

Título del trabajo:

Reprogramación metabólica de células tumorales y terapias dirigidas contra el fenotipo metabólico de estas células

Estudiante: Carolina Sánchez Pascua

Grado en Biotecnología

Correo electrónico: u1928656@campus.udg.edu

Tutor: Maria Vilanova Brugués

Empresa / institución: Universidad de Gerona

Visto bueno del tutor:

Nombre del tutor: Dra. Maria Vilanova Brugués

Empresa / institución: Universidad de Gerona

Correo electrónico: maria.vilanova@udg.edu

Fecha de depósito de la memoria a la secretaria de coordinación: 25 de Mayo de 2017

ÍNDICE

1. RESUMEN	3
1.1. RESUM	4
1.2. SUMMARY	5
2. INTRODUCCIÓN	5
3. OBJECTIVES	7
4. METODOLOGÍA.....	8
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN: METABOLISMO TUMORAL Y SU USO COMO DIANA TERAPÉUTICA. ...	9
5.1. ADSORCIÓN DESREGULADA DE GLUCOSA Y AMINOÁCIDOS	9
5.1.1. Alteración génica responsable de la elevada captación de glucosa y glutamina	12
5.1.2. Consumo de glucosa en estado de hipoxia	14
5.2. USO DE MODELOS OPORTUNISTAS EN LA ADQUISICIÓN DE NUTRIENTES	15
5.3. USO DE LOS INTERMEDIARIOS DEL CICLO TCA PARA LA BIOSÍNTESIS Y PRODUCCIÓN DE NADPH	16
5.4. AUMENTO DE LA DEMANDA DE NITRÓGENO	17
5.5. ALTERACIONES EN LA REGULACIÓN GÉNICA DEL METABOLISMO	18
5.5.1. Más allá de la alteración génica: Estado Rédox.....	18
5.6. INTERACCIONES METABÓLICAS CON EL MICROAMBIENTE	19
5.7. TERAPIA ANTITUMORAL PARA REVERTIR EL METABOLISMO ALTERADO EN CÉLULAS CANCERÍGENAS...	20
5.7.1 Enfoque bioenergético.....	22
5.7.2 Enfoque anabólico.....	26
5.7.3 Enfoque microambiental.....	27
5.8. ÉTICA Y BIOSOSTENIBILIDAD DE LOS ENSAYOS SOBRE POSIBLES FÁRMACOS TUMORALES	28
6. CONCLUSIONS	30
7. AGRADECIMIENTOS	31
8. BIBLIOGRAFÍA.....	32

1. RESUMEN

Los estudios realizados sobre la reprogramación metabólica de las células tumorales concluyen que los cambios metabólicos presentes en estas células tienen dos objetivos principales: sobrevivir y crecer en un medio bajo en nutrientes, hipóxico y ácido. Para ello, las células tumorales han diseñado un conjunto de procesos que les permiten obtener energía de una forma rápida, realizar numerosas reacciones biosintéticas y eliminar los elementos que inducirían su muerte. Para obtener energía se sirven del efecto Warburg y de su capacidad para obtener nutrientes de fuentes no convencionales. Para la obtención de precursores biosintéticos se sirven tanto de su elevada capacidad de captación de glucosa como de glutamina. Para sobrevivir en un medio adverso inhiben rutas apoptóticas, inactivan factores que regulan el crecimiento de células malignas y eluden el sistema inmune. Las investigaciones realizadas también han concluido que los cambios metabólicos están ligados a la activación de oncogenes y a la inhibición de supresores de tumores de manera que la reprogramación génica se halla estrechamente vinculada a la metabólica. El hecho de considerar esta alteración metabólica característica de las células cancerígenas, ha llevado a los científicos a pensar en ella como una fuente de potenciales dianas terapéuticas. Así, en ese contexto se están buscando agentes antitumorales que, de forma aislada o combinada con otros quimioterapéuticos, sean capaces de parar el crecimiento de un tumor o incluso de eliminarlo. Los estudios en curso se han enfocado principalmente en las vías bioenergéticas y anabólicas de las células tumorales, fijando como objetivos principales las enzimas, productos o intermediarios de la glucólisis, el ciclo TCA o la vía de pentosa fosfato. Desgraciadamente, y debido a su distinto origen, los cánceres muestran características extremadamente heterogéneas y una elevada plasticidad, de forma que no está siendo una tarea sencilla. La mayoría de estudios se encuentran en fases clínicas tempranas e incluso algunos de ellos se han visto interrumpidos por la aparición de efectos secundarios adversos -en su mayoría toxicidad-. A pesar de ello, hay muchos resultados positivos que permiten pensar que la lucha contra el metabolismo tumoral es y será una eficiente lucha contra el cáncer.

1.1 RESUM

Els estudis realitzats al voltant de la reprogramació metabòlica de les cèl·lules tumorals conclouen que els canvis metabòlics presents en aquestes cèl·lules tenen dos objectius principals: permetre la seva supervivència i creixement en un medi baix en nutrients, hipòxic i àcid. Per a això, les cèl·lules tumorals utilitzen un conjunt de processos que els permet obtenir energia ràpidament, dur a terme moltes reaccions biosintètiques i eliminar tots aquells elements que produirien la seva mort. Per obtenir energia utilitzen l'efecte Warburg i la seva capacitat d'obtenir nutrients de fonts no convencionals. Per a l'obtenció de precursors biosintètics fan servir la seva elevada capacitat de captació de glucosa i glutamina. Per sobreviure en un medi advers inhibeixen rutes apoptòtiques, inactiven factors que regulen el seu creixement i eludeixen el sistema immune. Les investigacions realitzades també han conclòs que els canvis metabòlics estan lligats a l'activació d'oncogens i a la inhibició de supressors de tumors, de manera que la reprogramació gènica està estretament vinculada a la metabòlica. El fet de considerar aquesta alteració metabòlica característica de les cèl·lules tumoral, ha dut als científics a considerar-la una font de potencials dianes terapèutiques. Així, en aquest context s'estan buscant agents antitumorals que, de forma aïllada o combinada amb altres quimioterapèutics, siguin capaços d'aturar el creixement d'un tumor o fins i tot d'eliminar-lo. Els estudis actuals s'han enfocat principalment en les vies bioenergètiques i anabòliques de les cèl·lules tumorals, fixant com a principals objectius els enzims, productes o intermediaris de la glucòlisis, el cicle TCA o la via de les pentoses fosfat. Desgraciadament, i degut a la diversitat d'òrigens dels tumors, els càncers presenten característiques extremadament heterogènies i una gran plasticitat, de manera que no està sent una tasca fàcil. La majoria d'estudis es troben en fases clíniques primerenques i alguns d'ells s'han vist, fins i tot, interromputs per l'aparició d'efectes secundaris adversos -majoritàriament toxicitat-. Tot i això, hi ha molts resultats positius que permeten pensar que la lluita contra el metabolisme tumoral és i serà una eficient lluita contra el càncer.

1.2 SUMMARY

The studies done about the metabolic rewiring of the tumor cells conclude that these changes have two main objectives: to improve tumor cell survival and to allow their growing in an acid and hypoxic medium with a low amount of nutrients. To this end, they have designed different processes that allow them to obtain energy quickly, to perform numerous biosynthetic reactions and to eliminate the elements that would induce their death. Tumor cells use the Warburg effect and their capacity to obtain nutrients from non-conventional sources. To obtain biosynthetic precursors, tumor cells use their high ability to capture glucose and glutamine. To survive in an adverse environment, they inhibit apoptotic pathways, inactivate antitumor factors that control cell growth and avoid the immune system. The investigations carried out also have concluded that the metabolic changes are associated with the activation of oncogenes and the inhibition of tumor suppressors, thus gene changes are closely related to the metabolic rewiring. This specific metabolic alteration of tumor cells allows scientists to think of it as a source of potential therapeutic targets. There are many antitumor drugs against metabolic targets that, used as stand-alone compounds or together with other chemotherapeutics, are analyzed as possible antitumor drugs able to stop tumor growth or even its eradication. The current studies are focused mainly on the bioenergetic pathways and anabolic pathways of the tumor cells, choosing as targets the enzymes, products or intermediates of the glycolysis, the TCA cycle or the pentose phosphate pathway. Unfortunately, tumors are extremely heterogeneous and have a high plasticity due to their different origin, thus the discover of new antitumor drug against metabolic targets is not a simple task. Most of the studies are in early clinical phases and some of them even been interrupted due to the appearance of severe harmful side effects - mainly toxicity-. However, there are many positive results that allow to think that struggle against the tumor metabolism is and will be a promising fight against the cancer.

2. INTRODUCCIÓN

Las células tumorales son, por definición, células con una capacidad autónoma e ilimitada de proliferación y crecimiento celular. Si se tiene en cuenta que esta proliferación requiere una elevada cantidad de nutrientes, energía y actividad biosintética no es sorprendente que estas células estén dotadas de una reprogramación metabólica muy extensa (*DeBerardinis et al., 2008*). Así, la tumorigénesis va acompañada y/o es consecuencia de un conjunto de alteraciones metabólicas -provocadas directa e/o indirectamente por mutaciones oncogénicas- que permiten a las células cancerígenas acceder a fuentes de nutrientes convencionales y no convencionales y utilizar los nutrientes obtenidos para crear biomasa capaz de sostener la elevada proliferación celular. La reprogramación metabólica en las células tumorales abarca todas las etapas de interacción entre célula y metabolito -captación de nutrientes, rutas metabólicas intracelulares y

modificación del microambiente tumoral- y se caracteriza por seis procesos metabólicos (Figura 1) que pueden presentarse en su totalidad o de forma aislada según el tipo de tumor (Pavlova et al., 2016):

- Absorción desregulada de glucosa y aminoácidos
- Uso de modelos oportunistas en la adquisición de nutrientes
- Uso de los intermediarios del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) para la biosíntesis y producción de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH)
- Aumento de la demanda de nitrógeno
- Alteración en la regulación génica del metabolismo Interacciones metabólicas con el microambiente

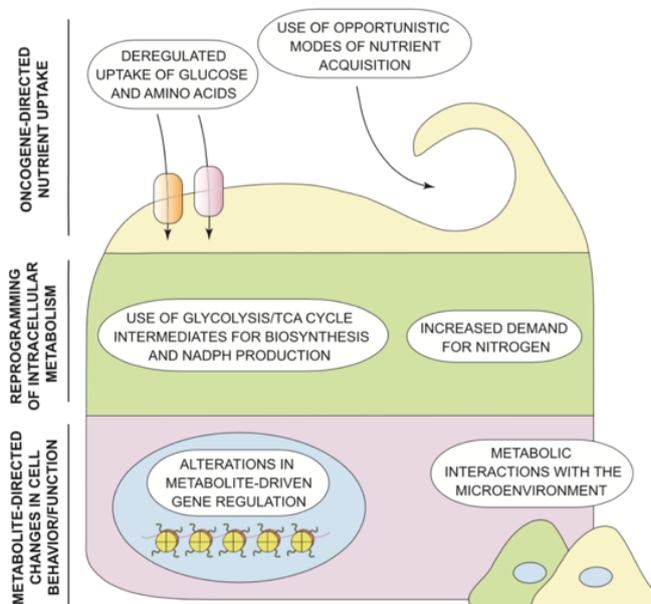


Figura 1: Alteraciones tumorales presentes en las tres capas de interacción entre la célula y los metabolitos del ambiente intracelular y extracelular. La parte superior muestra la relación entre la célula y el medio extracelular en el proceso de captar nutrientes y está caracterizada por una absorción desregulada y excesiva de glucosa y glutamina que le permite suplir sus necesidades energéticas y de biosíntesis. También destacar el uso de métodos oportunistas para lograr recursos de todas las fuentes posibles dentro de un entorno desfavorable. La capa intermedia refleja las relaciones que establece la célula con los metabolitos del medio intracelular y muestra la necesidad elevada de incorporar nitrógeno para poder llevar a cabo la división celular y la de utilizar la glucólisis y el ciclo tricarboxílico como fuente de precursores biosintéticos. El espacio inferior presenta las alteraciones celulares más profunda al modificar la expresión génica de genes que regulan los metabolitos y el mayor alcance tumoral a la hora de interactuar con su microambiente., encargado de proporcionar condiciones idóneas para su desarrollo y la invasión tumoral.

Fuente: Pavlova et al., 2016

El conocimiento sobre la regulación metabólica que se produce en las células tumorales ha permitido el desarrollo de agentes terapéuticos dirigidos contra vías metabólicas específicas que se encuentran alteradas en las células cancerígenas. Muchos de los fármacos utilizados contra estas en la última década se encuentran actualmente en fases de ensayos clínicos. Su utilización, ya sea de forma aislada o en combinación con otros fármacos o terapias, se considera muy prometedora. Debido a la estrecha conexión entre las rutas metabólicas y las vías de transducción de señales oncogénicas, la combinación de fármacos que alteren ambos procesos se considera una estrategia importante y que en un futuro próximo puede proporcionar avances terapéuticos significativos para el tratamiento de diferentes tipos de tumores (Sborow et al., 2015).

3. OBJECTIVES

The research project presented in this work is based on two main objectives that are related. The first one defines the sum of changes that a tumor cell undergoes in its metabolic processes and the second one describes the present therapeutic approaches to target these specific alterations.

Consequently, and according to the two objectives, the work has been divided in two parts. First, it is described the state-of-the-art on tumor metabolism that has been gained through a selection of scientific articles from different bibliographic sources. The information has been analyzed, categorized and exposed.

When the first part was completed, the resulting data were used to search for information about the use of these specific altered metabolic processes or parts of them as therapeutic targets and the data was processed to be explained in a summarized, concise and easy to understand way.

4. METODOLOGÍA

Debido a que el presente proyecto se trata de un trabajo de revisión, su metodología principal se ha basado en la búsqueda de información -mediante distintas bases de datos y fuentes bibliográficas- y en el análisis, evaluación y procesamiento posterior de ésta.

La búsqueda bibliográfica se ha llevado a cabo mediante tres buscadores online de libre acceso. El primero y más utilizado ha sido PubMed¹, un buscador ofrecido por la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos (NCBI) con acceso directo a la base de datos MEDLINE². Esta base de datos contiene un amplio número de artículos científicos especializados en diversos ámbitos -biotecnológico, bioquímico o biomédico entre otros- publicados en Estados Unidos. El segundo, New England Journal of Medicine (NEJM), se trata de una revista médica publicada por la Sociedad Médica de Massachusetts que publica artículos de investigación y de revisión científica a los que se puede acceder mediante su plataforma web³. En este caso los artículos son de enfoque clínico y su especificidad es superior que en PubMed. Y el tercero, ClinicalTrial⁴, ha sido utilizado en el segundo apartado del trabajo debido a que ofrece información de estudios clínicos, realizados o en curso, sobre una amplia gama de enfermedades. Esta información es directamente proporcionada y actualizada por el patrocinador o investigador principal del estudio clínico y el sitio web es mantenido por la Biblioteca Nacional de Medicina de los EE. UU.

El protocolo a seguir en todos los casos se basa en la elección de palabras clave relacionadas con el tema focal de estudio y el enlace de estas con el uso de etiquetas -como [OR], [AND] o [AD]- para poder delimitar la búsqueda. Además de este mecanismo, en la mayoría de casos se seleccionan artículos de revisión y de publicación reciente para obtener la información más actualizada posible.

Las palabras claves más utilizadas en el proyecto han sido: tumor cells, cancer drugs, metabolism, therapeutic target, anaerobic glycolysis, biosynthesis intermediates, Warburg, metabolic mismatch, TCA, redox co-enzymes, genetic modifications, tumorigenesis y cell proliferation.

[1] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

[2] <https://www.nlm.nih.gov/bsd/pmresources.html>

[3] <http://www.nejm.org>

[4] <https://clinicaltrials.gov/ct2/search/advanced>

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN: METABOLISMO TUMORAL Y SU USO COMO DIANA TERAPÉUTICA

A continuación se tratarán por separado cada una de las etapas implicadas en la reprogramación metabólica de las células tumorales descritas en la Introducción (*apartado 2*).

5.1 Adsorción desregulada de glucosa y aminoácidos

Las células tumorales deben aumentar la captación de nutrientes del medio externo para realizar las actividades biosintéticas asociadas a la proliferación. En el caso de los mamíferos, los nutrientes responsables de la supervivencia y la biosíntesis celular son la glucosa y la glutamina, a partir del metabolismo de los cuales la célula acumula diversos intermediarios del carbono que se utilizarán para construir diferentes macromoléculas. Además de esta acumulación, la oxidación controlada de los esqueletos de carbono de la glucosa y la glutamina le aporta a la célula su poder reductor -en forma de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato NADH o de dinucleótido de flavina y adenina (FADH)- que intervendrá en la generación de trifosfato de adenosina (ATP) (*Pavlova et al., 2016*).

En el caso de la glucosa, Otto Warburg descubrió en 1920 que las células tumorales la consumen a una velocidad muy alta y secretan la mayoría de su carbono como lactato en lugar de oxidarlo por completo. Este fenómeno fue nombrado "efecto Warburg" (*Figura 4*) y despertó controversia entre los expertos, ya que muchos de ellos no comprendían porque una célula con tan alta necesidad de ATP desperdiciaba la posibilidad de obtener mayor cantidad realizando una glucólisis anaerobia en lugar de una fosforilación oxidativa. La respuesta a tal incógnita se descubrió décadas después al demostrar que la vía glucolítica y el lactato proporcionan, por sí mismos, ciertas ventajas a las células proliferantes (*Figura 4*). Entre estas ventajas destaca, en primer lugar, el hecho de poder utilizar glucosa -el nutriente extracelular más abundante- para producir ATP de forma que, a pesar de la baja producción de ATP por glucosa consumida, si el flujo glucolítico es suficientemente elevado el porcentaje de ATP producido a partir de glucólisis puede superar el producido por fosforilación oxidativa. En segundo lugar que la degradación de glucosa proporciona a las células diferentes intermediarios necesarios para llevar a cabo procesos de biosíntesis muy necesarios para la proliferación del tumor (detallado en el apartado 5.3). La última ventaja recae sobre la producción de lactato -en lugar de piruvato- mediante lactato deshidrogenasa debido a que la tumorigénesis está asociada a un elevado flujo glucolítico. Si la célula produjera piruvato sería contraproducente, ya que éste daría lugar a una elevada actividad del ciclo TCA que produciría altas concentraciones de NADH citosólico y ATP mitocondrial, productos que inhibirían la glucólisis. En cambio, al producir lactato, la célula evita el inicio del ciclo TCA y la acumulación de estos inhibidores glucolíticos y puede mantener así su flujo elevado.

Además, también cabe destacar que el lactato es mucho más fácil de excretar, ya que el piruvato requiere una importación hacia la matriz y la activación de enzimas altamente reguladas -como

el complejo de la piruvato deshidrogenasa- que pueden limitar el flujo glucolítico. El lactato tiene otros muchos beneficios para la célula tumoral, pero al no estar involucrados en la glucólisis se exponen más adelante (*DeBerardinis et al., 2008*). El estudio del efecto Warburg también se centró en descubrir cómo y no sólo porqué tenía lugar este fenómeno. En un principio se demostró que el principal responsable de este metabolismo es la mutación en el gen codificante para la proteína p53, pero actualmente se ha revelado que no es el único. Esta mutación es una alteración muy común en tumores humanos. La proteína supresora de tumores p53 tiene un papel muy importante en la respuesta al estrés celular y se encarga de inhibir el desarrollo maligno, de modo que la pérdida de tal función contribuye al desarrollo tumoral. Se ha demostrado que p53 induce la apoptosis, la detención del ciclo celular y la respuesta que previene a la proliferación de células dañadas. Además, repara el daño del DNA mediante la detención reversible del ciclo celular. Todas estas funciones se llevan a cabo gracias a su papel como factor de transcripción que le permite inducir la expresión de un gran número de genes diana. Por ejemplo, la activación del gen p21 por p53 induce la detención del ciclo celular en G1 y la expresión de la proteína PUMA (modulador de la apoptosis inducida por p53) activa la apoptosis (*Liang et al., 2013*). Estudios recientes han sugerido que otra función de p53 en la determinación de la muerte o supervivencia celular es la regulación de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS), ya que es capaz de activar muchos genes que aumentan o disminuyen los niveles de ROS. Uno de estos genes es TIGAR (fosfatasa reguladora de glucólisis inducida por TP53), que codifica para una proteína reguladora de glucólisis y apoptosis. TIGAR puede disminuir los niveles de ROS y el aumento de su expresión protege a las células de la apoptosis inducida por estrés oxidativo. Funciona desfosforilando la fructosa-2,6-bifosfato y convirtiéndola en fructosa-6-fosfato. Este paso provoca la inhibición de PFK-1 -dependiente de fructosa-2,6-bifosfato- que interrumpe la glucólisis y la acumulación de glucosa-6-fosfato que se deriva hacia la vía de las pentosas-fosfato (PPP) (*Bensaad et al., 2006*). De esta forma se produce poder reductor en forma de NADPH el cual permite pasar de glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH). Este glutatión reducido pasa a ser el agente reductor que elimina ROS formando compuestos inocuos para la célula (*Figura 2*) (*Bensaad et al., 2006*). Aparte de esta mutación, los tumores también usan a su favor la expresión de la isoforma M2 de la piruvato quinasa en lugar de la M1 para llevar a cabo la glucólisis aerobia, ya que les permite crecer en ambientes deficientes de glucosa, que sobrevienen en los períodos de aglicemia, y oxígeno, típicos en situaciones tumorigénicas (*Weber, 2016*).

Si en lugar de glucosa, nos centramos en la glutamina, fue el científico Harry Eagle quien descubrió un rápido agotamiento este compuesto en los microambientes tumorales, ya que su captación permite, además de proporcionar carbono para el crecimiento, la obtención de nitrógeno reducido para la biosíntesis de novo de distintos compuestos nitrogenados, como aminoácidos no esenciales. En el interior celular, la glutamina puede contribuir directamente a la biosíntesis de nucleótidos o convertirse en glutamato mediante la reacción catalizada por glutaminasa (GLS). En caso de convertirse a glutamato, este puede contribuir en la síntesis de glutatión, un tripéptido que, como se ha comentado anteriormente, neutraliza los radicales libres de peróxido, o convertirse en α -cetoglutarato (α -KG) utilizando dos vías distintas. Una de ellas, mediada por la enzima glutamato deshidrogenasa (GLUD), da como subproducto NH_4^+ , NADH y

NADPH. El amonio podrá ser utilizado para controlar los niveles de pH, mientras que el poder reductor del NADH y NADPH permitirá la síntesis de lípidos y la disminución de ROS. La segunda vía, reversible, está mediada por aminotransferasas que dan como subproducto aminoácidos. Uno de los aminoácidos más importantes producidos por las aminotransferasas es la prolina, precursor del colágeno de la matriz extracelular ayudando a la invasión tumoral. Ambas vías están reguladas, aparte de por MYC, por los oncogenes KRAS y mTOR. KRAS es el único que siempre inhibe GLUD y favorece las aminotransferasas, los otros inducen una u otra según el momento y la necesidad celular. Una vez obtenido el α -KG, éste entra en el ciclo TCA dónde puede "avanzar" o "retroceder". En caso de avanzar, se obtiene malato, oxoacelato y citrato que proporcionan piruvato, aspartato y lípidos respectivamente. La biosíntesis de aspartato se considera crucial debido a su papel en la producción de purina y pirimidina que sostiene la división celular. En el de retroceder, se lleva a cabo la carboxilación reductora y el α -KG se convierte en citrato mediante el consumo de NADH y la intervención de la enzima isocitrato deshidrogenasa. En este caso también se promueve la lipogénesis (Figura 3) (Altman et al., 2016)

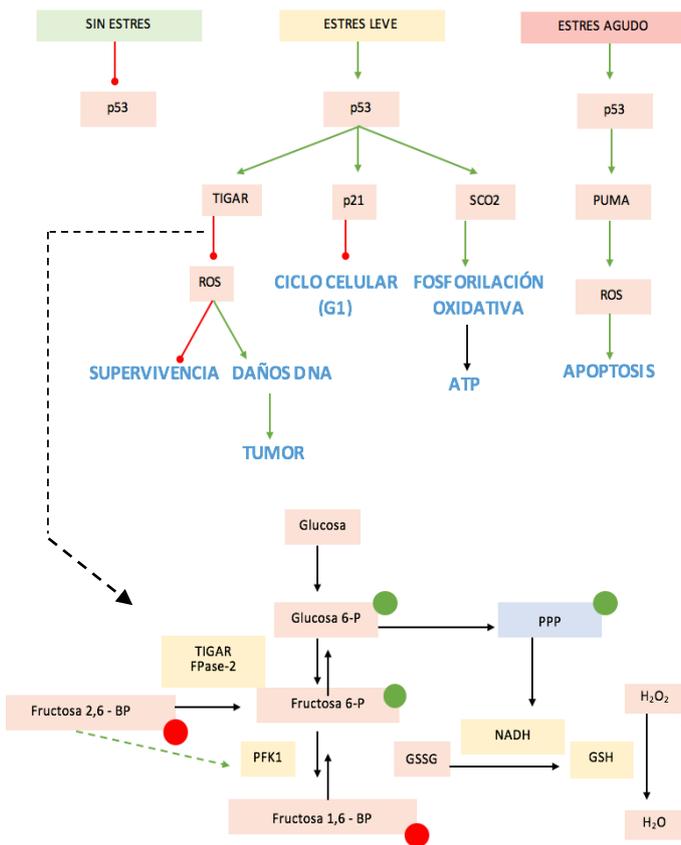


Figura 2. Vía de actuación de la proteína p53 en células no transformadas con ampliación de la reacción catalizada por TIGAR para inhibir ROS. La proteína p53 es sensible a las variaciones en los niveles de estrés celular y modifica su forma de actuar según este sensor. Su principal función es proteger al organismo del crecimiento de células malignas, por eso se mantiene inactiva en situaciones favorables y se activa cuando recibe una señal de estrés, valorando si la célula puede repararse del daño sufrido o debe ser eliminada. Si el estrés es moderado, p53 induce la expresión de un conjunto de genes diana, como SCO2, p21 y TIGAR, que tienen por objetivo parar el ciclo celular hasta que la célula se recupere y disminuir los niveles de estrés mediante la eliminación de ROS. Sin embargo, si el daño es irreversible activa otro tipo de genes diana, como PUMA, que aumentará el estrés mediante una inducción de ROS y llevará la célula a la apoptosis. Las células tumorales que presentan p53 mutado, son capaces de crecer a pesar de ser malignas porque no se las conduce a su apoptosis y se van acumulando daños en el DNA. Específicamente, TIGAR cataliza una reacción que convierte la F-2,6-BP en F-6P, de manera que la primera disminuye de concentración y deja de activar PFK1, frenando la glucólisis al interrumpir el paso de F-6P a F-6-BP. La acumulación de los intermediarios aguas arriba de la glucólisis, favorece la vía PPP que produce buenos niveles de NADH. Este es utilizado para reducir GSSG hasta GSH, y GSH para reducir hasta agua inocua, eliminando el estrés. *Las flechas verdes significan inducción y las rojas inhibición. Las redondas verdes indican la acumulación de intermediarios y las rojas su disminución

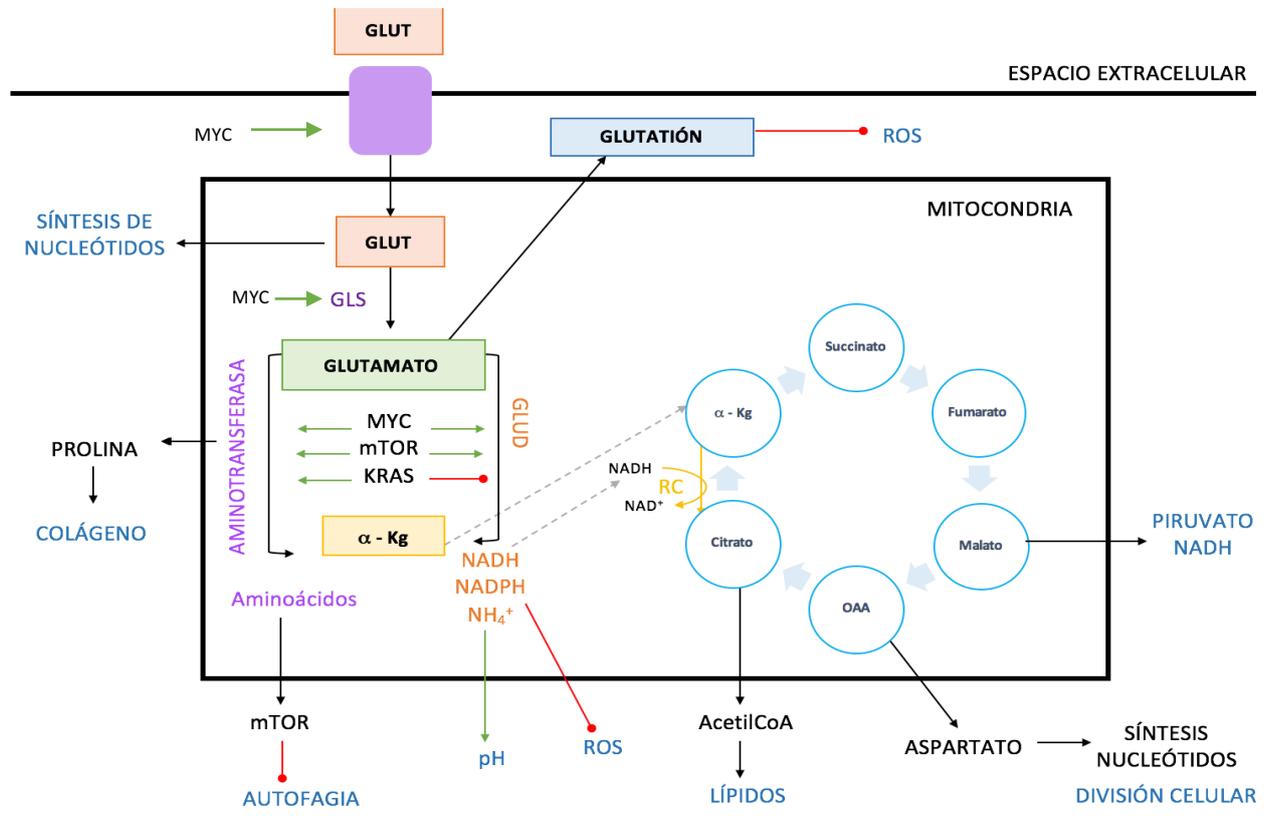


Figura 3. Metabolismo de la glutamina. La glutamina entra a la célula gracias a un elevado número de transportadores glutamínicos inducidos por el oncogen MYC. Una vez en el interior puede destinarse directamente a la síntesis de nucleótidos o derivarse a glutamato mediante una reacción catalizada por GLS, enzima regulada positivamente por MYC. A su vez el glutamato puede convertirse en glutatión e inhibir ROS o producir α -Kg -un intermediario del ciclo TCA- mediante dos reacciones distintas reguladas por los oncogenes MYC, mTOR y KRAS y catalizadas por GLUD o Aminotransferasas. Si la enzima utilizada es GLUD, en el proceso también se producirá amonio -capaz de equilibrar el pH - y poder reductor que intervendrá en la lipogénesis y el control negativo de ROS. Si por contra, la reacción la catalizan las aminotransferasas, se obtendrán aminoácidos que estabilizaran mTOR inhibiendo la autofagia. Una vez α -Kg se incorpora al ciclo TCA puede avanzar en él produciendo, además de poder reductor y ATP, otros intermediarios como Malato y OAA o retroceder por carboxilación oxidativa y producir citrato. Los intermediarios citados producen piruvato, aspartato y acetilCoA respectivamente y estos dos últimos activan la lipogénesis y la síntesis nucleotídica. *Las flechas verdes significan inducción y las rojas inhibición.

5.1.1 Alteración génica responsable de la elevada captación de glucosa y glutamina

La vía fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), un sistema muy conservado y altamente expresado en muchos tipos celulares, tiene como función responder positivamente a factores de crecimiento de tipo insulina (IGF), epidérmicos (EGF), estimulador de colonias (CSF) o derivados de plaquetas (PDGF). La unión de estos factores al receptor de membrana tirosina quinasa hace que este se autofosforile activando la vía PI3K, la cual se encarga de fosforilar lípidos fosfatidilinositol responsables de la activación de la serina/treonina quinasa (Akt) y de la vía de señalización mTOR. La iniciación de esta vía permite que las células aumenten la expresión superficial de los transportadores de nutrientes -transportador de glucosa (GLUT4) en el caso de la glucosa- lo que da como resultado una mayor absorción de glucosa y aminoácidos (Figura 4).

Además, también se potencia su acumulación gracias a la activación de la hexoquinasa (HK), enzima encargada de evitar la pérdida de glucosa hacia el medio extracelular mediante su fosforilación. De esta forma, se puede concluir que para la captación de glucosa las células no transformadas dependen de señales extracelulares -factores de crecimiento- y no de su necesidad de biosíntesis. Sin embargo, las células tumorales acumulan un conjunto de alteraciones oncogénicas que las dotan de independencia proliferativa en relación a los factores externos y que les permite captar glucosa de manera constitutiva. Algunas de estas alteraciones génicas se dan en la vía PI3K, en sus reguladores negativos, tales como los genes de los complejos de la esclerosis tuberosa 1 y 2 (TSC1 y 2) o fosfatidilinositol-3,4,5trifosfato 3-fosfatasa (PTEN) -inhibidores de la vía mediante desfosforilación- y en amplificadores de receptores de tirosina quinasa (*Figura 4*). La activación masiva de la vía lleva a una acentuación de sus funciones como la captación de glucosa, la biosíntesis de macromoléculas y una elevada expresión de Akt, que impulsa la glucólisis y producción de lactato además de inhibir la degradación macromolecular mediante mTOR (activado por la inhibición del supresor tumoral TSC2) en células cancerosas. De esta forma, las células tumorales son capaces de internalizar altas cantidades de glucosa incluso en medios adversos (*Pinzón et al., 2009*).

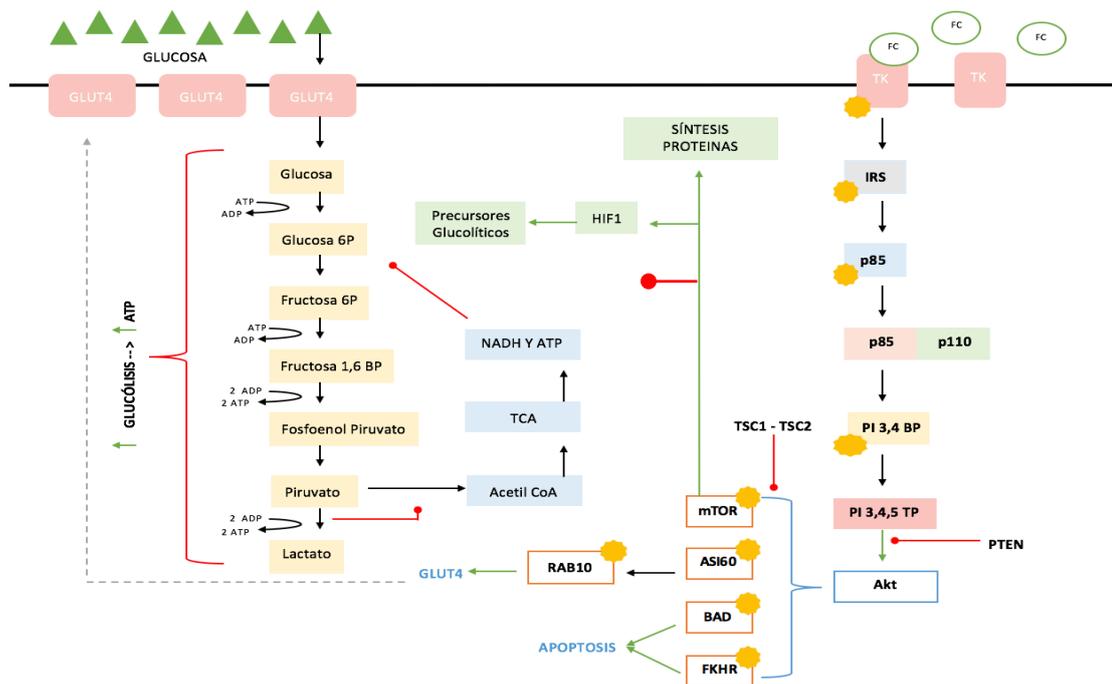


Figura 4. Vía PI3K. La vía PI3K se estimula mediante la unión de factores de crecimiento a receptores de membrana tirosina quinasa que autofosforilan y fosforilan el sustrato del receptor de insulina (IRS); éste, a su vez, fosforila la subunidad p85 de PI3K provocándole un cambio conformacional que conduce a la unión de la subunidad catalítica (p110). Esta unión forma la PI3K activa, que fosforila el fosfatidil inositol 3,4 difosfato (PIP2) convirtiéndolo en fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato (PIP3). Éste último conduce a la activación de Akt, una proteína con muchas dianas. Akt fosforilará BAD y FKHR induciendo la apoptosis, ASI60 que acabará produciendo receptores de glucosa y mTOR que inhibirá la autofagia, inducirá síntesis proteica y activará HIF1 que favorece la glucólisis generando precursores glucolíticos. En células tumorales se producen mutaciones en los inhibidores de esta vía -PTEN, TSC1 y TSC2- de manera que se encuentra amplificada potenciando la absorción de glucosa, la glucólisis y la biosíntesis *Las flechas verdes significan inducción y las rojas inhibición.. Las estrellas doradas equivalen a fosforilación.

Las alteraciones oncogénicas para internalizar glutamina son mucho menos conocidas que en el caso de la glucosa. Aún así, se conoce al factor de transcripción MYC -sobre-expresado en células tumorales- como el factor que controla el uso de éste aminoácido para la proliferación celular, debido a que induce la transcripción de transportadores de glutamina y promueve la expresión de enzimas, tal como glutaminasa (GLS), involucradas en la conversión de glutamina a glutamato, molécula que no puede salir de la célula mediante transportadores de glutamina y se acumula promoviendo la anaplerosis del ciclo TCA. Para corroborar tal información se ha demostrado que la privación de glutamina -fuente de nitrógeno- en estas células da como resultado el agotamiento de los intermedios del ciclo de TCA (*DeBerardinis et al., 2008*). También se ha hablado de la transformación oncogénica impulsada por KRAS, que se caracteriza por crear dependencia de glutamina y de las aminotransferasas al regular negativamente GLUD, hecho que provoca un aumento de NADPH para regenerar el glutatión reducido y controlar los niveles de ROS (*Figura 3*) (*Altman et al., 2016*). Cabe comentar que MYC también regula la captación de glucosa a través de activar transportadores glucolíticos y enzimas como lactato deshidrogenasa, hexoquinasa 2 o fosfofructoquinasa (*Liang et al., 2013*).

5.1.2 Consumo de glucosa en estado de hipoxia

Una de las características de la tumorigénesis es la creación de zonas deficientes en nutrientes -debido a su elevado consumo- y, también, hipóxicas. La falta de oxígeno, imposible de suplir debido a la falta de vasos sanguíneos suficientes y regulares, estimula las células hacia un mayor consumo de glucosa y una excesiva producción de lactato. En células normales o no transformadas de mamíferos, la respuesta a este estímulo está regulada por el factor de transcripción 1 inducible por hipoxia (HIF1) que tiene como objetivo la transcripción de genes que codifican para transportadores de glucosa y enzimas glucolíticas. La actividad de HIF1 requiere de la subunidad HIF1- α , controlada por la vía PI3K/Akt/mTOR. Durante la normoxia, la subunidad HIF1- α es modificada mediante una hidroxilación. Este cambio promueve la asociación con el supresor tumoral von Hippel-Lindau (VHL) y lleva a HIF1 α a su degradación. En células tumorales, esta degradación no sucede porque la unión entre HIF1 α y VHL no llega a producirse por dos razones. En primer lugar, la falta de oxígeno con presencia de ROS y la acumulación de succinato y fumarato imposibilitan la hidroxilación de HIF1- α . En segundo lugar, se produce la mutación del factor VHL. Esta estabilización constitutiva de HIF1- α permite su entrada al núcleo y su participación en la transcripción de genes específicos que regulan la captación de glucosa y la proliferación celular. Así, HIF1- α induce la expresión de piruvato deshidrogenasa quinasa 1 (PDK1), inhibidora de PDH mediante fosforilación. Este hecho limita la entrada de carbono proveniente de la glucosa al ciclo TCA y aumenta la conversión de piruvato en lactato (*Figura 5*). La adaptación favorece el flujo glucolítico y la supervivencia celular durante la hipoxia, pero evita una elevada biosíntesis dependiente de los intermediarios del ciclo TCA (*DeBerardinis et al., 2008; Weber, 2016*). HIF1- α también es capaz de activar transportadores de glucosa, potenciando así su efecto positivo regulador de glucólisis aerobia (*Liang et al., 2013*).

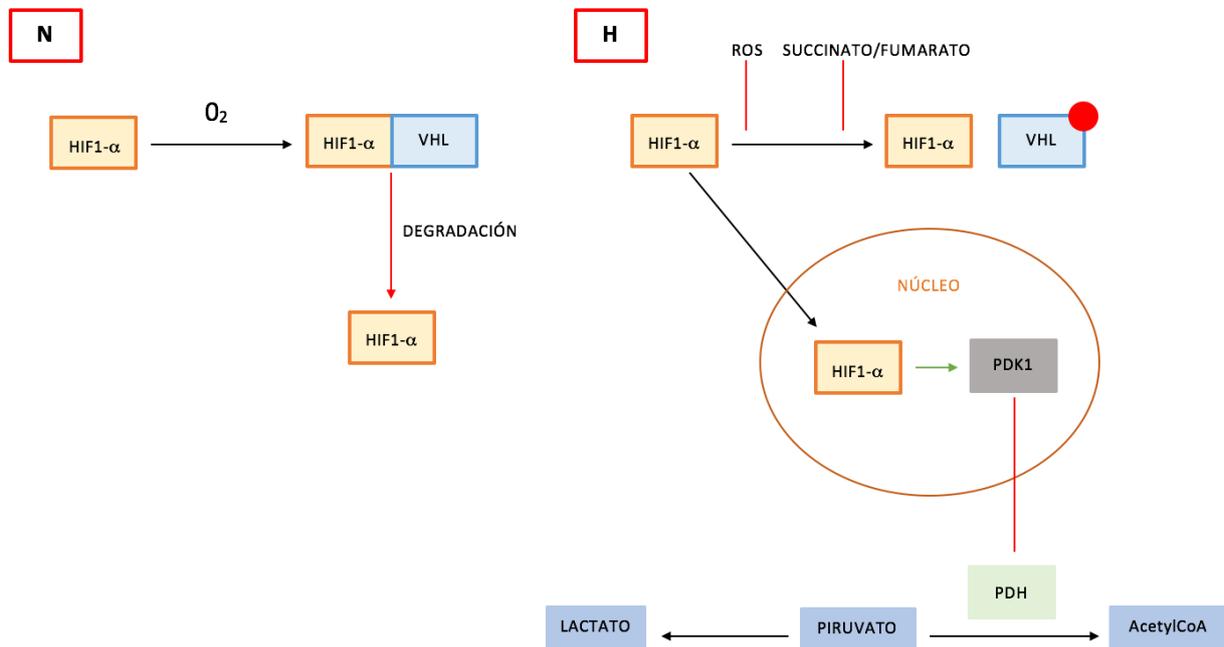


Figura 5. Respuesta del factor HIF en situación de normoxia y de hipoxia. En células normales, la presencia de oxígeno hace que HIF1 α sufra una hidroxilación que le permite unirse al supresor tumoral VHL. Esta unión provoca su degradación. Sin embargo, en células tumorales el ambiente es hipóxico y la hidroxilación no sucede ya que se halla inhibida por ROS y otros agentes, como succinato o fumarato. A causa de ello, HIF1 α no puede unirse al supresor tumoral VHL -mutado para reforzar éste hecho- y queda libre, estabilizándose hasta llegar al núcleo donde permite la transcripción de PDK1, una enzima inhibidora de PDH. La falta de actividad de PDH inhibe la conversión de piruvato a acetilCoA y favorece la fermentación y producción de lactato. *Las flechas rojas significan inducción y las bolas rojas mutación.

5.2 Uso de modelos oportunistas en la adquisición de nutrientes

A causa de las altas tasas de consumo propias de las células cancerígenas en muchas ocasiones éstas se encuentran en ambientes escasos de nutrientes, de forma que para sobrevivir han de adquirir ciertas mutaciones que las doten de la capacidad necesaria para utilizar fuentes de nutrientes alternativas que les permiten proliferar en situaciones desfavorables. Dentro de estas fuentes se encuentra el uso de proteína extracelular como donadora de aminoácidos mediante un proceso de macropinocitosis y degradación lisosomal favorecido por la expresión de los oncogenes Ras o c-Src. Además de las proteínas extracelulares, los aminoácidos libres también pueden ser recuperados a partir de la digestión de células vivas enteras (entosis) o de la fagocitosis de cuerpos celulares apoptóticos. También del uso de tales vías, también se debe mencionar que la falta de nutrientes crea áreas de hipoxia en zonas del tumor, de manera que muchas reacciones biosintéticas dependientes de oxígeno no pueden llevarse a cabo en este microambiente, siendo la más importante la síntesis de dobles enlaces que no permite la creación *de novo* de ácidos grasos insaturados. Para solucionar este déficit, las células tumorales hipóxicas importan estos ácidos grasos del ambiente o inducen la liberación de lípidos presentes en células normales vecinas. Finalmente, mencionar que además de estas vías de asimilación

externa, las células cancerígenas disponen de otro mecanismo propio para aprovechar al máximo su contenido macromolecular en la proliferación cuando se encuentran en situaciones desfavorables, y a pesar de no ser tan eficaz para sobrevivir durante largos periodos de tiempo en tales condiciones como el uso de las vías citadas, sí les otorga mucha ventaja. Este mecanismo, conocido como autofagia, se basa en la capacidad de la célula tumoral para utilizar vías metabólicas que le permiten fusionar macromoléculas y orgánulos propios a los lisosomas y degradar su contenido mediante proteasas y lipasas liberando así aminoácidos y ácidos grasos. Está regulado por la vía mTOR que se encuentra activa en caso de disponer de los aminoácidos suficientes y actúa inhibiendo la autofagia, pero se ve inhibida cuando la concentración de éstos es insuficiente, de manera que favorece la autofagia en situaciones de necesidad. Hay que tener en cuenta que la autofagia también afecta al estrés celular y que no siempre es favorable para la tumorigénesis (*Pavlova et al., 2016*).

5.3 Uso de los intermediarios del ciclo TCA para la biosíntesis y producción de NADPH

Otra diferencia importante entre el metabolismo de las células tumorales y el de las células no proliferantes es el uso del ciclo TCA, ya que las primeras lo utilizan como una fábrica biosintética que consume ATP -en lugar de producirlo- con el fin de crear un flujo continuo de productos intermedios destinados a la síntesis de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (cataplerosis). Un caso específico, como es la síntesis de lípidos, caracteriza el ciclo TCA en células tumorales como el ciclo truncado, ya que este proceso necesita la exportación del citrato desde las mitocondrias al citosol, donde se convierte en oxaloacetato (OAA) y en el precursor lipogénico acetil-CoA (como ya se ha mencionado en el apartado 5.1, al hablar del metabolismo de la glutamina). Como estos intermediarios son altamente consumidos en los procesos de síntesis, las células tumorales deben presentar una alta actividad anaplerótica -producción de intermediarios del ciclo TCA- para suplir la cataplerosis y mantener el ciclo activo. De este modo, la anaplerosis elevada se considera un indicador tumoral más potente incluso que la glucólisis anaerobia y se produce, principalmente, por el metabolismo de la glutamina. La oxidación de este aminoácido -análoga a la oxidación parcial de la glucosa - utiliza varios pasos del ciclo TCA convirtiéndolo en una fuente de energía para la proliferación y produce OAA como fuente suficiente de anaplerosis para compensar el uso de intermediarios del ciclo TCA en vías biosintéticas (*DeBerardinis et al., 2008*). Además de la ventaja que presenta la función del ciclo TCA mediante la oxidación de glutamina, cabe destacar lo beneficioso que es poder desvincular el ciclo del TCA de la glucólisis en las células tumorales. Este hecho no sólo evita la acumulación de inhibidores glucolíticos (apartado 5.1) sino que, a pesar de que la glucólisis se represente en las células no transformadas como una única cadena de reacciones para producir piruvato, muchos intermediarios glucolíticos pueden "descentralizarse" de la vía siendo dirigidos a rutas metabólicas que suponen ramificaciones de la glucólisis y permiten generar precursores biosintéticos necesarios para el crecimiento tumoral. La primera vía ramificada de la glucólisis es la ruta de las pentosas Fosfato, generadora de NADPH -necesario para la síntesis de muchas moléculas- y ribosa-5-fosfato -un componente estructural de nucleótidos- a partir de la oxidación parcial de glucosa-6-fosfato. Las enzimas encargadas de esta ruta -como transcetolasa tipo 1 (TKTL1)- se ven, por lo tanto, sobreexpresadas en células tumorales gracias a la activación de oncogénos. Otra ramificación

consiste en la utilización del intermediario de la glucólisis, fructosa-6-fosfato, junto con la glutamina para la síntesis de hexosamina. Esta vía convierte la fructosa-6-fosfato en N-acetylglucosamina (GlcNAc), un substrato para la formación de proteoglicanos y glicoproteínas. Otro intermediario significativo para la biosíntesis macromolecular es la dihidroxiacetona-fosfato (DHAP), capaz de convertirse en glicerol-3-fosfato -un precursor de la síntesis de fosfolípidos- por la acción de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa 1 (GPDH). Finalmente la desviación metabólica de 3-fosfoglicerato, permite la síntesis de los aminoácidos serina y glicina. Esta vía ramificada es la más estudiada en tumorigénesis debido a que las células cancerígenas pueden llegar a destinar un 50% del carbono derivado de la glucosa para producir y posteriormente catabolizar la serina como un intermediario del one carbon cycle que permite la biosíntesis de diferentes biomoléculas (*Figura 6*) (*Pavlova et al., 2016*).

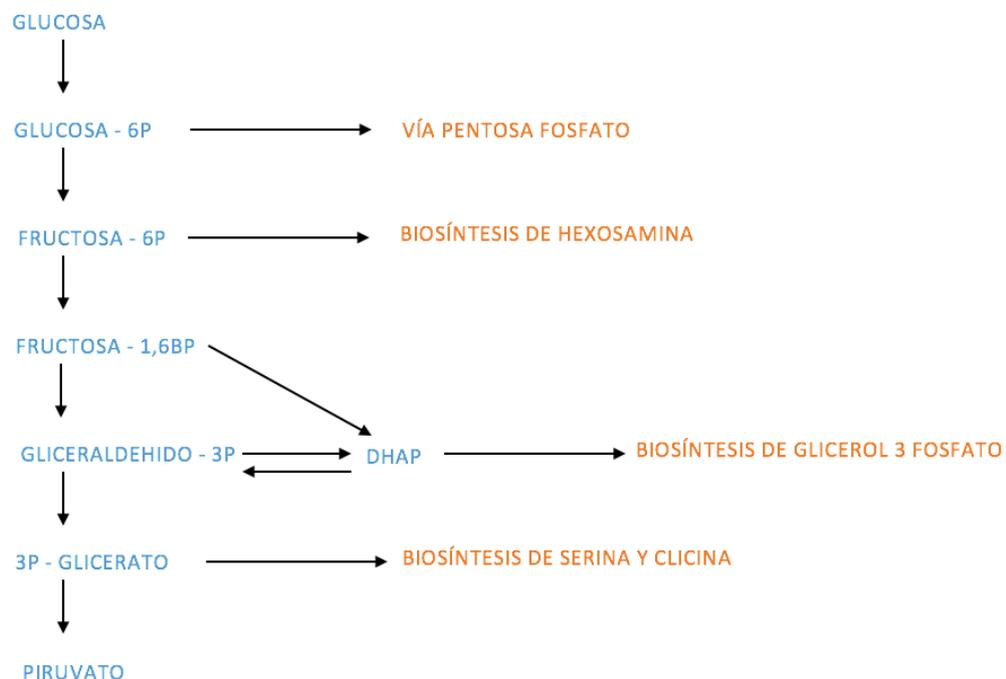


Figura 6. Precursores biosintéticos obtenidos a partir de intermediarios de la glucólisis. Esquemización sobre la derivación de intermediarios glucolíticos para comenzar otras vías metabólicas potenciadas en células tumorales que les permiten realizar la biosíntesis necesaria exigida para su crecimiento y proliferación.

5.4 Aumento de la demanda de nitrógeno

Tal y como se ha comentado anteriormente, una célula proliferante necesita poder sintetizar ciertas moléculas que contienen nitrógeno como nucleótidos, aminoácidos no esenciales y poliaminas. Para llevar a cabo esta biosíntesis se utiliza como fuente principal la glutamina, un aminoácido no esencial que contiene dos átomos de nitrógeno reducido y que utiliza su grupo amida como donador de nitrógeno para la formación de bases nitrogenadas. Debido a la necesidad de este aminoácido, en un ambiente carente de él se detendría el ciclo celular en la fase S. Por lo tanto, que las células tumorales tengan un sistema encargado de llevar a cabo una alta captación de glutamina no es de extrañar. Este sistema se basa principalmente en el oncogén

MYC, como ya se ha comentado en el apartado 5.1.1, que induce la transcripción de transportadores glutamínicos para favorecer la captación de glutamina y regula las enzimas encargadas de catalizar las reacciones mediante las que se obtienen nucleótidos o aminoácidos a partir de glutamina. Todas estas reacciones, obtención directa de nucleótidos a partir de glutamina, obtención indirecta de estos mismos a partir de glutamato y OAA y producción indirecta de aminoácidos mediante una reacción que parte de glutamato y está catalizada por aminotransferasas, se encuentran detalladas en el apartado 5.1 (*Figura 3*). También se debe mencionar la implicación del mutante p53, que facilita la expresión de enzimas responsables de nucleótidos, como timidina quinasa (TK1). Los estudios actuales se basan en dos aspectos distintos: primero, descubrir cómo se puede producir glutamina *de novo* y qué papel tiene en este proceso la glutamina sintetasa (GS), una enzima sobreexpresada en algunos tipos de tumores. Segundo, porqué la arginina, otro aminoácido no esencial, puede ser necesaria en células tumorales y es capaz de ser favorable en condiciones deficientes de glutamina (*Altman et al., 2016*).

5.5 Alteraciones en la regulación génica del metabolismo

Para poder llevar a cabo la activación irregular de señales responsables de la supervivencia y el crecimiento celular propios de la tumorigénesis se debe disponer de un fácil acceso al DNA genómico y a su proceso de transcripción. La disponibilidad del DNA depende de la condensación de la cromatina y, por lo tanto, de las enzimas que crean y deshacen marcas epigenéticas en ésta mediante metilación de histonas. Estas enzimas -como S-adenosilmetionina (SAM)- son dependientes obligadas de ciertos sustratos y se activan por las propias redes metabólicas según el estado nutricional de la célula y su nivel de señalización. Los metabolitos que más se utilizan como sustrato de éstas enzimas en células tumorales son el acetil-CoA citosólico y el crotonil-CoA, de manera que elevados niveles de estos metabolitos o de sus precursores son señales cancerígenas. La eliminación de las metilaciones también se rige por el estado metabólico celular, debido a que está mediado por una amplia clase de dioxigenasas dependientes de acetoglutarato. De esta forma, los niveles intracelulares de acetoglutarato, succinato y fumarato influyen directamente en la actividad de estas enzimas. Por ejemplo, una pérdida de succinato deshidrogenasa (SDH) -alteración encontrada en un subconjunto de tumores gastrointestinales- crea una acumulación de succinato y una inhibición de la dioxigenasa, hecho que permite un mayor número de metilaciones en la cromatina y, por lo tanto, una elevada facilidad para realizar cambios en la expresión génica (*Pavlova et al., 2016*).

5.5.1 Más allá de la alteración génica: Estado Redox.

En las últimas décadas, muchos estudios se han basado en los cambios génicos que suceden durante la reprogramación metabólica llevada a cabo por las células tumorales, pero han sido pocos los que han ido más allá, puntualizando sobre el cambio que generan estas células en su estado Redox. Estos últimos estudios han tenido en cuenta las concentraciones de distintos intermediarios que, actuando como coenzimas, son responsables de permitir los cambios necesarios en el metabolismo central del carbono (CCM) para pasar de un catabolismo oxidativo -común en el resto de células y productor de energía- a un anabolismo reductivo -productor de biosíntesis-. Los intermediarios más representativos son las parejas redox de NAD^+/NADH y

$\text{NAD}^+/\text{NADPH}$, diferentes en células tumorales y células no transformadas ya que las primeras necesitan mucho más poder reductor para llevar a cabo las reacciones de biosíntesis. La relación NAD^+/NADH permite el paso de piruvato a lactato incluso en presencia de oxígeno y por lo tanto favorece el elevado flujo glucolítico y la proliferación, mientras que la de $\text{NAD}^+/\text{NADPH}$, producida mayoritariamente en la ruta de las pentosas fosfato, favorece la biosíntesis y la protección frente al estrés oxidativo (Figura 7). Además de la modificación en la concentración de estos compuestos, también se produce una disminución significativa del potencial de membrana mitocondrial, algo que tiene como consecuencia una disminución de la actividad mitocondrial y, por lo tanto, una menor fosforilación oxidativa que reducirá los niveles de ATP y CO_2 aumentando el pH intracelular (Veiga, 2016).

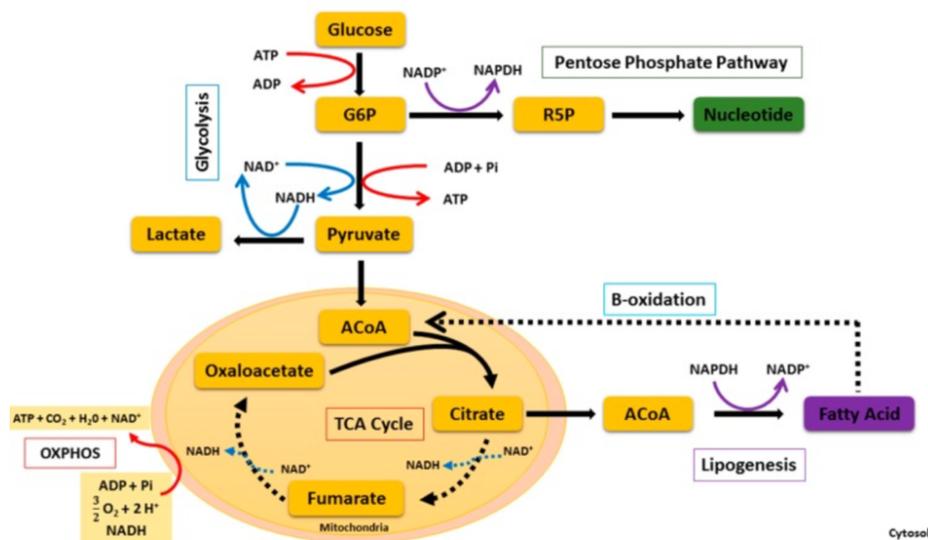


Figura 7. Efecto de las parejas redox NAD^+/NADH y $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ en la sostenibilidad de reacciones necesarias para el desarrollo tumoral. El ratio de la relación de NAD^+/NADH presente en las células tumorales es distinto que el de las no transformadas debido a que las primeras necesitan mucho más poder reductor para sostener el elevado ritmo de conversión de piruvato a lactato. Pasa lo mismo con la pareja $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, el poder reductor de la cual se genera mayoritariamente en la vía pentosa fosfato (masificada en células cancerígenas) y se utiliza en reacciones biosintéticas, sobretudo en lipogénesis.

5.6 Interacciones metabólicas con el microambiente

El estado metabólico de una célula tiene el potencial de influir en aquellas células que compartan su espacio. Es por esa razón que ciertos tipos celulares estables genéticamente, como son los fibroblastos asociados a tumor, las células endoteliales o las del sistema inmunitario, experimentan cambios fenotípicos al residir en las cercanías de un tumor en crecimiento. El microambiente tumoral está caracterizado por la escasez de nutrientes, una situación de hipoxia y de acidez. Estos tres estados favorecen dos fines determinados: la evasión del sistema inmune y la invasión tumoral. La invasión tumoral es un proceso necesario para el éxito del desarrollo cancerígeno. Se ha demostrado que está favorecido por la secreción de lactato al medio, debido a que éste se suma al transporte de H^+ desde el interior celular hacia el exterior y provoca la acidificación del microambiente, estimulando de este modo la actividad proteolítica de las metaloproteínas de la matriz (MMPs) y de las catepsinas, que actúan degradando los

componentes de la matriz extracelular y facilitando la invasión tumoral. Con el objetivo de ayudar en la invasión, el CO_2 se difunde en el espacio extracelular, donde se convierte en H^+ y HCO_3^- por una clase de anhidrasas carbónicas extracelulares, tales como la anhidrasa carbónica IX (CAIX), aumentadas en estado de hipoxia.

Evitar la vigilancia inmunológica es la interacción metabólica más distintiva que establece la célula tumoral con su microambiente, ya que para un crecimiento tumoral exitoso es imprescindible evitar las células del sistema inmune. Así, las células cancerígenas han desarrollado diversos mecanismos metabólicos con este fin entre los que destaca el efecto Warburg. Este efecto contribuye a la evasión inmune debido al elevado consumo de glucosa que tiene lugar en las células tumorales agotándola de forma competitiva para el resto de células e inactivando aquellas dependientes de glucosa, como las células T. Además, este efecto también produce una elevada concentración de lactato que inhibe la migración de monocitos, la liberación de citoquinas, la activación de células dendríticas y, una vez convertido en ácido láctico, acidifica el medio suprimiendo la activación de células T y células asesinas o células NK del inglés Natural Killer y evita la supervivencia de los macrófagos asociados a tumores. Otro mecanismo que permite la evasión del sistema inmune es el catabolismo mejorado del triptófano, que se basa en sobreexpresar enzimas encargadas de convertir el triptófano en kynurenina, tales como triptófano-2,3-dioxigenasa 2 (TDO2) e indolamina-2,3-dioxigenasas 1 (IDO1), delimitando así la utilización de triptófano por células T y provocando su apoptosis asociada a la privación de aminoácidos. El último mecanismo para favorecer el escape es la inducción de la acumulación extracelular de adenosina, que se acumula en el microambiente mediante un proceso por el cual el ATP es liberado de las células a través del metabolismo de nucleótidos alterados y degradado secuencialmente por las enzimas de superficie celular CD39 y CD73, sobreexpresadas en tumores, produciendo adenosina. La adenosina, a su vez, actúa sobre una variedad de receptores de adenosina (A1, A2A, A2B, A3) situados sobre células B, T, NK, células dendríticas, macrófagos, neutrófilos y mastocitos, suprimiendo ciertos efectos como la citotoxicidad de células NK, la maduración de células dendríticas y la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Lee et al., 2016).

5.7 Terapia antitumoral para revertir el metabolismo alterado en células cancerígenas.

Como se ha mencionado anteriormente, el estudio de la reprogramación metabólica que llevan a cabo las células tumorales empezó con Otto Warburg en 1924, año en que el investigador describió el proceso de glucólisis aeróbica como una característica de estas células. Desde esta fecha hasta el presente, las investigaciones sobre el metabolismo de las células tumorales no han dejado de aumentar, llegando a la descripción de muchos otros procesos característicos de tumorigénesis vinculados a alteraciones metabólicas, que han sido clasificados y detallados en los apartados anteriores del presente trabajo.

A pesar de ello, y de corroborar que el conjunto de cambios representan una marca diferencial de tumorigénesis, no ha sido hasta la última década que las alteraciones metabólicas han sido estudiadas como posibles dianas para eliminar tumores. Se han dedicado innumerables

esfuerzos a identificar potenciales fármacos que maten selectivamente células neoplásicas dirigidos a revertir la reprogramación metabólica de las células tumorales. Este enfoque se ha conseguido no sólo desarrollando nuevas moléculas sino dando un nuevo uso a otras ya existentes -destinadas al tratamiento de desordenes metabólicos, como el metotrexato y la gemcitabina-. Ciertas ideas erróneas sobre que estas alteraciones metabólicas son únicas de células cancerígenas o sobre la homogeneidad de los tumores han afectado a la posibilidad de conseguir un éxito rotundo en las terapias. Actualmente, y a pesar del elevado número de estudios clínicos (<https://clinicaltrials.gov/ct2/search/advanced>) en curso que evalúan distintos agentes como posibles fármacos (Tabla 1), sigue habiendo un número muy bajo de inhibidores metabólicos desarrollados para terapia tumoral comparado con otras terapias, hecho que pone de manifiesto la novedad de este campo de estudio (Galluzi et al., 2013).

A continuación, y como discusión sobre el uso clínico que tiene el hecho de conocer las características metabólicas tumorales, se describe la situación actual de la aplicación terapéutica de fármacos dirigidos a la reprogramación metabólica, a través de la descripción de distintas dianas metabólicas y sus respectivos fármacos así como la distancia a la que éstos se encuentran de llegar al mercado farmacológico. Cabe destacar que, al tratarse de un campo tan amplio, los estudios se presentarán agrupados según la vía metabólica que pretenden afectar y según si ésta pertenece a la actividad bioenergética o anabólica de la célula. Finalmente también se comentará, brevemente, la afectación de otras vías vinculadas al microambiente tumoral.

Tabla 1: Lista de posibles fármacos antitumorales contra dianas terapéuticas del metabolismo bioenergético y anabólico tumoral. Se describen algunos de los fármacos que se están evaluando como posibles agentes antitumorales. Se especifica la diana metabólica que se pretende atacar y la vía metabólica a la que pertenece. También se detalla, el estado del estudio y se añaden observaciones. En el texto han sido citados agentes que van dirigidos contra enzimas glucolíticas específicas, pero la tabla muestra también productos, transportadores e intermediarios como dianas terapéuticas para demostrar que el campo de investigación es muy amplio. Fuente: Galluzi et al., 2013.

Targets	Pathways	Agents or approaches (company)*	Development stage	Observations
Bioenergetic metabolism				
CPT1	β -oxidation	<ul style="list-style-type: none"> • Etomoxir • Oxfenicine • Perhexiline • RNAi 	Perhexiline is approved for use as an anti-angina agent in Asia, Australia and New Zealand	Inhibition of CPT1 exerts anticancer effects <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> , yet it remains unclear whether these stem from the blockade of β -oxidation
Complex I	Mitochondrial respiration	<ul style="list-style-type: none"> • Metformin • Phenformin 	Metformin is prescribed for the treatment of type 2 diabetes	The antineoplastic activity of metformin is independent of glycaemia and may reflect its capacity to inhibit mitochondrial respiration
GLUT1	Glycolysis	<ul style="list-style-type: none"> • WZB117 • RNAi 	Preclinical data	Pharmacological or genetic inhibition of GLUT1 exerts antineoplastic effects, both <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>
GLS1	Glutamine metabolism	<ul style="list-style-type: none"> • 968 • BPTES • RNAi 	Preclinical data	Malignant cells expressing mutant IDH1 may be particularly sensitive to GLS1-targeting agents
Hexokinases	Glycolysis	<ul style="list-style-type: none"> • 2-DG • 3-BP • Lonidamine • Methyl jasmonate • RNAi 	The clinical development of 2-DG, 3-BP and lonidamine has been discontinued	It remains to be determined whether the anticancer effects of 3-BP and lonidamine stem from the inhibition of hexokinases

Continuación Tabla 1

MCT1	Krebs cycle	<ul style="list-style-type: none"> • AR-C155858 • AR-C117977 • AZD3965 (AstraZeneca) • CHC • RNAi 	AZD3965 is in clinical development	AZD3965 is currently being tested in a Phase I clinical trial enrolling patients with advanced solid tumours; these agents may be incompatible with the use of MCT1-transported drugs such as 3-BP
PDK1	Krebs cycle	<ul style="list-style-type: none"> • DCA 	DCA is a prescription drug for the treatment of lactic acidosis	DCA is well tolerated by patients with glioblastoma multiforme and provokes profound mitochondrial defects in cancer cells
PKM2	Glycolysis	<ul style="list-style-type: none"> • TLN-232 (Thallion) • RNAi 	The clinical development of TLN-232 has been discontinued	Inhibition of PKM2 reverses the Warburg effect (at least in some tumour models), yet it may favour anabolism
Anabolic metabolism				
Choline kinase	Lipid biosynthesis	<ul style="list-style-type: none"> • CK37 • TCD-717 (TCD Pharma) • RNAi 	TCD-717 is in clinical development	The safety and therapeutic profile of TCD-717 is currently being tested in patients with advanced solid tumours
HMGCR	Mevalonate pathway	<ul style="list-style-type: none"> • Statins 	Statins are prescription drugs that are used to treat hypercholesterolaemia	The antineoplastic potential of statins is being investigated in multiple prospective clinical trials
IDHs	Lipid biosynthesis	<ul style="list-style-type: none"> • AGI-5198 (Xcessbio) • AGI-6780 (Xcessbio) • RNAi 	Preclinical data	Inhibition of both wild-type and mutant IDH results in multipronged antineoplastic effects, presumably reflecting a decrease in 2-HG levels as well as an interference with glutamine metabolism
MGLL	Lipid biosynthesis	<ul style="list-style-type: none"> • JZL184 • RNAi 	Preclinical data	MGLL promotes the migration, invasion and survival of malignant cells, as well as <i>in vivo</i> tumour growth
PGAM1	Pentose phosphate pathway	<ul style="list-style-type: none"> • PGMI-004A • RNAi 	Preclinical data	Pharmacological or genetic inhibition of PGAM1 attenuates tumour growth <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> , presumably owing to the 3PG-mediated inhibition of the pentose phosphate pathway
PHGDH	Anaplerosis	<ul style="list-style-type: none"> • RNAi 	Preclinical data	PHGDH inhibition fails to affect serine availability, yet limits that of multiple intermediates of the Krebs cycle
PKM2	Pentose phosphate pathway	<ul style="list-style-type: none"> • TEPP-46 • SAICAR • Serine 	Preclinical data	PKM2 activators reportedly limit the diversion of glucose toward the pentose phosphate pathway, hence mediating antitumour effects

5.7.1 Enfoque bioenergético

Desde el punto de vista bioenergético, muchas de las alteraciones metabólicas presentes en células cancerígenas -incluyendo la glucólisis, el ciclo TCA, la respiración mitocondrial, la glutaminólisis y la oxidación de ácidos grasos- han sido consideradas posibles dianas en la terapia antitumoral y por lo tanto se han visto sometidas a estudio.

Debido a que la inhibición de la glucólisis ha resultado útil para prevenir el desarrollo del cáncer, muchos de estos estudios han tenido por objetivo bloquear el aumento de esta vía metabólica en células tumorales mediante la disminución de la actividad enzimática de hexoquinasas (HK), piruvato quinasa (PK), fosfofructoquinasa (PFK) y piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK1), proteínas que regulan los pasos limitantes e irreversibles de la glucólisis (*Figura 8*) (*Villegas et al., 2016*). No obstante, algunos de los potenciales fármacos no se sabe si realmente son

efectivos perquè inhiben la glucòlisis o perquè inducen altres efectes donat que, com es ha descrit en apartats anteriors, poden afectar no solament a les cèl·lules tumorals sinó tot el seu entorn.

Per a il·lustrar aquest fet es descriuen a continuació alguns exemples concrets de fàrmacs dirigits contra les enzimes citades anteriorment. En els estudis en què es busca inhibir les HKs, destinades a comprometre l'ús de la glucosa en la via glucolítica, s'ha treballat amb diversos agents entre els quals destaca la 2-desoxi-D-glucosa (2-DG) compost que una vegada fosforilat per la HK no pot continuar la ruta glucolítica inhibint la glucòlisis aeròbia. L'inhibició no selectiva de les diferents isoformes de HK per aquest compost s'ha descrit com a tolerable des d'un punt de vista de toxicitat general en els assaigs realitzats, no obstant això existien dubtes de que s'haguessin utilitzat dosis relativament rellevants del compost (*Galluzi et al., 2013*). Per això, s'està buscant composts que inhibin de forma selectiva la isoforma 2 de la HK donat que es tracta de la isoforma més sobreexpressada en cèl·lules tumorals (*Wolf et al., 2011*). Altres exemples són el 3-bromopiruvat (3-BrPA) i la Ionidamina (LND), agents que també inhiben la HK (*Figura 9*). Les tres molècules s'encuentren en assaigs preclínics temprans, però els resultats de LND i 3-BrPA són menys prometedors que els de 2-DG donat que tampoc s'ha aconseguit una elevada especificitat. El 3-bromopiruvat s'ha vist que inhibeix altres enzimes de la glucòlisis incloent la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa (GAPDH) i la lactat deshidrogenasa (LDH). A més, actualment s'han detingut les investigacions sobre LND al detectar hepatotoxicitat i s'ha rebutjat la probabilitat d'administrar-lo amb un altre antitumoral per comprovar si els seus efectes milloren (*Van der Mijl et al., 2016*). En el cas d'utilitzar la PFK com a diana terapèutica, els investigadors tracten de disminuir el pH intracel·lular i d'augmentar la concentració de citrat, dos factors que interrompen la seva activitat (*Figura 8*). Amb aquest fi utilitzen agents com amilorid o SB-204990 que són capaços d'inhibir l'intercanviador Na^+/H^+ HE-1 (NHE1-NHE10) amb el qual s'augmenta el pH, i la ATP citrat liasa, la qual transforma el citrat cel·lular en acetil coenzim A, respectivament. El fàrmac PFK15 també és capaç de bloquejar PFK, disminuint els nivells de Fructosa-2,6-difosfat i lactat (*Figura 9*) (*Jang et al., 2013*). Els estudis sobre TLN32, inhibidor de PKM2 (*Figura 8*) s'encuentren parats després de descobrir que alguns tumors no necessiten l'ús d'aquesta enzima. A pesar de la importància d'aquestes enzimes, també s'han estudiat diversos fàrmacs que bloquegen diversos intermediaris de la via. Entre ells s'encuentren els inhibidors FK866, PGM1-004A i bloqENO que impedeixen l'activitat de GAPDH, PGAM1 i ENO, i els fàrmacs STF-31 o WZB117 que bloquegen selectivament el transportador GLUT1 impedeixent la captació de glucosa (*Figura 9*) (*Van der Mijl et al., 2016*). Finalment destacar el dicloroacetat (DCA), únic agent que s'encuentra disponible en el mercat com a fàrmac per la seva activitat contra l'acidosis làctica hereditària. Actua igual que altres fàrmacs com AZD7545 i VER-246680 inhibint la funció PDK1, normalment sobreexpressada en cèl·lules tumorals (*Figura 9*). D'aquesta manera no s'inhibeix el complex de la piruvat deshidrogenasa amb el qual s'afavoreix l'entrada de piruvat al TCA i es disminueix la formació de lactat. Els productes de la glucòlisis entren a la mitocondria realitzant metabolisme oxidatiu en lloc de fermentació i producció de lactat. No obstant això, se sospita que la normalització metabòlica produïda per aquest compost no és realment la responsable de la seva acció antitumoral, sinó que ho és la seva capacitat de reactivar

cascadas de transducción de señales que inducen apoptosis y su capacidad de incrementar el pH extracelular, debido a la disminución de la excreción de lactato, que frena la invasión de células tumorales y permite la recuperación de un microentorno inmunosupresivo (Calcinotto, 2012). El DCA consiguió un gran prestigio después de observarse la remisión completa y duradera de un linfoma de Hodgkin en un paciente en el que la quimioterapia convencional no había funcionado, aumentando de este modo el número de estudios sobre él y sobre otros reguladores de pH que dieron buenos resultados antineoplásicos en ratones. Considerado un fármaco barato, fácil de producir, seguro y bien tolerado el único inconveniente que presenta el DCA es su baja perspectiva de beneficio para las farmacéuticas, ya que es una molécula simple del siglo XIX que no se puede patentar. A pesar de ello, las investigaciones sobre sus posibilidades no dejan de crecer y actualmente se busca la forma de aplicarlo como parte de un régimen con múltiples fármacos (Salamon et al., 2017).

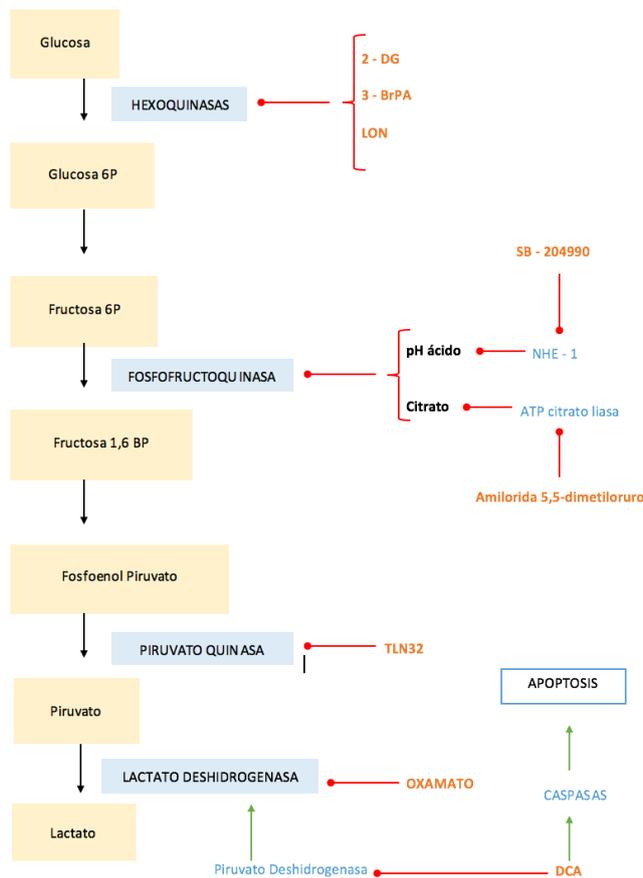


Figura 8. Ejemplos sobre fármacos antitumorales destinados a inhibir la actividad de enzimas glucolíticas encargadas de catalizar reacciones irreversibles y limitantes de la glucólisis. Las hexoquinasas catalizan la primera reacción glucolítica y son inhibidas por 2-DG, 3-BrPA y LON. La enzima que cataliza el paso de fructosa 6P a fructosa 1,6BP recibe el nombre de fosfofructoquinasa y se regula negativamente por niveles bajos de pH y concentraciones altas de citrato, de manera que la estrategia terapéutica es utilizar agentes antitumorales como SB-204990 y Amilorida 5,5-dimetilururo que inhiben los elementos que evitan estas condiciones - NHE-1 y ATP citrato liasa-. La piruvato quinasa es atacada para frenar la producción de piruvato mediante el agente TLN32. Finalmente, el posible fármaco DCA cumple dos funciones diferentes: inhibir la piruvato deshidrogenasa para que esta no pueda activar la lactato deshidrogenasa la cual cataliza el paso de piruvato a lactato y activar proteasas como las caspasas para inducir la apoptosis celular. La lactato deshidrogenasa también puede ser inhibida directamente por acumulación de oxamato. *Las flechas rojas indican inhibición y las verdes inducción.

Si dejamos de lado la glucólisis, otras vías como el ciclo TCA, el metabolismo de la glutamina, la β -oxidación o la respiración mitocondrial también han tenido su papel en los estudios de enfoque bioenergético aunque en menor proporción. En el caso de la respiración mitocondrial, se ha analizado el potencial antineoplásico de un fármaco llamado metformina en cánceres de mama, páncreas y próstata. La metformina es una biguanida muy utilizada para el tratamiento de

diabetes mellitus tipo 2. En las últimas décadas, también se ha estudiado su potencial como antitumoral al comprobarse que los pacientes diabéticos sometidos a este tratamiento presentaban menor incidencia y mortalidad por cáncer. En 2006, *Zakikhani (Villegas et al., 2016)* demostró que la metformina detenía el crecimiento de tumores de mama a través de la activación de la quinasa de hígado B1 (LKB1), una enzima supresora de tumores generalmente mutada en ciertos cánceres, y su proteína diana, la quinasa dependiente de adenosín monofosfato cíclico (AMPK). La activación de AMPK induce apoptosis, detención del ciclo celular vía caspasas o autofagia, activación de p53 por fosforilación e inhibición de mTOR. Esta inhibición, realizada por fosforilación y la estabilización del complejo de Esclerosis Tuberosa 2 (TSC2), impide las funciones asociadas a esta vía como anabolismo, síntesis proteica, crecimiento, supervivencia, proliferación celular e inhibición de la autofagia. Posteriormente, en 2007 se describió que inducía la detención del ciclo celular independiente de p53 y que inhibía la fosforilación oxidativa en las mitocondrias al bloquear el complejo I de la cadena transportadora de electrones, conduciendo a la apoptosis. En años recientes se han comprobado los mecanismos por los que la metformina potencia la acción del sistema inmune contribuyendo por otra vía a ejercer efectos antitumorales (*Villegas et al., 2016*). Otras dianas a mencionar son los transportadores de lactato al medio extracelular (MCT1) y de entrada de glutamina (GLS). La inhibición de MCT1 mediante fármacos como AZD3965 y AR-C155858 (*Figura 9*), inducen la acumulación de lactato que provoca cambios en el pH y efectos citotóxicos para las células tumorales. Por su parte, la enzima glutaminasa tiene distintas isoformas en la célula, pero la destacada a nivel tumoral por su sobreexpresión es la glutaminasa tipo riñón (KGA) derivada del gen GLS1. Esta enzima tiene dos variantes que difieren únicamente en el tamaño de su región C-terminal: la más larga mantiene el acrónimo KGA y la más corta pasa a llamarse glutaminasa C (GAC). KGA y GAC se encuentran inactivas en su forma dimérica y se activan al unirse formando tetrámeros, de manera que la investigación antitumoral cree que evitar esta unión podría ser una buena diana terapéutica. En relación a esta idea se han realizado estudios con moléculas pequeñas capaces de inhibir KGA y GAC, destacando en los últimos años BPTES y 968. BPTES es una molécula simétrica específica para KGA que se acopla a la región que los dímeros usan para unirse y formar un tetrámero, evitando de esta forma la activación de la enzima. La molécula 968, un regulador alostérico de GAC, se une a los extremos N y C-terminales de dos monómeros GAC impidiendo la formación de tetrámeros activos. Ninguna molécula ha sido considerada tóxica y en el caso de 968, por ejemplo, se ha demostrado que una dosis de fármaco que inhibe significativamente la proliferación de células cancerosas tiene poco efecto sobre células no transformadas. Se cree que esto sucede porque la mayoría de las células necesitan poca actividad de glutaminasa para sobrevivir, debido a que usan la fosforilación oxidativa como vía metabólica primaria (*Katt et al., 2014*). No obstante, no todo son ventajas, en el caso de utilizar el agente contra MCT1, AZD3965, se impide el uso simultáneo de otros tratamientos como el de 3-bromopiruvato, ya que éste para ser absorbido necesita la presencia de MCT1 funcional (*Birsoy et al., 2013*). Finalmente, mencionar que la vía bioenergética menos explotada como diana terapéutica ha sido la oxidación de ácidos grasos pero que, aun así, se ha demostrado que algunos de sus inhibidores pueden tener efectos antitumorales. Este es el caso del etomoxir, un fármaco que inhibe a carnitina O-palmitoitransferasa 1 (CPT1), una diana cuya inhibición conlleva una elevada capacidad antitumoral debido a su rango de funciones, que van desde la inhibición de la importación

mitocondrial de ácidos grasos mediada por la lanzadora de carnitina hasta la disminución de los niveles intracelulares de ATP, pasando por una disminución de la resistencia a la quimioterapia en determinados tipos de tumores (*Zhao et al., 2013*). Desgraciadamente, su desarrollo clínico se ha estancado debido a una elevada hepatotoxicidad asociada con su terapia.

5.7.2 Enfoque anabólico

A parte de la necesidad energética, las células tumorales deben generar elevadas cantidades de biomasa para mantener su nivel de proliferación. Por esa razón, su metabolismo anabólico -basado en la biosíntesis de lípidos, proteínas y nucleótidos- se convierte en una característica tumoral que puede ser utilizada como diana terapéutica y que da lugar a un nuevo enfoque de estudio destinado a destruir células con un determinado anabolismo. Muchas de las investigaciones realizadas en este ámbito se han basado en encontrar agentes capaces de inhibir la vía de las pentosa fosfato a partir de inactivar sus enzimas limitantes glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) y transcetolasa (TKT). G6PD puede ser bloqueada por fármacos como 6-aminonicotinamida (6-AN) y deshidroepiandrosterona (DHEA), ambos probados en tratamientos experimentales que han tenido como resultado un aumento del estrés oxidativo debido a la disminución de NADPH. La oxitiamina y el hidroxifenilpiruvato son ejemplos de inhibidores de TKT y la primera se consideró un tratamiento eficaz para reducir el crecimiento tumoral a través de la elevación del estrés oxidativo (*Figura 9*) (*Van der Mijn et al., 2016*). A parte de la citada vía, también se han atacado aquellas que sustentan la síntesis de ácidos nucleicos y la lipogénesis. En el caso de la síntesis de ácidos nucleicos se usaron como dianas terapéuticas los colectivamente determinados antimetabolitos -metabolitos que intervienen en la síntesis de timidinas, desoxinucleótidos o en la elongación del DNA (por ejemplo, metotrexato, 5-fluoruracilo, hidroxiure, etc.)- y, a pesar de ser considerados muy interesantes y con resultados antineoplásicos muy positivos, algunos presentan toxicidad para tejidos proliferantes, lo cual reduce su ventana terapéutica (*Zhao et al., 2013*). En el caso de la lipogénesis, se han atribuido papeles oncogénicos a varias enzimas implicadas en este proceso -como la sintasa de ácidos grasos (FASN), la monoglicérido lipasa (MGLL) o la ATP citrato liasa. Esta última transporta el citrato fuera de la mitocondria y lo convierte en acetilCoA, de manera que al verse bloqueada por inhibidores químicos como SB-204990 y SB-201076 (*Figura 9*) se inhibe la proliferación tumoral debido a una carencia de lípidos (*Van der Mijn et al., 2016*). No todos los inhibidores lipogénicos descubiertos han sido sometidos a estudios, aunque algunos de ellos están aprobados para otros tratamientos, por ejemplo el orlistat para el tratamiento de la obesidad. Lo mismo ocurre con las estatinas, medicamentos altamente usados en clínica para el control de los niveles de colesterol y de los cuales se tiene mucha información pero que, de momento, sus efectos antineoplásicos no han sido demostrados de manera concluyente (*Zhao et al., 2013*).

A parte de las vías de síntesis, también se han incluido en este tipo de estudios aquellos que juegan con la auxotrofia de las células tumorales y los que inhiben la vía mTOR. Teniendo en cuenta que las células malignas son auxotróficas para ciertos aminoácidos no esenciales -asparagina, arginina o glicina- se ha medido el potencial terapéutico de agentes que disminuyen los niveles de aminoácidos circulantes, como el caso de arginina deaminasa que está teniendo

resultados prometedores en ensayos clínicos (*Van der Mijn et al., 2016*) o el de la variante bacteriana de la L-asparaginasa que fue aprobada en 1987 como tratamiento para la leucemia linfoblástica por la Food and Drug Administration (FDA) (*Galluzi et al., 2013*). Por otro lado, el número de estudios sobre inhibidores farmacológicos de mTOR -como everolimus y temsirolimus- no deja de crecer, pero sus resultados no llegan a ser los deseados porque su función antitumoral se ve afectada por la capacidad intrínseca de estos compuestos para estimular la autofagia lo cual curiosamente resulta en una resistencia terapéutica del tumor. No obstante, la vía mTOR también puede ser inhibida por NVP-BEZ235, un fármaco que, combinado con agentes quimioterapéuticos, afecta la vía PI3K/mTOR y puede sensibilizar células resistentes a ciertas terapias, demostrando así cierta capacidad de revertir la quimioresistencia (*Altman et al., 2016*).

5.7.3 Enfoque microambiental

En los últimos años también se han estudiado como posibles dianas terapéuticas aquellas vías metabólicas que actúan en respuesta al microambiente tumoral. Sin embargo, este enfoque no ha logrado grandes avances y la mayoría de los estudios dedicados a atacar la angiogénesis producida por las células tumorales en situación de hipoxia han tenido como resultado una estimulación de la evasión y metástasis cancerosa (*Wilson et al., 2011*). La investigación actual se dedica a identificar mecanismos implicados en la adaptación de las células cancerosas a la hipoxia con el objetivo de detectar dianas para nuevos agentes terapéuticos. Una molécula clave es la HIF1- α , responsable de la formación del complejo HIF, que actúa como un factor de transcripción en la activación de un amplio espectro de genes y conduce, finalmente, la Transición Epitelial-Mesenquimal (EMT). EMT es un proceso presente durante la carcinogénesis, metástasis y recurrencia tumoral durante el cual las células epiteliales pierden sus características y adquieren propiedades mesenquimales: pérdida de adhesión celular, aumento en movilidad e invasividad y resistencia a apoptosis. Estos cambios facilitan una mayor invasividad, migración y proliferación celular de tejidos circundantes. Algunos fármacos han tenido relativo éxito en este campo, como el Ganetespib o la Digoxina. Ganetespib es capaz de aumentar la degradación de Hsp90, un activador de HIF1- α , y por ello se está estudiando actualmente en un ensayo en fase 3 en combinación con docetaxel. Cabe mencionar que este fármaco ya se administró como monoterapia en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico avanzado (NSCLC) en un estudio multicéntrico de fase 2 y mostró efectos secundarios aceptables y un incremento de supervivencia de 11 meses. La digoxina es un glucósido cardíaco con actividad antitumoral debido a la inhibición de la síntesis de HIF1- α en varios tumores sólidos. Actualmente, la digoxina está implicada en un ensayo clínico de fase 1 como un nuevo inhibidor de HIF1- α en cáncer de mama (*Wilson et al., 2011*). Por otro lado, los estudios sobre la inhibición de la autofagia han demostrado que esta inhibición puede limitar, más que incrementar, los beneficios de otros quimioterapéuticos al menos en determinadas circunstancias (*Galluzi et al., 2013*).

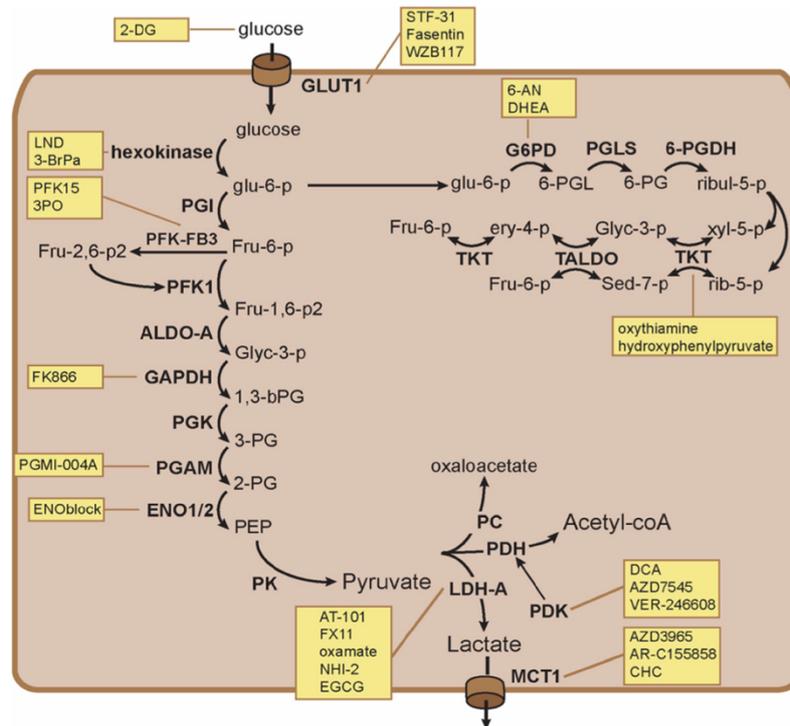


Figura 9. Inhibición por fármacos de enzimas críticas en distintas rutas metabólicas. La vía glucolítica está catalizada por distintas enzimas que pueden servir como dianas terapéuticas. Las más estudiadas han sido las HKs, la PFK1 y la PDK, bloqueadas por fármacos como 3-BrPa, o DCA. Otros intermediarios de esta vía, como el transportador de glucosa (GLUT1), la GAPDH, la PGAM o la ENO1/2 también han sido atacados por distintos fármacos aunque con menos éxito. La actividad de la hexoquinasa libera glucosa-6-fosfato que puede dirigirse a la PPP, vía que consta de dos fases distintas: una oxidativa catalizada por la enzima limitante G6PD y generadora de NADPH y ribulosa-5-fosfato y otra no oxidativa que reutiliza la ribulosa-5-fosfato para volver a la glicólisis y está regulada por TKT. Ambas enzimas son utilizadas como dianas e inactivadas por fármacos como 6-AN y oxitiamina. Los productores de lactato (LDH) y sus transportadores (MCT1) también se han utilizado en la terapia antitumoral, demostrando efectos positivos cuando son inactivados por fármacos químicos como FX11 o AZD3965. **Fuente: Van der Mijn et al., 2016.**

5.8 Ética y biosostenibilidad de los ensayos sobre posibles fármacos tumorales

El presente trabajo final de Grado no presenta implicaciones éticas ni de biosostenibilidad de ningún tipo al tratarse de un trabajo bibliográfico. No obstante, dado que implica la descripción de fármacos que se utilizan o podrán utilizarse como agentes antitumorales en humanos, a continuación se expondrán diferentes aspectos relacionados con la ética y biosostenibilidad de este campo de investigación.

La investigación de nuevos fármacos contra el metabolismo tumoral aporta esperanzas a la lucha contra el cáncer pero también afecta aspectos éticos y medioambientales que provocan discrepancia en la población sobre su realización y uso. Para que una Agencia Reguladora apruebe la salida de un nuevo fármaco al mercado éste debe haber sido analizado en una fase preclínica de investigación con cultivos celulares y modelos animales y en tres fases sucesivas de ensayos clínicos en humanos. Los ensayos con modelos animales se consideran un punto negativo pero necesario para conseguir un beneficio superior por una parte de la población, pero como una atrocidad excesiva por parte de otra. Este último grupo denuncia el uso de animales

como modelos de enfermedad para estudios farmacológicos en los ensayos preclínicos porqué lo consideran un abuso hacia ellos al someterlos a pruebas como la inducción intencionada de efectos adversos, la inducción de extra toxicidad o el cálculo de la dosis letal media que mata al 50% de los participantes para comprobar la seguridad del fármaco. Un elevado porcentaje poblacional demanda la eliminación del uso de ensayos con animales, algo imposible hasta el momento debido a que los códigos de ética internacionales para la investigación biomédica consideran estos ensayos una obligación para poder hacer ensayos clínicos en seres humanos. Así lo establecen distintos principios, como el Código de Núremberg o la Declaración de Helsinki, cuando imponen que cualquier experimento hecho en seres humanos debe haber sido diseñado y basado en los resultados de investigación animal, ya que hasta el momento no existen alternativas viables para ésta experimentación. Las técnicas de cultivo celular solo proporcionan información accesorio útil y lo máximo que se puede hacer es disminuir el número de animales utilizados en experimentación y globalizar las pruebas de toxicidad para evitar sus duplicaciones, pero en ningún caso pueden emular las interacciones que se dan en el organismo humano con la precisión que se obtiene de los ensayos con organismos animales. Por su parte, los investigadores defienden que todas las prácticas con animales están reguladas por las Pautas Éticas Internacionales del Consejo Internacional de Organizaciones Médicas (CIOM) y que éstas aseguran el reemplazo de animales conscientes por otros inconscientes o materiales no sensibles siempre que sea posible, la reducción del número de animales por prueba y el refinamiento de las técnicas para reducir el dolor y las molestias (*Rodríguez, 2012*). En el caso de los ensayos clínicos con humanos, se denuncia el uso de éstos como objetos de investigación y no como pacientes, algo que no se sostiene si se valora que cualquier participante de un estudio ha debido firmar el consentimiento asistido donde confirma que conoce todos los procesos y riesgos del estudio y que aun así quiere participar en él.

En cuanto a la sostenibilidad de los estudios oncogénicos, muchas farmacéuticas que realizan investigaciones en este campo aseguran sus buenas prácticas con el medio ambiente, defendiendo que no quieren perjudicar algo que utilizan como fuente, ya que no todos los fármacos usados como agentes antitumorales son de síntesis química sino que tienen su origen en la naturaleza. Para demostrar este compromiso a largo plazo y, no únicamente durante la creación del fármaco, ciertas grandes farmacéuticas han participado en iniciativas como SIGRE⁴ destinadas al correcto reciclaje de los envases de medicamentos evitando así potenciales contaminaciones.

También es importante mencionar que las alteraciones metabólicas que se producen en los tumores han sido utilizadas como excusa por ciertos personajes públicos para intentar lucrarse de este hecho, asegurando, por ejemplo, que ciertas dietas alimenticias pueden fomentar la cura de la enfermedad debido a que regulan el pH del organismo, un factor involucrado en el metabolismo celular y que ha sido diana de muchos estudios sobre cambios metabólicos en la tumorigénesis. Es decir, se han aprovechado resultados serios de investigación en este campo para utilizarlos de forma fraudulenta.

[4] <http://blogsigre.es>

6. CONCLUSIONS

The set of knowledge gained in the last decades about the metabolic changes of tumor cells have opened a new very powerful window of research in the fight against cancer. Until recently, only signal transduction pathways have been considered as therapeutic targets and, therefore, the information about metabolic alterations of the tumor allows to fighting cancer from another perspective. Rewiring the metabolism of tumor cells give us the opportunity to analyze a large number of metabolites as well as to develop drugs with a broad spectrum to treat different types of cancer. Despite the amount of preclinical data, clinical trials do not progress as quickly as one would wish. Currently, most of the agents tested as possible antitumor agents are still in clinical processes and have not been found fully functional in their missions. In addition, significant differences have been seen in the results depending whether the therapy is performed on one tumor type or another. Even so, there are studies with promising results that demonstrate the validity of the metabolism as a tumor label and as a therapeutic target, especially those that join the action of several possible drugs, i.e. the administration of drugs that target the metabolic phenotype with currently used chemotherapeutics. Overall, the data demonstrate that the metabolic approach studied so far is correct and may be very useful clinically, but that there are still unknowns about tumor metabolism that must be considered and understood and that it cannot be obviated the tumor heterogeneity.

7. AGRADECIMIENTOS

Antes de dar por finalizado el presente Trabajo de Fin de Grado, querría expresar mi más sincero reconocimiento y agradecimiento a todas las personas que han contribuido en su realización y que han permitido, gracias a su colaboración y esfuerzo, que éste fuera posible.

En primer lugar, gracias a Maria Vilanova Brugués, tutora de este proyecto, por encaminar y revisar todos sus apartados con dedicación.

Un agradecimiento especial a los tutores de las asignaturas "Bioenergética y Metabolismo" y "Fármacos Biotecnológicos", por despertar en mí un gran interés sobre el tema tratado.

Y, por último, gracias a mi familia y amigos por conseguir que no desista en ningún punto del camino.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Altman, B.J. et al. (2016) From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 16(10), 619-634.
- Birsoy, K. et al. (2013) MCT1-mediated transport of a toxic molecule is an effective strategy for targeting glycolytic tumors. *Nat Genet*, 45, 104-108.
- DeBerardinis, R.J. et al. (2008) The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. *CellPress*, 7(1), 11-20.
- Galluzi, L. et al. (2013) Metabolic targets for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*, 12(11), 829-846.
- Jang, M. et al. (2013) Cancer cell metabolism: implications for therapeutic targets. *Exp Mol Med*, 45: e45.
- Katt, W. et al. (2013) Glutaminase regulation in cancer cells: a druggable chain of events. *Drug Discov Today*, 19(4), 450-457.
- Lee, N. et al. (2016) Cancer Metabolism. Fueling More than Just Growth. *Mol. Cells*, 39(12), 847-854.
- Liang, Y. et al. (2013) The regulation of cellular metabolism by tumor suppressor p53. *Cell Biosci*, 3, 9.
- Pavlova, N.N. et al. (2016) The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *CellPress*, 23(1), 27-47.
- Pinzón, C.E. et al. (2009) Role of phosphatidylinositol 3-kinase pathway (PI3K/Akt) in humans. *Rev. Cienc. Salud. Bogotá*, 7(2), 47-66.
- Rodríguez, E. (2012) Desafíos éticos de la investigación con animales, manipulación genética. *Rev Peru Med Expo Salud Publica*, 29(4), 535-540.

- Salamon, S. et al. (2017) Glucose Metabolism in Cancer and Ischemia: Possible Therapeutic Consequences of the Warburg Effect. *Nutr Cancer*, 69(2), 177-183.
- Smith, B. et al. (2016) Addiction to Coupling of the Warburg Effect with Glutamine Catabolism in Cancer Cells. *Cell Reports*, 17(3), 821-836.
- Van der Mijn, J. et al. (2016) Novel drugs that target the metabolic reprogramming in renal cell cancer. *Cancer Metab*, 13(4).
- Veiga, J. (2016) The Redox Status of Cancer Cells Supports Mechanisms behind the Warburg Effect. *Metabolites*, 6(4):33.
- Villegas, C. et al. (2016) Nuevas evidencias del uso de la metformina en el tratamiento del cáncer. *Rev Cubana Endocrinol*, 27(3), 80-90.
- Weber, G. F. (2016) Time and Circumstances: Cancer Cell Metabolism at Various Stages of Disease Progression. *Front Oncol*, 6, 257.
- Wilson, WR. et al. (2011) Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 11(6), 393-410.
- Wolf, A. et al. (2011) Hexokinase 2 is a key mediator of Aerobic Glycolysis and Promotes Tumor Growth in Human Glioblastoma Multiforme. *Exp Med*, 208(2), 313-326.
- Zhao, Y. et al. (2013) Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics. *Cell death dis*, 4: e532.