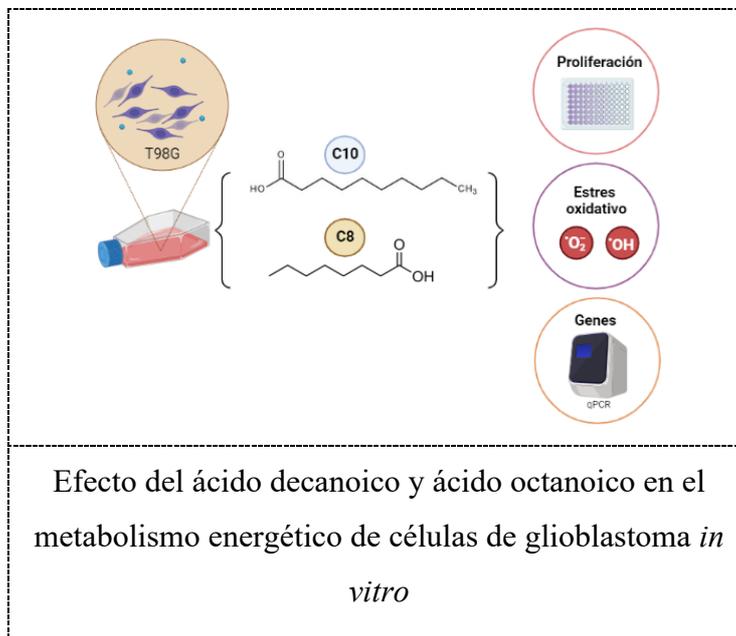


**Evaluación *in vitro* de los ácidos octanoico y decanoico como tratamiento para el  
cáncer de glioblastoma**

***In vitro* evaluation of octanoic and decanoic acids as treatment for glioblastoma  
cancer**

**Graphical Abstract**



**Evaluación *in vitro* de los ácidos octanoico y decanoico como tratamiento para el  
cáncer de glioblastoma**

*In vitro evaluation of octanoic and decanoic acids as treatment for glioblastoma  
cancer*

*Dayana Katerine Garcia Daza*

*Programa de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad Antonio Nariño.*

*Dirigido por: Mónica Losada Barragán PhD; Yulieth Alexandra Upegui Zapata PhD.*

## **Resumen**

El glioblastoma es el tumor más agresivo y maligno del cerebro, con una tasa de supervivencia no mayor a los 12 meses. En la actualidad se ha evidenciado resistencia a los tratamientos, por lo que hay una necesidad de explorar terapias adyuvantes de los ya existentes. Entre los que se encuentra la dieta cetogénica a base de ácidos grasos libres de cadena media que ha demostrado propiedades antiangiogénicas, antiinflamatorias y proapoptóticas en diversas enfermedades. En este estudio se evaluó la proliferación celular, el estrés oxidativo, y la expresión relativa de los genes tumorales *PTEN*, *CCND3*, *HIF 1α* y *BCL2* en las células T98G después de la adición de ácido octanoico y decanoico durante 3 días. Se encontró una reducción en la proliferación celular, en los niveles de superóxido y especies reactivas de oxígeno tanto en células tratadas con ácido octanoico como con ácido decanoico. Además, se evidenció una reducción de *BCL2* en células con ácido decanoico y un aumento en la expresión de *PTEN* con ácido octanoico bajo en glucosa lo que sugiere una recuperación en el control de muerte celular. El estudio demuestra el uso potencial *in vitro* de los ácidos grasos de cadena media como terapia adyuvante.

## **Abstract**

Glioblastoma is the most aggressive and malignant tumor of the brain, with a survival rate of no more than 12 months. Currently, resistance to treatments has been evidenced, so there is a need to explore adjuvant therapies to those that already exist. Among them is the ketogenic diet based on medium-chain free fatty acids, which has shown antiangiogenic, anti-inflammatory and proapoptotic properties in various diseases. In this study, cell overload, oxidative stress, and the relative expression of *PTEN*, *CCND3*, *HIF 1α*, and *BCL2* tumor genes in T98G cells after octanoic and decanoic acid supplementation for 3 days were evaluated. A reduction in cell turnover, superoxide levels and reactive

oxygen species was found in both octanoic acid and decanoic acid treated cells. In addition, a reduction of BCL2 in cells with decanoic acid and an increase in the expression of PTEN with low glucose octanoic acid is evidenced, which suggests a recovery in the control of cell death. The study demonstrates the potential in vitro use of medium chain fatty acids as adjuvant therapy.

**Keywords:** glioblastoma, decanoic acid, octanoic acid, oxidative stress, proliferation

## Introducción

El glioblastoma (GB) es el tumor cerebral más agresivo, maligno y común en el cerebro, aunque también puede presentarse en la médula espinal, cerebelo y tronco encefálico (Davis, 2016). El GB representa el 14,5% de todos los tumores del Sistema Nervioso Central (SNC) (Grochans et al., 2022), el 48,6% de los tumores malignos y posee una incidencia a nivel mundial de 3-4 casos por cada 100.000 personas al año (Cortes et al., 2022). En su mayoría esta enfermedad afecta a personas >40 años y según el Registro Central de Tumores Cerebrales de Estados Unidos la incidencia de GB aumenta con la edad llegando a un pico máximo entre los 75-80 años afectando principalmente a los hombres (Grochans et al., 2022). En pacientes menores de 70 años la supervivencia promedio es de 15 meses, en edad avanzada alrededor de 9 meses (Lombardi et al., 2019) y solo el 10% vive más de los 5 años (Lara-Velazquez et al., 2017). Sin embargo, en Colombia se desconoce la epidemiología actual del GB.

El GB está clasificado de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) como primario o secundario. El glioblastoma primario o IDH (isocitrato deshidrogenasa) tipo salvaje es el más común ya que abarca un 90% de los casos en adultos mayores de 55 años y el glioblastoma secundario o IDH mutante solo afecta al 10% de los casos (Ohgaki & Kleihues, 2013), comúnmente en jóvenes por la progresión de un astrocitoma difuso de bajo grado (II -III) a un grado más alto (IV) (Wesseling, 2018). El tumor se forma en las células gliales principalmente en los astrocitos y se clasifica histopatológicamente como un tumor maligno de grado alto por la presencia de necrosis, una alta tasa de proliferativa, angiogénesis y capacidad migratoria (Lara-Velazquez et al., 2017; Wirsching et al., 2016).

Este cáncer se caracteriza por una heterogeneidad celular, diversas alteraciones genéticas como la pérdida de la expresión del gen homólogo de fosfatasa y tensina (*PTEN*) (Soomro et al., 2017), la presencia de hipoxia en todo el tumor por la sobreexpresión del factor *HIF* entre otros marcadores moleculares, que ha revelado no solo su complicado perfil genético si no también la dificultad del desarrollo de una cura (Davis, 2016).

Actualmente, el GB es tratado con una resección del tumor que es difícil de lograr por su

ubicación, tamaño y amplia infiltración en el tejido cerebral normal (Lara-Velazquez et al., 2017). Después de la resección, el GB se controla con radioterapia adyuvante fraccionada combinada con el agente alquilante temozolomida (TMZ) y quimioterapia (Grochans et al., 2022). Sin embargo, se ha encontrado que el 50% de los pacientes tratados con TMZ son resistentes al tratamiento (Lara-Velazquez et al., 2017) y suelen presentar efectos secundarios neurológicos progresivos durante la evolución de la enfermedad, como por ejemplo convulsiones que deben ser tratados con terapia antiepiléptica (Tan et al., 2020).

Adicionalmente, el GB es resistente a las terapias mencionadas debido a su microambiente tumoral heterogéneo (Lin et al., 2019), proliferación celular descontrolada, resistencia a la muerte celular por sobreexpresión del protooncogén *BCL2*, entre otros factores (Alves et al., 2021). Aunque se han evaluado tratamientos como la inmunoterapia, combinando la bevacizumab con temozolomida en radioterapia, estos no han mejorado la tasa de supervivencia de quienes padecen GB (Chinot et al., 2014; Medikonda et al., 2021). Por lo anterior, es importante evaluar nuevos tratamientos adyuvantes para mejorar la tasa de sobrevida y reducir los efectos secundarios de las terapias disponibles.

La dieta cetogénica (DC) es una dieta alta en grasas, baja en carbohidratos y adecuada en proteínas, la cual favorece la síntesis de cuerpos cetónicos como fuente de energía para las células sanas. En contraste, en células tumorales se ha evidenciado la incapacidad para utilizar estos metabolitos como fuente energética debido al metabolismo tumoral (Martin-McGill et al., 2020; Maurer et al., 2011). Las células cancerosas adquieren de manera selectiva nutrientes del espacio extracelular, promoviendo el alto paso de glucosa para obtener energía a través de la glucólisis. Sin embargo, estas células pueden sobrevivir por medio de la glucólisis aeróbica, en donde hay una producción de lactato que da lugar a la síntesis de ATP sin emplear el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa, proceso conocido comúnmente en cáncer como efecto Warburg (Vander Heiden et al., 2009). Aunque es una ruta menos eficiente energéticamente que la fosforilación oxidativa, esta vía metabólica favorece la proliferación celular del tumor en condiciones hipóxicas y también se ha postulado que le permite generar precursores anabólicos para la síntesis de ácidos grasos y ácidos nucleicos con el objetivo de alimentar el

mantenimiento celular (Agnihotri & Zadeh, 2016). En consecuencia, es de esperarse que la deficiencia en glucosa de la DC reduzca la capacidad del tumor de realizar glicólisis y limitar la energía necesaria para el crecimiento tumoral.

En adición, las células de GB son incapaces de metabolizar los cuerpos cetónicos no solo por la disfunción y cambio metabólico de las mitocondrias sino también porque se ha evidenciado en gliomas de grado III y IV niveles de expresión bajos en enzimas cetolíticas (Chang et al., 2013). Por lo tanto, la administración de una DC proporcionaría una fuente de energía a las células gliales y las neuronas sanas con mitocondrias funcionales para oxidar los cuerpos cetónicos, pero limitando la fuente de energía al glioblastoma dependiente de glucosa.

Entre las variaciones existentes de la DC, el uso de los ácidos grasos de cadena media (AGCM), como el ácido decanoico (C10) y ácido octanoico (C8) provenientes del aceite de coco, aceite de almendra de palma, etc (Fernando et al., 2015), han demostrado ser eficaces en pacientes con epilepsia por su rápida absorción, oxidación y reducción de convulsiones a través de la inhibición de receptores AMPA (ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico) y el aumento en la función mitocondrial cerebral (Augustin et al., 2018). La dieta con AGCM ha demostrado efectos beneficiosos en enfermedades neurodegenerativas (Cunnane et al., 2020) como el Alzheimer (Avgerinos et al., 2020) y el Parkinson (Krikorian et al., 2019) por mejorar el rendimiento cognitivo, reducir la inflamación, contribuir a la actividad neuroprotectora del cerebro, disminuir las especies reactivas de oxígeno (ROS) y reforzar las funciones motoras (Rusek et al., 2019; Shaafi et al., 2016).

En comparación con los ácidos grasos de cadena larga (AGCL), los AGCM son absorbidos y metabolizados más rápidamente. Se transportan al hígado desde el tracto intestinal unida parcialmente a albumina plasmática, donde luego ingresan a la membrana mitocondrial interna como ácidos libres sin requerir la lanzadera carnitina como los AGCL ni ser esterificados. Posteriormente, son activados a acetil CoA para iniciar la  $\beta$ -oxidación mitocondrial y en exceso formar los dos cuerpos cetónicos comúnmente sintetizados en la cetogénesis, el acetoacetato (AcAc) e  $\beta$ -hidroxibutirato (bHB) (Grabacka et al., 2016; Schönfeld & Wojtczak, 2016) para proporcionar energía a los tejidos no

hepáticos (Damiano et al., 2020). Además, no solo los AGCM son metabolizados en el hígado, estos pueden a travesar la barrera hematoencefálica (Spector, 1988) y producir cuerpos cetónicos en los astrocitos (Edmond et al., 1987) funcionando como combustible metabólico en este linaje celular (Jensen et al., 2020).

Notablemente, el impacto positivo de los AGCM en el cerebro en casos como la epilepsia ha sido estudiado, sin embargo, en glioblastoma faltan estudios que evalúen el uso de la dieta con AGCM en la progresión tumoral y metabolismo cerebral. Por tanto, este trabajo aborda los efectos de los ácidos decanoico y octanoico en proliferación celular, estrés oxidativo y marcadores tumorales en una línea celular *in vitro* de GB.

## **1. Materiales y métodos**

### **1.1 Condiciones del cultivo celular**

Las células T98G (glioblastoma humano) se cultivaron inicialmente en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) con 4.5 g/L glucosa (medio alto en glucosa) suplementado con suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor al 10% (v/v) y Penicilina/Estreptomina al 1% (antibiótico/antimicótico) a una temperatura de 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente algunas células fueron cultivadas en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) con 1g/L de glucosa (medio bajo en glucosa) en iguales condiciones.

Los ácidos grasos fueron evaluados a una concentración de 250 μM, dato reportado en pacientes humanos evaluados bajo una dieta con ácidos grasos de cadena media (Gough et al., 2021; Puchalska & Crawford, 2017). Los grupos experimentales evaluados fueron: (1) células sin tratamiento; (2) ácido octanoico; (3) ácido decanoico; y (4) ácido palmítico como control al ser un AGCL.

Cada una de las condiciones experimentales se realizó en medio DMEM alto y bajo en glucosa durante 72 horas, con el propósito de simular la dieta cetogénica. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

## **1.2 Ensayo de proliferación celular**

Con el objetivo de evaluar los efectos de ácidos decanoico y octanoico en proliferación celular se realizaron ensayos MTT. El ensayo de MTT es una prueba colorimétrica basada en la reducción de la sal tetrazolio (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) a través de las enzimas reductoras mitocondriales a cristales de formazán (Präbst et al., 2017).

Para este ensayo se sembraron 10.000 células/pozo en placas de cultivo celular de 96 pozos en medio alto en glucosa y bajo en glucosa, se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas para permitir su adhesión a la placa. Posteriormente, las células fueron incubadas con los diferentes tratamientos y monitoreadas a 0, 24, 48 y 72 horas. En cada tiempo a evaluar, se adicionaron 10µL de MTT a 5 mg/mL por pozo y se incubaron durante 4 horas a 37°C. Pasado el tiempo, se verificó la formación de cristales por observación en microscopio invertido, se retiró el medio, se adicionaron 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) y durante 30 minutos se incubó para solubilizar los cristales formados. Luego, la absorbancia se midió a 570 nm en un lector de microplacas (Thermo Scientific).

## **1.3 Prueba de estrés oxidativo**

Para evaluar el efecto de los ácidos grasos en estrés oxidativo, se cuantificaron los niveles relativos de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y de superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) en células adheridas en placa, utilizando el kit de detección de superóxido/ROS celular de acuerdo con el fabricante (ab139476, Abcam). Resumidamente, en placas de cultivo celular de 96 pozos, se cultivaron 5.000 células con sus respectivos tratamientos durante 3 días hasta alcanzar una confluencia de 70-80%. Posterior al tiempo de incubación con los ácidos grasos, se retiró el medio de las células, se lavaron con tampón de lavado 1x, y a las células tratadas se les adicionó 100 µL de solución de detección de ROS/superóxido 2x. A las células seleccionadas para el control positivo se les adicionó 100 µL de piocianina (200µM) como inductor ROS y para el control negativo se adicionó 100 µL del inhibidor N- acetil-L-cisteína (5 mM)

durante 30 minutos a 37°C en oscuridad. Finalmente, la fluorescencia fue determinada en cada placa en un lector de microplacas de fluorescencia (Cytation™ 3) con un juego de filtros estándar de fluoresceína (Ex: 488nm, Em: 520nm) y rodamina (Ex:550nm, Em:610nm) en el modo de punto final (abcam, 2021).

## **1.4 Evaluación de expresión génica**

### **1.4.1 Extracción de ARN**

Con el propósito de evaluar la expresión de los genes tumorales involucrados en proliferación celular, muerte e hipoxia bajo las diferentes condiciones experimentales, en una placa de 6 pozos se cultivaron  $2 \times 10^5$  células por pozo, con los diferentes tratamientos y condiciones descritas anteriormente. Posteriormente, se realizó una extracción de RNA, transcripción reversa y PCR en tiempo real.

Por cada pozo se adicionó 400 µl de trizol durante 5 minutos, reactivo diseñado para el aislamiento del ARN total. Posterior a esto, se adicionó cloroformo con el objetivo de separar las muestras en tres fases: fase inferior de fenol cloroformo, en el medio el ADN y en la fase superior el ARN incoloro. En un nuevo tubo eppendorf se transfirió la capa superior y se extrajo el ARN, este se precipitó con 500 µL isopropanol y se incubó temperatura ambiente durante 10 minutos. Luego las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 12000 g, el pellet obtenido se lavó con etanol y se volvió a centrifugar. El sobrenadante se descartó y el pellet formado se homogenizó con agua libre de RNAsas para posteriormente ser incubado por 10 minutos a 55°C y almacenado a -70°C.

La pureza y la cantidad del ARN fue medida por el equipo NanoDrop Spectrophotometer (DeNovix) en longitudes de onda de 260/280 y 260/230.

### **1.4.2 Transcripción reversa**

Las muestras de RNA fueron retrotranscritas a cDNA a través del kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (No. 4374966, Applied Biosystems). Cada muestra de ARN a una concentración de 1µg fue diluida a 10 µL en agua libre de RNAsas. Por cada dilución se adicionó una mix de buffer RT, transcriptasa reversa MultiScribe, mezcla de dNTP, inhibidor de RNAsas, primers aleatorios, y agua libre de nucleasas según los volúmenes indicados por el fabricante (Thermo Fisher Scientific, 2018). En un tubo eppendorf se mezcló 10 µL de máster mix 2X RT con 10 µL de ARN muestra que posteriormente fueron homogeneizados. Las muestras fueron retrotranscritas empleando el termociclador Bio-Rad T100™ bajo las siguientes condiciones: 25°C durante 10 minutos; 37°C durante 120 minutos; 85°C durante 5 minutos; y 4°C. El ADNc se almaceno a -20°C.

### **1.4.3 PCR en tiempo real**

Las muestras de ADNc obtenidas bajo los diferentes tratamientos experimentales fueron analizadas por PCR en tiempo real para los genes descritos en la tabla 1. Las reacciones de qPCR se realizaron en el termociclador CFX96™ (Bio-Rad) y mezcla del agente intercalante SYBR Green. La activación de la enzima fue a 95°C durante 2 minutos y posteriormente se realizaron 40 ciclos que se compone de tres etapas: la desnaturalización a 95°C por 15 segundos, el anillamiento (descrito en la tabla 1 ), y la elongación a 70°C durante 32 segundos). Por cada corrida de gen se incluyó un control negativo compuesto por mix y agua libre de RNAsas sin muestra. Al finalizar cada amplificación, se realizó una curva de disociación con el propósito de evaluar la formación final de un solo producto acuerdo a la temperatura de disociación y la gráfica de un sola curva o campana de gauss.

*Tabla 1. Genes tumorales asociados a glioblastoma*

Nombre	Gen	Molde	Secuencia	T° Anillamiento
Fosfoglicerato quinasa 1	<i>PGK 1</i> (constitutivo)	Forward	CGGGTCGTTATGAGAGTCG	58°C
		Reverse	AATTTGATGCTTGGGACAGC	
		Reverse	CACTGTGTTGGCATAACAGGT	58°C
Regulador de apoptosis BCL2	<i>BCL2</i>	Forward	GACTGAGTACCTGAACCGGC	58°C
		Reverse	GTTCCACAAAGGCATCCCAGC	
Homólogo de fosfatasa y tensina	<i>PTEN</i>	Forward	TTTTAAAGGCACAAGAGGCC	60°C
		Reverse	GGGAATAGTTACTCCCTTTTTGT	
Ciclina D3	<i>CCND3</i>	Forward	TTACTGGATGCTGGAGGACT	58°C
		Reverse	TGAAGGCCAGGAAATCATGT	
Factor inducible de hipoxia	<i>HIF 1</i>	Forward	GGTCTAGGAACTCAAACCTGA	58°C
		Reverse	GACGTTCAGAACTTATCCTACCAT	

### 1.5 Análisis de datos

A través del software GraphPad Prism, Versión 8.0 se realizó los análisis estadísticos. Cada dato de este estudio se expresó como la media  $\pm$  Desviación estándar (SD). Se realizó el análisis estadístico con una ANOVA bidireccional y posteriormente una prueba post hoc Tukey. Los valores con un  $p < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos.

Los datos de fluorescencia para la determinación de los niveles de ROS/Superóxido se normalizaron utilizando las lecturas de los pozos vacíos de la placa y se aplicó inicialmente la prueba de normalidad Shapiro-Wilk, y luego, se realizó una ANOVA unidireccional donde el valor  $p < 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo.

Empleando el método  $\Delta\Delta Ct$  y los niveles de ARN del gen constitutivo PGK se cuantificó la expresión relativa del ARNm, con base a la fluorescencia de cada gen, y las eficiencias de amplificación (Pfaffl, 2004).

## 2. Resultados y Discusión

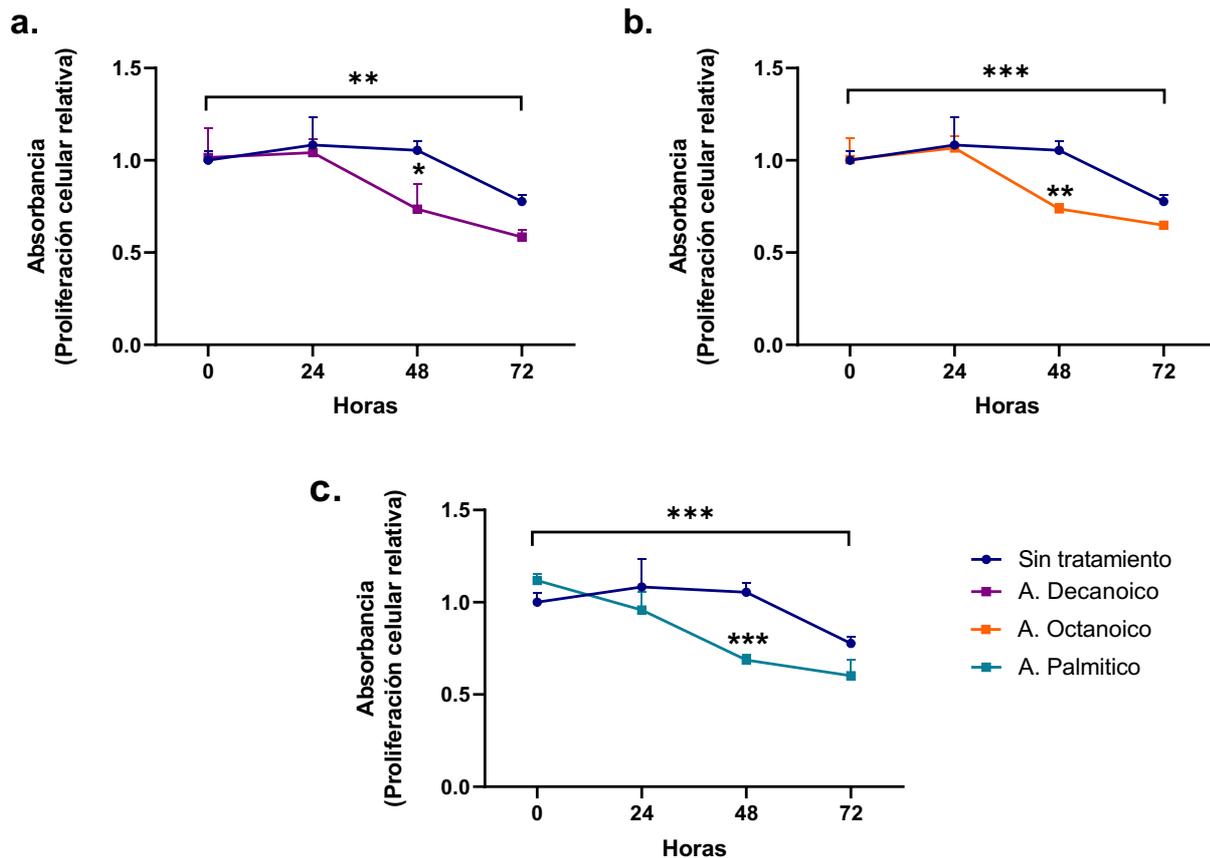
### 2.1 Efecto del ácido octanoico y decanoico en proliferación celular

Las células de GB al igual que otro tipo de células tumorales sufren cambios moleculares y celulares que conllevan a la activación de vías de señalización oncogénicas reguladoras de la glucólisis aeróbica, supervivencia y la proliferación celular. A medida que las células tumorales van aumentando en número requieren una mayor cantidad de un sustrato energético como la glucosa para el mantenimiento celular a través del efecto Warburg, lo que sugeriría que una depleción en el precursor de vías glucolíticas podría reducir la supervivencia de estas células. Por ello, en este trabajo disminuimos la concentración de glucosa y suministramos AGCM como el ácido octanoico y decanoico en las células T98G de glioblastoma con el fin de simular las condiciones de una dieta cetogénica y observar su influencia en la tasa proliferativa.

Los efectos inducidos por cada ácido graso en la proliferación celular se evaluaron en relación con las células sin tratamiento y cultivadas en medio bajo en glucosa a 0, 24, 48 y 72 horas (figura 1). A las 24 horas no se evidenciaron cambios significativos con ningún AGCM, ostentando un comportamiento similar al reportado previamente en otro estudio (Damiano et al., 2020). En contraste, a las 48 horas de incubación el ácido octanoico ( $p = 0.0021$ ) y ácido palmítico ( $p = 0.0009$ ) presentaron una reducción significativa en la proliferación celular con mayor significancia que las células con ácido decanoico ( $p = 0.0199$ ) en comparación con el control de células sin tratamiento (figura 1b y c). A las 72 horas, el ácido decanoico ( $p = 0.0019$ ), octanoico ( $p = 0.008$ ) y palmítico ( $p = 0.0004$ ) también tuvieron una reducción significativa en la proliferación en comparación con las células sin tratamiento en el tiempo 0 como lo evidencia la figura 1 y una mayor reducción en la proliferación que a las 48 horas respecto al tiempo 0.

Se esperaba observar una mayor reducción en proliferación por parte de los AGCM octanoico y decanoico respecto al AGCL, no obstante, el ácido palmítico promovió una mayor disminución de la proliferación celular, indicando que la presencia de ambos ácidos grasos tanto de cadena media como

larga impactan en la viabilidad celular de las células tumorales. Este hallazgo es similar a un estudio con células de glioblastoma y neuroblastoma, donde el ácido palmítico mostró citotoxicidad en una concentración  $\geq 200 \mu\text{M}$  a las 48 h (Wen Ng & How Say, 2018). Efecto que se ha vinculado a la inducción de apoptosis por parte del ácido palmítico al aumentar la relación Bax/Bcl2 y la caspasa 3 (Z. Wang et al., 2012; Zhang et al., 2022).



**Figura 1. Efecto de los ácidos octanoico y decanoico en la proliferación celular de células T98G en medio bajo en glucosa.** La tasa de proliferación en las células se evaluó por MTT durante 4 tiempos: 0, 24, 48, y 72 horas en un medio bajo en glucosa suplementado con el tratamiento. **a)** Proliferación de células sin tratamiento y células tratadas con ácido decanoico (250  $\mu\text{M}$ ), **b)** ácido octanoico (250  $\mu\text{M}$ ) **c)** ácido palmítico (250  $\mu\text{M}$ ). Los valores están normalizados con respecto a la absorbancia promedio de las células sin tratamiento en tiempo 0 (proliferación celular relativa). Los datos fueron analizados empleando una ANOVA bidireccional y una prueba post hoc Tukey para comparaciones múltiples entre grupos (\*  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.002$ , \*\*\* $p < 0.0002$ )

Para verificar si la reducción en proliferación celular inducida por los ácidos grasos era también

influenciada por la disponibilidad de glucosa en el medio se empleó el mismo diseño experimental utilizando un medio base alto en glucosa. Notablemente no se identificaron efectos antiproliferativos de ningún AG y los datos no fueron comparables por el número de células dada la alta tasa de crecimiento. Lo anterior soporta que la presencia de altas concentraciones de glucosa constituye la principal fuente energética de las células tumorales por encima de otros sustratos como los ácidos grasos.

El evento observado concuerda con la premisa de que condiciones hipóxicas la glucosa continua a través de la glucólisis anaerobia donde las moléculas de piruvato se convierten a lactato. Al limitar la glucosa como fuente primaria de energía, las células tumorales empiezan a reducir su proliferación ya que no pueden emplear los ácidos grasos como fuente energética, posiblemente debido a una disfunción mitocondrial y a la disminución de las enzimas cetolíticas mitocondriales ( OXCT1 y BDH1) como ha sido reportado previamente en gliomas humanos (Chang et al., 2013). Asimismo, en neuroblastoma también se ha observado una afectación de la vía cetogénica, asociada con una disminución en la expresión de la succinil-coenzima A:3 oxoácido coenzima A transferasa (SCOT), una enzima clave en el metabolismo de cuerpos cetónicos (Skinner et al., 2009).

Previamente, ha sido descrito que una restricción en glucosa y un alto nivel de cetonas en modelos *in vitro* e *in vivo* de glioblastoma atenúa la proliferación de las células tumorales (Martuscello et al., 2016)

En contraposición, se ha reconocido que las células astrocíticas sanas si pueden metabolizar el ácido decanoico y octanoico y emplearlo como fuente de energía (Andersen et al., 2021). Estudios desarrollados en astrocitos de células madre pluripotentes indican que el ácido octanoico podría ser un sustrato o estimular la cetogénesis al tener una cadena de carbonos más corta y aumentar el metabolismo de los cuerpos cetónicos  $\beta$ -hidroxibutirato (bHB) y acetoacetato (AcAc) (Damiano et al., 2020; Sonnay et al., 2019; Thevenet et al., 2016). Sin embargo, el mismo estudio concluyó que el ácido decanoico acelera la liberación de lactato a través la glucólisis (Thevenet et al., 2016) y estimula la síntesis de ácidos grasos mediado por el receptor activado por proliferadores peroxisómico gamma (PPAR $\gamma$ ) (Damiano et al., 2020). Por tanto, más estudios son necesarios para elucidar el rol metabólico de cada

ácido graso en células de glioblastoma.

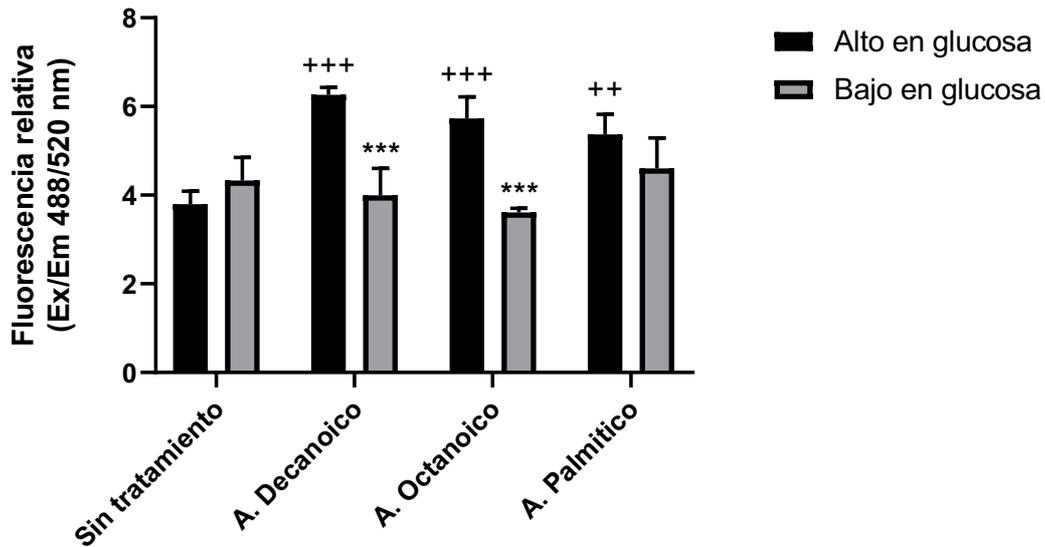
## 2.2 Efecto del ácido octanoico y decanoico en el estrés oxidativo

En las células, las especies reactivas de oxígeno (ROS) como el anión radical superóxido, el radical hidróxido, el peróxido de hidrógeno, el óxido nítrico son moléculas subproducto del metabolismo del oxígeno en la vía de la fosforilación oxidativa y cumplen un papel en la señalización intracelular como la muerte celular, la señalización del factor de crecimiento/insulina, etc. Para evitar su exceso y mantener un sistema redox en equilibrio, las células regulan las ROS a través de una serie de proteínas y moléculas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), catalasas, peroxidasas entre otras (Hayes et al., 2020). Sin embargo, en células cancerosas los niveles de ROS son altos a raíz de una deficiencia en enzimas antioxidantes, una alta actividad metabólica por la sobreexpresión de genes involucrados en las vías glucolíticas y una disfunción mitocondrial debido a hipoxia, sobreexpresión de factores de crecimiento, etc (Hayes et al., 2020). La sobre-producción de ROS estimula la supervivencia y la proliferación celular al inhibir proteínas supresoras de tumores además estimular vías antiapoptóticas (Salazar-Ramiro et al., 2016) promoviendo la invasión tumoral (Rinaldi et al., 2016).

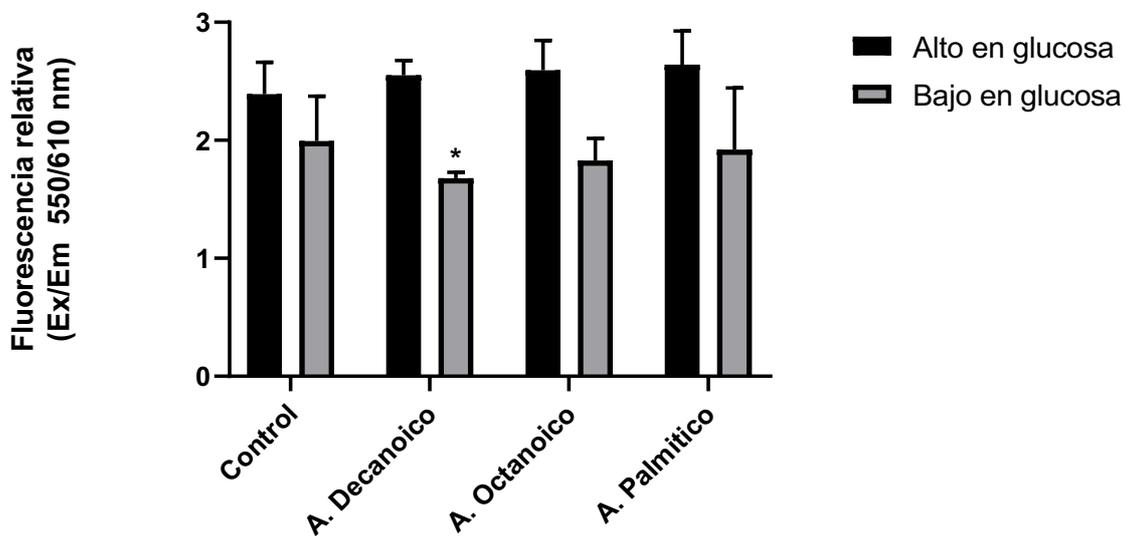
En las células cultivadas en medio bajo en glucosa no se observaron diferencias significativas entre las diferentes condiciones experimentales (Figura 2) pero en las células cultivadas en medio alto en glucosa se evidenció un aumento significativo de ROS en las células tratadas con ácido decanoico ( $p = 0.0002$ ), y octanoico ( $p = 0.010$ ) sobrepasando incluso al ácido palmítico ( $p = 0.0037$ ) respecto a las células sin tratamiento (Figura 2), comportamiento muy similar a los niveles de superóxido en la Figura 3. Notablemente, al comparar la producción de ROS de las células en medio bajo en glucosa con medio alto en glucosa se observó una reducción significativa en los niveles de ROS en los grupos suplementados con ácido decanoico ( $p = 0.0007$ ), y octanoico ( $p = 0.0003$ ) (Figura 2), indicando que el uso de estos ácidos grasos reduce la producción de ROS y por tanto la producción superóxido.

El comportamiento en los niveles de ROS fue similar al observado en los niveles de superóxido, siendo sus niveles inferiores en células cultivadas en medio bajo en glucosa en comparación con el medio alto en glucosa (Figura 3). Sin embargo, al observar los niveles de superóxido hubo una disminución significativa exclusivamente con el tratamiento realizado con el ácido decanoico ( $p = 0.0352$ ) (Figura 3). Este hallazgo se alinea con estudios previos realizados en células de neuroblastoma tratadas con ácido decanoico, el cual redujo los niveles de ROS y superóxido intracelulares independientes de su metabolización a cuerpo cetónico (Mett & Müller, 2021). El mecanismo que ha sido propuesto sugiere un aumento de la biosíntesis mitocondrial y la regulación de las enzimas superóxido dismutasa 2 (SOD 2) y catalasa a través SIRT1, enzima que regula la desintoxicación de ROS (Dabke & Das, 2020) y la activación del receptor  $\gamma$  del activador de la proliferación de peroxisomas PPAR $\gamma$  (Hughes et al., 2014). En adición, se ha identificado que en células primarias de astrocitos el efecto del ácido decanoico es mediado por: (i) el aumento del flujo de protones a través de la membrana mitocondrial interna protegiendo a las células de ROS; (ii) la regulación positiva en la expresión de genes antioxidantes; (iii) la actividad de catalasa (Andersen et al., 2021); y (iv) el aumento de las concentraciones de glutatión (Sonnay et al., 2019). Por tanto, es posible esperar que la reducción de ROS observada en células de glioblastoma tratadas con medio bajo en glucosa y enriquecido en AGCM confieran propiedades antioxidantes mediante los mecanismos descritos.

Por otro lado, en el ácido palmítico no se evidenció una diferencia significativa en los niveles de ROS en medio bajo en glucosa, pero si aumento los niveles de ROS en el medio alto en glucosa con respecto al control (Figura 2). Lo que sugiere que tanto la degradación de glucosa como la del ácido palmítico proporcionan moléculas de FADH<sub>2</sub> y NADH que posteriormente al ser oxidadas para la formación de ATP aumenta los niveles de ROS (Wen Ng & How Say, 2018).



**Figura 2. Efecto de los ácidos octanoico y decanoico en los niveles de ROS en células T98G.** La producción intracelular de ROS fue detectada mediante la medición de fluorescencia a 488 y 520 nm para cada tratamiento en un medio bajo y alto en glucosa. Los valores fueron normalizados con respecto a los pozos vacíos de la placa. Los datos fueron analizados empleando una ANOVA bidireccional y una prueba post hoc Tukey (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.002$ , \*\*\* $p < 0.0002$ ).



**Figura 3. Efecto de los ácidos octanoico y decanoico en los niveles de superóxido en células T98G.** La producción de superóxido en las células se detectó mediante la medición de fluorescencia a 550 nm y 610 nm para cada tratamiento en un medio bajo y alto en glucosa. Los valores fueron normalizados con respecto a los pozos vacíos de la placa. Los datos fueron analizados empleando una ANOVA bidireccional y una prueba post

hoc Tukey (\* $p < 0.05$ ).

### 2.3 Efecto de ácido octanoico y decanoico en genes tumorales

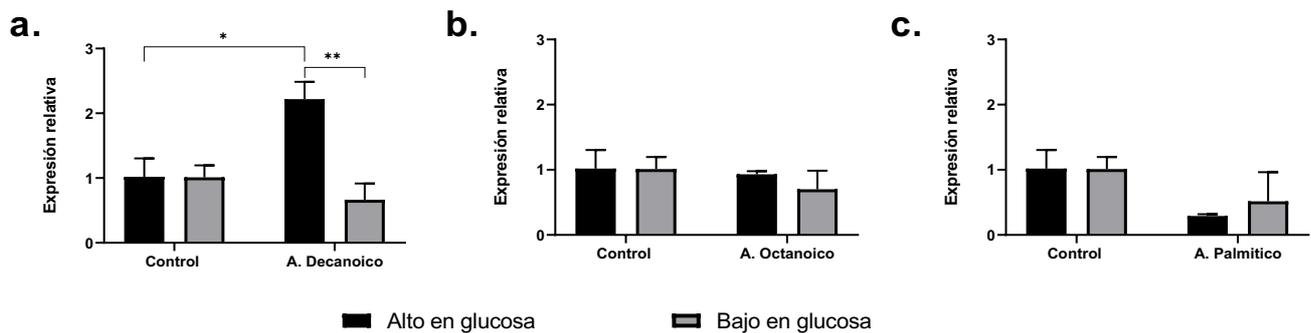
El GB suele presentar diversas alteraciones genéticas que controlan en las células cancerosas aspectos celulares esenciales como la proliferación, metabolismo, supervivencia celular, entre otros procesos. Dentro de los genes que participan en esas características celulares fueron seleccionados *BCL2*, *PTEN*, *CCND3* y *HIF 1A* para su análisis de expresión génica en las células de glioblastoma en los diferentes grupos experimentales descritos.

*BCL2* (linfoma de células B2) es un gen que codifica una proteína de membrana externa mitocondrial que bloquea la muerte apoptótica, es decir, juega un papel antiapoptótico en células sanas. *BCL2* se une a la proteína BAX, interacción que favorece la regulación antiapoptótica (Warren et al., 2019) ya que BAX tras un estímulo activa la vía intrínseca de la apoptosis (también conocida como vía mitocondrial) y da paso a la apertura de poros en la membrana mitocondrial para la liberación de citocromo c al citosol y la cascada de señalización de caspasas. Entre los estímulos inductores de apoptosis se encuentra el daño de ADN, carencia de factores de crecimiento, la privación de glucosa, entre otros (Pfeffer & Singh, 2018).

En células cultivadas en medio alto en glucosa, *BCL2* presentó un aumento significativo en su expresión en el tratamiento con ácido decanoico ( $p = 0.0147$ ) (Figura 4a) lo que concuerda con la premisa de que las células tumorales emplean la glucosa como fuente de energía para la proliferación y regula los genes involucrados en apoptosis (Krętowski et al., 2016). Sin embargo, no hay evidencia que confirme el papel del ácido decanoico. En contraste, en células cultivadas en medio bajo en glucosa no se observó este mismo comportamiento, pero se observa una diferencia significativa entre los niveles de expresión de *BCL2* en el grupo con ácido decanoico en las células con medio alto y bajo en glucosa ( $p = 0.0048$ ). Por su parte, el tratamiento con ácido octanoico y ácido palmítico mostró un comportamiento similar entre las diferentes condiciones experimentales (Figura 1b, c).

En GB las células emplean varios mecanismos para evitar la muerte celular inducida por los

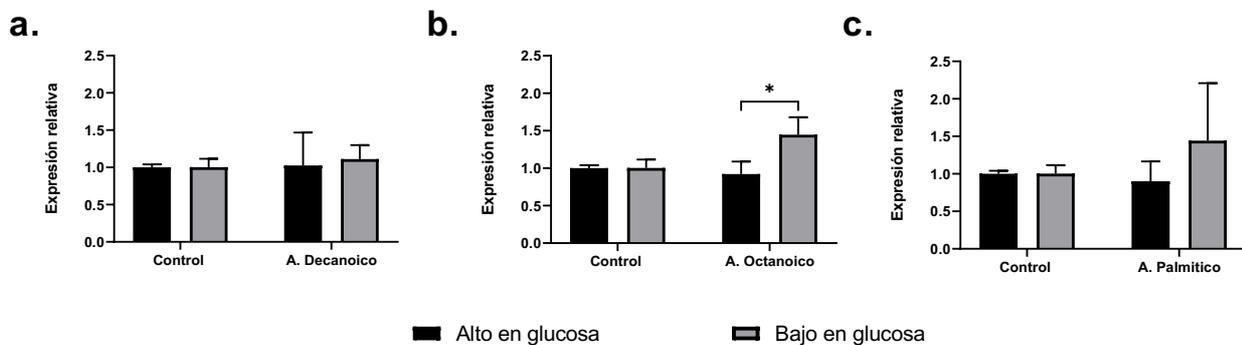
daños en el ADN y uno de ellos es inhibición de la apoptosis ya que se ha encontrado una desregulación al alza de BCL2 en tejidos tumorales de pacientes con GB y a la par una importante disminución de la proteína apoptótica BAX (Hosseini et al., 2021). Iniciar la apoptosis por esta vía intrínseca mitocondrial puede ser a través de la disminución de la síntesis de ATP además de la reducción del potencial de membrana mitocondrial (Nagy et al., 2015), por tanto, se espera aumentar la muerte celular a través de la dieta.



**Figura 4. Efecto de los ácidos octanoico y decanoico en la expresión relativa de BCL2 en células T98G.** Expresión relativa del gen determinado por qPCR en células con medio alto y bajo en glucosa tratadas con (a) ácido decanoico, b) ácido octanoico y c) ácido palmítico, contrastadas con células sin tratamiento (control). Los valores son expresados como relaciones normalizadas entre la expresión del gen BCL2 y el promedio del gen constitutivo PGK en cada tratamiento. Las diferencias estadísticas fueron analizadas una ANOVA bidireccional y una prueba post hoc Tukey (\*p < 0.05, \*\*p < 0.002).

Por su parte, la fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa o PTEN (homólogo de fosfatasa y tensina) es un gen supresor de tumores que codifica a una proteína con funciones de fosfatasa lipídica involucrada en el bloqueo de la vía de fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) /Akt/mTOR (Endersby & Baker, 2008; Grochans et al., 2022). En cáncer se ha evidenciado su mutación o pérdida de heterocigosidad desregulando diversos procesos celulares como el metabolismo, ciclo celular, supervivencia y proliferación celular (Hopkins et al., 2014). De hecho, estudios *in vitro* en células de

glioma han demostrado que una re-expresión de PTEN suprime la proliferación al detener la fase G1 del ciclo celular (Furnari et al., 1998). En este trabajo, el gen *PTEN* mostró una expresión relativa significativamente alta ( $p = 0.0366$ ) en las células con el tratamiento de ácido octanoico cultivadas en medio bajo en glucosa en comparación con las incubadas con este mismo ácido graso, pero en medio alto en glucosa (Figura 5b). Este hallazgo sugiere que el ácido octanoico en condiciones de bajos niveles de glucosa es capaz de inducir la expresión de PTEN, lo cual puede estar relacionado con la disminución en proliferación celular evaluada en el apartado 2.1. En contraste, los tratamientos ácido decanoico y ácido palmítico no evidenciaron una diferencia significativa entre los grupos experimentales (Figura 5a, c).



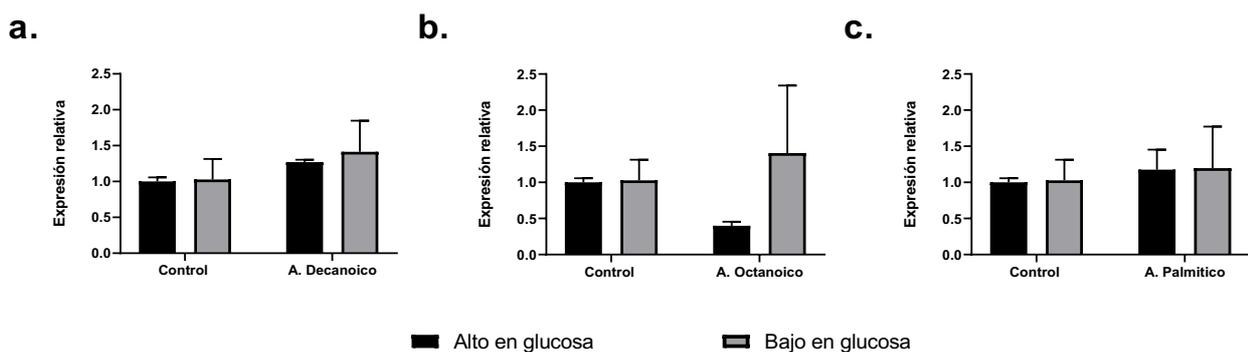
**Figura 5. Efecto de los ácidos octanoico y decanoico en la expresión relativa de *PTEN* de células T98G.**

Expresión relativa del gen determinado por qPCR en células con medio alto y bajo en glucosa tratadas con (a) ácido decanoico, b) ácido octanoico y c) ácido palmítico, contrastadas con células sin tratamiento (control). Los valores son expresados como relaciones normalizadas entre la expresión del gen *PTEN* y el promedio del gen constitutivo *PGK*. Las diferencias estadísticas fueron analizadas por una ANOVA bidireccional y una prueba post hoc Tukey ( $*p < 0.05$ ).

*HIF 1A* es un factor inducible por hipoxia que se expresa en la mayoría de las células en respuesta a bajos niveles de oxígeno y en algunas ocasiones en condiciones normóxicas en las células cancerosas por la inhibición de gen *PTEN*. Este gen en glioblastoma se activa por hormonas como la insulina, quinasas dependientes de ciclinas, ROS, etc para incrementar la tasa de expresión génica de genes diana como el factor de crecimiento endotelial (VEGF), GLUT1 y varias enzimas glucolíticas

que permiten la adaptación de las células a la hipoxia cambiando su metabolismo oxidativo al glucolítico además de dar paso a la angiogénesis tumoral (G. Wang et al., 2017). A pesar de que se esperaba una reducción del gen *HIF 1A* en las células suplementadas con ácido octanoico y decanoico en condiciones de baja en glucosa, no fue detectado en ninguna de las muestras analizadas posiblemente por no someter a las células a un ambiente bajo en oxígeno. Por tanto, para futuros estudios se considera el cultivo de células en una incubadora de hipoxia a 1 - 2 % de O<sub>2</sub> igualando las condiciones de incubación de 5% CO<sub>2</sub> y 37°C temperatura (Brose et al., 2014) o la adición de enzimas como la glucosa oxidasa o catalasa (Rinderknecht et al., 2021).

Por último, la ciclina D3 codificada por el gen *CCND3* es una proteína perteneciente al ciclo celular de los mamíferos que impulsa la proliferación celular y regula a la proteínas dependientes de ciclinas (CDK) (Ding et al., 2020). La ciclina D3 a través de PPAR $\gamma$  induce la actividad mitocondrial generando más ATP para conducir a la liberación del factor de transcripción E2F que promueve la transición de la fase G1 a S del ciclo celular (Icard et al., 2019). Al ser un punto clave de la proliferación se ha encontrado una sobreexpresión de este gen en glioblastoma (Büsches et al., 1999) y otros tipos de cáncer. Es decir que, en este estudio, al limitar la glucosa para la síntesis de ATP se esperaba una reducción en la expresión relativa de *CCND3*. Sin embargo, *CCND3* no mostró una expresión diferencial entre las células cultivadas en medio alto y bajo en glucosa, ni tampoco con los tratamientos con el ácido decanoico, octanoico y palmítico (Figura 6), lo que indicaría que las células independientemente del medio detuvieron su proliferación.



**Figura 6. Efecto de los ácidos octanoico y decanoico en la expresión relativa de *CCND3* de células T98G.**

Expresión relativa del gen determinado por qPCR en células con medio alto y bajo en glucosa tratadas con (a) ácido decanoico, b) ácido octanoico y c) ácido palmítico, contrastadas con células sin tratamiento (control). Los valores son expresados como relaciones normalizadas entre la expresión del gen *PTEN* y el promedio del gen constitutivo *PGK*. Las diferencias estadísticas fueron analizadas por una ANOVA bidireccional y una prueba post hoc Tukey.

### 3. Conclusión

Las células tratadas con los AGCM, octanoico y decanoico en medio bajo en glucosa presentan una reducción en la proliferación celular y producción de especies reactivas de oxígeno al transcurso de las 72 horas de tratamiento, efectos esperados en un tratamiento adyuvante para el glioblastoma.

En cuanto a la expresión de genes los dos AGCM, demostraron tener efectos diferentes en la expresión génica, induciendo el ácido decanoico la reducción del gen *BCL2* lo que sugiere que ejerce un efecto en la muerte celular vía apoptótica, mientras que el ácido octanoico aumenta la expresión del gen *PTEN* en medio bajo en glucosa reactivando la función de supresor tumoral y el control de la vía PI3K/Akt/mTOR.

En el presente estudio se demuestra que el ácido octanoico y decanoico tienen potencial *in vitro* como terapia adyuvante, al reducir la proliferación y cambiar el nicho tumoral reduciendo ROS y reactivando funciones de control en la supervivencia celular, su potencial debe confirmarse en evaluaciones en modelos *in vivo* de glioblastoma y debe valorarse su potencial uso en pacientes quimio resistentes.

### 4. Perspectivas.

- Plasmar este ensayo experimental en otros modelos de células gliales
- Evaluar la expresión del gen *HIF 1A* en algún modelo celular de glioblastoma bajo condiciones hipóxicas

- Determinar los metabolitos involucrados en la  $\beta$ -oxidación y PI3K/Akt/mTOR en células de glioblastoma bajo dieta cetogénica con AGCM para la evaluación de la biosíntesis de cuerpos cetónicos y la proliferación celular.
- Estudiar el efecto de los ácidos grasos octanoico y decanoico en la muerte celular por apoptosis.

### **Agradecimientos**

Agradezco la colaboración del grupo de investigación en Biología celular y funcional e ingeniería de biomoléculas de la Facultad de Ciencias y a la Universidad Antonio Nariño por proporcionarme el espacio y los equipos de trabajo. A la profesora Mónica Losada Barragán por tener tanta paciencia conmigo, enseñarme, corregirme a lo largo del trabajo, por ser tan comprensiva y apoyarme desde el inicio. A la profesora Yulieth Upegui por su insistencia, su apoyo, guía, comprensión y entusiasmo en la redacción del documento. A los profesores Carlos Bejarano y Yuly Bernal por apoyar mi proceso educativo y laboral. Quiero agradecer a Daniela Moreno por su amor, compañía y ser un soporte en este proceso tan difícil para mí y a Margarita Fierro, mi psicóloga por brindarme técnicas y bases para hacer este camino más ameno. Finalmente quiero agradecer a mi familia y compañeros de universidad que me han acompañado.

### **Referencias**

- abcam. (2021, December 29). *ROS/Superoxide Detection Assay Kit (Cell-based) (ab139476)*.
- Alves, A. L. v, Gomes, I. N. F., Carloni, A. C., Rosa, M. N., da Silva, L. S., Evangelista, A. F., Reis, R. M., & Silva, V. A. O. (2021). Role of glioblastoma stem cells in cancer therapeutic resistance: a perspective on antineoplastic agents from natural sources and chemical derivatives. *Stem Cell Research & Therapy*, 12(1), 206. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02231-x>

- Andersen, J., Westi, E., Jakobsen, E., Urruticoechea, N., Borges, K., & Aldana, B. (2021). Astrocyte metabolism of the medium-chain fatty acids octanoic acid and decanoic acid promotes GABA synthesis in neurons via elevated glutamine supply. *Molecular Brain*, *14*(1), 132.
- Augustin, K., Khabbush, A., Williams, S., Eaton, S., Orford, M., Cross, J. H., Heales, S. J. R., Walker, M. C., & Williams, R. S. B. (2018). Mechanisms of action for the medium-chain triglyceride ketogenic diet in neurological and metabolic disorders. *The Lancet Neurology*, *17*(1), 84–93. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30408-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30408-8)
- Avgerinos, K. I., Egan, J. M., Mattson, M. P., & Kapogiannis, D. (2020). Medium Chain Triglycerides induce mild ketosis and may improve cognition in Alzheimer’s disease. A systematic review and meta-analysis of human studies. *Ageing Research Reviews*, *58*, 101001. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2019.101001>
- Brose, S. A., Marquardt, A. L., & Golovko, M. Y. (2014). Fatty acid biosynthesis from glutamate and glutamine is specifically induced in neuronal cells under hypoxia. *Journal of Neurochemistry*, *129*(3), 400–412. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jnc.12617>
- Büsches, R., Weber, R. G., Actor, B., Lichter, P., Collins, V. P., & Reifenberger, G. (1999). Amplification and Expression of Cyclin D Genes (CCND1 CCND2 and CCND3) in Human Malignant Gliomas. *Brain Pathology*, *9*(3), 435–442. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1999.tb00532.x>
- Chang, H. T., Olson, L. K., & Schwartz, K. A. (2013). Ketolytic and glycolytic enzymatic expression profiles in malignant gliomas: implication for ketogenic diet therapy. *Nutrition & Metabolism*, *10*(1), 47. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-10-47>
- Chinot, O. L., Wick, W., Mason, W., Henriksson, R., Saran, F., Nishikawa, R., Carpentier, A. F., Hoang-Xuan, K., Kavan, P., Cernea, D., Brandes, A. A., Hilton, M., Abrey, L., & Cloughesy, T. (2014). Bevacizumab plus Radiotherapy–Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, *370*(8), 709–722. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1308345>
- Cortes, W., Torres, L., & Polo, J. (2022). *Características clínicas de pacientes con glioblastoma*

*multiforme primario y detección de la proteína MGMT por inmunohistoquímica: serie de casos.*

Autorea. <https://doi.org/10.22541/au.165183758.84762120/v1>

- Cunnane, S. C., Trushina, E., Morland, C., Prigione, A., Casadesus, G., Andrews, Z. B., Beal, M. F., Bergersen, L. H., Brinton, R. D., de la Monte, S., Eckert, A., Harvey, J., Jeggo, R., Jhamandas, J. H., Kann, O., la Cour, C. M., Martin, W. F., Mithieux, G., Moreira, P. I., ... Millan, M. J. (2020). Brain energy rescue: an emerging therapeutic concept for neurodegenerative disorders of ageing. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *19*(9), 609–633. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0072-x>
- Dabke, P., & Das, A. M. (2020). Mechanism of Action of Ketogenic Diet Treatment: Impact of Decanoic Acid and Beta—Hydroxybutyrate on Sirtuins and Energy Metabolism in Hippocampal Murine Neurons. *Nutrients*, *12*(8). <https://doi.org/10.3390/nu12082379>
- Damiano, F., de Benedetto, G. E., Longo, S., Giannotti, L., Fico, D., Siculella, L., & Giudetti, A. M. (2020). Decanoic Acid and Not Octanoic Acid Stimulates Fatty Acid Synthesis in U87MG Glioblastoma Cells: A Metabolomics Study. *Frontiers in Neuroscience*, *14*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00783>
- Davis, M. E. (2016). Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *Clinical Journal of Oncology Nursing*, *20*(5 Suppl), S2–S8. <https://doi.org/10.1188/16.CJON.S1.2-8>
- Ding, L., Cao, J., Lin, W., Chen, H., Xiong, X., Ao, H., Yu, M., Lin, J., & Cui, Q. (2020). The Roles of Cyclin-Dependent Kinases in Cell-Cycle Progression and Therapeutic Strategies in Human Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(6). <https://doi.org/10.3390/ijms21061960>
- Edmond, J., Robbins, R. A., Bergstrom, J. D., Cole, R. A., & de Vellis, J. (1987). Capacity for substrate utilization in oxidative metabolism by neurons, astrocytes, and oligodendrocytes from developing brain in primary culture. *Journal of Neuroscience Research*, *18*(4), 551–561. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jnr.490180407>
- Endersby, R., & Baker, S. J. (2008). PTEN signaling in brain: neuropathology and tumorigenesis. *Oncogene*, *27*(41), 5416–5430. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.239>
- Fernando, W. M. A. D. B., Martins, I. J., Goozee, K. G., Brennan, C. S., Jayasena, V., & Martins, R. N.

(2015). The role of dietary coconut for the prevention and treatment of Alzheimer's disease: potential mechanisms of action. *The British Journal of Nutrition*, *114*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1017/S0007114515001452>

Furnari, F. B., Huang, H. J., & Cavenee, W. K. (1998). The phosphoinositol phosphatase activity of PTEN mediates a serum-sensitive G1 growth arrest in glioma cells. *Cancer Research*, *58*(22), 5002–5008.

Gough, S. M., Casella, A., Ortega, K. J., & Hackam, A. S. (2021). Neuroprotection by the Ketogenic Diet: Evidence and Controversies. *Frontiers in Nutrition*, *8*, 782657. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.782657>

Grabacka, M., Pierzchalska, M., Dean, M., & Reiss, K. (2016). Regulation of Ketone Body Metabolism and the Role of PPAR $\alpha$ . *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(13), 2093. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ijms17122093>

Grochans, S., Cybulska, A. M., Simińska, D., Korbecki, J., Kojder, K., Chlubek, D., & Baranowska-Bosiacka, I. (2022). Epidemiology of Glioblastoma Multiforme—Literature Review. In *Cancers* (Vol. 14, Issue 10). <https://doi.org/10.3390/cancers14102412>

Hayes, J. D., Dinkova-Kostova, A. T., & Tew, K. D. (2020). Oxidative Stress in Cancer. *Cancer Cell*, *38*(2), 167–197. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.06.001>

Hopkins, B. D., Hodakoski, C., Barrows, D., Mense, S. M., & Parsons, R. E. (2014). PTEN function: the long and the short of it. *Trends in Biochemical Sciences*, *39*(4), 183–190. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.02.006>

Hosseini, M. S., Samaei, N. M., Ghaderian, S. M. H., Dastmalchi, R., & Rajabi, S. (2021). The oncogenic role of both lncRNA PANDA and BCL2 gene in glioblastoma. *Gene Reports*, *23*, 101160. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.genrep.2021.101160>

Hughes, S. D., Kanabus, M., Anderson, G., Hargreaves, I. P., Rutherford, T., Donnell, M. O., Cross, J. H., Rahman, S., Eaton, S., & Heales, S. J. R. (2014). The ketogenic diet component decanoic acid increases mitochondrial citrate synthase and complex I activity in neuronal cells. *Journal of*

*Neurochemistry*, 129(3), 426–433. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jnc.12646>

Icard, P., Fournel, L., Wu, Z., Alifano, M., & Lincet, H. (2019). Interconnection between Metabolism and Cell Cycle in Cancer. *Trends in Biochemical Sciences*, 44(6), 490–501. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.12.007>

Jensen, N. J., Wodschow, H. Z., Nilsson, M., & Rungby, J. (2020). Effects of Ketone Bodies on Brain Metabolism and Function in Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22). <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ijms21228767>

Krętowski, R., Borzym-Kluczyk, M., Stypułkowska, A., Brańska-Januszewska, J., Ostrowska, H., & Cechowska-Pasko, M. (2016). Low glucose dependent decrease of apoptosis and induction of autophagy in breast cancer MCF-7 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 417(1), 35–47. <https://doi.org/10.1007/s11010-016-2711-4>

Krikorian, R., Shidler, M. D., Summer, S. S., Sullivan, P. G., Duker, A. P., Isaacson, R. S., & Espay, A. J. (2019). Nutritional ketosis for mild cognitive impairment in Parkinson’s disease: A controlled pilot trial. *Clinical Parkinsonism & Related Disorders*, 1, 41–47. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.prdoa.2019.07.006>

Lara-Velazquez, M., Al-Kharboosh, R., Jeanneret, S., Vazquez-Ramos, C., Mahato, D., Tavanaiepour, D., Rahmathulla, G., & Quinones-Hinojosa, A. (2017). Advances in Brain Tumor Surgery for Glioblastoma in Adults. In *Brain Sciences* (Vol. 7, Issue 12). <https://doi.org/10.3390/brainsci7120166>

Lin, C.-M., Yu, C.-F., Huang, H.-Y., Chen, F.-H., Hong, J.-H., & Chiang, C.-S. (2019). Distinct Tumor Microenvironment at Tumor Edge as a Result of Astrocyte Activation Is Associated With Therapeutic Resistance for Brain Tumor. *Frontiers in Oncology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00307>

Lombardi, G., Bergo, E., Caccese, M., Padovan, M., Bellu, L., Brunello, A., & Zagonel, V. (2019). Validation of the Comprehensive Geriatric Assessment as a Predictor of Mortality in Elderly Glioblastoma Patients. In *Cancers* (Vol. 11, Issue 10). <https://doi.org/10.3390/cancers11101509>

- Martin-McGill, K. J., Marson, A. G., Tudur Smith, C., Young, B., Mills, S. J., Cherry, M. G., & Jenkinson, M. D. (2020). Ketogenic diets as an adjuvant therapy for glioblastoma (KEATING): a randomized, mixed methods, feasibility study. *Journal of Neuro-Oncology*, *147*(1), 213–227. <https://doi.org/10.1007/s11060-020-03417-8>
- Martuscello, R. T., Vedam-Mai, V., McCarthy, D. J., Schmoll, M. E., Jundi, M. A., Louviere, C. D., Griffith, B. G., Skinner, C. L., Suslov, O., Deleyrolle, L. P., & Reynolds, B. A. (2016). A Supplemented High-Fat Low-Carbohydrate Diet for the Treatment of Glioblastoma. *Clinical Cancer Research*, *22*(10), 2482–2495. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0916>
- Maurer, G. D., Brucker, D. P., Bähr, O., Harter, P. N., Hattingen, E., Walenta, S., Mueller-Klieser, W., Steinbach, J. P., & Rieger, J. (2011). Differential utilization of ketone bodies by neurons and glioma cell lines: a rationale for ketogenic diet as experimental glioma therapy. *BMC Cancer*, *11*, 315. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-315>
- Medikonda, R., Dunn, G., Rahman, M., Fecci, P., & Lim, M. (2021). A review of glioblastoma immunotherapy. *Journal of Neuro-Oncology*, *151*(1), 41–53. <https://doi.org/10.1007/s11060-020-03448-1>
- Mett, J., & Müller, U. (2021). The medium-chain fatty acid decanoic acid reduces oxidative stress levels in neuroblastoma cells. *Scientific Reports*, *11*(1), 6135. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85523-9>
- Nagy, A., Eder, K., Selak, M. A., & Kalman, B. (2015). Mitochondrial energy metabolism and apoptosis regulation in glioblastoma. *Brain Research*, *1595*, 127–142. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.10.062>
- Ohgaki, H., & Kleihues, P. (2013). The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma. *Clinical Cancer Research*, *19*(4), 764–772. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3002>
- Pfaffl, M. W. (2004). Quantification strategies in real-time PCR. *AZ of Quantitative PCR*, *1*, 89–113.
- Pfeffer, C. M., & Singh, A. T. K. (2018). Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(2). <https://doi.org/10.3390/ijms19020448>

- Präbst, K., Engelhardt, H., Ringgeler, S., & Hübner, H. (2017). *Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin BT - Cell Viability Assays: Methods and Protocols* (D. F. Gilbert & O. Friedrich, Eds.; pp. 1–17). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9_1)
- Puchalska, P., & Crawford, P. A. (2017). Multi-dimensional Roles of Ketone Bodies in Fuel Metabolism, Signaling, and Therapeutics. *Cell Metabolism*, 25(2), 262–284. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.12.022>
- Rinaldi, M., Caffo, M., Minutoli, L., Marini, H., Abbritti, R. V., Squadrito, F., Trichilo, V., Valenti, A., Barresi, V., Altavilla, D., Passalacqua, M., & Caruso, G. (2016). ROS and Brain Gliomas: An Overview of Potential and Innovative Therapeutic Strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6). <https://doi.org/10.3390/ijms17060984>
- Rinderknecht, H., Ehnert, S., Braun, B., Histing, T., Nussler, A. K., & Linnemann, C. (2021). The Art of Inducing Hypoxia. *Oxygen*, 1(1), 46–61. <https://doi.org/10.3390/oxygen1010006>
- Rusek, M., Pluta, R., Ułamek-Kozioł, M., & Czuczwar, S. J. (2019). Ketogenic Diet in Alzheimer’s Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(16). <https://doi.org/10.3390/ijms20163892>
- Salazar-Ramiro, A., Ramírez-Ortega, D., de la Cruz, V., Hernández-Pedro, N. Y., González-Esquivel, D. F., Sotelo, J., & Pineda, B. (2016). Role of Redox Status in Development of Glioblastoma. *Frontiers in Immunology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00156>
- Schönfeld, P., & Wojtczak, L. (2016). Short- and medium-chain fatty acids in energy metabolism: the cellular perspective. *Journal of Lipid Research*, 56(6), 943–954. <https://doi.org/https://doi.org/10.1194/jlr.R067629>
- Shaafi, S., Najmi, S., Aliasgharpour, H., Mahmoudi, J., Sadigh-Etemad, S., Farhoudi, M., & Baniasadi, N. (2016). The efficacy of the ketogenic diet on motor functions in Parkinson’s disease: A rat model. *Iranian Journal of Neurology*, 15(2), 63–69.
- Skinner, R., Trujillo, A., Ma, X., & Beierle, E. A. (2009). Ketone bodies inhibit the viability of human

neuroblastoma cells. *Journal of Pediatric Surgery*, 44(1), 212–216.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2008.10.042>

Sonnay, S., Chakrabarti, A., Thevenet, J., Wiederkehr, A., Christinat, N., & Masoodi, M. (2019).

Differential Metabolism of Medium-Chain Fatty Acids in Differentiated Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Astrocytes. *Frontiers in Physiology*, 10.

<https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00657>

Soomro, S. H., Ting, L. R., Qing, Y. Y., & Ren, M. (2017). Molecular biology of glioblastoma:

Classification and mutational locations. *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association*, 67(9), 1410–1414.

Spector, R. (1988). Fatty Acid Transport Through the Blood-Brain Barrier. *Journal of Neurochemistry*,

50(2), 639–643. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1988.tb02958.x>

Tan, A. C., Ashley, D. M., López, G. Y., Malinzak, M., Friedman, H. S., & Khasraw, M. (2020).

Management of glioblastoma: State of the art and future directions. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 70(4), 299–312. <https://doi.org/10.3322/caac.21613>

Thermo Fisher Scientific. (2018, July 16). *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit USER*

*GUIDE*.

[https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FFLSG%2Fmanuals%2FMAN0017977_highcap_cDNA_RT_UG.pdf)

[Assets%2FFLSG%2Fmanuals%2FMAN0017977\\_highcap\\_cDNA\\_RT\\_UG.pdf](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FFLSG%2Fmanuals%2FMAN0017977_highcap_cDNA_RT_UG.pdf)

[Assets%2FFLSG%2Fmanuals%2FMAN0017977\\_highcap\\_cDNA\\_RT\\_UG.pdf](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FFLSG%2Fmanuals%2FMAN0017977_highcap_cDNA_RT_UG.pdf)

Thevenet, J., de Marchi, U., Domingo, J. S., Christinat, N., Bultot, L., Lefebvre, G., Sakamoto, K.,

Descombes, P., Masoodi, M., & Wiederkehr, A. (2016). Medium-chain fatty acids inhibit mitochondrial metabolism in astrocytes promoting astrocyte-neuron lactate and ketone body

shuttle systems. *The FASEB Journal*, 30(5), 1913–1926.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1096/fj.201500182>

Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect:

the metabolic requirements of cell proliferation. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5930), 1029–1033.

<https://doi.org/10.1126/science.1160809>

- Wang, G., Wang, J.-J., Fu, X.-L., Guang, R., & To Tony, S.-S. (2017). Advances in the targeting of HIF-1 $\alpha$  and future therapeutic strategies for glioblastoma multiforme (Review). *Oncol Rep*, *37*(2), 657–670. <https://doi.org/10.3892/or.2016.5309>
- Wang, Z., Liu, D., Wang, J., Liu, S., Gao, M., Ling, E.-A., & Hao, A. (2012). Cytoprotective effects of melatonin on astroglial cells subjected to palmitic acid treatment in vitro. *Journal of Pineal Research*, *52*(2), 253–264. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00952.x>
- Warren, C. F. A., Wong-Brown, M. W., & Bowden, N. A. (2019). BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. *Cell Death & Disease*, *10*(3), 177. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1407-6>
- Wen Ng, Y., & How Say, Y. (2018). Palmitic acid induces neurotoxicity and gliatotoxicity in SH-SY5Y human neuroblastoma and T98G human glioblastoma cells. *PeerJ*, *6*. <https://doi.org/https://doi.org/10.7717/peerj.4696>
- Wesseling, P. , & C. D. (2018). WHO 2016 Classification of gliomas. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, *44*(2), 139–150. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/nan.12432>
- Wirsching, H.-G., Galanis, E., & Weller, M. (2016). Chapter 23 - Glioblastoma. In M. S. Berger & M. Weller (Eds.), *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 134, pp. 381–397). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802997-8.00023-2>
- Zhang, C., Zhu, N., Li, H., Gong, Y., Gu, J., Shi, Y., Liao, D., Wang, W., Dai, A., & Qin, L. (2022). New dawn for cancer cell death: Emerging role of lipid metabolism. *Molecular Metabolism*, *63*, 101529. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101529>

