

La dieta cetogénica y Terapia de oxígeno hiperbárico prolongar la supervivencia en ratones con cáncer metastásico Sistémico

Angela M. Capilla 1*, csilla Ari 1, Thomas N. Seyfried 2, Dominic P. D'Agostino 1

1 Departamento de Farmacología Molecular y Fisiología de la Universidad del Sur de Florida, Tampa, Florida, Estados Unidos de América, 2 Departamento de Biología, Universidad de Boston, Chestnut Hill, Massachusetts, Estados Unidos de América

Resumen

Introducción: metabolismo del cáncer anormal crea un glicolítica dependencia que puede ser explotada mediante la reducción de la disponibilidad de glucosa para el tumor. La dieta cetogénica (KD) es un carbohidrato bajo, dieta grasa alta que disminuye de glucosa en sangre y eleva cetonas en sangre y se ha demostrado que la progresión del cáncer lenta en animales y humanos. vasculatura del tumor anormal crea bolsillos hipóxicas que promueven la progresión del cáncer y aumentar aún más la glicolítica dependencia de cánceres. **terapia con oxígeno hiperbárico (HBO₂ T), los tumores saturados con oxígeno, invirtiendo el promotor del cáncer, efectos de la hipoxia tumoral.** Dado que estas terapias no tóxicas explotan la superposición de las deficiencias metabólicas de cáncer, hemos probado sus efectos combinados en la progresión del cáncer en un modelo natural de la enfermedad metastásica.

Métodos: Se utilizó el modelo de luciferasa de luciérnaga-etiquetados VM-M3 ratón de cáncer metastásico de comparar la progresión tumoral y la supervivencia en ratones alimentados estándar o KD ad libitum con o sin HBO₂ T (2,5 ATM absoluto, 90 min, 3x / semana). El crecimiento tumoral se controló mediante in vivo imágenes bioluminiscentes.

resultados: KD disminuyó solo significativamente la glucosa en sangre, se redujo el crecimiento del tumor, y el aumento de tiempo medio de supervivencia de 56,7% en los ratones con cáncer metastásico sistémica. mientras HBO₂ T solo no influyó en la progresión del cáncer, la combinación de la KD con HBO₂ T provocó una disminución significativa en la glucosa en sangre, la tasa de crecimiento del tumor, y el aumento de 77,9% en el tiempo medio de supervivencia en comparación con los controles.

conclusiones: KD y HBO₂ T producen efectos significativos contra el cáncer cuando se combinan en un modelo natural del cáncer metastásico sistémica. Nuestra evidencia sugiere que estos tratamientos deben investigarse más a fondo como potenciales tratamientos no tóxicos o terapias adyuvantes para el cuidado estándar para los pacientes con enfermedad metastásica sistémica.

Citación: Capilla AM, Ari C, Seyfried TN, D'Agostino DP (2013) La dieta cetogénica y hiperbárica terapia de oxígeno prolongar la supervivencia en ratones con cáncer metastásico sistémica. PLoS ONE 8 (6): e65522. doi: 10.1371/journal.pone.0065522

Editor: Chih-Hsin Tang, China Medical University, Taiwan

Recibido 20 de diciembre de, 2012; Aceptado 2 de mayo de 2013. Publicado 5 de junio de, 2013

Derechos de autor: © 2013 Poff et al. Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons, que permite sin restricciones uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que el autor original y la fuente se acreditan.

Fondos: Este trabajo fue apoyado por la Oficina de Investigación Naval, ONR subvención N000140610105 y ONR-DURIP equipos subvención N000140210643 (<http://www.onr.navy.mil/>). Los donantes no tenía papel en el diseño del estudio, la recogida y análisis de datos, decisión a publicar, o la preparación del manuscrito.

Conflicto de intereses: Los autores han declarado que no existen conflictos de intereses.

* E-mail: abennett@health.usf.edu

Introducción

La metástasis es un fenómeno complejo en el que las células cancerosas se diseminan de un tumor primario para establecer focos en un tejido distal y es responsable de 90 por ciento de las muertes relacionadas con el cáncer [1]. Los cambios específicos que median en la metástasis no están claros; sin embargo, el proceso implica generalmente el crecimiento local del tumor, invasión a través de la membrana basal y el tejido circundante, intravasación en los vasos linfáticos o vasos sanguíneos, la difusión y la supervivencia en la circulación, la extravasación de la vasculatura, y re-establecimiento de tumores en los tejidos distales. Mientras que muchos tumores primarios se pueden controlar con las terapias convencionales como la cirugía, la quimioterapia y la radiación, estos tratamientos a menudo son ineficaces contra la enfermedad metastásica y en algunos casos pueden promover la progresión del cáncer y la metástasis [2,3,4].

Quizás el factor más importante que limita en el desarrollo de nuevos tratamientos para el cáncer metastásico es la falta de modelos animales que reflejan con precisión la verdadera naturaleza de la enfermedad metastásica. modelos de xenoinjerto de cáncer humano en ratones inmunodeficientes son

inadecuada ya que el sistema inmunológico está muy involucrado en el desarrollo y progresión del cáncer. De hecho, la mayoría de los modelos de tumores que crecen como xenoinjertos en ratones inmunocomprometidos fallan a la metástasis [5,6]. modelos de inyección en la vena de la cola de cáncer metastásico eliminan los pasos importantes de la invasión tisular local y intravasación en la vasculatura, de nuevo no representar el verdadero fenotipo de la enfermedad. El modelo VM-M3 de cáncer metastásico es una novela modelo murino que se asemeja mucho a la progresión natural de la invasión y metástasis [7,8]. El tumor VM-M3 surgió espontáneamente en el cerebro de un ratón de la VM / Dk innato de deformación y expresa múltiples características de crecimiento de glioblastoma multiforme humano con macrófagos propiedades / microgliales [7,9]. Cuando se implanta por vía subcutánea, las células VM-M3 metastatizan rápidamente a todos los sistemas de órganos principales, en particular el hígado, pulmón, riñón, bazo, cerebro y médula ósea. metástasis sistémica también se ha documentado en varias ocasiones en glioblastoma multiforme humano (GBM), que se ha relacionado con las características de macrófagos / microglial del tumor [9]. El tumor fue adaptado para el cultivo de células y se transfeció con el gen de luciferasa de luciérnaga para permitir un fácil control del crecimiento del tumor in vivo [10]. El modelo VM-M3 de

cáncer metastásico tiene una clara ventaja sobre otros modelos metastáticos porque se extiende de forma natural en un huésped inmunocompetente, imitando el microambiente del cáncer natural. El cisplatino y metotrexato, dos agentes de quimioterapia comúnmente usados, inhiben la propagación metastásica en el modelo VM-M3 de cáncer metastásico de manera similar a sus efectos en seres humanos, apoyando aún más la representación de la modelo del verdadero estado de la enfermedad [8,11,12,13]. Por estas razones, se utilizó el modelo VM-M3 de cáncer metastásico para este estudio.

metabolismo energético anormal es una característica constante de la mayoría de las células tumorales a través de todos los tipos de tejido [14]. En la década de 1930 s, Otto Warburg observó que todos los cánceres expresan altas tasas de fermentación en presencia de oxígeno [15]. Esta característica, conocida como la Warburg Effect, está vinculada a la disfunción mitocondrial y mutaciones genéticas dentro de la célula de cáncer [14,16,17]. Estos defectos causan cánceres a dependen en gran medida de la glucosa para la energía, una calidad que subyace en el uso de fluorodesoxiglucosa-PET escanea como una herramienta de diagnóstico importante para los oncólogos [18]. dietas cetogénicas son altos en grasa, las dietas bajas en carbohidratos que se han utilizado durante décadas para tratar a los pacientes con epilepsia refractaria [19]. Cetogénica dietas también suprimen el apetito, naturalmente, lo que produce una pérdida de peso corporal [19,20,21,22]. los niveles de glucosa de reducción (DER) baja sangre de energía alimentaria, limitando el suministro de energía a las células cancerosas, mientras que la elevación de los niveles circulantes de cetonas en la sangre [6]. Los cuerpos cetónicos pueden servir como una fuente de energía alternativa para aquellas células con función mitocondrial normal de [23,24], pero no para las células del cáncer [25]. DER se ha demostrado que tienen efectos anti-tumorales en una variedad de cánceres, incluyendo el cerebro, próstata, mama, páncreas, pulmón, gástrico, de colon y [14,26,27,28,29,30,31,32,33, 34]. DER produce efectos anti-cáncer a través de varias rutas metabólicas, incluyendo la inhibición de la IGF-1 / PI3K / Akt / HIF-1 próstata, mama, páncreas, pulmón, estómago y colon [14,26,27,28,29,30,31,32,33,34]. DER produce efectos anti-cáncer a través de varias rutas metabólicas, incluyendo la inhibición de la IGF-1 / PI3K / Akt / HIF-1 próstata, mama, páncreas, pulmón, estómago y colon [14,26,27,28,29,30,31,32,33,34]. DER produce efectos anti-cáncer a través de varias rutas metabólicas, **incluyendo la inhibición de la IGF-1 / PI3K / Akt / HIF-1 un vía que es utilizado por las células cancerosas para promover la proliferación y la angiogénesis y la apoptosis de inhibición** [35,36,37,38,39,40,41,42]. Además, induce DER apoptosis en células de astrocitoma, mientras que la protección de las células normales del cerebro de la muerte a través de la activación de la adenosina monofosfato quinasa (AMPK) [43].

Los tumores poseen vasculatura anormal que bloquea adecuada perfusión tisular, que conduce a la presencia de regiones hipóxicas que promueven la quimioterapia y la resistencia a la radiación [44,45,46,47]. De hecho, las células cancerosas hipóxicas son tres veces más resistente a la terapia de radiación que son células bien oxigenadas [48]. Además de disminuir la eficacia de la atención estándar, la hipoxia tumoral activa una serie de vías de oncogenes, en gran parte a través del factor de transcripción HIF-1, que promueven el crecimiento del tumor, la metástasis, la angiogénesis y apoptosis de inhibición [49,50].

terapia con oxígeno hiperbárico (HBO₂ T) implica la administración de 100% de oxígeno a presión elevada (mayor que el nivel del mar, o 1 ATA). HBO₂ T aumenta la saturación de oxígeno de plasma que facilita el suministro de oxígeno al tejido independiente de la hemoglobina O₂ saturación de [51]. El potencial beneficio del uso de HBO₂ T para combatir los efectos promotores del cáncer de la hipoxia tumoral es clara. HBO₂ T solo se ha demostrado que el crecimiento del tumor de inhibición, reducir la densidad de los vasos sanguíneos del tumor, e inducir la expresión preferencial de genes anti-cáncer en modelos de rata de tumores de mama [52]. Además, la radiación y muchos medicamentos de quimioterapia funcionan mediante la producción de radicales libres dentro de los tumores, lo que lleva a la muerte celular. HBO₂ T aumenta la producción de células tumorales de especies reactivas de oxígeno que contribuye a los efectos sinérgicos de HBO₂ T como un tratamiento adyuvante para la atención estándar. De hecho, HBO₂ T mejora la eficacia de tanto la radiación y la quimioterapia en modelos animales [53,54,55,56,57].

en condiciones normales tejidos, inhibe la disponibilidad de oxígeno disminuido producción mitocondrial de ATP, la estimulación de una regulación de enzimas glucolíticas a las necesidades se encuentran de energía por nivel de sustrato

la producción de la fosforilación de ATP. Por lo tanto, la respuesta celular a la hipoxia tumoral está mediada por varias de las mismas vías que son demasiado activo en las células de cáncer con el daño mitocondrial y altas tasas de glucólisis aeróbica. Esto sugiere **que la dieta cetogénica y HBO₂ T podría apuntar a varias vías superpuestas y comportamientos tumorigénicas de las células cancerosas.** La hipótesis de que estos tratamientos podrían trabajar sinérgicamente para inhibir la progresión del tumor. Sugerimos que la adición de estas terapias adyuvantes no tóxicos para el tratamiento de referencia actual puede mejorar la supervivencia libre de progresión en pacientes con enfermedad metastásica avanzada.

Materiales y métodos

Ratones

Tres parejas reproductoras de la cepa VM / Dk de los ratones fueron utilizados para establecer y propagar una colonia VM / Dk ratón en la Universidad del Sur de Florida (USF) Morsani Colegio de Medicina Vivarium acuerdo con el protocolo estándar de la cría. ratones macho adulto Cuarenta (10-18 semanas de edad) se usaron para este estudio. Todos los procedimientos con animales se realizaron dentro de la estricta adhesión a la Guía del NIH para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y que fueron aprobadas por el USF Institucional Cuidado de Animales y el empleo Comisión (IACUC; Número de protocolo R4137).

Cultivo de células

VM-M3 / células Fluc se recibieron como un regalo de TN Seyfried, Boston College, donde se crearon a partir de un tumor espontáneo en un VM / Dk ratón y adaptados para el cultivo de células [7]. células VMM3 / Fluc se transdujeron con un vector de lentivirus que contiene el gen de luciferasa de luciérnaga bajo el control del promotor de citomegalovirus (VMM3 / Fluc) como se describe anteriormente [7]. Las células VMM3 / Fluc se cultivaron en Eagle medio esencial mínimo con 2 mM L-glutamina (ATCC, Manassas, VA), suero bovino fetal al 10% (Invitrogen, Grand Island, NY), 1% penicillinestreptomycin (Gibco, Invitrogen) y alto glucosa (mM **D-glucosa 25, Fisher Scientific, Waltham, MA). Las células se cultivaron en un CO₂ incubadora a 37 u C en 95% de aire y 5% de CO₂.**

La implantación del tumor subcutáneo

El día 0, VM-M3 / Células Fluc (1 millón de células en 300 metro L PBS) se implantaron, sc, en el abdomen de ratones VM / Dk usando una aguja 27 de calibre. resultados de inoculación en la metástasis rápida y sistémica a la mayoría de los órganos principales, a saber, el hígado, los riñones, el bazo, los pulmones, y el cerebro como se describe anteriormente [7].

dietoterapia

En el día de la inoculación del tumor, los ratones fueron asignados aleatoriamente a uno de **cuatro grupos: SD (Control); SD + HBO₂ T; KD; o KD + HBO₂ T. Los ratones en el grupo de SD fueron alimentados con comida estándar para roedores (2018 Teklad Global 18% de proteína de Rodent Diet, Harlan) ad libitum. Los ratones del grupo KD recibido KD-Solace dieta cetogénica ad libitum. KD-Solace es un polvo dieta cetogénica disponible comercialmente (KetoGen, Solace Nutrition) y se mezcló 1: 1 con H₂O para formar una pasta sólida. información de macronutrientes para SD y KDSolace se muestran en la Tabla 1. Las dietas fueron reemplazados continuamente cada otro día para mantener la frescura y permitir que los ratones a los piensos ad libitum.**

Oxígeno hiperbárico Therapy (HBO₂ T)

Los ratones sometidos a HBO₂ T recibió 100% O₂ durante 90 minutos a 1,5 calibre ATM (2,5 ATM absoluto) tres veces por semana (M, W, F) en una cámara hiperbárica (Modelo 1300B, Sechrist Industries, Anaheim, CA).

Tabla 1. información de macronutrientes de la dieta.

Información de macronutrientes dieta estándar	KD-Solace	
Cal% de grasa	18.0	89.2
Cal% de proteína	24.0	8.7
% Cal de carbohidratos	58.0	2.1
La densidad calórica	3,1 Kcal / g	7,12 Kcal / g

doi: 10.1371/journal.pone.0065522.t001

Glucosa, cuerpos cetónicos, y Weight Mediciones

Cada 7 días, se recogió sangre de la cola utilizando métodos aprobados. La glucosa se midió usando el Nova Max H Más™

La glucosa y si- Cetona Sistema de monitorización (Nova Biomedical, Waltham, MA), y si- hidroxibutirato se midió utilizando el Xtra Precision™ De glucosa en sangre y cetonas Sistema de monitorización (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL).

Los ratones se pesaron entre 1 y 3 pm dos veces a la semana durante la duración del estudio utilizando la Escala digital portátil AWS-1 kg (AWS, Charleston, Carolina del Sur).

Bioluminiscente Imaging y Análisis de crecimiento tumoral

El crecimiento del tumor se monitorizó como una medida de la señalización de bioluminiscente usando el sistema Xenogen IVIS Lumina (Caliper LS, Hopkinton, MA). **adquisición y análisis de datos se realizó mediante la imagen viva H software (Caliper LS). Aproximadamente 15 minutos antes de la in vivo de formación de imágenes, los ratones recibieron una inyección ip de D-luciferina (50 mg / kg) (Caliper LS).** Bioluminiscente señal se obtuvo usando el IVIS Lumina enfrió sistema de cámara CCD con un tiempo de exposición de 1 seg. Como sólo las células cancerosas contenían el gen de la luciferasa, la señal bioluminiscente (fotones / seg) de todo el animal se midió y seguimiento en el tiempo como un indicador del tamaño del tumor metastásico y propagación.

El análisis de supervivencia

A lo largo del estudio, la salud y el comportamiento de los ratones fueron evaluados **diariamente. Los ratones fueron sacrificados humanitariamente por CO₂ asfixia según las** directrices del IACUC previa presentación de criterios definidos (ascitis asociados al tumor, disminución de la respuesta a los estímulos, letargo, y retraso en el desarrollo), y el tiempo de supervivencia se registró.

Estadísticas

Los datos de supervivencia se analizó mediante los ensayos de Kaplan-Meier y rango logarítmico para la distribución de supervivencia. La media de tiempo de supervivencia se analizaron mediante pruebas t de Student de dos colas. señal bioluminiscente como una medida del tamaño del tumor se analizó mediante pruebas t de Student de dos colas. mediciones de sangre fueron analizadas por One Way ANOVA con la prueba de Kruskal Wallis y la prueba de comparación múltiple de Dunn post hoc. Las diferencias en el porcentaje de cambio de peso se analizaron por One Way ANOVA con múltiple de Tukey prueba de comparación post hoc. Correlación entre la glucosa en sangre, cambio de peso corporal, y los tiempos de supervivencia fueron analizados por análisis de regresión lineal. Los resultados se consideraron significativos cuando $p < 0,05$.

resultados

La combinación de la KD con HBO₂ T prolongó la supervivencia en ratones con cáncer metastásico

KD y KD + HBO₂ T ratones tratados demostró una curva de supervivencia estadísticamente diferentes según la prueba de rango logarítmico con un aumento de

el tiempo de supervivencia en comparación con los animales de control ($p = 0,0194$ y $p = 0,0035$, respectivamente; Figura 1A). **KD alimentados y KD + HBO₂ T animales también mostraron un aumento significativo en el tiempo medio de supervivencia en comparación con los animales de control por la prueba t de Student de dos colas ($p = 0,0044$ y $p = 0,0050$, respectivamente; Figura 1B).** Aunque **estudios previos han informado de que HBO₂ T solo puede aumentar el tiempo de supervivencia en los animales con diversos tipos de cáncer [52,54,58,59], no vimos un efecto sobre la supervivencia en ratones que recibieron SD + HBO₂ T. ratones de control (SD) tenía un tiempo de supervivencia media de 31,2 días, mientras que SD + HBO₂ T ratones tenían una supervivencia media no estadísticamente diferente de**

38,8 días (Figura 1B). La KD solo aumentó tiempo medio de supervivencia de **aproximadamente 17 días (56,7%), y cuando se combina con HBO₂ T, ratones mostraron un aumento en el tiempo de supervivencia media de aproximadamente 24 días (77,9%) (Figura 1B). Este hallazgo apoya firmemente la eficacia de la KD y HBO₂ T como terapias para la progresión del tumor y la supervivencia de inhibición prolong en animales con cáncer metastásico.**

El KD y HBO₂ T Disminución Tumor Bioluminiscencia

señal bioluminiscente fue rastreado como una medida del tamaño del tumor durante **todo el estudio. Los animales que recibieron la KD solo o en combinación con HBO₂ T demostró una tendencia notable del crecimiento tumoral más lento en el tiempo. Esta tendencia fue más pronunciada en KD + HBO₂ ratones T y refleja el incremento en el tiempo de supervivencia visto en estos animales (Figuras 1, 2). La diferencia en el tamaño medio del tumor entre KD + HBO₂ T y de control de los animales en la semana 3 fue estadísticamente significativa ($p = 0,0062$; Figura 2B). Día 21 e x vivo**

órgano bioluminiscencia de KD + HBO₂ T ratones demostró una tendencia de los tumores metastásicos reducidas en los animales comparado con el grupo SD (Figura 2). Spleen bioluminiscencia se redujo significativamente en KD + HBO₂ ratones T ($p = 0,0266$).

El KD La disminución de glucosa en la sangre, la sangre elevada cetonas, y disminución del peso corporal

Antes del estudio, glucosa en sangre, cetona, y los pesos corporales iniciales fueron similares entre los grupos (datos no presentados). Los niveles de glucemia eran más bajos en los ratones KD-tratado que en los ratones SD-treated por día 7 ($p < 0,001$; Figura 3). Mientras que todos los ratones alimentados-KD demostró una tendencia de los niveles de cetona en **sangre elevado durante toda la duración del estudio, sólo el KD + HBO₂ T animales mostraron un aumento significativamente cetonas comparación con los controles en el día 7 ($p < 0,001$; Figura 3). Por día 7, los ratones alimentados-KD perdió aproximadamente el 10% de su peso corporal inicial y mantenido ese peso durante la duración del estudio (Figura 4). Día glucosa 7 sangre y el porcentaje de cambio de peso corporal se correlacionó significativamente con el tiempo de supervivencia ($p = 0,0189$ y $p = 0,0001$, respectivamente; Figura 5).**

Discusión

Casi un siglo después de Otto Warburg informó el metabolismo anormal de la energía de las células cancerosas, un renovado interés en el campo se ha dilucidado una plétora de **nuevas dianas terapéuticas. Dos tratamientos prometedores implican el uso de HBO₂ T para revertir los efectos cancerpromoting de la hipoxia tumoral y el uso de la KD para limitar la disponibilidad de sustratos glucolíticas a las células de cáncer de glucosa-adicto. Ambas terapias se ha informado anteriormente de poseer anticancerígenos efectos [14,54,58,60]. Dado que estos tratamientos se cree que funciona por la orientación de varios mecanismos que se solapan, la hipótesis de que la combinación de estos tratamientos no tóxicos podría proporcionar un potente efecto anti-cáncer, sinérgico. Además, puesto que la metástasis es responsable de la gran mayoría de las muertes relacionadas con el cáncer, hemos probado la eficacia de estas terapias siameses en el modelo VM-M3 de ratón de cáncer metastásico [7,10].**

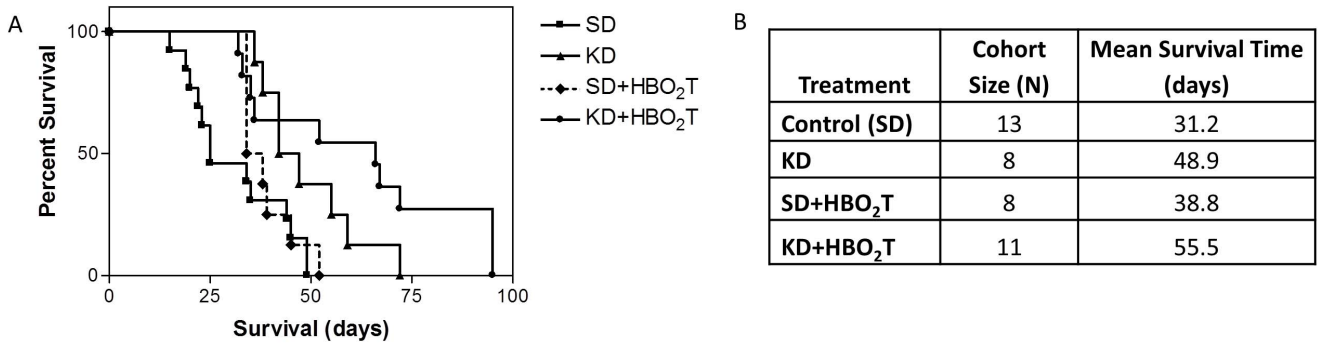


Figura 1. El KD y HBO₂T aumenta el tiempo de supervivencia en ratones con cáncer metastásico sistémica. (UN) De Kaplan-Meier de supervivencia trama de grupos de estudio. Los animales que recibieron KD y KD + HBO₂T mostró una supervivencia significativamente mayor en comparación con animales de control ($p = 0,0194$ y $p = 0,0035$, respectivamente; Kaplan-Meier y rango logarítmico Las pruebas de distribución de supervivencia). (SI) Tratamiento tamaño de grupo de cohorte y los tiempos medios de supervivencia se muestra. ratones KD exhibió un aumento de 56,7% en el tiempo medio de supervivencia en comparación con los controles ($p = 0,0044$; prueba de la t de Student de dos colas); KD + HBO₂T ratones mostraron un aumento del 77,9% en el tiempo medio de supervivencia en comparación con los controles ($p = 0,0050$; prueba t de Student de dos colas). Los resultados se consideraron significativos cuando $p < 0,05$. doi: 10.1371 / journal.pone.0065522.g001

Se encontró que la KD alimentado ad libitum aumentado significativamente el tiempo de supervivencia media en ratones con cáncer metastásico ($p = 0,0194$; Figura 1). Es importante tener en cuenta que los animales alimentados-KD perdieron aproximadamente 10% de su peso corporal durante el curso del estudio (Figura 4). Está bien establecido que la baja en carbohidratos, dietas cetogénicas altas en grasa pueden causar la pérdida de peso corporal en humanos con sobrepeso [21,22,61]. dietas cetogénicas también se sabe que tienen un efecto supresor del apetito que puede contribuir a la pérdida de peso corporal [20]. Junto con la supresión del apetito, un potencial factor que contribuye a la pérdida de peso corporal observada es la posibilidad de que los ratones encontró el KD a ser menos agradable al paladar y se auto-restricción de la ingesta calórica. Como la restricción calórica es conocido para provocar profunda anti-

los efectos del cáncer, la dieta cetogénica pueden inhibir la progresión del cáncer, en parte, por la restricción de energía alimentaria indirecta [6,38]. Fine y sus colegas utilizaron recientemente un KD muy baja en carbohidratos para promover enfermedad estable o remisión parcial en pacientes con cáncer metastásico avanzado [62]. El estudio de Fine demostró una correlación entre las cetonas en sangre y la respuesta a la terapia de la dieta, lo que sugiere que la elevación cetona en sí también contribuye a la eficacia anti-cáncer de la KD.

Como hipótesis, se observaron efectos anti-cáncer profundas en nuestro modelo de ratón metastásico después de combinar la KD con HBO₂T. La combinación de estas terapias casi se duplicó el tiempo de supervivencia en ratones con cáncer metastásico, el aumento del tiempo de supervivencia media por

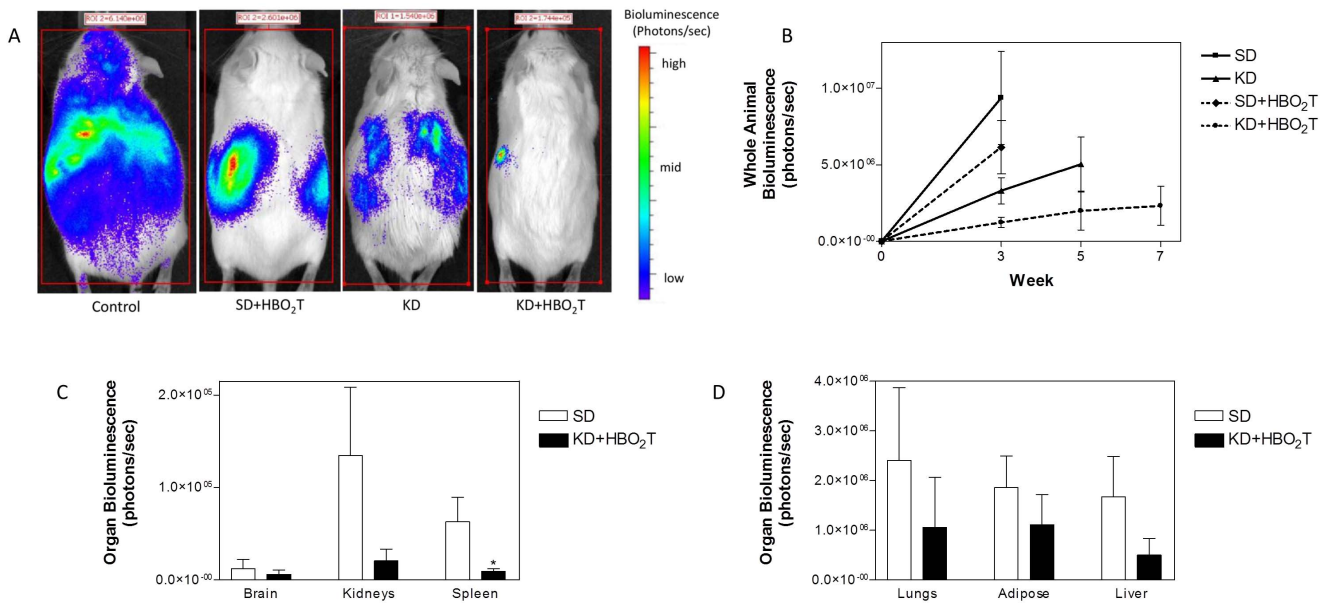
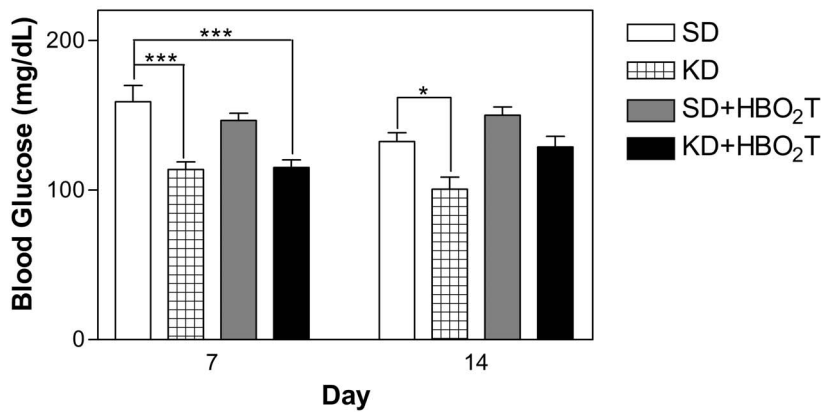


Figura 2. bioluminiscencia del tumor en ratones. El crecimiento del tumor fue más lenta en los ratones alimentados con la KD que en los ratones alimentados con la SD. (A) Los animales representativos de cada grupo de tratamiento bioluminiscencia tumor demuestra en el día 21 después de la inoculación de células tumorales. Los animales tratados mostraron una menor bioluminiscencia que los controles con ratones KD + HBO₂T que presenta una profunda disminución de la bioluminiscencia tumor en comparación con todos los grupos. (B) bioluminiscencia cuerpo total se midió semanalmente como una medida del tamaño del tumor; barras de error representan 6 SEM. KD + HBO₂T ratones mostraron significativamente menos bioluminiscencia tumor que los animales control en la semana 3 ($p = 0,0062$; prueba t de Student de dos colas) y una tendencia general del crecimiento del tumor notablemente más lenta que en los controles y otros animales tratados durante todo el estudio. (C, D) Día 21 ex vivo de órganos bioluminiscencia de SD y animales KD + HBO₂T (N = 8) demostró una tendencia de la reducción de la carga tumoral metastásica en los animales que recibieron la terapia combinada. bioluminiscencia bajo se redujo significativamente en ratones KD + HBO₂T (* $p = 0,0266$; prueba de la t de dos colas de Student). Los resultados se consideraron significativos cuando $p < 0,05$. doi: 10.1371 / journal.pone.0065522.g002

A



B

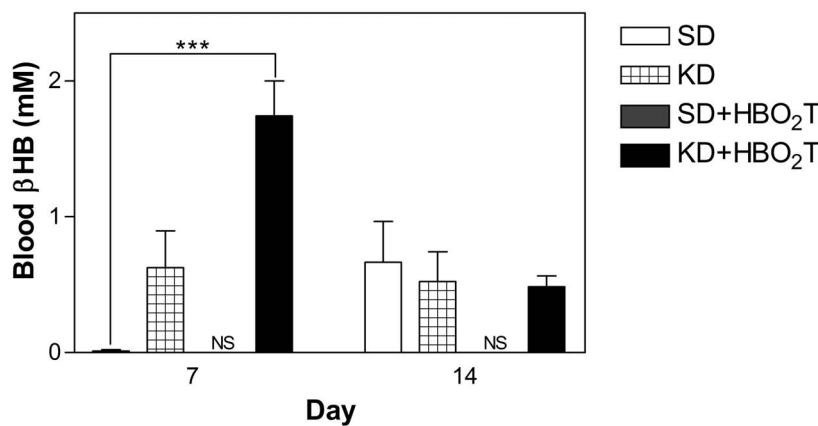


Figura 3. La glucosa en sangre y si- niveles hidroxibutirato en animales. (ratones alimentados-KD A) mostró menor glucosa en sangre que los controles en el día 7 (**p, 0,001). Los animales en el grupo de estudio KD tenían niveles de glucosa en sangre significativamente más bajos que los controles en el día 14 (* p, 0,05). ratones (B) KD + HBO2T tenía significativamente más altos cetonas en sangre que los controles en el día 7 (**p, 0,001). Las barras de error representan 6 SEM. Análisis de la sangre se llevó a cabo con un ANOVA de un factor con el test Wallis Kruksal y prueba de comparación múltiple de Dunn post hoc; los resultados se consideraron significativas cuando p, 0,05. doi: 10.1371 / journal.pone.0065522.g003

24 días en comparación con los animales de control (p = 0,0050; Figura 1). El KD + HBO₂T ratones tratados con T mostraron una disminución significativa de bioluminiscencia comparación con los controles en la semana 3 (p = 0,0062) y una tendencia de disminución de la tasa de crecimiento del tumor durante todo el estudio

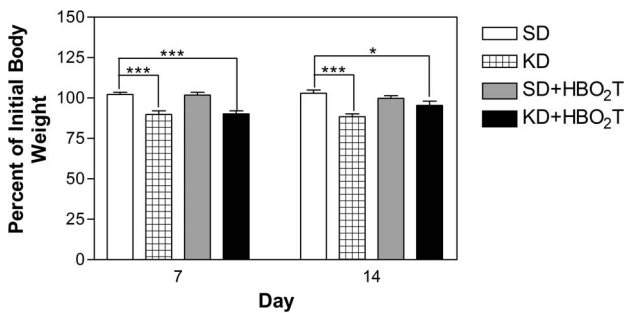


Figura 4. Animal. El peso corporal se midió dos veces a la semana. Gráfico indica porcentaje promedio de animales iniciales de peso corporal en los días 7 y 14. KD y ratones KD + HBO₂T perdieron aproximadamente el 10% de su peso corporal por día 7 y exhiben una diferencia significativa en el porcentaje de cambio de peso corporal en comparación con animales de control (* p, 0,05; **p, 0,001). Las barras de error representan 6 SEM.

doi: 10.1371 / journal.pone.0065522.g004

(Figura 2). Por día 7, todos los animales en una dieta cetogénica tenían niveles de glucosa en sangre significativamente más bajos que los controles (Figura 3). Como se ha demostrado que el crecimiento tumoral se correlaciona directamente con los niveles de glucosa en sangre [63], esta disminución en la concentración de glucosa en la sangre probablemente contribuyó a la tendencia de disminución de la bioluminiscencia del tumor y la tasa de crecimiento tumoral observada en los animales alimentados-KD (Figura 2). Nebeling et al. demostró que la KD disminuyó significativamente la captación de glucosa en pacientes con tumores cerebrales pediátricos por análisis de FDG-PET [64]. Estos datos clínicos sugieren disminuyó la entrega de glucosa al tumor es un mecanismo causal en el tratamiento KD. Todos los ratones KD-alimentado mostró una tendencia de cetonas en sangre elevados a lo largo del estudio; sin embargo, sólo KD + HBO₂T ratones tenían cetonas significativamente más altos que en los controles en el día 7 (Figura 3). Como cetonas se metabolizan exclusivamente dentro de las mitocondrias, las células cancerosas con las mitocondrias dañadas son incapaces de utilizar adecuadamente para obtener energía. Muchos cánceres no expresan la succinil-CoA: enzima 3ketoacid CoA-transferasa (SCOT) que se requiere para el metabolismo del cuerpo cetona [65,66]. De hecho, si previene la administración HB neuronas del hipocampo sanos pero no las células de glioma de la muerte celular retirada inducida por la glucosa [24]. Además, los cuerpos cetónicos tienen efectos anti-cáncer en sí, posiblemente a través de la inhibición de enzimas glucolíticas [67]. Skinner y sus colegas demostraron que acetoacetato y si administración HB inhibe la viabilidad celular del cáncer de cerebro in vitro [25]. Por lo tanto, la cetona elevado

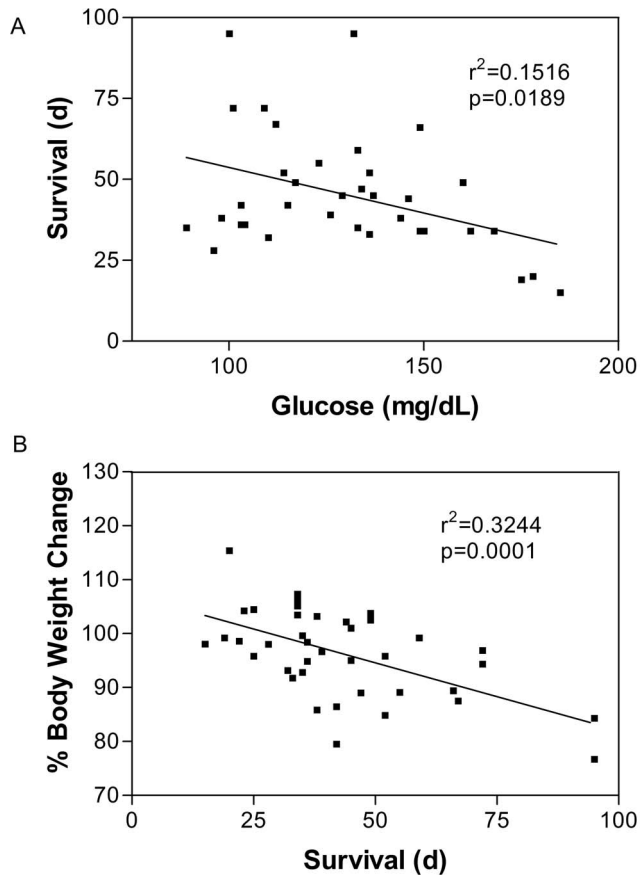


Figura 5. La glucosa y el cambio de peso se correlacionan con la supervivencia. Análisis de regresión lineal reveló una correlación significativa entre el día 7 de glucosa en sangre y el porcentaje de cambio de peso corporal con la supervivencia ($p = 0,0189$ y $p = 0,0001$, respectivamente). Los resultados se consideraron significativos cuando $p, 0,05$.

doi: 10.1371/journal.pone.0065522.g005

los niveles en el KD + HBO₂ T ratones probable mejoró la eficacia de esta terapia combinada.

Un informe reciente de Listanti, et. al propuso que los fibroblastos tumorassociated producen cuerpos cetónicos para las células cancerosas para su uso como combustible [68]. Los autores han publicado anteriormente varios papeles con hallazgos similares [69,70,71]. En estos estudios, los autores crearon fibroblastos que fueron alterados a las enzimas limitantes de la velocidad sobreexpresan en la producción de cuerpos cetónicos inmortalizados, y co-cultivaron estas células con células de cáncer de mama humano alterados para enzimas sobreexpresan implicados en la utilización de cuerpos cetónicos. Si bien este fenómeno puede ocurrir en el sistema de cultivo genéticamente modificado utilizado por los autores, no hay evidencia de que **esto ocurre de forma natural en las células cancerosas in vitro o en los tumores en vivo. Por el contrario**, la literatura en su conjunto sugiere fuertemente que las células cancerosas no pueden utilizar eficazmente cetonas como combustible. Como se ha descrito, la mayoría de cánceres no expresan la enzima SCOT que es necesaria para la utilización de cuerpos cetónicos [65,66]. Varios estudios han reportado una deficiencia de células de cáncer de metabolizar los cuerpos cetónicos in vitro

[24,25]. Además, se acepta ampliamente que los cuerpos cetónicos se producen casi **exclusivamente a partir de ácido graso si- oxidación en el hígado. Hay no se sabe vía metabólica** mediante el cual los fibroblastos pueden producir cuerpos cetónicos de la glucosa. Sin evidencia convincente adicional para apoyar estas afirmaciones, seguimos siendo partidarios de la idea de que las células cancerosas no pueden utilizar los cuerpos cetónicos como sustratos energéticos eficientes.

preocupación potencial puede surgir con respecto al uso de una terapia de dieta para pacientes de cáncer susceptibles a la caquexia. Mientras baja en carbohidratos o dietas cetogénicas promover la pérdida de peso en personas con sobrepeso, que también son conocidos por pérdida de masa muscular libre durante condiciones de restricción de energía y el hambre [72,73,74,75]. En un modelo animal de la caquexia por cáncer, la administración de un hidrato de carbono bajo, dieta alta en grasa impide la pérdida de peso de los animales, mientras que simultáneamente disminuye el tamaño del tumor [76]. Efectos similares se describen en pacientes humanos con cáncer [64,77]. Los efectos anticachexia de la KD no son sorprendentes cuando se considera un interruptor metabólico con el metabolismo de grasa y posterior cetosis evolucionado como un método de ahorro de proteínas durante el ayuno o la inanición [72,78,79] prolongada. Tiene sentido que la cetosis terapéutica inducida por la dieta de un paciente con cáncer evitaría el desgaste muscular similar a como lo hace con los atletas sometidos a ejercicio intenso [80]. Por otra parte, cuando se administra como tratamiento adyuvante para pacientes con cáncer avanzado, el KD mejora la calidad de vida y aumenta la eficacia del tratamiento con quimioterapia en la clínica [81,82]. Este y otros emergentes evidencia pone en duda el consejo médico común de limitar el consumo de grasas en pacientes con cáncer con sobrepeso [83].

Veech y colegas describen los mecanismos por los que el metabolismo cetona protege a las células del daño oxidativo [74,78], mientras que la evidencia más reciente sugiere **que las cetonas funcionan como inhibidores de HDAC [84]. si HB metabolismo da como resultado un aumento de la reducción de la pareja NAD y aumento de la oxidación de la coenzima Q en el interior de la mitocondria. Aumento de la oxidación de Q disminuye los niveles de semiquinona, posteriormente disminuir la producción de anión superóxido [74]. El aumento de la reducción de la pareja NADP realiza la regeneración de glutatión reducido, un importante antioxidante endógeno [74]. Por lo tanto, el metabolismo del cuerpo cetona protege a las células del daño oxidativo por la disminución de la producción de ROS y mediante la mejora de las capacidades de antioxidantes endógenos. Como se discutió previamente, las células cancerosas son incapaces de metabolizar los cuerpos cetónicos eficazmente; por lo tanto, no esperamos que las cetonas se conferirán los mismos efectos protectores sobre la célula de cáncer. HBO₂ T aumenta la producción de ROS dentro de la célula que puede dar lugar a la peroxidación de lípidos de membrana y la muerte celular [85]. Las células de cáncer con el daño mitocondrial y la perfusión caótica producen naturalmente los niveles crónicamente elevados de ROS, pero son susceptibles a la muerte celular inducida por el daño oxidativo con incluso modestos aumentos en ROS [58,86]. Proponemos un mecanismo potencial de KD + HBO₂ T eficacia: la KD debilita las células del cáncer mediante restricción de la glucosa y los inherentes efectos anticancerígenos de cuerpos cetónicos mientras que confiere al mismo tiempo una ventaja de protección para el tejido sano capaz de metabolismo cetona. Esta focalización metabólica sensibiliza las células cancerosas a HBO₂ T inducida por la producción de ROS y el daño oxidativo, lo que contribuye a la eficacia de la combinación de KD con HBO₂ T. Además, el metabolismo cetona por la protección tejidos sanos probables confiere contra las posibles consecuencias negativas de HBO₂ T (CNS toxicidad del oxígeno) [87,88,89]. Reciente in vivo estudios apoyan los efectos neuroprotectores de la cetona ésteres [90,91]. Estos mecanismos hipotéticos pueden contribuir a la seguridad y eficacia de la KD + HBO₂ T terapia combinada.**

Stuhr y Moen ha publicado recientemente una revisión exhaustiva de la literatura sobre **el uso de HBO₂ T para el cáncer [59]. Los autores concluyeron que HBO₂ T debe ser considerado como un tratamiento seguro para pacientes con diversos tumores malignos y que no hay pruebas convincentes de su uso promueve la progresión del cáncer o la repetición. En la literatura, hay un número sustancial de estudios que indican que HBO₂ T puede inducir efectos notables contra el cáncer in vitro y en estudios animales y humanos por igual [58,59,92]. La evidencia es mixta, sin embargo, ya que otros estudios no informaron efectos con HBO₂ T [58,59].**

De hecho, en nuestro estudio, HBO₂ T solo no mejoró el resultado de ratones VM con cáncer metastásico, pero la combinación de HBO₂ T con KD provocó un efecto terapéutico dramático. Tal vez la adición de la KD u otra terapia metabólica (por ejemplo, 2-desoxiglucosa, 3-bromopiruvato) para HBO₂ T produciría resultados similares en estos informes anteriores estudios que demuestran sin eficacia debido a HBO₂ T solo. **Es importante buscar las interacciones sinérgicas entre las terapias que pueden aumentar la eficacia del tratamiento contra el cáncer.** Scheck y compañeros de trabajo informó remisión completa sin recurrencia en 9 de 11 ratones con glioma mediante la combinación de la KD con radiación [93]. Marsh, et al. sinergia notificados entre la dieta cetogénica restringido y la glucólisis inhibidor 2deoxyglucose [94]. **Podría añadir HBO₂ T a estos tratamientos combinados provocan resultados aún mejores? Del mismo modo, podría el uso de terapias adyuvantes como KD y HBO₂ T mejorar la respuesta del paciente al tratamiento convencional?**

Nuestro estudio sugiere que la combinación de una KD con HBO₂ T puede ser una terapia eficaz y no tóxica para el tratamiento de

referencias

- Gupta G, Massague' J (2006) la metástasis del cáncer: la construcción de un marco. *Cell* 127: 679-695.
- Graeme M, Robyn W, Michael B (2004) La contribución de la quimioterapia citotóxica a 5 años de supervivencia en tumores malignos de adultos. *Clinical Oncology* 16: 549-560.
- Sun Y, Campisi J, Higano C, Beer TM, Porter P, et al. (2012) daños Treatmentinduced para el microambiente tumoral promueve la próstata resistencia a la terapia del cáncer mediante WNT16B. *Nature Medicine* 18: 1359-1369.
- Seyfried TN, Shelton LM, Mukherjee, P (2010) lo hace la norma existente de aumento cuidado metabolismo energético glioblastoma? *The Lancet Oncology* 11: 811-813.
- Fomchenko E, E Holanda (2006) Los modelos de ratón de tumores cerebrales y sus aplicaciones en ensayos preclínicos. *investigación clínica del cáncer: una revista oficial de la Asociación Americana para la Investigación del Cáncer* 12: 5288-5297.
- Seyfried TN (2012) El cáncer como una enfermedad metabólica: Sobre el origen, manejo y prevención del cáncer. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, In. 421 p.
- Huysentruyt LC, Mukherjee P, Banerjee D, Shelton LM, Seyfried TN (2008) las células de cáncer metastásico con propiedades de macrófagos: evidencia de un nuevo modelo de tumor murino. *International Journal of Cancer* 123: 73-84.
- Huysentruyt LC, Shelton LM, Seyfried TN (2010) Influencia de metotrexato y cisplatino en la progresión tumoral y la supervivencia en el modelo de ratón VM de cáncer metastásico sistémica. *International Journal of Cancer Diario Internacional du cáncer* 126: 65-72.
- Huysentruyt L, Akgoc Z, Seyfried T (2011) Hipótesis: son los macrófagos neoplásicas / microglia presente en glioblastoma multiforme? *ASN neuro* 3: 183-193.
- Shelton L, Mukherjee P, Huysentruyt L, Urts I, Rosenberg J, et al. (2010) Una novela pre-clínica in vivo modelo de ratón para el crecimiento del tumor maligno en el cerebro y la invasión. *Diario de neuro-oncología* 99: 165-241.
- Bergamo A, Gagliardi R, Scarcia V, Furlani A, Alessio E, et al. acción (1999) vitro la detención del ciclo En la célula, in vivo en tumores de metástasis sólidos, y toxicidad para el huésped del fármaco antimetastásico NAMI-A y cisplatino. *El Diario de Farmacología y Terapéutica Experimental* 289: 559-564.
- Loehrer P, Einhorn L (1984) Drugs cinco años posteriores. Cisplatino. *Annals of Internal Medicine* 100: 704-713.
- McGuire WP, Hoskins WJ, Brady MF, Kucera PR, perdiz EE, et al. (1996) La ciclofosfamida y cisplatino frente a paclitaxel y cisplatino: una fase III ensayo aleatorizado en pacientes con estadio subóptima / IV de cáncer de ovario III (desde el Gynecologic Oncology Group). *Seminars in Oncology* 23: 40-47.
- Seyfried T, Shelton L (2010) cáncer como una enfermedad metabólica. *Nutrición y metabolismo* 7: 7.
- Warburg O (1956) Sobre el origen de las células cancerosas. *Ciencia* 123: 309-314.
- Frezza C, Pollard P, Gottlieb E (2011) Congénitas y defectos metabólicos adquiridos en el cáncer. *Diario de la medicina molecular (Berlín, Alemania)* 89: 213-233.
- Bayley JP, Devilee P (2012) El efecto Warburg en 2012. La opinión actual en oncología 24: 62-69.
- L Durantí, Leo M, T Pastorino (2012) Contribución de exploración PET en el manejo de tumores en el pecho: una revisión sistemática para los cirujanos torácicos. *Tumori* 98: 175-184.
- Katyal GN, Koehler AN, McGhee B, Foley CM, Crumrine PK (2000) La dieta cetogénica en la epilepsia refractaria: la experiencia del Hospital de Niños de Pittsburgh. *pediatría clínica* 39: 153-159.
- Johnstone A, Horgan G, Murison S, Bremner D, Lobley G (2008) Efectos de una dieta cetogénica alta en proteínas en el hambre, el apetito, y pérdida de peso en los hombres obesos alimentación ad libitum. *American Journal of Clinical Nutrition* 87: 44-55.
- Hussain TA, Mathew TC, Dashti AA, Asfar S, Al-Zaid N, et al. (2012) Efecto de baja en calorías versus baja en carbohidratos dieta cetogénica en la diabetes tipo 2. *Nutrition* 28: 1016-1021.
- Volek J, Sharman M, Gómez A, Judelson DA, Rubin M, et al. (2004) Comparación de muy baja en carbohidratos con restricción de energía y las dietas bajas en grasa sobre la pérdida de peso y la composición corporal en hombres y mujeres con sobrepeso. *Nutrición y metabolismo* de 1: 13.
- Veech R (2004) Las implicaciones terapéuticas de cuerpos cetónicos: los efectos de los cuerpos cetónicos en condiciones patológicas: la cetosis, la dieta cetogénica, estados redox, resistencia a la insulina y el metabolismo mitocondrial. *Las prostaglandinas, leucotrienos y ácidos grasos esenciales* 70: 309-328.
- Maurer G, Brucker D, Bahr O, Harter P, Hattingen E, et al. (2011) la utilización diferencial de cuerpos cetónicos por las neuronas y las líneas celulares de glioma: una lógica para la dieta cetogénica como terapia glioma experimental. *BMC Cancer* 11: 315.
- Skinner R, Trujillo A, Ma X, Beierle E (2009) Los cuerpos cetónicos inhiben la viabilidad de células de neuroblastoma humano. *Diario de cirugía pediátrica* 44: 212.
- Zhou W, Mukherjee P, Kiebish M, Markis W, Mantis J, et al. (2007) La dieta cetogénica restricción calórica, una terapia alternativa eficaz para el cáncer cerebral maligno. *Nutrición y metabolismo* de 4: 5.
- Zuccoli G, Marcello N, Pisanello A, Servadei F, Vaccaro S, et al. (2010) Gestión metabólico del glioblastoma multiforme usando la terapia estándar junto con una dieta cetogénica restringida: Caso clínico. *Nutrición y metabolismo* 7: 33.
- Mavropoulos J, Buschemeyer W, Tewari A, Rokhfeld D, Pollak M, et al. (2009) los efectos de variar la dieta de carbohidratos y grasa en la supervivencia en un modelo de xenoinjerto de cáncer de próstata LNCaP murino. *investigación de la prevención del cáncer (Filadelfia, Pensilvania)* 2: 557-565.
- Otto C, Kaemmerer U, Illert B, Muehling B, Pletzter N, et al. (2008) El crecimiento de células de cáncer gástrico humano en ratones nude se retrasa por una dieta cetogénica suplementado con omega-3, ácidos grasos y triglicéridos de cadena media. *BMC Cancer* 8: 122.
- Mavropoulos J, Isaacs W, S Pizzo, Freedland S (2006) ¿Hay un papel para una dieta cetogénica bajos en carbohidratos en el manejo del cáncer de próstata? *Urology* 68: 15-18.
- Masko E, Thomas J, Antonelli J, Lloyd J, Phillips T, et al. (2010) bajos en carbohidratos dietas y el cáncer de próstata: lo bajo que es "lo suficientemente baja"? investigación de la prevención del cáncer (Philadelphia, PA) 3: 1124-1131.
- Wheatley KE, Williams EA, Smith NC, Dillard A, Parque EY, et al. (2008), la dieta bajos en carbohidratos frente a la restricción calórica: efectos sobre la pérdida de peso, las hormonas y el crecimiento del tumor de colon en ratones obesos. *Nutrición y cáncer* 60: 61-68.
- Rossifanelli F, Franchi F, Mulieri M, Cangiano C, Cascino A, et al. (1991) Efecto de la Energía Sustrato La manipulación de tumor proliferación celular en la alimentación parenteral en pacientes de cáncer. *Clinical Nutrition* 10: 228-232.
- Tisdale MJ, Brennan RA (1988) Una comparación de los triglicéridos de cadena larga y triglicéridos de cadena media en la pérdida de peso y el tamaño del tumor en un modelo de caquexia. *British journal of cáncer* 58: 580-583.
- Mukherjee P, El-Abbadi M, Kasperzyk J, Ranes M, Seyfried T (2002) La restricción dietética reduce la angiogénesis y el crecimiento en un modelo de tumor de cerebro de ratón ortotópico. *British journal of cáncer* 86: 1615-1621.
- Mukherjee P, Sotnikov A, Mangian H, Zhou J, Visek W, et al. (1999) La ingesta de energía y el crecimiento del tumor de próstata, la angiogénesis y la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular. *Revista del Instituto Nacional del Cáncer* 91: 512-523.
- Thompson H, McGinley J, Spoelstra N, Jiang W, Zhu Z, et al. (2004) Efecto de la restricción de energía alimentaria en la densidad vascular durante la carcinogénesis mamaria. *La investigación del cáncer* 64: 5.643-5.650.

38. Hursting S, S Smith, Lashinger L, Harvey A, S Perkins (2010) Calorías y carcinogénesis: lecciones aprendidas a partir de 30 años de investigación la restricción calórica. *Carcinogénesis* 31: 83-89.
39. Thompson H, Zhu Z, Jiang W (2003) la restricción de energía alimentaria en la prevención del cáncer de mama. *Diario de la biología de la glándula mamaria y la neoplasia* 8: 133-142.
40. Thompson H, Zhu Z, Jiang W (2004) Identificación de la apoptosis activación de la cascada inducida en mamaria carcinomas por la restricción de energía. *La investigación del cáncer* 64: 1541-1545.
41. Zhu Z, Jiang W, McGinley J, Wolfe P, Thompson H (2005) Efectos de la repleción de energía de la dieta y el IGF-1 de infusión en la inhibición de la carcinogénesis mamaria por la restricción de energía alimentaria. *carcinogénesis Molecular* 42: 170-176.
42. Marsh J, Mukherjee P, Seyfried TN (2008) efectos proapoptóticos Akt-dependiente de la restricción en la dieta sobre la gestión de la última etapa de una fosfatasa y tensina homólogo / esclerosis tuberosa astrocitoma ratón complejo 2-deficiente. *investigación clínica del cáncer: una revista oficial de la Asociación Americana para la Investigación del Cáncer* 14: 7.751-7.762.
43. Mukherjee P, Mulrooney T, Marsh J, Blair D, Chiles T, et al. (2008) Efectos diferenciales de tensión de la energía sobre la fosforilación de AMPK y la apoptosis en tumor cerebral experimental y el cerebro normal. *cáncer Molecular* 7: 37.
44. Vaupel P, Thews O, Hoekel M (2001) La resistencia al tratamiento de tumores sólidos: el papel de la hipoxia y la anemia. *oncología médica (Northwood, Londres, Inglaterra)* 18: 243-259.
45. Hoogsteen I, Marres H, van der Kogel A, Kaanders J (2007) El microentorno del tumor hipóxico, selección de los pacientes y los tratamientos hipóxicos modificadores. *oncología clínica (Real Colegio de Radiólogos (Gran Bretaña))* 19: 385-396.
46. Vaupel P, Mayer A, Höckel M (2004) La hipoxia tumoral y la progresión maligna. *Methods in Enzymology* 381: 335-354.
47. Vaupel P, Harrison L (2004) Tumor hipoxia: factores causales, los mecanismos de compensación, y la respuesta celular. *El oncólogo* 9 Suppl 5: 4-9.
48. Grey L, Conger A, Ebert M, Hornsey S, Scott O (1953) La concentración de oxígeno disuelto en los tejidos en el momento de la irradiación como un factor en la radioterapia. *La revista británica de radiología* 26: 638-648.
49. Wouters B, van den Beucken T, MAGAGNIN M, Lambin P, Koumenis C (2004) Orientación de tolerancia a la hipoxia en el cáncer. *actualizaciones de resistencia a fármacos: opiniones y comentarios en la quimioterapia contra el cáncer antimicrobiana y* 7: 25-40.
50. Le QT, Denko N, Giaccia A (2004) la expresión génica hipóxico y la metástasis. *Reviews Cancer metástasis* 23: 293-310.
51. Gill AL, Bell CNA (2004) El oxígeno hiperbárico: sus usos, mecanismos de acción y los resultados. *QJM* 97.
52. Stuhr L, Raa A, Oyan A, Kalland K, Sakariassen P, et al. (2007) Hiperoxia retarda el crecimiento e induce la apoptosis, cambios en la densidad vascular y la expresión génica en los gliomas trasplantados en ratas desnudas. *Journal of Neuro-oncología* 85: 191-393.
53. Moen I, Oyan A, Kalland KH, Tronstad K, AKSLEN L, et al. induce (2009) de tratamiento Hyperoxic mesenquimales-a-epitelial de transición en un modelo de adenocarcinoma de rata. *PLoS ONE* 4.
54. Stuhr L, Iversen V, Straume O, Maehle B, Reed R (2004) hiperbárica de oxígeno solo o combinado con 5-FU atenúa el crecimiento de tumores de mama de rata inducido por DMBA. *Cancer Letters* 210: 35-75.
55. Bennett M, Feldmeier J, Smee R, Milross C (2008) hiperbárico oxigenación para la sensibilización de tumores a la radioterapia: una revisión sistemática de los ensayos controlados aleatorios. *revisa el tratamiento del cáncer* 34: 577-591.
56. Takiguchi N, Saito N, Nunomura M, Kouda K, Oda K, et al. (2001) El uso de 5FU más oxígeno hiperbárico para el tratamiento de tumores malignos: evaluación de efecto antitumoral y la medición de 5FU en órganos individuales. *La quimioterapia del cáncer y la farmacología* 47: 11-14.
57. Petre P, Baciewicz F, Tigan S, Spears J (2003) El oxígeno hiperbárico como un adyuvante de quimioterapia en el tratamiento de tumores pulmonares metastásicos en un modelo de rata. *El Diario de la cirugía torácica y cardiovascular* 125: 85.
58. Daruwalla J, Christophi C (2006), la terapia con oxígeno hiperbárico para malignidad: una revisión. *Diario mundo de la cirugía* 30: 2112-2143.
59. Moen I, Stuhr LE (2012), la terapia con oxígeno hiperbárico y el cáncer: una revisión. *Targeted oncología* 7: 233-242.
60. Scheck A, Abdelwahab M, Fenton K, Stafford P (2011) La dieta cetogénica para el tratamiento de glioma: Insights de perfiles genéticos. *investigación de la epilepsia* 100: 327-337.
61. Astrup A, Ryan L, Grunwald G, Storgaard M, Saris W, et al. (2000) El papel de la grasa de la dieta en la grasa corporal: evidencia de un meta-análisis preliminar de estudios de intervención dietética baja en grasa ad libitum. *La revista británica de la nutrición* 83: S25-32.
62. Fine E, Segal-Isaacson C, Feinman R, Herszkopf S, Romano M, et al. (2012) Orientación de la inhibición de la insulina como una terapia metabólica en el cáncer avanzado: un piloto de seguridad y ensayo dietético viabilidad en 10 pacientes. *Nutrition* 28: 1028-1035.
63. Seyfried T, Sanderson T, El-Abbadi M, McGowan R, Mukherjee P (2003) Papel de glucosa y cuerpos cetónicos en el control metabólico de cáncer cerebral experimental. *British journal of cáncer* 89: 1375-1457.
64. Nebeling LC, Miraldi F, Shurin SB, Lerner E (1995) Efectos de una dieta cetogénica en el metabolismo del tumor y el estado nutricional en pacientes de oncología pediátrica: dos informes de casos. *Revista de la American College of Nutrition* 14: 202-208.
65. Tisdale M, Brennan R (1983) Pérdida de acetatoacetato de coenzima A de actividad de transferasa en tumores de los tejidos periféricos. *British journal of Cancer* 47: 293-297.
66. Sawai M, Yashiro M, Nishiguchi Y, Ohira M, Hirakawa K (2004) efectos Growthinhibitory del cuerpo cetona, monoacetacetin, sobre el cáncer gástrico humano
- células con succinil-CoA: 3-oxoácido CoA-transferasa (SCOT) deficiencia. la investigación contra el cáncer 24: 2213-2217.
67. Magee BA, Potezny N, Rofé AM, Conyers RA (1979) La inhibición del crecimiento de células malignas por cuerpos cetónicos. *La revista australiana de la biología experimental y la ciencia médica* 57: 529-539.
68. Martínez-Outschoorn UE, Lin Z, Whitaker-Menezes D, Howell A, Sotgia F, et al. (2012) La cetona unidades de utilización del cuerpo el crecimiento tumoral y la metástasis. *ciclo celular* 11: 3.964 a 3.971.
69. Martínez-Outschoorn U, Prisco M, Ertel A, Tsigirgos A, Lin Z, et al. (2011) Las cetonas y aumento de células de cáncer de lactato "stemness", recurrencia, metástasis y los pobres resultados clínicos de conducción en el cáncer de mama: el logro de la medicina personalizada a través de Metabolo-Genómica. *Ciclo celular* 10: 1271-1286.
70. Bonuccelli G, Tsigirgos A, Whitaker-Menezes D, Pavides S, Pestell R, et al. (2010) " el crecimiento del tumor cetonas y lactato "combustible" y metástasis: La evidencia de que las células cancerosas epiteliales utilizan metabolismo mitocondrial oxidativo. *Ciclo celular* 9: 3.506-3.514.
71. Salem A, Whitaker-Menezes D, Lin Z, Tanowitz H, Al-Zoubi M, et al. (2012) metabolismo del tumor de dos compartimentos: la autofagia en el microambiente tumoral y oxidativa mitocondrial metabolismo (OXPHOS) en células cancerosas. *ciclo celular* 11: 2545-2601.
72. Manninen AH (2006) Las dietas muy bajas en carbohidratos y preservación de la masa muscular. *Nutrición y metabolismo* 3: 9.
73. Cahill G (2006), el metabolismo de gasolina en la inanición. *Revisión anual de la nutrición* 26: 1-22.
74. Veech RL (2004) Las implicaciones terapéuticas de cuerpos cetónicos: los efectos de los cuerpos cetónicos en condiciones patológicas: la cetosis, la dieta cetogénica, estados redox, resistencia a la insulina y el metabolismo mitocondrial. *Las prostaglandinas, leucotrienos y ácidos grasos esenciales* 70: 309-319.
75. Volek J, Sharmar M, Love D, Avery N, Gómez A, et al. (2002) Composición corporal y las respuestas hormonales a una dieta restringida en carbohidratos. *Metabolismo: clínico y experimental* 51: 864-870.
76. Tisdale MJ, Brennan RA, Fearon KC (1987) Reducción de la pérdida de peso y el tamaño del tumor en un modelo de caquexia por una dieta alta en grasas. *British journal of cáncer* 56: 39-43.
77. Nebeling LC, Lerner E (1995) La implementación de una dieta cetogénica a base de aceite de triglicéridos mediumchain en pacientes pediátricos con cáncer. *Revista de la Asociación Americana de Dietética* 95: 693-697.
78. Veech RL, Chance B, Kashiwaya Y, Lardy HA, Cahill GF, Jr. (2001) Los cuerpos cetónicos, usos terapéuticos potenciales. *la vida IUBMB* 51: 241-247.
79. Wu GY, Thompson JR (1988) El efecto de los cuerpos cetónicos en alanina y metabolismo de la glutamina en el músculo esquelético aislado del polluelo de ayuno. *La revista Bioquímica* 255: 139-144.
80. Paoli A, Grimaldi K, D'Agostino D, L Cenci, Moro T, et al. (2012) dieta cetogénica no afecta al rendimiento fuerza en gimnastas de élite artísticas. *Revista de la Sociedad Internacional de Nutrición Deportiva* 9: 34.
81. Stafford P, Abdelwahab M, Kim DY, Preul M, Rho J, et al. (2010) La dieta cetogénica invierte los patrones de expresión de genes y reduce los niveles de especies reactivas de oxígeno cuando se utiliza como terapia adyuvante para el glioma. *Nutrición y metabolismo* 7: 74.
82. Schmidt M, N Pletzer, Schwab M, Strauss I, Kammerer T (2011) Efectos de una dieta cetogénica en la calidad de vida en 16 pacientes con cáncer avanzado: un ensayo piloto. *Nutrición y metabolismo* 8: 54.
83. Champ C, Volek J, J Siglin, Jin L, N Simone (2012) El aumento de peso, el síndrome metabólico y la recurrencia del cáncer de mama: son las recomendaciones dietéticas apoyada por los datos? *revista internacional de cáncer de mama* 2012: 506.868.
84. Shimazu T, Hirschey MD, Newman J, El W, Shirakawa K, et al. (2013) La supresión del estrés oxidativo por beta-hidroxiacetato, un inhibidor de la histona desacetilasa endógeno. *Ciencia* 339: 211-214.
85. D'Agostino D, Olson J, Dean J (2009) aumenta hyperoxia agudos peroxidación lipídica e induce plasma membrana blebbing en células U87 de glioblastoma humano. *Neurociencia* 159: 1011-1033.
86. Aykin-Burns, N, Ahmad I, Zhu Y, Oberley L, Spitz D (2009) El aumento de los niveles de superóxido y H2O2 median en la susceptibilidad diferencial de células de cáncer frente a células normales a la privación de glucosa. *La revista Bioquímica* 418: 29-66.
87. D'Agostino D, Pilla R, Held H, Landon CS, Ari C, et al. (2012) Desarrollo, pruebas y aplicaciones terapéuticas de los ésteres de cetona (KE) para la toxicidad del oxígeno CNS (CNS-OT); es decir, oxígeno hiperbárico (HBO2) inducida por convulsiones. *FASEB. San Diego, CA.*
88. Pilla R, D'Agostino D, Landon C, Dean J (2012) intragástricos ésteres de cetona previene la administración la toxicidad del oxígeno del sistema nervioso central a través de volumen corriente y la modulación de frecuencia respiratoria en ratas. *Tercer Simposio Internacional sobre Terapias dietéticas para la epilepsia y otros trastornos neurológicos.*
89. Bennett A, Ari C, Kesi S, Luke J, Diamond D, et al. (2012) Efecto del tratamiento cetona y la inhibición glucólisis en células de cáncer de cerebro (U87MG) y neuronas de cultivos primarios de ratas expuestas a oxígeno hiperbárico y beta amiloide. *FASEB J.*
90. D'Agostino DP, Pilla R, Held HE, Landon CS, Puchowicz M, et al. (2013) cetosis terapéutico con éster de cetona retrasa convulsiones de toxicidad de oxígeno del sistema nervioso central en ratas. *American Journal of Physiology Reguladora de la fisiología, integrante y comparativa.*
91. Kashiwaya Y, Bergman C, Lee JH, Wan R, King MT, et al. propiedades de dieta éster cetona exposiciones (2013) A ansiolíticos y la cognición ahorradores, y disminuye amiloide y patologías tau en un modelo de ratón de la enfermedad de Alzheimer. *Neurobiology of Aging* 34: 1530-1539.

92. Al-Waili NS, Butler GJ, Beale J, Hamilton RW, Lee BY, et al. (2005) con oxígeno hiperbárico y malignidades: un papel potencial en la radioterapia, la quimioterapia, la cirugía de tumor y la fototerapia. *monitor de la ciencia médica: revista médica internacional de la investigación experimental y clínica* 11: RA279-289.

93. Abdelwahab M, Fenton K, Preul M, Rho J, Lynch A, et al. (2012) La dieta cetogénica es un adyuvante eficaz para la terapia de radiación para el tratamiento de glioma maligno. *PLoS ONE* 7.

94. Marsh J, Mukherjee P, Seyfried T *sinergia* (2008) Drug / dieta para la gestión de astrocitoma maligno en ratones: 2-desoxi-D-glucosa y la dieta cetogénica restringido. *Nutrición y metabolismo* 5: 33.