

Evaluación del citrato y la acetil carnitina en combinación con docetaxel como potencial estrategia quimioterapéutica en modelos celulares de cáncer de próstata avanzado

Pablo Elías Prado Guevara

Trabajo de Grado para Optar al Título de Magíster en Ciencias Básicas Biomédicas

Director

Mario Felipe Negrette Guzmán

Doctor en ciencias bioquímicas

Codirector

Bladimiro Rincón Orozco

Doctor en ciencias biológicas

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Salud

Escuela de Medicina – Departamento de Ciencias Básicas

Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas

Bucaramanga

2026

Dedicatoria

“A ella, la única, sin cuya presencia este viaje no habría encontrado destino.”

Agradecimientos

El conocimiento y la ciencia siempre ha sido un pilar de mi vida, gracias a él y a todos esos seres que me lo brindaron pude crecer y forjarme. Agradezco inmensamente a todas las personas que fueron parte de este trayecto que con su valioso apoyo pude culminar este fascinante viaje.

Tabla de Contenido

Introducción	17
1. Planteamiento del problema.....	17
2. Objetivos	21
2.1 Objetivo General	21
2.2 Objetivos Específicos.....	21
3. Hipótesis	21
4. Marco teórico	22
4.1 Cáncer de próstata.....	22
4.2 Tratamiento con docetaxel para pacientes con cáncer de próstata	25
4.3 Citrato y su uso en cáncer de próstata.....	27
4.4 Acetil-L-Carnitina y derivados como alternativa de tratamiento para Cáncer	31
4.5 Efecto Warburg y mecanismo glucolítico.....	33
5. Metodología	36
5.1 Cultivo celular.....	36
5.2 Ensayo de cristal violeta	37
5.3 Ensayo de MTT.....	38
5.4 Esquema de combinación de fármacos	39
5.5 Evaluación de la apoptosis mediante FAM-FLICA.....	41
5.6 Evaluación de masa mitocondrial	42
5.7 Extracción de proteínas.....	43
5.8 Cuantificación de proteínas.....	44

5.9 Determinación de glutatión total.....	44
5.10 Determinación de catalasa	47
5.11 Determinación de superóxido dismutasa	48
5.12 Evaluación de ERO total.....	50
5.13 Determinación de lactato	50
5.14 Determinación de glucosa.....	51
5.15 Análisis estadísticos	52
6. Resultados.....	53
6.1 Concentración letal 50 de CIT en PC3 y LNCaP	53
6.2 Concentración letal 50 de DCT en PC3 y LNCaP	56
6.3 Concentración letal 50 de ALCAR en PC3 y LNCaP	59
6.4 Curvas dosis respuesta CIT en PC3 y LNCaP	63
6.5 Curvas dosis respuesta DCT en PC3 y LNCaP	65
6.6 Curvas dosis respuesta CIT.A en PC3 y LNCaP	67
6.7 Índices de Combinación en PC3	69
6.8 Índices de Combinación en LNCaP	73
6.9 Curvas dosis-respuesta RWPE1.....	76
6.10 Evaluación de apoptosis pancaspasas FAM-FLICA.....	78
6.11 Evaluación de masa mitocondrial	80
6.12 Evaluación enzimas antioxidantes	81
6.13 Evaluación de ERO total.....	84
6.14 Determinación de tasa de glucólisis.....	86
7. Discusión.....	88

8. Conclusiones	93
9. Recomendaciones	94
Referencias Bibliográficas	96

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1 <i>Esquemas de combinaciones</i>	40
Tabla 2 <i>Mezcla de reacción</i>	49
Tabla 3 <i>CL50 24, 48 y 72h de citrato en la línea celular PC3</i>	53
Tabla 4 <i>CL 50 a 24, 48 y 72h de citrato en la línea celular LNCaP</i>	54
Tabla 5 <i>CL50 a 72h de Docetaxel en la línea celular PC3</i>	57
Tabla 6 <i>CL50 a 24, 48 y 72h de Docetaxel en la línea celular LNCaP</i>	58
Tabla 7 <i>CL50 de CIT en PC3 y LNCaP</i>	65
Tabla 8 <i>CL50 de DCT en PC3 y LNCaP</i>	67
Tabla 9 <i>CL50 de CIT.A en PC3 y LNCaP</i>	69
Tabla 10 <i>Índices de combinación DCT:CIT en PC3</i>	70
Tabla 11 <i>Índices de combinación DCT:CIT.A en PC3</i>	71
Tabla 12 <i>Índices de combinación DCT:CIT en LNCaP</i>	73
Tabla 13 <i>Índices de combinación DCT:CIT.ALCAR en LNCaP</i>	74

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1 Señalización mediada por los receptores de andrógenos	22
Figura 2 Estructura química del citrato.....	27
Figura 3 El papel central y regulador del citrato	28
Figura 4 Esquema de las propiedades antiinflamatorias y antiangiogénicas del ALCAR en el CP	33
Figura 5 Esquema de ensayo de cristal violeta.....	38
Figura 6 Esquema de ensayo de reducción de MTT	39
Figura 7 Esquema de ensayo de actividad de caspasas en citómetro de flujo	42
Figura 8 Esquema de ensayo de medición de masa mitocondrial en citómetro de flujo	43
Figura 9 Esquema del principio químico del método de reciclaje enzimático para cuantificación de GSH-GSSG.....	46
Figura 10 Sistema generador de radical superóxido basado en la reacción xantina-xantina oxidasa, empleado para la determinación de formazán a partir de la reducción del NBT	48
Figura 11 Curva dosis respuesta de CIT en PC3 y LNCaP.....	56
Figura 12 Curva dosis respuesta de DCT en PC3 y LNCaP	59
Figura 13 Viabilidad de ALCAR en PC3	60
Figura 14 Viabilidad de ALCAR en LNCaP	61
Figura 15 Comparación del efecto del solvente DMSO con ALCAR en PC3.....	62
Figura 16 Comparación del efecto del solvente DMSO con ALCAR en LNCaP	63
Figura 17 Curvas dosis respuesta y gráfica de efecto mediano de CIT en PC3 y LNCaP.....	64

Figura 18 <i>Curvas dosis respuesta y gráfica de efecto mediano de DCT en PC3 y LNCaP</i>	66
Figura 19 <i>Curvas dosis respuesta y gráfica de efecto mediano de CIT.A en PC3 y LNCaP</i>	68
Figura 20 <i>Comparación en índices de combinación de concentraciones equitóxicas en PC3</i>	72
Figura 21 <i>Comparación en índices de combinación de concentraciones equitóxicas en LNCaP</i>	75
Figura 22 <i>Efecto de las combinaciones seleccionadas en células RWPE-1</i>	77
Figura 23 <i>Cuantificación de apoptosis mediado por caspasas en PC3 y LNCaP</i>	79
Figura 24 <i>Medición de masa mitocondrial en PC3 y LNCaP</i>	80
Figura 25 <i>Medición de GSH total y SOD en PC3 y LNCaP</i>	82
Figura 26 <i>Medición de actividad de catalasa en PC3 y LNCaP</i>	83
Figura 27 <i>Medición de ERO total en PC3 y LNCaP</i>	85
Figura 28 <i>Medición de tasa de glucólisis en PC3 y LNCaP</i>	87

Lista de Reacciones

	Pág.
Reacción 1 <i>Reacciones involucradas en la determinación de lactato</i>	51
Reacción 2 <i>Reacciones involucradas en la determinación de glucosa</i>	52

Abreviaturas

ACLY	ATP-citrato liasa
ALCAR	Acetil-L-carnitina
ANOVA	Análisis de varianza
ASB	Albúmina sérica bovina
BPE	Extracto de pituitaria bovina
CACT	Carnitina-acil-carnitina translocasa
CAT	Catalasa
CIC	Transportador mitocondrial del citrato
CIT	Citrato
CL50	Concentración letal 50
CN	Células sin tratar
CP	Cáncer de próstata
CPRC	Cáncer de próstata resistente a castración
CPT-1	Carnitina palmitoiltransferasa 1
CPT-2	Carnitina palmitoiltransferasa 2
CS	Citrato sintasa
CV	Violeta de cristal
DCFH-DA	2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato
DCT	Docetaxel
DCT:CIT	Docetaxel combinado con citrato
DCT:CIT.ALCAR	Docetaxel combinado con citrato más 6 μ M de acetyl-L-carnitina

DHT	Dihidrotestosterona
Dm	Dosis media
DMSO	Dimetil sulfoxido
DTNB	5,5'-ditio-bis(ácido 2-nitrobenzoico)
EEM	Error estándar de la media
ERO	Especies reactivas de oxígeno
F1,6P	Fructosa 1,6-bifosfato
FADH2	Flavina adenina dinucleótido
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación disulfuro
GS-TNB	Complejo disulfuro ácido 5'-tio-2-nitrobenzoico
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
HIF-1α	Factor inducible por hipoxia 1 alfa
HIF-β	Factor inducible por hipoxia subunidad β
HRE	Elementos de respuesta a hipoxia
IC95%	Intervalo de confianza del 95%
ICx	Índice de combinación
IFR	Intensidad de fluorescencia relativa
IGF-1R	Receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina
IL-23	Interleucina-23

IL-23R	Receptor de interleucina-23
KPE	Buffer fosfato de potasio
Lac/Glu	Tasa de glucólisis
m-ACN	Aconitasa mitocondrial
MDSC	Células supresoras derivadas de mieloides
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NBT	Nitro azul de tetrazolio
OAA	Oxalacetato
PDH	Piruvato deshidrogenasa mitocondrial
PK1	Piruvato deshidrogenasa quinasa 1
PFK1	Fosfofructoquinasa 1
PFK2	Fosfofructoquinasa 2
P-gp	P-glicoproteína 1
PHD2	Proteína dominio prolilhidroxilasa 2
PI3K/Akt	Fosfatidilinositol 3-quinasa/proteína quinasa B
PK	Piruvato quinasa
PML	Proteína asociada a leucemia promielocítica
PSA	Antígeno prostático específico
PTEN	Fosfatasa con función supresora tumoral
pVHL	Proteína supresora de tumores von Hippel-Lindau
RA	Receptor de andrógenos

rhEGF	Factor de crecimiento epidérmico recombinante humano
SD	Desviación estándar
SDS	Dodecil sulfato sódico
SFB	Suero fetal bovino
SOD	Superóxido dismutasa
SRD5A3	5 α -reductasa tipo 2
TCA	Ciclo del ácido tricarboxílico
TME	Transición mesenquimal-epitelial
TNB	Ácido 5'-tio-2-nitrobenzoico
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
XOD	Xantina-xantina oxidasa

Resumen

Título: Evaluación del citrato y la acetil carnitina en combinación con docetaxel como potencial estrategia quimioterapéutica en modelos celulares de cáncer de próstata avanzado*

Autor: Pablo Elías Prado Guevara**

Palabras Clave: Cáncer, Combinación, Fármacos, Quimioterapia, Sinergismo.

Descripción:

El cáncer de próstata (CP) es un problema de salud pública en Colombia, siendo la primera causa de incidencia y la segunda en mortalidad masculina. Entre el 15-20% de los pacientes con CP avanzado desarrollan resistencia a la castración (CPRC), un curso agresivo y refractario al Docetaxel (DCT), el estándar quimioterapéutico más coste-efectivo en el país. Ante esto, es imperativo buscar alternativas que permitan quimiosensibilizar estos tumores.

Esta tesis evaluó una estrategia de terapia combinada basada en el reposicionamiento del citrato (CIT) y la acetil-L-carnitina (ALCAR) en combinación con DCT. Las curvas dosis-respuesta se determinaron en las líneas celulares LNCaP (CP avanzado), PC3 (CPRC) y RWPE-1 (control no tumoral). Se evaluaron combinaciones de DCT:CIT y DCT:CIT.ALCAR en proporciones 5:1, 3:1 y 1:1 de la CL50, calculando los índices de combinación (ICx) mediante el método de Chou-Talalay. En los tratamientos más promisorios se caracterizó la apoptosis, masa mitocondrial, estrés oxidante y la tasa de glucólisis.

Las CL50 de DCT y CIT fueron inferiores a las concentraciones plasmáticas máximas reportadas. ALCAR no mostró citotoxicidad propia, por lo que su incorporación se ajustó farmacocinéticamente junto al CIT. El análisis de isoblogramas evidenció un fuerte efecto sinérgico, destacando la proporción 5:1 por su baja toxicidad en células normales. Esta combinación indujo significativamente la apoptosis y disminuyó la tasa glicolítica en ambas líneas tumorales, además de reducir la masa mitocondrial en PC3, sin alterar significativamente las especies reactivas de oxígeno.

En conclusión, las combinaciones de DCT:CIT y DCT:CIT.ALCAR en proporción 5:1 exhiben un efecto sinérgico y selectivo en los modelos LNCaP y PC3, posicionándose como una prometedora estrategia terapéutica frente al CP avanzado y el CPRC.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Salud. Escuela de Medicina. Director: Mario Felipe Negrette Guzmán, PhD. Codirector: Bladimiro Rincón Orozco, PhD.

Abstract

Title: Evaluation of citrate and acetyl carnitine in combination with docetaxel as a potential chemotherapeutic strategy in cellular models of advanced prostate cancer *

Author: Pablo Elías Prado Guevara **

Key Words: Cancer, Chemotherapy, Combination, Drugs, Synergism

Description:

Prostate cancer (PC) is a pressing public health issue in Colombia, ranking first in incidence and second in mortality among men. Approximately 15-20% of patients with advanced PC develop castration resistance (CRPC), an aggressive clinical course refractory to Docetaxel (DCT), the most cost-effective chemotherapeutic standard in the country. Consequently, finding alternative therapeutic strategies to chemosensitize these tumors is imperative.

This thesis evaluated a combination therapy strategy based on drug repurposing by combining citrate (CIT) and acetyl-L-carnitine (ALCAR) with DCT. Dose-response curves were determined in three cell lines: LNCaP (advanced PC), PC3 (CRPC), and RWPE-1 (non-tumoral control). Pharmacological combinations of DCT:CIT and DCT:CIT.ALCAR were evaluated at LC50 ratios of 5:1, 3:1, and 1:1, determining combination indexes (CI) via the Chou-Talalay method. Apoptosis, mitochondrial mass, oxidative stress profiles, and glycolysis rates were characterized in the most promising treatments.

The LC50 values for DCT and CIT were lower than reported maximum plasma concentrations. ALCAR showed no intrinsic cytotoxicity; thus, its incorporation was pharmacokinetics-adjusted alongside CIT. Isobologram analysis demonstrated a strong synergistic effect, highlighting the 5:1 ratio due to its limited toxicity in non-tumoral cells. This combination significantly induced apoptosis and decreased the glycolytic rate in both tumor lines, while reducing mitochondrial mass in PC3, despite showing no significant differences in reactive oxygen species levels.

In conclusion, DCT:CIT and DCT:CIT.ALCAR combinations at a 5:1 ratio exhibit a synergistic and selective effect in LNCaP and PC3 cell models, positioning themselves as a promising therapeutic strategy against advanced PC and CRPC.

* Degree Work

** Faculty of Health. School of Medicine. Advisor: Mario Felipe Negrette Guzmán, PhD. Co-advisor: Bladimiro Rincón Orozco, PhD.

Introducción

1. Planteamiento del problema

El cáncer de próstata (CP) es la quinta causa de muerte por cáncer a nivel mundial y el segundo tipo de cáncer más diagnosticado en hombres, con 1.466.680 casos nuevos reportados en el año 2022 (1). El riesgo que tienen los hombres para desarrollar CP aumenta significativamente con la edad; en hombres menores de 50 años la incidencia estimada es de aproximadamente 1 por cada 350; entre los 50 y 90 años se incrementa a 1 por cada 52; y en mayores de 60 años, más del 60% presenta algún grado de crecimiento tumoral o lesiones prostáticas asociadas (2).

En Colombia, el CP es un problema de salud pública apremiante, siendo la principal causa de incidencia de cáncer en población masculina y la segunda en mortalidad, después del cáncer gástrico (3,4). Según el Instituto de Métricas y Evaluación Sanitaria, en el 2019 fueron reportados 14.728 nuevos casos de CP, con 4.459 muertes relacionadas (5). De manera que, para el 2040 se prevé un aumento de casos del 101.1% en los países de Latinoamérica y la región Caribe, según estimaciones del Observatorio Global para el Cáncer de la OMS (2).

Se han reportado que más del 90% de los pacientes son respondedores al tratamiento convencional para el CP, sin embargo, un porcentaje de los pacientes experimentan la progresión de la enfermedad (6). Así mismo, los pacientes presentan una amplia gama de efectos secundarios y adversos graves, entre ellos, los daños citotóxicos y afectaciones sistémicas, los cuales, pueden llegar a ser irreversibles y como resultado, se debe recurrir a tratamientos terapéuticos más invasivos con una alto grado de morbilidad (6,7). Por consiguiente, en etapas avanzadas de la enfermedad, como lo es la progresión metastásica del CP la cual está mediada de forma

dependiente por la señalización del receptor de andrógenos (RA) se requiere de tratamientos más específicos e invasivos como la castración quirúrgica o terapias farmacológicas de ablación androgénica (8). Sin embargo, aproximadamente el 15-20% de los pacientes con CP avanzado desarrollan resistencia a la castración (CPRC), que es altamente refractaria al tratamiento con una supervivencia global a los 5 años del 30-40% (6,9).

Como opciones terapéuticas para este tipo de cáncer se encuentran los taxanos, agentes antimitóticos capaces de estabilizar los microtúbulos como el docetaxel (DCT) o cabazitaxel los cuales son considerados como una intervención clínica estándar para pacientes con CP avanzado y CPRC debido a que ellos han demostrado un incremento en la supervivencia y disminución del dolor mediante el control analgésico en la fase final de la enfermedad (10). No obstante, los efectos secundarios agudos y crónicos de estos agentes citotóxicos generan un deterioro significativo en la calidad de vida de los pacientes (11); por lo tanto, es imperativo el desarrollo de alternativas terapéuticas que reduzcan los efectos adversos y mejoren la eficacia de los quimioterapéuticos convencionales. El enfoque investigativo de la última década se ha centrado en la combinación de fármacos con distintos principios activos para fortalecer el efecto de quimioterapéuticos existentes, disminuyendo los efectos secundarios, reduciendo la progresión tumoral y mejorando la calidad de vida en los pacientes.

Considerando lo previamente expuesto, proponemos el uso de dos compuestos, el citrato (CIT) y la acetil-L-carnitina (ALCAR), como una terapia de combinación promisorio con DCT para el tratamiento de CP avanzado y CPRC. Ambos compuestos están descritos al ser moléculas de gran importancia en el metabolismo celular, especialmente en la vía energética de la fosforilación oxidativa y la oxidación de ácidos grasos (12). En estudios realizados en tejidos tumorales de CP con alto grado de malignidad, han descrito que la baja concentración de CIT es

un indicador de agresividad tumoral (13); esta relación se atribuye a la capacidad del CIT para inhibir la glucólisis y promover la apoptosis en células tumorales (14). A su vez, estudios recientes han demostrado que la ALCAR disminuye la viabilidad celular, incrementa la apoptosis e inhibe la angiogénesis en modelos celulares *in vitro* de CP avanzado y CPRC (15). Por otro lado, han descrito que la ALCAR desempeña un papel como agente citoprotector al reducir de manera efectiva la neuropatía periférica inducida por el tratamiento con taxanos y cisplatino en estudios con ratas Wistar, así como en un estudio piloto en humanos (16,17). Teniendo en cuenta esta evidencia, planteamos la siguiente hipótesis; ¿el uso del CIT como reprogramador metabólico en el microambiente tumoral, en combinación con los efectos de la ALCAR, puede ser una estrategia novedosa y promisorio para el tratamiento de CP avanzado y CPRC, especialmente en el contexto del tratamiento con DCT?

En la actualidad existe una marcada tendencia al reposicionamiento de fármacos, que implica el uso de medicamentos o principios activos previamente evaluados y que hayan sido aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) como seguros y aptos como tratamiento para enfermedades comunes y raras. Esta estrategia ofrece ventajas sustanciales, como la reducción de costos, y el acortamiento en el tiempo necesario para desarrollar y probar nuevos productos farmacéuticos (18,19). La fortaleza del reposicionamiento farmacológico reside en la disponibilidad de medicamentos de bajo costo y sin patente, lo que facilita su amplio uso y acceso (20). Esta premisa ha estimulado numerosas investigaciones con el objetivo de optimizar los tratamientos preexistentes, aumentando su eficiencia mediante la búsqueda de efectos sinérgicos, mejorar la quimiosensibilidad del tejido tumoral, reducir la resistencia a los tratamientos y, en general, proporcionar citoprotección en los tejidos normales no tumorales.

En Colombia, los estudios de la guía práctica clínica para el cáncer de próstata han descrito que la combinación de DCT con prednisona es la estrategia de tratamiento más costo-efectiva para el CPRC (3). Sin embargo, existe una alta incidencia de efectos adversos que empeoran la calidad de vida del paciente posterior al inicio del tratamiento con DCT. Uno de los efectos agudos más frecuentes de la terapia con DCT son las toxicidades de grado 3 las cuales abarcan la anemia, trombocitopenia y neutropenia febril, esta última reportándose en más del 30% de incidencia de los casos (8,21). Inclusive, los eventos adversos derivados del DCT pueden evolucionar a daños irreversibles y, por consiguiente, requerir tratamientos terapéuticos más invasivos, pérdida de órganos o afectaciones sistémicas. Esto conlleva al abandono del tratamiento y un aumento de la morbilidad en los pacientes bajo tratamiento (7). El presente estudio tiene como propósito evaluar el efecto del CIT y la ALCAR en modelos celulares de CP avanzado y CPRC *in vitro*, con el objetivo de determinar su potencial para modular la viabilidad celular, la apoptosis y la respuesta al tratamiento con DCT.

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Evaluar la capacidad de quimiosensibilización de citrato y acetil-L-carnitina en combinación con docetaxel sobre diferentes modelos celulares de cáncer de próstata avanzado.

2.2 Objetivos Específicos

(OE1) Determinar las interacciones farmacológicas entre el citrato, la acetil-L-carnitina y el docetaxel en las líneas celulares RWPE-1, LNCaP y PC3.

(OE2) Caracterizar la apoptosis inducida por los tratamientos individuales y en combinación del citrato, acetil-L-carnitina y docetaxel en las líneas celulares RWPE-1, LNCaP y PC3.

(OE3) Evaluar los cambios en el estado redox y el metabolismo energético inducidos por los tratamientos individuales y en combinación del citrato, la acetil-L-carnitina y el docetaxel en las líneas celulares RWPE-1, LNCaP y PC3.

3. Hipótesis

Se espera que la combinación de citrato y acetil-L-carnitina potencie la respuesta quimioterapéutica del docetaxel en modelos celulares de cáncer de próstata avanzado, lo que se reflejará en una disminución significativa de la viabilidad celular, un aumento en la apoptosis, cambios en el estado redox y cambios en el metabolismo energético en comparación con el tratamiento solo con docetaxel.

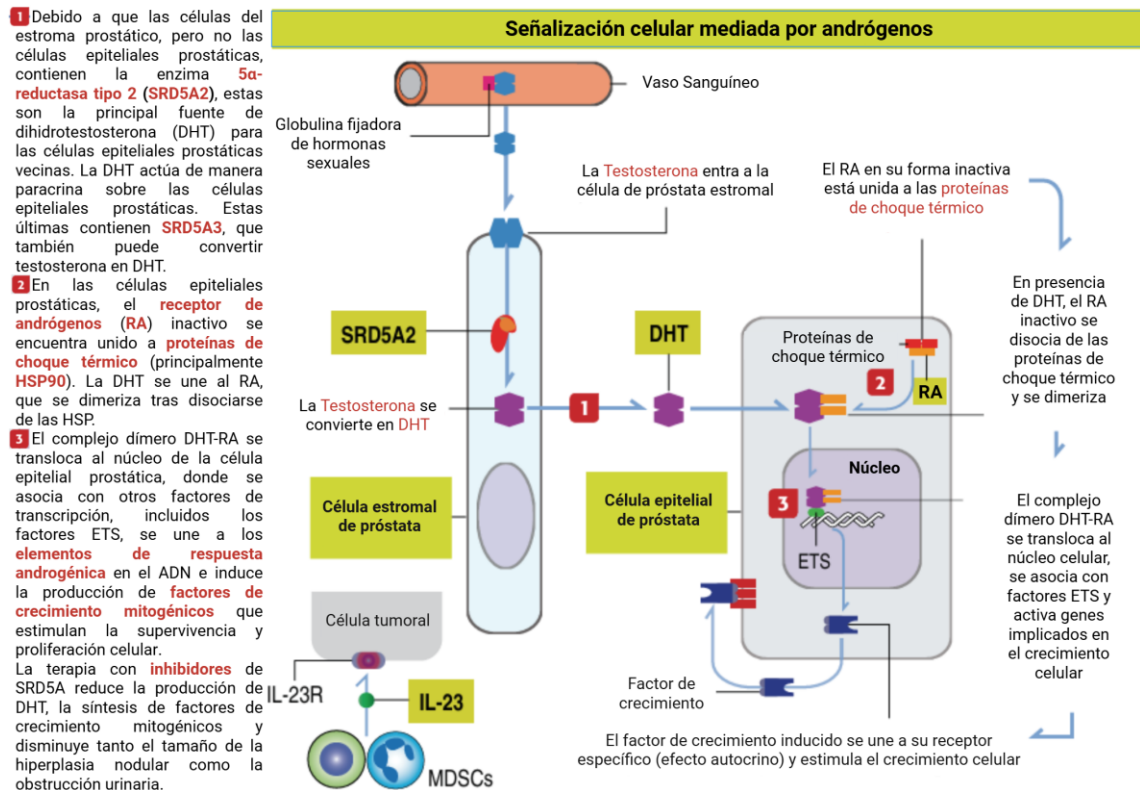
4. Marco teórico

4.1 Cáncer de próstata

Las glándulas prostáticas están conformadas por un epitelio columnar simple o pseudoestratificado organizado en pliegues y en su lumen cuentan con cuerpos amiláceos (estructuras condensadas ricas en glicoproteínas y fragmentos celulares) los cuales pueden calcificarse en los hombres de edades avanzadas, por consiguiente, dicho epitelio puede presentar hiperplasias benignas, es decir, un agrandamiento no canceroso de la glándula prostática debido al incremento de la dihidrotestosterona (DHT) la cual genera un crecimiento nodular que ocasiona una compresión parcial o total de la uretra prostática causando la restricción en la micción urinaria, cistitis y/o pielonefritis. A su vez, las células de este epitelio pueden presentar un desequilibrio metabólico conllevando al desarrollo de células malignas las cuales favorecen el desarrollo del CP y su avance en la severidad de la enfermedad (22,23).

Figura 1

Señalización mediada por los receptores de andrógenos



Nota. Tomada y modificada del libro Histology and Cell Biology (22)

La DHT presenta un rol importante en el desarrollo del CP debido a que es generada por medio de la esteroide 5 α -reductasa tipo 2 (SRD5A3) una enzima localiza predominantemente en las células estromales, el lugar de conversión de andrógenos, ella hace que la testosterona se reduzca a DHT quien se dimerizará con los receptores de andrógenos (RA) y favorecerá la traslocación de los RA a el núcleo para que actúen como un factor de transcripción que se une al ADN induciendo la expresión de factores de supervivencia y crecimiento autocrinos y paracrinosis que actúan sobre las células epiteliales y las células estromales de la próstata (Figura 1) (22).

Por consiguiente, si se presenta una alteración congénita de SRD5A2 se dará lugar a una glándula prostática vestigial y junto a la castración en el hombre se genera una atrofia de la glándula conllevando a que la DHT se una a los RA. El incremento de la DHT en las hiperplasias benignas junto con una alta unión a los RA puede verse implicado en la transición a un estado

patológico en los pacientes. Adicionalmente, una sobre expresión de los RA ocasionada por la inhibición de los quimioterapéuticos sobre la translocación al núcleo de la DHT y los RA, impiden la formación de los dímero de RA-RA, ocasionando en las células cancerosas la muerte o una inhibición de la señalización celular mediada por andrógenos, estos mecanismos en la gran mayoría de los pacientes conlleva a la progresión al CPRC en donde se da la sobreexpresión de los RA y un aumento de la expresión de SRD5A (22). En la próstata de los pacientes con CPRC puede observarse una población de células supresoras derivadas de mieloides (MDSC, por sus siglas en inglés), que incluye neutrófilos y monocitos que expresan las proteínas CD11b, CD33 y CD15. Las células MDSC secretan interleucina-23 (IL-23) que, tras unirse al receptor de IL-23 (IL-23R) en las células tumorales, desencadena una vía en la célula tumoral que conduce a un aumento de la expresión de RA. El aumento de la expresión del RA potencia la vía de expresión génica dependiente de andrógenos, lo que da lugar a una activación del crecimiento del cáncer de próstata (22,24,25).

En la literatura han sido reportados dos genes supresores de tumores claves involucrados en la protección contra el CP, entre ellos está la fosfatasa con función supresora tumoral (PTEN, por sus siglas en inglés) y la proteína asociada a leucemia promielocítica (PML, por sus siglas en inglés). Sin embargo, la pérdida de ellos podría desencadenar lo siguiente: la pérdida parcial de PTEN se ha relacionado con el 70% de los casos de CP localizado, la pérdida completa de PTEN, por falta de acción de la fosfatasa en el ciclo celular, está relacionada con el CPRC metastásico y por último la pérdida de PTEN y PML suele observarse en las formas más agresivas de CP asociado a metástasis óseas (22).

Entre los métodos diagnósticos se encuentran tacto rectal (palpación de la próstata a través del recto), la ecografía transrectal y la determinación de los niveles sanguíneos del antígeno

prostático específico (PSA) (26). Adicionalmente se encuentran otros biomarcadores moleculares los cuales pueden ser utilizados para acciones preventivas, diagnóstico y/o pronóstico debido a que ellos permiten la detección temprana del cáncer o la diferenciación entre enfermedad benigna y maligna (27). En diversos estudios han reportado que las células del CP presentan perfiles metabólicos distintos a otras de cáncer debido a su producción alterada del PSA, citrato y poliamina, por consiguiente, entre las principales pruebas de cribado para el CP se encuentra la determinación de los niveles séricos del PSA y el tacto rectal. No obstante, los valores del PSA pueden ser no específicos y representativos del estadio del CP conllevando a un sobrediagnóstico, terapias con mayor agresividad y la realización de biopsias innecesarias (24,28).

4.2 Tratamiento con docetaxel para pacientes con cáncer de próstata

El tratamiento inicial para el CP es la terapia de privación androgénica, que puede ser realizada de forma quirúrgica o farmacológica. Aunque esta terapia en un principio suprime el crecimiento tumoral dependiente de andrógenos, eventualmente la enfermedad progresa, con un crecimiento tumoral descontrolado y una evasión de la apoptosis, independientemente de la presencia de andrógenos. Estas características conforman el fenotipo de CPRC. Taxanos como el DCT o el cabazitaxel son la quimioterapia estándar para el CP metastásico y el CPRC (10).

Los taxanos son pseudoalcaloides diterpenos aislados de árboles del género *Taxus*, conocidos comúnmente como Tejos. Estos compuestos comparten la característica de estabilizar las subunidades de β -tubulina de los microtúbulos, lo que resulta en su ensamblaje irreversible. En consecuencia, estos compuestos evitan la segregación adecuada de los cromosomas e inducen arresto en la fase G2/M del ciclo celular, lo que finalmente conduce a la apoptosis (29). Por los efectos mencionados anteriormente, los taxanos han sido empleados como agentes

quimioterapéuticos, y en la actualidad el paclitaxel, el DCT y el cabazitaxel han sido aprobados por la FDA para usos médicos en CP.

En un estudio fase 3 realizado por Tannaok y colaboradores en 1.006 pacientes con CP, dejaron en evidencia que los pacientes con CPRC al ser tratados con DCT más prednisona (75mg/m² de DCT cada 21 días más 5mg de prednisona dos veces al día) obtuvieron un aumento significativo de la supervivencia general en comparación con el tratamiento control de mitoxantrona más prednisona (HR:0,76; IC (95%) 0,62-0,94 p=0.009). A su vez, incrementaron el tiempo medio de supervivencia a 18,9 meses en el esquema de DCT cada tres semanas en comparación al esquema de tratamiento control, 16,5 meses (30). Cabe destacar que en otro estudio de fase 3, Petrylack y colaboradores en 674 paciente con CPRC metastásico demostraron que el grupo tratado con el esquema de DCT más estramustina en esquemas de tratamiento cada 21 días obtuvieron un aumento significativo en la supervivencia general en comparación al tratamiento control de mitoxantrona más prednisona (HR:0,8; IC (95%) 0,67-0,9 p=0.02), y con un tiempo medio de supervivencia de 17,5 meses y 15,6 meses, respectivamente (31). Estos dos ensayos clínicos, llevados a cabo durante más de una década, han demostrado de manera conjunta que el DCT favorece un incremento significativo en la supervivencia general en los esquemas de tratamiento que lo incluyen en comparación con los esquemas de tratamiento de control. En conclusión, estas evidencias han consolidado a los taxanos, y en particular al DCT, como la única intervención clínicamente relevante para pacientes con CPRC (10). No obstante, los pacientes presentaron más eventos adversos con el esquema de tratamiento con DCT, con especial énfasis, en la disfunción de la médula ósea, anemia, trombocitopenia, neutropenia febril, diarrea, neuropatía sensorial, estomatitis y edema periférico, siendo una de las causales del abandono del tratamiento y/o del estudio (8).

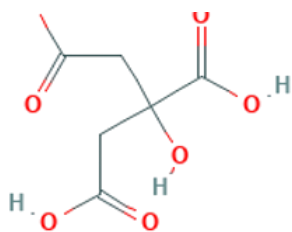
En Colombia el taxano utilizado para tratamiento de CP avanzado es el DCT, este taxano semisintético aparte de estabilizar las subunidades de β -tubulina, inhibe la expresión de los genes antiapoptóticos BCL-2 y BCL-X, e inhibe el transporte nuclear del receptor de andrógenos mediado por microtúbulos (3,8). Sin embargo, en diversos estudios han descrito la aparición de mecanismos de resistencia al DCT en los pacientes con CP, atribuido en gran medida a las bombas de eflujo de fármacos de ATP, siendo especialmente relevante la P-glicoproteína 1 (P-gp), una ATPasa tipo ABC con alta afinidad al DCT (10). Durante la progresión de la malignidad del CP, se ha evidenciado un aumento en la expresión de la P-gp, lo cual se correlaciona con el fracaso del tratamiento con DCT y la mayoría de los pacientes experimentan recurrencia a la enfermedad letal 1 (10).

4.3 Citrato y su uso en cáncer de próstata

El CIT (nomenclatura IUPAC 2-hidroxiopropano-1,2,3-tricarboxilato) es una sal derivada del ácido cítrico producida en la matriz mitocondrial a partir del acetil-CoA y el oxalacetato (OAA) mediante la enzima citrato sintasa (CS) (12,24,32,33).

Figura 2

Estructura química del citrato



Nota. Fórmula del citrato

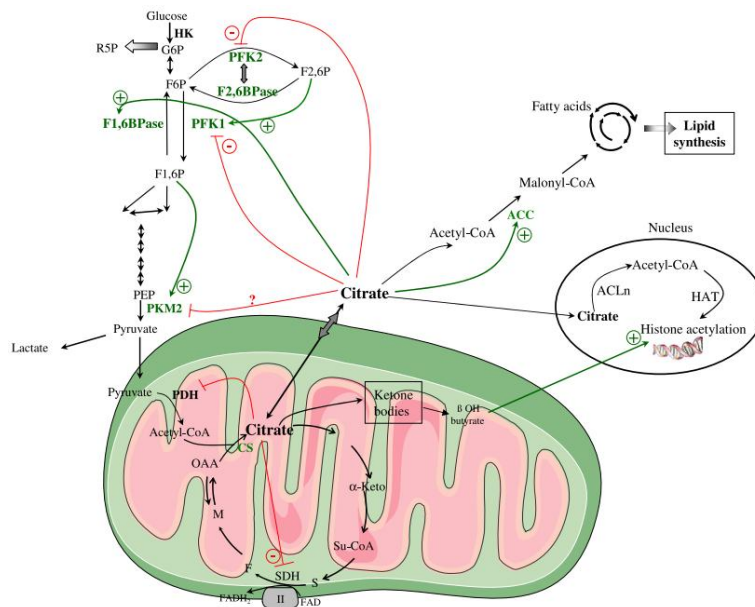
Debido a los grupos carboxilos -COO- presentes en la estructura del CIT (Figura 2), esta molécula se comporta como un quelante de iones metálicos entre ellos el calcio, siendo utilizado a nivel clínico como un fármaco anticoagulante, coadyuvante en la terapia continua de reemplazo renal, como alcalinizante urinario, para el tratamiento de la acidosis metabólica y como agente preventivo para la formación de cálculos renales (34,35).

El CIT es un intermediario clave en el metabolismo energético celular, especialmente en el ciclo de Krebs o ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), en donde la oxidación del CIT favorece

la formación de moléculas como la nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) y la flavina adenina dinucleótido (FADH₂), dos equivalentes reductores indispensables en la síntesis de ATP, al ser cofactores en la cadena de transporte de electrones y finalmente mediante la ATP sintasa, la producción eficiente de ATP (12). El CIT sintetizado en la mitocondria puede ser transportado al citosol por medio el transportador mitocondrial del CIT (CIC), donde mediante la ATP-citrato liasa (ACLY) se escinde el CIT en acetil-CoA y OAA, siendo intermediarios en varias rutas metabólicas como la síntesis de ácidos grasos, la síntesis de nucleótidos y la gluconeogénesis (Figura 3) (12,32,36). Asimismo, este proceso está involucrado en muchos mecanismos fisiopatológicos como la inflamación, el cáncer, la acetilación de histonas y los trastornos neurológicos (14,32).

Figura 3

El papel central y regulador del citrato



Nota. Efecto regulador del citrato (36).

En el epitelio prostático, se produce una interrupción del ciclo de Krebs, ya que el CIT generado en la matriz mitocondrial no puede continuar al siguiente paso debido a la disminución

significativa de la actividad de la enzima aconitasa mitocondrial (m-ACN) por la acumulación excesiva del Zn^{2+} , característico de este tejido. Este fenotipo metabólico exclusivo convierte a las células epiteliales prostáticas en productoras netas de citrato, ya que este compuesto facilita la maduración y movilidad espermática (24).

Por otra parte, el CIT en el citosol desempeña un papel crucial en la inhibición de la glucólisis (efecto Pasteur). Actúa directamente sobre la primera enzima reguladora del glucolisis, la fosfofructoquinasa 1 (PFK1), así como sobre la fosfofructoquinasa 2 (PFK2), que produce fructosa 2,6-bisfosfato, un potente activador alostérico de la PFK1. Además, el CIT inhibe también de forma indirecta la piruvato quinasa (PK), al disminuir los niveles de la fructosa 1,6-bisfosfato (F1,6P), un potente activador alostérico de la PK (Figura 3) (36).

En las fases tempranas de la malignidad en el tejido prostático, se ha observado una disminución en los niveles de CIT y Zn^{2+} . Esta reducción conlleva a la pérdida de inhibición de la actividad de la m-ACN y al restablecimiento del proceso oxidativo del CIT. Como consecuencia, se logra una activación sostenida del metabolismo de la glucosa (32,36,37,38). La progresión de la malignidad se ve influenciado por una reprogramación del metabolismo celular hacia la síntesis de nucleótidos, proteínas y lípidos necesarios para la proliferación. Siendo activada la vía de señalización fosfatidilinositol 3-quinasa/proteína quinasa B (PI3K/Akt) promoviendo la captación de glucosa y dirigiéndolo hacia las vías biosintéticas. Sin embargo, la actividad oncogénica de la vía PI3K/Akt es mediada por la reprogramación del metabolismo del CIT, ya que la exportación del CIT fuera de la mitocondria es esencial para la proliferación de las células cancerosas (32). Por lo tanto, la glucólisis y la vía de las pentosas fosfatos se transforman en las bases fundamentales de la biosíntesis en la malignidad, con la producción de metabolitos intermedios como la ribosa,

el glicerol y el equivalente reductor nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH) (32).

Por otra parte, diversos estudios han reportado que el uso de concentraciones elevadas del CIT (>10 mM) en modelos celulares de cáncer de distintos orígenes como mama, páncreas, pulmón, piel y estómago, han presentado la inhibición directa del receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF-1R), que promueve la activación de las vías PI3K/Akt/mTOR y MAPK, ampliamente involucradas en la malignidad del cáncer (12). Así mismo, una dosis elevada de CIT activa el PTEN, una fosfatasa clave en la inhibición de la vía PI3K/Akt. Por otro lado, han reportado que el CIT en células cancerosas inhibe directamente el metabolismo glucolítico marcado e induce la apoptosis mediada por las caspasas 1, 8 y 9; la acetilación de histonas mediada por la acetil-CoA citosólica, así como la inhibición de las proteínas anti apoptóticas Bcl-XL, Bcl-2 (12,36).

Finalmente, en el estudio de Tramontano y colaboradores evaluaron el efecto prolongado del CIT en el modelo celular de CPRC 'PC3', demostrando que en un principio el uso de concentraciones entre 5 y 10 mM de CIT disminuyó la viabilidad de forma dosis dependiente un 66% y 90%, respectivamente, junto a la disminución del metabolismo glucolítico. Si embargo, las células que superaron las etapas primarias del tratamiento adquirieron resistencia al CIT, con rasgos de transición mesenquimal-epitelial (TME), una acumulación de especies reactivas de oxígeno (ERO) mitocondrial, sobre expresión de la vía autofágica y un metabolismo glucolítico disminuido en comparación a las células PC3 sin tratamiento (39,40). De la misma forma, el estudio de Zhang y colaboradores en la evaluación del efecto del CIT en células malignas de mesotelioma pleural resistentes a cisplatino (MSTO-211H), presentaron quimiosensibilización al cisplatino posterior al tratamiento con CIT (41). En síntesis, el efecto del CIT frente al CP

avanzado y CPRC es prometedor como un fármaco que favorezca la quimiosensibilización, adicionado a un efecto citotóxico. Por lo tanto, proponemos la combinación del CIT y DCT, como una alternativa promisorio para el tratamiento del CP.

4.4 Acetil-L-Carnitina y derivados como alternativa de tratamiento para Cáncer

La L-carnitina (β -hidroxi-c-trimetil-amino-butilato) es un aminoácido sintetizado a partir de los aminoácidos esenciales metionina y la lisina, se distribuye principalmente en los músculos esqueléticos y cardiacos de los mamíferos, y puede ser adquirido por la dieta rica en carnes y lácteos (42). La ALCAR es un compuesto formado por la modificación enzimática directa de la L-carnitina por la introducción de un grupo acetil, no obstante, acorde a las necesidades metabólicas, la enzima carnitina acetiltransferasa puede transformar nuevamente la ALCAR en L-carnitina (43,44). La única diferencia entre estas dos moléculas es debido a que la ALCAR tiene una mayor tasa de absorción intestinal y atraviesa más fácilmente la barrera hematoencefálica (43). De hecho, la ALCAR se puede encontrar en formulaciones comerciales de venta libre para administración oral (45) como clorhidrato de ALCAR, siendo utilizado como suplemento deportivo o adelgazante. Además, se ha demostrado que la ALCAR disminuye exitosamente concentraciones de colesterol y triglicéridos en sangre, es un agente protector del daño neuropático, mejora la función cognitiva de individuos con Alzheimer, aumenta la regeneración de los nervios periféricos y ayuda en el tratamiento de la depresión (43,46).

El rol fisiológico de la L-carnitina y la ALCAR radica en facilitar la beta oxidación de ácidos grasos de cadena larga (acil-CoA), al mediar su transporte hacia la matriz mitocondrial, este sistema de transporte está conformado por la enzima carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT-1), que se encuentra en la membrana externa mitocondrial y es sensible al malonil-CoA. La CPT-1 transfiere el grupo acilo del acil-CoA hacia la L-carnitina, formando la acil-carnitina, la cuál es

translocada hacia la matriz mitocondrial a través de la carnitina-acil-carnitina translocasa (CACT). Una vez en la matriz mitocondrial, la acil-carnitina es convertida nuevamente en acil-CoA por la carnitina palmitoiltransferasa 2 (CPT-2). Esto hace que el ácido graso activado esté disponible para continuar con la beta oxidación (42). La beta oxidación conduce a la generación de dos equivalentes reductores, NADH y FADH₂, así como acetil-CoA para su posterior entrada al TCA. Como resultado de este proceso, se promueve un incremento en la producción de ATP (47).

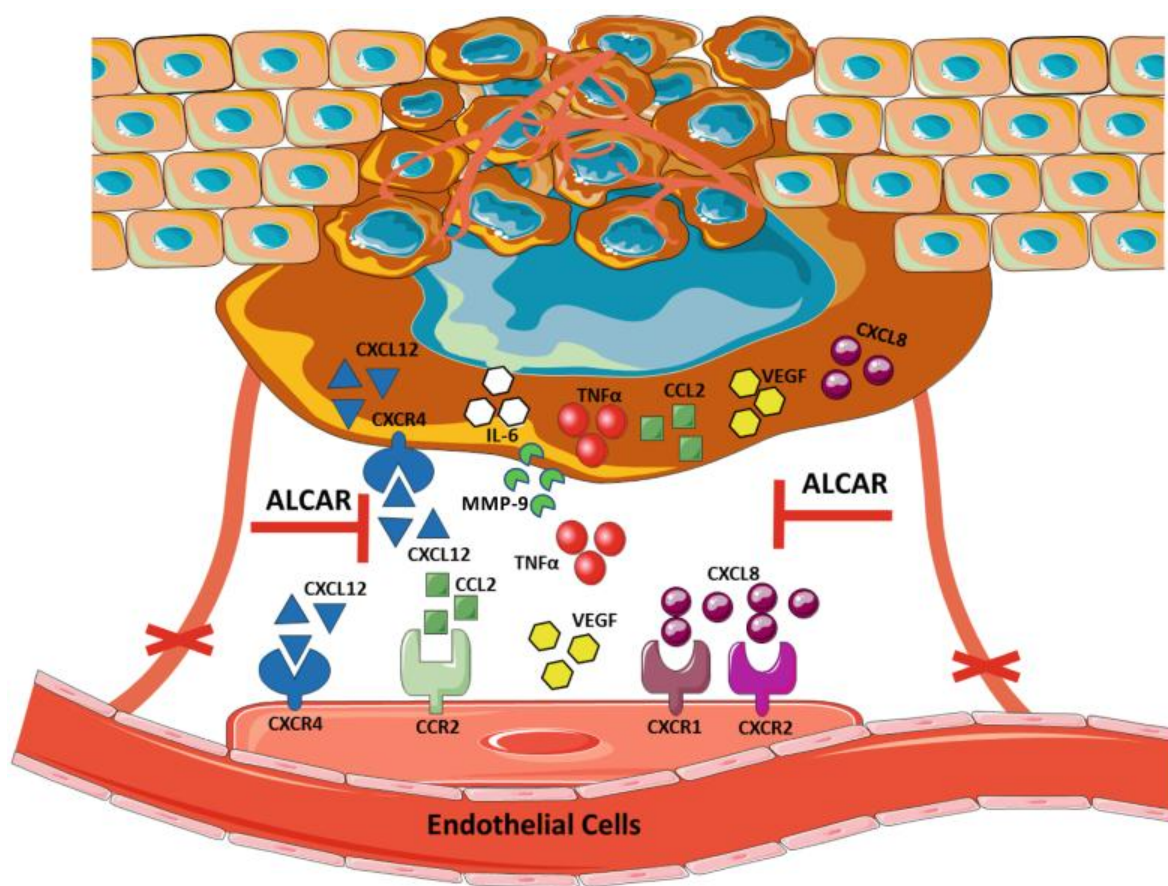
En un estudio *in vivo* realizado por Pisano y colaboradores en 69 ratas Wistar hembras, evaluaron el efecto de la ALCAR en la neuropatía periférica inducida por paclitaxel y cisplatino, dejando en evidencia que el cotratamiento con ALCAR fue capaz de reducir significativamente la neurotoxicidad inducida por ambos quimioterapéuticos (16). Por otra parte, un estudio exploratorio realizado por Maestri y colaboradores en 27 pacientes con cáncer, evaluaron si la ALCAR podía revertir la neuropatía periférica inducida por paclitaxel y/o cisplatino, sus resultados demostraron que el tratamiento de ALCAR 1g/día durante 10 días presentó una mejoría de al menos un grado en la gravedad de la neuropatía periférica en el 73% de los pacientes (17).

También han descrito que la L-carnitina promueve la apoptosis en células cancerosas, pero no afecta a los tejidos normales (42). Estos hallazgos se han evidenciado en estudios *in vitro* con células cancerosas de adenocarcinoma colorrectal humano HT-29 y en células de linfoma no Hodgkin U937, en donde la adición de L-carnitina y derivados indujeron la apoptosis (42). Así mismo, la L-carnitina en un modelo animal de insuficiencia cardíaca inhibió la actividad de las caspasas, disminuyó los niveles del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e inhibió la apoptosis en los mionúcleos de las ratas (48). A su vez, Baci y colaboradores evidenciaron el efecto de la ALCAR en modelos celulares de CP avanzado 'LNCaP' y CPRC 'PC3', en donde el tratamiento de ALCAR impacta significativamente en el CP al reducir la adhesión, migración e invasión de

las células tumorales *in vitro*, junto a la disminución de la viabilidad celular y promoción de la apoptosis, además de interferir con la expresión del TNF- α , así como con otras citocinas y quimiocinas proinflamatorias como IL-6, CCL2 y CXCL12 (15). Finalmente, los investigadores demostraron que la ALCAR inhibe la angiogénesis *in vitro* y restringe el crecimiento del tumor *in vivo* (Figura 4) (15).

Figura 4

Esquema de las propiedades antiinflamatorias y antiangiogénicas del ALCAR en el CP



Nota. Propiedades antiinflamatoria y antiangiogénicas del ALCAR en el CP (15).

4.5 Efecto Warburg y mecanismo glucolítico

En 1926 Otto Heinrich Warburg y colaboradores demostraron que las células cancerosas poseen una característica distintiva en su metabolismo: tienden a producir la mayor parte de su

ATP a través de la glucólisis, incluso en presencia de oxígeno, además de la producción de altas cantidades de ácido láctico, (fenómeno conocido como efecto Warburg) (12,36,49,50). Estos hallazgos contrastaron la noción previa conocida como el efecto Pasteur, la cual establecía que, en la mayoría de las células eucariotas los niveles de glucólisis disminuyen considerablemente en presencia de oxígeno (48). Este fenómeno puede ser explicado por la inducción del factor inducible por hipoxia 1 alfa (HIF-1 α), que permite la sobre expresión de varias enzimas glucolíticas, incluso en condiciones de normoxia. Además, activa la piruvato deshidrogenasa quinasa 1 (PDK1), la cual inactiva la piruvato deshidrogenasa mitocondrial (PDH), enzima que cataliza la decarboxilación oxidativa del piruvato, convirtiéndolo en acetil-CoA, un paso fundamental para la entrada en el ciclo de Krebs. La inhibición de la PDH promueve una disociación entre el piruvato y el TCA (32,36,51).

En las células cancerosas, se ha propuesto que el efecto Warburg se debe al aumento de la expresión de la ACLY, manteniendo niveles bajos de CIT en el citosol. Esta reducción en los niveles de CIT disminuye su efecto inhibitorio sobre las PFK1 y PFK2, permite la alta producción de la F1,6P, que promueve la señalización de Ras/PI3K/Ak, y a su vez, activa tanto la PFK2 y el HIF-1 α , potenciando la glucólisis, promoviendo la agresividad tumoral y la TME (12). La expresión de HIF-1 α también participa en otros procesos celulares, como la resistencia a la apoptosis, la sobreexpresión de bombas de eflujo de fármacos, la remodelación de la vasculatura, la angiogénesis, la neoangiogénesis y la metástasis (49).

El HIF es un factor de transcripción que se une al ADN y se asocia con cofactores nucleares específicos en respuesta a condiciones de hipoxia, lo que desencadena una respuesta adaptativa ante la disminución de la disponibilidad de oxígeno. El HIF es un heterodímero formado por una subunidad alfa (HIF- α) lábil al oxígeno y una subunidad β (HIF- β) constitutiva. La HIF- α posee

un dominio de degradación dependiente del oxígeno el cuál en normoxia es hidroxilado en alguno de sus dos residuos de prolina por la proteína dominio prolilhidroxilasa 2 (PHD2), por lo tanto, es reconocido por el dominio β de la proteína supresora de tumores von Hippel-Lindau (pVHL), y ulteriormente marcado por un complejo ubiquina-ligasa hacia su degradación proteosomal 26S (52). De forma complementaria, en condiciones de hipoxia la actividad de la PHD2 se disminuye y la HIF- α escapa de la degradación citoplasmática del proteosoma, lo cual permite la translocación y acumulación de la HIF- α en el núcleo, donde en conjunto a otras proteínas co-activadoras, se unen a los elementos de respuesta a hipoxia (HRE) y activa la transcripción de sus genes blanco (52). Así mismo la activación del HIF1 α ejerce un efecto inhibitorio en la biogénesis mitocondrial, desregulación de la cadena de transporte de electrones, una marcada autofagia y reducción de niveles de ERO intracelular (53,54).

5. Metodología

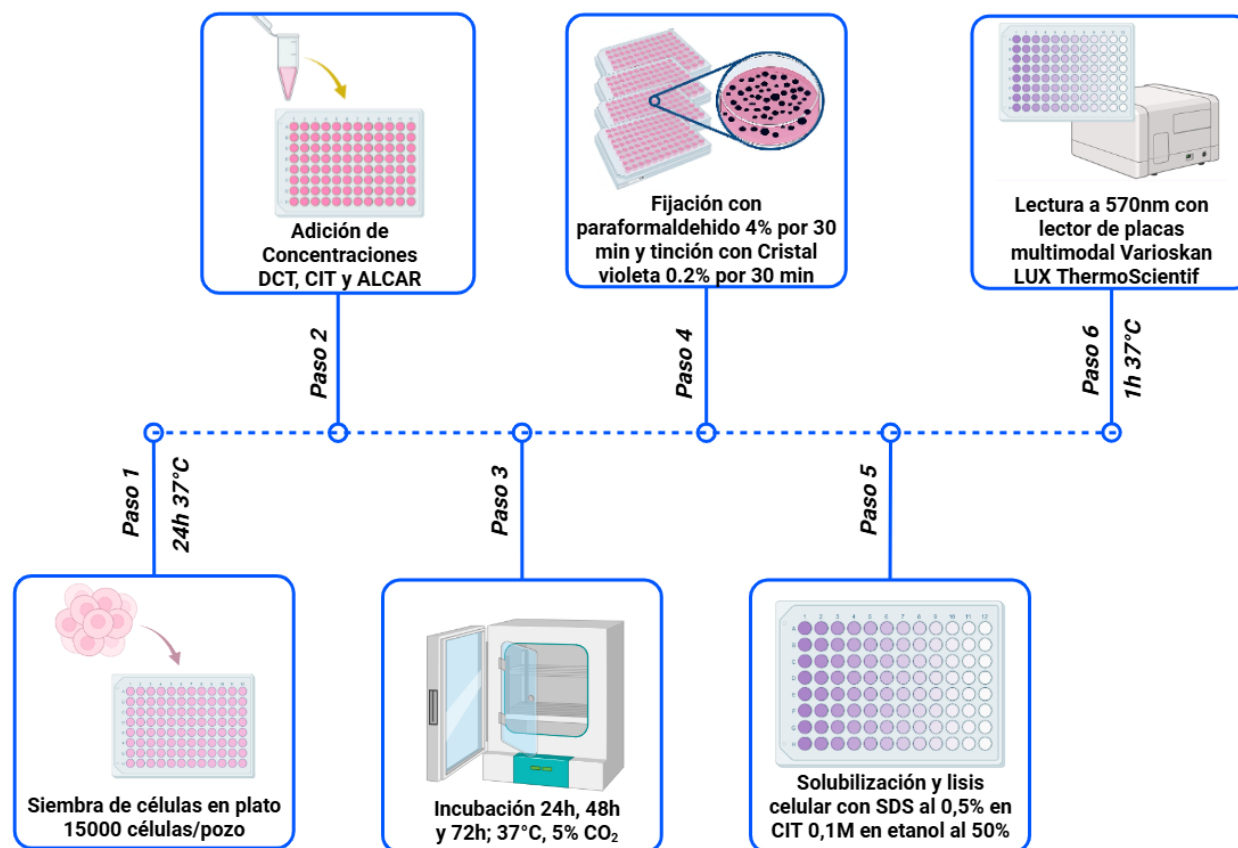
5.1 Cultivo celular

Para este estudio se emplearon las líneas celulares RWPE-1 (ATCC® - CRL-11609™), LNCaP clone FGC (ATCC® - CRL-1740) y PC3 (ATCC® - CRL-1435) obtenidas de la de la American Type Culture Collection (Rockville, MD, EEUU). Las células RWPE-1 son células epiteliales derivadas de la zona periférica de una próstata adulta humana histológicamente normal de adulto caucásico de 54 años, e inmortalizadas con HPV 18 (55). Las células RWPE-1 se cultivaron en medio libre de suero para queratinocitos K-SFM 1X, suplementado con extracto de pituitaria bovina (BPE 0,05mg/mL), factor de crecimiento epidérmico recombinante humano (rhEGF 5ng/mL), 100 IU penicilina y 0.1 mg/mL estreptomicina 1%; y se incubaron a condiciones permisivas para el crecimiento (95% aire y 5% CO₂ a 37°C). La línea LNCaP son células epiteliales derivadas de un adenocarcinoma de próstata metastásico aislados de un ganglio linfático supraclavicular izquierdo de un adulto caucásico de 50 años, y la línea PC3 son células epiteliales derivadas de un adenocarcinoma prostático de grado 4 aislados de una metástasis en hueso de un adulto caucásico de 60 años, ambas líneas celulares representan un modelo de cáncer de próstata avanzado con dependencia a andrógenos y resistencia a andrógenos, respectivamente (56,57). Las líneas celulares LNCaP y PC3 se cultivaron en medio RPMI 1640 (Sigma Chemicals Aldrich, Milan, Italy), suplementado con suero fetal bovino 10% (SFB), 100 UI penicilina, 0.1 mg/mL estreptomicina, y 1% GlutaMAX™ (Gibco™, Thermo Fisher Scientific). Las células utilizadas en los ensayos se mantuvieron a una confluencia de 80-90% y se verificó que fueran negativas para

Mycoplasma spp. Para la elección de réplicas biológicas se utilizaron por cada experimento independiente un pase distinto, desde el pase 5 hasta máximo el pase 18.

5.2 Ensayo de cristal violeta

El ensayo de cristal violeta (CV) se realizó para determinar el efecto citotóxico del CIT, DCT y ALCAR, se utilizaron platos de fondo plano Corning® de 96 pozos, a una densidad celular de 15×10^3 células/pozo, según Negrette-Guzmán et al. (58). Las células se lavaron con 100 μ L de PBS 1X por pocillo y se fijaron con 100 μ L de paraformaldehído al 4% en PBS durante 30 min. Una vez finalizó la incubación, se añadieron 50 μ l de CV al 0,2% en metanol al 6% y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se eliminó el exceso de colorante mediante tres lavados con agua destilada y se añadieron 100 μ l de dodecil sulfato sódico (SDS) al 0,5% en tampón citrato 0,1 M con etanol al 50% y se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂ durante 1 h. Por último, se midió la absorbancia a 570 nm utilizando un lector de microplacas multimodo Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Figura 5*Esquema de ensayo de cristal violeta*

Nota. Protocolo estandarizado para la medición de biomasa, utilizada como indicador de viabilidad celular.

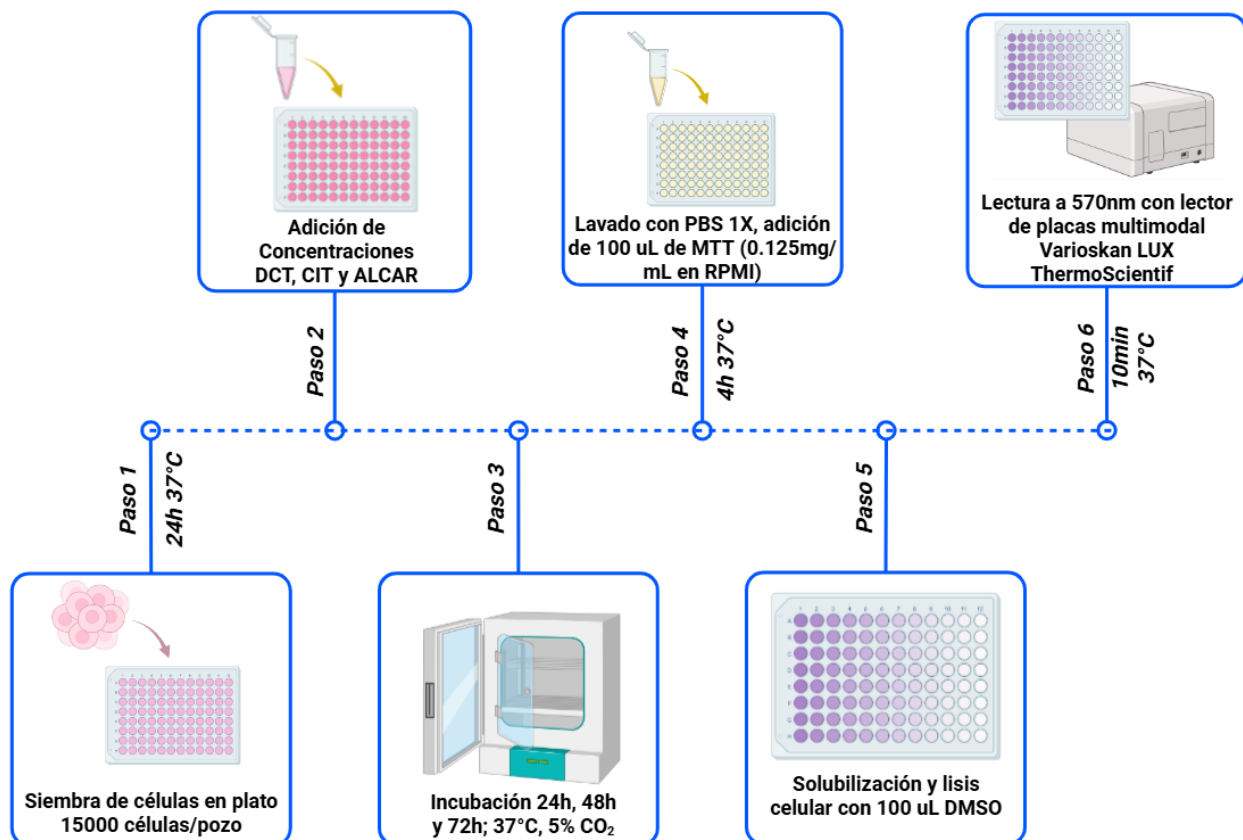
5.3 Ensayo de MTT

El ensayo de viabilidad por bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) se realizó en platos de fondo plano Corning® de 96 pozos, a una densidad celular de 15×10^3 células/pozo, según el protocolo de Negrette-Guzmán et al. (58). Las células se lavaron con 100 μ L de PBS 1X por pocillo, posteriormente se añadieron 100 μ L de MTT 0.125mg/mL disuelto en medio RPMI, e incubaron a 37°C, con 5% de CO₂ durante 4 h. Pasada la incubación, se eliminó el

sobrenadante de MTT y los cristales de formazan depositados en el fondo de cada pocillo se disolvieron con 100 μ L de dimetil sulfóxido (DMSO). Por último, se midió la absorbancia a 570 nm utilizando un lector de microplacas multimodo Varioskan LUX.

Figura 6

Esquema de ensayo de reducción de MTT



Nota. Protocolo estandarizado para la medición de actividad de deshidrogenasas mitocondriales, utilizada como indicador de viabilidad celular.

5.4 Esquema de combinación de fármacos

DCT, CIT y ALCAR fueron administrados solos y en combinación. Se realizaron curvas dosis respuesta para DCT (BLAU Farmacéutica, Cotia, SP, Brazil), CIT trisódico (PanReac AppliChem, Castellar del Vallés, Barcelona, España) y ALCAR (Santa Cruz Biotechnology,

Dallas, TX, USA) usando la técnica de ensayo de CV. Para las combinaciones de tratamientos, los fármacos fueron adicionados en simultáneo a proporciones fijas de DCT:CIT y DCT:CIT.ALCAR (5:1, 3:1 y 1:1), usando concentraciones correspondientes a 4, 2, 1, 0.5, 0.25 x concentraciones letales 50 (CL50) para cada componente (Tabla 1). Las interacciones farmacológicas fueron analizadas utilizando la ecuación de efecto mediano, descrito por Chou-Talalay (59,60). Con el programa CompuSyn (Version 1.0; ComboSyn, Inc., Paramus, NJ, USA) se calcularon los índices de combinación (ICx), donde $ICx = 1$ indica un efecto aditivo, $ICx < 1$ indica un efecto sinérgico, y $ICx > 1$ indica un efecto antagónico. Se empleó la clasificación de sinergismo postulada por Chou (59, 60) para medir los efectos ajustados al intervalo de confianza del 95%.

Tabla 1

Esquemas de combinaciones

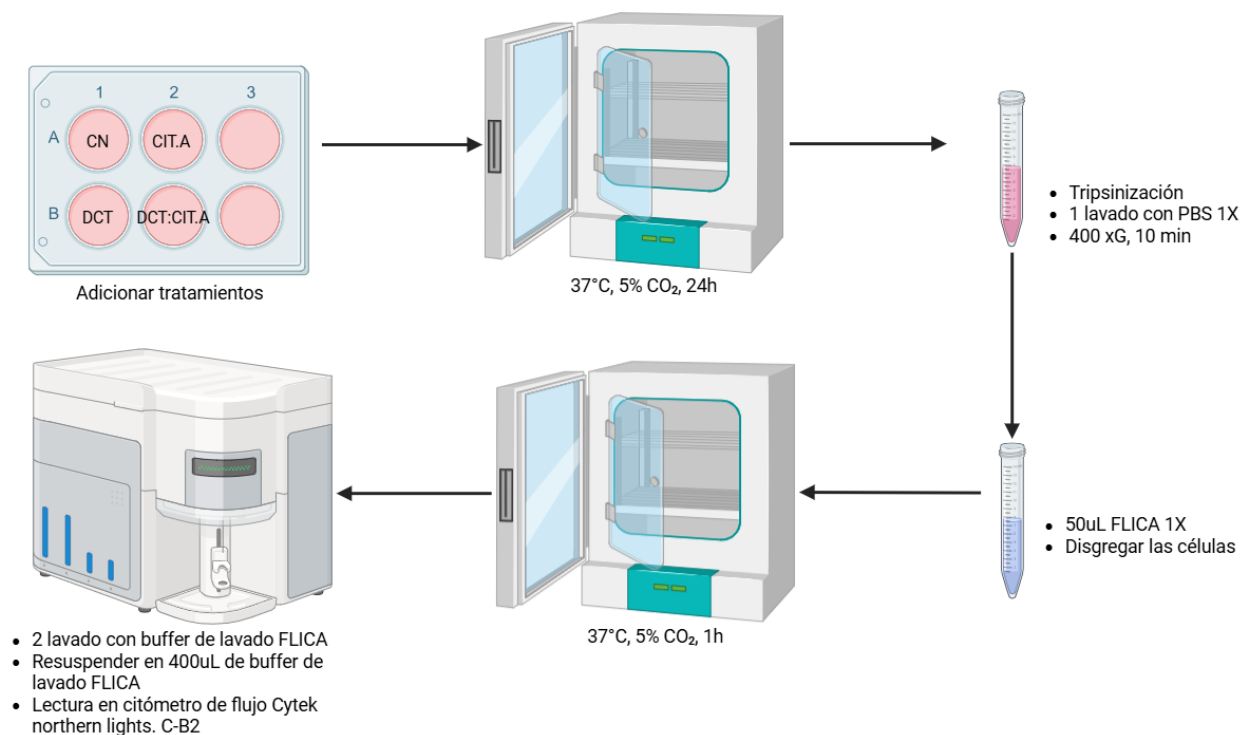
Esquemas de Combinación		
Razón 5:1	Razón 3:1	Razón 1:1
4 x CL50 a,b	4 x CL50 a,b	4 x CL50 a,b
2 x CL50 a,b	2 x CL50 a,b	2 x CL50 a,b
1 x CL50 a,b	1 x CL50 a,b	1 x CL50 a,b
0.5 x CL50 a,b	0.5 x CL50 a,b	0.5 x CL50 a,b
0.25 x CL50 a,b	0.25 x CL50 a,b	0.25 x CL50 a,b

Nota. Esquemas de combinación farmacológica donde se muestran las razones farmacológicas entre un componente “a” y un componente “b”. Las proporciones 5:1, 3:1 y 1:1 se establecieron

mediante la reducción proporcional del componente “b” frente a “a”, manteniéndose constante el componente “a”.

5.5 Evaluación de la apoptosis mediante FAM-FLICA

Las células se sembraron en platos de 6 pozos, fondo plano Corning®, a una densidad celular de 5×10^5 células/pozo, en medio RPMI con 2% SFB y se incubaron a 37°C, 5% CO₂ durante 24h. Pasado el tiempo, se adicionaron las concentraciones a 1 x CL50 a,b a proporción 5:1, y se incubaron a 37°C, 5% CO₂ durante 24h. Posteriormente se traspasaron las células de cada pozo a tubos de centrifuga estéril de 15mL. Las células se lavaron con PBS 1X y se adicionó 50 µL de reactivo de FLICA 1X, incubando durante 1h a 37°C, 5% CO₂. Finalmente se lavaron las células 2 veces con el buffer de lavado FLICA, leyendo la fluorescencia en citómetro de flujo Cytex Northern Lights (Cytex Biosciences, Fremont, CA, USA), en el canal B2 (excitación 495nm, emisión 519-525 nm).

Figura 7*Esquema de ensayo de actividad de caspasas en citómetro de flujo*

Nota. Protocolo estandarizado para la medición de actividad de poli caspasas activas, utilizada como indicador de apoptosis celular.

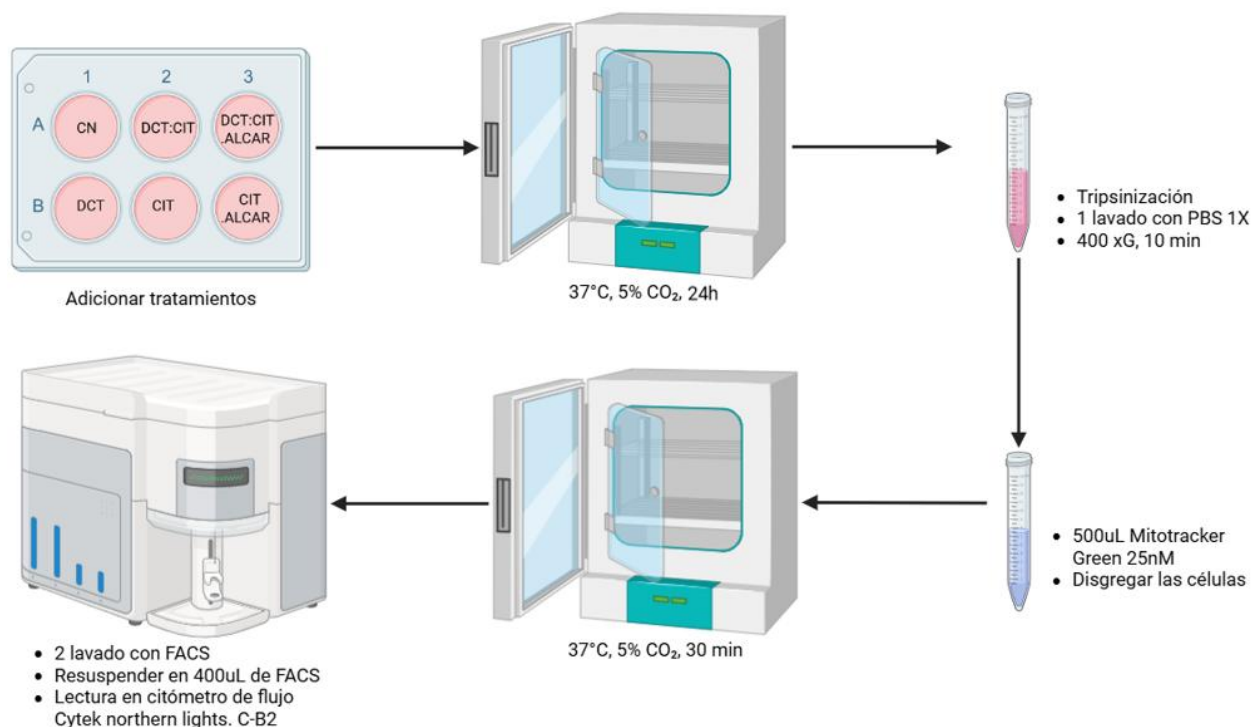
5.6 Evaluación de masa mitocondrial

Las células se sembraron en platos de 6 pozos fondo plano Corning®, a una densidad celular de 5×10^5 células/pozo, en medio RPMI con 2% SFB y se incubaron a 37°C, 5% CO₂ durante 24h. Pasado el tiempo se adicionaron los respectivos tratamientos, y se incubaron a 37°C, 5% CO₂ durante 48h. En un paso posterior, se traspasaron las células de cada pozo a tubos de centrífuga estéril de 15mL. Las células se lavaron con PBS 1X y se adicionó 500 µL de reactivo de Mitotracker Green 25nM, incubando durante 30 minutos 37°C, 5% CO₂. Finalmente se lavaron las células 2 veces con FACS (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), leyendo la fluorescencia en

citómetro de flujo Cytex Northern Lights (Cytex Biosciences, Fremont, CA, USA), en el canal B2 (excitación 495nm, emisión 519-525 nm).

Figura 8

Esquema de ensayo de medición de masa mitocondrial en citómetro de flujo



Nota. Protocolo estandarizado para la medición de masa mitocondrial mediante una sonda específica, utilizada como cuantificador de mitocondrias celulares.

5.7 Extracción de proteínas

Para la extracción de proteínas totales, se utilizó buffer RIPA preparado en el laboratorio, de acuerdo con la formulación estándar, siguiendo el protocolo de GoldBio (Gold Biotechnology, St. Louis, MO, USA) (61), el cual permite la disrupción eficiente de las membranas celulares y la solubilización de proteínas tanto citosólicas como nucleares.

Las células fueron sembradas en platos de 12 pozos fondo plano Corning®, a una densidad celular de 5×10^5 células/pozo, en medio RPMI con 2% SFB y se incubaron a 37°C, 5% CO₂ durante 24h. Posteriormente, se adicionaron los tratamientos y se incubó a condiciones normales durante 48h. Transcurrido este periodo de tiempo, las células se lavaron con PBS 1X frío, y se agregaron 200 uL de buffer RIPA frío en cada pozo. La lisis se facilitó mediante pipeteo con puntas de 200 uL, seguido de una incubación de 5 minutos a 4 °C. El contenido de cada pozo fue transferido a tubos de microcentrífuga de 1,5 mL y centrifugado a 21,130 x g durante 40 minutos a 4 °C. Finalmente, el sobrenadante fue recuperado y transferido a nuevos tubos de microcentrífuga de 1,5 mL y almacenado a -80 °C hasta su posterior análisis.

5.8 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas totales se realizó mediante el método de Bradford, utilizando el reactivo Coomassie Plus (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA). Se preparó una curva de albúmina sérica bovina (ASB) entre 50 y 1000 µg/mL. Cada determinación se realizó en platos de 96 pozos fondo plano Corning®, utilizando 5uL de estándar, blanco o muestra (esta últimas previamente diluidas 1:5 en agua tipo I), a los que se les adicionaron 200 µL de reactivo Bradford, incubando durante 10 minutos a temperatura ambiente, y finalmente se midió la absorbancia a 595 nm utilizando un lector de microplacas multimodo Varioskan LUX.

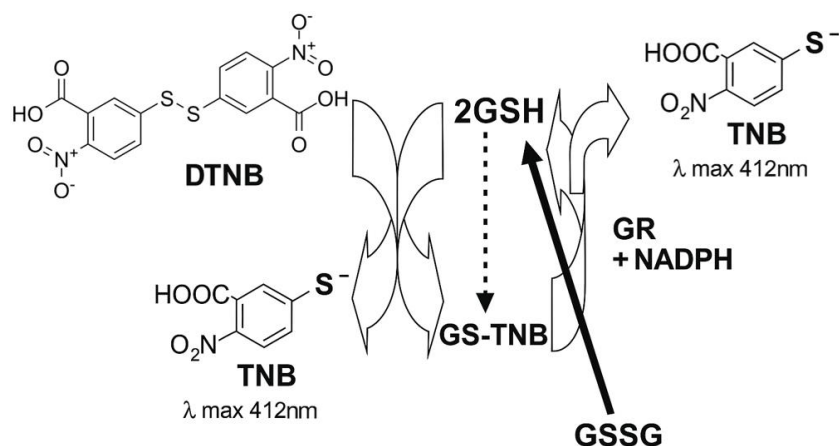
5.9 Determinación de glutatión total

El glutatión es el tiol no proteico más prevalente en el citosol y desempeña un papel esencial como agente antioxidante de bajo peso molecular. Este tripéptido se encuentra en dos formas principales: como glutatión reducido (GSH), que representa la forma activa, y como

glutación disulfuro (GSSG), su forma oxidada. Para la determinación del glutación total, a una alícuota de lisado de la muestra en buffer RIPA se mezcló en proporción 1:1 con buffer fosfato de potasio (KPE 0,1 M) con sal disódica EDTA 5 mM, pH 7,5, suplementada con ácido sulfosalicílico (para alcanzar una concentración final de 6 mg/mL). El procedimiento se llevó a cabo según la metodología planteada por Rahman y colaboradores (62). La técnica se basó en la reacción entre el GSH y el 5,5'-ditio-bis(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB) para formar el cromóforo amarillo ácido 5'-tio-2-nitrobenzoico (TNB) más el complejo disulfuro (GS-TNB). La formación del TNB libre, medida a 412 nm, es proporcional a la concentración de GSH en la muestra. Posteriormente, el producto oxidado GS-TNB es reducido por la enzima glutación reductasa (GR) en presencia de NADPH, regenerando GSH y permitiendo que continúe el ciclo de reacción. Figura 9. La velocidad de cambio en la absorbancia (ΔA_{412} nm/min) se utiliza como valor lineal para facilitar y estandarizar la medición. Esta variación es directamente proporcional a la concentración total de GSH. La concentración en las muestras se determina interpolando en la ecuación de regresión obtenida a partir de una curva estándar con concentraciones conocidas de GSH.

Figura 9

Esquema del principio químico del método de reciclaje enzimático para cuantificación de GSH-GSSG



Nota. Figura adaptada de Rahman y colaboradores (62).

Se prepararon soluciones estándar de GSH a partir de una concentración máxima de 26.4 μM , realizando diluciones seriadas en tampón KPE hasta una concentración de 0.103 μM (1:256). En platos de 96 pozos fondo plano Corning®, se dispensaron 20 μL de cada estándar, muestra o blanco por pocillo. Se mezclaron volúmenes iguales de las soluciones recién preparadas de DTNB (0.667 mg/mL) y GR (1.5 U/mL), y se añadieron 120 μL de esta mezcla a cada pocillo. La reacción se incubó durante 30 segundos para la conversión de GSH en el aducto GS-TNB y, se añadieron 60 μL de solución de β -NADPH (0.667 mg/mL). Luego, se midió la absorbancia a 412 nm utilizando un lector de microplacas multimodo Varioskan LUX cada 30 segundos durante 2 minutos (5 mediciones). Finalmente, se calculó la velocidad de formación del ácido 2-nitro-5-tiobenzoico (cambio de absorbancia/min) y se determinó la concentración total real de GSH en las muestras utilizando la regresión lineal para calcular los valores obtenidos a partir de la curva patrón estándar. Los valores de concentración total de GSH se expresaron nmol/ μg proteína.

5.10 Determinación de catalasa

Para determinar la actividad de la enzima catalasa, se evaluó la degradación enzimática del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a lo largo del tiempo. Esta descomposición sigue una cinética de primer orden, en la cual la velocidad de reacción es directamente proporcional a la concentración del H_2O_2 presente en el medio. Se empleó el método modificado de Aebi y colaboradores (63).

Se preparó una solución de trabajo 30 mM de H_2O_2 (Peróxido de hidrógeno 30% estabilizado, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) en buffer fosfato 10 mM (pH 7) y 0.004% de antifoem 204 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

La actividad enzimática fue cuantificada en platos de 96 pozos fondo plano transparente para UV Corning®. En cada pozo se dispensaron 6.4 μL de muestra o blanco, seguidos de 193.6 μL de solución de trabajo H_2O_2 . La disminución en la absorbancia a 240 nm se midió cada 15 segundo durante 1 minuto (5 mediciones) con un lector de microplacas multimodo Varioskan LUX. Según Aebi, se utilizó la constante de reacción de primer orden (κ) como la unidad de actividad de la catalasa, siendo definida mediante:

$$\kappa = \left(\frac{1}{\Delta t} \right) \times (2.3 \times \log \frac{[A_1]}{[A_2]})$$

Donde:

t = intervalo de tiempo medio

$[A_1]$ y $[A_2]$ son las absorbancias de H_2O_2 en los tiempos t_1 y t_2 .

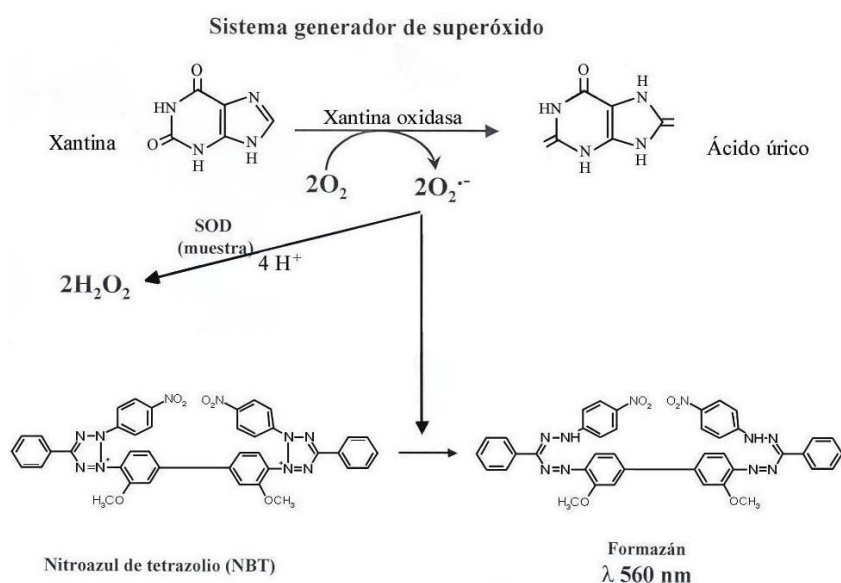
Finalmente, la actividad específica de la catalasa se calculó dividiendo el valor de la constante de primer orden κ entre la cantidad de proteína total en μg .

5.11 Determinación de superóxido dismutasa

La actividad de la superóxido dismutasa (SOD) se determinó en función de su capacidad para inhibir la reducción del nitro azul de tetrazolio (NBT) inducida por aniones superóxido ($O_2^{\bullet-}$) generados en el sistema de la xantina-xantina oxidasa (XOD). La oxidación de xantina por la enzima XOD produce aniones superóxido, los cuales reducen el NBT a formazán, un compuesto coloreado que puede cuantificarse espectrofotométricamente a 560 nm. La presencia de SOD compite con el NBT al desactivar los $O_2^{\bullet-}$, lo cual disminuye la formación de formazán, y esta inhibición es proporcional a la actividad enzimática de la SOD (Figura 10) (64).

Figura 10

Sistema generador de radical superóxido basado en la reacción xantina-xantina oxidasa, empleado para la determinación de formazán a partir de la reducción del NBT



Nota. Figura adaptada de Oberley y colaboradores (64).

Se preparó una mezcla de reacción manteniendo la siguiente proporción:

Tabla 2*Mezcla de reacción*

Componente	Placa de 96 Pozos (para 45 pozos)
Xantina 3 mM	5 mL
EDTA 0.6 mM	1.5 mL
NBT 600 μ M	1.5 mL
Na ₂ CO ₃ 400 mM	0.9 mL
Albúmina (ASB) 0.1%	0.45 mL
Total (mL)	9.35 mL

Nota. Manteniendo la relación se ajustaron dependiendo de la cantidad de pozos requeridos.

La XOD se preparó a una concentración de 262.5 U/L con solvente de sulfato de amonio 2 M. La cuantificación de la actividad de la SOD, se realizó en platos de 96 pozos fondo plano Corning®, haciendo el montaje de 3 repeticiones por cada condición a evaluar: (1) control con 100% de actividad de la XOD, (2) muestra, y (3) blanco de muestra. En cada pozo se adicionaron 166 μ L de mezcla de reacción (Tabla 2). Ulteriormente, se añadieron 33 μ L de buffer fosfato 50 mM al grupo 1, 33 uL de muestra problema a los grupos 2 y 3. Para iniciar la reacción enzimática, se dispensaron 10 uL de XOD a los grupos 1 y 2, mientras que al grupo 3 (blanco) se añadieron 10 uL de sulfato de amonio 2 M. Los platos se incubaron a 27 °C durante 15 minutos. Finalizada la incubación, la reacción se detuvo con 66 uL de CuCl₂ 0.8 mM, y se midió la absorbancia a 560 nm utilizando un lector de microplacas multimodo Varioskan LUX.

5.12 Evaluación de ERO total

La detección intracelular de ERO se realizó mediante la tinción con 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA), siguiendo el protocolo modificado descrito por Kim y colaboradores (65).

Las células se sembraron en platos de 6 pozos fondo plano Corning®, a una densidad celular de 5×10^5 células/pozo, en medio RPMI con 2% SFB y se incubaron a 37°C, 5% CO₂ durante 24h. Pasado el tiempo se adicionaron los respectivos tratamientos, y se incubaron a 37°C, 5% CO₂ durante 48h. Transcurrido el tiempo de tratamiento, las células se lavaron una vez con medio RPMI sin suplementos y se incubaron con 500 µL por pozo de una solución de trabajo de DCFH-DA (10 µM en RPMI) durante 30 minutos a 37 °C y 5 % CO₂, protegidas de la luz. En la fase siguiente, se retiró y descartó la solución de DCFH-DA, las células se lavaron dos veces con PBS 1X y se procedió a la lisis celular mediante la adición de 200 µL de buffer RIPA en cada pozo, continuando con el protocolo de extracción de proteínas.

Del sobrenadante se traspasaron 100 µL a platos de 96 pozos fondo plano Corning®, y se midió la fluorescencia utilizando un lector de microplacas multimodo Varioskan LUX (excitación 485nm, emisión 530 nm). La fluorescencia por cada muestra se normalizó sobre la cuantificación de proteínas mediante Bradford.

5.13 Determinación de lactato

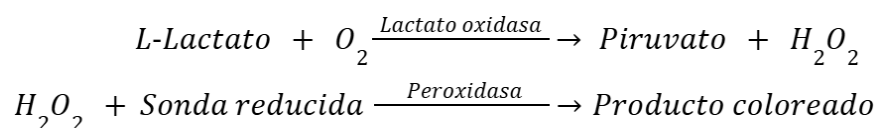
Las células se sembraron en platos de 12 pozos fondo plano Corning®, a una densidad celular de 5×10^5 células/pozo, en medio RPMI con 2% SFB y se incubaron a 37°C, 5% CO₂ durante 24h. Pasado el tiempo se adicionaron los respectivos tratamientos, y se incubaron a 37°C,

5% CO₂ durante 48h. Finalmente, se recolectaron 1 mL del sobrenadante de cada combinación experimental.

Se utilizó el kit comercial *Lactate Assay Kit* (Sigma-Aldrich, MilliporeSigma, St. Louis, MO, USA; Cat.No. MAK064) (66), siguiendo el protocolo del fabricante, bajo la siguiente reacción:

Reacción 1

Reacciones involucradas en la determinación de lactato



Nota. Tomado del kit del fabricante MAK064 (66).

Se prepararon curvas estándar de lactato en un rango de 0 a 10 nmol/pozo. Las muestras fueron diluidas a una razón de 1:50 en el buffer de ensayo de lactato provisto por el kit, y se adicionaron 50 µL de muestra, estándar y blanco en platos de 96 pozos fondo plano Corning®. A cada pozo se agregaron 50 µL de mezcla maestra de reacción y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, protegida de la luz. Pasado el tiempo, la absorbancia se midió a 570 nm utilizando un lector de microplacas multimodo Varioskan LUX.

5.14 Determinación de glucosa

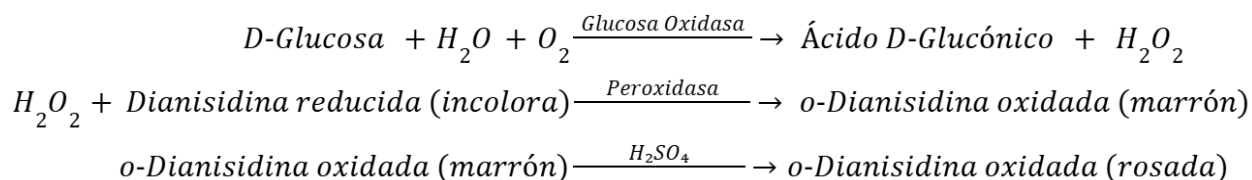
Las células se sembraron en platos de 12 pozos fondo plano Corning®, a una densidad celular de 5x10⁵ células/pozo, en medio RPMI con 2% SFB y se incubaron a 37°C, 5% CO₂ durante 24h. Pasado el tiempo se adicionaron los respectivos tratamientos, y se incubaron a 37°C,

5% CO₂ durante 48h. Finalmente, se recolectaron 1mL del sobrenadante de cada combinación experimental.

Se utilizó el kit comercial *Glucose Assay Kit* (Sigma-Aldrich, MilliporeSigma, St. Louis, MO, USA; Cat.No. GAGO20) (67), siguiendo el protocolo del fabricante, bajo la siguiente reacción:

Reacción 2

Reacciones involucradas en la determinación de glucosa



Nota. Tomado del kit del fabricante GAGO20 (67).

Se prepararon curvas estándar de glucosa en un rango de 20 a 80 µg/mL. Las muestras fueron diluidas a una razón 1:10 en agua tipo 1, y se adicionaron 40 µL de muestra, estándar, y blanco en plastos de 96 pozos fondo plano Corning®. A cada pozo se agregaron 80 µL del reactivo de ensayo y se incubó durante 30 minutos a 37°C, protegida de la luz. Pasado el tiempo, la reacción se detuvo con 80 uL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 12N, finalmente, la absorbancia se midió a 540 nm utilizando un lector de microplacas multimodo Varioskan LUX.

5.15 Análisis estadísticos

Los resultados obtenidos en cada objetivo específico se expresaron como media ± SD o mediana ± IC95%, de acuerdo con la normalidad de los datos, la cual fue determinada mediante el test de Shapiro-Wilk. Los datos de todas las pruebas se consideraron por cada experimento

independiente como un pase distinto de cada línea celular. Para las comparaciones de combinaciones, se emplearon análisis de medidas repetidas, paramétricos o no paramétricos según correspondiera. La comparación entre grupos se realizó mediante análisis de varianza (ANOVA) de una vía para medidas repetidas o mediante el test de Friedman, seguidos de post-tests de comparaciones múltiples de Tukey o Dunn con ajuste de BKY. Para los análisis estadísticos se utilizó el software GraphPad Prism (versión 8.0), mientras que los análisis de combinaciones farmacológicas y la determinación de dosis medias (Dm) equivalentes a la CL50 se llevaron a cabo mediante el modelo de efecto medio, utilizando el programa CompuSyn (versión 1.0).

6. Resultados

6.1 Concentración letal 50 de CIT en PC3 y LNCaP

Para la primera fase, se determinaron las concentraciones letales 50 de forma independiente de cada principio activo o fármaco. Para el CIT se generó un stock de 100 mM de CIT disuelto en medio RPMI 1640 puro, y de estos se generaron las curvas dosis respuestas tanto para PC3 como LNCaP a 24, 48 y 72h (Tablas 3 y 4; Figura 11).

Tabla 3

CL50 24, 48 y 72h de citrato en la línea celular PC3

	PC3 24h	PC3 48h	PC3 72h
log(agonista) vs. respuesta			
normalizada – Pendiente variable			
Valores de mejor ajuste			

LogCL50	1.097	0.8084	0.7305
Pendiente de Hill	1.458	1.118	1.303
CL50	12.49	6.433	5.377
IC 95% (perfil de probabilidad)			
LogCL50	0,9379 a 1,197	0,6837 a 0,9304	0,6338 a 0,8303
Pendiente de Hill	0,9541 a 2,179	0,9167 a 1,476	1,098 a 1,651
CL50	8,668 a 15,74	4,827 a 8,519	4,303 a 6,766
Bondad de ajuste			
Grados de libertad	82	103	82
R cuadrado	0.8126	0.8754	0.9381
Suma de cuadrados	27228	23608	8643
Sy.x	18.22	15.14	10.27
Números de puntos			
# de valores de X	105	105	105
# de valores de Y analizados	84	105	84

Nota. Los datos fueron obtenidos con el ensayo de CV medidas a las 24, 48 y 72h, se utilizaron cinco réplicas independientes (n = 5). La CL50 está ajustada a concentraciones “mM”. Los datos fueron analizados con el programa GraphPad Prims 8.

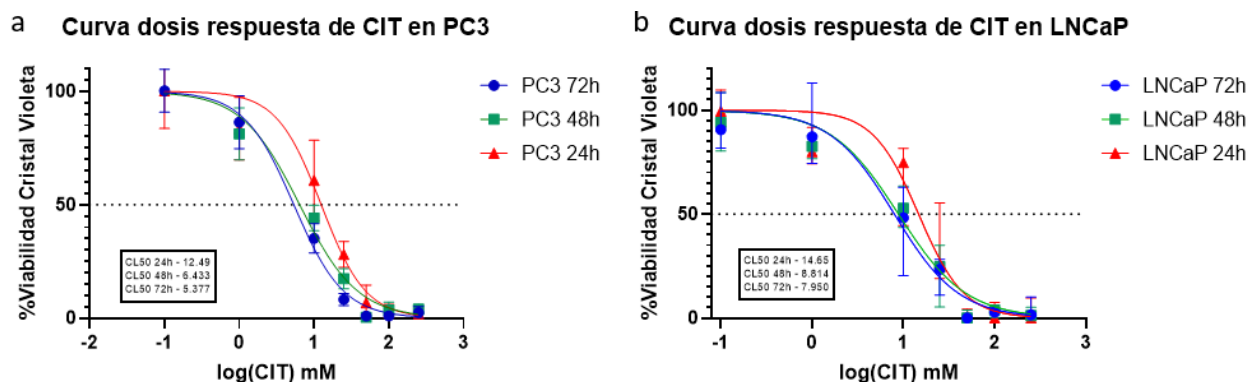
Tabla 4

CL 50 a 24, 48 y 72h de citrato en la línea celular LNCaP

	LNCaP 24h	LNCaP 48h	LNCaP 72h
Log (agonista) vs. respuesta normalizada – Pendiente			
variable			
Valores de mejor ajuste			
LogCL50	1.166	0.9452	0.9004

Pendiente de Hill	1.741	1.173	1.235
CL50	14.65	8.814	7.95
IC 95% (perfil de probabilidad)			
LogCL50	1,084 a 1,232	0,8090 a 1,066	0,7805 a 1,005
Pendiente de Hill	1,273 a 2,282	0,8984 a 1,773	0,9696 a 1,698
CL50	12,15 a 17,08	6,442 a 11,65	6,033 a 10,11
Bondad de ajuste			
Grados de libertad	103	103	82
R cuadrado	0.8481	0.8673	0.8936
Suma de cuadrados	26821	21274	13502
Sy.x	16.14	14.37	12.83
Números de puntos			
# de valores de X	105	105	105
# de valores de Y analizados	105	105	84

Nota. Los datos fueron obtenidos con el ensayo de CV medidas a las 24, 48 y 72h, se utilizaron cinco réplicas independientes (n = 5). La CL50 está ajustada a concentraciones “mM”. Los datos fueron analizados con el programa GraphPad Prims 8.

Figura 11*Curva dosis respuesta de CIT en PC3 y LNCaP*

Nota. (a) curva dosis respuesta de CIT en PC3 y (b) en LNCaP. Se normalizó el medio sin tratamientos como 100% de viabilidad, un control de muerte con 100mM de CIT y se transformaron las concentraciones a logaritmo de la dosis, determinando curvas de viabilidad a 24, 48 y 72h con técnica de CV. Los datos están ajustados a la media $\pm$ IC95%. Se realizó cinco experimentos independientes ($n = 5$) con tres réplicas técnicas. Los datos fueron analizados con el programa GraphPad Prims 8. Abreviaturas: control sin tratamiento (CN), citrato (CIT), cristal violeta (CV), e intervalo de confianza del 95% (IC95%).

6.2 Concentración letal 50 de DCT en PC3 y LNCaP

La CL50 del DCT (marca Blau) se determinó en las líneas PC3 y LNCaP mediante mediciones a 24, 48 y 72h. Sin embargo, a las 24 y 48 h no se evidenció linealidad ni correlación del efecto (R cuadrado), tanto en el ensayo de MTT como de CV. El efecto citotóxico fue detectado únicamente a las 72h con el ensayo de CV (Tablas 5 y 6; Figura 12).

En consecuencia, la evaluación posterior de los efectos citotóxicos y combinaciones farmacológicas se realizó utilizando la técnica de CV a las 72h.

Tabla 5*CL50 a 72h de Docetaxel en la línea celular PC3*

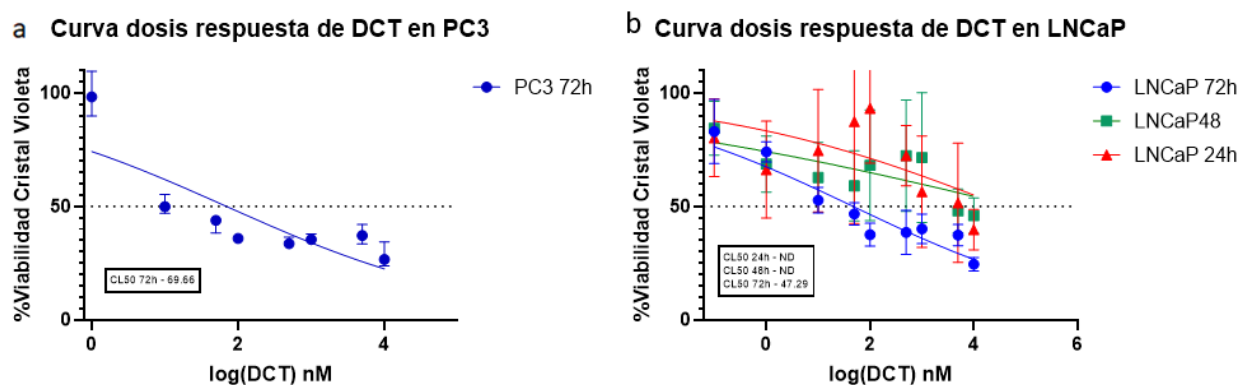
PC3 72h	
Log (agonista) vs. respuesta normalizada – Pendiente	
variable	
Valores de mejor ajuste	
LogCL50	1.843
Pendiente de Hill	0.2493
CL50	69.66
IC 95% (perfil de probabilidad)	
LogCL50	1,594 a 2,081
Pendiente de Hill	0,2005 a 0,3024
CL50	39,23 a 120,6
Bondad de ajuste	
Grados de libertad	70
R cuadrado	0.6457
Suma de cuadrados	11614
Sy.x	12.88
Números de puntos	
# de valores de X	72
# de valores de Y analizados	72

Nota. Los datos fueron obtenidos con el ensayo de CV medido a las 72h, se utilizaron tres réplicas independientes (n = 3). La CL50 está ajustada a concentraciones “nM”. Los datos fueron analizados con el programa GraphPad Prims 8.

Tabla 6*CL50 a 24, 48 y 72h de Docetaxel en la línea celular LNCaP*

	LNCaP 24h	LNCaP48	LNCaP 72h
Log (agonista) vs. respuesta			
normalizada – Pendiente variable			
Valores de mejor ajuste			
LogCL50	4.573	4.807	1.675
Pendiente de Hill	0.1528	0.09538	0.1891
CL50	37398	64140	47.29
IC 95% (perfil de probabilidad)			
LogCL50	3,298 a 17,42	3,404 a 11,89	1,448 a 1,888
Pendiente de Hill	0,02480 a 0,3918	0,02828 a 0,1708	0,1590 a 0,2208
		2532 a	
CL50	1985 a 2,609e+017	774609158746	28,08 a 77,18
Bondad de ajuste			
Grados de libertad	49	49	121
R cuadrado	0.1095	0.1456	0.6046
Suma de cuadrados	32993	16354	16966
Sy.x	25.95	18.27	11.84
Números de puntos			
# de valores de X	135	135	135
# de valores de Y analizados	51	51	123

Nota. Los datos fueron obtenidos con el ensayo de CV medido a las 24, 48 y 72h, se utilizaron de tres a cinco réplicas independientes (n = 3 a 5). La CL50 está ajustada a concentraciones “nM”. Los datos fueron analizados con el programa GraphPad Prims 8.

Figura 12*Curva dosis respuesta de DCT en PC3 y LNCaP*

Nota. (a) curva dosis respuesta de DCT en PC3 y (b) en LNCaP. Se normalizó el medio sin tratamientos como 100% de viabilidad, un control de muerte con 100mM de CIT y se transformaron las concentraciones a logaritmo de la dosis, determinando curvas de viabilidad a 24, 48 y 72h con técnica de CV. Los datos están ajustados a la media $\pm$ IC95%. Se realizó tres a cinco experimentos independientes ($n = 3-5$) con tres réplicas técnicas. Los datos fueron analizados con el programa GraphPad Prims 8. Abreviaturas: control sin tratamiento (CN), citrato (CIT), cristal violeta (CV), no determinado (ND), e intervalo de confianza del 95% (IC95%).

6.3 Concentración letal 50 de ALCAR en PC3 y LNCaP

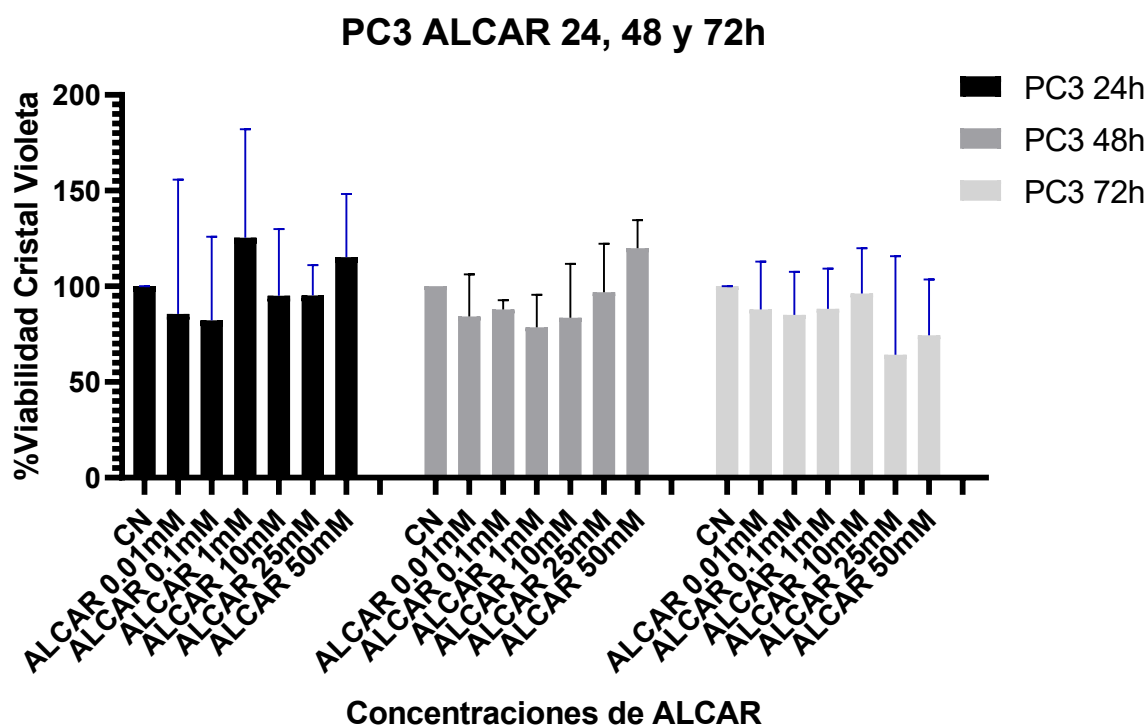
Para la evaluación de los efectos citotóxicos de la ALCAR se emplearon concentraciones similares a las reportadas por Baci y colaboradores (15), en las cuales no se observaron efectos citotóxicos. Debido a la disponibilidad limitada del reactivo, en los ensayos preliminares solo se realizó una réplica biológica en las líneas PC3 y LNCaP, con mediciones a 24, 48 y 72 horas (Figura 13 y 14).

En un experimento independiente, se utilizó DMSO puro como solvente de la ALCAR, encontrándose efectos citotóxicos entre 1 y 10 mM. No obstante, estos efectos citotóxicos estuvieron relacionados a las concentraciones del DMSO en las células (figura 15 y 16).

Se realizó una revisión sistemática de farmacología de la ALCAR, en la cual Farahzadi y colaboradores (68), reportaron que el nivel plasmático de la ALCAR en pacientes sanos bajo tratamiento se encuentra en el rango de 3-6 μM . Con base en esta evidencia, se decidió formular un nuevo principio activo en la combinación de CIT con 6 μM de ALCAR.

Figura 13

Viabilidad de ALCAR en PC3

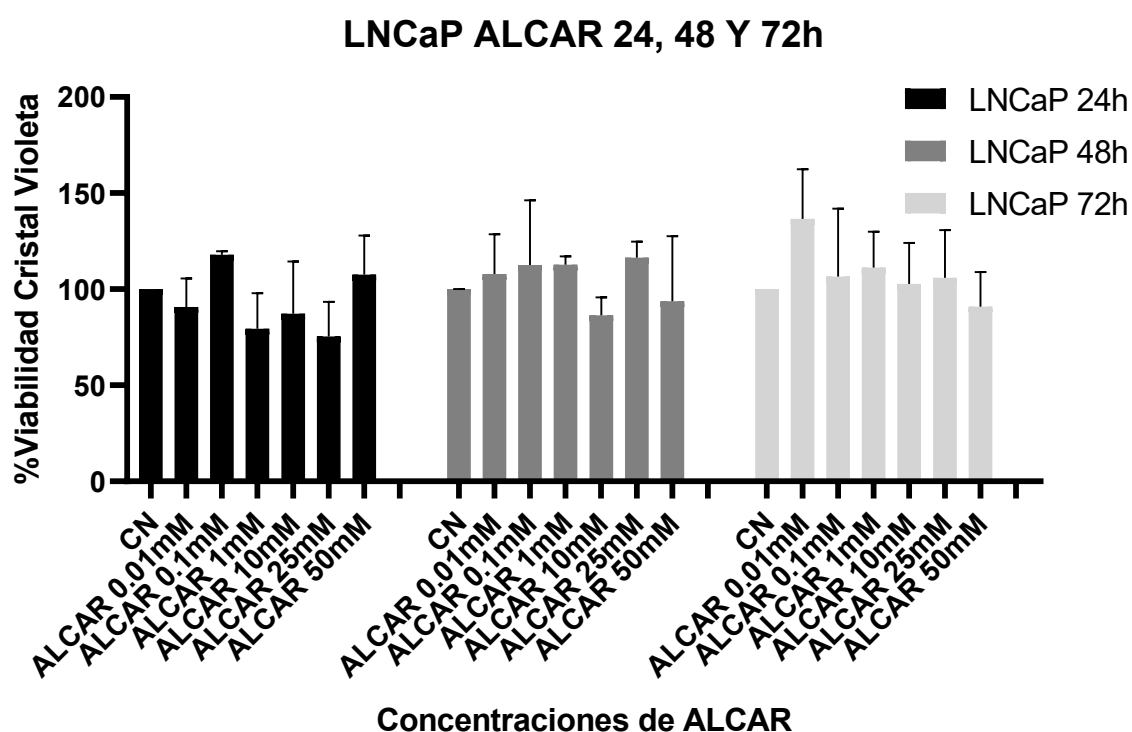


Nota. Se normalizó el medio sin tratamientos como 100% de viabilidad y un control de muerte con 100mM de CIT, determinando curvas de viabilidad a 24, 48 y 72h. Los datos están ajustados a la

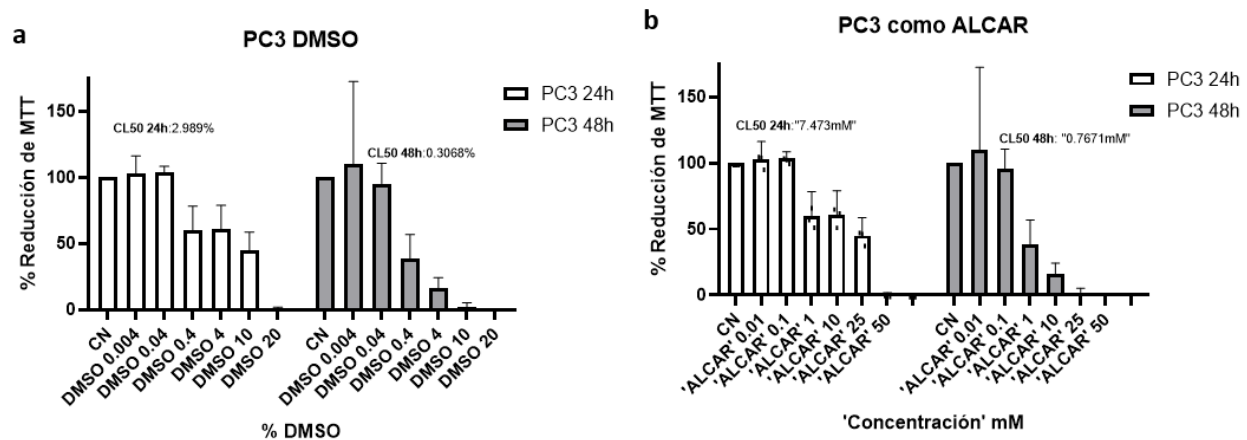
media $\pm$ IC95%. Se realizó un experimento independiente ($n = 1$) con tres réplicas técnicas. Los datos fueron analizados con el programa GraphPad Prims 8. Abreviaturas: control sin tratamiento (CN), citrato (CIT) y acetil-L-carnitina (ALCAR) e intervalo de confianza del 95% (IC95%).

Figura 14

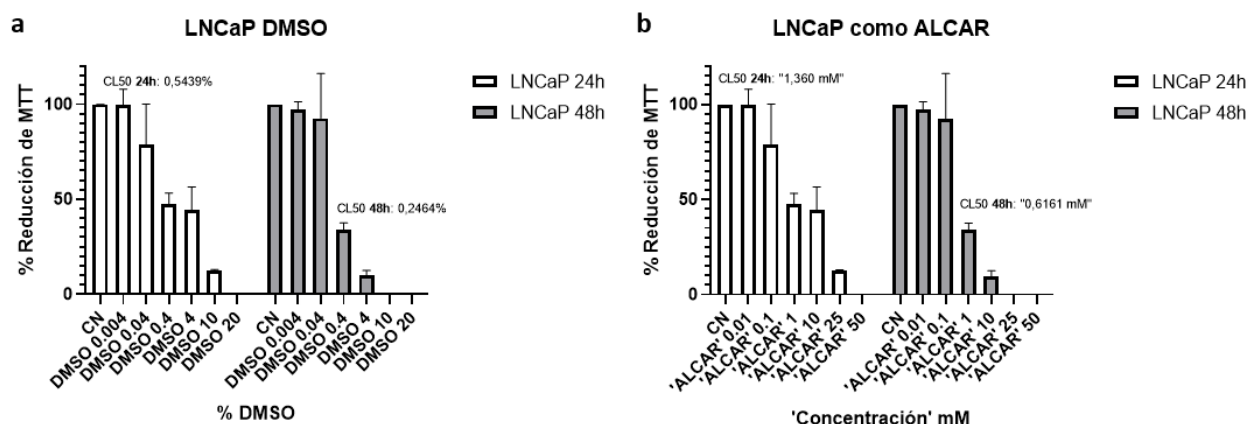
Viabilidad de ALCAR en LNCaP



Nota. Se normalizó el medio sin tratamientos como 100% de viabilidad y un control de muerte con 100mM de CIT, determinando curvas de viabilidad a 24, 48 y 72h. Los datos están ajustados a la media $\pm$ IC95%. Se realizó un experimento independiente ($n = 1$), con 3 réplicas técnicas. Los datos fueron analizados con el programa GraphPad Prims 8. Abreviaturas: control sin tratamiento (CN), citrato (CIT) y acetil-L-carnitina (ALCAR) e intervalo de confianza del 95% (IC95%).

Figura 15*Comparación del efecto del solvente DMSO con ALCAR en PC3*

Nota. Se normalizó el medio sin tratamientos como 100% de reducción de MTT y un control de muerte con 100mM de CIT, determinando curvas de viabilidad a 24, 48 y 72h. Los datos están ajustados a la media $\pm$ IC95%. Se realizó un experimento independiente (n= 1), con 3 réplicas técnicas. Los datos fueron analizados con el programa GraphPad Prims 8. Abreviaturas: control sin tratamiento (CN), citrato (CIT) y acetil-L-carnitina (ALCAR) e intervalo de confianza del 95% (IC95%).

Figura 16*Comparación del efecto del solvente DMSO con ALCAR en LNCaP*

Nota. Se normalizó el medio sin tratamientos como 100% de reducción de MTT y un control de muerte con 100mM de CIT, determinando curvas de viabilidad a 24, 48 y 72h. Los datos están ajustados a la media $\pm$ IC95%. Se realizó un experimento independiente ($n = 1$), con 3 réplicas técnicas. Los datos fueron analizados con el programa GraphPad Prims 8. Abreviaturas: control sin tratamiento (CN), citrato (CIT) y acetil-L-carnitina (ALCAR) e intervalo de confianza del 95% (IC95%).

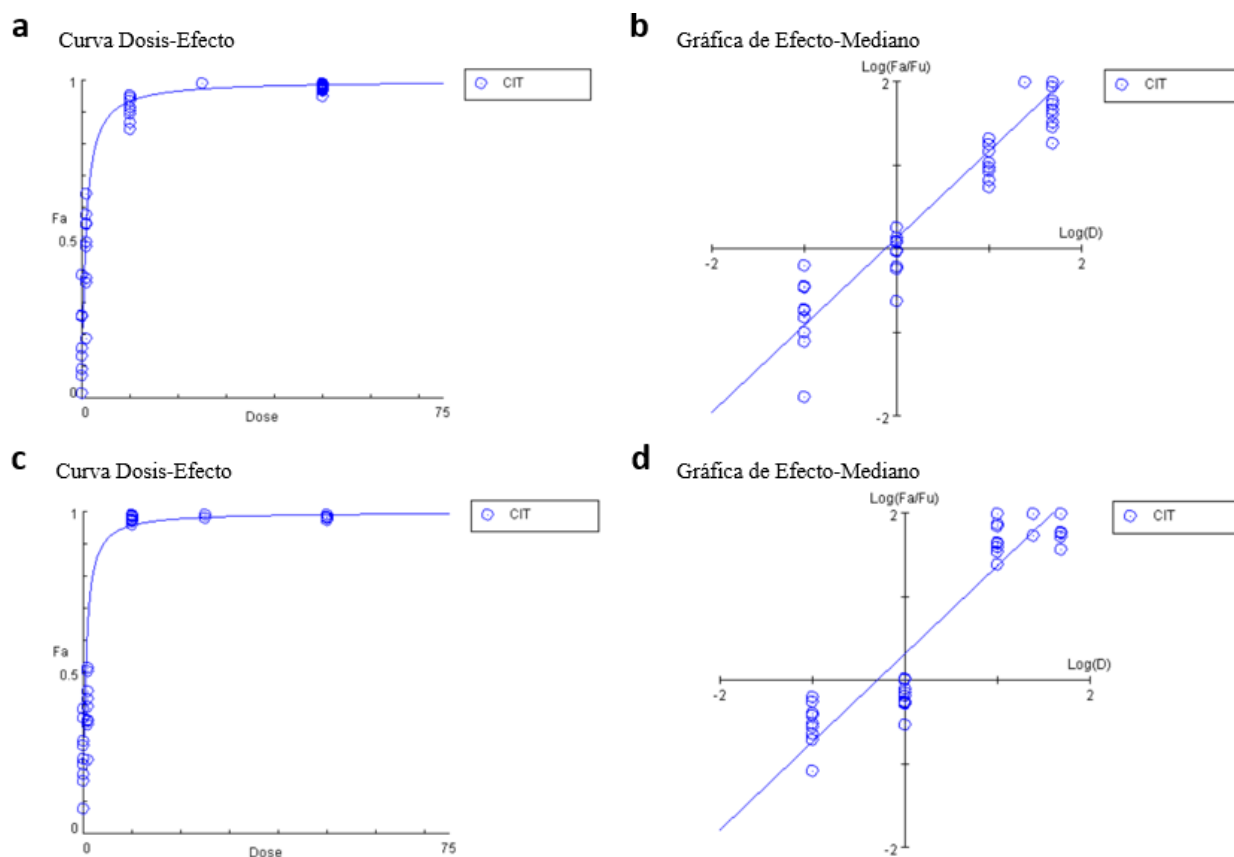
6.4 Curvas dosis respuesta CIT en PC3 y LNCaP

Se preparó un nuevo stock de CIT 1 M con el fin de evaluar su efecto en combinación con 6 μ M de ALCAR. Adicionalmente, se evaluó el CIT de forma independiente en PC3 y LNCaP mediante el modelo del programa CompuSyn (Figura 17) para calcular las Dm equivalentes a las CL50 (Tabla 7), resultando en 0.61 mM para PC3 y 0.62 mM para LNCaP

Para optimizar el ajuste del modelo, se estableció como valor mínimo de efecto citotóxico 0.01, correspondiente al control sin tratamiento, y como valor máximo 0.99, correspondiente al control de muerte con 100mM de CIT.

Figura 17

Curvas dosis respuesta y gráfica de efecto mediano de CIT en PC3 y LNCaP



Nota. (a) curva dosis-efectos de CIT en PC3, (b) gráfica de efecto-mediano de CIT en PC3, (c) curva dosis-efecto de CIT en LNCaP, (d) gráfica de efecto-mediano de CIT en LNCaP. Se normalizó el medio sin tratamientos como 0.01 y el control de muerte con 100mM de CIT como 0.99, midiendo los efectos a las 72h. Se realizó cinco experimentos independientes ($n = 5$) en PC3 y tres experimentos independientes ($n = 3$) en LNCaP. Las gráficas fueron obtenidas utilizando el programa CompuSyn (versión 1.0). Abreviaturas: citrato (CIT) y efecto (Fa).

Tabla 7*CL50 de CIT en PC3 y LNCaP*

Principio	CL50	m	r
CIT PC3	0.61 (SD 0.30) mM	1.026	0.934
CIT LNCaP	0.62 (SD 0.21) mM	1.077	0.926

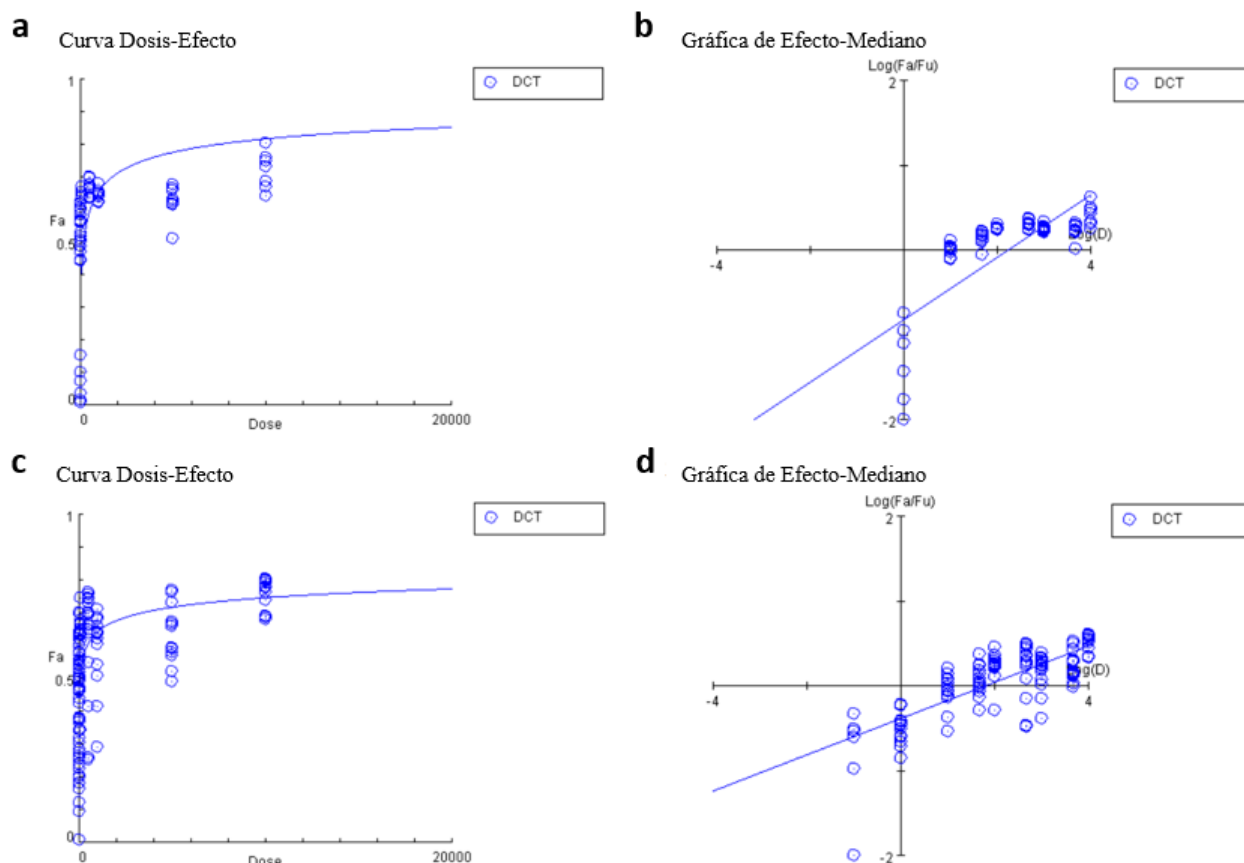
Nota. Se realizó el ensayo de CV a las 72h, La CL50 fue calculada con el programa CompuSyn (versión 1.0). Los datos están ajustados a la media $\pm$ desviación estándar (SD). Se realizaron cinco experimentos independientes (n= 5) en PC3 y tres experimentos independientes (n= 3) en LNCaP.

6.5 Curvas dosis respuesta DCT en PC3 y LNCaP

Los datos de la sección 6.2, utilizados para determinar la CL50 del DCT en PC3 y LNCaP a las 72h, se introdujeron en el modelo de CompuSyn (Figura 18), obteniéndose las Dm equivalente a la CL50 (Tabla 8), con valores de 170.9 nM para PC3 y 61.2 nM para LNCaP.

Figura 18

Curvas dosis respuesta y gráfica de efecto mediano de DCT en PC3 y LNCaP



Nota. (a) curva dosis-efectos de DCT en PC3, (b) gráfica de efecto-mediano de DCT en PC3, (c) curva dosis-efecto de DCT en LNCaP, (d) gráfica de efecto-mediano de DCT en LNCaP. Se normalizó el medio sin tratamientos como 0.01 y el control de muerte con 100mM de CIT como 0.99, midiendo los efectos a las 72h. Los datos fueron obtenidos de las CL50 previamente manejados en DCT para ambas líneas celulares. Las gráficas fueron obtenidas utilizando el programa CompuSyn (versión 1.0). Abreviaturas: docetaxel (DCT), citrato (CIT) y efecto (Fa).

Tabla 8*CL50 de DCT en PC3 y LNCaP*

Fármaco	CL50	m	r
DCT PC3	170.9 nM	0.37	0.748
DCT LNCaP	61.2 nM	0.21	0.759

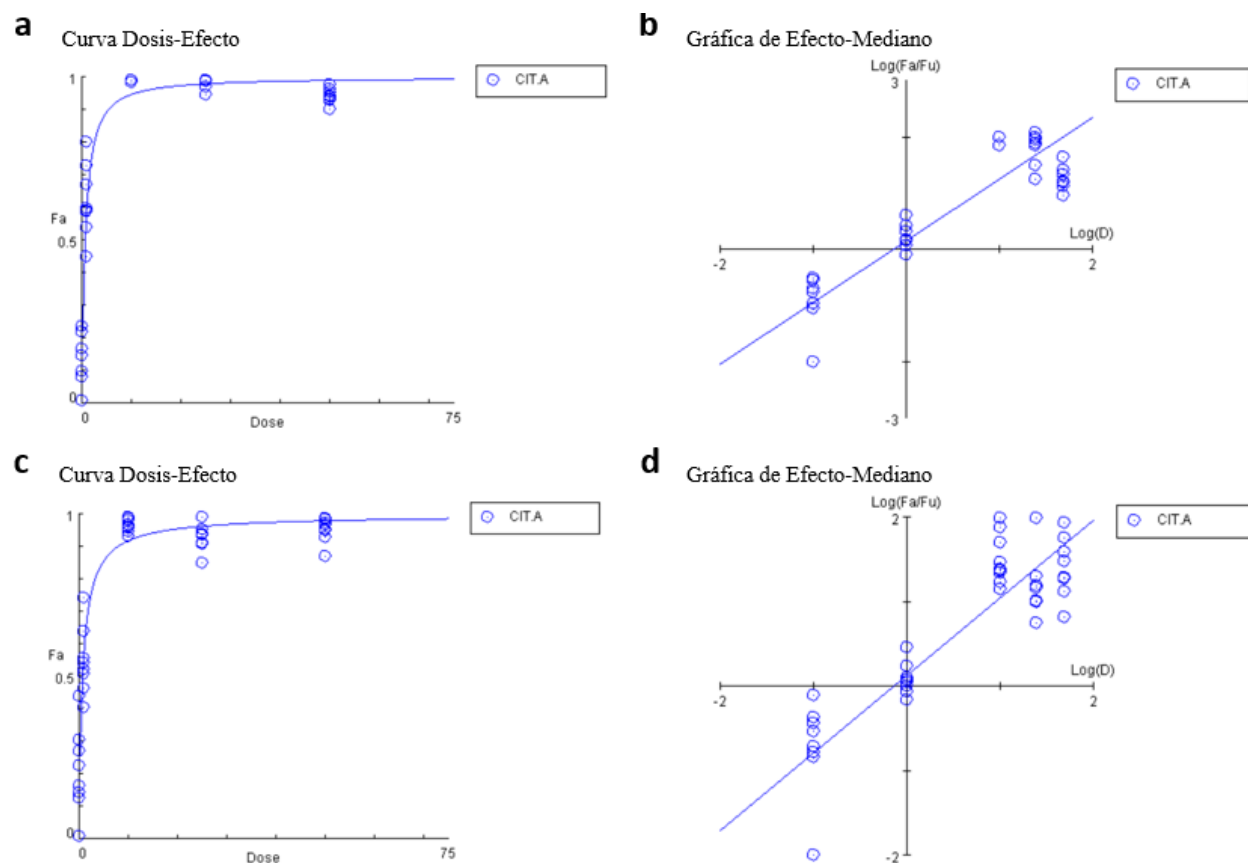
Nota. Se realizó el ensayo de CV a las 72h. La CL50 fue calculada con el programa CompuSyn (versión 1.0), a partir de los datos crudos previamente analizados en las curvas de CL50 de DCT para ambas líneas celulares.

6.6 Curvas dosis respuesta CIT.A en PC3 y LNCaP

Se evaluó el nuevo principio activo de CIT en combinación con 6 μ M de ALCAR (CIT.A). A las 72h se midió el efecto citotóxico en PC3 y LNCaP, empleando el modelo del programa CompuSyn (Figura 19) para estimar las dosis medias (Dm) equivalentes a las CL50 (Tabla 9), que fueron de 0.72 mM en PC3 y 0.81 mM en LNCaP.

Figura 19

Curvas dosis respuesta y gráfica de efecto mediano de CIT.A en PC3 y LNCaP



Nota. (a) curva dosis-efectos de CIT.A en PC3, (b) gráfica de efecto-mediano de CIT.A en PC3, (c) curva dosis-efecto de CIT.A en LNCaP, (d) gráfica de efecto-mediano de CIT.A en LNCaP. Se normalizó el medio sin tratamientos como “0.01” y el control de muerte con 100 mM de CIT como “0.99”, midiendo los efectos a las 72h. Se formó un nuevo principio activo en la combinación entre CIT y 6uM de ALCAR. Se realizaron cuatro experimentos independientes (n= 4) en PC3 y tres experimentos independientes (n= 3) en LNCaP. Las gráficas fueron obtenidas utilizando el programa CompuSyn (versión 1.0). Abreviaturas: citrato (CIT), acetil-L-carnitina (ALCAR) y efecto (Fa).

Tabla 9*CL50 de CIT.A en PC3 y LNCaP*

Principio	CL50	m	r
CIT.A PC3	0.72 (SD 0.06) mM	1.136	0.938
CIT.A LNCaP	0.81 (SD 0.57) mM	1.15	0.928

Nota. Se realizó el ensayo de CV a las 72h, la CL50 fue calculada con el programa CompuSyn (versión 1.0). Los datos están ajustados a la media $\pm$ desviación estándar (SD). Se realizaron 4 experimentos independientes $n = 4$ en PC3 y 3 experimentos independiente $n = 3$ en LNCaP.

6.7 Índices de Combinación en PC3

Tras determinar las CL50 de todos los componentes, se realizaron dos combinaciones: DCT con CIT y DCT con CIT suplementado con 6 μ M de ALCAR, tanto para PC3 como LNCaP. Se estableció la concentración de 1 CL50 de CIT en 0.5 mM para normalizar el efecto y facilitar la preparación de las combinaciones. En la línea celular PC3, los índices de combinación presentaron sinergismo ($IC_x < 0.7$) y fuerte sinergismo ($IC_x < 0.3$) en todas las razones a partir de 2 x CL50, con un predominio de fuerte sinergismo (Tabla 10 y 11). La razón 5:1 exhibió la mayor diferencia estadísticamente significativa entre todas las razones y en ambas combinaciones a concentraciones equitóxicas (1 x CL50) (figura 20). La clasificación de combinaciones farmacológicas se realizó ajustando al rango superior del IC95% del IC_x , de acuerdo a los criterios descritos por Chou (60).

Tabla 10*Índices de combinación DCT:CIT en PC3*

Razón	Grupo	Dosis DCT [nM]	Dosis CIT [mM]	Efecto	ICx	IC 95%	Rango de ICx	Descripción
1:1	4CL50	684	2	0.79	1.21	1.01:1.41	0.90-1.10	Aditividad
	2CL50	342	1	0.80	0.53	0.45:0.61	0.3-0.7	Sinergismo
	1CL50	171	0.5	0.78	0.30	0.25:0.36	0.3-0.7	Sinergismo
	0.5CL50	85.5	0.25	0.76	0.18	0.14:0.22	0.1-0.3	Fuerte Sinergismo
	0.25CL50	42.75	0.125	0.72	0.13	0.09:0.18	0.1-0.3	Fuerte Sinergismo
3:1	4CL50	684	0.667	0.77	0.71	0.38:1.03	0.90-1.10	Aditividad
	2CL50	342	0.333	0.78	0.26	0.22:0.31	0.3-0.7	Sinergismo
	1CL50	171	0.167	0.76	0.16	0.12:0.20	0.1-0.3	Fuerte Sinergismo
	0.5CL50	85.5	0.083	0.75	0.09	0.06:0.12	0.1-0.3	Fuerte Sinergismo
	0.25CL50	42.75	0.042	0.70	0.08	0.04:0.13	0.1-0.3	Fuerte Sinergismo
5:1	4CL50	684	0.4	0.78	0.36	0.29:0.43	0.3-0.7	Sinergismo
	2CL50	342	0.2	0.78	0.20	0.14:0.25	0.1-0.3	Fuerte Sinergismo
	1CL50	171	0.1	0.75	0.12	0.09:0.16	0.1-0.3	Fuerte Sinergismo
	0.5CL50	85.5	0.05	0.75	0.07	0.05:0.09	<0.1	Muy Fuerte Sinergismo
	0.25CL50	42.75	0.025	0.71	0.07	0.03:0.10	0.1-0.3	Fuerte Sinergismo

Nota. Se realizó el ensayo de CV a las 72h en PC3, el medio sin tratamiento fue normalizado como 0.01 y el control positivo de muerte con 100 mM de CIT como 0.99. Se realizaron cinco experimentos independientes (n= 5). El análisis de ICx se realizó mediante el programa de CompuSyn (versión 1.0). Abreviaturas: citrato (CIT) docetaxel (DCT), intervalo de confianza (IC) e índice de combinación (ICx).

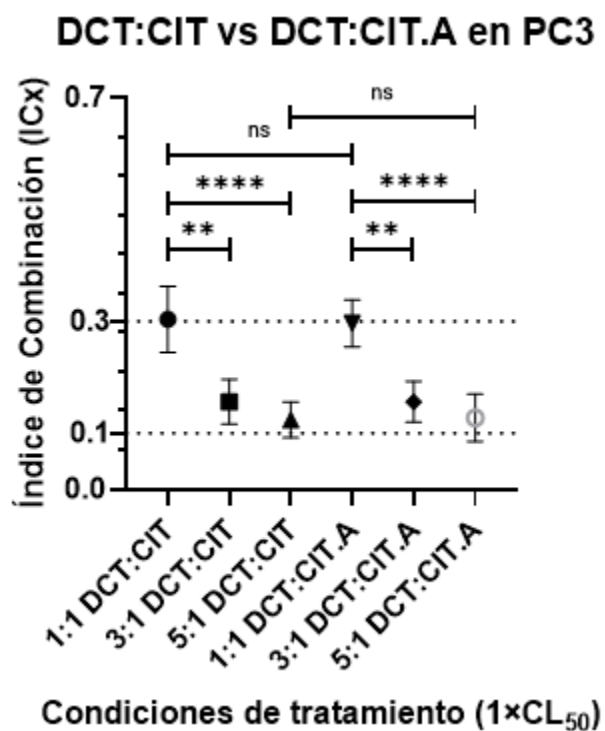
Tabla 11*Índices de combinación DCT:CIT.A en PC3*

Razón	Grupo	Dosis DCT [nM]	Dosis CIT [mM]	Efecto	ICx	IC 95%	Rango de ICx	Descripción
1:1	4CL50	684	2	0.81	0.90	0.80:1.01	0.90-1.10	Aditividad
	2CL50	342	1	0.80	0.46	0.42:0.50	0.3-0.7	Sinergismo
	1CL50	171	0.5	0.77	0.30	0.26:0.34	0.3-0.7	Sinergismo
	0.5CL50	85.5	0.25	0.75	0.16	0.14:0.19	0.1-0.3	Fuerte Sinergismo
	0.25CL50	42.75	0.125	0.71	0.11	0.09:0.14	0.1-0.3	Fuerte Sinergismo
3:1	4CL50	684	0.667	0.78	0.50	0.35:0.65	0.3-0.7	Sinergismo
	2CL50	342	0.333	0.77	0.28	0.18:0.37	0.3-0.7	Sinergismo
	1CL50	171	0.167	0.75	0.16	0.12:0.19	0.1-0.3	Fuerte Sinergismo
	0.5CL50	85.5	0.083	0.73	0.09	0.07:0.12	0.1-0.3	Fuerte Sinergismo
	0.25CL50	42.75	0.042	0.69	0.07	0.05:0.08	<0.1	Muy Fuerte Sinergismo
5:1	4CL50	684	0.4	0.79	0.36	0.23:0.49	0.3-0.7	Sinergismo
	2CL50	342	0.2	0.77	0.24	0.13:0.34	0.3-0.7	Sinergismo
	1CL50	171	0.1	0.75	0.13	0.09:0.17	0.1-0.3	Fuerte Sinergismo
	0.5CL50	85.5	0.05	0.74	0.07	0.05:0.10	0.1-0.3	Fuerte Sinergismo
	0.25CL50	42.75	0.025	0.69	0.06	0.04:0.08	<0.1	Muy Fuerte Sinergismo

Nota. Se realizó el ensayo de CV a las 72h en PC3, el medio sin tratamiento fue normalizado como 0.01 y el control positivo de muerte con 100 mM de CIT como 0.99. Se realizaron tres experimentos independientes (n= 3). El análisis de ICx se realizó mediante el programa de CompuSyn (versión 1.0). Abreviaturas: citrato con 6 µM de acetil-L-carnitina (CIT.A), docetaxel (DCT), intervalo de confianza (IC) e índice de combinación (ICx).

Figura 20

Comparación en índices de combinación de concentraciones equitóxicas en PC3



Nota. Se normalizó el medio sin tratamientos como 0.01 y el control de muerte con 100 mM de CIT como 0.99, midiendo los efectos a las 72h. Se realizaron cinco experimentos independientes ($n = 5$) en DCT:CIT y tres experimentos independientes ($n = 3$) en DCT:CIT.A. El análisis estadístico se llevó a cabo con la prueba de Kruskal–Wallis y comparaciones múltiples mediante la prueba post hoc de Dunn. “ns” $p \geq 0.05$, ** $p < 0.01$ y **** $p < 0.0001$. Los datos se expresan como media $\pm$ intervalo de confianza del 95%. Las gráficas se obtuvieron utilizando GraphPad Prism (versión 8.0). Citrato (CIT), docetaxel (DCT) y citrato con 6 μ M de acetil-L-carnitina (CIT.A).

6.8 Índices de Combinación en LNCaP

los índices de combinación presentaron moderado sinergismo ($IC_x < 0.85$), sinergismo ($IC_x < 0.7$) y fuerte sinergismo ($IC_x < 0.3$) en todas las razones, con un predominio de fuerte sinergismo (Tabla 12 y 13). La razón 5:1 mostró la mayor diferencia estadísticamente significativa entre todas las razones a concentraciones equitóxicas (1 x CL50) (figura 21).

Tabla 12

Índices de combinación DCT:CIT en LNCaP

Razón	Grupo	Dosis DCT [nM]	Dosis CIT [mM]	Efecto	IC _x	IC 95%	Rango de IC _x	Descripción
	4CL50	244	2	0.85	0.71	0.39:1.02	0.90-1.10	Aditividad
	2CL50	122	1	0.81	0.50	0.25:0.75	0.7-0.85	Moderado Sinergismo
1:1	1CL50	61	0.5	0.78	0.32	0.16:0.47	0.3-0.7	Sinergismo
	0.5CL50	30.5	0.25	0.69	0.28	0.13:0.43	0.3-0.7	Sinergismo
	0.25CL50	15.25	0.125	0.55	0.57	0.08:1.06	0.90-1.10	Aditividad
	4CL50	244	0.667	0.79	0.37	0.23:0.51	0.3-0.7	Sinergismo
	2CL50	122	0.333	0.76	0.26	0.11:0.41	0.3-0.7	Sinergismo
3:1	1CL50	61	0.167	0.71	0.25	0.02:0.47	0.3-0.7	Sinergismo
	0.5CL50	30.5	0.083	0.63	0.20	0.05:0.36	0.3-0.7	Sinergismo
	0.25CL50	15.25	0.042	0.50	0.51	0.11:0.92	0.90-1.10	Aditividad
	4CL50	244	0.4	0.77	0.27	0.17:0.37	0.3-0.7	Sinergismo
	2CL50	122	0.2	0.76	0.14	0.10:0.17	0.1-0.3	Fuerte Sinergismo
5:1	1CL50	61	0.1	0.71	0.11	0.06:0.17	0.1-0.3	Fuerte Sinergismo
	0.5CL50	30.5	0.05	0.68	0.12	0.01:0.28	0.1-0.3	Fuerte Sinergismo
	0.25CL50	15.25	0.025	0.59	0.17	0.04:0.29	0.1-0.3	Fuerte Sinergismo

Nota. Se realizó el ensayo de CV a las 72h en LNCaP, el medio sin tratamiento fue normalizado como 0.01 y el control positivo de muerte con 100 mM de CIT como 0.99. Se realizaron tres experimentos independientes (n= 3). El análisis de ICx se realizó mediante el programa de CompuSyn (versión 1.0). Abreviaturas: citrato (CIT) docetaxel (DCT), intervalo de confianza (IC) e índice de combinación (ICx).

Tabla 13

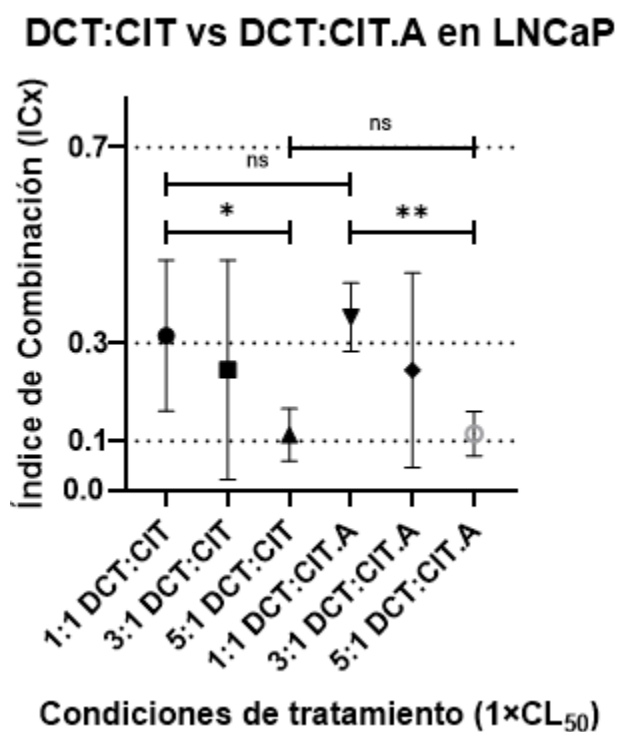
Índices de combinación DCT:CIT.ALCAR en LNCaP

Razón	Grupo	Dosis DCT [nM]	Dosis CIT [mM]	Efecto	ICx	IC 95%	Rango de ICx	Descripción
	4CL50	244	2	0.81	0.81	0.64:0.99	0.90-1.10	Aditividad
	2CL50	122	1	0.78	0.51	0.38:0.64	0.7-0.85	Moderado Sinergismo
1:1	1CL50	61	0.5	0.73	0.35	0.28:0.42	0.3-0.7	Sinergismo
	0.5CL50	30.5	0.25	0.63	0.36	0.23:0.49	0.3-0.7	Sinergismo
	0.25CL50	15.25	0.125	0.52	0.58	0.27:0.89	0.85-0.90	Ligero Sinergismo
	4CL50	244	0.667	0.75	0.51	0.30:0.72	0.7-0.85	Moderado Sinergismo
	2CL50	122	0.333	0.78	0.21	0.13:0.29	0.1-0.3	Fuerte Sinergismo
3:1	1CL50	61	0.167	0.70	0.24	0.05:0.44	0.3-0.7	Sinergismo
	0.5CL50	30.5	0.083	0.61	0.41	0.01:0.81	0.7-0.85	Moderado Sinergismo
	0.25CL50	15.25	0.042	0.47	0.76	0.01:1.81	1.45-3.3	Antagonismo
	4CL50	244	0.4	0.78	0.27	0.16:0.37	0.3-0.7	Sinergismo
	2CL50	122	0.2	0.77	0.15	0.07:0.23	0.1-0.3	Fuerte Sinergismo
5:1	1CL50	61	0.1	0.72	0.11	0.07:0.16	0.1-0.3	Fuerte Sinergismo
	0.5CL50	30.5	0.05	0.64	0.11	0.04:0.18	0.1-0.3	Fuerte Sinergismo
	0.25CL50	15.25	0.025	0.58	0.16	0.03:0.28	0.1-0.3	Fuerte Sinergismo

Nota. Se realizó el ensayo de CV a las 72h en LNCaP, el medio sin tratamiento fue normalizado como 0.01 y el control positivo de muerte con 100 mM de CIT como 0.99. Se realizaron tres experimentos independientes ($n=3$). El análisis de ICx se realizó mediante el programa de CompuSyn (versión 1.0). Abreviaturas: citrato con 6 μ M de acetil-L-carnitina (CIT.A), docetaxel (DCT), intervalo de confianza (IC) e índice de combinación (ICx).

Figura 21

Comparación en índices de combinación de concentraciones equitóxicas en LNCaP

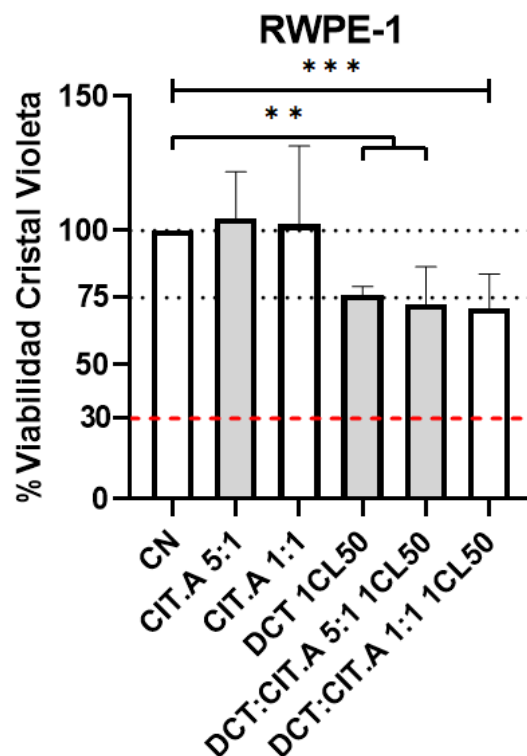


Nota. Se normalizó el medio sin tratamientos como 0.01 y el control de muerte con 100 mM de CIT como 0.99, midiendo los efectos a las 72h. Se realizaron tres experimentos independientes ($n=3$) en ambas combinaciones. El análisis estadístico se llevó a cabo con la prueba de Kruskal–Wallis y comparaciones múltiples mediante la prueba post hoc de Dunn. “ns” $p \geq 0.05$, * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$. Los datos se expresan como media $\pm$ intervalo de confianza del 95%. Las gráficas

se obtuvieron utilizando GraphPad Prism (versión 8.0). Abreviaturas: citrato (CIT), docetaxel (DCT) y citrato con 6 μ M de acetil-L-carnitina (CIT.A).

6.9 Curvas dosis-respuesta RWPE1

Una vez encontramos las combinaciones más promisorias a nivel equitóxico, se aplicaron en las células RWPE-1 y se evaluó la citotoxicidad mediante el ensayo de CV. Tanto DCT como las combinaciones, redujeron hasta un 25% de la viabilidad en las células RWPE-1. En contraste, estas mismas combinaciones disminuyeron aproximadamente un 70% de la viabilidad en PC3 y LNCaP (Figura 22).

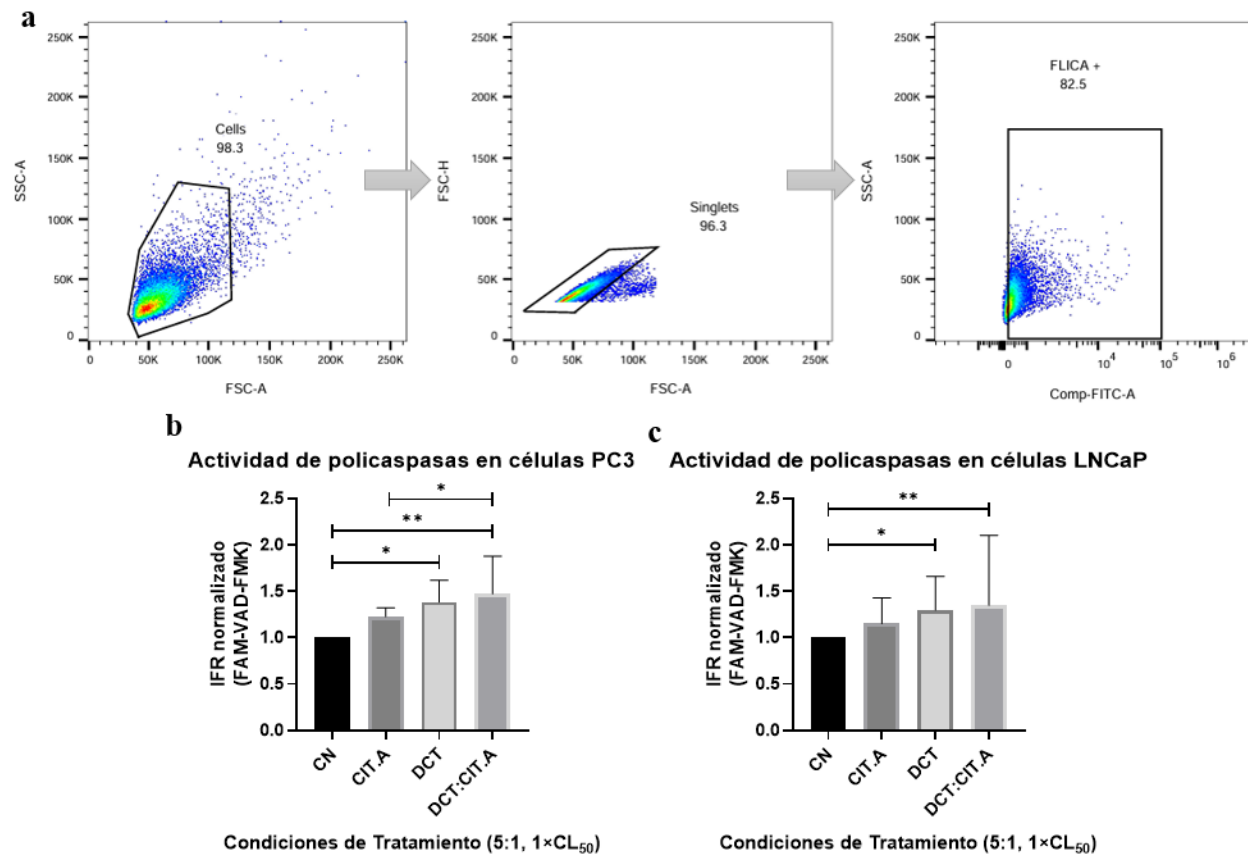
Figura 22*Efecto de las combinaciones seleccionadas en células RWPE-1*

Nota. Se aplicaron las concentraciones más prometedoras (razones 1:1 y 5:1 a 1 x CL50) previamente evaluadas en las células LNCaP y PC3. La línea punteada roja indica el 30 % de viabilidad, equivalente al menor efecto presentado de las combinaciones en PC3 y LNCaP. Para cada combinación se utilizó la concentración más alta determinada entre ambas líneas celulares. Se normalizó el medio sin tratamientos como control de viabilidad (100%) y 100 mM de CIT como control de muerte (0%). Los efectos se midieron a las 72h mediante ensayo de CV. Los datos se expresaron como media $\pm$ IC95% del análisis de tres experimentos independientes ($n = 3$), con significancia estadística **: $p < 0.002$; ***: $p < 0.0002$ (Test Kruskal-Wallis con comparación entre cada grupo junto a un pos test de comparación múltiple de Dunn's). Las gráficas fueron obtenidas con GraphPad Prism (versión 8.0). Abreviaturas: control sin tratamiento (CN), citrato

(CIT), acetil-L-carnitina (ALCAR), citrato suplementado con 6 μ M de ALCAR (CIT.A), docetaxel (DCT), cristal violeta (CV), concentración letal 50 (CL50) e intervalo de confianza del 95% (IC95%).

6.10 Evaluación de apoptosis pancaspasas FAM-FLICA

En las combinaciones más prometedoras, a concentraciones equitóxicas, se evaluó la actividad de caspasas, correlacionando la disminución de la viabilidad celular con la inducción de apoptosis global. En la (figura 23a) se describe el proceso de análisis de regiones de citometría de flujo, definiendo los singletes y se cuantificaron los niveles de FLICA+. Debido a la limitación del reactivo FAM-FLICA, se empleó la combinación DCT:CIT.A como representante de las combinaciones, dado que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre DCT:CIT y DCT:CIT.A a razón 5:1, 1xCL50 en ambas líneas celulares (Figura 20 y 21). Se observó un aumento estadísticamente significativo en los niveles de caspasas activas de la combinación DCT:CIT.A tanto en PC3 como en LNCaP, en comparación con el control sin tratamiento (Figura 23b,c). Así mismo, DCT también presentó un incremento significativo, aunque menos pronunciado en ambas líneas celulares, mientras que CIT no generó cambios, lo cual se correlaciona con el uso de una quinta parte de su CL50.

Figura 23*Cuantificación de apoptosis mediado por caspasas en PC3 y LNCaP*

Nota. (a) análisis por regiones en citometría de flujo, (b) actividad de poli caspasas en células PC3 y (c) actividad de poli caspasas en células LNCaP. Cuantificación de la actividad de las policaspasas 1 a 9 mediante la sonda FAM-VAD-FMK, se evaluaron las condiciones de razón 5:1, a 1 x CL₅₀. La intensidad de fluorescencia relativa (IFR) se normalizó frente al CN. Los datos están expresados como la mediana ± IC95% de 5 experimentos independientes para PC3 y LNCaP (n = 5), con significancia estadística *: p < 0.05; **: p < 0.01 (Test de Friedman junto a un post test de comparación múltiple de Dunn ajustado con BKY). Las gráficas fueron obtenidas con GraphPad Prism (versión 8.0). Abreviaturas: control sin tratamiento (CN), citrato (CIT), acetil-L-carnitina (ALCAR), citrato suplementado con 6 μM de ALCAR (CIT.A), docetaxel (DCT),

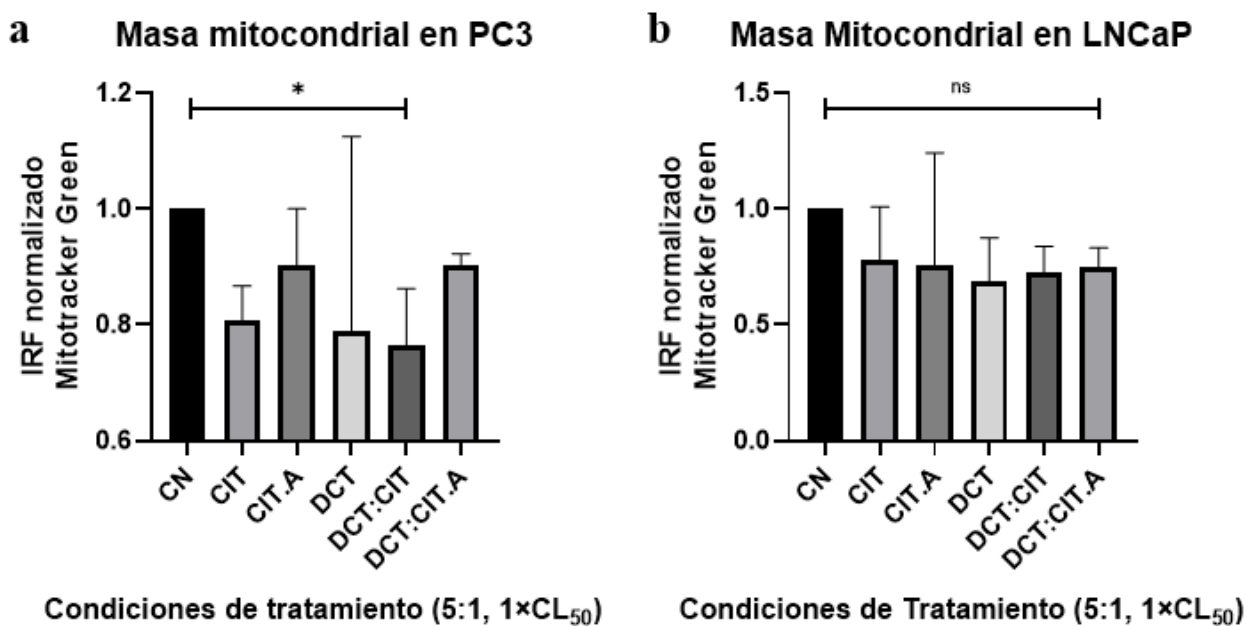
intensidad de fluorescencia relativa (IFR) concentración letal 50 (CL50) e intervalo de confianza del 95% (IC95%).

6.11 Evaluación de masa mitocondrial

La masa mitocondrial fue evaluada a las 48h posteriores a la aplicación de los tratamientos más prometedores a concentraciones equitóxicas, mediante la sonda MitoTracker Green. Se observó una disminución global de la masa mitocondrial; sin embargo, sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la combinación DCT:CIT en PC3 respecto al CN (Figura 24a), mientras que en LNCaP no se evidenciaron diferencias (Figura 24b).

Figura 24

Medición de masa mitocondrial en PC3 y LNCaP



Nota. (a) masa mitocondrial en PC3 y (b) masa mitocondrial en LNCaP. Cuantificación de la masa mitocondrial mediante la sonda Mitotracker Green, se evaluaron las condiciones de razón 5:1, a 1

x CL50. La IFR se normalizó frente al CN. Los datos están expresados como la mediana $\pm$ IC95% de tres experimentos independientes para PC3 y cuatro experimentos independientes para LNCaP (n= 3 a 4), con significancia estadística ns: $p \geq 0.05$; *: $p < 0.05$ (Test de Friedman junto a un post test de comparación múltiple de Dunn ajustado con BKY). Las gráficas fueron obtenidas con GraphPad Prism (versión 8.0). Abreviaturas: control sin tratamiento (CN), citrato (CIT), citrato suplementado con 6 μ M de acetyl-L-carnitina (CIT.A), docetaxel (DCT), intensidad de fluorescencia relativa (IFR) concentración letal 50 (CL50) e intervalo de confianza del 95% (IC95%).

6.12 Evaluación enzimas antioxidantes

Las determinaciones de los marcadores de estrés oxidante se realizaron a partir de la extracción de proteínas de las células cancerosas tras la aplicación de los tratamientos más promisorios. En todas las extracciones se cuantificaron los niveles de proteínas totales mediante la técnica de Bradford. Simultáneamente, se construyeron las respectivas curvas de estándar para la medición de GSH total, CAT y SOD, normalizando las concentraciones obtenidas como nivel enzimático por mg de proteína total.

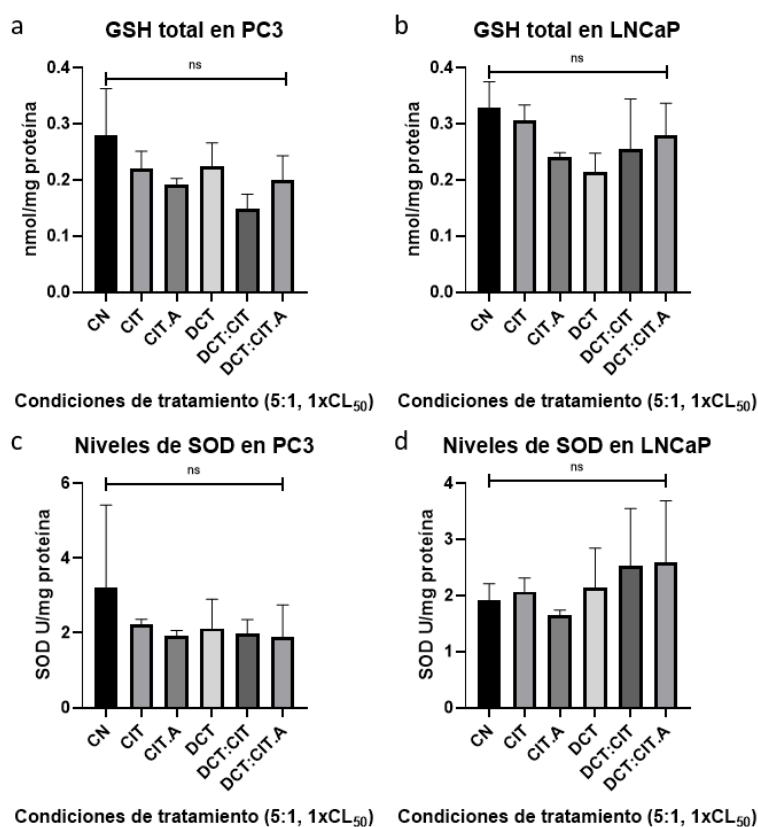
No se observan diferencias entre los grupos de tratamientos en los niveles de GSH total, tanto en PC3 como en LNCaP (Figura 25a,b). Este mismo efecto se evidenció en la medición de SOD (Figura 25c,d).

En el ensayo de actividad enzimática de CAT, las mediciones se realizaron en un periodo no mayor a 30 s, debido a su alta actividad catalítica. Se evaluaron intervalos de actividades enzimáticas de 0-15, 15-30 y 0-30 s. En PC3, se observó una disminución estadísticamente significativa en todos los intervalos (Figura 26a-c), siendo más pronunciada en las combinaciones

DCT:CIT y DCT:CIT.A, que presentaron los niveles más bajos en comparación con el control. Las mediciones en 15-30 y 0-30 s permitieron distinguir adecuadamente las tendencias globales, mostrando una disminución de la actividad enzimática en ambas combinaciones y en DCT frente a CN, CIT y CIT.A (Figura 26c,d). En LNCaP no se observaron diferencias en los tratamientos (Figura 26d-f).

Figura 25

Medición de GSH total y SOD en PC3 y LNCaP

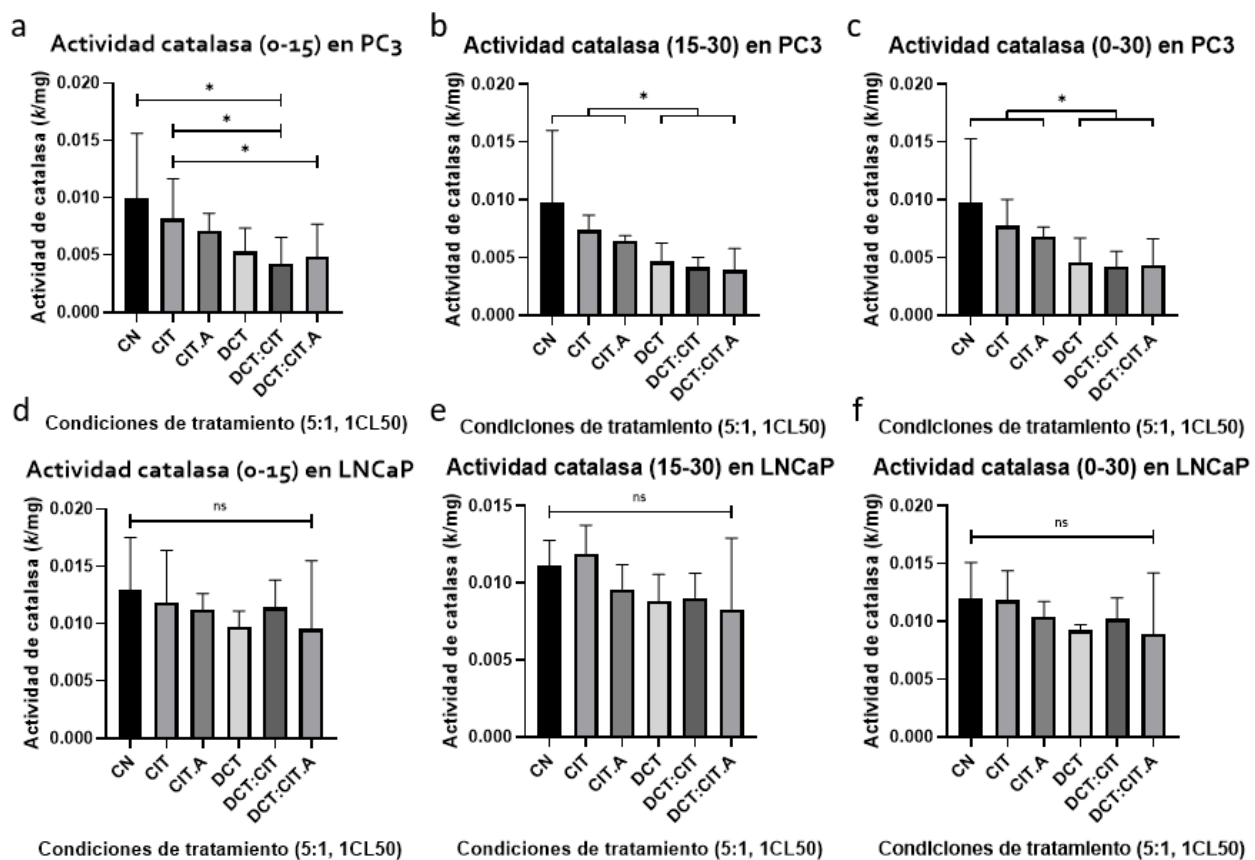


Nota. (a) GSH total en PC3, (b) GSH total en LNCaP, (c) niveles de SOD en PC3 y (d) niveles de SOD en LNCaP. Cuantificación del glutatión total mediante el protocolo de Rahman y SOD por Oberley, se evaluaron las condiciones de razón 5:1, a 1 x CL₅₀ y los principios activos de forma independiente. La actividad enzimática se normalizó frente a los mg de proteína total. Los datos

están expresados como la media $\pm$ SD de tres experimentos independientes para PC3 y LNCaP ($n=3$), con significancia estadística ns: $p \geq 0.05$ (ANOVA de medidas repetidas con post test de comparación múltiple de Tukey). Las gráficas fueron obtenidas con GraphPad Prism (versión 8.0). Abreviaturas: control sin tratamiento (CN), citrato (CIT), citrato suplementado con 6 μ M de acetyl-L-carnitina (CIT.A), docetaxel (DCT), super óxido dismutasa (SOD), glutatión reducido (GSH), concentración letal 50 (CL50) y desviación estándar (SD).

Figura 26

Medición de actividad de catalasa en PC3 y LNCaP

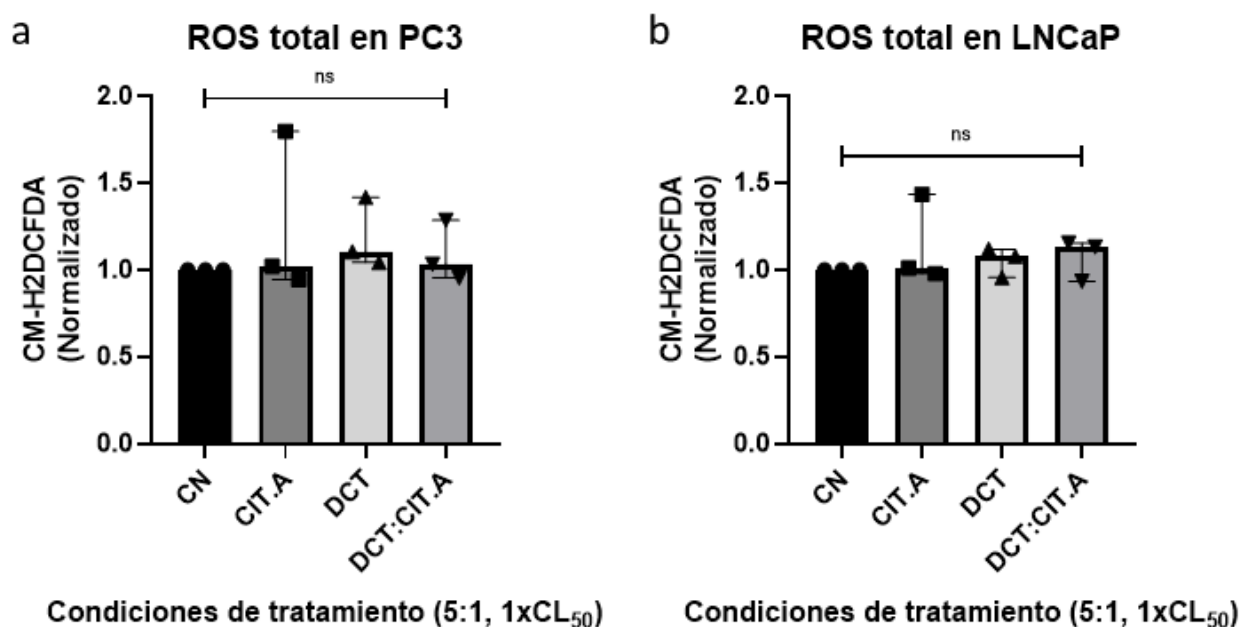


Nota. (a) actividad de CAT de 0-15 s, (b) 15-30 s y (c) 0-30 s en PC3. (d) actividad de CAT de 0-15 s, (e) 15-30 s y (f) 0-30 s en LNCaP. Cuantificación de la CAT mediante el protocolo de Aebi,

se evaluaron las condiciones de razón 5:1, a 1 x CL50 y los principios activos de forma independiente. La actividad enzimática se normalizó frente a los mg de proteína total. Los datos están expresados como la media $\pm$ SD de tres experimentos independientes para PC3 y LNCaP (n= 3), con significancia estadística ns: $p \geq 0.05$ y *: $p < 0.05$ (ANOVA de medidas repetidas con post test de comparación múltiple de Tukey). Las gráficas fueron obtenidas con GraphPad Prism (versión 8.0). Abreviaturas: control sin tratamiento (CN), citrato (CIT), citrato suplementado con 6 μ M de acetyl-L-carnitina (CIT.A), docetaxel (DCT), catalasa (CAT), concentración letal 50 (CL50) y desviación estándar (SD).

6.13 Evaluación de ERO total

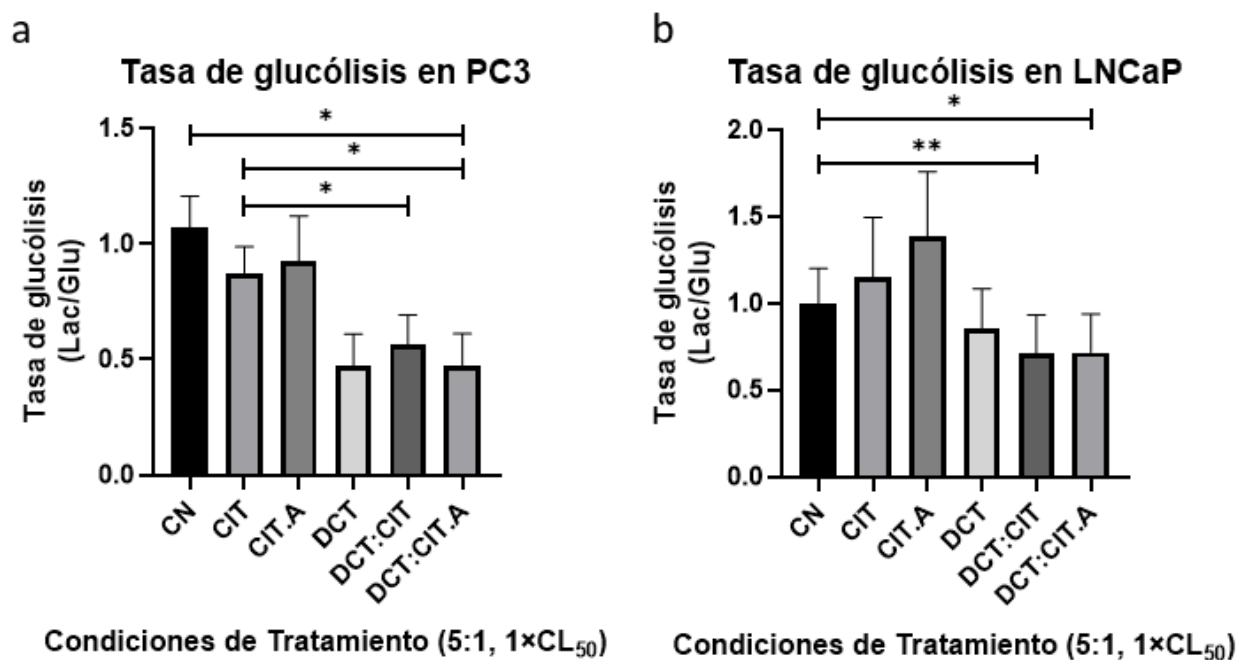
Los niveles de ERO totales se cuantificaron mediante la sonda fluorescente CM-H2DCFDA a las 48 h posteriores al tratamiento con las combinaciones más promisorias e individuales. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en las líneas celulares PC3 y LNCaP (Figura 27a,b).

Figura 27*Medición de ERO total en PC3 y LNCaP*

Nota. (a) ROS total en PC3 y (b) ROS total en LNCaP. Se midió las ROS mediante la sonda CM-H2DCFDA normalizado a concentración de proteínas totales. Se evaluaron las condiciones de razón 5:1, a 1 x CL₅₀ y los principios activos de forma independiente. Los datos están expresados como la mediana $\pm$ IC95% de tres experimentos independientes para PC3 y LNCaP ($n = 3$), con significancia estadística ns: $p \geq 0.05$ (Test de Friedman junto a un post test de comparación múltiple de Dunn ajustado con BKY). Las gráficas fueron obtenidas con GraphPad Prism (versión 8.0). Abreviaturas: control sin tratamiento (CN), citrato (CIT), citrato suplementado con 6 μ M de acetyl-L-carnitina (CIT.A), docetaxel (DCT), especies reactivas de oxígeno (ERO), concentración letal 50 (CL₅₀) e intervalo de confianza del 95% (IC).

6.14 Determinación de tasa de glucólisis

La tasa de glucólisis se calculó a partir de la relación de lactato/glucosa, determinada mediante los kits MAK064 y GAGO20. La medición se realizó a partir del medio de cultivo tras 48 h de tratamiento con las combinaciones más promisorias. Los datos se transformaron a una misma unidad de concentración del analito (nmol/ μ L) para calcular la razón lactato/glucosa (Lac/Glu). Se observó una disminución estadísticamente significativa de la razón Lac/Glu en las combinaciones respecto a las células sin tratar (CN) en ambas líneas celulares. En PC3, la combinación DCT:CIT.A presentó una disminución significativa frente al CN y la combinación DCT:CIT mostró diferencias significativas frente a CN y CIT (Figura 28a). En LNCaP, ambas combinaciones (DCT:CIT y DCT:CIT.A) exhibieron una disminución significativa en comparación con el CN (Figura 28b).

Figura 28*Medición de tasa de glucólisis en PC3 y LNCaP*

Nota. (a) tasa de glucólisis en PC3, (b) tasa de glucólisis en LNCaP. Se midió el lactato y la glucosa utilizando el kita MAK064 y GAGO20, respectivamente. Se evaluaron las condiciones de razón 5:1, a 1 x CL50 y los principios activos de forma independiente. Los datos están expresados como la media $\pm$ EEM de tres experimentos independientes para PC3 y LNCaP ($n = 3$), con significancia estadística *: $p < 0.05$ y **: $p < 0.01$ (ANOVA de medidas repetidas con post test de comparación múltiple de Tukey). Las gráficas fueron obtenidas con GraphPad Prism (versión 8.0). Abreviaturas: control sin tratamiento (CN), citrato (CIT), citrato suplementado con 6 μ M de acetyl-L-carnitina (CIT.A), docetaxel (DCT), lactato (Lac), glucosa (Glu), concentración letal 50 (CL50) y error estándar de la media (EEM).

7. Discusión

El reposicionamiento de fármacos se ha planteado como una estrategia terapéutica prometedora para identificar nuevas aplicaciones de medicamentos ya existentes, más allá de sus indicaciones originales. Esta aproximación, al aprovechar el conocimiento farmacológico disponible, junto con los datos clínicos existentes, permiten acelerar el desarrollo de nuevas terapias, en nuestro caso, dirigidas al cáncer (69). Bajo este principio, el uso de la terapia combinada del CIT y ALCAR, en conjunto con DCT, fue un enfoque promisorio para la búsqueda de nuevas alternativas quimioterapéuticas.

Al evaluar los efectos de cada fármaco o principio activo de manera independiente, encontramos que las CL₅₀ de DCT para las líneas cancerosas PC3 y LNCaP estuvieron por debajo de los niveles farmacocinéticos reportados en la literatura. Dichos valores corresponden a una concentración plasmática máxima (C_{max}) de $5.026 \pm 1.708 \mu\text{M}$ en pacientes con tumores sólidos menores de 65 años, y de $4.382 \pm 1.956 \mu\text{M}$ en pacientes de 65 años o más, bajo la dosis aprobada de 75 mg/m² empleada en Colombia (Tabla 7.) (70). No obstante, al comparar los efectos reportados de DCT de manera independiente en ambas líneas celulares, se evidenció una amplia variabilidad en los valores de CL₅₀, que oscilaron desde 0.2 nM (66,71,72,73,74) hasta valores superiores a la C_{max} reportada, como 18 μM (75,76). Entre las características que podrían explicar esta alta variabilidad se incluyen las diferencias en las casas comerciales de los compuestos, los solventes empleados y el tiempo de exposición utilizado en los ensayos (24-72 h)

En este estudio, las CL₅₀ del CIT se encontraron por debajo de 1 mM (Tabla 6). En contraste, se ha reportado en la literatura valores de CL₅₀ de 2mM en PC3 y de entre 2 y 3 mM

en LNCaP (77). Asimismo, diversos estudios han descrito que el CIT, a concentraciones superiores a 10 mM, ejerce efectos antitumorales *in vitro* en una amplia variedad de líneas tumorales. Entre los mecanismos reportados se incluyen la inducción de muerte celular, la reducción del tamaño tumoral, la inhibición de la proliferación, el arresto del ciclo celular e incluso la potenciación de los efectos de otros quimioterapéuticos como el cisplatino. Estos hallazgos se han documentado en múltiples tipos de modelos celulares tumorales, como mesotelioma, melanoma, adenocarcinomas, cáncer gástrico, neuroblastoma, cáncer de pulmón, glioblastoma, cáncer de ovario, leucemia monocítica aguda, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer orofaríngeo, fibrosarcoma y cáncer de próstata (12). Las CL50 del CIT reportadas en este estudio están por debajo de 1 mM (Tabla 6). En conjunto, estos hallazgos sugieren que el CIT presenta un efecto citotóxico más pronunciado a lo reportado en la literatura, lo que plantea interrogantes sobre se equivalencia citotóxica con otras marcas comerciales o presentaciones del principio activo. Asimismo, al comparar la farmacocinética del CIT reportada en pacientes tratados, las CL50 encontradas en este estudio están por debajo de la Cmax reportada “ 1.01 ± 0.39 mM” (78). Este hallazgo es promisorio para su uso como terapia de reposicionamiento de fármacos, ya que demuestra que el CIT no sólo disminuye la viabilidad, sino que los realiza a concentraciones plausibles desde el punto de vista farmacocinético.

No se observaron efectos citotóxicos con ALCAR en PC3 y LNCaP (Figura 13 y 14). En la literatura se ha reportado una CL50 de 10 mM a las 72h en ambas líneas celulares (15); esta discrepancia podría atribuirse a diferencias entre casas comerciales o al tipo de solvente empleado. El reactivo puede resuspenderse en agua o en DMSO puro; aun así, al evaluar ALCAR disuelto en DMSO, observamos efectos equiparables a una CL50 de 10 mM a las 72h, los cuales fueron finalmente atribuidos al DMSO (Figura 15 y 16). Asimismo, la farmacocinética descrita en

pacientes en tratamiento con ALCAR reporta una C_{max} de 4-6 μM (68), que en concentraciones clínicamente plausibles no son agentes citotóxicos por sí mismo. Con base a esta información, formulamos un nuevo principio activo con CIT y 6 μM de ALCAR, con el propósito de determinar si esta combinación potencia los efectos de quimiosensibilización a DCT.

Las combinaciones farmacológicas evaluadas fueron utilizando las proporciones de DCT:CIT y DCT:CIT.A a razones 5:1, 3:1 y 1:1; donde se obtuvieron efectos sinérgicos significativos en la mayoría de las combinaciones (Tabla 10 a 13), con una muy fuerte sinergia a razón de 5:1 en las líneas celulares cancerosas (Figura 20 y 21). A su vez, al evaluar estas combinaciones en el modelo celular histológicamente normal RWPE-1, se observaron efectos citotóxicos limitados (Figura 22). Esta sinergia marcada podría atribuirse al efecto del CIT sobre metabolismo glucolítico característicos de las células de CP. La inhibición de las enzimas fosfofructoquinasa y hexoquinasa II por parte del CIT induciría la quimiosensibilización frente a la coterapia con DCT, potenciado al efecto citotóxico global de la combinación. (79,80). Asimismo, el efecto citotóxico limitado de las combinaciones a las RWPE-1 podría atribuirse a la naturaleza de las células de próstata normal de la zona periférica, que por condiciones fisiológicas propias del tejido prostático mantienen altas concentraciones de CIT (13.000 nmol/g) (81).

En las combinaciones más promisorias empleadas a concentraciones equitóxicas (1CL50), se evaluó la inducción de muerte celular mediante la sonda FAM-VAD-FMK, un marcador fluorescente dirigido a caspasas activas. Debido a las limitaciones asociadas al uso de esta sonda, el análisis de apoptosis se realizó únicamente en las combinaciones DCT:CIT.A. En estas se observó un aumento estadísticamente significativo de las caspasas activas (Figura 23). Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas previamente entre las combinaciones DCT:CIT frente a DCT:CIT.A a 1CL50 en ambas líneas tumorales (Figura 20 y

Figura 21). Por otra parte, la principal limitación de la sonda en su alta afinidad por caspasas activas, no únicamente caspasas 3 y 7, indicativas de apoptosis intrínseca. Aunque, los mecanismos de muerte celular inducidos por CIT y DCT en el CP han sido descritos, esta medición requiere mayor precisión (80,82). Adicionalmente, el uso exclusivo de caspasas activas solo permite identificar etapas tempranas del proceso apoptótico. Por ello, se sugiere complementar el análisis de muerte celular con otras técnicas que permitan evaluar fases tardías, como la medición de fragmentación de ADN o la alteración de la integridad de la membrana celular.

La reducción diferencial de la masa mitocondrial observada en PC3 bajo las combinaciones DCT:CIT (Figura 24) podría atribuirse a un efecto directo del proceso apoptótico, desencadenando mecanismos de mitofagia como respuesta adaptativa al estrés oxidante (58). Sin embargo, al emplear la sonda fluorescente sensible a ERO CM-H2DCFDA, no se detectaron diferencias significativas en la producción global de ERO (Figura 27). Esto sugiere que los cambios mitocondriales observados podrían no estar mediados por un aumento generalizado del ERO, sino por alteraciones específicas a nivel mitocondrial. En este sentido, se recomienda complementar los análisis con sondas dirigidas a ROS mitocondrial MitoSOX Red, así como la evaluación del potencial de membrana mitocondrial JC-1, con el fin de dilucidar con mayor precisión los mecanismos implicados en la disfunción mitocondrial inducida por las combinaciones farmacológicas en PC3. En concordancia con estos planteamientos, Tramontano y colaboradores (2019), han descrito mecanismos de resistencias de PC3 asociados a la exposición elevada al CIT, caracterizados por una reducción en la producción de ROS total, acompañada con la acumulación dirigida hacia el ROS mitocondrial, junto con una sobrerregulación de la autofagia (40), lo que podría explicar parcialmente la adaptación celular frente al estrés oxidante inducido.

Las moléculas asociadas a la respuesta frente al estrés oxidante son esenciales en las células cancerosas, ya que les permite contrarrestar el daño oxidante inducido por agentes quimioterapéuticos, manteniendo un equilibrio dinámico entre el daño celular y los mecanismos de recuperación (83). Al evaluar los estados de apoptosis inducidos por las combinaciones más promisorias, se analizaron las principales enzimas antioxidante SOD, CAT y el tripéptido de glutatión total, con el fin de determinar la respuesta al estrés oxidante. No obstante, no se observaron diferencias en los niveles de SOD y GSH total en ambas líneas cancerosas (Figura 25); por el contrario, se observó una disminución estadísticamente significativa de la actividad enzimática de la CAT en PC3 (Figura 26). Estos resultados son relevantes debido al efecto potenciado observado en modelos de CPRC, en los cuales la respuesta antioxidante se manifestó principalmente a nivel de la enzima CAT (84). Se ha reportado que niveles elevados de CAT ejercen un efecto protector frente al estrés oxidante mediado por H_2O_2 , mientras que su disminución se asocia con un incremento de la apoptosis en diversos tipos de cáncer, incluidos el gástrico, mamario y ovárico (85,86). En consonancia con Giginis y colaboradores (2023), La CAT y la inducción del H_2O_2 han sido propuestas como blancos terapéuticos promisorios en el tratamiento de CPRC, al evidenciar una sensibilidad específica a la apoptosis mediado por H_2O_2 , junto con una reducción en la masa tumoral y en la migración celular derivadas de la depresión de la CAT en PC3 (84).

El efecto más destacado de las combinaciones DCT:CIT y DCT:CIT.A fue su capacidad de inducir una disminución significativa de la tasa de glucólisis (Lac/Glc) en ambas líneas cancerosas, observándose un efecto potenciado en PC3, modelo caracterizado por su alta dependencia a la glucólisis (Figura 28). En la literatura se ha reportado que tanto DCT como CIT reducen la actividad glucolítica (58,80,87); sin embargo, las concentraciones de CIT utilizadas en

las combinaciones 5:1 no mostraron diferencias significativas por sí solas en comparación a los controles sin tratamiento, aunque sí potenciaron los efectos cuando se administraron en combinación.

En conjunto, las combinaciones a razón 5:1 en concentraciones equimolares demostraron un efecto consistente sobre distintos parámetros celulares, evidenciado una reducción en la masa mitocondrial, una disminución en la actividad enzimática de CAT en PC3 y una caída significativa en la tasa de glucólisis, además de la inducción de apoptosis y de efectos citotóxicos en ambas líneas cancerosas. Estos hallazgos sugieren un efecto metabólico y proapoptótico sinérgico, particularmente pronunciado en los modelos de CPRC.

8. Conclusiones

Este estudio demostró que la combinación de CIT con DCT, tanto en presencia como en ausencia de ALCAR, presentan una capacidad significativa de quimiosensibilización en modelos celulares de CP avanzado y CPRC. A su vez, estas combinaciones exhibieron interacciones fuertemente sinérgicas, con predominancia a razón 5:1, bajo condiciones equitóxicas y por debajo de las C_{max} reportadas en cada principio activo, asociadas con una marcada reducción de la viabilidad celular y alteraciones funcionales y metabólicas relevantes en las células tumorales, sin inducir efectos citotóxicos significativos en las células prostáticas no tumorales RWPE-1. No obstante, la ALCAR no mostró un efecto citotóxico individual, por lo que no fue posible evaluar de manera aislada su interacción con el quimioterapéutico.

La apoptosis fue caracterizada en las líneas celulares PC3 y LNCaP mediante la evaluación de caspasas activas, evidenciando que las combinaciones farmacológicas más promisorias indujeron un marcado efecto proapoptótico. En particular, la combinación DCT:CIT.ALCAR a razón 5:1 y a 1xCL50 produjo el mayor aumento de apoptosis, siendo este efecto más pronunciado en la línea celular PC3.

Con este estudio se concluyó que las combinaciones farmacológicas en las células tumorales disminuyen la tasa de glucólisis en ambas líneas celulares, con un efecto predominante en la línea PC3. Adicionalmente, solo se evidenció una disminución de la masa mitocondrial y de la actividad enzimática de la CAT en PC3, sin observarse diferencias significativas en los niveles de ERO total, glutatión y SOD.

9. Recomendaciones

Considerando la disminución de la actividad enzimática de la CAT y la reducción de la masa mitocondrial en PC3, se recomienda evaluar específicamente las ERO mitocondriales, así como otros marcadores mitocondriales más específicos como el potencial de membrana y el consumo de oxígeno, con el fin de caracterizar los mecanismos mediante los cuales las combinaciones afectan a las células tumorales.

Para fortalecer los resultados obtenidos en esta tesis, es necesario realizar estudios en los que se evalúe el perfil transcripcional y metabólico modulado por las combinaciones más promisorias, así como las vías que activa el CIT y el CIT formulado con ALCAR. Adicionalmente,

es imperativo el determinar si en estudios en modelos experimentales de animales, los efectos biológicos observados *in vitro* de las combinaciones se mantienen. Siendo un paso crucial previo a la implementación en la fase preclínica, junto con la debida formulación y presentación de los componentes.

Referencias Bibliográficas

1. Organization WH. Global Cancer Observatory. 2024;2022:2024–5.
2. Rawla P. Epidemiology of Prostate Cancer. World J Oncol [Internet]. 2019;10(2):63–89. Disponible en: <http://www.wjon.org/index.php/WJON/article/view/1191>
3. Colombia SG de SS en S–. Guía de práctica clínica (GPC) para la detección temprana, diagnóstico, tratamiento, seguimiento y rehabilitación del cáncer de próstata [Internet]. Sistema General de Seguridad Social en Salud – Colombia. 2013. 48 p. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/INEC/IETS/Cancer-prostata-fina-Prof-Salud.pdf>
4. ONS. Estimación de la carga de la enfermedad por Diabetes Mellitus en Colombia 2010-2014. Carga la Enferm por Enferm Cron no Transm y Discapac en Colomb. 2015;110–8.
5. Institute for Health Metrics and Evaluation [Internet]. Global Burden of Disease Collaborative Network. 2019 [citado el 7 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://vizhub.healthdata.org/gbd-results/>
6. Rebello RJ, Oing C, Knudsen KE, Loeb S, Johnson DC, Reiter RE, et al. Prostate cancer. Nat Rev Dis Prim [Internet]. 2021;7(1). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/s41572-020-00243-0>
7. De Paredes Esteban JCG, Del Rey EJA, Díez RA. Docetaxel in hormone-sensitive advanced prostate cancer; GENESIS-SEFH evaluation report. Farm Hosp. 2017;41(4):550–8.
8. Schweizer M, Antonarakis ES. Chemotherapy and its evolving role in the management of advanced prostate cancer. Asian J Androl. 2014;16(3):334–40.

9. Sandhu S, Moore CM, Chiong E, Beltran H, Bristow RG, Williams SG. Prostate cancer. *Lancet* [Internet]. 2021;398(10305):1075–90. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00950-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00950-8)
10. Martin SK, Kyprianou N. Exploitation of the Androgen Receptor to Overcome Taxane Resistance in Advanced Prostate Cancer [Internet]. 1a ed. Vol. 127, *Advances in Cancer Research*. Elsevier Inc.; 2015. 123–158 p. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.acr.2015.03.001>
11. Al-Batran SE, Hozaeel W, Tauchert FK, Hofheinz RD, Hinke A, Windemuth-Kieselbach C, et al. The impact of docetaxel-related toxicities on health-related quality of life in patients with metastatic cancer (QoliTax). *Ann Oncol* [Internet]. 2015;26(6):1244–8. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv129>
12. Icard P, Coquerel A, Wu Z, Gligorov J, Fuks D, Fournel L, et al. Understanding the central role of citrate in the metabolism of cancer cells and tumors: An update. *Int J Mol Sci*. 2021;22(12):1–19.
13. Giskeødegård GF, Bertilsson H, Selnæs KM, Wright AJ, Bathen TF, Viset T, et al. Spermine and Citrate as Metabolic Biomarkers for Assessing Prostate Cancer Aggressiveness. *PLoS One*. 2013;8(4):1–9.
14. Huang L, Wang C, Xu H, Peng G. Targeting citrate as a novel therapeutic strategy in cancer treatment. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* [Internet]. 2020;1873(1):188332. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.188332>
15. Baci D, Bruno A, Cascini C, Gallazzi M, Mortara L, Sessa F, et al. Acetyl-L-Carnitine downregulates invasion (CXCR4/CXCL12, MMP-9) and angiogenesis (VEGF, CXCL8) pathways in prostate cancer cells: rationale for prevention and interception strategies. *J Exp*

- Clin Cancer Res. 2019;38(1):1–17.
16. Pisano C, Pratesi G, Laccabue D, Zunino F, Giudice P Lo, Bellucci A, et al. Paclitaxel and Cisplatin-Induced Neurotoxicity: A Protective Role of Acetyl-L-Carnitine. Clin Cancer Res. 2003;9(15):5756–67.
 17. Maestri A, De Pasquale Ceratti A, Cundari S, Zanna C, Cortesi E, Crinò L. A pilot study on the effect of acetyl-L-carnitine in paclitaxel-and cisplatin-induced peripheral neuropathy. Tumori. 2005;91(2):135–8.
 18. Pushpakom S, Iorio F, Eyers PA, Escott KJ, Hopper S, Wells A, et al. Drug repurposing: Progress, challenges and recommendations. Nat Rev Drug Discov. 2018;18(1):41–58.
 19. Osakwe O, Rizvi SAA. Social aspects of drug discovery, development and commercialization. Social Aspects of Drug Discovery, Development and Commercialization. 2016. 1–324 p.
 20. Drew DA, Chan AT. Aspirin in the Prevention of Colorectal Neoplasia. Annu Rev Med. 2021;72(4):415–30.
 21. Ho MY, Mackey JR. Presentation and management of docetaxel-related adverse effects in patients with breast cancer. Cancer Manag Res. 2014;6(1):253–9.
 22. Kierszenbaum AL, Tres LL. Organ Systems | The Reproductive System - Fertilization, Placentation and Lactation. Vol. 1, Histology and Cell Biology - An Introduction to Pathology. 2020. 773–774 p.
 23. Rashighi M, Harris JE. The Intermediary Metabolism of the Prostate: A Key to Understanding the Pathogenesis and Progression of Prostate Malignancy. Physiol Behav. 2017;176(3):139–48.
 24. Haferkamp S, Drexler K, Federlin M, Schlitt HJ, Berneburg M, Adamski J, et al.

- Extracellular Citrate Fuels Cancer Cell Metabolism and Growth. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8(December):1–11.
25. Uo T, Sprenger CC, Plymate SR. Androgen Receptor Signaling and Metabolic and Cellular Plasticity During Progression to Castration Resistant Prostate Cancer. *Front Oncol.* 2020;10(October):1–12.
26. Ritch C, Cookson M. Recent trends in the management of advanced prostate cancer [version 1; peer review: 3 approved]. *F1000Research.* 2018;7(0):1–7.
27. Amante E, Cerrato A, Alladio E, Capriotti AL, Cavaliere C, Marini F, et al. Comprehensive biomarker profiles and chemometric filtering of urinary metabolomics for effective discrimination of prostate carcinoma from benign hyperplasia. *Sci Rep [Internet].* 2022;12(1):1–14. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08435-2>
28. williams, B J. Prostate Cancer Survival in the United States by Race and Stage (2001–2009): Findings From the CONCORD-2 Study. *Physiol Behav.* 2019;176(3):139–48.
29. Lange BM, Conner CF. Taxanes and taxoids of the genus *Taxus* – A comprehensive inventory of chemical diversity. 2022;
30. Berthold DR, Pond GR, Soban F, De Wit R, Eisenberger M, Tannock IF. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer: Updated survival in the TAX 327 study. *J Clin Oncol.* 2008;26(2):242–5.
31. Walsh PC. Docetaxel and Estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. *J Urol.* 2005;173(2):457.
32. Iacobazzi V, Infantino V. Citrate-new functions for an old metabolite. *Biol Chem.* 2014;395(4):387–99.
33. Huang L, Wang C, Xu H, Peng G. Targeting citrate as a novel therapeutic strategy in cancer

- treatment. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* [Internet]. 2020;1873(1):188332. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.188332>
34. Gattas DJ, Rajbhandari D, Bradford C, Buhr H, Lo S, Bellomo R. A randomized controlled trial of regional citrate versus regional heparin anticoagulation for continuous renal replacement therapy in critically ill adults. *Crit Care Med*. 2015;43(8):1622–9.
35. Michael D. Weston. S.J. Ennam, David B. Bylund - xPharm_ The Comprehensive Pharmacology Reference. 2008;1:1–4.
36. Icard P, Poulain L, Lincet H. Understanding the central role of citrate in the metabolism of cancer cells. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* [Internet]. 2012;1825(1):111–6. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2011.10.007>
37. Braadland PR, Giskeødegård G, Sandsmark E, Bertilsson H, Euceda LR, Hansen AF, et al. Ex vivo metabolic fingerprinting identifies biomarkers predictive of prostate cancer recurrence following radical prostatectomy. *Br J Cancer*. 2017;117(11):1656–64.
38. Costello LC, Franklin RB. The clinical relevance of the metabolism of prostate cancer; zinc and tumor suppression: Connecting the dots. *Mol Cancer*. 2006;5:1–13.
39. Vellky JE, Ricke WA. Development and prevalence of castration-resistant prostate cancer subtypes. *Neoplasia (United States)* [Internet]. 2020;22(11):566–75. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.neo.2020.09.002>
40. Caiazza C, D'Agostino M, Passaro F, Faicchia D, Mallardo M, Paladino S, et al. Effects of long-term citrate treatment in the PC3 prostate cancer cell line. *Int J Mol Sci*. 2019;20(11):1–18.
41. Zhang X, Varin E, Allouche S, Yunfei L, Poulain L, Icard P. Effect of citrate on malignant pleural mesothelioma cells: A synergistic effect with cisplatin. *Anticancer Res*.

- 2009;29(4):1249–54.
42. Fan JP, Kim HS, Han GD. Induction of apoptosis by l-carnitine through regulation of two main pathways in Hepa1c1c 7 cells. *Amino Acids*. 2009;36(2):365–72.
 43. Mendelson SD. *Metabolic Syndrome and Psychiatric Illness: Interactions, Pathophysiology, Assessment, and Treatment*. San Diego; 2008.
 44. Hoppel C. The role of carnitine in normal and altered fatty acid metabolism. *Am J Kidney Dis*. 2003;41(4 SUPPL. 4):4–12.
 45. Rebouche CJ. Kinetics, pharmacokinetics, and regulation of L-Carnitine and acetyl-L-carnitine metabolism. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1033:30–41.
 46. Curran MWT, Olson J, Morhart M, Sample D, Chan KM. Acetyl-L-carnitine (ALCAR) to enhance nerve regeneration in carpal tunnel syndrome: Study protocol for a randomized, placebo-controlled trial. *Trials* [Internet]. 2016;17(1):4–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s13063-016-1324-2>
 47. Adeva-Andany MM, Carneiro-Freire N, Seco-Filgueira M, Fernández-Fernández C, Mouriño-Bayolo D. Mitochondrial β -oxidation of saturated fatty acids in humans. *Mitochondrion* [Internet]. 2019;46:73–90. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.mito.2018.02.009>
 48. Vescovo G, Ravara B, Gobbo V, Sandri M, Angelini A, Barbera M Della, et al. L-carnitine: A potential treatment for blocking apoptosis and preventing skeletal muscle myopathy in heart failure. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2002;283(3 52-3):802–10.
 49. Scatena R. Mitochondria and drugs. Vol. 942, *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2012. 329–346 p.
 50. Gogvadze V, Zhivotovsky B, Orrenius S. The Warburg effect and mitochondrial stability

- in cancer cells. *Mol Aspects Med* [Internet]. 2010;31(1):60–74. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2009.12.004>
51. Philippe I, Hubert L. The reduced concentration of citrate in cancer cells: An indicator of cancer aggressiveness and a possible therapeutic target. *Drug Resist Updat* [Internet]. 2016;29:47–53. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drug.2016.09.003>
52. Greer SN, Metcalf JL, Wang Y, Ohh M. The updated biology of hypoxia-inducible factor. *EMBO J* [Internet]. 2012;31(11):2448–60. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2012.125>
53. Semenza GL. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr Opin Genet Dev*. 2010;20(1):51–6.
54. Zhou W, Choi M, Margineantu D, Margaretha L, Hesson J, Cavanaugh C, et al. HIF1 α induced switch from bivalent to exclusively glycolytic metabolism during ESC-to-EpiSC/hESC transition. *EMBO J* [Internet]. 2012;31(9):2103–16. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2012.71>
55. ATCC. RWPE-1 [Internet]. 2025 [citado el 10 de diciembre de 2025]. Disponible en: <https://www.atcc.org/products/crl-3607>
56. ATCC. LNCaP clone FGC [Internet]. 2025 [citado el 10 de diciembre de 2025]. Disponible en: <https://www.atcc.org/products/crl-1740>
57. ATCC. PC-3 [Internet]. 2025 [citado el 10 de diciembre de 2025]. Disponible en: <https://www.atcc.org/products/crl-1435>
58. Peñata-taborda A, Espitia-pérez P, Espitia-pérez L, Coneo-pretelt A, Brango H, Ricardo-caldera D, et al. Combination of Low-Dose Sulforaphane and Docetaxel on Mitochondrial Function and Metabolic Reprogramming in Prostate Cancer Cell Lines. 2025;

59. Chou T. Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method. 2010;70(2):440–6.
60. Chou T. Theoretical Basis , Experimental Design , and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies □. 2007;
61. Revision T. Radio Immunoprecipitation Assay (RIPA) Cell Lysate Preparation. 2018;(800):2016–8.
62. Rahman I, Kode A, Biswas SK. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. 2007;1(6):3159–65.
63. Aebi H. [13] Catalase in Vitro. Methods Enzymol. 1984;105(C):121–6.
64. Oberley LW, Spitz DR. Assay of Superoxide Dismutase Activity in Tumor Tissue. 1984;2(1969):457–64.
65. Kim H, Xue X. Detection of Total Reactive Oxygen Species in Adherent Staining. 2020;(June):1–5.
66. SIGMA - ALDRICH MAK064. Lactate Assay Kit - Technical bulletin. 2014;1–4.
67. ALDRICH S-. Glucose (GO) Assay Kit - Technical bulletin GAGO20. 2019;2–4.
68. Farahzadi R, Hejazi MS, Molavi O, Pishgahzadeh E, Montazersaheb S, Jafari S. Review Article Clinical Significance of Carnitine in the Treatment of Cancer : From Traffic to the Regulation. 2023;2023.
69. Saranraj K, Kiran PU. Drug repurposing : Clinical practices and regulatory pathways. 2025;61–8.
70. Kenmotsu H, Tanigawara Y. docetaxel : Why the Japanese dose differs from the Western dose. 2015;106(5).
71. Sivaganesh V, Ta TM. Pentagalloyl Glucose (PGG) Exhibits Anti-Cancer Activity against

- Aggressive Prostate Cancer by Modulating the ROR1 Mediated AKT-GSK3 β Pathway. 2024;
72. Oblad R, Doughty H, Lawson J, Christensen M, Kenealey J. Application of Mixture Design Response Surface Methodology for Combination Chemotherapy in PC-3 Human Prostate Cancer Cells s. *Mol Pharmacol* [Internet]. 2018;94(2):907–16. Disponible en: <https://doi.org/10.1124/mol.117.111450>
 73. Iannelli F, Roca MS, Lombardi R, Ciardiello C, Grumetti L, Rienzo S De, et al. Synergistic antitumor interaction of valproic acid and simvastatin sensitizes prostate cancer to docetaxel by targeting CSCs compartment via YAP inhibition. 2020;7:1–24.
 74. Tu KJ, Roy SK, Keepers Z, Gartia MR, Shukla HD, Tu KJ, et al. Docetaxel radiosensitizes castration-resistant prostate cancer by downregulating CAV-1. *Int J Radiat Biol* [Internet]. 2024;100(2):256–67. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/09553002.2023.2263553>
 75. Zeng J, Liu W, Fan Y, He D, Li L. PrLZ increases prostate cancer docetaxel resistance by inhibiting LKB1 / AMPK-mediated autophagy. 2018;8(1).
 76. Ramezani SR, Mojra A, Tafazzoli-Shadpour M. Investigating the migration of cells with different degrees of metastasis before and after treatment with chemical drugs targeting cytoskeleton structure, steroid and androgen receptor. 2024 31st Natl 9th Int Iran Conf Biomed Eng ICBME 2024. 2024;(November):205–10.
 77. Fan X, Zhou J, Yan X, Bi X, Liang J, Lu S, et al. Citrate activates autophagic death of prostate cancer cells via downregulation CaMKII / AKT / mTOR pathway. *Life Sci* [Internet]. 2021;275(1):119355. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119355>
 78. Kramer L, Bauer E, Joukhadar C, Strobl W, Gendo A, Madl C, et al. Citrate pharmacokinetics and metabolism in cirrhotic and noncirrhotic critically ill patients. *Crit*

- Care Med. 2003;31(10):2450–5.
79. Mendiola AV, Cruz IS. Metabolismo energético y cáncer. 2014;17(2):108–13.
80. Huang L, Wang C, Xu H, Peng G, Wang C, Xu H. Targeting citrate as a novel therapeutic strategy in cancer treatment. 2019;
81. Costello LC, Franklin RB, Narayan P, Section MB. Citrate in the Diagnosis of Prostate Cancer. 2015;38(3):237–45.
82. Tamaki H, Harashima N, Hiraki M, Arichi N. Bcl-2 family inhibition sensitizes human prostate cancer cells to docetaxel and promotes unexpected apoptosis under caspase-9 inhibition. 2014;5(22).
83. Udomsak W, Kucinska M, Pospieszna J, Dams-kożłowska H, Chatuphonprasert W, Murias M. Antioxidant Enzymes in Cancer Cells : Their Role in Photodynamic Therapy Resistance and Potential as Targets for Improved Treatment Outcomes. 2024;
84. Giginis F, Wang J, Chavez A, Martins-green M. Catalase as a novel drug target for metastatic castration-resistant prostate cancer. 2023;13(6):2644–56.
85. Yang L, Zheng XL, Sun H, Zhong YJ, Wang Q, He HN, et al. Catalase suppression-mediated H₂O₂ accumulation in cancer cells by wogonin effectively blocks tumor necrosis factor-induced NF- κ B activation and sensitizes apoptosis. 2011;102(4).
86. Bechtel W, Bauer G, Virologie A, Mikrobiologie M. Catalase Protects Tumor Cells from Apoptosis Induction by Intercellular ROS Signaling. 2009;4558:4541–57.
87. Peng J, He Z, Yuan Y, Xie J, Zhou Y, Guo B, et al. Docetaxel suppressed cell proliferation through Smad3 / HIF - 1 α - mediated glycolysis in prostate cancer cells. Cell Commun Signal [Internet]. 2022;1–12. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12964-022-00950-z>