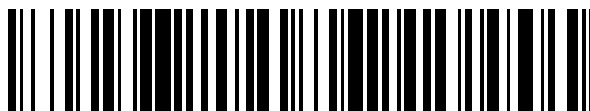


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 353**

51 Int. Cl.:

A61K 31/20 (2006.01)
A61K 31/202 (2006.01)
A61K 36/00 (2006.01)
A61K 33/00 (2006.01)
A61K 31/375 (2006.01)
A61K 31/07 (2006.01)
A61K 31/59 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.10.2010 PCT/US2010/053821**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **28.04.2011 WO11050302**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.10.2010 E 10825771 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2018 EP 2490684**

54 Título: **Métodos y formulaciones nutricionales para aumentar la eficacia y reducir los efectos secundarios del tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

22.10.2009 US 254154 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.03.2018

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF SOUTHERN CALIFORNIA
(100.0%)
1975 Zonal Avenue
Los Angeles, CA 90089-0071, US**

72 Inventor/es:

**LONGO, VALTER D. y
LEE, CHANGHAN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 659 353 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos y formulaciones nutricionales para aumentar la eficacia y reducir los efectos secundarios del tratamiento del cáncer

5

Campo técnico

La presente invención se refiere en general a dietas y al tratamiento del cáncer. Más específicamente, la invención proporciona métodos que pueden utilizarse para sensibilizar a las células cancerosas a los fármacos quimioterapéuticos, protegiendo al mismo a las células normales.

10

Antecedentes

La quimioterapia puede prolongar la supervivencia de los pacientes diagnosticados con una amplia serie de tumores malignos. Sin embargo, los efectos secundarios tóxicos para las células y los tejidos normales limitan la intensidad, la frecuencia y la eficacia de la dosis de la quimioterapia. Por ejemplo, la cardiotoxicidad y la nefrotoxicidad asociadas a los fármacos anticancerosos generalmente prescritos, la doxorubicina y el cisplatino, respectivamente, limitan su potencial terapéutico completo (Rajagopalan, S. Cancer Res. 1988, Hale, JP Arch. Dis. Child 1994; Dobyán, DC, J. Pharmacol., E.T1980; Fillastre, JP Toxicology, 1989). Por lo tanto, la reducción de toxicidad no deseada mediante protección selectiva de las células normales sin comprometer la destrucción de las células malignas representa una estrategia prometedora para mejorar el tratamiento del cáncer.

15

20

Recientemente, se informó sobre una intervención basada en ayuno capaz de proteger diferencialmente a las células normales, pero no a las cancerosas, contra la quimioterapia a dosis altas en cultivos celulares y en ratones portadores de neuroblastoma (Raffaghello, L. PNAS 2008). En el modelo de ratón de xenoinjerto de neuroblastoma, a los ratones se les permitió consumir solo agua durante 48 horas antes de tratamiento con etopósido. Mientras que el etopósido a altas dosis condujo a una letalidad del 50% en ratones alimentados a demanda (*ad lib*), el ayuno no solo protegió la quimiotoxicidad asociada al fármaco sino que también retrasó la muerte dependiente de metástasis del neuroblastoma (Raffaghello, L. PNAS 2008).

25

30

Delongo y Fortuna (2010 Trends in Pharmacological Sciences) y Hustling et al., (2003; Annual Review of Medicine: selected topics in the clinical sciences) revisan los efectos de la restricción de calorías sobre la prevención del cáncer. Niabing et al. (1995 Journal of American College of Nutrition y Journal of American Dietetic Association) desvelan los posibles beneficios de una dieta cetogénica en el tratamiento del cáncer. Estas dietas cetogénicas no implican restricción calórica.

35

Se sabe que la restricción calórica mejora la resistencia al estrés y prolonga la longevidad de organismos que van desde las levaduras hasta los mamíferos. También se ha demostrado que la restricción calórica retrasa el crecimiento del cáncer, pero su efecto es pequeño y no se puede combinar con la quimioterapia ni se puede aplicar sola, ya que requiere una pérdida de peso a largo plazo que es perjudicial para los pacientes con cáncer y también muy difícil mantener.

40

Por consiguiente, al menos por estos motivos, existe la necesidad de métodos adicionales para tratar el cáncer que incorporen de manera eficaz una dieta que ayude al tratamiento y alivie los efectos secundarios quimioterapéuticos.

45

Resumen

Con este trasfondo de la técnica anterior, se desvela un método para aliviar el crecimiento del cáncer o un síntoma de cáncer. El método de esta realización incluye una etapa en la que se identifica a un paciente con cáncer y después se le proporciona una primera dieta durante un primer período de tiempo predeterminado. La primera dieta proporciona al paciente como máximo el 50% de la ingesta calórica normal del paciente, procediendo al menos el 50% de las kilocalorías de la grasa, preferiblemente de grasa monoinsaturada. Después, se proporciona al paciente una segunda dieta durante un segundo período de tiempo predeterminado. La segunda dieta proporciona al paciente un máximo de 500 kcal/día. El paciente recibe después una tercera dieta que optimiza la recuperación de peso y la reposición de los nutrientes esenciales necesarios para una recuperación y salud óptimas de las células y órganos normales. La presente realización proporciona un protocolo de dieta modificada a corto plazo que es eficaz para proteger a las células normales e impedir y retrasar el crecimiento de las células cancerosas. El protocolo y la dieta modificada promoverán estos efectos sin causar pérdida de peso crónica en los pacientes. La invención proporciona un envase de comida terapéutica para su uso en el suministro de comidas a un paciente con cáncer que retrasa el crecimiento del cáncer y aumenta la eficacia de los fármacos quimioterapéuticos, comprendiendo el envase de comida terapéutica:

55

60

un primer componente de comida dividido en comidas, que proporciona al paciente con cáncer como máximo el 50% de la ingesta calórica normal del paciente, proporcionando el primer componente de comida, al paciente con cáncer, de 700 a 1200 kcal/día, procediendo de la grasa al menos el 50% de las kilocalorías y proporcionando el

65

- primer componente de comida, comidas durante un primer período de tiempo predeterminado de aproximadamente 1 a 5 días;
 un segundo componente de comida dividido en comidas, proporcionando el primer componente de comida al paciente con cáncer, como máximo 500 kcal/día, proporcionando el segundo componente de comida, comidas durante un segundo período de tiempo predeterminado de aproximadamente 2 a 7 días; y
 una composición reponedora que comprende aminoácidos esenciales y otros aminoácidos no esenciales, ácidos grasos esenciales, minerales, vitaminas y/o extractos de verduras, durante un tercer período de tiempo predeterminado.
- El primer componente de comida y el segundo componente de comida pueden incluir cada uno independientemente un componente seleccionado del grupo que consiste en extractos de verduras, minerales, ácidos grasos esenciales omega-3/6 y combinaciones de los mismos.
- El primer componente de comida y el segundo componente de comida pueden incluir cada uno independientemente extractos de verduras de una fuente seleccionada del grupo que consiste en col china, col rizada, lechuga, espárrago, zanahoria, calabaza, alfalfa, guisantes verdes, tomate, repollo, coliflor y remolacha.
- El primer componente de comida y el segundo componente de comida pueden incluir independientemente ácidos grasos esenciales omega-3/6 de fuentes seleccionadas del grupo que consiste en salmón, atún, caballa y anchoa.
- El tercer período de tiempo predeterminado puede ser de al menos 5 días.
- La composición reponedora puede incluir extractos de verduras de fuentes seleccionadas del grupo que consiste en col china, col rizada, lechuga, espárrago, zanahoria, calabaza, alfalfa, guisantes verdes, tomate, repollo, coliflor y remolacha. La composición reponedora puede incluir ácidos grasos esenciales omega-3/6. La composición reponedora puede incluir aminoácidos no esenciales seleccionados del grupo que consiste en histidina, serina, taurina, tirosina, cisteína, glutamina y combinaciones de los mismos. La composición reponedora puede incluir un comprimido multimineral que incluye hierro, cinc, cobre, magnesio y calcio.
- El comprimido multimineral puede incluir un complejo de vitamina B con vitamina B12.
- El primer componente de comida puede proporcionar a un paciente aproximadamente 1100 kcal/día o a una paciente aproximadamente 900 kcal/día.
- El envase de comida terapéutica puede comprender además instrucciones para administrar al paciente con cáncer el primer y segundo componente de comida.
- Se describe un método para sensibilizar el cáncer a los medicamentos quimioterapéuticos. El método incluye una etapa en la que se identifica a un paciente con cáncer y después se le proporciona una primera dieta durante un primer período de tiempo predeterminado. La primera dieta proporciona al paciente como máximo el 50% de la ingesta calórica normal del paciente, procediendo de la grasa al menos el 50% de las kilocalorías. Después, se proporciona al paciente una segunda dieta durante un segundo período de tiempo predeterminado. La segunda dieta proporciona al paciente un máximo de 500 kcal/día. El paciente recibe después una tercera dieta que optimiza la recuperación de peso y la reposición de nutrientes esenciales necesarios para una recuperación y salud óptimas de las células y órganos normales. Se proporciona un protocolo de dieta modificada a corto plazo que es eficaz para proteger a las células normales y sensibilizar el cáncer de/a la quimioterapia (Resistencia al Estrés Diferencial). El protocolo y la dieta modificada promoverán estos efectos sin causar pérdida de peso crónica en los pacientes.
- Estos resultados son intrigantes en vista de la creencia generalmente aceptada por los oncólogos de que el ayuno es potencialmente dañino para pacientes con cáncer que se han debilitado, o que están demacrados, debido a ciclos de quimioterapia anteriores.
- También se desvela un método para sensibilizar el cáncer a la radioterapia. El método incluye una etapa en la que se identifica a un paciente con cáncer y después se le proporciona una primera dieta durante un primer período de tiempo predeterminado. La primera dieta proporciona al paciente como máximo el 50% de la ingesta calórica normal del paciente procediendo al menos de la grasa el 50% de las kilocalorías. Después, se proporciona al paciente una segunda dieta durante un segundo período de tiempo predeterminado. La segunda dieta proporciona al paciente un máximo de 500 kcal/día. El paciente recibe después una tercera dieta que optimiza la recuperación de peso y la reposición de los nutrientes esenciales necesarios para la recuperación y la salud óptimas de las células y órganos normales. Se proporciona un protocolo de dieta modificada a corto plazo que es eficaz para proteger las células normales y sensibilizar el cáncer de/a la radioterapia (Resistencia al Estrés Diferencial). El protocolo y la dieta modificada promoverán estos efectos sin causar pérdida de peso crónica en los pacientes.

También se describen formulaciones que contienen intervalos específicos de proteínas, aminoácidos esenciales, hidratos de carbono, grasas, vitaminas, minerales y ácidos grasos esenciales para retrasar el crecimiento del cáncer cuando se administran solos o para proteger al hospedador contra la quimioterapia y/o radioterapia y sensibilizar a las células cancerosas a la quimioterapia y/o radioterapia.

5

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 proporciona gráficos de valores de laboratorio de recuentos de células sanguíneas para el caso 1: (A) Neutrófilos; (B) Linfocitos; (C) Leucocitos, L; (D) Plaquetas; (E) Eritrocitos, E; (F) Hemoglobina, Hgb; (G) Hematocrito, Hct; (H) Peso corporal, el triángulo negro indica el día de la quimioterapia; el cuadrado blanco indica ayuno, los intervalos normales de los valores de laboratorio se indican con líneas discontinuas;

10

La Figura 2 es un diagrama de barras que muestra los efectos secundarios facilitados por los pacientes después de la quimioterapia para el caso 1, los datos representan el promedio de 2 ciclos de quimioterapia sola frente al promedio de 2 ciclos de tratamientos con quimioterapia y ayuno;

15

La Figura 3 es un gráfico de barras que proporciona los efectos secundarios facilitados por los pacientes después de la quimioterapia para el caso 2, los datos representan el promedio de 3 ciclos de quimioterapia sola frente al promedio de 5 ciclos de tratamientos de quimioterapia y ayuno;

20

La Figura 4 proporciona gráficos de valores de laboratorio de recuentos de células sanguíneas para el caso 3: (A) Neutrófilos; (B) Linfocitos; (C) Leucocitos, L; (D) Plaquetas; (E) Eritrocitos, E; (F) Hemoglobina, Hgb; (G) Hematocrito, Hct; (H) nivel del antígeno prostático específico (APE), el paciente participó en un ensayo clínico con acetato de abiraterona (inhibidor de CYP17) durante 90 días, lo cual se indica con líneas discontinuas verticales, el paciente también recibió G-CSF (Neulasta) el día de la quimioterapia excepto durante el tratamiento con acetato de abiraterona, el triángulo negro indica el día de quimioterapia; el cuadrado blanco indica ayuno, la flecha indica aplicación de testosterona (crema 1%), los intervalos normales de los valores de laboratorio se indican con líneas discontinuas horizontales;

25

La Figura 5 es un gráfico de barras que muestra de los efectos secundarios facilitados por los pacientes después de la quimioterapia para el caso 3, los datos representan el promedio de 5 ciclos de quimioterapia sola frente al promedio de 7 ciclos de tratamientos de quimioterapia y ayuno.

30

La Figura 6 proporciona gráficos de valores de laboratorio de recuentos de células sanguíneas para el caso 4: (A) Neutrófilos; (B) Linfocitos; (C) Leucocitos, L; (D) Plaquetas; (E) Eritrocitos, E; (F) Hemoglobina, Hgb; (G) Hematocrito, Hct; el triángulo negro indica el día de la quimioterapia; el cuadrado blanco indica ayuno, los intervalos normales de los valores de laboratorio se indican con líneas discontinuas;

35

La Figura 7 es un gráfico de barras que muestra los efectos secundarios facilitados por los pacientes después de la quimioterapia para el caso 4, los datos representan el promedio de 5 ciclos de quimioterapia sola frente al promedio de 1 ciclo de tratamiento con quimioterapia y ayuno.

40

La Figura 8 es un gráfico de barras que muestra los efectos secundarios facilitados por los pacientes después de la quimioterapia para el caso 5, los datos representan 1 ciclo de quimioterapia sola (1^{er} ciclo) frente al promedio de 5 ciclos de tratamientos con quimioterapia y ayuno;

45

La Figura 9 proporciona gráficos de valores de laboratorio de recuentos de células sanguíneas para el caso 6: (A) Neutrófilos; (B) Linfocitos; (C) Leucocitos, L; (D) Plaquetas; (E) Eritrocitos, E; (F) Hemoglobina, Hgb; (G) Hematocrito, Hct; el triángulo negro indica el día de la quimioterapia; el cuadrado blanco indica ayuno, los intervalos normales de los valores de laboratorio se indican con líneas discontinuas, el paciente recibió transfusión de eritrocitos (3 unidades) el día 71 y también recibió G-CSF (Neulasta) como se ha indicado;

50

La Figura 10 es un gráfico de barras que muestra los efectos secundarios facilitados por los pacientes después de la quimioterapia para el caso 6;

55

La Figura 11 proporciona gráficos de valores de laboratorio de recuentos de células sanguíneas para el caso 7: (A) Neutrófilos; (B) Linfocitos; (C) Leucocitos, L; (D) Plaquetas; (E) Eritrocitos, E; (F) Hemoglobina, Hgb; (G) Hematocrito, Hct; (H) nivel de antígeno prostático específico (APE), el triángulo negro indica el día de la quimioterapia; el cuadrado blanco indica ayuno, la flecha indica administración de abiraterona, los intervalos normales de los valores de laboratorio se indican con líneas discontinuas, el paciente también recibió G-CSF (Neulasta) como se ha indicado;

60

La Figura 12 es un gráfico de barras que muestra los efectos secundarios facilitados por los pacientes después de la quimioterapia para el caso 7, los datos representan el promedio de 8 ciclos de tratamientos con quimioterapia y ayuno;

65

La Figura 13 es un gráfico de barras que muestra los efectos secundarios facilitados por los pacientes después de la quimioterapia para el caso 8, los datos representan el promedio de 4 ciclos de tratamientos con quimioterapia y ayuno;

5 La Figura 14 es un gráfico de barras que muestra los efectos secundarios facilitados por los pacientes después de la quimioterapia para el caso 9; los datos representan el promedio de 4 ciclos de tratamientos con quimioterapia y ayuno;

10 La Figura 15 proporciona gráficos de valores de laboratorio de recuentos de células sanguíneas para el caso 10: (A) Neutrófilos; (B) Linfocitos; (C) Leucocitos, L; (D) Plaquetas; (E) Eritrocitos, E; (F) Hemoglobina, Hgb; (G) Hematocrito, Hct; el triángulo negro indica el día de la quimioterapia; el cuadrado blanco indica ayuno, los intervalos normales de los valores de laboratorio se indican con líneas discontinuas, el paciente también recibió G-CSF (Neulasta) como se ha indicado;

15 La Figura 16 es un gráfico de barras de los efectos secundarios facilitados por los pacientes después de la quimioterapia para el caso 10, los datos representan el promedio de 6 ciclos de tratamientos con quimioterapia y ayuno;

20 La Figura 17 es un gráfico de barras que muestra los efectos secundarios facilitados por los pacientes después de la quimioterapia con o sin ayuno. (A) Los datos representan el promedio del grado de CTC comunicado por todos los pacientes en este estudio; se compararon 18 ciclos de quimioterapia con una dieta a demanda (*ad lib*) con 46 ciclos de quimioterapia y ayuno; (B) Los datos representan el promedio del grado de CTC de ciclos de ayuno y no ayuno correspondientes; 6 pacientes recibieron tratamiento solo con quimioterapia o con quimioterapia y ayuno, los efectos secundarios facilitados por los pacientes de los dos ciclos más cercanos se compararon entre sí, el análisis estadístico se realizó solo a partir de ciclos correspondientes, y los datos se presentaron como error típico de la media (ETM), el valor de P se calculó con una prueba de la t bilateral, para datos independientes (*, $P < 0,05$);

30 La Figura 18 es un gráfico de barras que muestra los resultados de un experimento en el que se sembraron células de cáncer de mama murino (4T1-luc) en placas de cultivo celular de 96 pocillos (20.000/pocillo), y durante 48 horas se permitió que llegasen al equilibrio y alcanzasen la confluencia y a continuación los medios se cambiaron a medios con alto y bajo contenido en glucosa durante 48 horas antes de la irradiación (5 o 10Gy, Figs. 18A, 18B), la viabilidad se determinó mediante el ensayo con MTT (Fig. 18C), y el análisis estadístico se realizó mediante la prueba de la t de Student (N= 60);

35 La Figura 19 es un gráfico de barras que muestra los resultados de un experimento en el que se sembraron células de glioma murino (GL26) en placas de cultivo celular de 96 pocillos (20.000/pocillo), y durante 48 horas se permitió que llegasen al equilibrio y alcanzasen la confluencia y a continuación los medios se cambiaron a medios con alto y bajo contenido en glucosa durante 48 horas antes de la irradiación (5 o 10Gy, Figs. 19A, 19B), la viabilidad se determinó mediante el ensayo con MTT (Fig. 19C), y el análisis estadístico se realizó mediante la prueba de la t de Student (N= 60);

45 La Figura 20 proporciona gráficos de un experimento en el cual ratones BALB/c hembra, con un peso de 20-25 g., recibieron una inyección por vía subcutánea de células singénicas de cáncer de mama (4T1-luc; 2×10^5 células/ratón), el día 13 el tumor avanzó significativamente a $300-500 \text{ mm}^3$, y el tratamiento comenzó con el ayuno de los ratones durante 48 horas antes de la irradiación (IR; 5Gy), el segundo ciclo de ICP/IR (3Gy) se realizó 1 semana más tarde, y el análisis estadístico se realizó utilizando la prueba de la t de Student para cada día, * $p < 0,05$;

50 La Figura 21 proporciona gráficos de un experimento en el cual ratones BALB/c hembra, con un peso de 20-25 g., recibieron una inyección por vía subcutánea de células cancerosas singénicas de glioma (GL26; 3×10^5 células/ratón), el día 27 el tumor avanzó significativamente a $500-1000 \text{ mm}^3$, y el tratamiento comenzó con el ayuno de los ratones durante 48 horas antes de la irradiación (IR; 7,5Gy), el segundo ciclo de ICP/IR (3Gy) se realizó 1 semana más tarde, y el análisis estadístico se realizó utilizando la prueba de la t de Student para cada día, * $p < 0,05$;

60 La Figura 22 proporciona gráficos que muestran que el ayuno sensibiliza a los tumores a la quimioterapia; en particular, el avance tumoral subcutáneo de (A) cáncer mamario murino (4T1), (B) melanoma (B16) y (C) glioma (GL26) se muestra como porcentaje de crecimiento junto con el tamaño tumoral inmediatamente antes y después de cada ciclo de ayuno de 48 horas;

65 La Figura 23 proporciona gráficos que muestran que la pérdida de peso corporal durante 48-60 horas de ayuno se recuperaba fácilmente después de reanudar la alimentación normal en modelos murinos de cáncer subcutáneo (A-C) y metastásico (D): (A) ratones BALB/c portadores de cáncer de mama murino (4T1), (B) ratones C57BL portadores del melanoma murino (B16) y (C) glioma (GL26) y (D) ratones AJV portadores de neuroblastoma (Neuro-2a) murino;

La Figura 24 proporciona un gráfico que muestra que un intervalo de 24-48 horas de ayuno mejoraba la supervivencia del melanoma murino metastásico (B 16);

5 La Figura 25 es un gráfico de barras que muestra la metástasis de células de melanoma B16 en diferentes órganos en comparación con ratones que recibieron DXR con alimentación normal;

La Figura 26 proporciona gráficos que muestran que el ayuno también sensibiliza a los tumores en 2 modelos metastásicos de neuroblastoma murino: NXS2 ($P < 0,001$) produciendo una supervivencia prolongada;

10 La Figura 27 proporciona gráficos que muestran que el ayuno también sensibiliza a los tumores en 2 modelos metastásicos de neuroblastoma murino: Neuro-2a ($P = 0,005$) produciendo una supervivencia prolongada;

15 La Figura 28 proporciona gráficos que muestran que el ayuno sensibiliza a las células cancerosas a la quimioterapia en el modelo de ratón de cáncer de mama metastásico (4T1), ensayo de rango logarítmico, $P < 0,0005$;

20 La Figura 29 proporciona gráficos que muestran que el ayuno retrasó el avance tumoral de neuroblastoma (ACN) humano xenoinjertado que se inyectó por vía subcutánea en ratones lampiños: una vez que los tumores fueron palpables, se realizó ayuno durante un total de 5 ciclos; se efectuó un ANOVA unidireccional con prueba posterior de Tukey para modelos subcutáneos (prueba de la t de Student para (B) día 27)) y prueba de orden logarítmico para modelos metastásicos, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$;

25 La Figura 30 proporciona un gráfico de barras que muestra que el suero de ratones en ayunas sensibilizó a las células de cáncer de mama a dosis de DXR y CP que fueron mínimamente tóxicas en suero de ratones alimentados a demanda. Las células de los grupos de control de ser humano y de murino se cultivaron en glucosa 1,0 g/l y 2,0 g/l, respectivamente, complementada con SBF (Suero Bovino Fetal) al 10 %. Las células de los grupos sometidos a inanición a corto plazo, ICP, se cultivaron en 0,5 g/l de glucosa complementada con SBF al 1 %. La supervivencia se determinó por reducción de MTT. Para conocer los efectos de todas las combinaciones de glucosa y suero en DXR y CP, véanse las Figs. 33-34;

30 La Figura 31 proporciona un gráfico de barras que muestra los niveles de glucemia de ratones en ayunas;

35 La Figura 32 proporciona gráficos que muestran los resultados de un experimento en el que la ICP sensibilizó a 15 de las 17 líneas de células de cáncer diferentes contra a DXR *in vitro*, se aplicó ICP a 4 líneas de células de cancer murino - cáncer de mama (4T1), melanoma (B16), glioma (GL26) y neuroblastoma (NXS2 y Neuro-2a) y a 13 líneas células de cancer humano diferentes: cáncer de próstata (PC3, 22RV1), cáncer de mama (MCF-7, C42B), glioblastoma (U87-MG), cáncer de cuello uterino (HeLa), cáncer de colon (LOVO), neuroblastoma (ACN, SH-SY5Y), carcinoma epidermoide (A431), melanoma (MZ-MEL) y cáncer de ovario (OVCAR) y se expusieron a DXR; ;

40 La Figura 33 proporciona gráficos que muestran los efectos de todas las combinaciones de glucosa y suero en DXR;

45 La Figura 34 proporciona gráficos que muestran los efectos de todas las combinaciones de glucosa y suero en CP;

50 La Figura 35 proporciona gráficos de barras que muestran que el IGF-I invierte la sensibilización dependiente de ICP de células cancerosas a quimioterapia; las células de cáncer de mama murino (4T1) y melanoma (B16) se trataron con rhIGF-I (200 μ M) durante la restricción de glucosa (0,5 g/l frente a 2,0 g/l, con SBF al 1%), seguido de tratamiento con DXR (16 μ M); Prueba de la t de Student; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$;

55 La Figura 36 proporciona resultados de ensayo que muestran el ayuno y la regulación del estrés oxidativo y la reparación del ADN; la ICP fue genotóxica y aumentó sinérgicamente el daño al ADN cuando se combinó con (A) CP en células de cáncer de mama (4T1) y con DX en células de (B) melanoma (B16) y (C) glioma (GL26) según lo determinó el ensayo cometa. Las células en los grupos de control y de ICP se cultivaron en glucosa normal (2,0 g/l) o glucosa baja (0,5 g/l), respectivamente, complementada con SBF al 1%. Los fármacos se seleccionaron por coherencia con los estudios *in vivo* en la Figura 22 A-C;

60 La Figura 37 proporciona resultados de análisis de micromatriz en tumores de mama subcutáneos (4T1) de ratones alimentados normalmente o en ayunas que muestran una regulación diferencial de las rutas de proliferación celular;

65 La Figura 38 proporciona resultados de análisis de micromatriz en tumores de mama subcutáneos (4T1) de ratones alimentados normalmente o en ayunas que muestran un aumento en los mecanismos de traducción que incluyen ensamblaje/biogénesis de ribosomas;

La Figura 39 proporciona resultados de ensayo que muestran que el ayuno aumentó Akt y S6K y redujo la fosforilación de eIF2a, en consonancia con el aumento de los componentes traduccionales, en células de cáncer de mama murino (4T1) (A) *in vivo* y (B) *in vitro*;

5 La Figura 40 es un gráfico de barras que muestra la proliferación de células de cáncer obstaculizada por ICP *in vitro*, en consonancia con el crecimiento tumoral retardado en ratones;

10 La Figura 41 es un gráfico de barras que muestra que el ayuno regula diferencialmente la expresión de los componentes que responden al estrés, incluyendo la forkhead box 03 (FOX03), el factor de transcripción nuclear kappa B (NFkB) y la hemoxigenasa 1 (HO-1) al causar una represión significativa en los tumores, pero una inducción considerable en los órganos normales; Prueba de la t de Student; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$;

15 La Figura 42 proporciona resultados del ensayo que muestran que la ICP aumentó el estrés oxidativo intracelular estimado por un marcador de superóxido (DHE);

La Figura 43 proporciona resultados del ensayo que muestran que la ICP aumenta los niveles de superóxido intracelular inducidos por CP; células de cáncer de mama murino (4T1) se mantuvieron en ayunas y se trataron con CP *in vitro*;

20 La Figura 44 proporciona resultados del ensayo que muestran que el ayuno aumentó selectivamente el nivel de escisión/activación de caspasa-3 en los tumores, pero no en los órganos/células normales (A) *in vivo* y (B) *in vitro*;

25 La Figura 45 proporciona resultados del ensayo que muestran que la autofagia inducida por ICP sustenta la energética celular;

La Figura 46 es un gráfico de barras que muestra que el bloqueo de autofagia durante ICP aumenta adicionalmente la muerte celular;

30 La Figura 47 es un gráfico de los resultados de un experimento en el que células de cáncer de mama murino (4T1) se trataron con hemina, el inductor más habitual de HO-1 (10 μM), en glucosa normal o baja complementada con SBF al 1% y después se expusieron a CP;

35 La Figura 48 es un gráfico que muestra que HO-1 es un importante mediador de Resistencia al Estrés Diferencial (RED) dependiente de ayuno; células de cáncer de mama murino se trataron con hemina, el inductor más habitual de HO-1, en glucosa normal o baja complementada con SBF normal (10%) o bajo (1%) durante 24 horas antes y 24 durante el tratamiento con CP;

40 La Figura 49 es un gráfico que muestra los resultados de un experimento en el que células de cáncer de mama murino (4T1) se trataron con ZnPP (protoporfirina de cinc) (20 μM), un inhibidor de HO-1 normalmente utilizado, en glucosa normal o baja complementada con SBF al 1%, y después se expusieron a CP;

45 La Figura 50 es un gráfico que muestra que la HO-1 (hemoxigenasa 1) es un importante mediador de RED dependiente de ayuno; células de cáncer de mama murino se trataron con ZnPP, un inhibidor de HO-1 normalmente utilizado, en glucosa normal o baja complementada con SBF normal (10%) o bajo (1%), durante 24 horas antes y 24 durante el tratamiento con CP;

50 La Figura 51 proporciona un modelo de sensibilización tumoral, dependiente de ayuno, a quimioterapia en respuesta al ayuno, la glucosa, el IGF-I y otras moléculas/factores favorables al crecimiento se reducen, las células malignas responden a esta reducción activando AKT/S6K y eIF2a e intentando aumentar la traducción pero también reduciendo la expresión de las proteínas de resistencia al estrés FOX03a, NFkB y HO-1, estos cambios conducen al aumento del estrés oxidativo y del daño del ADN, a la activación de la caspasa-3 y a la muerte celular;

55 La Figura 52 es un gráfico que muestra los resultados de un experimento en el que se muestran los niveles en suero de IGF-I en ratones hembra CD1 alimentados con una dieta de control (T.D.7912), alimentados con una fórmula de aminoácidos (AA-D), o privados de alimento durante 2,5 días (inanición a corto plazo, ICP), la dieta de aminoácidos modificada redujo el IGF-I en suero en un 50 % después de 5 días de alimentación;

60 La Figura 53 es un gráfico que muestra que la alimentación de la dieta de aminoácidos modificada mantuvo un nivel bajo de IGF-I en suero después de la inanición a corto plazo (ICP); Ratones hembra CD1 se privaron de alimento durante 2,5 días y se alimentaron durante 2 o 4 días con una dieta de control (T.D.7912) o con una dieta de aminoácidos modificada (AA-D);

65

La Figura 54 es un gráfico que muestra los niveles de glucemia: (A) ratones hembra CD1 se privaron de alimento durante 3 días o se alimentaron con dieta una dieta VCM hipocalórica (6% de la ingesta calórica normal) (durante 3 días) o con una dieta de aminoácidos modificada (AA-D, durante 3 o 5 días); (B) los ratones hembra CD1 se privaron de alimento durante 2,5 días y se volvieron a alimentar con la dieta de control de aminoácidos modificada durante 4 días, la glucosa se midió después de 4 horas de restricción de alimento;

La Figura 55 proporciona gráficos de barras que muestran resultados de experimentos en los que se muestran niveles en suero de IGF-I: ratones hembra CD1 se privaron de alimento (ICP) durante 2,5 días, se alimentaron con una dieta VCM-M hipocalórica (durante 2 días) seguido de 1 día de dieta de aminoácidos modificada (M/AA), se alimentaron con una dieta VCM-H hipocalórica (durante 2 días) seguido de 1 día de dieta de aminoácidos modificada (H/AA), prueba de Tukey, en comparación con el control; (B) Dos días de alimentación de dietas VCM hipocalóricas seguido de 1 día de dieta de aminoácidos modificada mejoraba la supervivencia de ratones tratados con doxorubicina (DXR, 18 mg/kg);

La Figura 56 es un gráfico que muestra los resultados de un experimento en el que ratones hembra CD1 se alimentaron con dieta de control (TD.7912), se privaron de alimento o se alimentaron con VegeGel durante 2,5 días: (A) glucemia en ayunas; (B) niveles en suero de IGF-I; y

La Figura 57 es un gráfico que muestra los resultados de un experimento en el que ratones hembra CD1 se alimentaron con dieta de control (TD.7912), dieta cetogénica restringida en calorías (3 días) o dieta cetogénica restringida en calorías (1 día) seguido de VegeGel (2 días): (A) glucemia en ayunas; (B) niveles en suero de IGF-I.

Descripción detallada

Ahora se hará referencia en detalle a las composiciones, realizaciones y métodos actualmente preferidos de la presente invención, que constituyen los mejores modos actualmente conocidos por los inventores, de poner en la práctica la invención. Las figuras no son necesariamente a escala. Sin embargo, debe entenderse que las realizaciones desveladas son meramente ilustrativas de la invención que pueden incorporarse en diversas formas alternativas. Por lo tanto, los detalles específicos desvelados en este documento no deben interpretarse como limitantes, sino simplemente como una base representativa para cualquier aspecto de la invención y/o como una base representativa para enseñar a un experto en la técnica a emplear de diversas maneras la presente invención.

Excepto en los ejemplos, o cuando se indique expresamente lo contrario, todas las cantidades numéricas en esta descripción que indiquen cantidades de material o condiciones de reacción y/o uso deben entenderse como modificadas por la palabra "aproximadamente" al describir el alcance más amplio de la invención. La práctica dentro de los límites numéricos establecidos es generalmente preferida. Además, a menos que se indique expresamente lo contrario: el porcentaje, las "partes de" y los valores de proporciones se dan en peso; la descripción de un grupo o clase de materiales como adecuada o preferida para un propósito dado en relación con la invención implica que las mezclas de cualquiera de dos o más de los miembros del grupo o clase son igualmente adecuadas o preferidas; la descripción de los constituyentes en términos químicos se refiere a los constituyentes en el momento de la adición a cualquier combinación especificada en la descripción, y no excluye necesariamente las interacciones químicas entre los constituyentes de una mezcla una vez mezclada; la primera definición de un acrónimo u otra abreviación se aplica a todos los usos posteriores de la misma abreviatura y se aplica por analogía a las variaciones gramaticales normales de la abreviatura definida inicialmente; y, a menos que se indique expresamente lo contrario, la medición de una propiedad se determina mediante la misma técnica a la que se ha hecho referencia anteriormente o después para la misma propiedad.

También debe entenderse que esta invención no está limitada a las realizaciones y métodos específicos descritos a continuación, ya que los componentes específicos y/o las condiciones específicas pueden, por supuesto, variar. Además, la terminología utilizada en este documento se usa solo con el fin de describir realizaciones particulares de la presente invención y no pretende ser de ninguna manera limitante.

También debe observarse que, tal como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, la forma singular "un", "uno(a)", "el" y "la", comprenden referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la referencia a un componente en singular pretende comprender una pluralidad de componentes.

La expresión "aminoácido esencial" se refiere a aminoácidos que un organismo no puede sintetizar. En los seres humanos, los aminoácidos esenciales incluyen isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina. Además, los siguientes aminoácidos también son esenciales en los seres humanos en ciertas condiciones: histidina, tirosina y selenocisteína.

Los términos "kilocaloría" (kcal) y "caloría" se refieren a las calorías de los alimentos. El término "caloría" se refiere a la denominada pequeña caloría.

5 El término "paciente" se refiere a un ser humano o animal, incluidos todos los mamíferos, tales como primates (particularmente primates superiores), ovejas, perros, roedores (por ejemplo, ratón o rata), cobaya, cabra, cerdo, gato, conejo y vaca.

El término "inanición" significa someter a una célula o a un paciente a un aporte reducidos o nulo de nutrientes.

10 El término "cáncer" se refiere a una enfermedad o trastorno caracterizado por división descontrolada de células y por la capacidad de estas células a propagarse, ya sea por crecimiento directo en tejido adyacente a través de invasión, o por implantación en sitios distantes por metástasis. Cánceres ejemplares incluyen, pero no se limitan a, cáncer primario, cáncer metastásico, carcinoma, linfoma, leucemia, sarcoma, mesotelioma, glioma, germinoma, coriocarcinoma, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer gastrointestinal, 15 cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de endometrio, cáncer de ovario, melanoma, cáncer de cerebro, cáncer testicular, cáncer de riñón, cáncer de piel, cáncer de tiroides, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de hígado, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer intestinal, cáncer de colon, cáncer de recto, mieloma, neuroblastoma, feocromocitoma y retinoblastoma.

20 En general, se encuentra que la inanición a corto plazo (ICP o ayuno) impide selectivamente el crecimiento de los tumores y protege a las células normales de la toxicidad de la quimioterapia, pero sensibiliza a esta a las células cancerosas. Las realizaciones específicas de métodos y composiciones que logran este objetivo se exponen a continuación. Aunque la operativa de la presente invención no está limitada a ningún mecanismo particular, la protección observada en diversas realizaciones de la presente invención se debe en parte a la modulación de la ruta 25 de IGF-I y a los niveles de glucosa, sin interferir con su efecto sobre las células cancerosas (Resistencia al estrés diferencial, RED). La base del efecto protector del ayuno parece estar basada en la capacidad de redistribuir energía a la protección/mantenimiento de la reproducción/crecimiento cuando los nutrientes son escasos o no hay. Debe señalarse que, la restricción dietética a largo plazo causa una reducción mucho más moderada en IGF-I y glucosa en comparación con el ayuno. Además, a diferencia del ayuno, la restricción dietética a largo plazo no es factible 30 para la gran mayoría de los pacientes con cáncer ya que causa pérdida de peso crónica y es muy difícil de mantener. En cambio, un promedio de aproximadamente 62 horas de ayuno antes y 24 horas después de la quimioterapia fue bien tolerado por pacientes con cáncer que recibieron una variedad de tratamientos tóxicos.

35 También se debe señalar que las mutaciones oncogénicas, que generalmente se encuentran en rutas asociadas al crecimiento celular y a la respuesta al estrés, impiden el cambio al modo de alta protección en las células malignas y continúan promoviendo el crecimiento o un estado asociado al crecimiento incluso durante el ayuno. Los estudios realizados en levaduras y mamíferos han sugerido que la sensibilización de las células malignas a toxinas/oxidantes puede ser en gran parte independiente del tipo de mutaciones oncogénicas debido a la redundancia en la ruta pro-crecimiento en la inhibición de la entrada al modo protegido, lo que indica que la gran mayoría de las células cancerosas y tipos de cáncer no deberían protegerse en respuesta a ICP o a un nivel bajo de IGF-I. 40

En el presente documento se describe un método para aliviar el crecimiento del cáncer o un síntoma de cáncer. Se identifica a un paciente con cáncer y después se le proporciona una primera dieta durante un primer período de tiempo predeterminado. La primera dieta proporciona al paciente como máximo el 50 % de la ingesta calórica normal del paciente, procediendo al menos el 50 % de las kilocalorías de grasas, preferiblemente grasas 45 monoinsaturadas. La ingesta calórica normal del paciente es la cantidad de kcal que el paciente consume para mantener su peso. La ingesta calórica normal del paciente se puede estimar preguntando al paciente o considerando el peso del paciente. Como una guía aproximada, la ingesta calórica normal del paciente es, en promedio, de 2600 kcal/día para los hombres y de 1850 kcal/día para las mujeres. En un refinamiento, la primera dieta proporciona al paciente entre 700 y 1200 kcal/día. En un refinamiento particularmente útil, la primera dieta proporciona al paciente de peso promedio, aproximadamente 1100 kcal/día y a la paciente de peso promedio, 900 kcal/día. Por lo general, el primer período de tiempo predeterminado es de aproximadamente 1 a 5 días. En un refinamiento, el primer período de tiempo predeterminado es de 1 día. Para no desproporcionar el nivel de grasa en la primera dieta, la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos recomienda la siguiente 50 distribución nutricional para una dieta típica de 2000 kilocalorías por día: 65 gramos de grasa (aproximadamente 585 kilocalorías), 50 gramos de proteína (aproximadamente 200 kilocalorías), 300 gramos totales de hidratos de carbono (aproximadamente 1200 kilocalorías). Por lo tanto, en una versión de la primera dieta, se elimina gran parte de las calorías de los hidratos de carbono y proteínas.

60 Aunque la primera dieta incluye prácticamente cualquier fuente de grasa, son particularmente útiles fuentes con alto contenido en grasas insaturadas, incluidas las grasas monoinsaturadas y poliinsaturadas, (por ejemplo, ácidos grasos esenciales omega-3/6). Los ejemplos adecuados de fuentes de alimentos con grasas monoinsaturadas incluyen, pero no se limitan a, mantequilla de cacahuete, aceitunas, nueces (por ejemplo, almendras, pacanas, pistachos, anacardos), aguacate, semillas (por ejemplo, de sésamo), aceites (por ejemplo, de oliva, sésamo, 65 cacahuete, colza), etc. Los ejemplos adecuados de fuentes de alimentos con grasas poliinsaturadas incluyen, pero no se limitan a, nueces, semillas (por ejemplo, de calabaza, girasol), semillas de lino, pescado (por ejemplo, salmón,

atún, caballa), aceites (por ejemplo, cártamo, soja, maíz). La primera dieta también incluye un componente seleccionado del grupo que consiste en extractos de verduras, minerales, ácidos grasos esenciales omega-3/6 y combinaciones de los mismos. En un refinamiento, dicho extracto de verduras proporciona el equivalente a 5 porciones diarias recomendadas de verduras. Las fuentes adecuadas para el extracto de verduras incluyen, pero no se limitan a, col china, col rizada, lechuga, espárrago, zanahoria, calabaza, alfalfa, guisantes verdes, tomate, repollo, coliflor y remolacha. Las fuentes adecuadas para los ácidos grasos esenciales omega-3/6 incluyen pescado, tal como salmón, atún, caballa, anchoa, pez espada y similares.

El paciente recibe después una segunda dieta durante un segundo período de tiempo predeterminado. La segunda dieta proporciona al paciente un máximo de 500 kcal/día. En un refinamiento, la segunda dieta proporciona al paciente un máximo de 200 kcal/día. Por lo general, el segundo período de tiempo predeterminado es de aproximadamente 2 a 7 días. En un refinamiento particularmente útil, el segundo período de tiempo predeterminado es de 3 días. En otro refinamiento más, la segunda dieta incluye un componente seleccionado del grupo que consiste en extractos de verduras, minerales, ácidos grasos esenciales omega-3/6 y combinaciones de los mismos. En un refinamiento, dicho extracto de verduras proporciona el equivalente a 5 porciones diarias recomendadas de verduras. Las fuentes adecuadas para el extracto de verduras incluyen, pero no se limitan a, col china, col rizada, lechuga, espárrago, zanahoria, calabaza, alfalfa, guisantes verdes, tomate, repollo, coliflor y remolacha. Las fuentes adecuadas para los ácidos grasos esenciales omega-3/6 incluyen aceites de pescado de salmón, atún, caballa, anchoa, pez espada y similares.

La efectividad de la primera y segunda dieta se controla midiendo diversos parámetros del paciente. Por ejemplo, es deseable que la concentración en suero de IGF-I del paciente se reduzca en un 25 – 90 % al final del segundo período de dieta. También es deseable que la concentración de glucosa en sangre en el paciente se reduzca en un 25 - 75% al final del segundo período de dieta.

En una variación, al paciente se le proporciona una tercera dieta durante un tercer período de tiempo predeterminado. La tercera dieta es para complementar la dieta normal del paciente. Característicamente, la composición reponedora incluye aminoácidos esenciales, minerales y grasas esenciales. Favorablemente, la tercera dieta permitirá que el paciente recupere su peso normal y maximice su resistencia. Por lo general, el tercer período de tiempo predeterminado es de al menos 5 días. La composición reponedora también incluirá opcionalmente diversos componentes adicionales. Por ejemplo, la composición reponedora puede incluir un extracto de verduras. En un refinamiento, dicho extracto de verduras proporciona el equivalente a 5 porciones diarias recomendadas de verduras. Las fuentes adecuadas para el extracto de verduras incluyen, pero no se limitan a, col china, col rizada, lechuga, espárrago, zanahoria, calabaza, alfalfa, guisantes verdes, tomate, repollo, coliflor y remolacha. La composición reponedora también puede incluir ácidos grasos esenciales omega-3/6 y aminoácidos no esenciales. Los ejemplos de aminoácidos no esenciales adecuados incluyen, pero no se limitan a, histidina, serina, taurina, tirosina, cisteína, glutamina y combinaciones de los mismos. La composición reponedora también puede incluir un comprimido multimineral que contenga hierro, cinc, cobre, magnesio y calcio y también puede contener un complejo de vitamina B que incluye vitamina B12.

Se describe un método para sensibilizar el cáncer a los fármacos quimioterapéuticos. Se identifica a un paciente con cáncer y después se le proporciona una primera dieta durante un primer período de tiempo predeterminado. Los ejemplos de cánceres que son susceptibles al presente método incluyen, pero no se limitan a, cáncer de piel, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de próstata, glioma, melanoma, neuroblastoma y feocromocitoma. La primera dieta proporciona al paciente como máximo el 50 % de la ingesta calórica normal del paciente, procediendo al menos el 50 % de las kilocalorías de grasas. Por lo general, el primer período de tiempo predeterminado es de aproximadamente 1 a 5 días. En un refinamiento, el primer período de tiempo predeterminado es de 1 día. Como se expuso anteriormente, la primera dieta incluye prácticamente cualquier fuente de grasa, prefiriéndose las fuentes con alto contenido de grasas insaturadas, en particular las fuentes de grasas monoinsaturadas. Ejemplos adecuados de fuentes de alimentos con grasas monoinsaturadas incluyen, pero no se limitan a, mantequilla de cacahuete, aceitunas, nueces (por ejemplo, almendras, pacanas, pistachos, anacardos), aguacate, semillas (por ejemplo, de sésamo), aceites (por ejemplo, de oliva, sésamo, cacahuete, colza), etc. Los ejemplos adecuados de fuentes de alimentos con grasas poliinsaturadas incluyen, pero no se limitan a, nueces, semillas (por ejemplo, de calabaza, girasol), semillas de lino, pescado (por ejemplo, salmón, atún, caballa), aceites (por ejemplo, cártamo, soja, maíz). Los detalles adicionales de la primera dieta son los mismos que los expuestos anteriormente.

Después, el paciente recibe una segunda dieta durante un segundo período de tiempo predeterminado. La segunda dieta proporciona al paciente un máximo de 500 kcal/día. En un refinamiento, la segunda dieta proporciona al paciente un máximo de 200 kcal/día. Por lo general, el segundo período de tiempo predeterminado es de aproximadamente 2 a 7 días. En un refinamiento particularmente útil, el segundo período de tiempo predeterminado es de 3 días. Los detalles adicionales de la segunda dieta son los mismos que los expuestos anteriormente.

Se administra un agente quimioterapéutico al paciente durante o después de que el paciente consuma la segunda dieta. Por lo general, el agente quimioterapéutico se administra después de 48-72 horas de la segunda dieta. Se aprecia fácilmente que el presente método es efectivo prácticamente con cualquier agente quimioterapéutico. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos útiles incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes de ADN, oxidantes, inhibidores de topoisomerasa y combinaciones de los mismos. Los ejemplos específicos de agentes quimioterapéuticos útiles incluyen, pero no se limitan a, metanosulfonato de metilo, ciclofosfamida, etopósido y otros inhibidores de topoisomerasa, doxorubicina, cisplatino, carboplatino y otros fármacos basados en platino, gemcitabina, docetaxel o 5-FU.

En una variación, al paciente se le proporciona posteriormente una tercera dieta durante un tercer período de tiempo predeterminado. La tercera dieta complementa la ingesta calórica normal del paciente e incluye una composición reponedora. Característicamente, la composición reponedora incluye aminoácidos esenciales. La composición reponedora también puede incluir fuentes naturales de ácidos grasos esenciales, vitaminas y minerales y un comprimido multimineral que contenga hierro, cinc, cobre, magnesio y calcio y también puede contener un complejo de vitamina B que incluye vitamina B12.

Como se expuso anteriormente, la tercera dieta, junto con la dieta normal del paciente, permitirá al paciente recuperar su peso normal y maximizar su resistencia. Por lo general, el tercer período de tiempo predeterminado es de al menos 5 días y puede continuar indefinidamente. En un refinamiento, el tercer período de tiempo predeterminado es de aproximadamente 4 días a aproximadamente 14 días. Se estima que una semana es casi óptima para este propósito. La composición reponedora también incluirá opcionalmente diversos componentes adicionales. Por ejemplo, la composición reponedora puede incluir un extracto de verduras. En un refinamiento, dicho extracto de verduras proporciona el equivalente a 5 porciones diarias recomendadas de verduras. Las fuentes adecuadas para el extracto de verduras incluyen, pero no se limitan a, col china, col rizada, lechuga, espárrago, zanahoria, calabaza, alfalfa, guisantes verdes, tomate, repollo, coliflor y remolacha. La composición reponedora también puede incluir ácidos grasos esenciales omega-3/6 y aminoácidos no esenciales. Los ejemplos de aminoácidos no esenciales adecuados incluyen, pero no se limitan a, histidina, serina, taurina, tirosina, cisteína, glutamina y combinaciones de los mismos. Los detalles adicionales de la tercera dieta son los mismos que los establecidos anteriormente.

El método de la presente divulgación proporciona diversas ventajas terapéuticas. Por ejemplo, el método permite proporcionar al paciente el agente quimioterapéutico durante un período de tiempo más largo de lo que ocurre en la práctica estándar para el agente quimioterapéutico cuando al paciente no se le proporciona la primera y la segunda dieta. Este aumento en la duración es el resultado de la primera y segunda dieta que disminuyen los efectos tóxicos de los agentes quimioterapéuticos y/o hacen que las células cancerosas sean más susceptibles a los agentes quimioterapéuticos que las células normales (es decir, no cancerosas). Para muchos pacientes, la primera y segunda dieta, que protegen al hospedador, permiten que el agente quimioterapéutico se administre en una mayor cantidad que en los protocolos de tratamiento que no utilizan la primera y segunda dieta. Por lo general, dichos agentes pueden administrarse en una cantidad que es al menos 10% mayor que las cantidades normalmente toleradas por el paciente. Sin embargo, en determinados pacientes, la dosis de dichos agentes puede aumentar de 10 % a 40 %. En dichos escenarios, el paciente puede tratarse de una manera más agresiva. En otro refinamiento, la primera y segunda dieta que sensibilizan al cáncer, permiten una menor cantidad de agente quimioterapéutico que la cantidad normal que debe proporcionarse al paciente mientras se mantiene una respuesta casi óptima o mejorada. En dichas circunstancias, los agentes quimioterapéuticos pueden administrarse en una cantidad que es al menos 10% menor que las cantidades administradas normalmente. En algunos pacientes, las dosis de dichos agentes pueden reducirse del 10 % al 40 % para reducir la toxicidad no deseada. El presente método también permite que continúe el tratamiento quimioterapéutico de pacientes que exhiben efectos secundarios tóxicos inaceptables. En dichas situaciones, se identifica a los pacientes que presentan un síntoma de toxicidad relacionado con el agente quimioterapéutico y después reciben la primera, segunda y tercera dieta, de la manera y duración indicadas anteriormente. Favorablemente, el presente método también permite el tratamiento continuo de pacientes que se han identificado como pacientes terminales y que, de otro modo, interrumpirían la terapia. En otra variación más, la primera y la segunda dieta se administran durante la administración prolongada de los agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, 5 días de tratamiento con 5-FU.

También se desvela un método para sensibilizar el cáncer a la radioterapia. Se identifica a un paciente con cáncer y después se le proporciona una primera dieta durante un primer período de tiempo predeterminado. Los ejemplos de cánceres que son susceptibles al presente método incluyen, pero no se limitan a, cáncer de piel, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de próstata, glioma, melanoma, neuroblastoma y feocromocitoma. La primera dieta proporciona al paciente como máximo el 50 % de la ingesta calórica normal del paciente, procediendo al menos el 50 % de las kilocalorías de grasas. Por lo general, el primer período de tiempo predeterminado es de aproximadamente 1 a 5 días. En un refinamiento, el primer período de tiempo predeterminado es de 1 día. Como se expuso anteriormente, la primera dieta incluye prácticamente cualquier fuente de grasa, prefiriéndose las fuentes con alto contenido de grasas insaturadas, en particular las fuentes de grasas monoinsaturadas. Ejemplos adecuados de fuentes de alimentos con grasas monoinsaturadas incluyen, pero no se limitan a, mantequilla de cacahuete, aceitunas, nueces (por ejemplo, almendras, pacanas, pistachos, anacardos), aguacate, semillas (por ejemplo, de sésamo), aceites (por ejemplo, de

oliva, sésamo, cacahuete, colza), etc. Los ejemplos adecuados de fuentes de alimentos con grasas poliinsaturadas incluyen, pero no se limitan a, nueces, semillas (por ejemplo, de calabaza, girasol), semillas de lino, pescado (por ejemplo, salmón, atún, caballa), aceites (por ejemplo, cártamo, soja, maíz). Los detalles adicionales de la primera dieta son los mismos que los expuestos anteriormente.

Después, el paciente recibe una segunda dieta durante un segundo período de tiempo predeterminado. La segunda dieta proporciona al paciente un máximo de 500 kcal/día. En un refinamiento, la segunda dieta proporciona al paciente un máximo de 200 kcal/día. Por lo general, el segundo período de tiempo predeterminado es de aproximadamente 2 a 7 días. En un refinamiento particularmente útil, el segundo período de tiempo predeterminado es de 3 días. Los detalles adicionales de la segunda dieta son los mismos que los expuestos anteriormente.

La radioterapia se administra al paciente durante o después de que el paciente consuma la segunda dieta. Por lo general, la radioterapia se administra después de 48-72 horas de la segunda dieta.

En una variación, al paciente se le proporciona posteriormente una tercera dieta durante un tercer período de tiempo predeterminado. La tercera dieta complementa la ingesta calórica normal del paciente e incluye una composición reponedora. Característicamente, la composición reponedora incluye aminoácidos esenciales. La composición reponedora también puede incluir fuentes naturales de ácidos grasos esenciales, vitaminas y minerales y un comprimido multimineral que contiene hierro, cinc, cobre, magnesio y calcio y también puede contener un complejo de vitamina B que incluye vitamina B12.

Como se expuso anteriormente, la tercera dieta, junto con la dieta normal del paciente, le permitirá al paciente recuperar su peso normal y maximizar su resistencia. Por lo general, el tercer período de tiempo predeterminado es de al menos 5 días y puede continuar indefinidamente. En un refinamiento, el tercer período de tiempo predeterminado es de aproximadamente 4 días a aproximadamente 14 días. Se estima que una semana es casi óptima para este propósito. La composición reponedora también incluirá opcionalmente diversos componentes adicionales. Por ejemplo, la composición reponedora puede incluir un extracto de verduras. En un refinamiento, dicho extracto de verduras proporciona el equivalente a 5 porciones diarias recomendadas de verduras. Las fuentes adecuadas para el extracto de verduras incluyen, pero no se limitan a, col china, col rizada, lechuga, espárrago, zanahoria, calabaza, alfalfa, guisantes verdes, tomate, repollo, coliflor y remolacha. La composición reponedora también puede incluir ácidos grasos esenciales omega-3/6 y aminoácidos no esenciales. Los ejemplos de aminoácidos no esenciales adecuados incluyen, pero no se limitan a, histidina, serina, taurina, tirosina, cisteína, glutamina y combinaciones de los mismos. Los detalles adicionales de la tercera dieta son los mismos que los expuestos anteriormente.

Se proporciona un envase de comida terapéutica para proporcionar comidas a un paciente con cáncer, que retrasa el crecimiento del cáncer y mejora la eficacia de los fármacos quimioterapéuticos. El envase de comida terapéutica está diseñado para proporcionar los requisitos nutricionales y calóricos apropiados de los métodos expuestos anteriormente. El envase de comida terapéutica incluye un primer componente de comida, un segundo componente de comida y una composición reponedora. El primer componente de comida proporciona los componentes nutricionales de la primera dieta expuesta anteriormente. El primer componente de comida se divide en porciones que proporcionan al paciente con cáncer como máximo el 50% de la ingesta calórica normal del paciente, procediendo al menos el 50% de las kilocalorías de la grasa. El primer componente de comida está en una cantidad suficiente para proporcionar comidas durante un primer período de tiempo predeterminado. En un refinamiento, el primer componente de comida también incluye extractos equivalentes a 5 porciones de verduras, así como ácidos grasos esenciales omega-3/6.

El segundo componente de comida proporciona los componentes nutricionales de la segunda dieta expuesta anteriormente. El segundo componente de comida se divide en porciones que proporcionan al paciente con cáncer como máximo 500 kcal/día. El segundo componente de comida está en una cantidad suficiente para proporcionar comidas durante un segundo período de tiempo predeterminado. El segundo componente de comida también incluye extractos equivalentes a 5 porciones de verduras, así como minerales y ácidos grasos esenciales omega-3/6.

La composición reponedora proporciona, al menos parcialmente, los componentes nutricionales de la tercera dieta expuesta anteriormente. Por lo general, la composición reponedora se combina con la dieta normal del paciente para proporcionarle una ingesta calórica algo normal. La composición reponedora incluye aminoácidos esenciales. La composición reponedora está en una cantidad suficiente para proporcionar la reposición durante un tercer período de tiempo predeterminado.

Como se expuso anteriormente, el primer componente de comida tiene alto contenido de grasa. Aunque el primer componente de comida incluye prácticamente cualquier fuente de grasa, se prefieren fuentes con alto contenido de grasas insaturadas, en particular fuentes de grasas monoinsaturadas, para minimizar los efectos secundarios cardiovasculares posiblemente perjudiciales de las grasas, particularmente en pacientes que harán un uso frecuente de esta dieta. Ejemplos adecuados de fuentes de alimentos monoinsaturados incluyen, pero no se limitan a, mantequilla de cacahuete, aceitunas, nueces (por ejemplo, almendras, pacanas, pistachos, anacardos), aguacate,

semillas (por ejemplo, de sésamo), aceites (por ejemplo, de oliva, sésamo, cacahuete, colza), etc. Los ejemplos adecuados de fuentes de alimentos con grasas poliinsaturadas incluyen, pero no se limitan a, nueces, semillas (por ejemplo, de calabaza, girasol), semillas de lino, pescado (por ejemplo, salmón, atún, caballa), aceites (por ejemplo, cártamo, soja, maíz). El primer componente de comida también incluye un componente seleccionado del grupo que consiste en extractos de verduras, minerales, ácidos grasos esenciales omega-3/6 y combinaciones de los mismos. En un refinamiento, dicho extracto de verduras proporciona el equivalente a 5 porciones diarias recomendadas de verduras. Las fuentes adecuadas para el extracto de verduras incluyen, pero no se limitan a, col china, col rizada, lechuga, espárrago, zanahoria, calabaza, alfalfa, guisantes verdes, tomate, repollo, coliflor y remolacha. Las fuentes adecuadas para los ácidos grasos esenciales omega-3/6 incluyen pescado, tal como salmón, atún, caballa, anchoa, pez espada y similares.

Como se expuso anteriormente, el segundo componente alimentario proporciona al paciente una cantidad muy baja de kcal. En un refinamiento, el segundo componente alimentario incluye un componente seleccionado del grupo que consiste en extractos de verduras, minerales, ácidos grasos esenciales omega-3/6 y combinaciones de los mismos. En un refinamiento, dicho extracto de verduras proporciona el equivalente a 5 porciones diarias recomendadas de verduras. Las fuentes adecuadas para el extracto de verduras incluyen, pero no se limitan a, col china, col rizada, lechuga, espárrago, zanahoria, calabaza, alfalfa, guisantes verdes, tomate, repollo, coliflor y remolacha. Las fuentes adecuadas para los ácidos grasos esenciales omega-3/6 incluyen pescado tal como salmón, atún, caballa, anchoa, pez espada y similares.

La composición reponedora está diseñada para que el peso y la resistencia normales del paciente se mantengan (o se restablezcan si se ha perdido peso). En un refinamiento, la composición reponedora incluye adicionalmente extractos equivalentes a 5 porciones de verduras así como minerales y ácidos grasos esenciales omega-3/6. Debe apreciarse que la composición reponedora se debe tomar con una dieta normal de manera que se alcancen los objetivos de peso y resistencia. Por lo general, la dieta normal proporcionará aproximadamente la ingesta calórica normal del paciente como se expuso anteriormente.

El envase de comida terapéutica también puede incluir instrucciones para administrar al paciente con cáncer el primer componente de comida, el segundo componente de comida y la composición reponedora. Las instrucciones proporcionarán los detalles expuestos anteriormente con respecto a los métodos. En un refinamiento, las instrucciones establecen que el primer componente alimentario se debe proporcionar al paciente durante un primer período de tiempo predefinido como se expuso anteriormente. Por lo general, el primer período de tiempo predeterminado es de aproximadamente 1 a 2 días. En un refinamiento, el primer período de tiempo predeterminado es 1 día. Las instrucciones también establecen que el segundo componente alimentario debe tomarse durante un segundo período de tiempo predeterminado como se expone anteriormente. Por lo general, el segundo período de tiempo predeterminado es de aproximadamente 2 a 7 días. En un refinamiento particularmente útil, el segundo período de tiempo predeterminado es de aproximadamente 3 días. Las instrucciones también establecen que la composición reponedora debe tomarse con la dieta normal y, en particular, con una cantidad suficiente de productos alimentarios adicionales para mantener o recuperar el peso y la resistencia del paciente. Por lo general, el tercer período de tiempo predeterminado es de al menos 5 días. En un refinamiento, el tercer período de tiempo predeterminado es de aproximadamente 4 días a aproximadamente 14 días. Se encuentra que una semana es casi óptima para este propósito.

En una variación, el envase alimentario terapéutico se envasa en un recipiente (por ejemplo, una caja). En un refinamiento, cada uno de los componentes de la primera comida y segunda comida se dividen en porciones diarias con etiquetas que así lo indican. En un refinamiento adicional, cada porción diaria se divide en tres comidas. Por lo general, cada comida será una combinación de comida sólida, un batido y una sopa (día 1) y solo sopas y batidos para los días 2, 3 y 4 (3 comidas/día). Cada envase también contendrá píldoras con ácidos grasos esenciales, minerales y vitaminas y/o extractos de verduras. La caja también contendrá un suministro de 1 semana de la dieta reponedora que será en forma de píldoras. En general, las fuentes no naturales de cualquier elemento en todos los componentes de la dieta se reducen al mínimo.

Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención. Los expertos en la materia reconocerán muchas variaciones que están dentro del alcance de las reivindicaciones.

Experimento 1

Se describen diez casos en los que los pacientes diagnosticados con una variedad de tumores malignos han ayunado voluntariamente antes (48-140 horas) y/o después (24-56 horas) de recibir quimioterapia. Ninguno de estos 10 pacientes, que recibieron un promedio de 4 ciclos de quimioterapia en combinación con ayuno, comunicó efectos secundarios significativos causados por el propio ayuno, además de hambre. La toxicidad se calificó según los Criterios de Toxicidad comunes (CTC) del Instituto Nacional del Cáncer (INC) y los efectos secundarios facilitados por los pacientes de cinco pacientes, indican que el ayuno puede proteger contra el cansancio, la debilidad y los efectos secundarios gastrointestinales. En aquellos pacientes cuyo avance del cáncer podría controlarse, el ayuno no impidió la reducción dependiente de quimioterapia de la masa tumoral o marcadores tumorales. Aunque se requieren ensayos clínicos controlados para determinar el papel del ayuno en la mejora de los resultados clínicos y

de la calidad de vida del paciente, los 10 casos aquí presentados sugieren que el ayuno, en combinación con la quimioterapia, es factible, seguro y tiene el potencial de aumentar la quimioterapia existente.

Se comunican diez casos de pacientes diagnosticados con varios tipos de cáncer, que voluntariamente ayunaron antes y después de la quimioterapia. Los resultados presentados, basados en los resultados de salud facilitados por los pacientes, y en las lecturas analíticas, sugieren que el ayuno es seguro y que puede reducir los múltiples efectos secundarios causados por la quimioterapia sin impedir la destrucción de las células cancerosas.

Caso 1:

Mujer caucásica de 51 años, diagnosticada con cáncer de mama en estadio IIA, a quien se la recomendó quimioterapia complementaria con docetaxel (DTX) y ciclofosfamida (PC). Dicha mujer ayunó antes de recibir su primera administración de quimioterapia. El régimen de ayuno consistió en una restricción calórica completa durante 120 horas antes y 60 horas después de la quimioterapia (180 horas en total), durante las cuales consumió solo agua y vitaminas. La paciente completó este ayuno prolongado sin mayores inconvenientes y perdió 3,1 kilos (7 libras) que se recuperaron al final del tratamiento (Figura 1H). Después del ciclo de quimioterapia con ayuno, la paciente sintió cansancio leve, xerostomía (sequedad de boca) e hipo (Figura 2); sin embargo, pudo realizar sus actividades diarias (trabajando hasta 12 horas al día). Por el contrario, en los ciclos de tratamiento con quimioterapia posteriores (segundo y tercero), recibió quimioterapia sin ayunar y refirió cansancio de moderado a intenso, debilidad, náuseas, cólicos abdominales y diarrea (Figura 2). Esta vez, los efectos secundarios la obligaron a dejar su horario de trabajo habitual. Para el 4º y último ciclo, optó por ayunar una vez más, aunque con un régimen diferente que consistía en ayunar 120 horas antes y 24 horas después de la quimioterapia. En especial, los efectos secundarios facilitados por la paciente fueron menores a pesar del daño acumulado esperado en los tejidos a causa de los ciclos previos. De acuerdo con esto, las lecturas de las analíticas confirman que el ayuno puede tener un efecto beneficioso en la protección de las células sanguíneas. El recuento total de leucocitos (L) y el recuento absoluto de neutrófilos (RAN) mostraron un ligero incremento, aunque constante, al nadir, cuando la quimioterapia fue precedida de ayuno (Figura 1A, C, Tabla 1). Además, se observó que los niveles de plaquetas no disminuyeron, sino que permanecieron estables o aumentaron durante el 1º y 4º ciclo, respectivamente, en ciclos de quimioterapia en ayunos. (Figura 1D). Curiosamente, después del 4º ciclo de quimioterapia combinado con ayuno de 144 horas, el RAN y los recuentos de L y plaquetas alcanzaron el nivel más alto desde el comienzo de la quimioterapia 80 días antes (Figuras 1A, C y D). En general, los valores de laboratorio y las encuestas basadas en CTC (criterios de toxicidad comunes), sugieren que el ayuno es seguro y podría conferir protección contra los efectos secundarios tóxicos de la quimioterapia para esta paciente.

Caso 2:

Varón caucásico de 68 años que fue diagnosticado en febrero de 2008 de adenocarcinoma esofágico. En el momento del diagnóstico, se encontró metástasis a la glándula suprarrenal izquierda en una exploración CT-PET (tomografía por emisión de positrones y tomografía computarizada), en consonancia con la enfermedad en estadio IV. El tratamiento inicial fue 5-fluorouracilo (5-FU) combinado con cisplatino (CDDP). Al mismo tiempo que esta quimioterapia, también recibió radiación localizada durante los dos primeros ciclos. A lo largo de este período, el paciente experimentó múltiples efectos secundarios que incluyeron debilidad intensa, mucho cansancio y vómitos, y neuropatía periférica significativa (Figura 3). Además, el paciente refirió disfagia intensa secundaria a mucositis grave, muy probablemente causada por el tratamiento de radiación. Durante el tercer ciclo, la administración de 5-FU tuvo que retirarse debido a náuseas intensas y vómitos refractarios (Figura 3). A pesar de la estrategia agresiva con quimioterapia y radiación, su enfermedad avanzó. El desarrollo de nuevas metástasis a la glándula suprarrenal derecha, al lóbulo inferior del pulmón derecho, al sacro izquierdo y a la apófisis coracoides, se demostró mediante una nueva CT-PET realizada en agosto de 2008. Esto provocó un aumento de su régimen de quimioterapia (4º ciclo). Se administró carboplatino (CBDCA) en combinación con DTX y 5-Fu (el 5-FU se administró durante 96 horas). El paciente incorporó un ayuno de 72 horas antes de la quimioterapia y de 51 horas después de la misma durante el 4º ciclo. La justificación de realizar un ayuno de 51 horas después de la quimioterapia horas fue protegerse contra la administración continuada de 5-FU. El paciente perdió aproximadamente 3,1 kilos (7 libras), 1,8 de los cuales se recuperaron durante los primeros días de la reanudación de la dieta normal (datos no mostrados). Aunque se utilizaron tres agentes quimioterapéuticos en combinación durante este ciclo, los efectos secundarios facilitados por el paciente fueron sistemáticamente menores en comparación con los de los ciclos de quimioterapia y alimentación a demanda (Figura 3). Antes de su 5º tratamiento con quimioterapia, el paciente optó por ayunar de nuevo. En lugar de recibir la infusión de 5-FU durante 96 horas, como lo hizo anteriormente, se administró la misma dosis de fármaco en 48 horas y el régimen de ayuno también se modificó a 48 horas antes y 56 horas después de la administración del fármaco. Curiosamente, no solo hubo menos efectos secundarios facilitados por el paciente, sino también una respuesta clínica alentadora documentada en una exploración CT-PET. En la exploración se observó disminución en el valor de captación estándar (VCE) de la masa esofágica principal, metástasis de las glándulas suprarrenales y el nódulo en el lóbulo inferior derecho del pulmón. Para el 6º, 7º y 8º ciclo, el paciente ayunó antes y después de los tratamientos de quimioterapia (Tabla 3). A pesar de la toxicidad acumulada esperada, la mayoría de los efectos secundarios se redujeron con el ayuno, excepto por la diarrea leve y los cólicos abdominales que se desarrollaron durante el 7º ciclo de quimioterapia. Era un cáncer muy agresivo y, a pesar de la quimioterapia bien tolerada, la enfermedad del paciente avanzó y el paciente falleció en febrero de 2009.

Caso 3:

Varón de 74 años que fue diagnosticado en julio de 2000 con adenocarcinoma de próstata bilateral, puntuación 7 de Gleason y nivel de APE de 5,8 ng/ml. Una prostatectomía realizada en septiembre de 2000 produjo niveles indetectables de APE hasta enero de 2003, cuando aumentó a 1,4 ng/ml. Se prescribió acetato de leuprolida junto con bicalutamida y finasterida. Sin embargo, la administración de estos medicamentos tuvo que suspenderse en abril de 2004 debido a efectos secundarios graves relacionados con la restricción de testosterona. Para controlar la enfermedad, se utilizaron diferentes fármacos, tales como pamoato de triptolerina, nilutamida, talidomida, CP y ketoconazol. En 2007, el nivel de APE del paciente alcanzó 9 ng/ml y se observaron nuevas metástasis durante una gammagrafía ósea. Semanalmente se administró DTX a 25 mg/m², pero los niveles de APE continuaban aumentando llegando a 40,6 ng/ml (datos no mostrados). Se añadió bevacizumab al tratamiento y solo entonces el APE disminuyó significativamente (datos no mostrados). Sistemáticamente, una gammagrafía ósea mostró una mejoría general. A lo largo de los ciclos con quimioterapia, el paciente experimentó efectos secundarios significativos que incluían cansancio, debilidad, sabor metálico en la boca, mareos, amnesia, deterioro de la memoria a corto plazo y neuropatía periférica (Figura 5). Después de suspender los tratamientos de quimioterapia, su APE aumentó rápidamente. DTX a 75 mg/m² en un ciclo de 3 semanas fue el régimen elegido y una vez más, el paciente padeció efectos secundarios significativos (Figura 5). En junio de 2008, la quimioterapia se detuvo. El paciente participó en un ensayo clínico en fase III con acetato de abiraterona, un medicamento que puede bloquear selectivamente CYP17, una enzima microsómica que cataliza una serie de reacciones críticas para la biosíntesis de andrógenos no gonadales (Derek Raghavan y Eric A. Klein J. CO 2008). Durante el ensayo clínico, los niveles de APE del paciente aumentaron hasta 20,9 ng/dl (Figura 4H), lo que provocó la reanudación de la quimioterapia. Esta vez, el paciente optó por ayunar antes de la quimioterapia. Sus regímenes de ayuno fueron en su mayoría 60 horas antes y 24 después de la administración del fármaco (Tabla 3). El nivel de APE disminuyó inmediatamente después de reiniciar los tratamientos de quimioterapia (DTX 75 mg/m²) y ayuno, y en especial, los efectos secundarios referidos por el paciente fueron considerablemente menores en comparación con los de los ciclos previos de quimioterapia y alimentación a demanda (Figura 5). De acuerdo con lo que experimenta el paciente, las lecturas de la analíticas fueron sistemáticamente estables y permanecieron dentro del intervalo normal a lo largo de los tratamientos (Figuras 4A-G). Durante los tres últimos ciclos, además de ayunar, el paciente se aplicó testosterona (en crema al 1 %) durante cinco días antes de la quimioterapia. Como consecuencia, el nivel de APE junto con el nivel de testosterona aumentó drásticamente. No obstante, 3 ciclos de quimioterapia combinada con ayuno redujeron el APE de 34,2 a 6,43 ng/ml (Figura 4H). Estos resultados no respaldan la posibilidad de que el ayuno pueda conferir protección parcial a las células cancerosas.

Caso 4:

Mujer caucásica de 61 años que fue diagnosticada en junio de 2008 con carcinoma de pulmón no microcítico (CPNMC) mal diferenciado. La masa, originalmente observada en una exploración por tomografía computarizada, demostró ser hipermetabólica en un estudio con PET (tomografía por emisión de positrones) (junio de 2008) que se correlacionaba con los resultados de la biopsia. En la misma exploración con PET se observó enfermedad metastásica diseminada en múltiples ganglios linfáticos del mediastino y perihiliares del lado izquierdo. También se observaron metástasis a huesos, hígado, bazo y páncreas. El tratamiento inicial comenzó con la administración de DTX 75 mg/m² y CBDCA 540 mg/m² cada 21 días. Aunque seguía una dieta regular, durante los 5 primeros ciclos perdió un promedio de 1,8 kilos (4 libras) después de cada quimioterapia; muy probablemente debido a la toxicidad de la misma. La paciente comunicó que tardó aproximadamente tres semanas en recuperar su peso original. Entre los efectos secundarios experimentados, refirió espasmos musculares intensos, neuropatía de las extremidades inferiores, cansancio significativo, llagas en la boca y la lengua, facilidad de producirse hematomas y molestias intestinales (Figura 7). Durante el sexto ciclo, que consistió en tomar los mismos fármacos en las mismas dosis, la paciente ayunó durante 48 horas antes y 24 horas después de la quimioterapia. Durante este período, perdió aproximadamente 2,7 kilos (6 libras), que se recuperaron en 10 días (datos no mostrados). Además de cansancio leve y debilidad, la paciente no refirió ningún otro efecto secundario que experimentase durante los cinco ciclos previos (Figura 7). Cabe señalar que, los efectos secundarios acumulados, tales como la neuropatía periférica, la alopecia o deterioro de la memoria a corto plazo, pueden no invertirse mediante el ayuno una vez que se hayan desarrollado. Por el contrario, los efectos secundarios tóxicos agudos, se evitaron con éxito cuando se administró quimioterapia en ayunas (Figura 7). Después del sexto y último ciclo, la paciente refirió que su energía se recuperó rápidamente al caminar 4,8 kilómetros (3 millas) solo tres días después de la administración del fármaco. No se observaron diferencias significativas en la analítica de la paciente (Figura 6A-G). El último estudio radiológico (PET) realizado en febrero de 2009 mostró enfermedad estable en la masa principal (lóbulo inferior del pulmón izquierdo) y disminución de la captación del marcador en el bazo y el hígado en comparación con su estudio de referencia.

Caso 5:

Paciente de 74 años, diagnosticada en 2008 de carcinoma seroso papilar uterino en estadio IV. Se recomendó realizar histerectomía abdominal total con salpingooforectomía bilateral (TAH-BSO) seguida de quimioterapia complementaria. Además, se extirparon los ganglios linfáticos pélvicos, periaórticos y precava. Finalmente, debido a un importante agrandamiento del uréter derecho, también se realizó una nefrectomía derecha. Se administraron seis ciclos de CBDCA (480 mg) y paclitaxel (280 mg) cada 21 días. Durante el primer tratamiento, la paciente tuvo una

dieta regular y experimentó cansancio, debilidad, alopecia, cefalea y molestias gastrointestinales (Figura 8). Por el contrario, durante el ciclo 2-6, la paciente ayunó antes y siguió la administración del fármaco y refirió una reducción en los efectos secundarios desarrollados después de la quimioterapia (Tabla 3, Figura 8). De acuerdo con otros informes, el ayuno no interfirió con la destrucción, dependiente de quimioterapia, de las células cancerosas, documentado por la reducción del 87 % del marcador tumoral CA-125 después del 4º ciclo (datos no mostrados).

Caso 6:

Paciente de raza blanca de 44 años, diagnosticada de masa ovárica derecha (10x12 cm.) en julio de 2007. Se realizó cirugía (TAH-BSO). El tumor no mostró invasión de la cápsula ovárica y los más de 30 ganglios linfáticos fueron negativos. Su enfermedad fue clasificada como carcinosarcoma en estadio IA del ovario. El tratamiento inicial implementado fue un programa de seis ciclos de ifosfamida y CDDP, que el paciente recibió de julio a noviembre de 2007. Su primera tomografía computarizada, realizada en enero de 2008, no mostró enfermedad extra ovárica. Siete meses después, una resonancia magnética reveló múltiples nuevos nódulos pulmonares. Este hallazgo se confirmó con una tomografía computarizada donde se visualizaron más de 20 nódulos nuevos dentro de los pulmones junto con algunas anomalías (imágenes hipodensas = MTS?) en la región esplénica y cambios degenerativos en la columna vertebral. En base a estos resultados, se eligió un nuevo régimen de medicamentos que incluía Taxol, carboplatino y Avastin. Las infusiones comenzaron en agosto de 2008 y se realizaron en un calendario de 3 semanas. Al mismo tiempo, la paciente recibió un complemento de altas dosis de vitamina C (50 mg/día). En septiembre de 2008, una nueva evaluación con una tomografía computarizada mostró una disminución notable en el tamaño y el número de nódulos pulmonares bilaterales dispersos múltiples. Sin embargo, en noviembre, una tomografía computarizada mostró que uno de los nódulos principales aumentó de 0,5 a 0,8 cm, lo que indicaba el avance de la enfermedad. Se prescribió un nuevo tratamiento que consistía en gemcitabina el primer día seguido de gemcitabina y docetaxel el octavo día. Sin embargo, después de la primera administración de gemcitabina a dosis completa (900 mg/m²), la paciente experimentó neutropenia (Figura 9A) y trombocitopenia (Figura 9D) prolongadas lo que obligó a la suspensión del tratamiento de seguimiento. Durante el segundo ciclo, la paciente recibió una dosis reducida de gemcitabina (720 mg/m²), pero nuevamente desarrolló neutropenia y trombocitopenia prolongadas, lo que dificultó completar el programa original. Antes del tercer ciclo, la paciente ayunó durante 62 horas antes y 24 horas después de la quimioterapia. La paciente no refirió efectos secundarios, independientemente de si había ayunado o no, pero curiosamente su analítica mostró una mejora notable durante los tratamientos de quimioterapia en ayunas (Figura 10). Se observó una tendencia en la que los nadir eran ligeramente menos pronunciados y los cenit eran considerablemente más altos en el recuento absoluto de neutrófilos (RAN), linfocitos y leucocitos (Figuras 9A, B, C, respectivamente, Tabla 2). Además, la gemcitabina sola, durante la 1ª y la 2ª quimioterapia, condujo a una disminución rápida y pronunciada del recuento de plaquetas, que tardó 11 y 12 días en recuperarse, respectivamente. (Tabla 2). Sin embargo, los recuentos de plaquetas no disminuyeron, sino que aumentaron, después del primer tratamiento combinado de ayuno y gemcitabina (3er ciclo) (Figura 9D). El nadir plaquetario alcanzó un nivel más bajo en comparación con los tratamientos previos de quimioterapia solo, lo que podría explicarse por el efecto aditivo de tres agentes quimioterapéuticos (Figura 9D, Tabla 2). No obstante, el cenit en los números de plaquetas y el tiempo para recuperar el nivel normal fueron mucho más pronunciados y acortados, respectivamente, durante los tratamientos de quimioterapia en ayunas en comparación con la quimioterapia sola (Figura 9D, Tabla 2). Esta mejora significativa y recuperación más rápida de plaquetas después ayuno/quimioterapia múltiple no solo permitió a la paciente completar su quimioterapia, sino que también sugiere que esta estrategia puede tener efectos protectores sobre los precursores de las células sanguíneas, permitiendo una repoblación más rápida de trombocitos y granulocitos.

Caso 7:

Varón caucásico de 66 años, diagnosticado en julio de 1998 de adenocarcinoma de próstata, puntuación 8 de Gleason. Un estudio ProstaScint realizado en el mismo año mostró captación positiva del radiotrazador en los ganglios ilíacos derechos, en consonancia con enfermedad en etapa D1. En 1998, el paciente recibió acetato de leuprolida y bicalutamida por primera vez. En septiembre 1999, esos fármacos desaparecieron y tomó finasteride. En diciembre de 2000, una tomografía computarizada insinuó un avance local de la enfermedad. Comenzó el segundo ciclo con acetato de leuprolida y también recibió braquiterapia de alta tasa de dosis (ATD) y radiación de haz externo con radioterapia de intensidad modulada (RTIM). Se aplicó tratamiento complementario con múltiples fármacos tales como bicalutamida, pamoato de triptolerina y nandrolona para controlar la enfermedad. Sin embargo, su nivel de APE aumentaba rápidamente cada vez que se detenía el tratamiento. En abril de 2008, un escáner Combidex reveló una masa pélvica de 3 x 5 cm e hidronefrosis izquierda; En junio del mismo año, una nueva recaída del APE, junto con una nueva tomografía computarizada que confirmó aún más la masa en la zona ilíaca izquierda, provocó los tratamientos con DTX. El paciente decidió ayunar 60-66 horas antes y 8-24 horas después de la quimioterapia (Tabla 3). Durante el ayuno, el paciente sintió sensación de mareo y una disminución significativa de la presión arterial, pero los efectos secundarios facilitados el paciente después de la quimioterapia fueron casi inexistentes excepto por la leve sensación vibratoria en los pies desarrollada después de siete ciclos consecutivos de DTX (Figura 12). Después de realizar las lecturas analíticas del paciente, se encontró que los niveles de RAN, L, plaquetas y linfocitos se mantuvieron en el intervalo normal, mientras que los eritrocitos y sus parámetros asociados (hematocrito y hemoglobina) no lo hicieron (Figuras 11A-G). Esto sugiere que algunas células sanguíneas pueden beneficiarse de la protección dependiente de ayuno mientras que otras no. Por último, los niveles de APE a lo largo

de los ciclos, mostraron una tendencia decreciente constante que confirma que el ayuno no interfirió con la destrucción de las células de cáncer de próstata (Figura 11H).

Caso 8:

Paciente caucásica de 53 años, diagnosticada de cáncer de mama en estadio IIA (HER2+). Después de una lumpectomía realizada en 2008, la paciente se sometió a 4 ciclos de quimioterapia programados cada 21 días. El régimen incluyó DXT (75 mg/m²) y CP (600 mg/m²). A lo largo de 4 ciclos, la paciente ayunó 64 horas antes y 24 horas después de la administración de quimioterapia. Los efectos secundarios referidos incluyeron debilidad leve y deterioro leve de la memoria a corto plazo (Figura 13).

Caso 9:

Paciente caucásica de 48 años, diagnosticada de cáncer de mama a quien se recomendó quimioterapia complementaria. Su régimen de quimioterapia consistió en 4 ciclos de doxorubicina (DXR) (110 mg) combinados con CP (1100 mg) en el programa de 21 días seguido de paclitaxel y trastuzumab semanalmente durante 12 semanas. Antes de su primer tratamiento de quimioterapia, la paciente ayunó durante 48 horas y no refirió efectos adversos. Durante el segundo ciclo, la paciente incorporó 60 horas de ayuno antes de la quimioterapia, seguido de 5 horas después de la administración del fármaco. Curiosamente, no expresó ninguna dificultad para seguir el ayuno. Aunque perdió el cabello y sintió debilidad leve, la paciente no padeció otros efectos secundarios comúnmente referidos por la quimioterapia (Figura 14).

Caso 10:

Mujer caucásica de 78 años, diagnosticada de cáncer de mama RER2 positivo. Tras el diagnóstico y después de una lumpectomía complicada, la paciente se sometió a una mastectomía total. Los oncólogos prescribieron seis ciclos de quimioterapia complementaria con CBDCA 400 mg (ABC = 6), DTX (75 mg/m²) complementado con G-CSF (Neulasta) y seguido de 6 meses con trastuzumab (Tabla 3). Durante los tratamientos de quimioterapia, la paciente ayunó antes y después de la administración del fármaco. Aunque la paciente adoptó variación del régimen de ayuno, no se experimentaron efectos secundarios graves (Figura 16, Tabla 3). Además, las lecturas analíticas de los niveles de L, RAN, plaquetas y linfocitos estaban dentro de los niveles normales (Figuras 15A-D) durante todo el tratamiento.

Para evaluar la gravedad de los efectos secundarios experimentados se obtuvieron evaluaciones facilitadas por los 10 pacientes. Dado que muchos de los efectos secundarios quimiotóxicos son acumulativos, se compararon los datos de la encuesta, incluidos todos los efectos secundarios de la quimioterapia asociados a ayuno combinado y sin ayuno (Figura 17 A). La toxicidad se calificó según los criterios de toxicidad comunes del Instituto Nacional del Cáncer. Alentadoramente, todos los pacientes refirieron los mejores resultados de salud facilitados, aunque los ciclos de quimioterapia con ayuno se realizaron principalmente en la parte posterior de la terapia. Las náuseas, vómitos, diarrea, cólicos abdominales y llagas bucales prácticamente no aparecían en los informes de los 10 pacientes cada vez que se administraban ciclos de quimioterapia, mientras que 5 de los 6 pacientes alimentados a demanda (Figura 17A) refirieron al menos uno de estos síntomas. Los cuatro pacientes que siempre ayunaron en combinación con todos los tratamientos de quimioterapia refirieron baja gravedad para la mayoría de los efectos secundarios (Figuras 12, 13, 14, 16). Solo se refirió debilidad moderada y pérdida de cabello por parte de varios pacientes. Para los 6 pacientes que recibieron quimioterapia en asociación con dieta a demanda o ayuno, la gravedad de los efectos secundarios facilitados por los pacientes se determinó al considerar solo los dos ciclos más próximos de quimioterapia en los que el paciente había ayunado o no. Hubo una reducción general y principal en la gravedad de muchos de los efectos secundarios facilitados por los pacientes en combinación con el ayuno (Figura 17B). Considerando que los síntomas, tales como el cansancio y la debilidad, se redujeron significativamente ($p < 0,001$ y $p < 0,00193$, respectivamente), nunca se refirieron vómitos y diarrea en combinación con ayuno, a pesar de que estos ciclos se llevaron a cabo sistemáticamente al final (Figura 17B). En especial, no hubo ningún efecto secundario incluido en las encuestas basadas en CTC (criterios de toxicidad comunes), cuya gravedad promedio aumentase con el ayuno (Figura 17A, 17B).

Los resultados de las encuestas, de un grupo pequeño y heterogéneo de pacientes, sugieren que el ayuno es seguro y bien tolerado en pacientes con cáncer y podría mejorar los múltiples efectos secundarios dependientes de la quimioterapia. Aunque el sesgo podría afectar a la estimación de los efectos secundarios por parte del paciente, la tendencia de las mejoras en las lecturas analíticas posteriores a la quimioterapia confirma que el ayuno podría proteger realmente contra diferentes fármacos quimioterapéuticos. En especial, se sabe que el ayuno protege a levaduras y ratones contra una variedad de toxinas y tensiones (Rafaghello, LPNAS 2008; Matsson, M. Annual Rev. Nutr2005) y, por lo tanto, un efecto protector contra múltiples fármacos quimioterapéuticos en seres humanos no sería sorprendente.

Resultados

En este estudio se muestra a diez pacientes con cáncer, 7 mujeres y 3 varones con una media de edad de 61 años (intervalo de 44 a 78 años) que reciben quimioterapia. Cuatro de ellos padecían cáncer de mama, dos cáncer de próstata y cuatro carcinoma de ovario, de cuello uterino y carcinoma de pulmón no microcítico, o adenocarcinoma esofágico. Todos los pacientes habían ayunado voluntariamente durante un total de 48 a 140 horas antes y/o de 24 a 56 horas después de la quimioterapia bajo la supervisión de sus oncólogos tratantes. El ayuno fue bien tolerado en todos los casos. El hambre y la disminución de la presión arterial fueron síntomas comunes citados por los pacientes después de los períodos de ayuno prolongado.

Análisis

Las recomendaciones dietéticas generales durante el tratamiento del cáncer se basan en objetivos generales para prevenir o invertir las deficiencias de nutrientes, preservar la masa corporal magra y minimizar los efectos secundarios relacionados con la nutrición (tales como disminución del apetito, náuseas, cambios de sabor o intestinales) (Doyle, Nutrition and Physical Activity During and After Cancer Treatment, 2006). Contrariamente a las dietas estándar posteriores a la quimioterapia, la mayoría de los pacientes en esta serie refirió que el ayuno era factible y beneficioso al reducir los efectos secundarios tales como cansancio, debilidad, náuseas, vómitos y cólicos abdominales. Las dolencias minoritarias surgieron durante el ayuno, entre las que se incluían mareos, hambre o cefalea, a un nivel que no interfirió con las actividades normales, incluido el trabajo.

La pérdida de peso es una gran preocupación en los pacientes con cáncer. Esto puede deberse al propio cáncer, a la disminución del apetito después de la quimioterapia o a daño gastrointestinal. En especial, en este informe de casos, la pérdida de peso durante el ayuno se recuperó rápidamente en la mayoría de los pacientes. Para los pacientes que recibieron quimioterapia tanto con ayuno como sin él, los efectos secundarios quimiotóxicos parecieron atenuarse durante los ciclos de quimioterapia y ayuno. Los síntomas que parecieron mejorar con esta intervención fueron principalmente gastrointestinales y constitucionales.

En las células no malignas, las condiciones arduas tales como el ayuno/la inanición de glucosa, estimulan al organismo a suprimir el crecimiento/la reproducción y desvían su energía hacia el mantenimiento/la reparación y maximizan sus posibilidades de supervivencia (Longo., Nature, 2005). Por lo tanto, los factores de crecimiento tales como IGF-I disminuyen (Thiessen, JP Endocrine Rev 1994; Stephen R. Spindler Annual review of nutrition 2007) y los mecanismos de resistencia al estrés, tales como la respuesta de proteínas desplegadas (RPD) incluyendo las proteínas de choque térmico (HSP 70) y las proteínas de respuesta a la glucosa (GRP 78), aumentan (Mote, PL Mechanism Age Dev 1998; Lee, AS Trends in biochemical science 2001; Ramachandra K. Reddy J. of Biological Chemistry 2003). Las células normales responderían a estos cambios, mientras que las células malignas no responderían debido a la autosuficiencia en las señales de crecimiento (Hanahan, Hallmarks of cancer). 2000). Por lo tanto, el ayuno protegería selectivamente a las células normales contra la toxicidad de la quimioterapia sin comprometer la actividad del fármaco en las células cancerosas.

Aunque los resultados son aún preliminares con solo 10 pacientes, no obstante son alentadores ya que la mayoría de los efectos secundarios presentados en este documento tienen un patrón acumulativo y el ciclo de quimioterapia y ayuno se llevó a cabo principalmente en la parte posterior de los tratamientos.

Tabla 1

| | Ciclo n° | Ayuno (horas) | Quimioterapia | Respuesta tumoral |
|--------|----------|--------------------|---|---|
| Caso 1 | 1 | 140 pre 40 post | Docetaxel 75 mg/m ² + Ciclofosfamida 600 mg/m ² | n/a |
| | 4 | 120 pre 24 post | Docetaxel 75 mg/m ² + Ciclofosfamida 600 mg/m ² | n/a |
| Caso 2 | 4 | 72 pre 51 post | Docetaxel 64,6 mg/m ² + Carboplatino 485 mg | --- |
| | 5 | 48 pre 56 post | Docetaxel 79 mg/m ² + Carboplatino 470 mg + 5FU 2415,7 mg/m ² | Enfermedad estable con exploración CT/ PET |

ES 2 659 353 T3

| | | | | |
|---------|------|-----------------------|--|--|
| | 6 | 48 pre 56 post | Docetaxel 79 mg/m ² + Carboplatino 470 mg En referencia al texto + 5FU 2415,7 mg/m ² | Mejora con exploración CT/PET |
| | 7 | 48 pre 56 post | Docetaxel 79 mg/m ² + Carboplatino 470 mg +5FU 2415,7 mg/m ² | |
| | 8 | 48 pre 56 post | Docetaxel 79 mg/m ² + Carboplatino 470 mg + 5FU 2415,7 mg/m ² | Avance de la enfermedad con exploración CT/PET |
| Caso 3 | 5-12 | 60-66 pre 24 post | Docetaxel 75 mg/m ² | Véase gráfico de APE |
| Caso 4 | 6 | 48 pre 24 post | Docetaxel 75 mg/m ² + Carboplatino 540 mg | Enfermedad estable con exploración CT/PET en referencia al texto |
| Caso 5 | 2 | 36 pre | Carboplatino 480 mg + Paclitaxel 280 mg | --- |
| | 3-4 | 60 pre | Carboplatino 480 mg + Paclitaxel 280 mg | Disminución de CA 125 de 87%, Reducción de CT en ganglios linfáticos |
| | 5-6 | 60 pre 24 post | Carboplatino 480 mg + Paclitaxel 280 mg | |
| Caso 6 | 3 | 62 pre 24 post | Gemcitabina 720 mg/m ² (día 1)+ GMZ 720 mg/m ² (día 8) | --- |
| | 4 | 62 pre 24 post | Gemcitabina 720 mg/m ² (día 1)+ GMZ 720 mg/m ² (día 8) | --- |
| | 5-6 | 602 pre 24 post | Gemcitabina 900 mg/m ² (día 1) + GMZ 900 mg/m ² Docetaxel 100 mg/m ² (día 8) | Enfermedad estable con exploración PET, sin nueva MTS |
| Caso 7 | 1 | 65 pre 8 post | Docetaxel 60 mg/m ² | Véase gráfico de APE |
| | 2-8 | 65 pre st post* | Docetaxel 75 mg/m ² | Véase gráfico de APE |
| Caso 8 | 1-4 | 64 pre 24 post** | Docetaxel 75 mg/m ² | Véase gráfico de APE |
| Caso 9 | 1 | 48 pre | Doxorrubicina 110 mg+ Ciclofosfamida 1100 mg | n/a |
| | 2-4 | 61 pre 4 post | Doxorrubicina 110 mg+ Ciclofosfamida 1100 mg | n/a |
| Caso 10 | 1 | 60 pre | Docetaxel 75 mg/m ² + Carboplatino 400 mg | n/a |
| | 2 | 48 pre | Docetaxel 75 mg/m ² + Carboplatino 400 mg | n/a |
| | 3 | 40 pre 24 post | Docetaxel 75 mg/m ² + Carboplatino 400 mg | n/a |
| | 4 | 48 pre 24 post | Docetaxel 75 mg/m ² + Carboplatino 400 mg | n/a |
| | 5 | 36 pre 24 post | Docetaxel 75 mg/m ² + Carboplatino 400 mg | n/a |
| | 6 | 20 pre 20 post | Docetaxel 75 mg/m ² + Carboplatino 400 mg | n/a |

* también se utilizó dieta hipoglucémica durante 24 horas antes del ayuno.
 ** también se utilizó dieta líquida durante 24 horas después del ayuno.
 n/a = no aplicable, debido a que la quimioterapia se administra en el entorno adyuvante.

Tabla 2

| Días | Tratamiento | Ayuno (horas) | | G-CSF | L | | | RAN | | | PLT | | | | | |
|------|---|---------------|------|-------|---------------|---------|-----------------------|---------------|---------------|---------|-----------------------|---------------|---------------|---------|-----------------------|---------------|
| | | pre | post | | Nadir* (Días) | Cél./ul | Recuperación** (Días) | Cénit Cél./ul | Nadir* (Días) | Cél./ul | Recuperación** (Días) | Cénit Cél./ul | Nadir* (Días) | Cél./ul | Recuperación** (Días) | Cénit Cél./ul |
| 4 | Gemcitabina (900 mg/m ²) | a | -- | -- | 7 | 900 | 16 | 9000 | 7 | 400 | 16 | 7500 | 10 | 63 | 11 | 203 |
| 25 | | | | G-CSF | | | | | | | | | | | | |
| 27 | Gemcitabina (720 mg/m ²) | a | -- | -- | 5 | 700 | 2 | 9200 | 5 | 700 | 2 | 8100 | 9 | 59 | 12 | 177 |
| 32 | | | | G-CSF | | | | | | | | | | | | |
| 33 | | | | G-CSF | | | | | | | | | | | | |
| 34 | | | | G-CSF | | | | | | | | | | | | |
| 36 | | | | G-CSF | | | | | | | | | | | | |
| 39 | | | | G-CSF | | | | | | | | | | | | |
| 41 | | | | G-CSF | | | | | | | | | | | | |
| 42 | | | | G-CSF | | | | | | | | | | | | |
| 43 | Gemcitabina (720 mg/m ²) | 62 | 24 | -- | 5 | 700 | 5 | 7800 | 5 | 700 | 5 | 6400 | -- | | -- | |
| 48 | | | | G-CSF | | | | | | | | | | | | |
| 49 | | | | G-CSF | | | | | | | | | | | | |
| 50 | | | | G-CSF | | | | | | | | | | | | |
| 51 | | | | G-CSF | | | | | | | | | | | | |
| 53 | Gemcitabina (720 mg/m ²) Docetaxel (80 mg/m ²) | 62 | 24 | | 4 | 1800 | 3 | 11800 | 4 | 1300 | 3 | 10700 | 8 | 27 | 10 | 280 |
| 54 | | | | G-CSF | | | | | | | | | | | | |
| 67 | Gemcitabina (720 mg/m ²) | 62 | 24 | -- | 9 | 2700 | 5 | 21400 | 9 | 1600 | 2 | 18600 | -- | | - | |
| 76 | Gemcitabina (720 mg/m ²) Docetaxel (80 mg/m ²) | 62 | 24 | -- | -- | | -- | | -- | | -- | | 8 | 38 | 6 | 286 |

| Días | Tratamiento | Ayuno (horas) | | L | | | RAN | | | PLT | | | | | | |
|------|--|---------------|------|------------------|---------|--------------------------|------------------|------------------|---------|--------------------------|------------------|------------------|---------|--------------------------|------------------|----|
| | | pre | post | Nadir* (Días) | Cél./ul | Recuperación** (Días) | Cémit Cél./ul | Nadir* (Días) | Cél./ul | Recuperación** (Días) | Cémit Cél./ul | Nadir* (Días) | Cél./ul | Recuperación** (Días) | Cémit Cél./ul | |
| 78 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 91 | Gemcitabina (720 mg/m ²) | 62 | 24 | | | | | | | | | | | | | |
| 96 | | | | | | 6 | 2300 | 1 | 16500 | 6 | 1500 | 1 | 15300 | -- | -- | -- |
| 97 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 98 | Gemcitabina (900 mg/m ²) Docetaxel (100 mg/m ²) | 62 | 24 | 6 | 2300 | 1 | 14600 | 6 | 1700 | 6 | 1700 | 1 | 12800 | 7 | 16 | 7 |
| 99 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 112 | Gemcitabina (900 mg/m ²) | | | | | | | | | | | | | | | |

Tabla 3

| Días Tratamiento | Ayuno (horas) | | L | | | | RAN | | | | |
|------------------|---|-----------|---------------|-----------|-----------------------|---------------|---------------|-----------|-----------------------|---------------|------|
| | Pre | Post | Nadir* (Días) | célula/ul | Recuperación** (Días) | Cénit Cél./ul | Nadir* (Días) | célula/ul | Recuperación** (Días) | Cénit Cél./ul | |
| 3 | Docetaxel 75 mg/m ² + Ciclofosfamida 600 mg/m ² | 140 | 40 | 15 | 1700 | 4 | 3900 | 15 | 561 | 4 | 2601 |
| 24 | Docetaxel 75 mg/m ² + Ciclofosfamida 600 mg/m ² | a demanda | -- | 12 | 1200 | 6 | 4600 | 12 | 120 | 6 | 3036 |
| 45 | Docetaxel 75 mg/m ² + Ciclofosfamida 600 mg/ m ² | a demanda | -- | 12 | 1500 | 8 | 4100 | 12 | 216 | 8 | 2932 |
| 66 | Docetaxel 75 mg/m ² + Ciclofosfamida 600 mg/ m ² | 120 | 24 | -- | -- | -- | 5200 | -- | -- | -- | 3567 |

Experimento 2

Con referencia a la Fig. 18, el ayuno sensibiliza a las células malignas a la irradiación. Células de mama murino (4T1-luc) se sembraron en placas de cultivo celular de 96 pocillos (20.000/pocillo), y se dejaron equilibrar y alcanzar la confluencia durante 48 horas. A continuación, el medio se cambió a medio con bajo o alto contenido de glucosa durante 48 horas antes de la irradiación (5 o 10 Gy, Figuras 18A, 18B). La viabilidad se determinó mediante el ensayo de MTT (Fig. 18C). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de la t de Student (N = 60).

Con referencia a la Fig. 19, el ayuno sensibiliza a las células malignas a la irradiación. Células de glioma murino (GL26) se sembraron en placas de cultivo celular de 96 pocillos (20.000/pocillo) y se dejaron equilibrar y alcanzar la confluencia durante 48 horas. A continuación, el medio se cambió a medio con bajo o alto contenido de glucosa durante 48 horas antes de la irradiación (5 o 10 Gy, Figuras 19A, 19B). La viabilidad se determinó mediante el ensayo de MTT (Fig. 19C). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de la t de Student (N = 60).

Con referencia a la Fig. 20, la ICP (ayuno) sensibiliza a las células de cáncer de mama murino a la irradiación y mejora el control tumoral en ratones. Ratones hembra BALB/c, que pesaban 20-25 g, recibieron una inyección por vía subcutánea de células singénicas de cáncer de mama (4T1-luc, 2×10^5 células/ratón). El día 13 el tumor avanzó significativamente a 300-500 mm³, y el tratamiento comenzó dejando a los ratones en ayunas durante 48 horas antes de la irradiación (IR; 5GY). El segundo ciclo de ICP/IR (3Gy) se realizó una semana después. El análisis estadístico se realizó utilizando cada día la prueba de la t de Student. * p <0,05.

Con referencia a la Fig. 21, la ICP (ayuno) sensibiliza a las células de cáncer de glioma murino a la irradiación y mejora el control tumoral en ratones. Ratones hembra C57BL/6, que pesaban 25-30 g, recibieron una inyección por vía subcutánea de células singénicas de cáncer de glioma (GL26; 3×10^5 células/ratón). El día 27 el tumor avanzó significativamente a 500-1000 mm³, y el tratamiento comenzó dejando a los ratones en ayunas durante 48 horas antes de la irradiación (IR; 7,5 Gy). El segundo ciclo de ICP/IR (3Gy) se realizó una semana después. El análisis estadístico se realizó utilizando cada día la prueba de la t de Student. * p <0,05.

Experimento 3

Se analizó una hipótesis de que los muchos cambios en las fuentes de energía, en el crecimiento y en otros factores extracelulares causados por el ayuno no solo impiden la protección, sino que también promueven la sensibilización de una gran variedad de células cancerosas a los fármacos quimioterapéuticos.

Para explorar si el ayuno puede mejorar sinérgicamente la toxicidad de la quimioterapia, se estudiaron varios modelos de cáncer de ratón utilizando células de cáncer de mama murino (4T1), melanoma (B16), glioma (GL26) y neuroblastoma murino (NXS2, Neuro-2-a), así como células de neuroblastoma humano (ACN). La inanición a corto plazo (ICP), o ayuno, se realizó retirando por completo el alimento durante 48-60 horas, con acceso ilimitado a agua. Como se esperaba, la quimioterapia administrada con una dieta a demanda retrasó el crecimiento de los tumores subcutáneos (Fig. 22 AC). Extraordinariamente, solo dos ciclos de ayuno (de 48 horas cada uno) fueron tan eficaces como dos ciclos de tratamiento de quimioterapia. Se observaron efectos similares en ratones portadores de masas subcutáneas de melanoma (células B16), aunque el efecto del ayuno solo no se mantuvo después del segundo ciclo (Fig. 22B), y también en ratones portadores de masas subcutáneas de glioma (células GL26) (Fig. 22C). El ayuno en el modelo de glioma se aplicó una sola vez debido al crecimiento tumoral inusualmente rápido en el grupo de control (a demanda, sin quimioterapia). El mayor índice terapéutico se observó cuando el ayuno se combinó con cualquiera de los fármacos quimioterapéuticos doxorubicina (DXR) o ciclofosfamida (PC), habitualmente utilizados, (Fig. 22 AC). Para el cáncer de mama 4T1, dos ciclos de ayuno dieron como resultado un tamaño tumoral de menos de la mitad en el grupo de tratamiento solo con CP, incluso 20 días después del último tratamiento (Fig. 22A). En los modelos de glioma y melanoma subcutáneos (Fig. 22 B-C) se observaron efectos similares. En particular, el peso corporal perdido durante el ayuno se recuperó por lo general a los 3 días de la realimentación, incluso después del tratamiento con quimioterapia (Fig. 23 A-D), confirmando que el ayuno no exacerba los efectos de los tumores y la quimioterapia sobre la pérdida de peso en ratones, de acuerdo con las observaciones del estudio preliminar de ayuno y quimioterapia en pacientes.

El efecto del ayuno sobre la quimioterapia se estudió en modelos metastásicos generados por inyecciones intravenosas de células de cáncer de mama murino (4T1), células de melanoma (B16) y 2 líneas celulares de neuroblastoma (NXS2 y Neuro-2a) en ratones inmunocompetentes. El ayuno potenció la quimioterapia y prolongó la supervivencia de todos los modelos de cáncer metastásico en ratones (Figuras 24-28). En el modelo metastásico de melanoma, los ratones se sacrificaron al principio para determinar el efecto de la ICP en la metástasis. Curiosamente, la ICP combinada con DXR causó una reducción en la metástasis de las células de melanoma B16 a diferentes órganos en comparación con los ratones que recibieron DXR con una alimentación normal (Fig. 25). Por ejemplo, se encontraron metástasis pulmonares en el 100 % frente al 65% de los ratones que recibieron DXR con alimentación normal y ayuno, respectivamente. Además, a diferencia de los ratones alimentados normalmente, no se detectó metástasis en el hígado o el bazo de los ratones en ayunas (Fig. 25).

Para evaluar el efecto de ciclos múltiples de ayuno y quimioterapia sobre un cáncer metastásico agresivo, se controló la supervivencia de 2 modelos de neuroblastoma metastásico en ratón. La supervivencia a largo plazo (más de 180 días) se logró en el 42 % de los ratones portadores de neuroblastoma murino (NXS2), que se sometieron a 2 ciclos de ayuno con dosis altas de DXR (16 mg/kg) (Fig. 26), en comparación con el 100 % de mortalidad en el grupo con alimento a demanda. Para el modelo de cáncer metastásico avanzado, a los ratones se les inyectó por vía intravenosa células de neuroblastoma murino (Neuro-2a) y se permitió que la propagación durante 9 días antes de iniciar la quimioterapia. Para analizar el efecto de la ICP en combinación con la terapia estándar en un modelo metastásico de neuroblastoma, el ayuno se combinó con un cóctel de dosis altas de quimioterapia, basado en el ampliamente utilizado para tratar esta neoplasia en niños (DXR 10 mg/kg + Cisplatino, CDDP, 8 mg/kg). Sorprendentemente, mientras que todos los ratones tratados con el cóctel de quimioterapia combinado con una dieta a demanda murieron el día 75, el 25 % de los ratones que ayunaron en combinación con el cóctel de quimioterapia lograron una supervivencia a largo plazo (más de 300 días) (Fig. 27). Para analizar si muchos ciclos de ayuno (ICP) pueden ser eficaces para retrasar el avance del neuroblastoma sin quimioterapia, pero también para analizar su efecto en un modelo tumoral humano, se realizaron 5 ciclos de ayuno en ratones lampiños inmunocomprometidos inyectados por vía subcutánea con células de neuroblastoma ACN humano (Fig. 29). Después de 36 días, 5 ciclos de ayuno pudieron limitar el tamaño del tumor a la mitad del alcanzado en ratones alimentados normalmente (Fig. 29).

Para el modelo de ayuno *in vitro*, las células cancerosas se incubaron en medios que contenían suero extraído de ratones alimentados a demanda o en ayunas durante 48 horas. De acuerdo con los resultados en ratones, las células de cáncer de mama (4T1) cultivadas en medio complementado con suero de ratones en ayunas se sensibilizaron tanto a DXR como a CP en comparación con el efecto de la incubación en suero de ratones alimentados a demanda (figura 30). Debido a que la reducción pronunciada de glucosa y factor de crecimiento (por ejemplo, la reducción del 75% en el factor de crecimiento IGF-I) son dos respuestas extracelulares clave al ayuno, las células se incubaron en diferentes concentraciones de glucosa y suero basadas en mediciones de glucemia de ratones alimentados normalmente y en ayunas (Fig. 31), es decir, incubación en niveles bajos de glucosa (0,5 g/l) con niveles bajos de suero (SBF al 1%), o niveles normales de glucosa (1,0 y 2, 0 g/l para líneas celulares humanas y murinas, respectivamente) con suero normal (SBF al 10%) durante 24 horas antes y también durante el tratamiento con fármaco (Fig. 32). De acuerdo con los estudios *in vivo*, la restricción de glucosa y suero sensibilizó a 15 de las 17 líneas de células de cáncer diferentes, incluyendo las células de melanoma murino (B16), glioma (GL26) y cáncer de mama (4T1), a DXR y/o CP (Figs. 32-34). Además, la reducción solo de glucosa o suero también potenció la toxicidad a DXR y/o CP para las células cancerosas, pero no fue tan eficaz como la combinación de ambas (Figuras 33, 34). De los muchos factores de crecimiento implicados en RED (la resistencia al estrés diferencial) dependiente de ayuno, se informó previamente que la reducción del IGF-I es un cambio clave, y que la infusión de IGF-I puede invertir la protección de los ratones a la quimioterapia. Aquí se muestra que el tratamiento con IGF-I de las células 4T1 y B16 también invierte la sensibilización de las células cancerosas a DXR causada por la restricción de glucosa, lo que sugiere que la ICP sensibiliza a las células cancerosas, en parte, reduciendo el IGF-I (Fig. 35).

Para determinar los mecanismos responsables de esta sensibilización dependiente de ICP, se estudió el efecto del nivel bajo de glucosa sobre las roturas de ADN mono y bicatenario en células cancerosas expuestas a quimioterapia mediante el ensayo cometario. La glucosa, que es la principal fuente de energía de los metazoos, es particularmente importante para las células neoplásicas, un fenómeno conocido como el efecto Warburg, y la glucemia elevada promueve un mayor crecimiento del cáncer. La reducción de glucosa de la alimentación a demanda (2,0 g/l) a la alcanzada después del ayuno (0,5 g/l) en combinación con una baja condición de suero (SBF al 1 %), para imitar también la reducción dependiente de ayuno en factores de crecimiento sanguíneo y proteínas, aumentó el daño al ADN más que la quimioterapia sola, y la combinación de 0,5 g/l de glucosa y quimioterapia promovió un incremento notable de 20 veces en el daño del ADN en células de cáncer de mama 4T1 (Figura 36A) y células de melanoma B16 (Figura 36B) El efecto de la glucosa reducida fue en cambio aditivo con el de la doxorrubicina en el tratamiento de las células de glioma GL26 (Fig. 36C).

Para obtener una visión imparcial de los cambios en la expresión génica que se producen en las células cancerosas en respuesta al ayuno, se realizaron análisis hologenómicos de micromatriz en el corazón, músculo, hígado y masa tumoral de cáncer de mama 4T1 subcutáneo de ratones que ayunaron durante 48 horas o se alimentaron con una dieta a demanda. El análisis de micromatriz indica claramente que el ayuno regula diferencialmente genes implicados en la proliferación celular (Fig. 37). Además, se encontró que la expresión de los componentes de la traducción y los genes de ensamblaje/biogénesis de ribosomas aumentaban significativamente en el cáncer de mama autoinjertado (4T1), mientras que en tejidos normales estaban reprimidos o mínimamente afectados (Fig. 38). De acuerdo con este aumento en los componentes de la traducción, la fosforilación de Akt y S6K fue elevada y la fosforilación de eIF2a se redujo en células cancerosas previamente privadas en tumores autoinjertados (Fig. 39A), y también *in vitro*, particularmente en combinación con tratamiento de CP (Fig. 39B). Sin embargo, a pesar de esta activación dependiente de inanición de los mecanismos de traducción, la duplicación de las células cancerosas se redujo enormemente *in vitro* (figura 40), lo que concuerda con el retraso del avance tumoral mediante el ayuno *in vivo* (Figs. 36, 37). La traducción está estrechamente relacionada con el avance del ciclo celular y el crecimiento celular, y es un proceso costoso que puede consumir de 50 a aprox. 75 % de la energía celular en las células que se dividen rápidamente. Es posible que el tumor 4T1 intente compensar la falta de nutrientes necesarios para el

crecimiento aumentando la traducción y, como resultado, consume incluso más energía lo que conduce a la muerte celular.

5 Dado que se sabe que el factor de transcripción de resistencia al estrés FOXO3a se inactiva por AKT, el efecto del ayuno en su expresión se analizó en masas tumorales de cáncer de mama 4T1 y en tejido normal. Se encontró que FOXO3a se regulaba diferencialmente en respuesta al ayuno. Su expresión fue significativamente reprimida en los tumores, pero inducida en órganos normales (Fig. 41). También se determinó el efecto del ayuno sobre otro factor principal de transcripción de respuesta al estrés, el factor nuclear kappa B (NFkB), en el tumor de mama autoinjertado (4T1). La RT-PCR mostró expresión diferencial de NFkB por ayuno: su expresión se reprimió en gran medida en los tumores, pero se indujo en gran medida en los órganos normales (Fig. 41). Entre los genes protectores cuya expresión es inducida por NFkB, la hemoxygenasa-1 (HO-1) es una enzima evolutivamente conservada que es muy inducible en respuesta a diversos estímulos, incluidos los rayos UVA y el estrés oxidativo. Se encontró que el ayuno también reprimía la expresión de HO-1 en los tumores, pero causaba un aumento importante en su expresión en órganos normales, en consonancia con los de FOXO3a y NFkB (Fig. 15 41). Prueba de la t de Student; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Debido a que tanto FOXO3a como NFkB reducen el estrés oxidativo a través de HO-1 y MnSOD, el nivel de especies reactivas del oxígeno (ROS, siglas del inglés *reactive oxygen species*) se midió utilizando oxidación de dihidroetidio (DHE) en células 4T1 como una forma de estimar los niveles de superóxido en condiciones estándar y de ICP después del tratamiento con CP (Figuras 42, 43). Después de ayuno/quimioterapia, en las células cancerosas se detectaron niveles más altos de oxidación de DHE, lo que sugiere aumento del estrés oxidativo y posiblemente de niveles de superóxido. Además, se encontró que los niveles de caspasa-3 aumentaron solo en los tumores aloinjertados después de ICP, pero no en los órganos normales tanto *in vivo* (Fig. 44A) como *in vitro* (Fig. 44B), de acuerdo con el efecto de los oxidantes en la promoción de la apoptosis y con el papel de HO-1 en la inhibición de la actividad de la caspasa-3. Se ha sugerido que la apoptosis inducida por la restricción de glucosa en las células cancerosas también se promueve por la autofagia. La restricción de glucosa en la incubación con niveles bajos de suero aumentó la autofagia en células 4T1 (Fig. 45) pero la inhibición de la autofagia por cloroquina incrementó adicionalmente la muerte celular lo que indica que un nivel bajo de glucosa no promueve la muerte celular por una muerte celular dependiente de autofagia (Figura 46).

Para confirmar el papel de HO-1 en la sensibilización dependiente de ayuno a la quimioterapia, se indujo la expresión de HO-1 durante el ayuno utilizando hemina y se encontró que la sensibilización podía invertirse parcialmente (Figuras 47, 48). Por el contrario, la protoporfirina de cinc (ZnPP), un inhibidor de HO-1, sensibilizó a las células cancerosas a la quimioterapia (Figuras 49, 50). En conjunto, estos estudios indican que la expresión reducida de HO-1 es parte del mecanismo responsable de la sensibilización dependiente de ayuno de las células de cáncer de mama 4T1.

En resumen, se demostró que las disminuciones importantes en glucosa, IGF-I y posiblemente muchos otros cambios que se sabe que se producen en respuesta a la inanición/ayuno en cultivo celular y en ratones, dan como resultado un retraso del crecimiento y un aumento importante en la muerte celular en una amplia gama de células tumorales (Fig. 51), particularmente en combinación con quimioterapia. Estos resultados sugieren que múltiples ciclos de ayuno tienen el potencial de proporcionar al paciente tanto protección como efectos de sensibilización al cáncer en la terapia del cáncer.

45 Métodos

Cultivo celular

50 Se adquirieron células de cáncer de mama murino 4T1-luc en SibTech (Brookfield, CT). Las células de melanoma murino B16-fluc las proporcionó Noah Craft (UCLA). Las células de glioma murino GL26 y de glioblastoma humano U87-MG las proporcionó Thomas Chen (USC). Las células de cáncer de próstata humano PC3 y 22RV1 las proporcionó Pinchas Cohen (UCLA). Las células de cáncer de mama humano MCF-7 y C42B y las células de cáncer de cuello uterino humano HeLa las proporcionó Amy Lee (USC). Las células de cáncer de colon humano LOVO las proporcionó Darryl Shibata (USC). Las células de neuroblastoma murino Neuro-2a y NXS2 y de ACN humano y SH-SY5Y, de carcinoma ovárico humano OVCAR, de melanoma humano MZ-MEL y de carcinoma epidermoide A431 se cultivaron rutinariamente en el Laboratorio de Oncología del Instituto Gaslini. Las células 4T1 se transfectaron de forma estable con LC3-GFP, que fue un obsequio amable de Jae Jung de la USC, para estudios de autofagia. Todas las células se mantuvieron rutinariamente en DMEM, SBF al 10 % a 37 °C, CO₂ al 5%. Para inhibir la autofagia las células se trataron con cloroquina (CQ) 5 μM durante 48 horas durante la ICP *in vitro*. Para modular la actividad de HO-1, las células 4T1 se trataron con hemina 10 μM (Sigma) o protoporfirina de cinc (ZnPP; Sigma) 20 μM durante 60 24 horas antes del tratamiento de quimioterapia y 24 horas durante el tratamiento de quimioterapia.

Quimioterapia

Se utilizó doxorubicina (DXR, Bedford Laboratories, Estados Unidos) y ciclofosfamida (PC; Baxter, Estados Unidos) *in vitro* e *in vivo*.

5 La quimioterapia se realizó *in vitro* tratando las células durante 24 horas en un medio que contenía fármacos quimioterapéuticos. Se determinaron las dosis óptimas de fármaco para cada línea celular individual. Para los estudios *in vivo*, se inyectó DXR por vía intravenosa a través de la vena lateral de la cola, y se inyectó CP por vía intraperitoneal.

10 Modelos de cáncer de ratón

15 Todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con los procedimientos aprobados por el comité institucional de cuidado y uso de animales de la Universidad del Sur de California, y por el comité de ética y licencias del Instituto Nacional de Investigación del Cáncer, Génova, Italia, y por Ministerio de Salud italiano. Para establecer un modelo de cáncer subcutáneo de ratón, ratones hembra BALB/c de 12 semanas de vida, ratones macho y hembra C57BL/6 de 12 semanas de vida y ratones lampiños de 7 semanas de vida recibieron inyección de células de cáncer de mama 4T1, células de melanoma B16, células de glioma GL26 y células de neuroblastoma humano ACN, respectivamente. Para los modelos de cáncer metastásico de ratón, ratones hembra BALB/c de 12 semanas de vida y ratones macho y hembra C57BL/6 de 12 semanas de vida, recibieron inyección intravenosa a través de vena lateral de la cola de 2×10^5 células 4T1, B16, GL26, respectivamente, y ratones hembra A/J de 6 semanas de vida recibieron inyección a través de la vena lateral de la cola de 2×10^5 células NXS2 y 1×10^6 células Neuro-2a. Antes de la inyección, se recogieron células en fase de crecimiento logarítmico y se suspendieron en PBS a 2×10^6 células/ml, y se inyectaron 100 μ l (2×10^5 células/ratón) por vía subcutánea en la región lumbar o por vía intravenosa a través de la vena lateral de la cola. Las células de ACN y Neuro-2a se suspendieron en PBS a una densidad de 5×10^7 y 1×10^7 células/ml, y se inyectaron 100 μ l (5×10^6 células de ACN/ratón y 1×10^6 células Neuro-2a / ratón) por vía subcutánea en la región lumbar o por vía intravenosa a través de la vena lateral de la cola. Todos los ratones se afeitaron antes de la inyección tumoral subcutánea, y se calentaron suavemente antes de las inyecciones intravenosas para dilatar las venas. Los pesos corporales se determinaron periódicamente y el tamaño del tumor se midió con un calibre Vernier digital. El volumen tumoral se calculó utilizando la siguiente ecuación: volumen tumoral (mm^3) = (longitud x anchura x altura) x $\pi/6$, donde la longitud, la anchura y la altura son en mm.

Ayuno *in vitro*

35 El ayuno celular se realizó por restricción de glucosa y/o suero que se basó en mediciones de glucemia en ratones en ayunas y normalmente alimentados; el nivel inferior se aproxima a 0,5 g/l y el nivel superior a 2,0 g/l. Para las líneas celulares humanas, un nivel normal de glucosa se consideró como 1,0 g/l. Las células se lavaron dos veces con PBS antes de cambiar a medio de ayuno.

40 Ayuno *in vivo*

Los animales se sometieron a ayuno durante un total de 48-60 horas por restricción completa de alimento, pero con libre acceso a agua. Los ratones se alojaron individualmente en una jaula nueva y limpia para reducir el canibalismo, la coprofagia y el pienso residual. El peso corporal se midió inmediatamente antes y después del ayuno.

45 Ensayos *in vitro*

La citotoxicidad se midió por la capacidad de reducir el bromuro de metiltiazolildifenil tetrazolio (MTT). Resumiendo, se preparó MTT a 5 mg/ml en PBS, para los ensayos, se diluyó a una concentración final de 0,5 mg/ml y se incubó durante aprox. 3 a 4 horas a 37 °C. Los cristales de formazán se disolvieron durante la noche (16 horas) a 37 °C con tampón de lisis μ l (SDS 15 % (p/v), dimetilformamida al 50 % (v/v), pH 4,7). La supervivencia se presentó como porcentaje de nivel de reducción de MTT de las células tratadas con respecto a las células control. La absorbancia se leyó a 570 nm utilizando un lector de microplaca SpectraMax 250 (Molecular Devices) y el programa informático SoftMax Pro 3.0 (Molecular Devices).

55 Los niveles de superóxido se estimaron utilizando la oxidación del colorante fluorescente, DHE (dihidroetidina; Invitrogen, Estados Unidos). Las células se cultivaron en portaobjetos, se trataron y se lavaron dos veces con PBS antes de la incubación con DHE (10 μ M; en DMSO al 0,1 %) durante 30 minutos.

60 Ensayo de inmunotransferencia

Las células se aclararon una vez en PBS enfriado con hielo y se recogieron en tampón de lisis RIPA que contenía inhibidores de proteasa (Roche) y un cóctel de inhibidores de fosfatasa (Sigma). Los tejidos tumorales se homogeneizaron en tampón de lisis RIPA complementado con los mismos inhibidores de proteasa y fosfatasa. Las proteínas de los lisados totales se resolvieron mediante SDS-PAGE al 8-12% y se analizaron mediante

inmunotransferencia utilizando anticuerpos para GAPDH, Akt y fosfo-Ser473 Akt, p70 S6 quinasa y fosfo-Thr389 p70 S6 quinasa, eIF2 α y fosfo-Ser51 eIF2 α , 1:1000-2000, Cell Signaling Technology).

Protocolo de ensayo Cometa

5 Las células se diluyeron a 10⁵/ml en medio de cultivo (DMEM/F12 SBF al 10 %), y se trataron con DXR 50 μ M durante 1 hora a 37 °C. Después, las células se lavaron una vez con PBS enfriado con hielo y se sometieron a ensayo Cometa (Trevigen, Inc, Gaithersburg, MD) de acuerdo con el procedimiento recomendado por el fabricante. Las imágenes de Comet se adquirieron con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse TE300 y se
10 analizaron con el programa informático Comet Score (TriTek Corp., ver1.5). Se contaron 100-300 células de cada genotipo/grupo de tratamiento.

Extracción de sangre y mediciones de glucosa

15 Los ratones se anestesiaron con isoflurano inhalado al 2% y la sangre se extrajo por punción cardíaca del ventrículo izquierdo. La sangre se recogió en tubos recubiertos con K₂ - EDTA para procesar suero (BD, Estados Unidos). La glucemia se midió utilizando el sistema de control de glucemia Precision Xtra (Abbott Laboratories, Estados Unidos).

Análisis de micromatrices

20 El ARN se aisló de los tejidos de acuerdo con los procedimientos descritos por el fabricante utilizando el kit RNeasy de Qiagen (n° de catálogo 74106). Después, el ARN se hibridó con microplacas BD-202-0202 de IlluminaBeadchips (San Diego, CA). Los datos sin procesar se sometieron a normalización Z tal como se describió anteriormente. El análisis significativo parametrizado se finaliza de acuerdo con el protocolo SAM con el filtrado ANOVA (ANOVA p <0,05). Los genes significativos se seleccionan para cada comparación por pares. El enriquecimiento del conjunto de genes se analizó utilizando el método PAGE como se describió previamente. Las figuras se seleccionaron basándose en los nombres y descripciones proporcionados por Gene Ontology Database y Pathway Data Set. Adicionalmente, el sistema de análisis Pathway Ingenuity (Ingenuity Systems, Redwood City, CA) realiza el
25 análisis génico de la relación regular y la ruta canónica.

PCR en tiempo real

30 El ARN se aisló de los tejidos de acuerdo con los procedimientos descritos por el fabricante utilizando el kit RNeasy de Qiagen (n° de catálogo 74106). El ADNc se sintetizó usando el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (AB Applied Biosystems n° de catálogo 4368814) y se realizó una RT-PCR utilizando la mezcla maestra SYBR Green de PCR (AB Applied Biosystems cat n° 4309159). El gen GAPDH se utilizó como gen calibrador. Cada tratamiento analizado se realizó con tres repeticiones biológicas y se utilizaron al menos tres reacciones para calcular la expresión. La relación de la expresión se calculó de acuerdo con el método $2^{-\Delta\Delta CP}$.

Experimento 4

35 Para validar un régimen dietético para pacientes con cáncer sometidos a quimioterapia se analizaron diversas formulaciones dietéticas en modelos de ratón. El criterio de valoración diana es obtener una reducción en la glucosa y/o IGF-1 en suero del 20-75 %, que ha demostrado ser eficaz en la protección del hospedador y en la sensibilización de una amplia variedad de células cancerosas. Las formulaciones se seleccionan para proporcionar un nivel de nutrientes suficiente para mantener el peso corporal normal. Se controla la ingesta diaria de alimentos, el peso corporal y la salud general (comportamiento y aspecto físico). Al final de cada programa de alimentación, se extrae sangre para determinar la glucosa y el IGF-1. Se ha descubierto que si durante 5 días (Figura 52) se alimenta con una dieta deficiente en aminoácidos específicos (AA-D) pero con calorías totales normales, se reduce significativamente el IGF-1 (Figura 52) y la glucosa (Figura 54A) en suero. Este efecto beneficioso se incrementa si se utiliza en un paradigma de realimentación (Figuras 53 y 54B) donde la inanición a corto plazo es seguida de la formulación AA-D.

50 Un régimen de dieta que consiste de 2 días con una dieta muy baja en calorías (MBC, 6% de la ingesta calórica normal) seguido de 1 día con una formulación deficiente en aminoácidos (AA) reduce los niveles de IGF-1 en suero significativamente más que la inanición a corto plazo (ICP) (Fig. 55A). Además, este régimen de dieta protegió a los ratones del fármaco quimioterapéutico, doxorubicina (DXR) (Fig. 55B). En este caso, después de 2 días de dieta MBC, al inicio de la re-alimentación, se inyecta DXR con la formulación deficiente en aminoácidos (AA).

60 Se determinó que una formulación de VegeGel baja en calorías (equivalente a 5 porciones recomendadas de verduras) reducía la glucosa y el IGF-1 se inyecta DXR de manera similar a la inanición a corto plazo (ICP) (Figs. 56 A y B). Además, se demostró que una dieta cetogénica restringida en calorías (90% de calorías procedentes de grasa) durante 3 días reduce el IGF-1 y la glucosa en suero (Figs. 6A y B, triángulos verdes). Es importante destacar que 1 día de esta dieta cetogénica seguido de 2 días con la formulación de VegeGel, muestra un efecto beneficioso
65 en la reducción de glucosa e IGF-1 sobre la dieta cetogénica sola (Figura 57 A y B, cuadrados rojos).

Aunque anteriormente se describen ejemplos de realizaciones, no se pretende que estas realizaciones describan todas las formas posibles de la invención. Por el contrario, las palabras utilizadas en la memoria descriptiva son palabras descriptivas y no limitativas, y se entiende que se pueden realizar diversos cambios sin apartarse del alcance de la invención. Adicionalmente, las características de diversas realizaciones de implementación pueden combinarse para formar realizaciones adicionales de la invención.

5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un envase de comida terapéutica para su uso para proporcionar comidas a un paciente con cáncer, que retrasa el crecimiento del cáncer y mejora la eficacia de los fármacos quimioterapéuticos, comprendiendo el envase de comida terapéutica:
- 10 un primer componente de comida dividido en comidas, que proporciona al paciente con cáncer como máximo el 50% de la ingesta calórica normal del paciente, proporcionando el primer componente de comida, al paciente con cáncer, de 700 a 1200 kcal/día, procediendo de la grasa al menos el 50% de las kilocalorías, proporcionando el primer componente de comida, comidas durante un primer período de tiempo predeterminado de aproximadamente 1 a 5 días;
- 15 un segundo componente de comida dividido en comidas, proporcionando el primer componente de comida al paciente con cáncer, como máximo 500 kcal/día, proporcionando el segundo componente de comida, comidas durante un segundo período de tiempo predeterminado de aproximadamente 2 a 7 días; y
- una composición reponedora que comprende aminoácidos esenciales y otros aminoácidos no esenciales, ácidos grasos esenciales, minerales, vitaminas y/o extractos de verduras, durante un tercer período de tiempo predeterminado.
- 20 2. El envase de comida terapéutica para el uso de la reivindicación 1, en el que cada uno del primer componente de comida y del segundo componente de comida incluye independientemente un componente seleccionado del grupo que consiste en extractos de verduras, minerales, ácidos grasos esenciales omega-3/6 y combinaciones de los mismos.
- 25 3. El envase de comida terapéutica para el uso de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que cada uno del primer componente de comida y del segundo componente de comida incluye independientemente extractos de verduras de fuentes seleccionadas del grupo que consiste en col china, col rizada, lechuga, espárrago, zanahoria, calabaza, alfalfa, guisantes verdes, tomate, repollo, coliflor y remolacha.
- 30 4. El envase de comida terapéutica para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que cada uno del primer componente de comida y del segundo componente de comida incluye independientemente ácidos grasos esenciales omega-3/6 de fuentes seleccionadas del grupo que consiste en salmón, atún, caballa y anchoa.
- 35 5. El envase de comida terapéutica para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el tercer período de tiempo predeterminado es de al menos 5 días.
- 40 6. El envase de comida terapéutica para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la composición reponedora incluye extractos de verduras de fuentes seleccionadas del grupo que consiste en col china, col rizada, lechuga, espárrago, zanahoria, calabaza, alfalfa, guisantes verdes, tomate, repollo, coliflor y remolacha.
- 45 7. El envase de comida terapéutica para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la composición reponedora incluye ácidos grasos esenciales omega-3/6.
8. El envase de comida terapéutica para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la composición reponedora incluye aminoácidos no esenciales seleccionados del grupo que consiste en histidina, serina, taurina, tirosina, cisteína, glutamina y combinaciones de los mismos.
- 50 9. El envase de comida terapéutica para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la composición reponedora incluye un comprimido multimineral que incluye hierro, cinc, cobre, magnesio y calcio.
10. El envase de comida terapéutica para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el comprimido multimineral incluye un complejo de vitamina B que tiene vitamina B12.
- 55 11. El envase de comida terapéutica para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el primer componente de comida proporciona a un paciente aproximadamente 1100 kcal/día.
12. El envase de comida terapéutica para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el primer componente de comida proporciona a una paciente aproximadamente 900 kcal/día.
- 60 13. El envase de comida terapéutica para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende además instrucciones para administrar al paciente con cáncer el primer componente de comida y el segundo componente de comida.

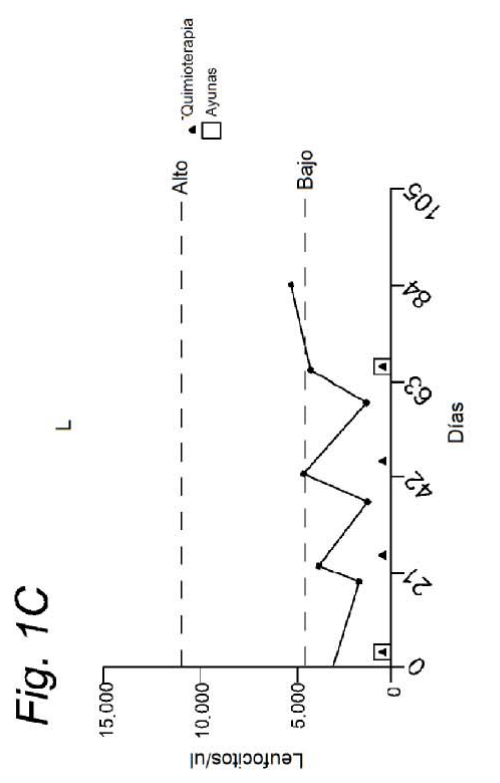
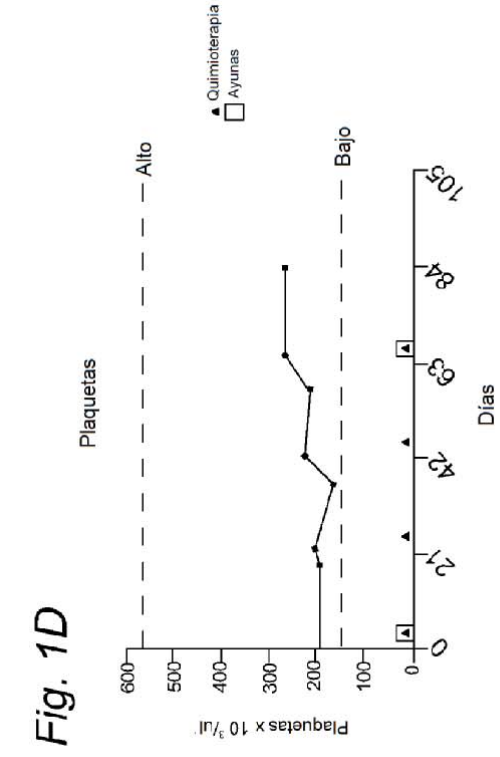
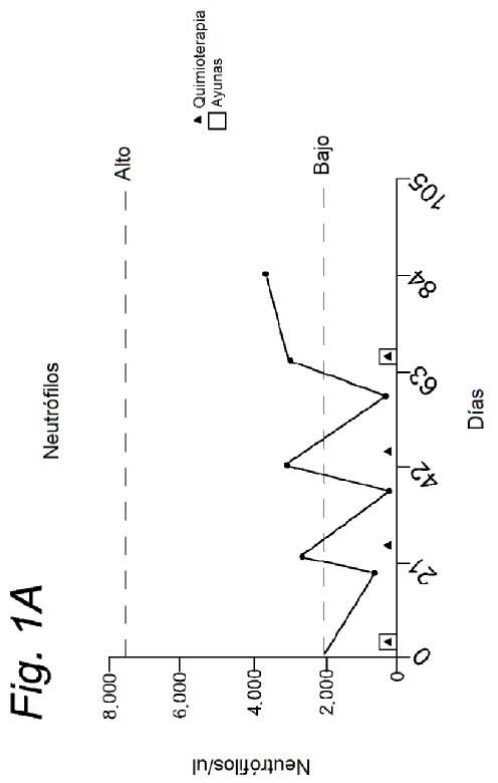
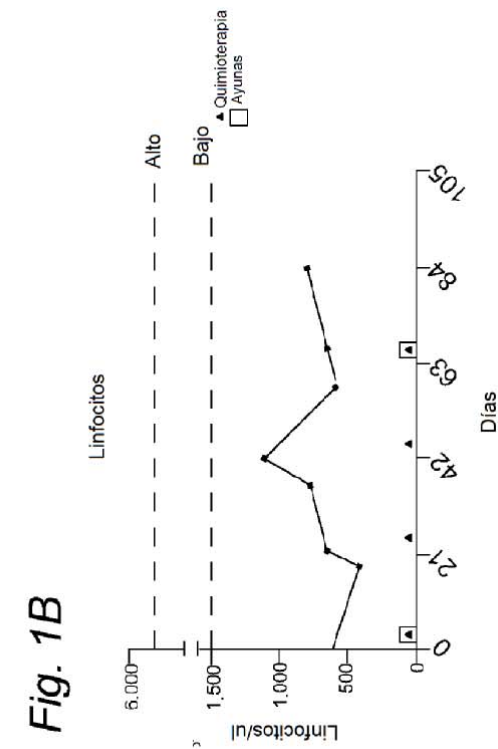


Fig. 1E

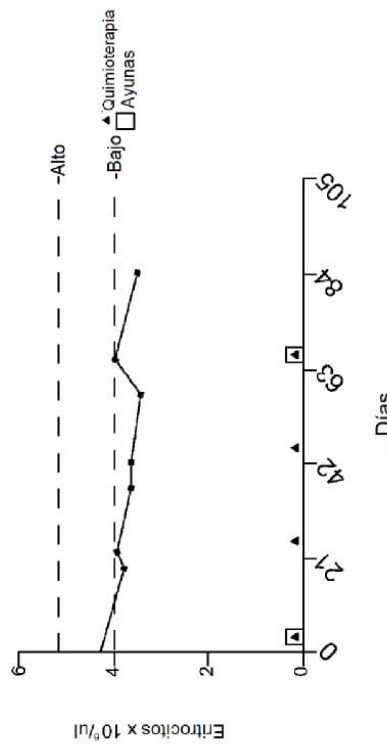


Fig. 1F

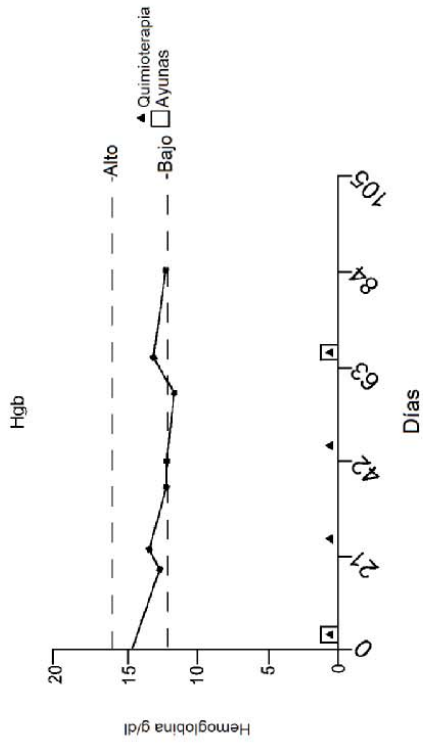


Fig. 1G

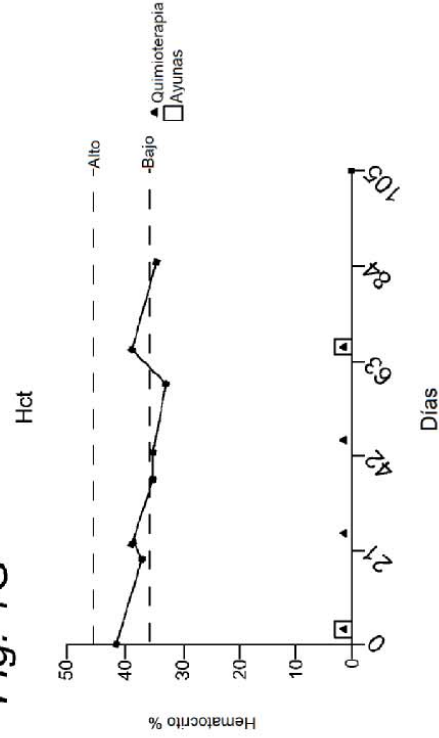
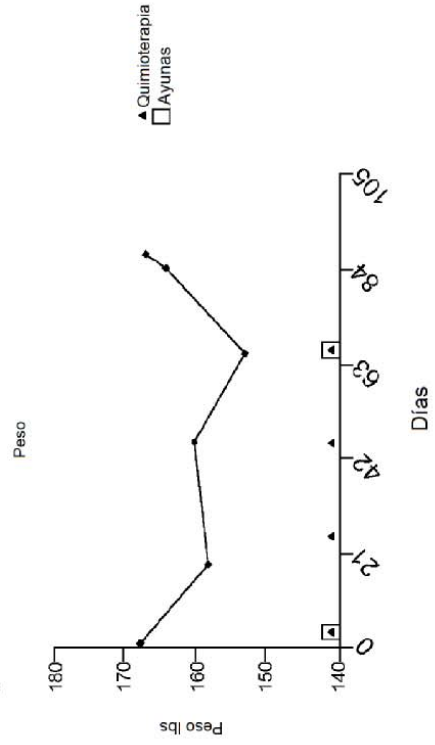


Fig. 1H



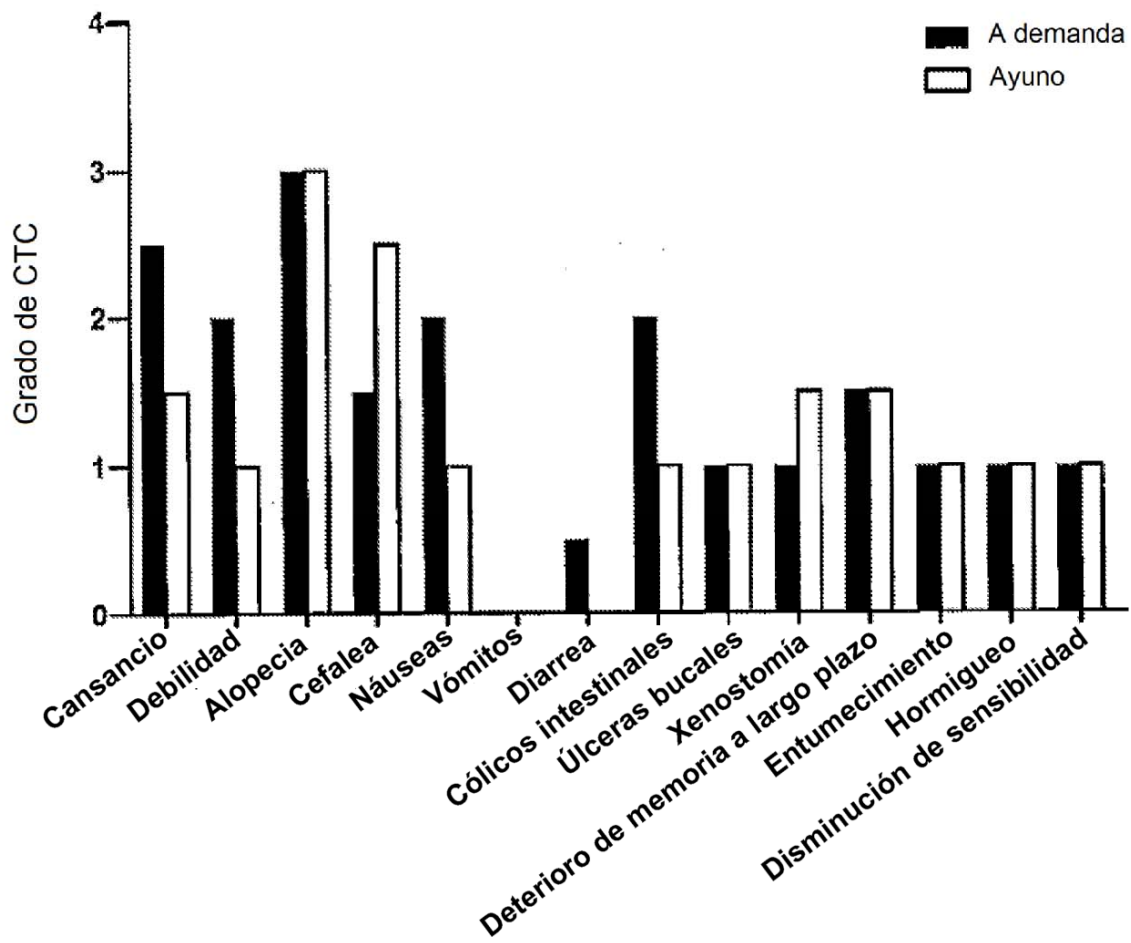


Fig. 2

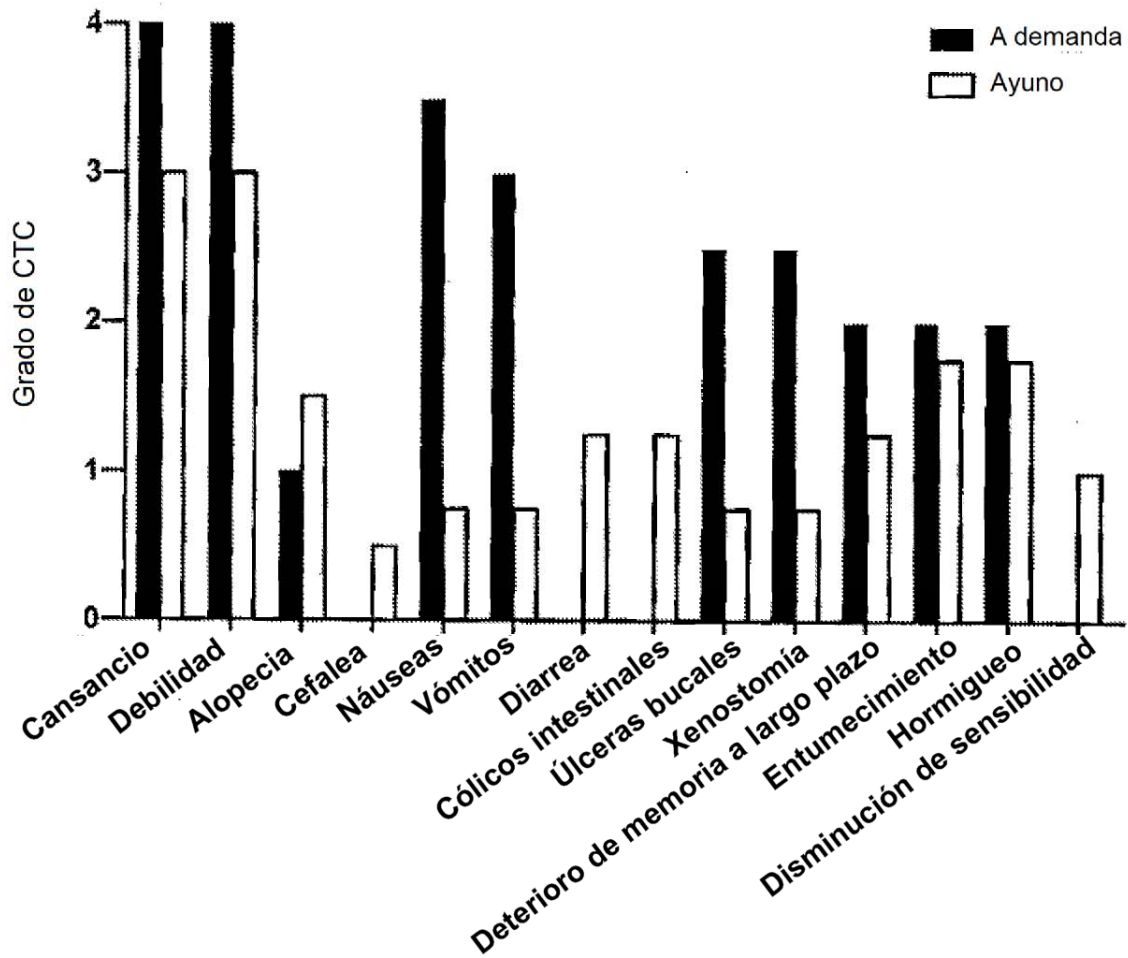
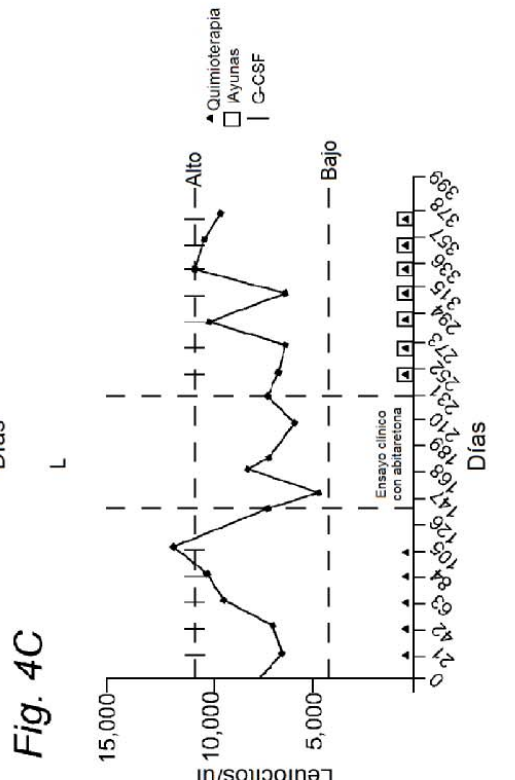
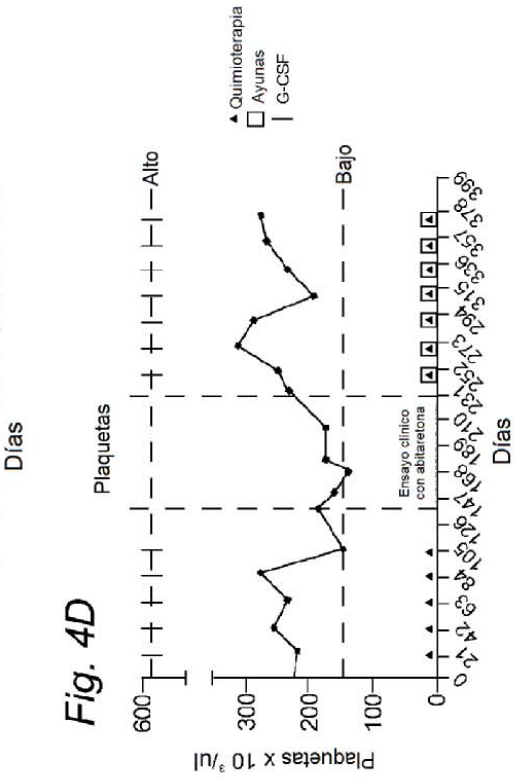
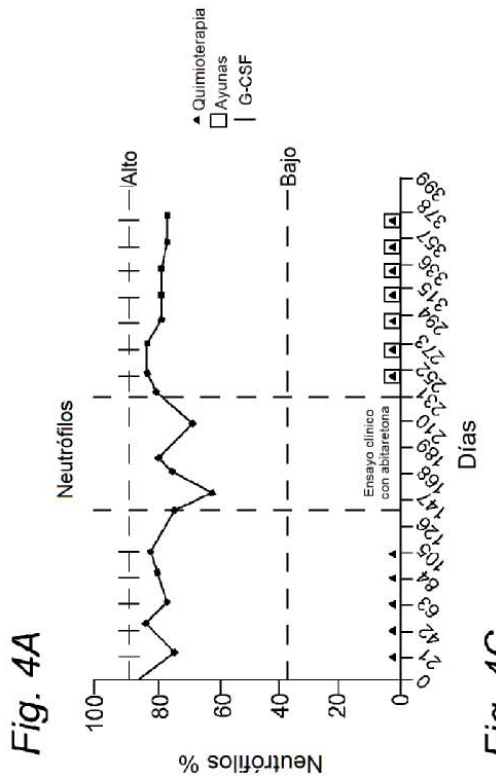
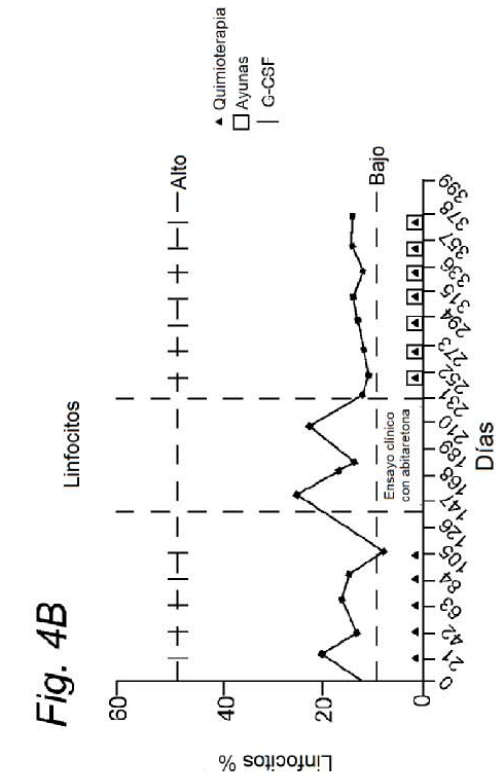
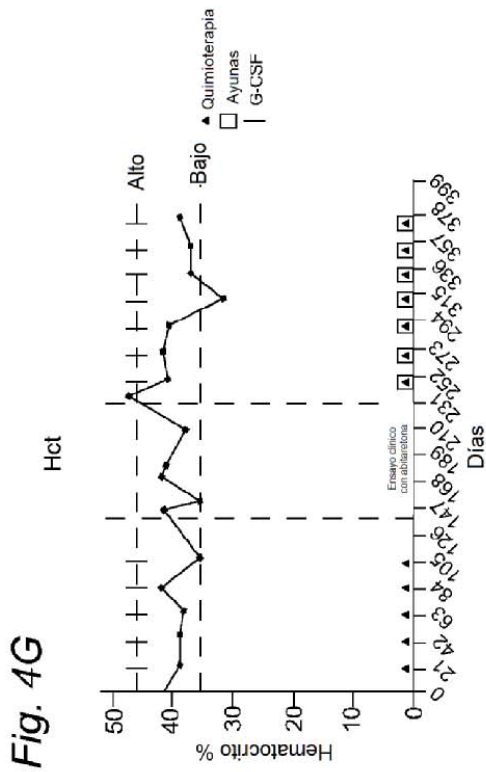
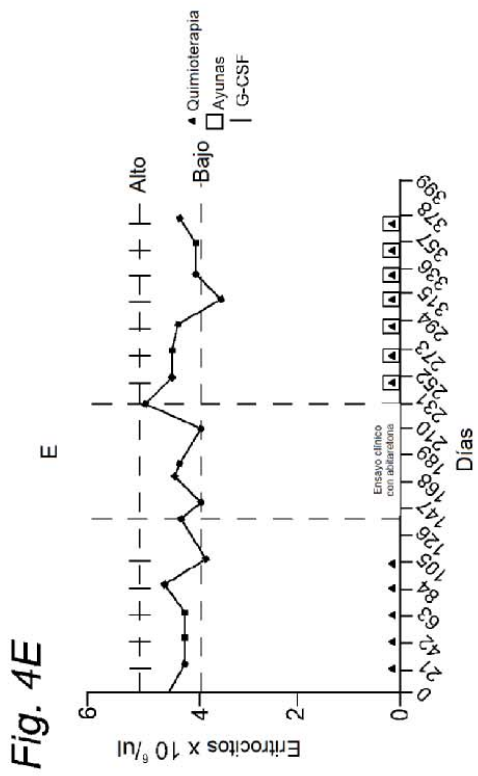
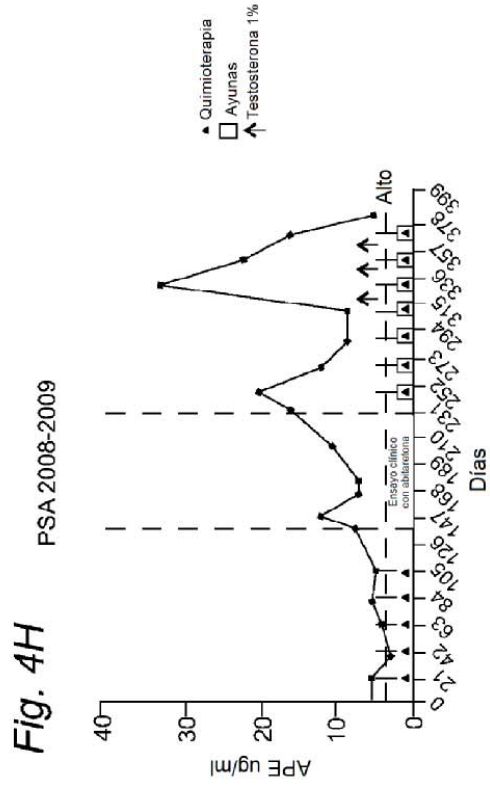
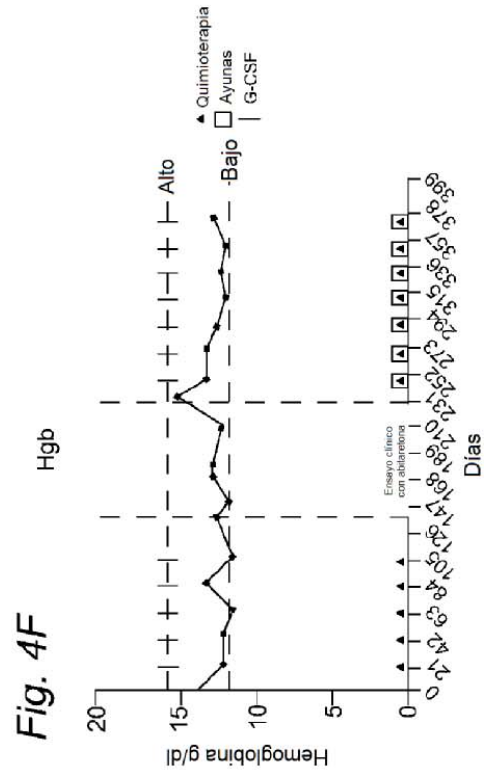


Fig. 3





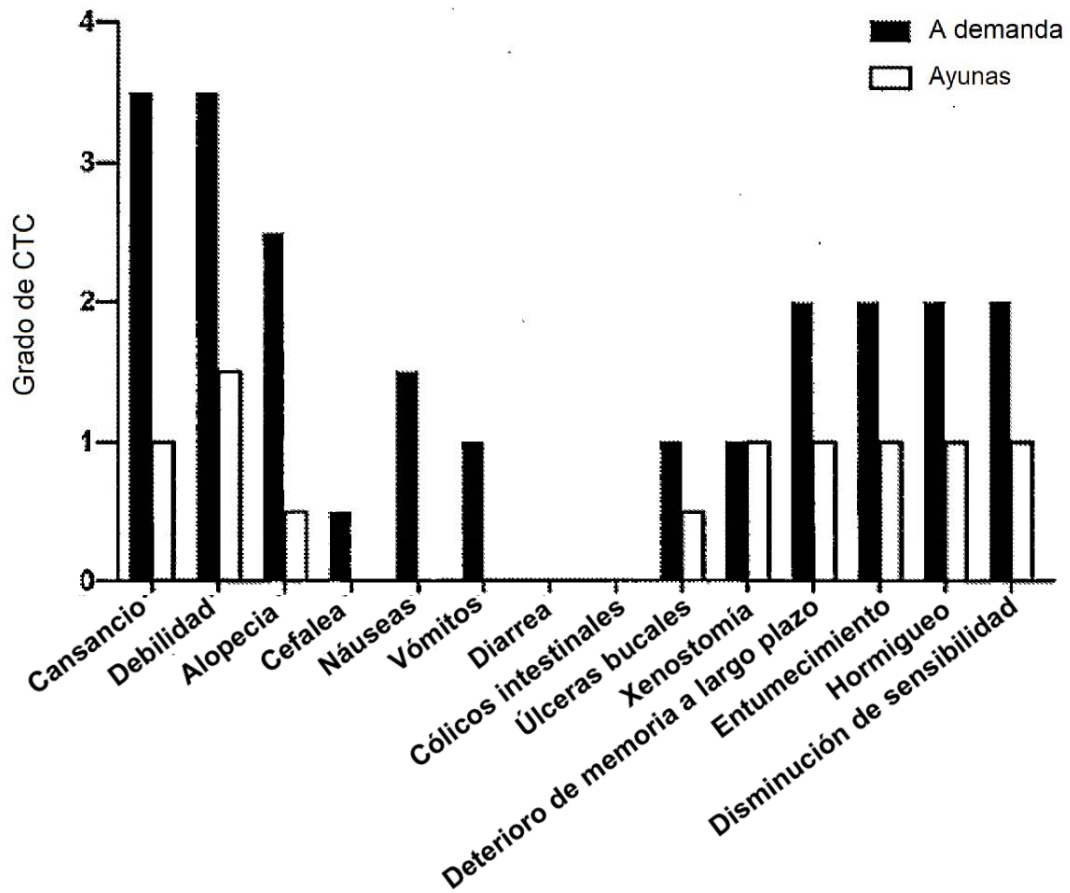


Fig. 5

Fig. 6A

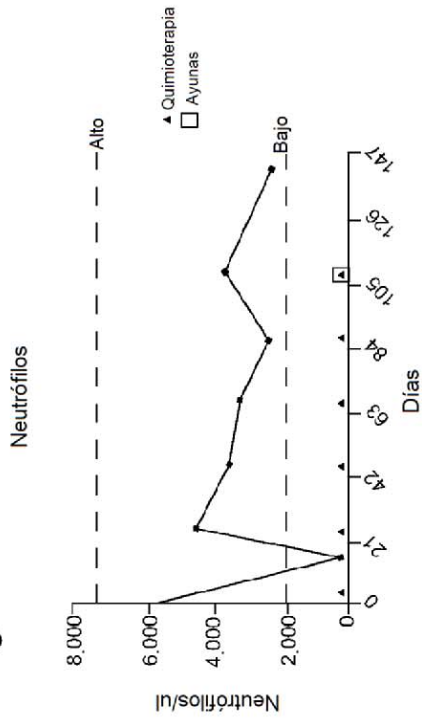


Fig. 6B

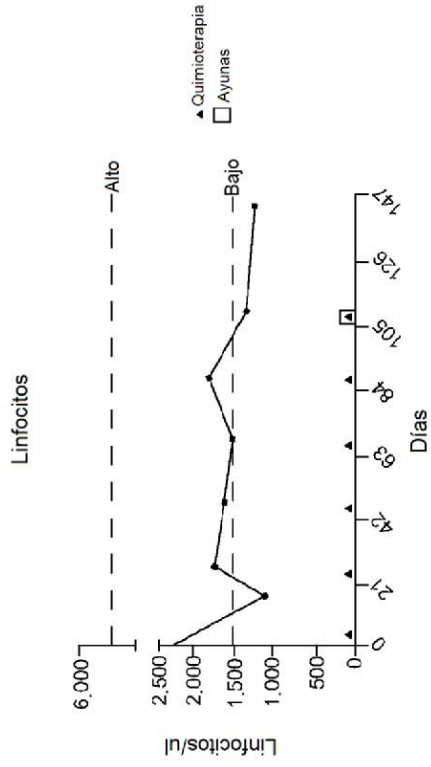


Fig. 6C

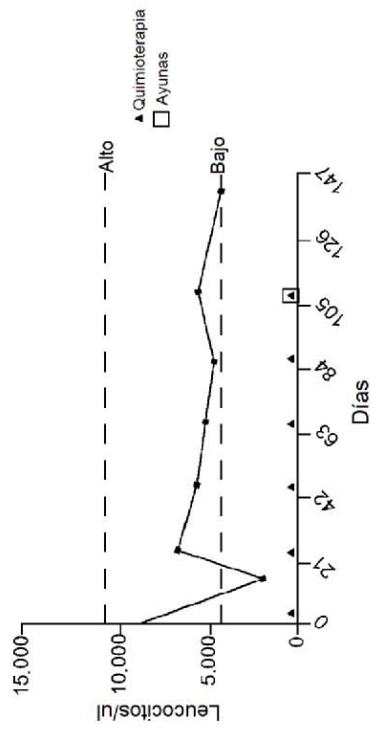


Fig. 6D

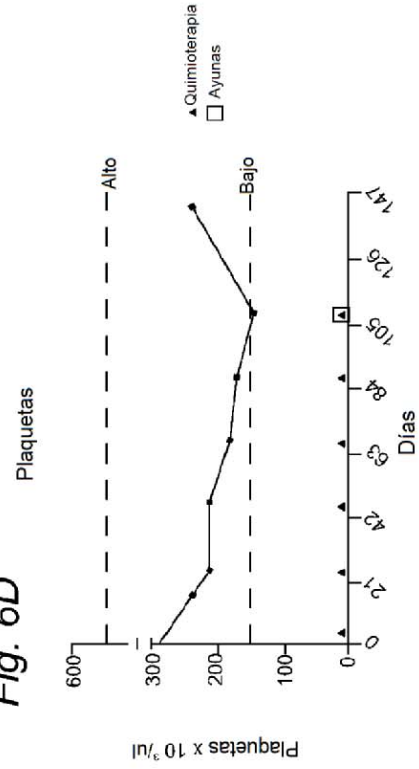


Fig. 6F

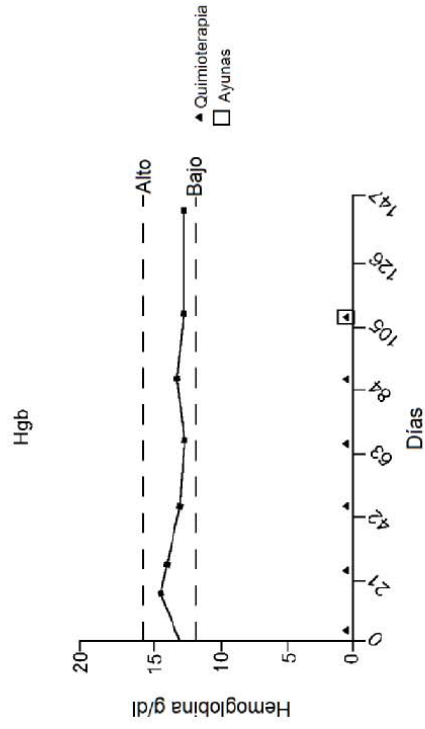


Fig. 6E

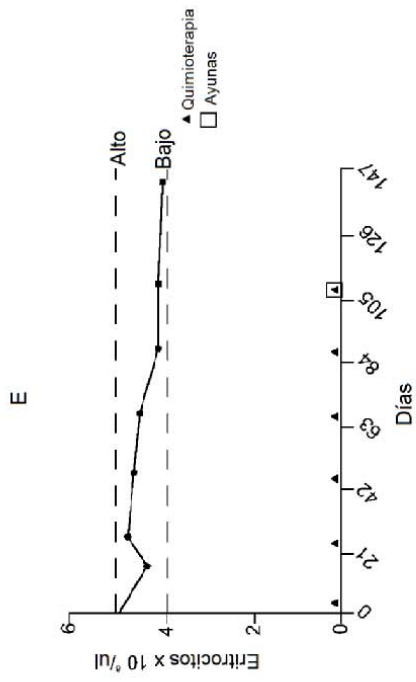
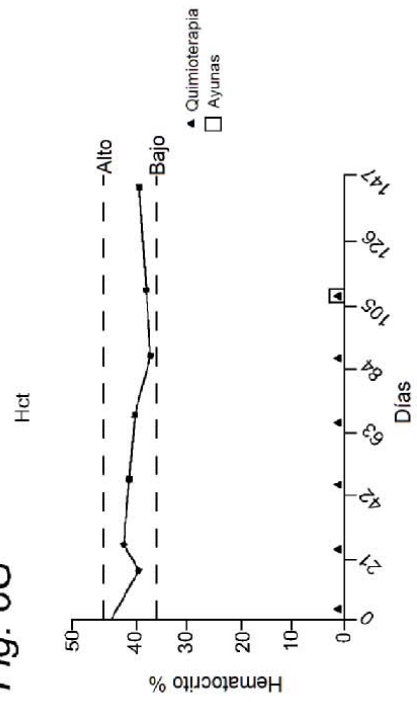


Fig. 6G



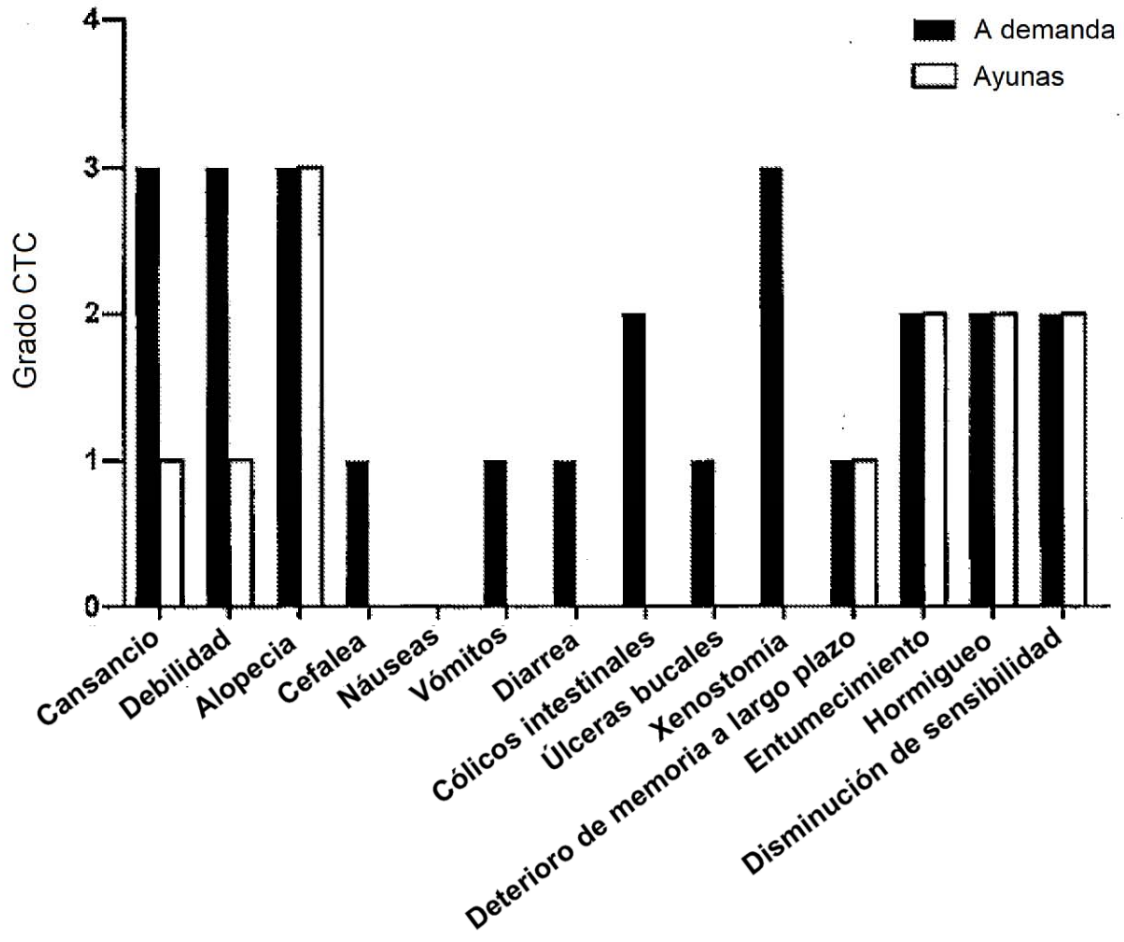


Fig. 7

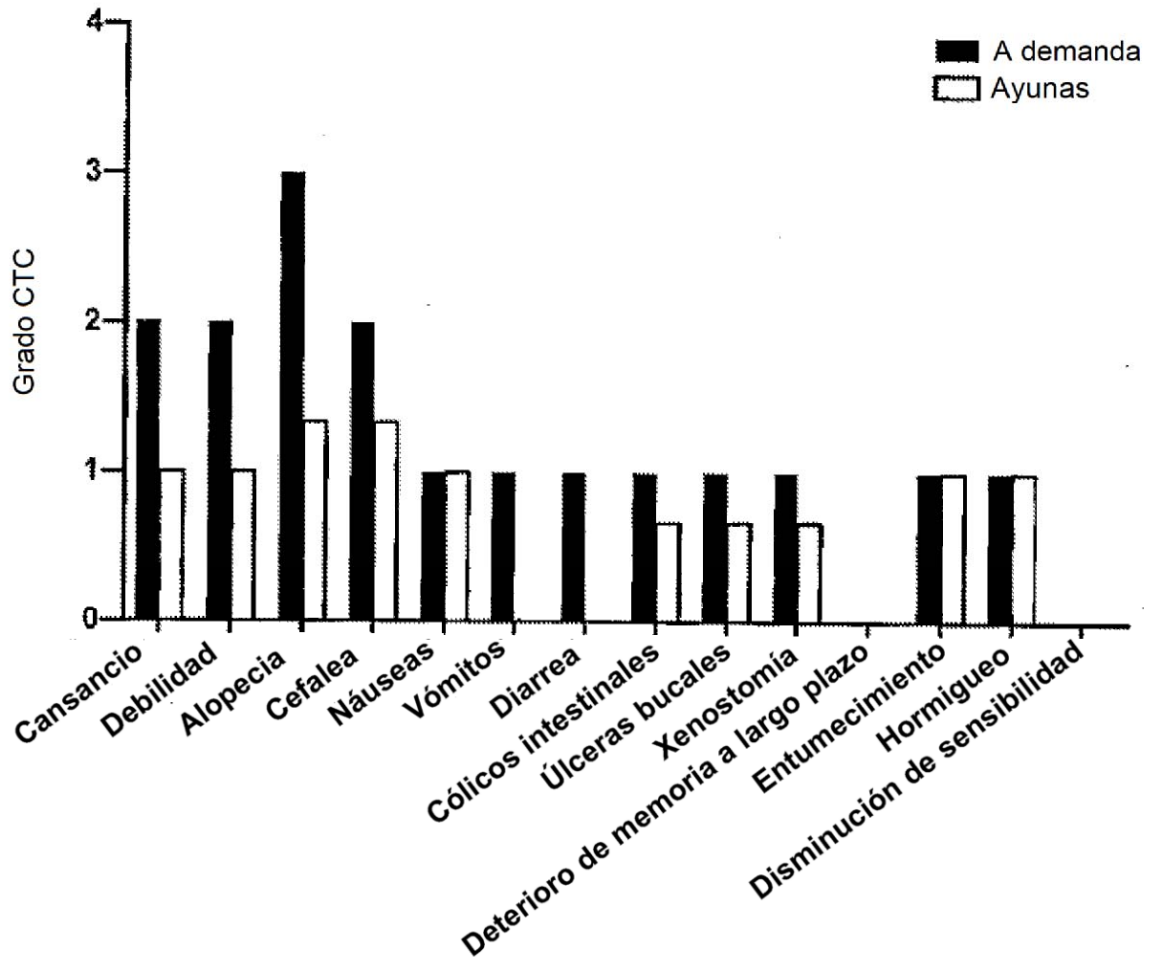


Fig. 8

Fig. 9A

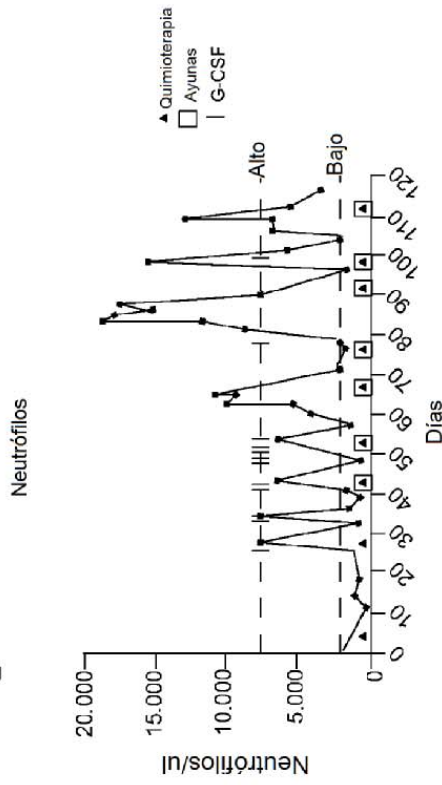


Fig. 9C

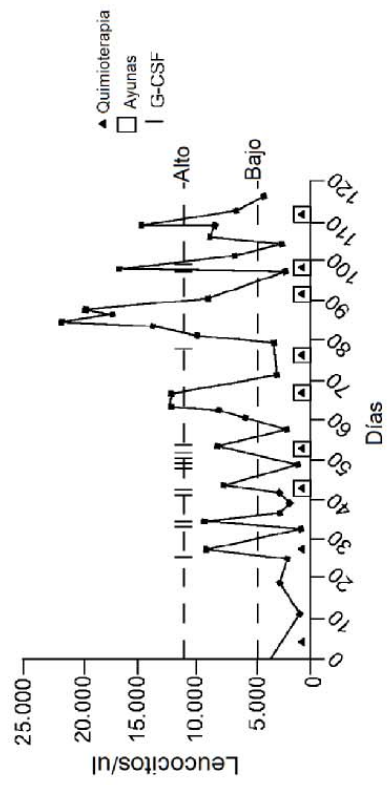


Fig. 9B

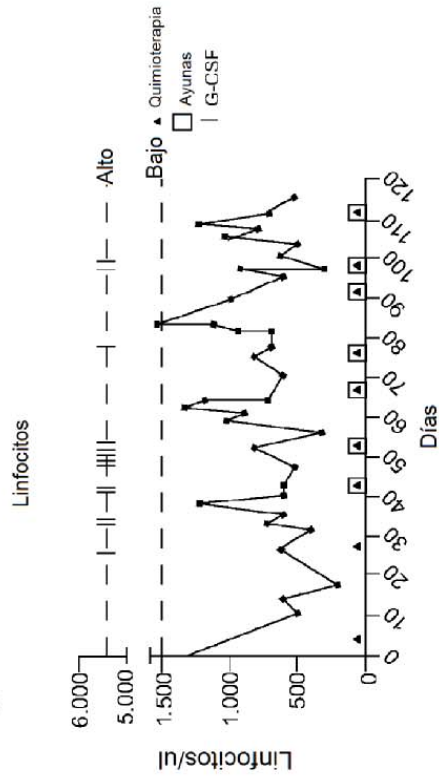


Fig. 9D

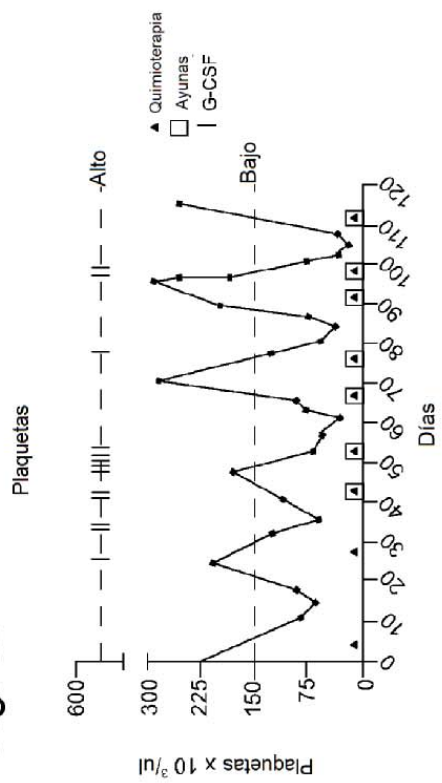


Fig. 9E

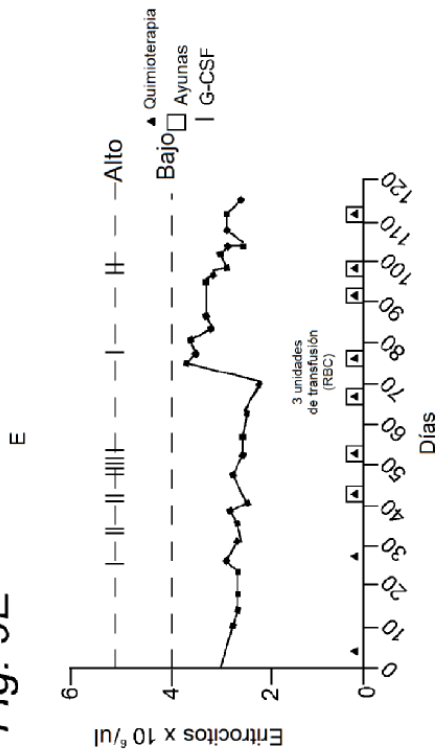


Fig. 9F

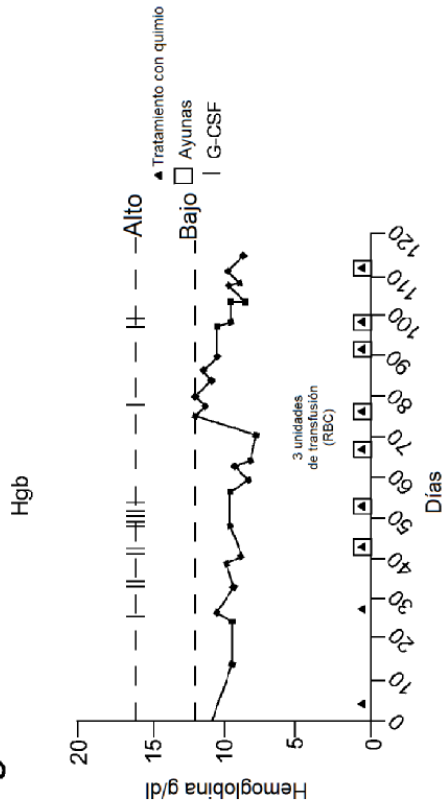
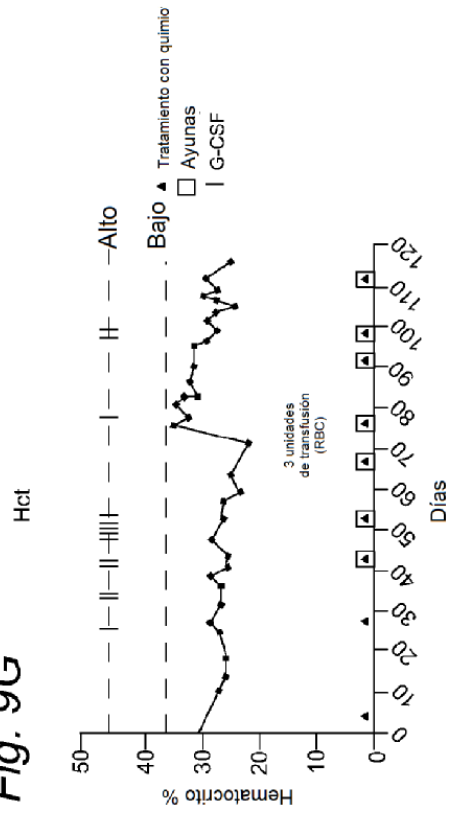


Fig. 9G



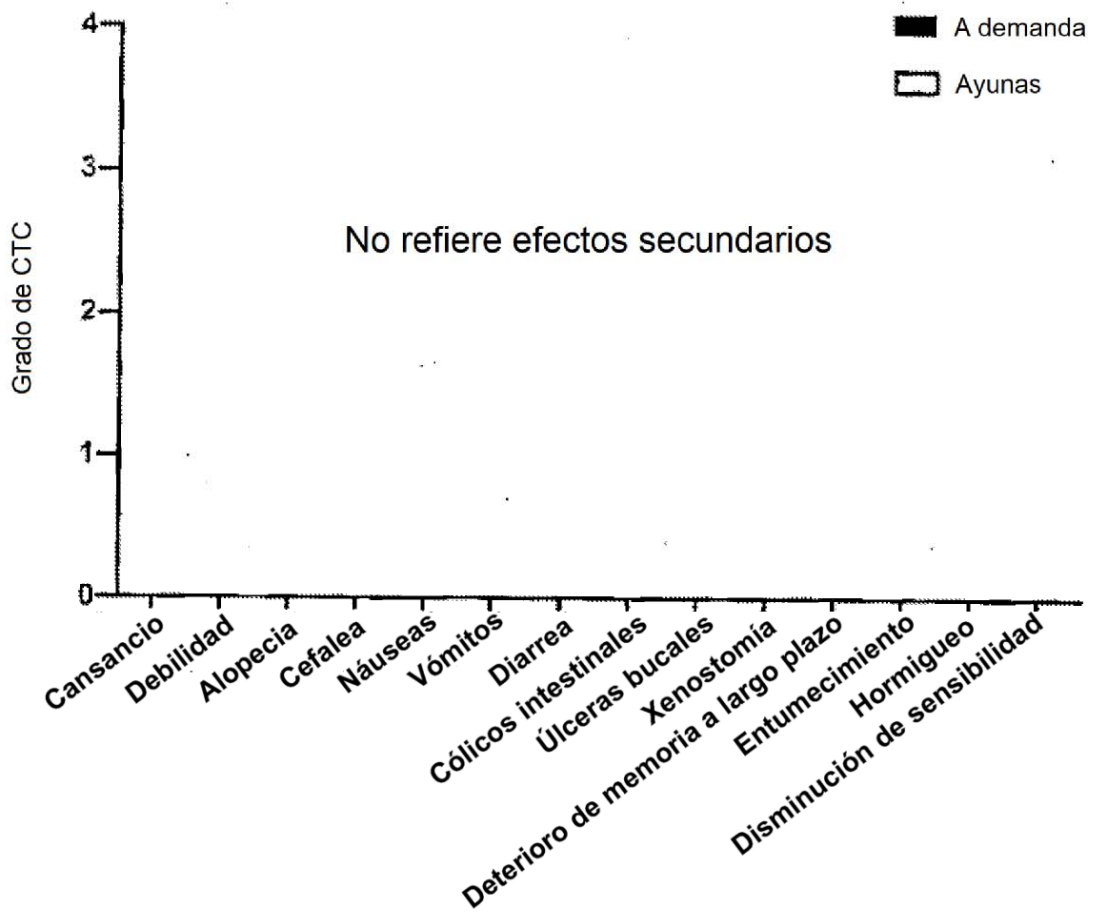


Fig. 10

Fig. 11A

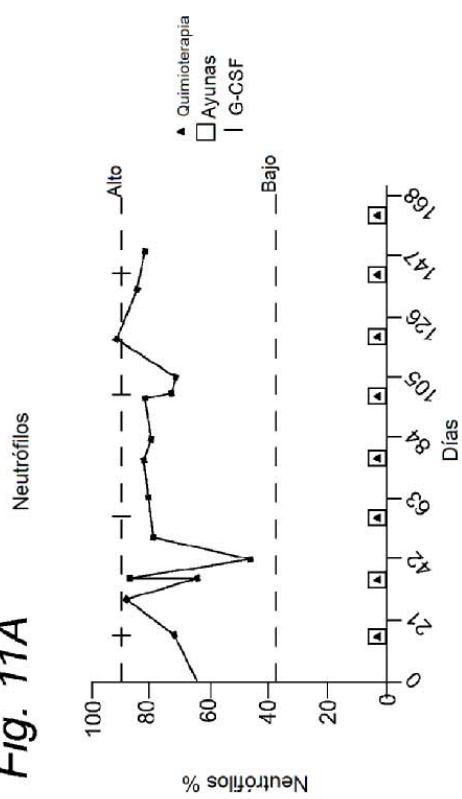


Fig. 11B

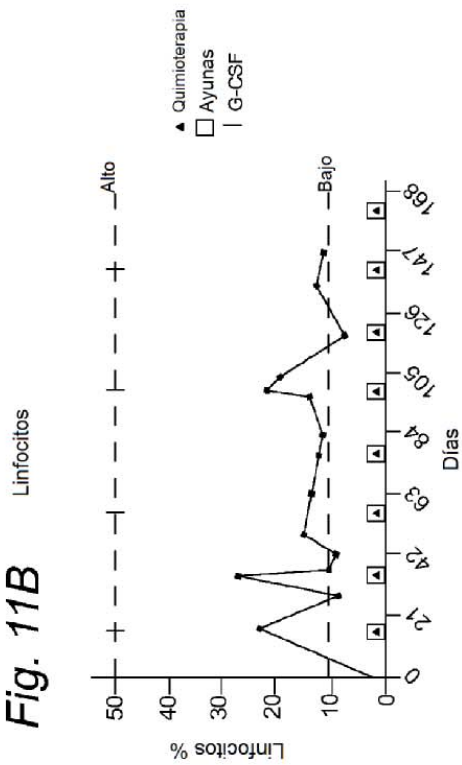


Fig. 11C

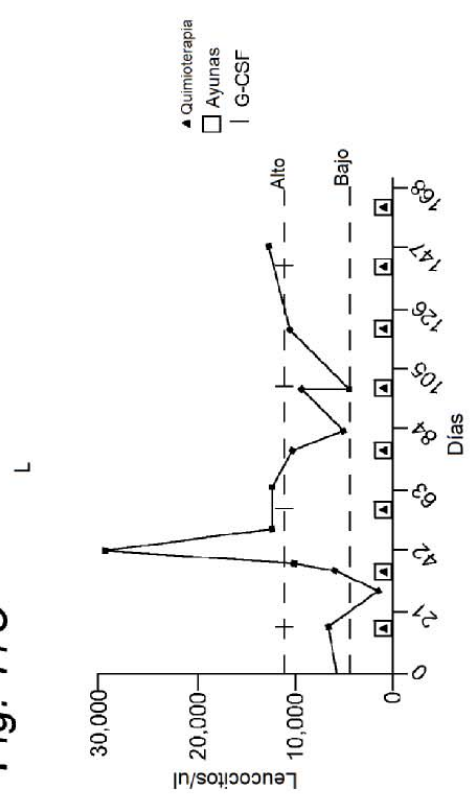


Fig. 11D

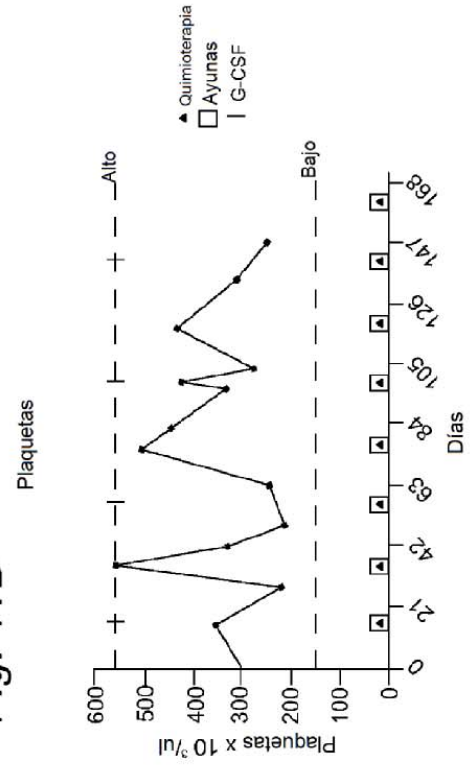


Fig. 11F

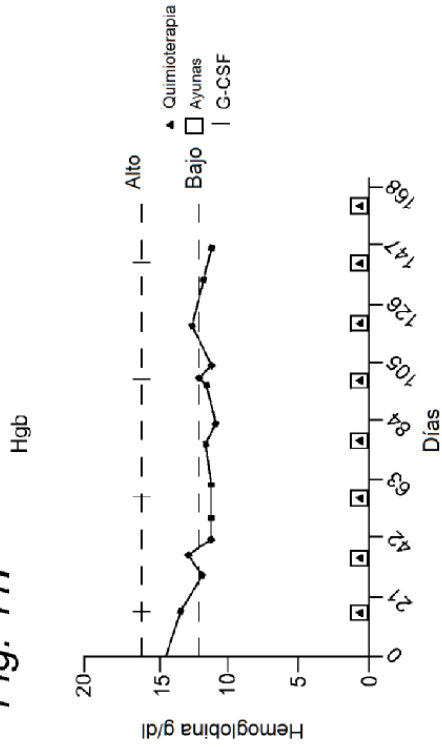


Fig. 11E

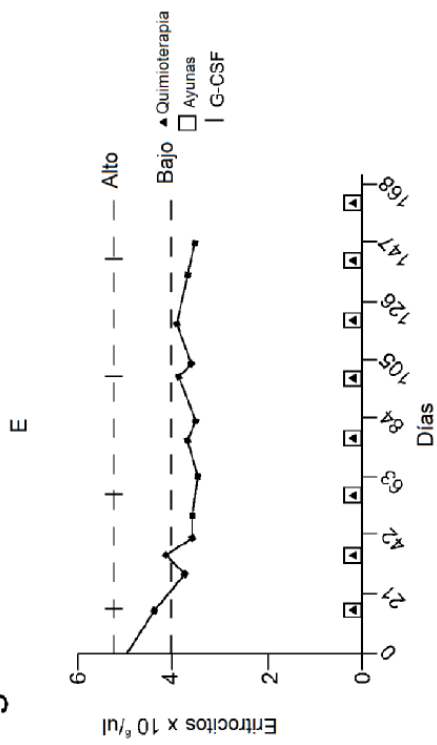


Fig. 11H

Niveles de APE durante la quimioterapia (2008)

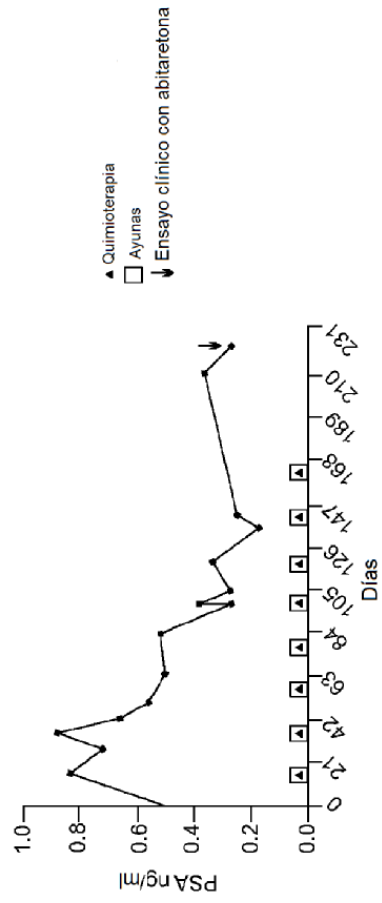
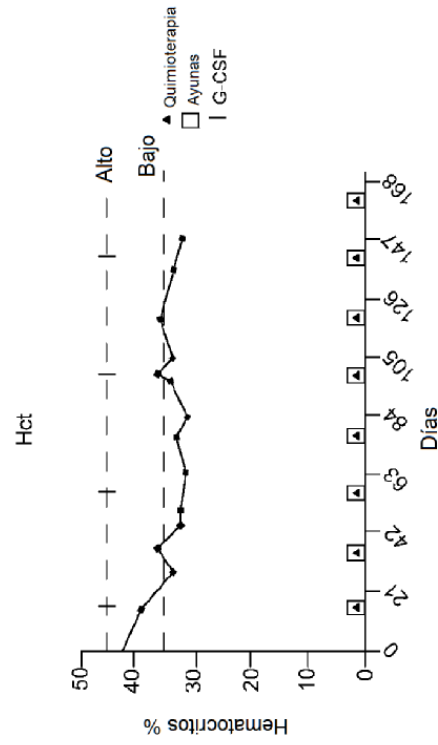


Fig. 11G



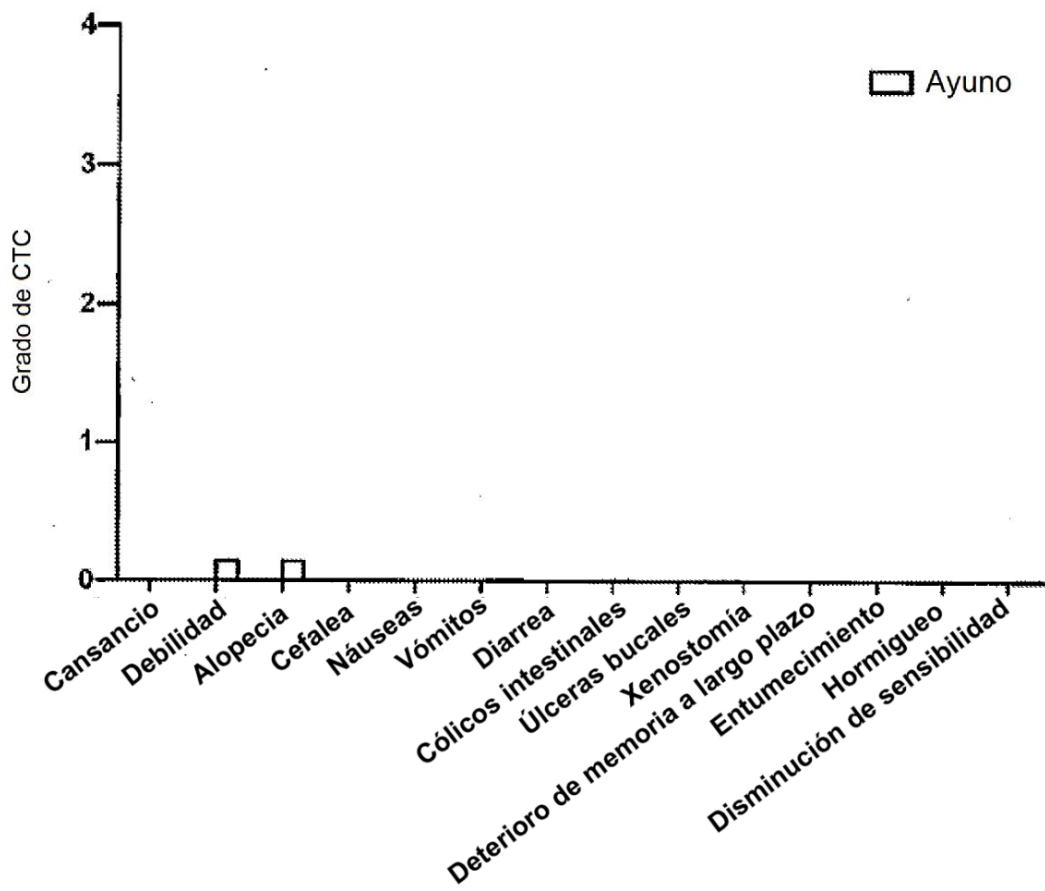


Fig. 12

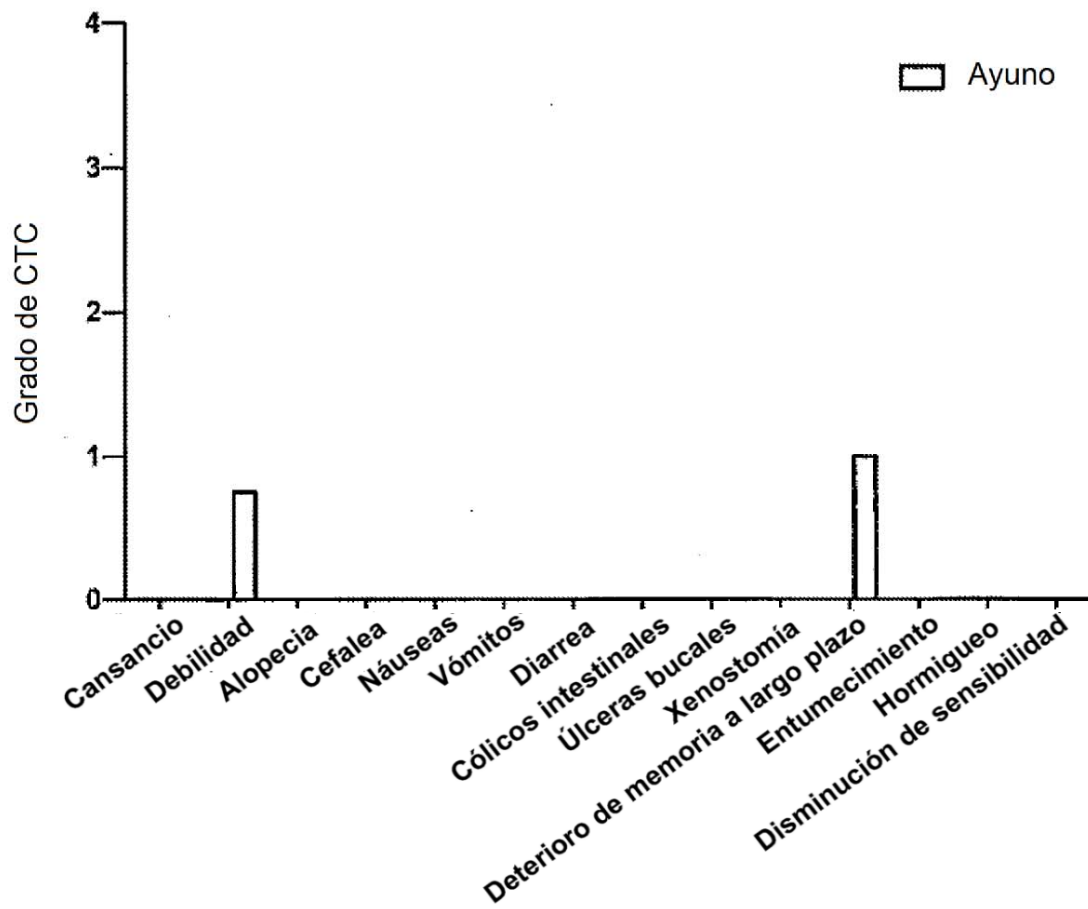


Fig. 13

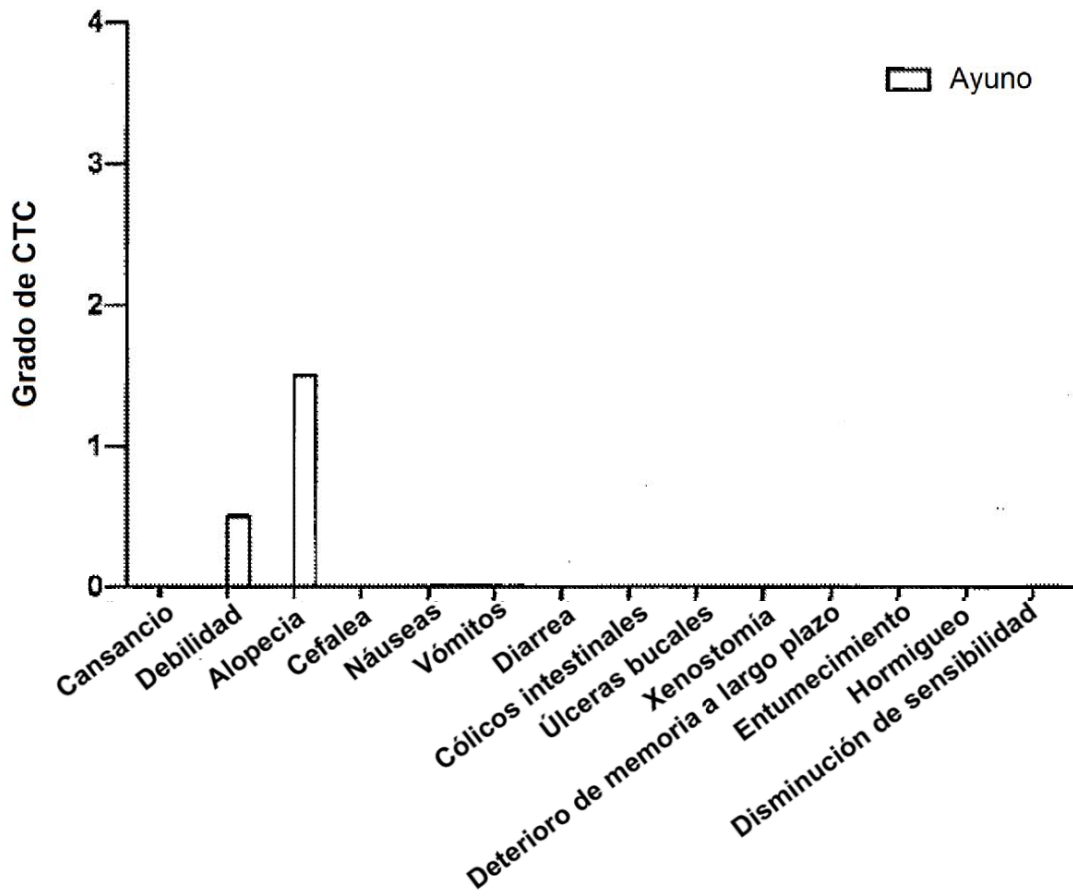


Fig. 14

Fig. 15A

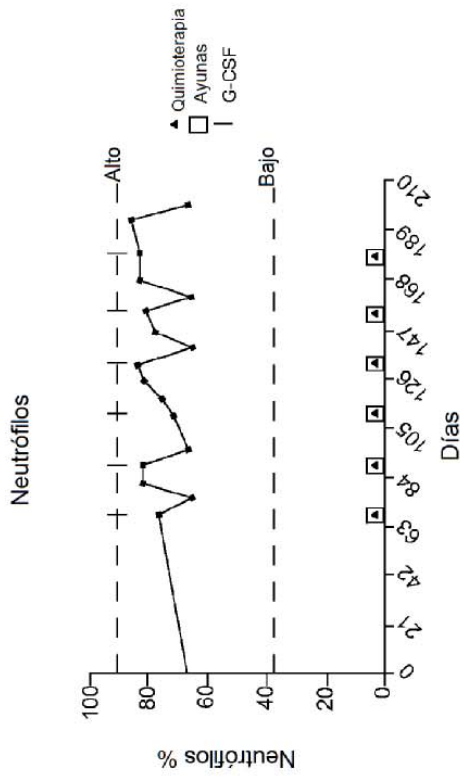


Fig. 15B

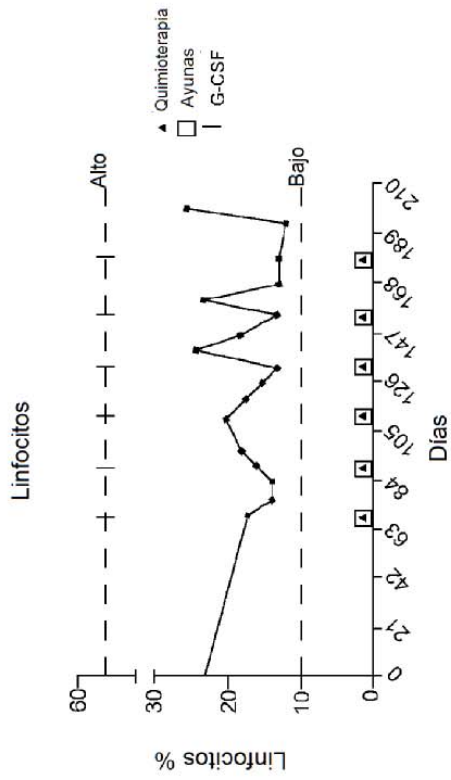


Fig. 15C

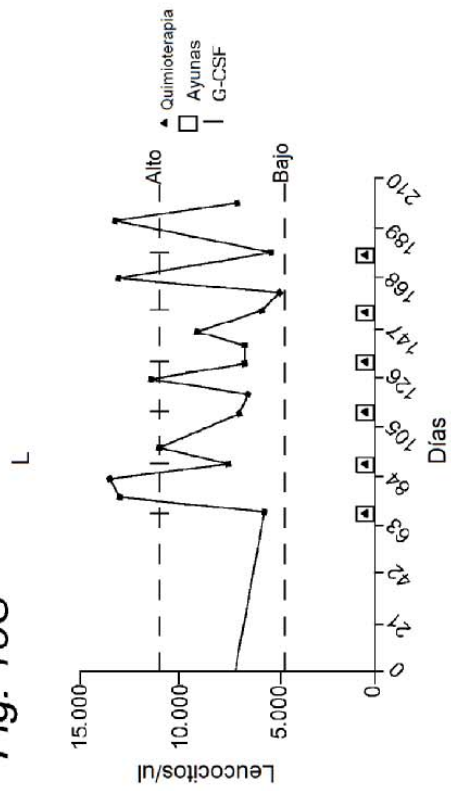


Fig. 15D

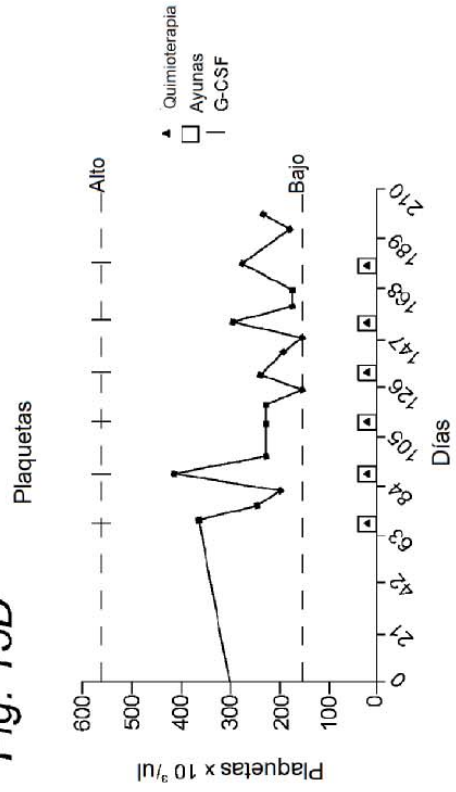


Fig. 15F

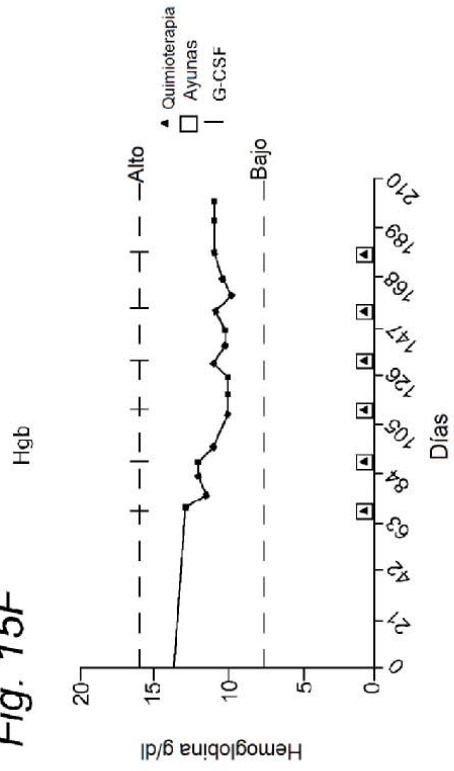


Fig. 15E

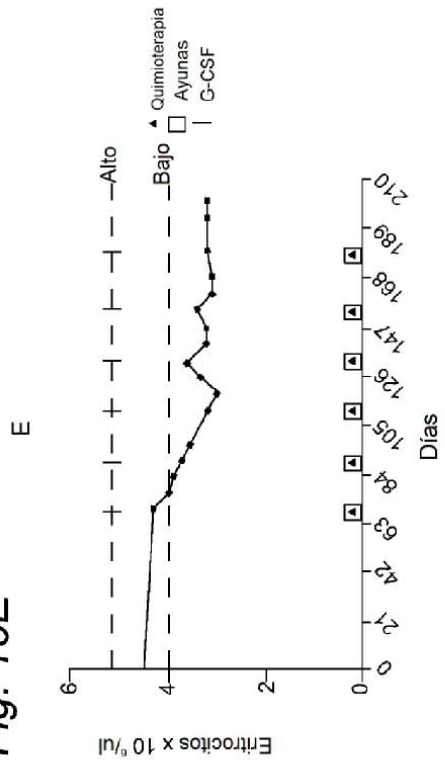
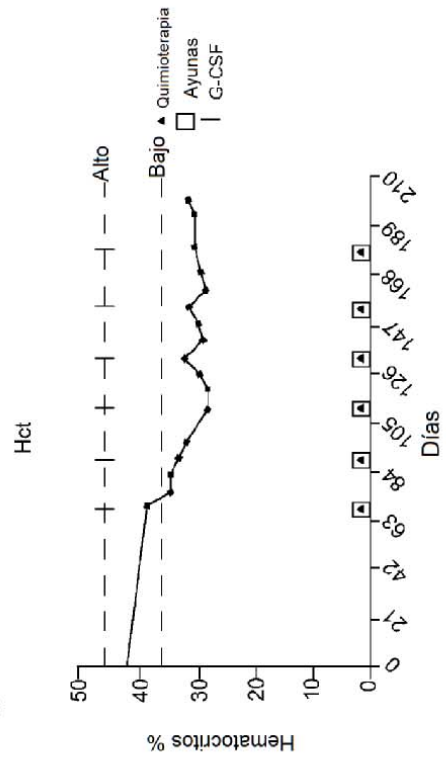


Fig. 15G



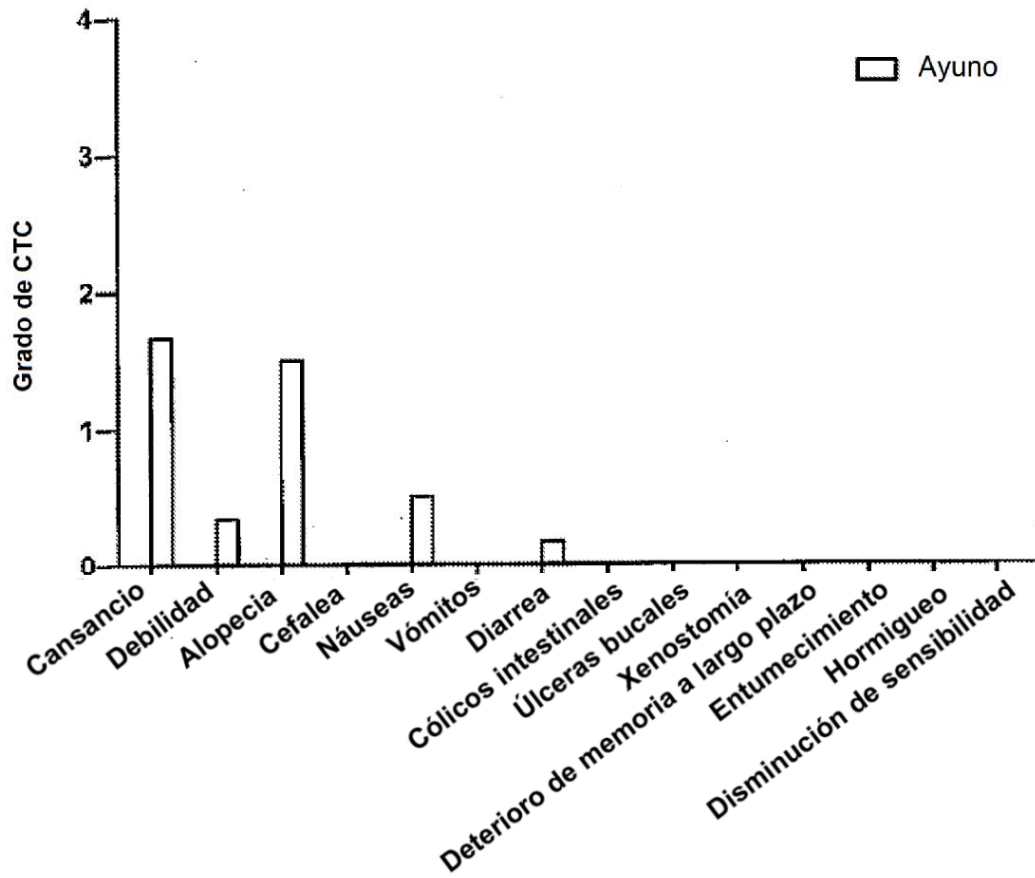


Fig. 16

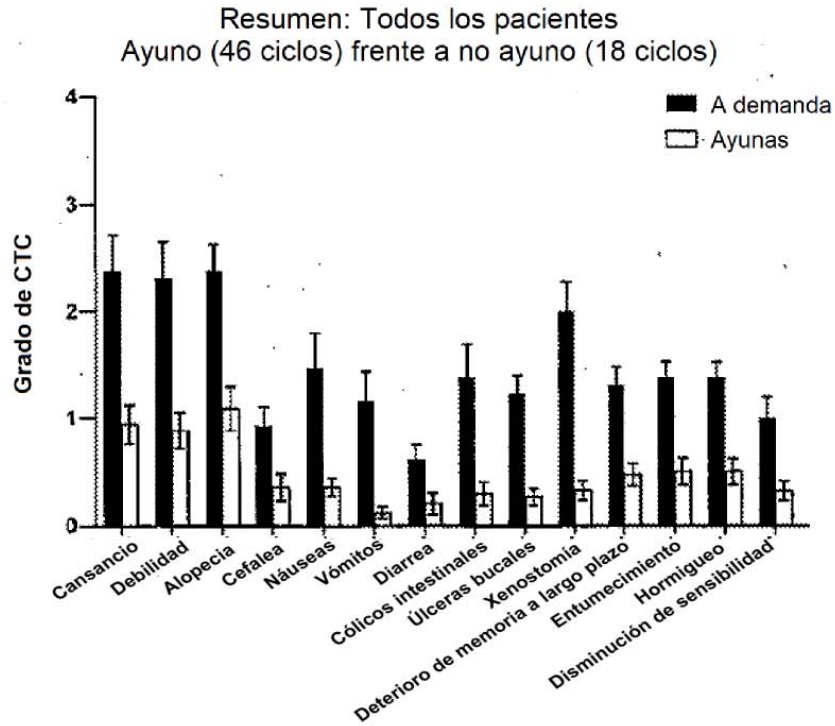


Fig. 17A

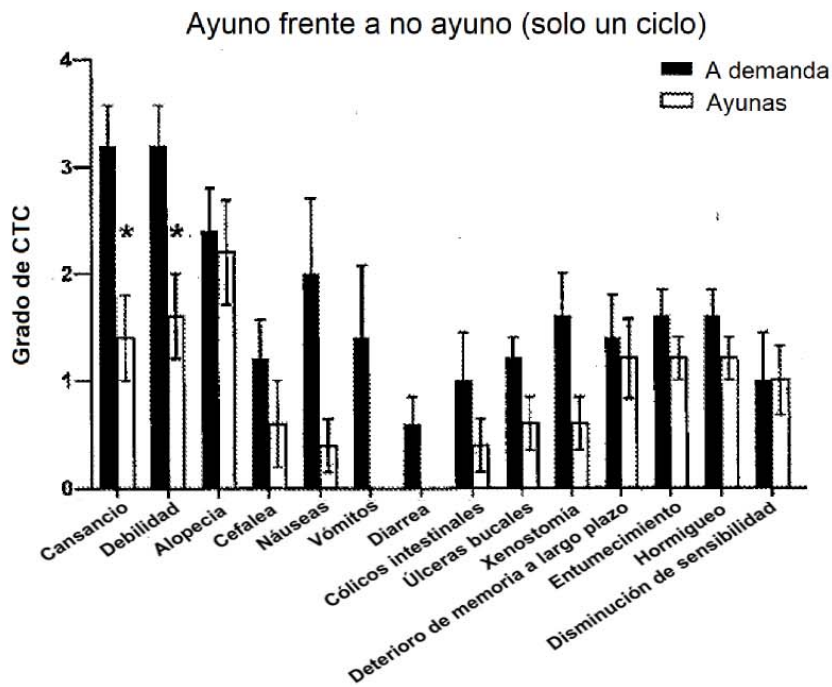


Fig. 17B

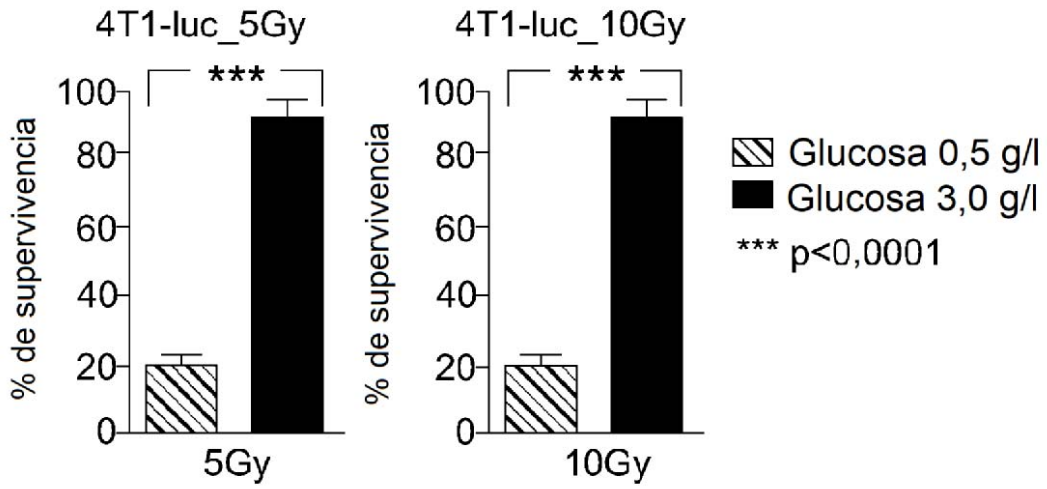


Fig. 18A

Fig. 18B

Diferencia de 4T1_luc ICP con MTT

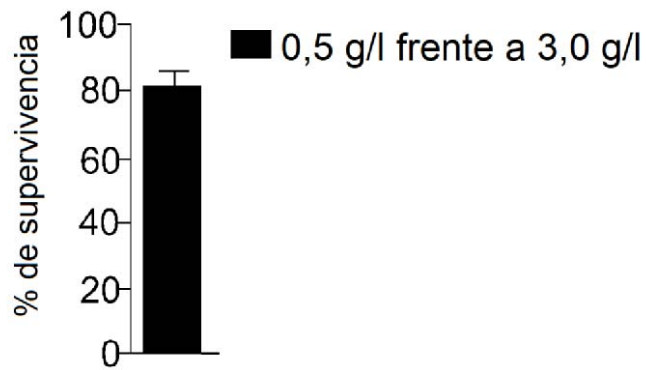


Fig. 18C

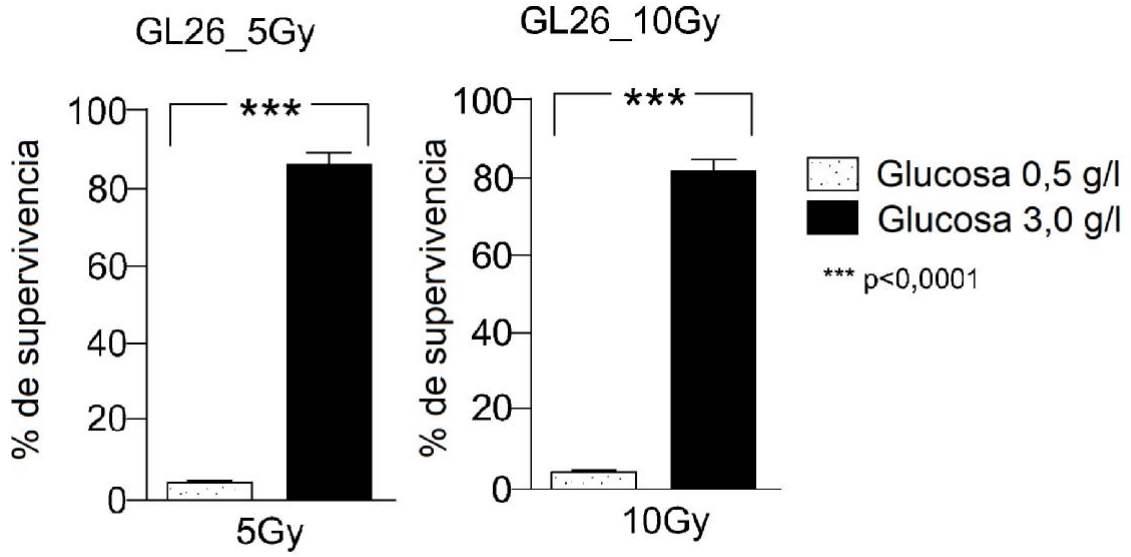


Fig. 19A

Fig. 19B

Diferencia de GL26_ICP con MTT

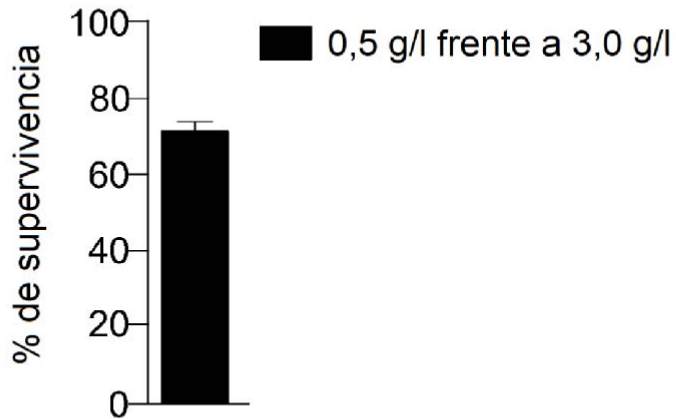


Fig. 19C

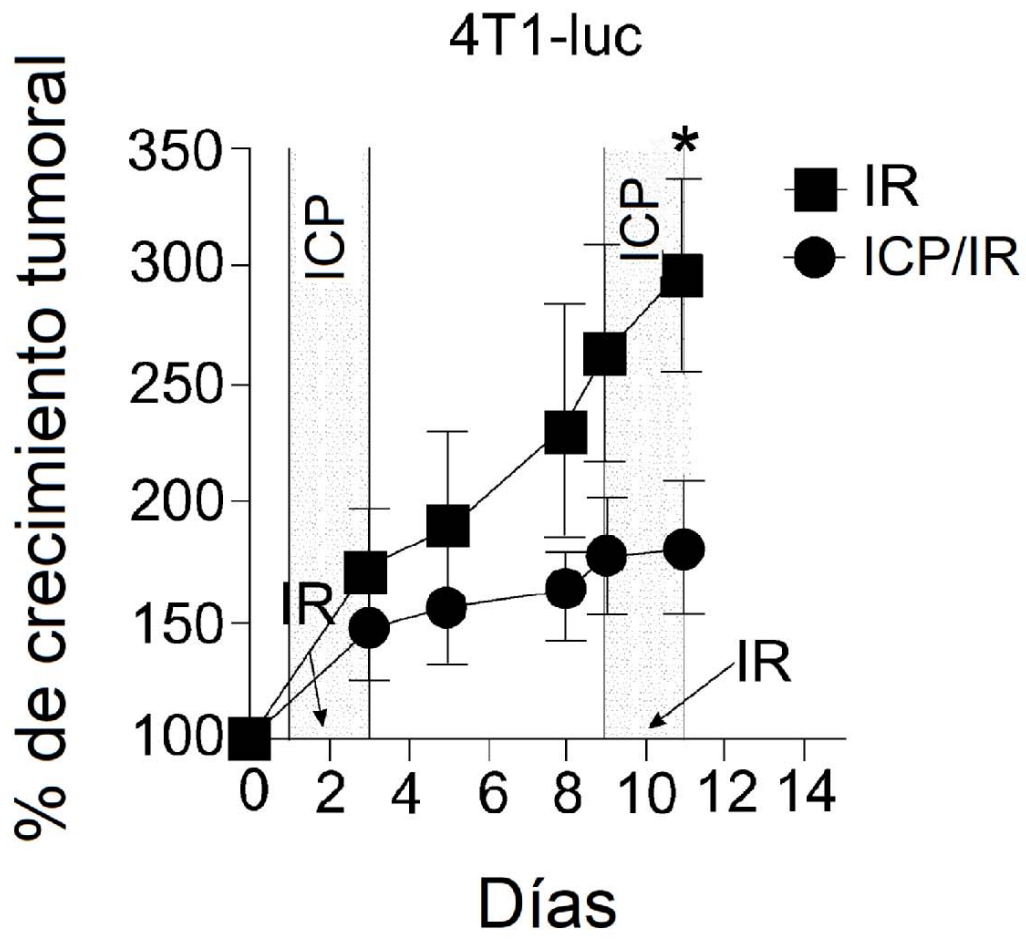


Fig. 20

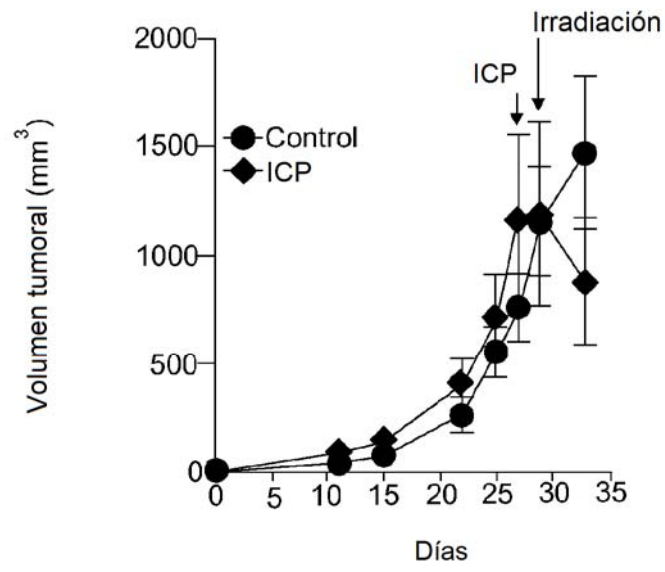


Fig. 21

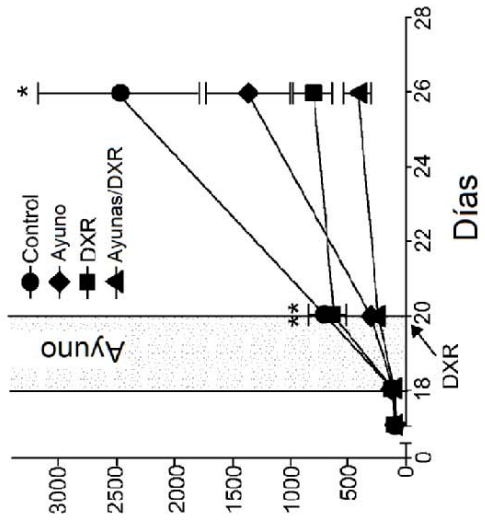


Fig. 22C

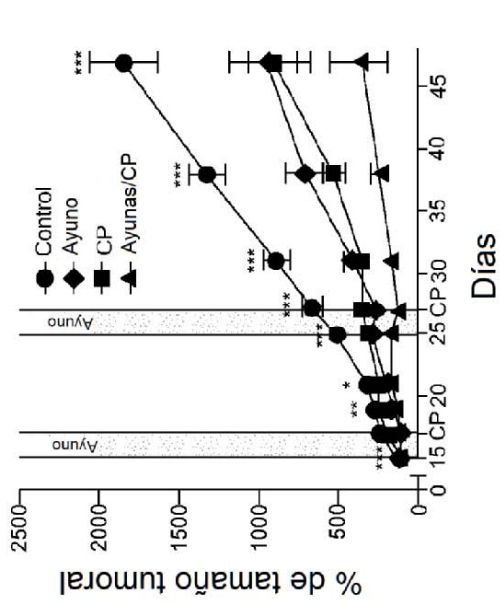


Fig. 22A

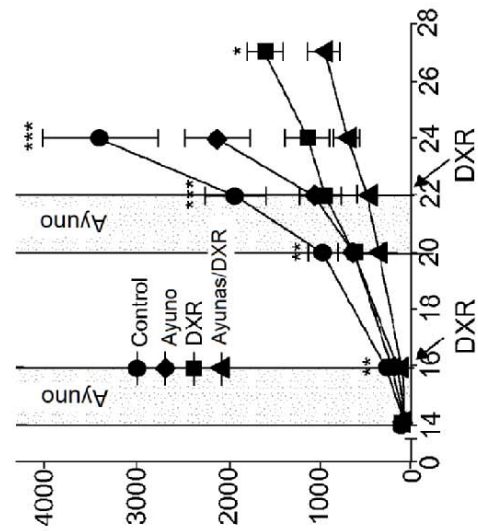


Fig. 22B

Fig. 23B

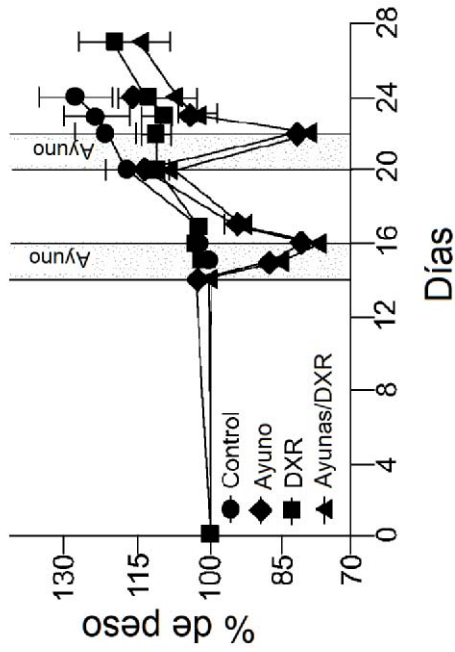


Fig. 23D

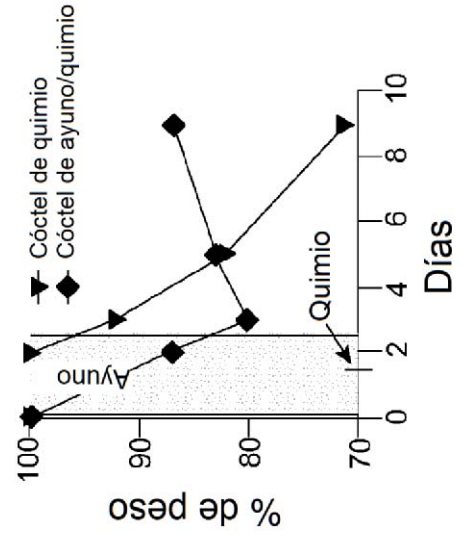


Fig. 23A

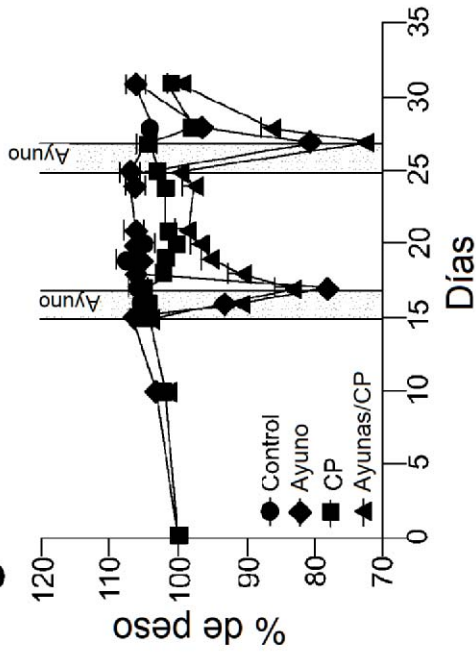
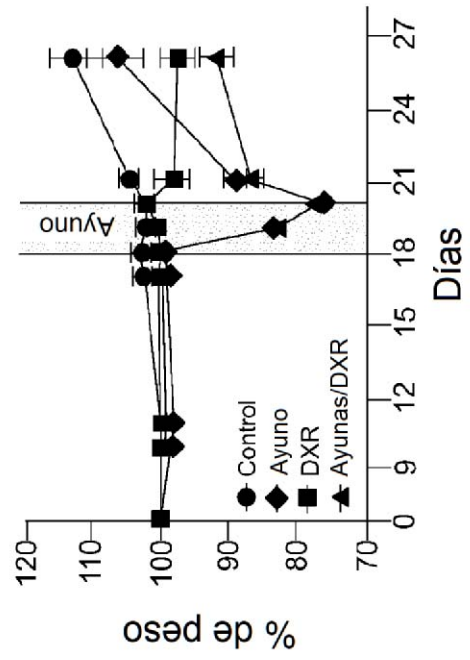


Fig. 23C



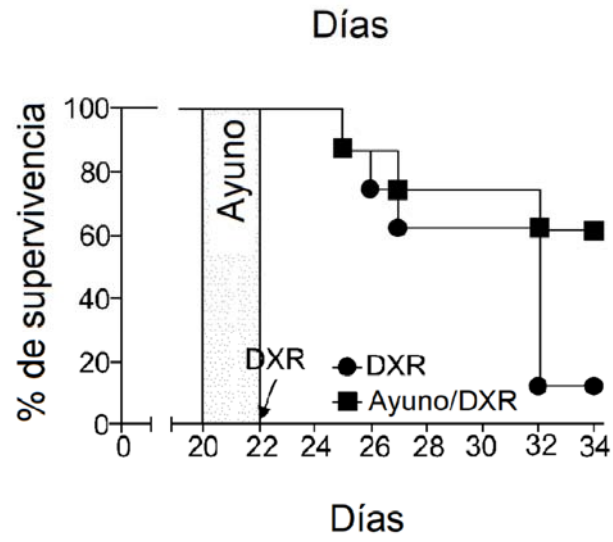


Fig. 24

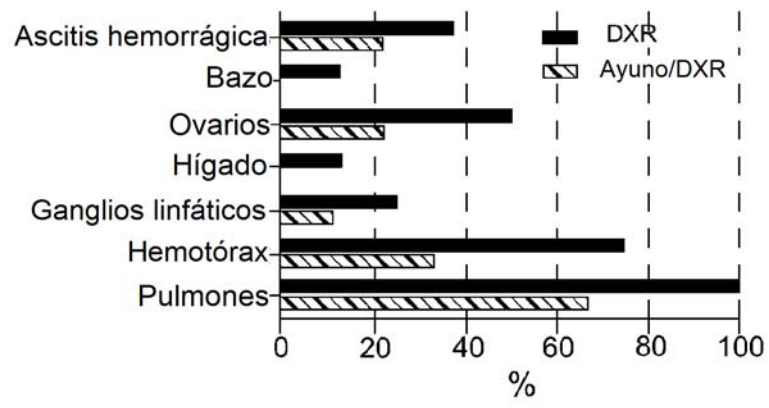


Fig. 25

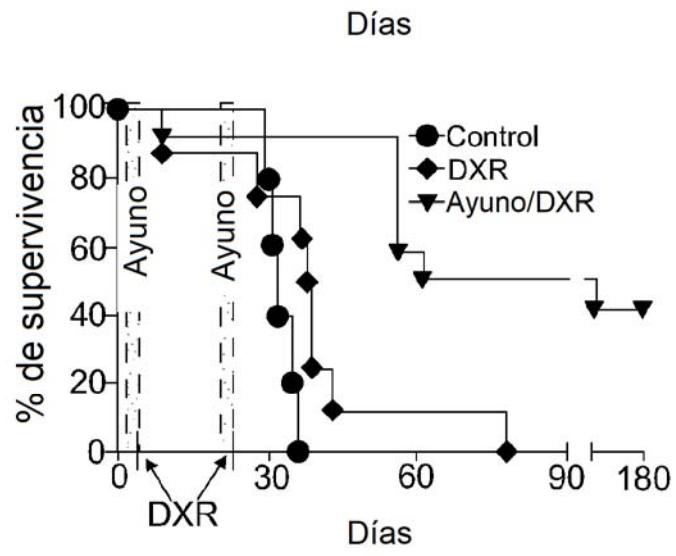


Fig. 26

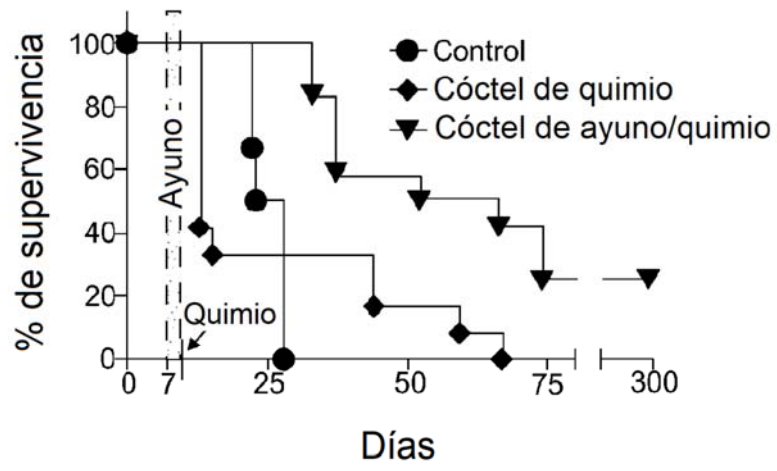


Fig. 27

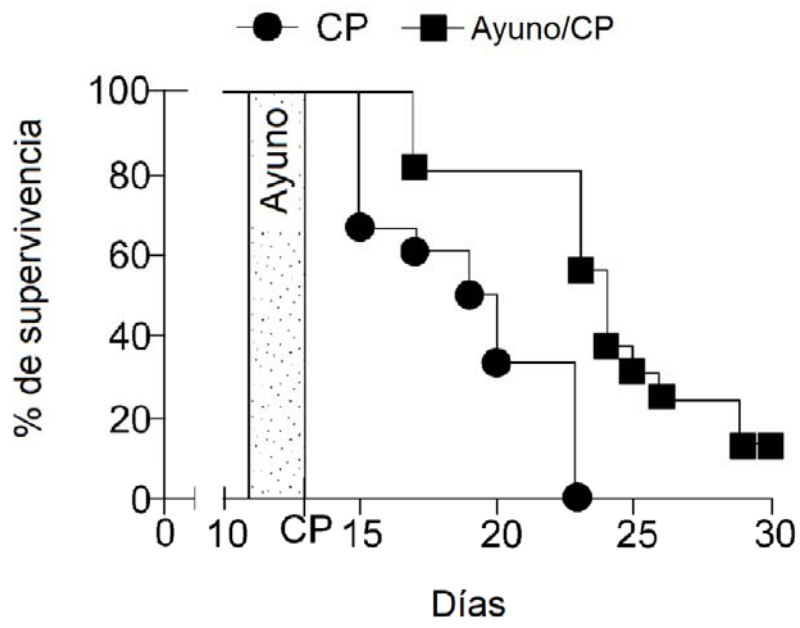


Fig. 28

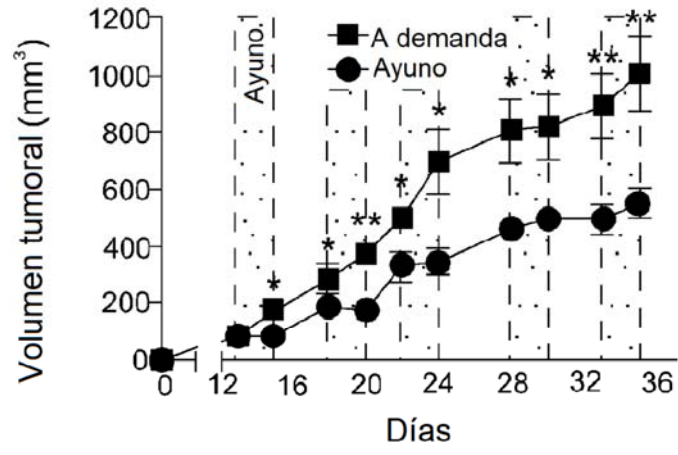


Fig. 29

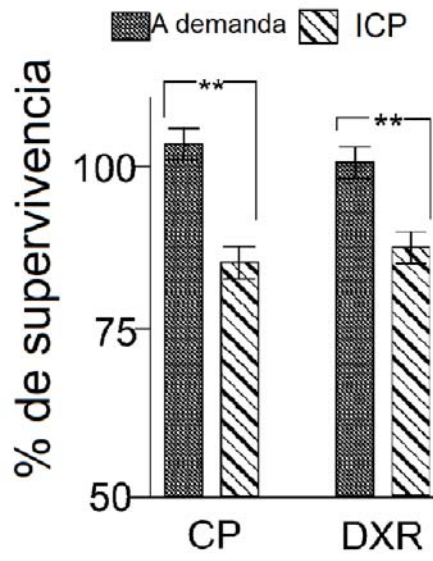


Fig. 30

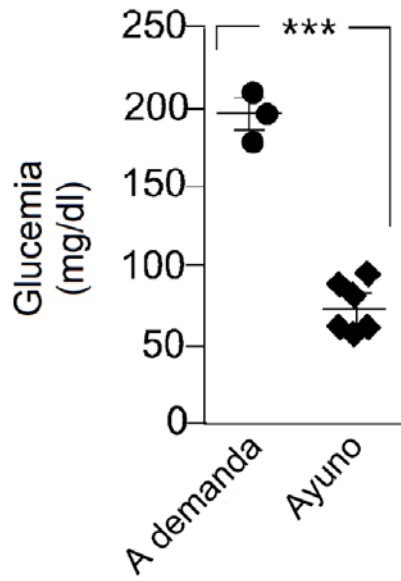


Fig. 31

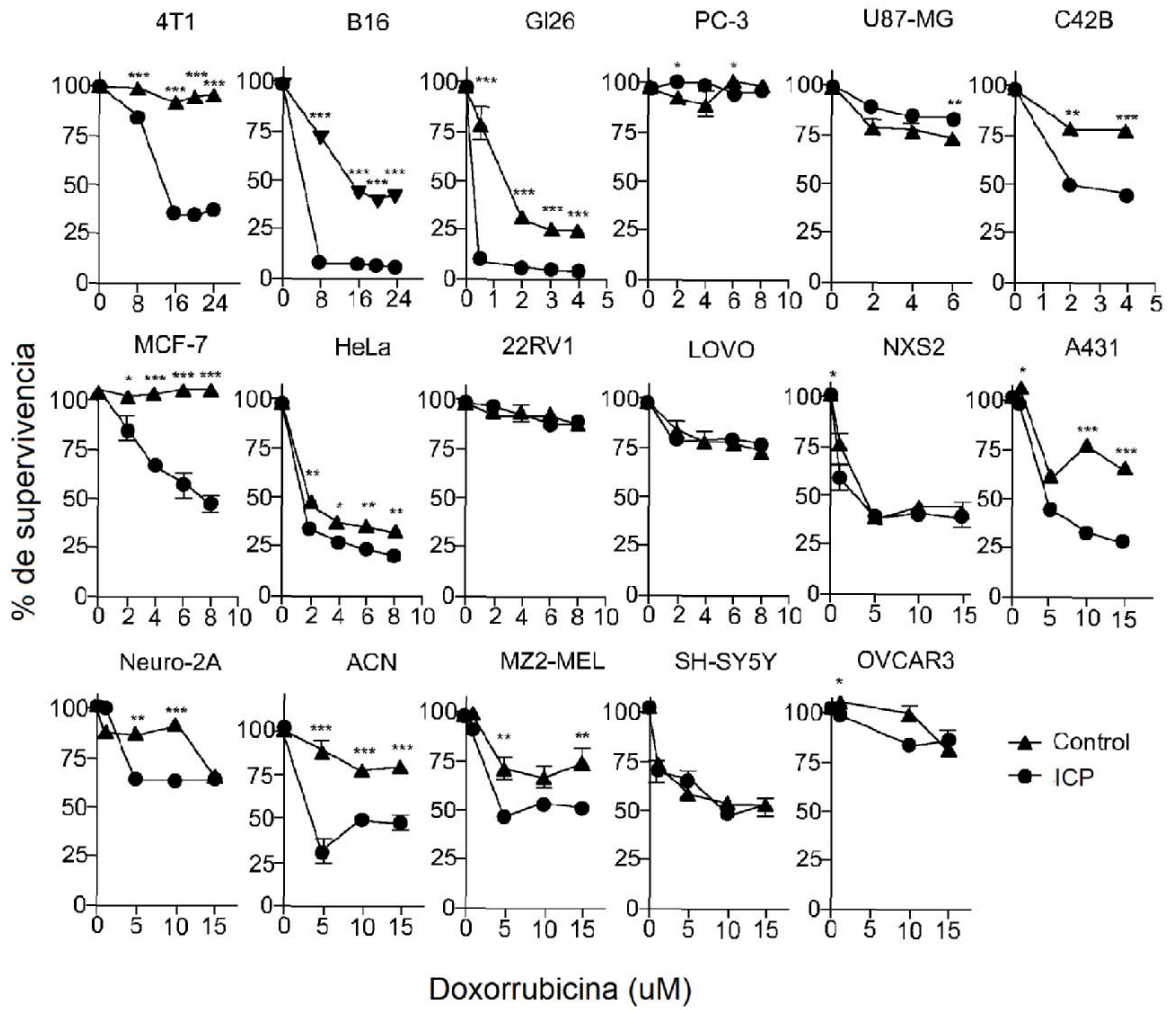


Fig. 32

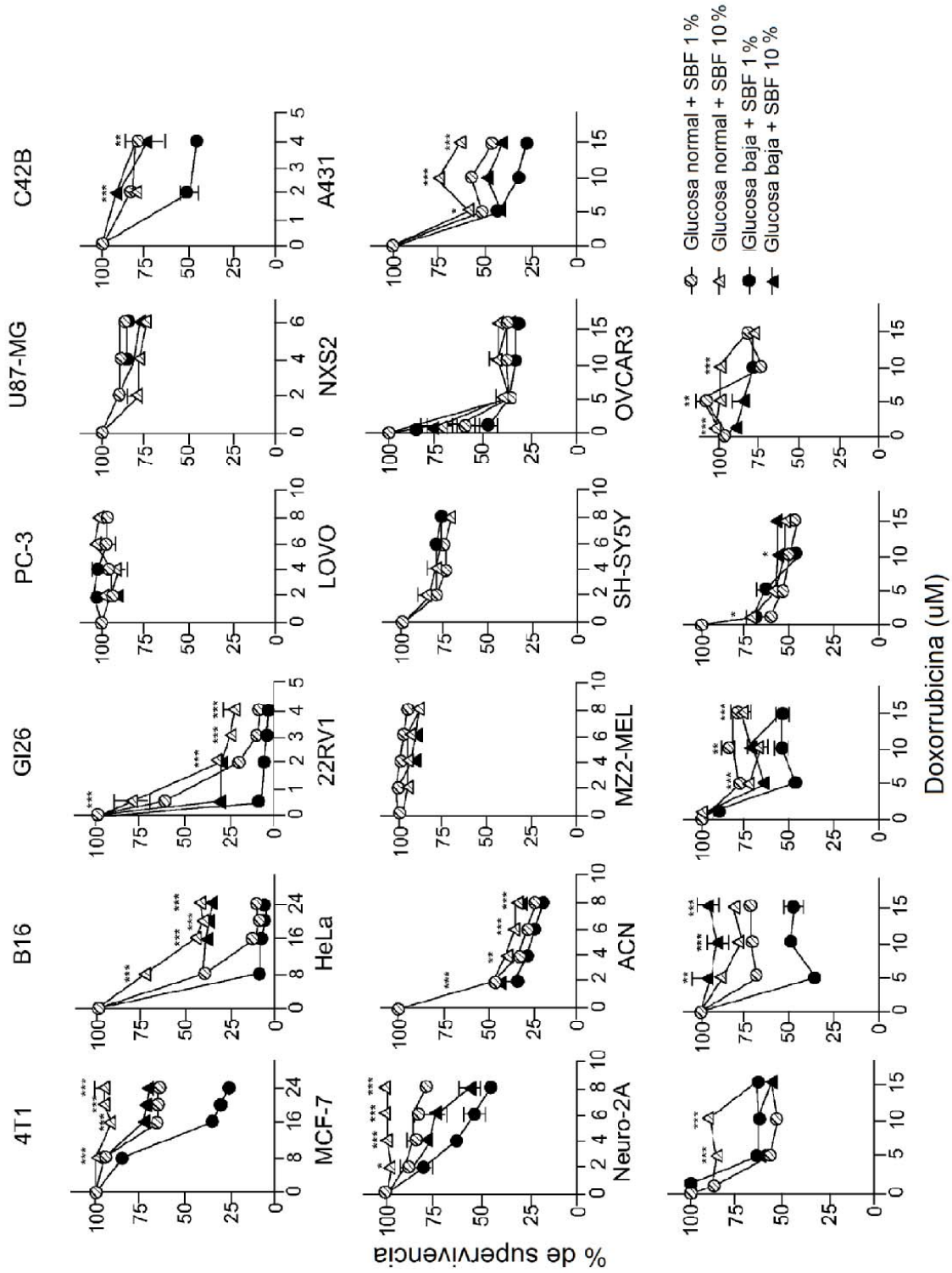


Fig. 33

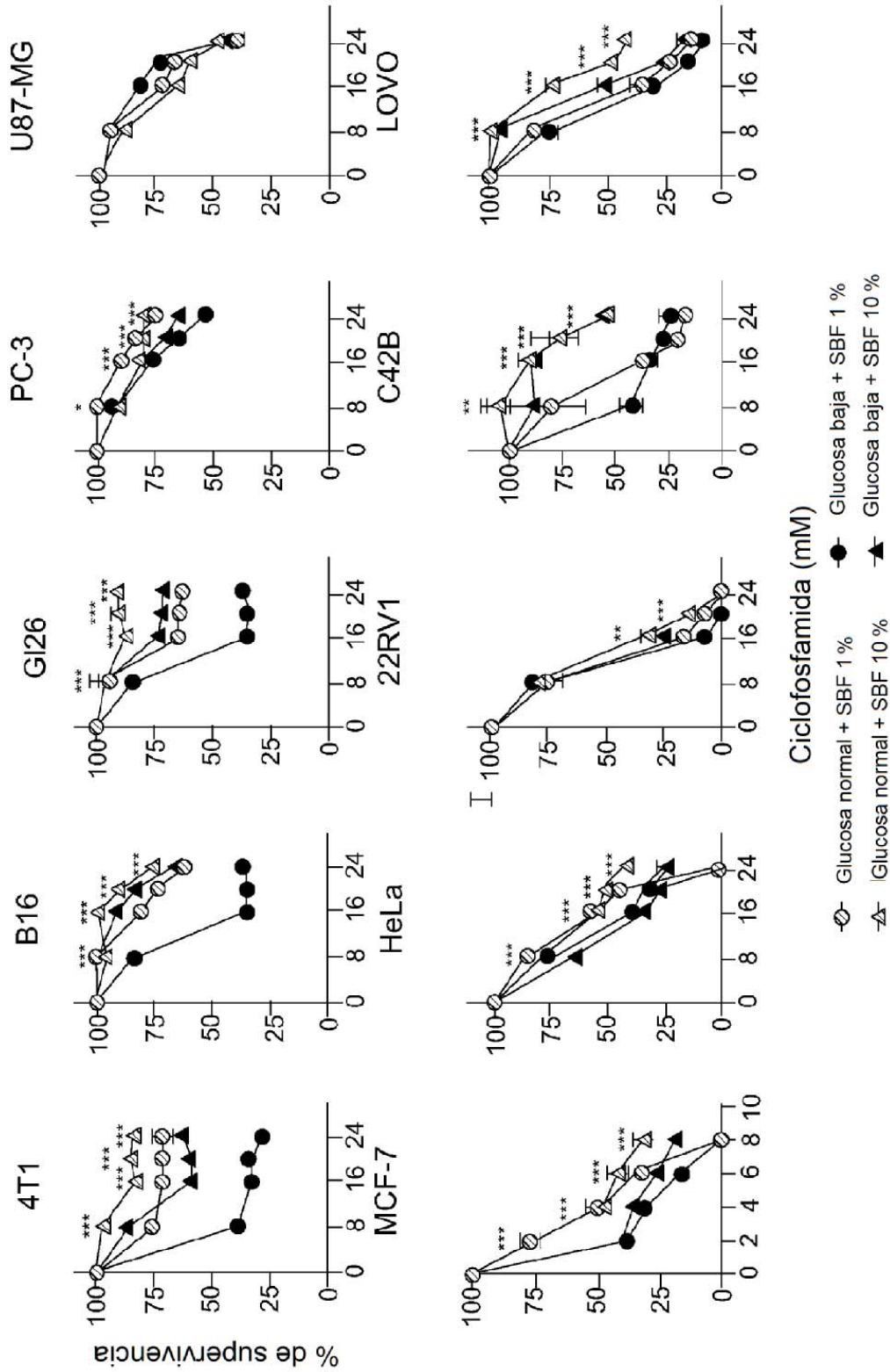


Fig. 34

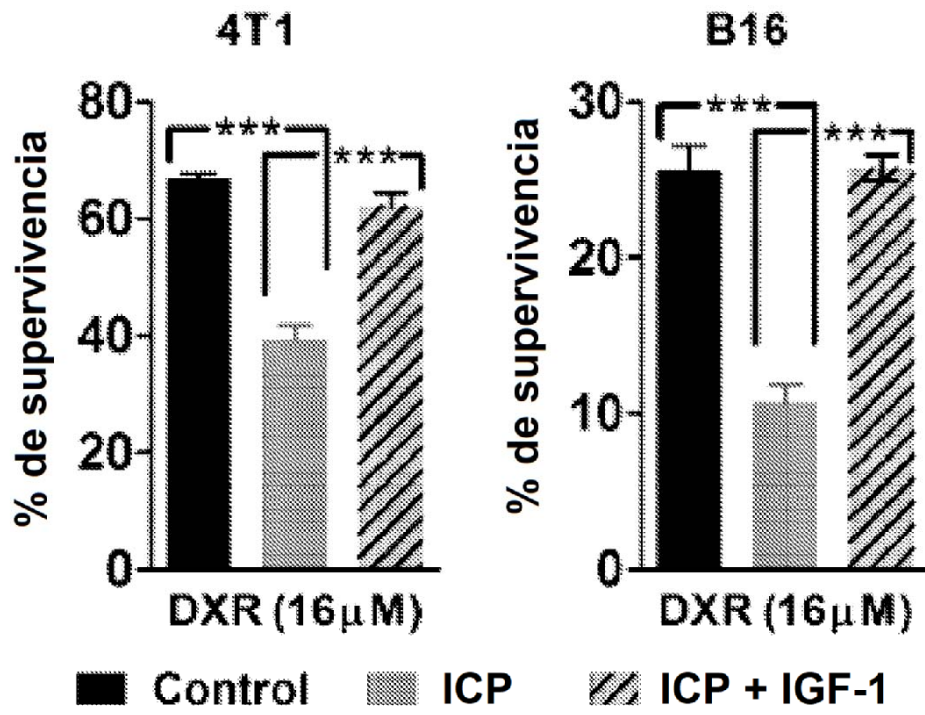


Fig. 35

Fig. 36A

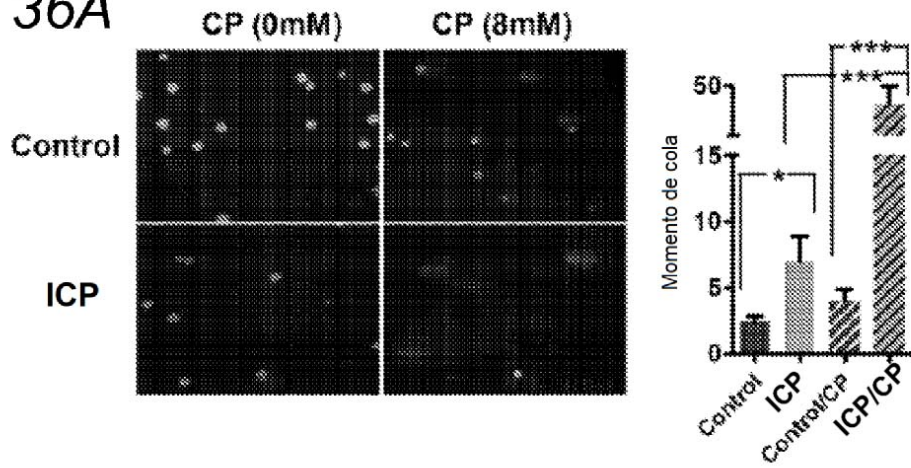


Fig. 36B

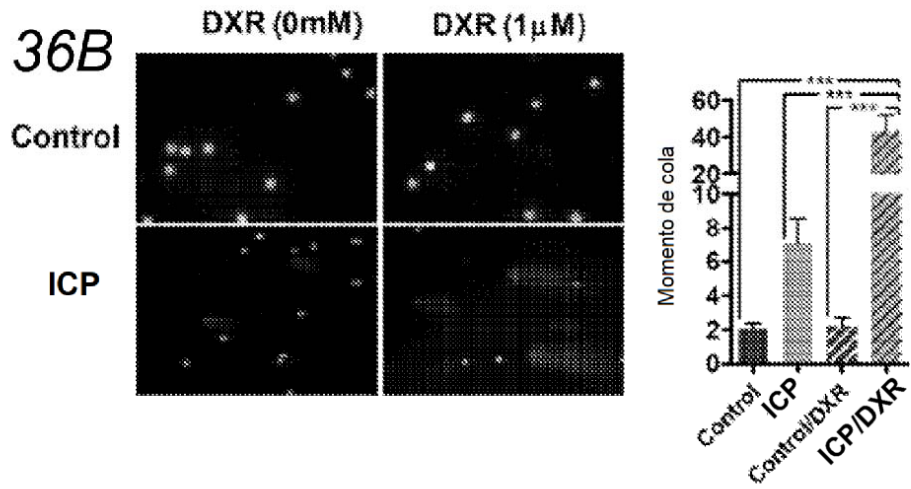
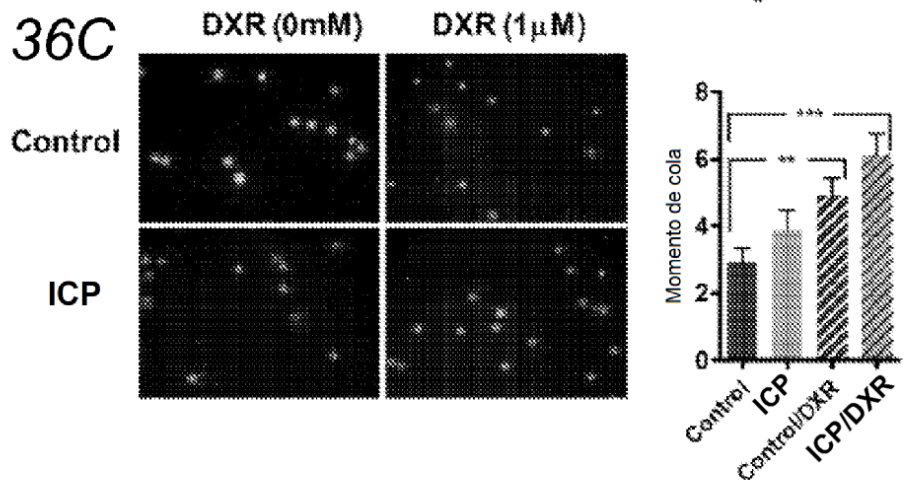


Fig. 36C



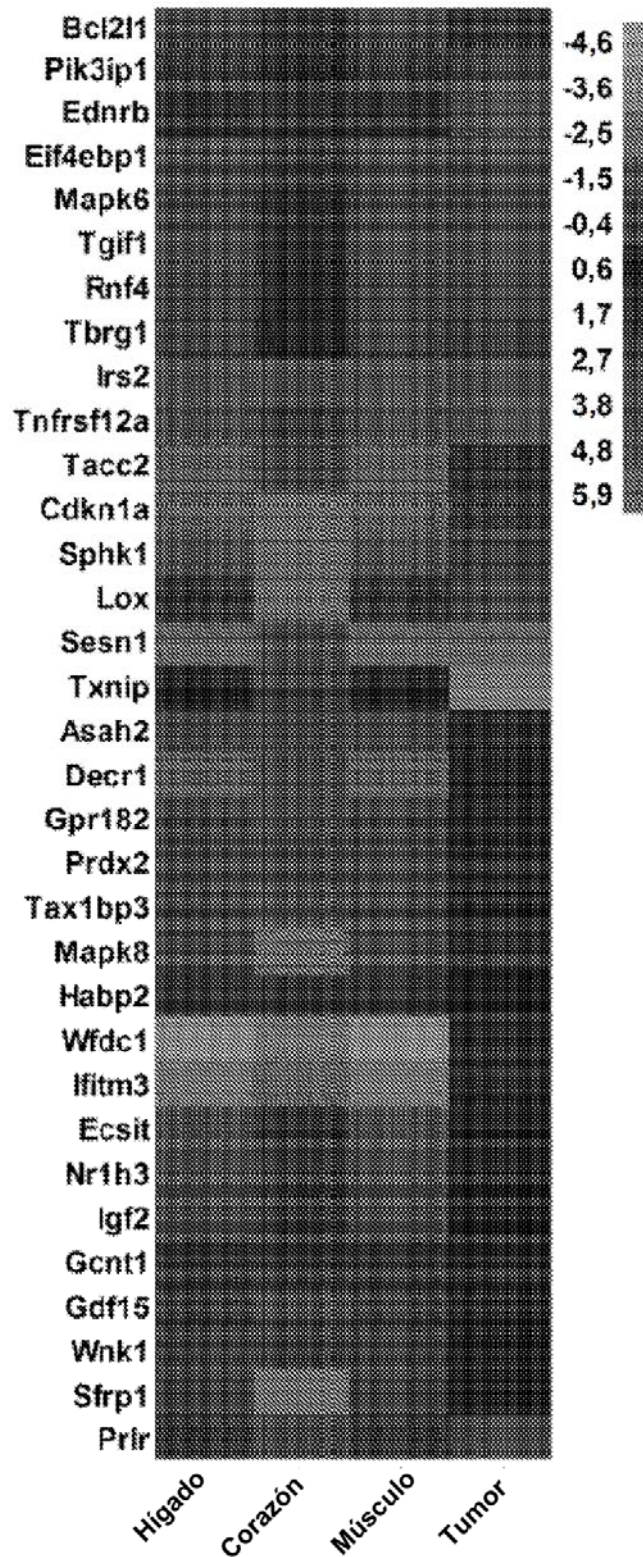


Fig. 37

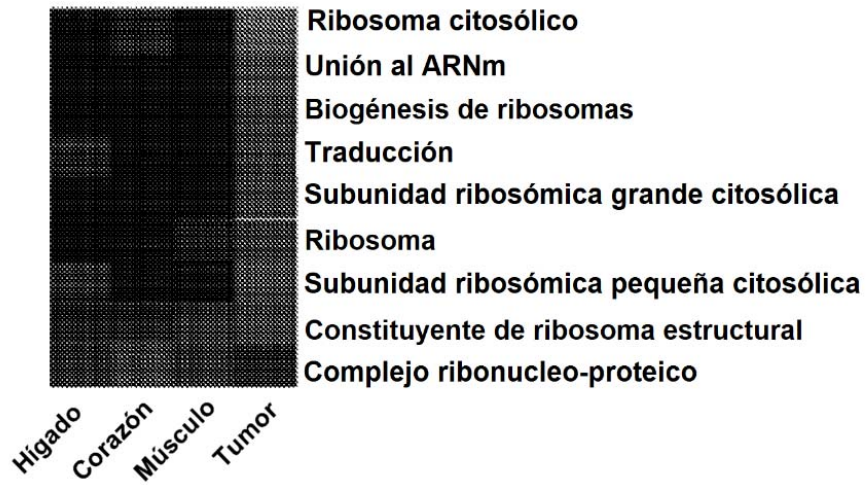


Fig. 38

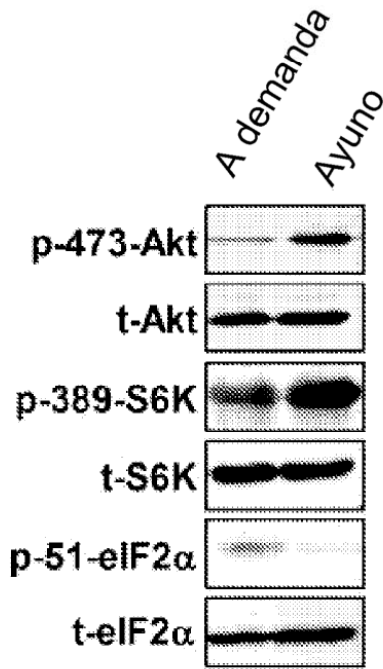


Fig. 39A

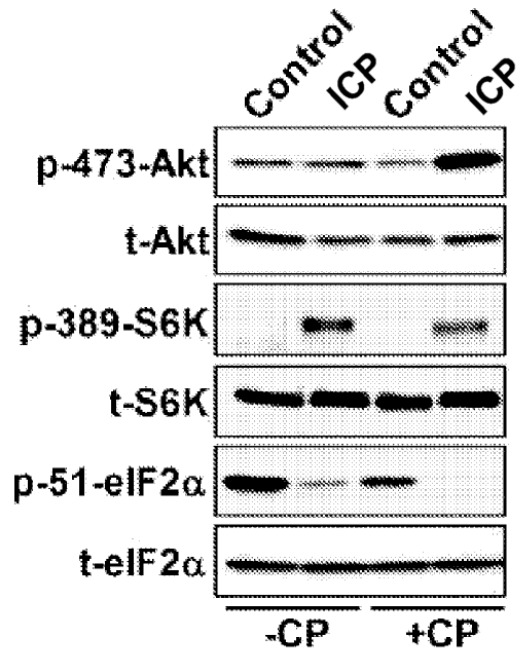


Fig. 39B

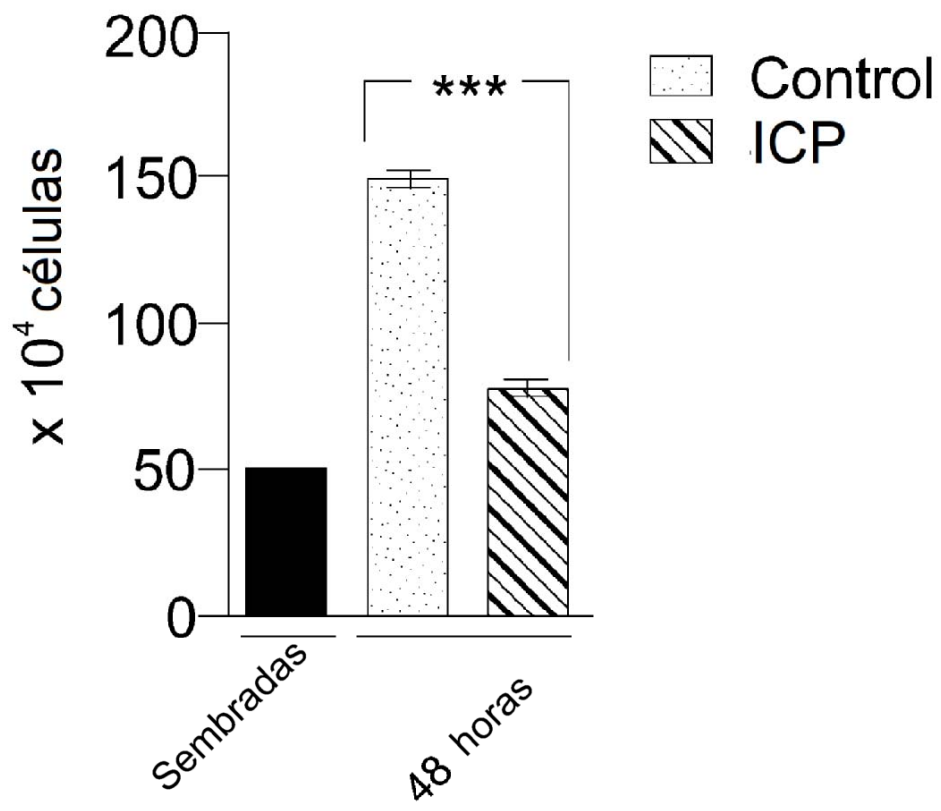


Fig. 40

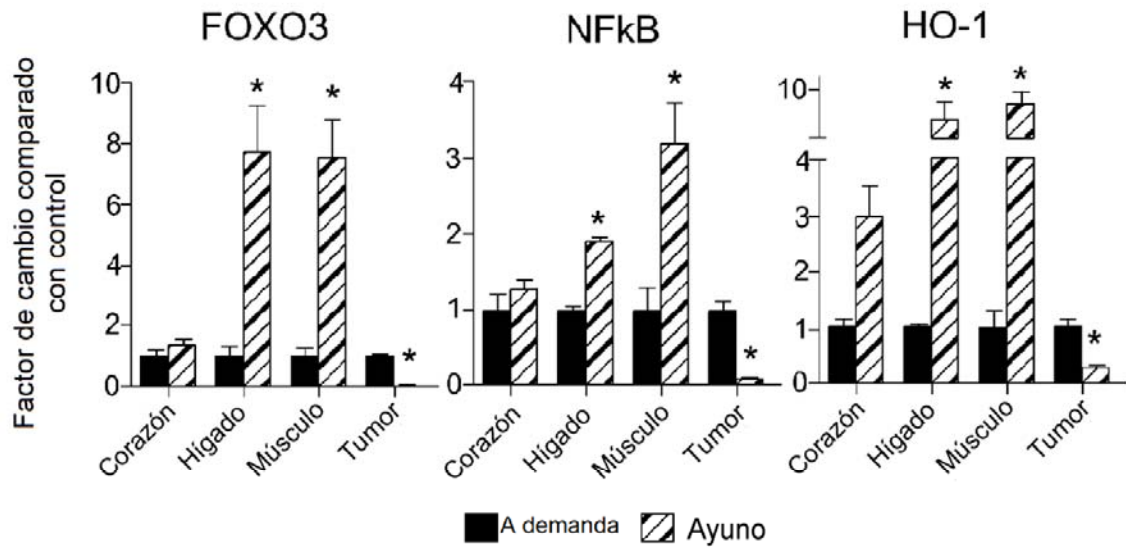


Fig. 41

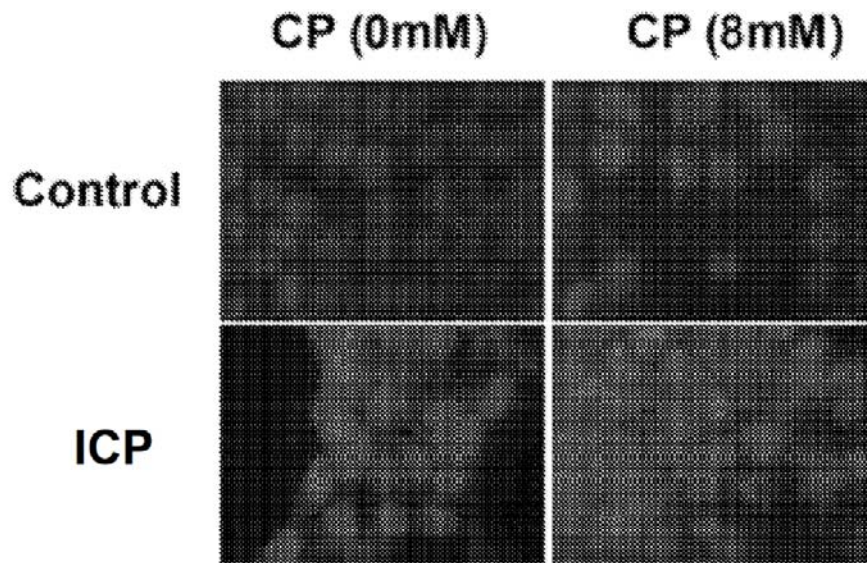


Fig. 42

CP 8 mM

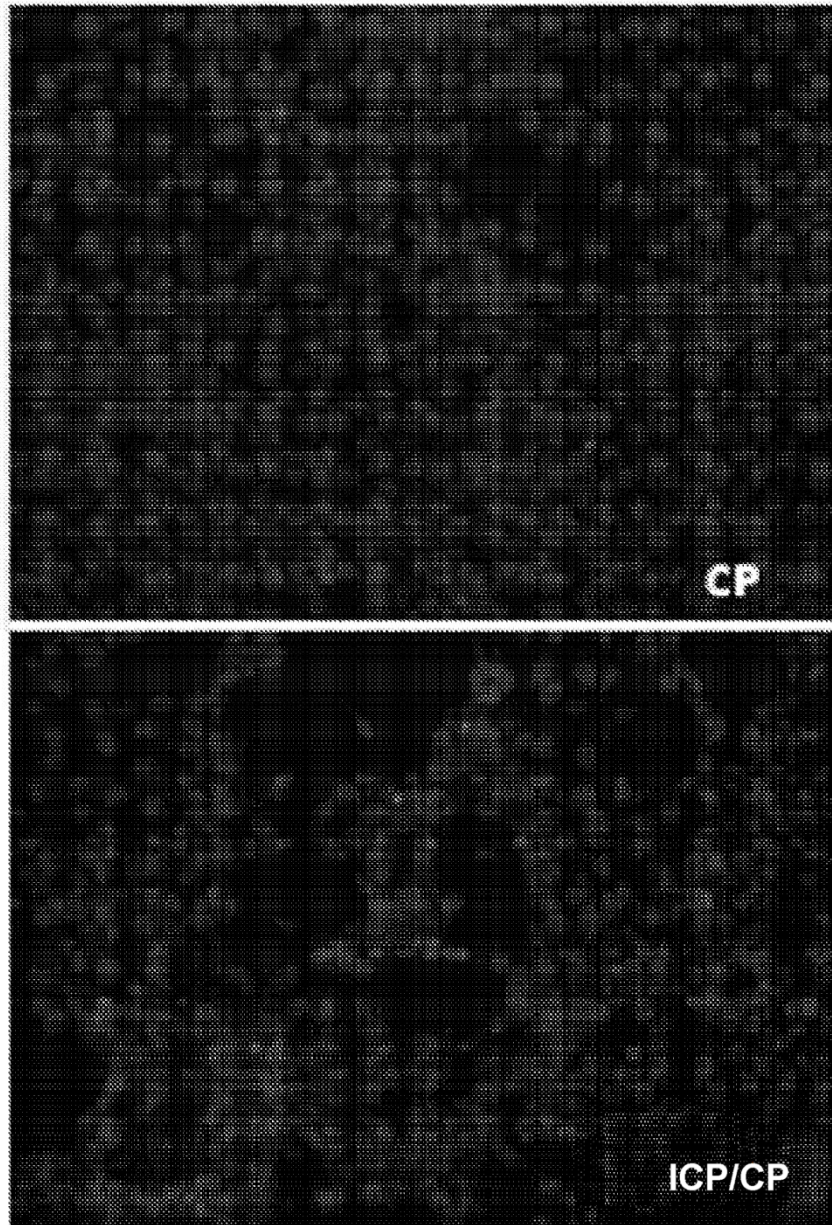


Fig. 43

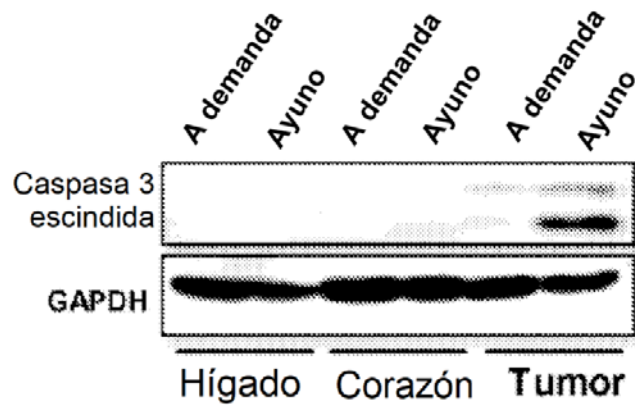


Fig. 44A

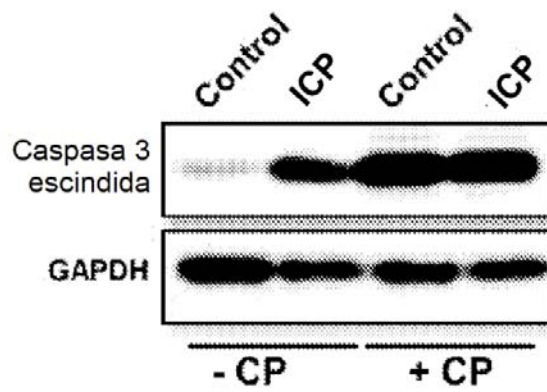


Fig. 44B

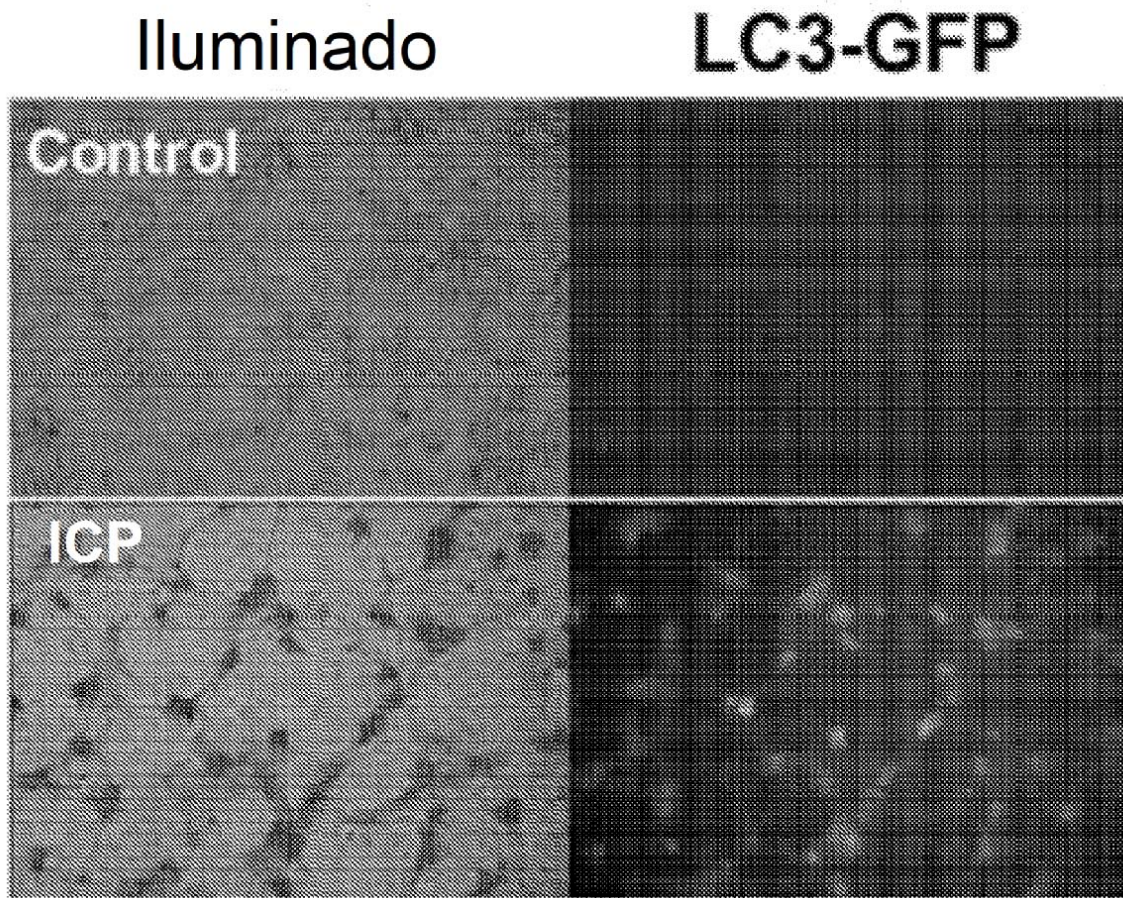


Fig. 45

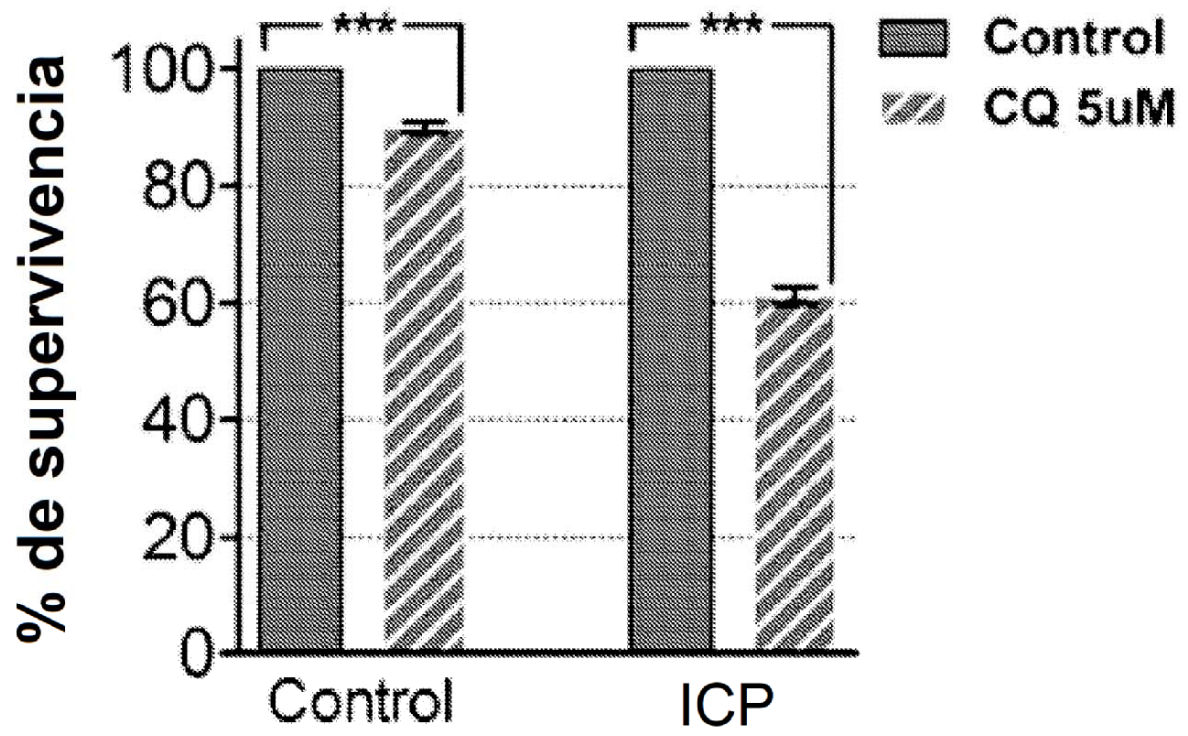


Fig. 46

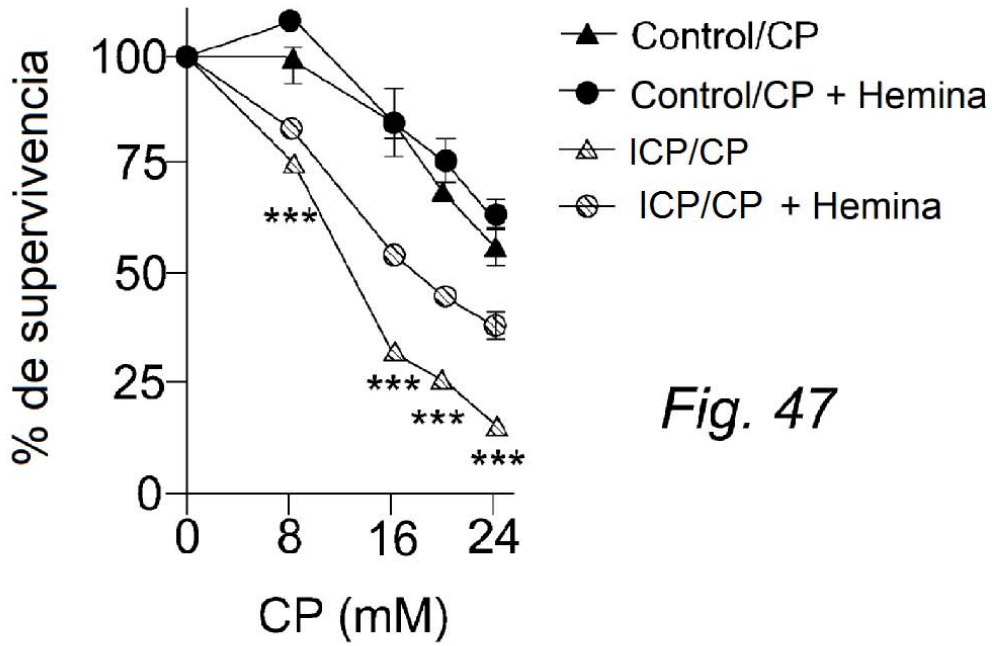


Fig. 47

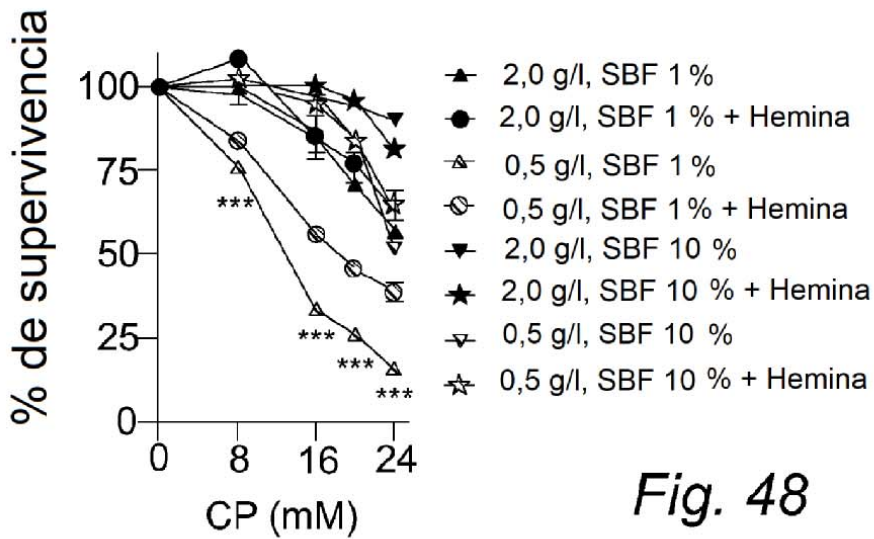


Fig. 48

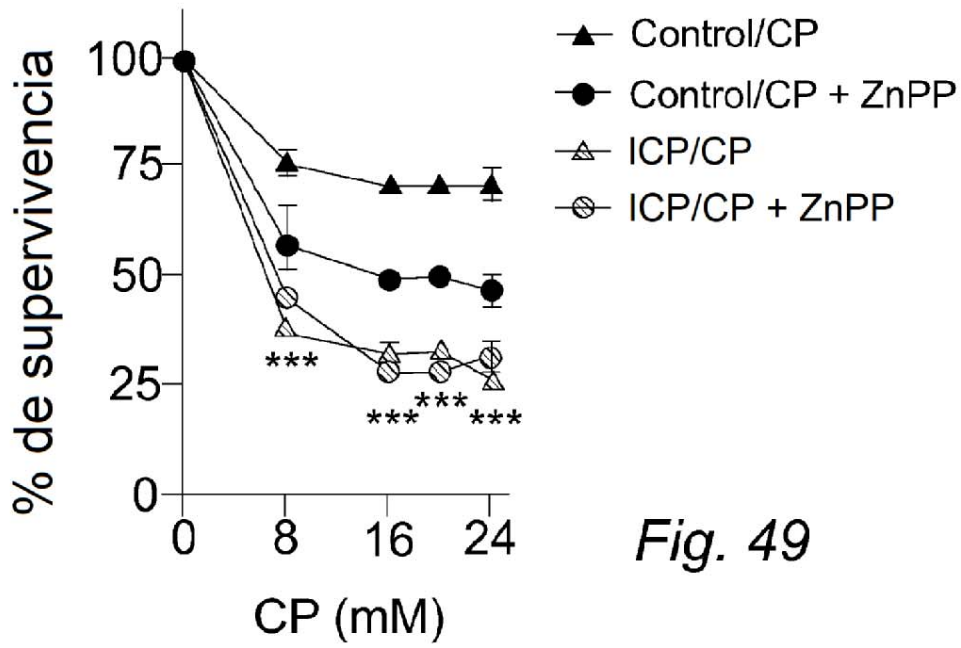


Fig. 49

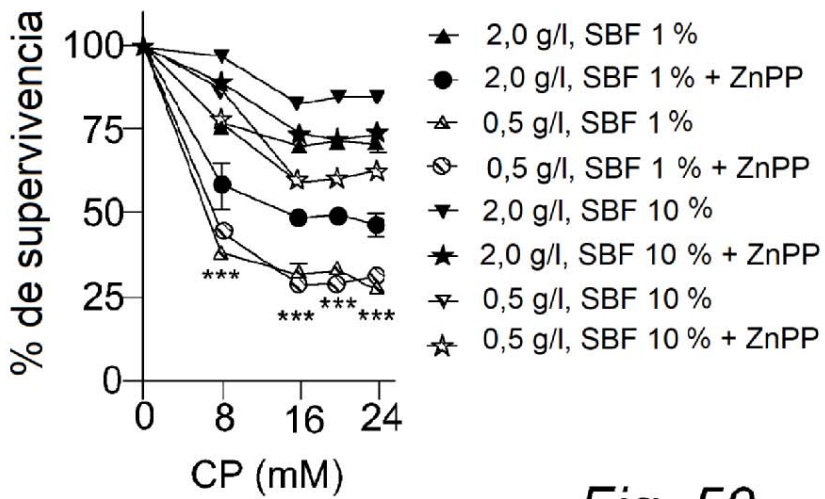


Fig. 50

INANICIÓN

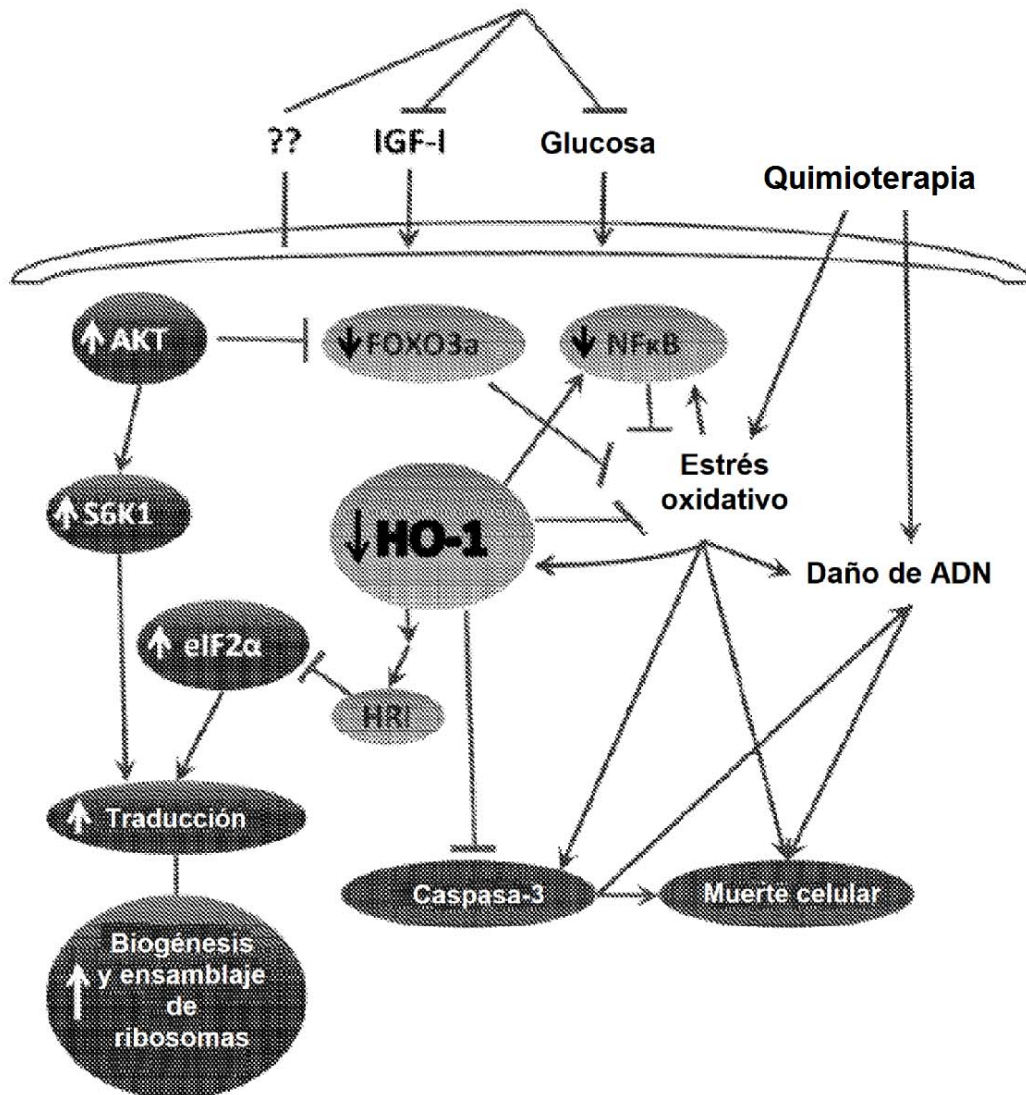


Fig. 51

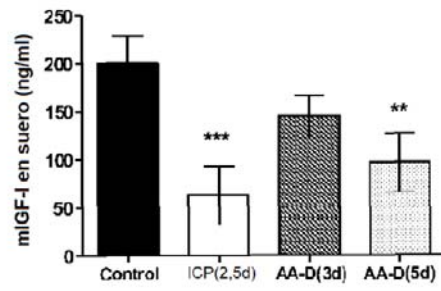


Fig. 52

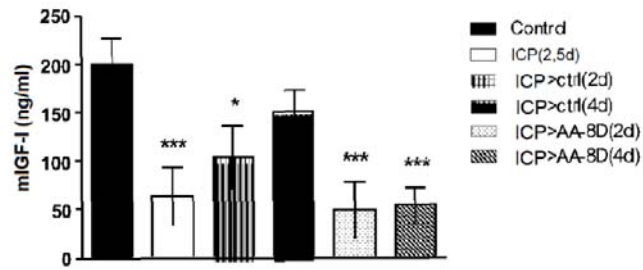


Fig. 53

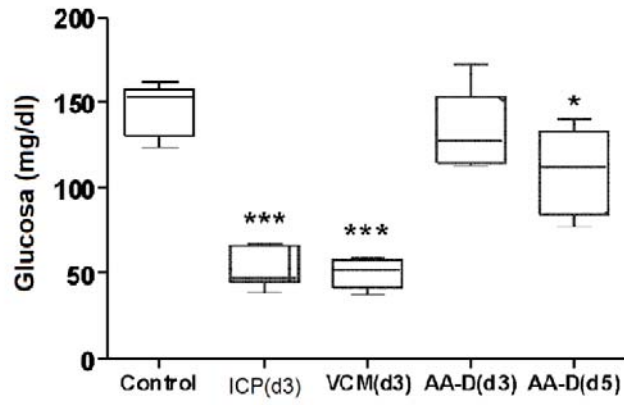


Fig. 54A

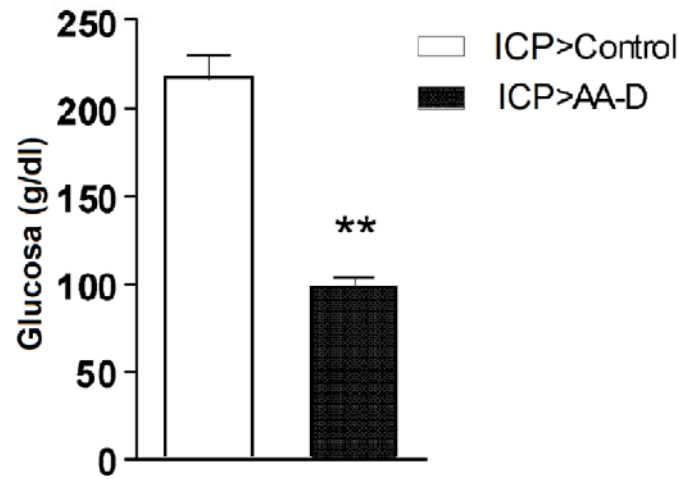


Fig. 54B

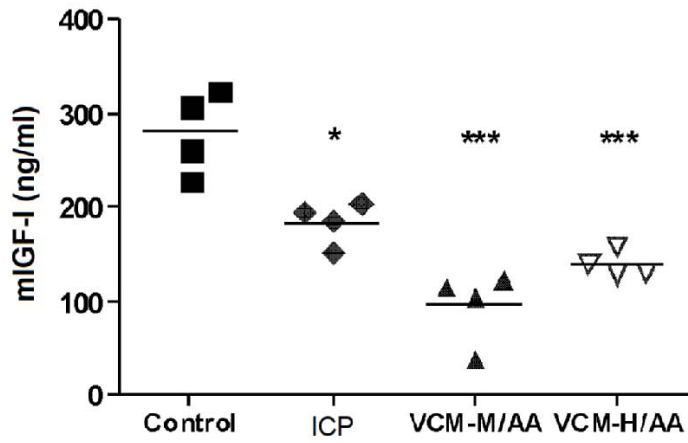


Fig. 55A

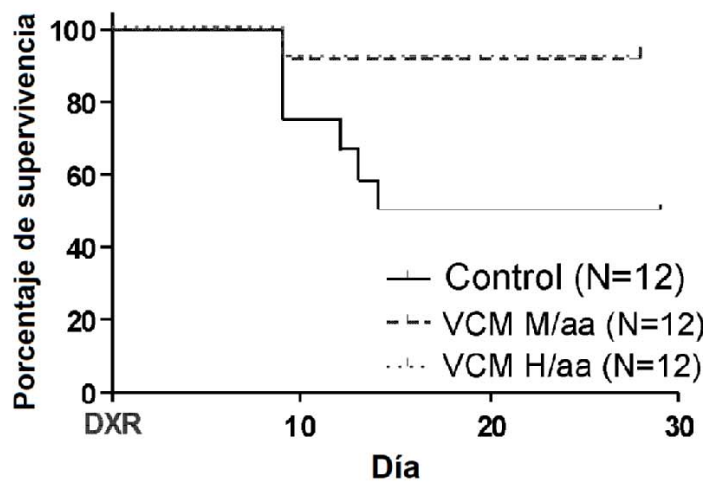


Fig. 55B

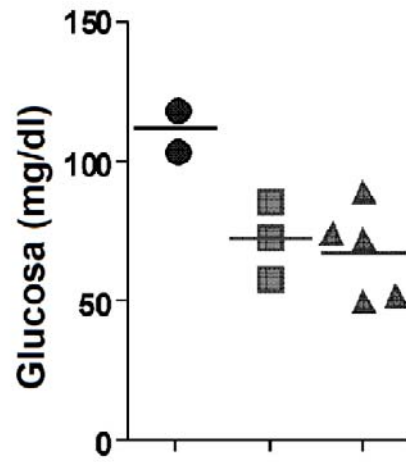


Fig. 56A

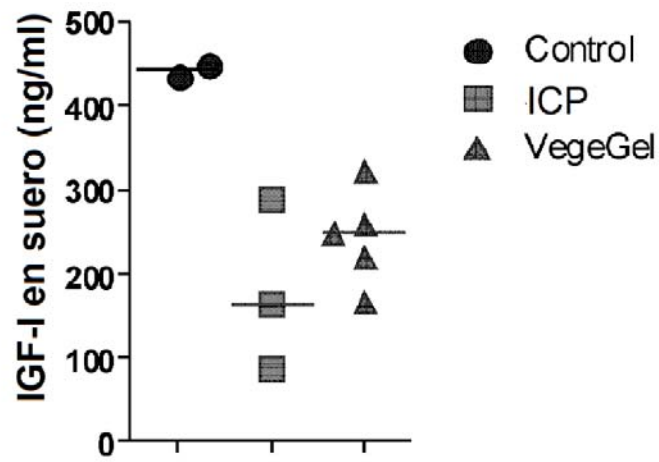


Fig. 56B

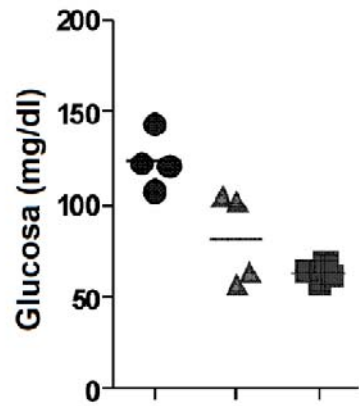


Fig. 57A

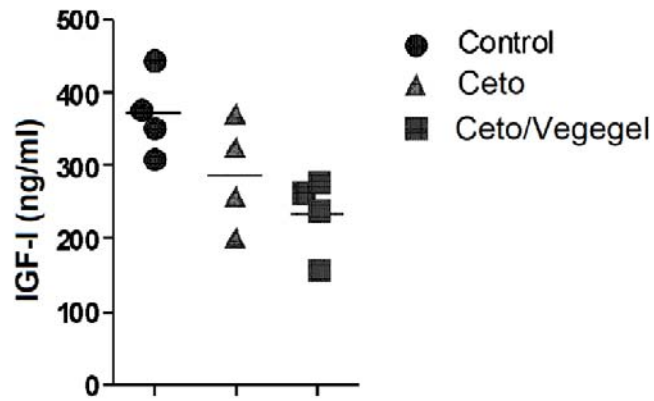


Fig. 57B