



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Implicación de la leptina en el efecto Warburg de la línea de cáncer de mama MCF-7

Raquel García Belmonte

Grau de Bioquímica

Any acadèmic 2013-14

DNI de l'alumne: 43206175P

Treball tutelat per Dr. Adamo Valle Gómez

Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut



S'autoritza la Universitat a incloure el meu treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Palabras clave del trabajo:

Cáncer de mama, leptina, efecto Warburg, glucólisis, OXPHOS, oligomicina, 2-deoxiglucosa.

ÍNDICE

1. Introducción.....	4
1.1. Cáncer de mama.....	5
1.2. La leptina y el cáncer de mama.....	7
1.3. Efecto Warburg.....	9
1.4. 2-Deoxiglucosa y oligomicina.....	11
2. Objetivos.....	12
3. Materiales y métodos.....	12
3.1. Línea celular.....	12
3.2. Ensayo del metabolismo.....	12
3.3. Determinación de los niveles de AMPK mediante Western blot.....	15
3.4. Análisis de datos y estadístico.....	15
4. Resultados.....	16
4.1. Determinación del ATP.....	16
4.2. Determinación del lactato.....	17
4.3. Consumo de oxígeno.....	18
4.4. Determinación de los niveles de AMPK mediante Western blot.....	20
6. Discusión.....	21
7. Conclusión.....	24
8. Bibliografía.....	24

RESUMEN

Introducción: El cáncer de mama es la neoplasia maligna más común en las mujeres siendo una de las principales causas de muerte por cáncer en este género. En las mujeres postmenopáusicas, uno de los principales factores de riesgo es la obesidad ya que el tejido adiposo aumenta la producción de estrógenos y leptina entre otros, jugando estas hormonas un papel mitogénico en la mama. Una particularidad común a muchos tumores es la mayor actividad de la vía glucolítica como fuente de obtención de energía en contraposición a la fosforilación oxidativa, lo que se conoce como efecto Warburg. La leptina participa en la activación de vías como JAK2/STAT3, MAPK/ERK1 y PI-3K/AKT1, que favorecen la proliferación celular y la inhibición de la apoptosis. La AMPK es un sensor energético que se activa cuando las células necesitan energía y parece tener un papel anti-tumoral al regular negativamente a HIF-1 α que favorece el efecto Warburg en las células tumorales. El objetivo principal de este trabajo es conocer si la leptina influye de alguna manera sobre el efecto Warburg en células de cáncer de mama. **Materiales y métodos:** Se utilizó la línea celular MCF-7 tratada o no con 100 ng/ml de leptina durante 24 h. Para poder estudiar el efecto Warburg se utilizaron dos inhibidores, la oligomicina que bloquea la fosforilación oxidativa al inhibir la ATPasa y la 2-deoxiglucosa que inhibe la glucólisis. Se analizaron los niveles de ATP celular, los de lactato en el medio, el consumo de oxígeno y la fosforilación de la AMPK. **Resultados y discusión:** Los niveles de ATP en la célula son más sensibles a la inhibición de la glucólisis en las células control, y prácticamente insensibles a la inhibición de la fosforilación oxidativa. La leptina invirtió esta situación, lo que sugiere que la hormona promueve la obtención de energía mediante la fosforilación oxidativa. La inhibición de la fosforilación oxidativa en las células tratadas con leptina incrementó la producción de lactato, por lo que la leptina permite que las células puedan recurrir a la vía glucolítica si la mitocondria se ve afectada. El mayor metabolismo aeróbico promovido por la leptina se confirmó por el elevado consumo de oxígeno de estas células respecto a las células control. La leptina indujo una mayor fosforilación de la AMPK, lo que podría explicar esta reprogramación del metabolismo energético. **Conclusión:** La leptina parece revertir el efecto Warburg en la línea celular MCF-7 manteniendo la capacidad de redirigir su metabolismo hacia la glucólisis cuando las condiciones lo requieran.

ABSTRACT

Introduction: Breast cancer is the most common malignancy in woman and it has been classified in different groups depending on their molecular differences. One of main risk factors is postmenopausal obesity, due to adipose tissue increase leptin and estrogen production. Feature of many tumors is the major glycolysis activity instead of oxidative phosphorylation phenomenon known as Warburg effect. Leptin participate in JAK2/STAT3, MAPK/ERK1 and PI-3K/AKT1 pathways activation. These pathways stimulate cellular proliferation and apoptosis inhibition. AMPK is a regulator of energy homeostasis that is activated when cells need energy. AMPK seems to have anti-tumoral effect due to it negatively regulates HIF-1 α and this can promote Warburg effect in malignant cells. The main aim of this research is to know whether leptin somehow influences on the Warburg effect in breast cancer cells. **Materials and methods:** cell line MCF-7 was used to control and leptin treatment groups. Oligomycin (ATPase inhibitor) and 2-deoxyglucose (glycolysis inhibitor) were used to study Warburg effect. Cellular ATP and AMPK, medium lactate and oxygen consumption levels were analyzed. **Results and discussion:** Oligomycin inhibition affects mostly the cells treated with leptin, causing a decrease in ATP levels and an increase in lactate levels production. 2-DG inhibition affects more rapidly to ATP levels in control cells than leptin cells. Control and leptin MCF-7 oxygen consumption falls with both inhibitors, despite ATP drop in leptin treated cells is bigger than in control cells, in both cases. Cells treated with leptin show an increase in pAMPK levels. **Conclusion:** Leptin seems throw back Warburg effect in MCF-7 cell line and seems to be able to redirect their metabolism to glycolysis.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cáncer de mama

El cáncer de mama es la neoplasia maligna más común entre las mujeres de todo el mundo, representando el 16% del total de cánceres femeninos con una mayor prevalencia en países en vías de desarrollo. El porcentaje de supervivencia de las personas afectadas con este tipo de cáncer depende en gran medida de los ingresos medios de los países, siendo más alta en países con mayor poder adquisitivo como América del Norte y más baja en países muy pobres. Esto es debido a que los países con menos recursos económicos carecen de programas de detección precoz además de no tener los servicios necesarios para conseguir un buen diagnóstico y tratamiento del mismo (OMS, Carga Mundial de Morbilidad, 2004).

Esta enfermedad presenta una gran diversidad clínica y genética. Según diversos estudios, podemos clasificar el cáncer de mama en cinco grupos distintos en función de las diferencias moleculares que se dan en los patrones de expresión proteica. Estos tipos son: Luminal A y B, Her2, Basal-Like, Normal-Like y Claudin-Low. En primer lugar, los tipos luminal A y B se caracterizan por ser los únicos tumores que expresan el receptor de estrógenos (ER). En segundo lugar, se encuentra el tipo Her2, que recibe este nombre por presentar grandes cantidades del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (Her2). El tipo Basal-Like carece de ER, Her2 y PR (receptor de progesterona) [1]. El tipo normal-like presenta firma genética de tejido adiposo. Finalmente el tipo Claudin-Low, fue el último en entrar en la clasificación y se diferencia del resto de grupos por presentar una baja expresión de Claudina 3, 4 y 7 y cadherina-E (proteínas de adhesión celular) [2].

En el tratamiento de esta enfermedad es de gran importancia poder determinar de cuál de estos tipos de cáncer se trata ya que en función de esto, las dianas terapéuticas pueden variar, así como las posibilidades de supervivencia, ya que estas varían también entre los distintos tipos [1, 3].

Existen multitud de factores de riesgo que pueden dar lugar a la aparición de un cáncer de mama. Entre estos factores se encuentran: el no haber dado a luz, la historia familiar, la edad de aparición de la menarquia y la de la menopausia [4], así como la exposición a estrógenos, obesidad, alcohol, además de la predisposición genética, ligada especialmente a genes como BRCA1 y BRCA2 [5].

La participación de la obesidad como factor de riesgo en el cáncer de mama varía en función de la edad de la mujer, ya que únicamente en mujeres postmenopáusicas es un factor de riesgo. En el caso de mujeres en edad reproductiva que padecen obesidad, existe una menor predisposición a

desarrollar un cáncer de mama. Por otra parte, la obesidad impulsa a que la enfermedad avance más rápidamente y que ésta progrese con un peor pronóstico [6, 7]. El riesgo de muerte que asume una mujer con obesidad es 2,5 veces mayor que en el caso de una mujer con normopeso. Esto es debido a que el exceso de tejido adiposo proporciona un ambiente favorable para que el cáncer se desarrolle hacia la metástasis [8]. La relación entre la obesidad tras la menopausia y la aparición del cáncer de mama es debida especialmente al aumento de los niveles de estrógenos y a la hiperinsulinemia provocada por la aparición de resistencia a la insulina [5, 9].

Los estrógenos se forman a partir de la aromatización enzimática de androstenediona, reacción que es llevada a cabo por unas enzimas llamadas aromatasas [5, 9]. La actividad de estas enzimas se ve aumentada cuando el peso corporal aumenta, hecho que puede explicar la abundante producción de estrógenos en mujeres obesas postmenopáusicas. De todas maneras, este aumento puede deberse a una posible alteración genética que conlleva a una sobreexpresión de estas proteínas [6, 7]. La hiperinsulinemia podría relacionarse con el cáncer de mama de manera indirecta por aumentar la actividad del factor de crecimiento relacionado con la insulina (IGF) I y II, que a su vez, unidos a sus receptores específicos, puede activar las vías de señalización MAPK y PI3-K (*explicadas posteriormente*) [9].

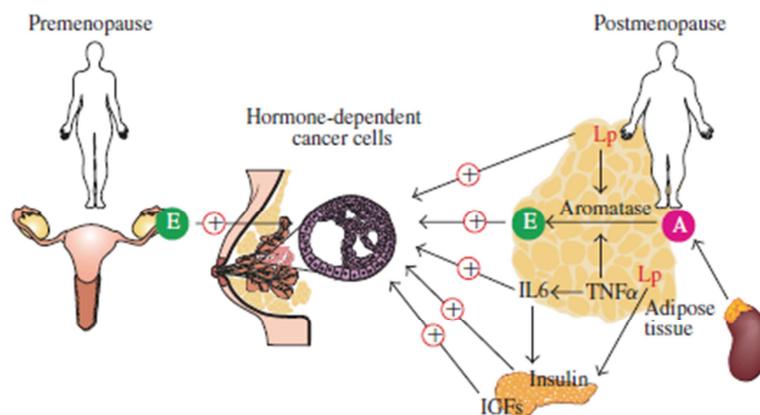


Figura 1: Diferencias en la producción de estrógenos y sus mecanismos en mujeres pre/postmenopáusicas.

En mujeres premenopáusicas. La producción de estrógenos se lleva a cabo principalmente en los ovarios, sin embargo en las mujeres postmenopáusicas, el tejido adiposo (TA) es el mayor productor de estrógenos. Esto es debido a la mayor concentración de aromatasas en TA de manera que convierte los andrógenos a estrógenos. Por otra parte, la obesidad está relacionada con el síndrome metabólico produciendo más insulina y IGF-1 que pueden conducir al desarrollo del tumor mamario. Las células de TA producen diferentes adipoquinas como leptina, adiponectina entre otras. Cuando hay un exceso de TA aumenta la producción de leptina y otras citoquinas inflamatorias [9].

1.2. La leptina y el cáncer de mama

Las adipoquinas son proteínas con función hormonal secretadas principalmente por los adipocitos, siendo la leptina la principal adipoquina que mantiene una relación con el desarrollo del cáncer de mama. La leptina se sintetiza en cantidades proporcionales al índice de masa corporal (IMC) [9], a partir del gen Ob que codifica para un péptido de 16 kDa y lleva a cabo sus efectos tras ser reconocido por alguna de las 6 isoformas del receptor (ObRa – ObRf) [10-12]. Únicamente la isoforma ObRb, presenta una región intracelular capaz de tener influencia sobre la activación de vías de señalización en el citoplasma como por ejemplo, la vía de JAK/STAT [13].

Una de las principales funciones de la leptina es controlar la homeostasis energética y lo consigue inhibiendo la ingesta de alimentos (efecto anorexigénico) y aumentando el gasto energético [14]. Otro regulador importante del balance energético de la célula es la proteína quinasa activada por AMPK, que se activa por un déficit energético presente en la célula como un aumento en el ratio AMP/ATP [15]. Esta quinasa es capaz de fosforilar proteínas involucradas en los procesos de obtención de energía entre los que se encuentra la captación de la glucosa y su metabolismo por glucólisis, oxidación mitocondrial, activación de la cascada de biogénesis mitocondrial, además de la inhibición las vías anabólicas para evitar el consumo de energía [15, 16]. Existe una relación entre la leptina y la AMPK. Cuando aumentan los niveles de leptina en el hipotálamo, ésta activa la enzima Acetil-CoA carboxilasa (participante en la síntesis de ácidos grasos) e inactiva la AMPK. Sin embargo, el mecanismo de acción de la leptina en el músculo esquelético es capaz de activar la AMPK y favorecer la oxidación de los ácidos grasos [16]. De esta manera podríamos pensar que la leptina puede participar en la activación de la AMPK de forma dependiente del tejido. Por otra parte, otros autores sugieren que AMPK puede disminuir la progresión del tumor en cáncer de mama debido a que está relacionada con adipoquinas favorables como la adiponectina [10, 15, 17]. En muchas ocasiones se propone a AMPK como supresor tumoral a partir de la regulación del metabolismo y del efecto Warburg [18] pero otros sugieren que la función de la AMPK en el metabolismo junto con otras señales oncogénicas podría dar lugar a la activación de AMPK como estrategia de supervivencia y para mantener la proliferación celular [15].

Existe una alta relación entre la obesidad, el incremento de los niveles en la secreción de leptina y el riesgo de padecer cáncer de mama [19]. El aumento de tejido adiposo que conlleva la obesidad produce un incremento en la concentración de estrógenos que a su vez, predisponen a los adipocitos a producir altos niveles de leptina y de sus receptores ya que, la producción de leptina está regulada por este tipo de hormonas sexuales, entre otros factores reguladores [20]. La leptina, además de ejercer su función como regulador de la sensación de hambre, es capaz de inducir el

crecimiento y la proliferación de las células epiteliales de la mama tanto en situaciones fisiológicas, como es el caso del desarrollo normal de la glándula, como en la formación de un tumor [21]. En contraposición a la leptina se encuentra la adiponectina, una adipoquina con un efecto contrario, es decir, reduce el riesgo y la progresión del cáncer de mama al ser una hormona antiproliferativa y proapoptótica. Sin embargo, en una situación de obesidad, esta hormona se libera de manera inversamente proporcional a la leptina, por lo que disminuye su concentración en el suero [22, 23].

Una vez que la leptina se une a su receptor, es capaz de iniciar numerosas vías de señalización relacionadas con la proliferación celular, inhibición de la apoptosis, progresión de la invasión y modulación de la matriz extra celular [19, 21] a través de la activación de vías como JAK2/STAT3, MAPK/ERK1 y PI-3K/AKT1 [24]. En primer lugar, la vía de JAK2/STAT participa en la regulación de proliferación, supervivencia, y apoptosis. JAK2 es una proteína quinasa que está unida al receptor ObR en su forma inactiva y cuando la leptina se une al receptor permite un cambio conformacional que posibilita la activación de JAK2. Esta proteína con actividad quinasa, cuando está en su forma activa fosforila a ObR en un residuo de tirosina, situación que propicia el anclaje y la fosforilación de STAT3 que es un transductor de señal y activador de la transcripción. De esta manera, STAT3 puede formar dímeros que son liberados y translocados al núcleo, donde son capaces de activar la transcripción de determinados genes [13, 20]. Algunos de los genes regulados por esta vía son *C-MYC*, que incrementa la proliferación y bloquea la apoptosis, *C-JUN* que promueve el crecimiento celular, la *CICLINA D1*, que activa la entrada de la célula a la fase S1 del ciclo celular para que esta se duplique, y *P21* y *BCL-2* como genes antiapoptóticos [10, 24].

La vía de señalización proteína quinasa activada por mitógeno, MAPK/ERK1, está involucrada en muchos mecanismos celulares. Puede iniciarse de manera dependiente de JAK-2, cuando esta es fosforilada, o bien, de manera independiente [24]. La activación de esta vía afecta a dianas relacionadas con la proliferación, diferenciación, migración e invasión celular [25, 26]. Esta vía favorece la progresión del tumor hacia la metástasis. Por otra parte, está relacionada con la activación del factor de hipoxia inducible (*HIF-1 α*), relacionado con la angiogénesis en situación de hipoxia [26]. Algunos estudios sugieren que *HIF-1 α* activan a los receptores GLUT1 provocando una mayor entrada de glucosa en los tejidos y un aumento de la glucólisis. Además *HIF-1 α* activa a la enzima piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK) que fosforila a la piruvato deshidrogenasa inhibiéndola y bloqueando así la fosforilación oxidativa, situación que induce que el metabolismo de la glucólisis finalice en la fermentación aeróbica (Efecto Warburg) [27]. En cuanto a la vía de señalización de PI3K/AKT, participa en procesos de crecimiento y proliferación celular, así como en el

metabolismo de la glucosa mediante la activación de oncogenes como *MDM2* e inhibición de *P53*, *C-MYC* y *CICLINA-D1* entre muchos otros [25].

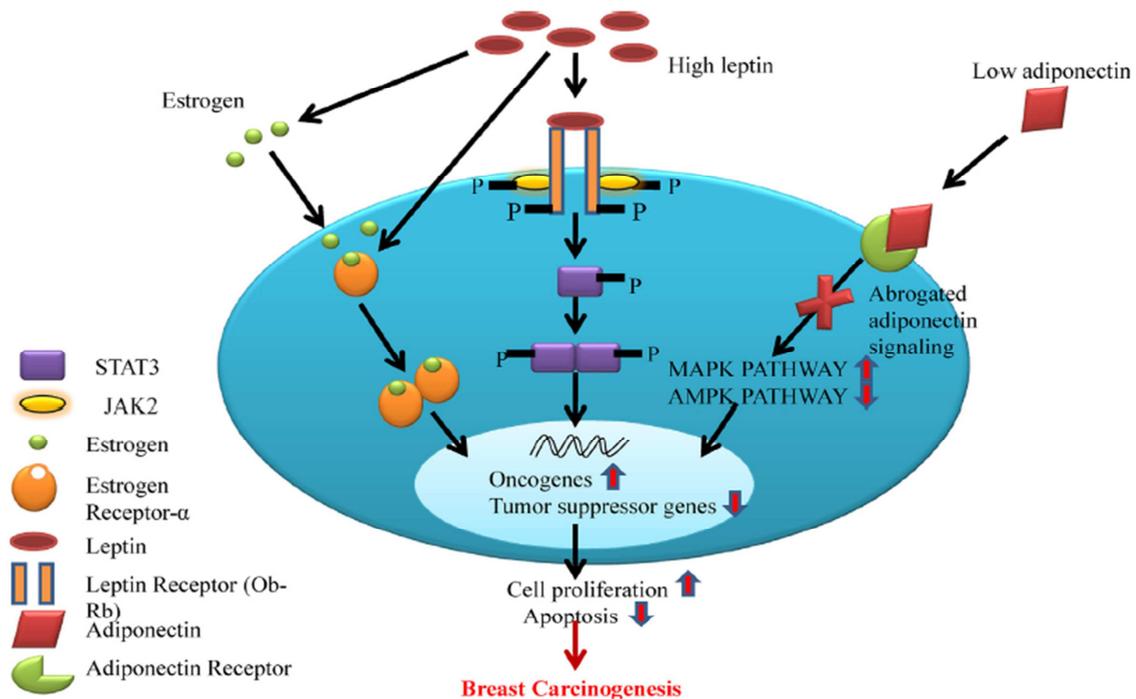


Figura 2: Señalización de los estrógenos leptina y adiponectina en la carcinogénesis de mama. Los estrógenos unidos a sus receptores promueven la expresión de genes tumorales. La leptina unida a ObR activa las vías de señalización JAK/STAT3, PI3-K/AKT y MAPK/ERK. Todas ellas se inician con la fosforilación de JAK2, que permite a su vez la fosforilación de STAT3 y a su vez la dimerización de este. El dímero de STAT3 activo promueve la traducción de factores de progresión del tumor, del ciclo celular y antiapoptóticos. La leptina aumenta la expresión de las aromatasas por ello se incrementa la síntesis de estrógenos. Bajas concentraciones de adiponectina provocan activación de la MAPK/ERK y la inhibición de la vía de la AMPK [10].

La expresión de todos estos a través de la activación de las diferentes vías de señalización nombradas, como consecuencia de la unión de leptina con a su receptor tiene como resultado una situación molecular que predispone a la división y proliferación celular e inhibe la apoptosis, situación perfecta para la aparición y progresión de un tumor [10, 25, 26].

1.3. Efecto Warburg

En 1924 el fisiólogo alemán Otto Heinrich Warburg observó que las células de un tumor hepático presentaba un incremento de la actividad de la vía glucolítica en comparación con células hepáticas no tumorales [28]. No fue hasta 1956, cuando propuso que el efecto Warburg podía promover que las células cancerosas sufrieran un desplazamiento hacia la vía glucolítica en lugar de hacia la vía oxidativa con el fin de conseguir energía [3].

En general, las células no tumorales obtienen la mayor parte de la energía que requieren a partir de la fosforilación oxidativa (OXPHOS) usando como sustrato el NADH obtenido a partir de la glucosa, ácidos grasos u otros metabolitos secundarios [28, 29]. El sistema OXPHOS está formado por 5 complejos: el complejo I o NADH deshidrogenasa, el complejo II que recibe el nombre de succinato deshidrogenasa, el complejo III y IV conocidos como citocromo C oxidoreductasa y oxidasa, respectivamente, y finalmente el complejo V o ATP-sintasa (Figura 3) [30]. Todos estos complejos trabajan en conjunto para transportar los electrones del NADH y los protones a lo largo de la cadena de transporte de electrones hasta llegar al complejo IV donde 2 electrones son cedidos a un átomo de oxígeno, último receptor de la cadena de electrones, formando así una molécula de H_2O [31]. Durante todo el transporte, gracias a la energía libre de este transporte electrónico, se translocan H^+ desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana, conservando así la energía en forma de gradiente protónico. Los protones son retornados a la matriz mediante el complejo V o ATP sintasa, la cual aprovecha la energía que produce la reentrada de los protones a favor de gradiente para impulsar la fosforilación del ADP a ATP [30-32].

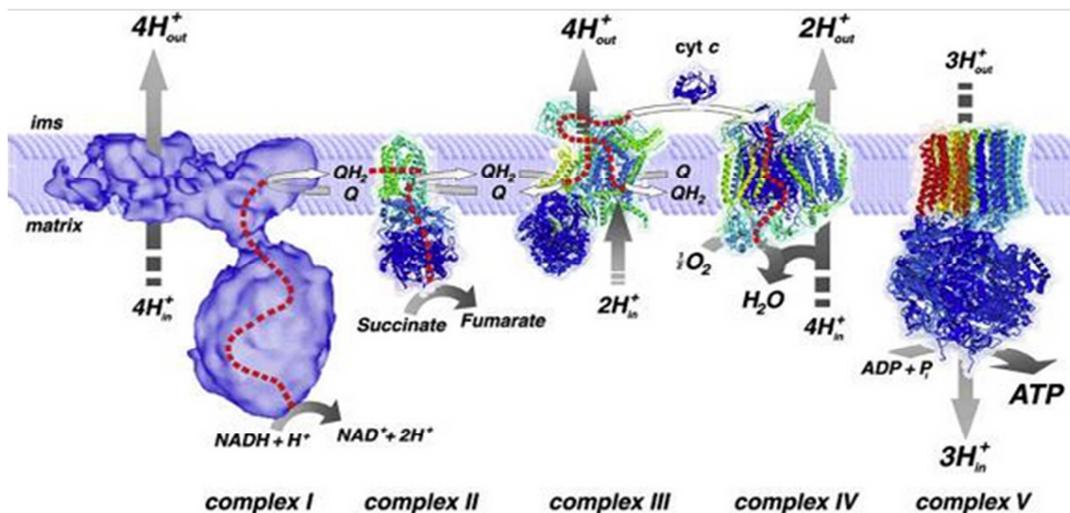


Figura 3: Esquema de la cadena respiratoria mitocondrial y sus componentes. Cadena del transporte de electrones desde el $NADH+H^+$ hasta el último receptor de electrones (O_2) representando los protones que se translocan al espacio intermembrana en cada complejo y que finalmente son retornados por la ATPasa para producir energía en forma de ATP [32].

Las células tumorales, al tener una alta tasa de proliferación, necesitan grandes cantidades de energía pero también de carbonos para la síntesis de nuevas moléculas, por lo que en este estado patológico, la vía de la glucólisis está muy activa. A partir de esta vía, las células pueden obtener energía sin perder los carbonos de la glucosa, los cuales pueden dirigirse a biosíntesis de múltiples sillares estructurales que son necesarios para crecer (nucleótidos, ácidos grasos, aminoácidos, etc) [28, 33]. El efecto Warburg defiende que las células cancerosas dependen más de la vía glucolítica

que de la vía oxidativa para la obtención de ATP, a pesar de que la fosforilación oxidativa consigue 38 ATP (incluyendo los de la glucólisis) mientras que la fermentación del lactato únicamente produce 2 ATP por molécula de glucosa, pero en contrapartida, la glucólisis permite dirigir un importante flujo de carbonos a biosíntesis, mientras que en la fosforilación oxidativa el carbono se pierde en forma de CO₂ [28].

Existen evidencias de que las células tumorales adoptan la habilidad de no ser susceptibles a la inhibición alostérica de la glucólisis por el aumento de los niveles de ATP y citrato. Esta situación le permite a la célula el mantenimiento de esta vía en su forma activa, sin embargo, se requiere de NAD⁺ para que la glucólisis pueda seguir funcionando. Una de las posibles explicaciones a la activación de la producción de lactato es que, para que éste se forme a partir del piruvato de la glucólisis, se necesita la oxidación de una molécula de NADH a NAD⁺, de esta manera la célula podría recuperar el poder reductor para mantener activa la glucólisis y así poder continuar con la biosíntesis de ácidos nucleicos y otros metabolitos [29].

1.4. 2-Deoxiglucosa y oligomicina

La utilización de compuestos como la 2-deoxiglucosa y la oligomicina son de gran interés en el estudio del efecto Warburg, ya que permiten inhibir selectivamente las dos grandes rutas de obtención de energía en la célula. Por una parte la 2-deoxiglucosa promueve la inhibición de la glucólisis, mientras que la oligomicina provoca la desactivación de OXPHOS a través de la inhibición de la ATPasa [34].

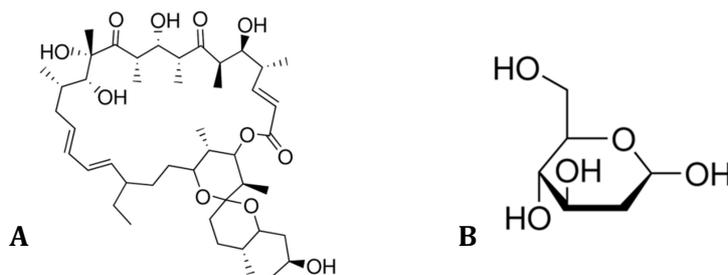


Figura 4: Estructura química de la oligomicina(A) y 2-deoxiglucosa (B) (Sigma-Aldrich).

En primer lugar, la 2-deoxiglucosa (2-DG) es un análogo de la glucosa capaz de inhibir el metabolismo de ésta [35]. La estructura química de la 2-DG es igual que la de glucosa, con la única diferencia de que el grupo hidroxilo del carbono 2 es un hidrógeno (Figura 4B) [36]. La 2-DG entra en las células por los mismos transportadores que la glucosa. Una vez dentro, la hexoquinasa fosforila la 2-DG que se acumula en la célula inhibiendo a la enzima fosfogluco isomerasa, la cual cataliza la

segunda reacción de la glucólisis [37]. De esta manera, la 2-DG, al inhibir la glucólisis consigue una disminución considerable en la producción de ATP y a largo plazo en los niveles totales del mismo [35, 36]. Por este motivo, se ha especulado con el posible uso de la 2-DG como eficiente inhibidor de la progresión tumoral, ya que las células cancerosas tienen aumentado el metabolismo de la glucosa [36, 37]. En segundo lugar, la oligomicina es un antibiótico capaz de inhibir el complejo V de OXPHOS interfiriendo con la subunidad F_0 de la ATP-sintasa [38].

2. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta el papel que la leptina juega en la progresión del cáncer de mama, y el particular metabolismo que presentan las células tumorales (efecto Warburg), nos propusimos como objetivo como objetivo de este trabajo evaluar el efecto de la leptina sobre el efecto Warburg en la línea celular de cáncer de mama MCF-7.

Para alcanzar este objetivo se evaluaron los niveles de ATP celular, lactato en el medio y consumo de oxígeno de las células en las células tumorales tratadas con dos inhibidores, oligomicina y 2-deoxiglucosa. Además se evaluó también el grado de fosforilación y los niveles de AMPK en respuesta a la leptina.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Línea celular

Se utilizó la línea celular de cáncer de mama MCF-7 adquirida de *American Type Culture Collection* (ATCC) “Manassas, VA” y mantenida en Dulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM), suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) y 1% de antibióticos (penicilina y estreptomina) a 37°C y con atmósfera al 5% de CO_2 . Para llevar a cabo las distintas determinaciones, 24 horas antes del tratamiento con leptina, las células se pasaron y se incubaron en medio DMEM libre de rojo fenol, 10% de charcoal, ya que al carecer de hormonas lipofílicas se evita la posible interferencia que puede tener con la leptina.

3.2. Ensayo del metabolismo

Tratamiento

Las células tumorales MCF-7 se recogieron de una placa de 100 mm y se sembraron en dos placas de 96 pocillos con 10.000 células por pocillo en 90 μ L de medio de cultivo. Tras 24 h la mitad

de cada placa fue tratada con 90 μL de medio suplementado con leptina (concentración final 100 ng/mL) la cual fue preparada a partir de una disolución madre de 1,25 mg/mL. La otra mitad de ambas placas, que no fueron tratadas, se utilizaron como control. Una vez transcurridas 24 h, una de las placas fue tratada con oligomicina a diferentes concentraciones (0; 0,25; 0,5; 1 μM), mientras que las células de la segunda placa estuvieron expuestas a concentraciones variantes de 2-deoxiglucosa (0; 5; 10; 20 mM). La concentración final de vehículo DMSO en el medio fue de 0,05% para todos los tratamientos ensayados. Estas células fueron utilizadas para la determinación de los niveles de ATP celular y de lactato en el medio.

Determinación de ATP

Para llevar a cabo la determinación de la concentración de ATP celular y observar así si existían o no diferencias en la concentración de ATP tras haber estado sometidas a los respectivos tratamientos durante 30 minutos, se utilizó el kit “ApoSENSOR™ Cell Viability Assay Kit” (VioVision) siguiendo el protocolo adjunto con el mismo. Este kit utiliza la enzima luciferasa para producir luz y luciferina a partir del ATP celular, la luz que emiten las muestras es proporcional a la concentración de ATP presente en las células y puede ser medida utilizando un luminómetro.

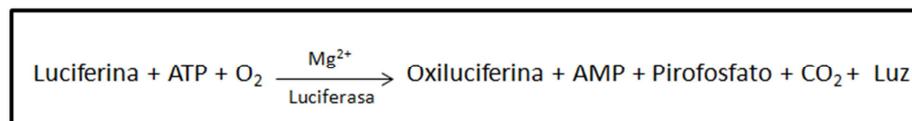


Figura 5: Reacción de la luciferasa (Kit).

La determinación de ATP se hizo por triplicado. Las lecturas se corrigieron por el número de células presentes en cada pocillo, a partir de un conteo indirecto mediante la tinción de células con Cristal Violeta (0,5% p/v) en. Se midieron las absorbancias a 570 nm.

Determinación de lactato

La determinación del lactato se llevó a cabo por octuplicado tras 1 hora de tratamiento. Una vez transcurrido este tiempo, se recogió el medio de las células y se congeló a -20°C hasta el momento de ser procesado.

El método utilizado se fundamenta en la reacción producida por la enzima *Lactato deshidrogenasa* (Figura 6), que gracias a la adición de hidracina la reacción se desplaza hacia la producción de piruvato y NADH. De esta manera se deduce que la cantidad de NADH formado es proporcional a la cantidad de lactato de la muestra.

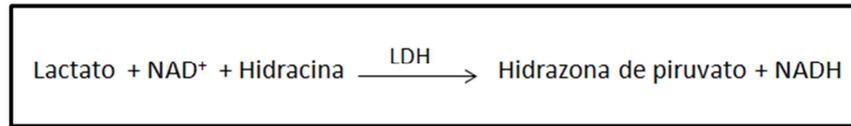


FIGURA 6: REACCIÓN DE LA ENZIMA LACTATO DESHIDROGENASA (LDH).

Se prepararon dos placas de 96 pocillos de manera paralela, una para las muestras tratadas con oligomicina y otra para las tratadas con 2-deoxiglucosa. En cada pocillo se añadió 10 μL de la muestra diluida correspondiente y 90 μL de H_2O bidestilada. A la vez se preparó el patrón de 6 puntos a partir de una dilución de lactato 2,5 mM y H_2O . A continuación se añadieron 160 μL de Tampón de glicina 840 mM e hidrato de hidracina 660 mM a todos los pocillos y seguidamente se le agregó a ambas placas 20 μL de NAD^+ (40mM) en cada pocillo. Tras haber agitado las placas unos minutos, se realizó una primera lectura de absorbancias a 340 nm (A1) y se procedió a añadir 10 μL de la enzima *Lactato deshidrogenasa* (125 U/mL), y después de haber dejado actuar la enzima durante 1 hora protegida de la luz a temperatura ambiente se leyeron las absorbancias de las placas de nuevo a 340 nm (A2). Los niveles de lactato se calcularon a partir de los incrementos de absorbancia y comparación con la recta patrón.

Consumo de oxígeno

El Oxygraph es un electrodo de oxígeno tipo Clark diseñado para medir el consumo del mismo a partir de mediciones continuas. Cada celda dispone de un agitador magnético además de todos los elementos necesarios para medir la señal desde el electrodo de oxígeno. La muestra se introduce en la cámara DW1/AD y se cierra con un émbolo que se caracteriza por tener una entrada central muy pequeña que permite la adición de diferentes compuestos. La muestra se mantiene a la temperatura necesaria gracias a un baño de agua termo-regulado que circula por el exterior de la cámara. Por otra parte, en la base de la celda se encuentra el disco de electrodo con un cátodo central de platino y un ánodo de plata concéntrico que quedan separados de la muestra gracias a una membrana permeable de politetrafluoroetileno (PTFE). El electrodo es el encargado de detectar cualquier pequeño cambio en los niveles de oxígeno que se van produciendo en el medio de la cámara y estos datos se muestran de manera gráfica en el PC.

Se determinó el consumo de oxígeno de 10^6 células en 0,5 mL de medio. Se analizaron 4 placas control y 4 de leptina y se promediaron los valores. Con las células obtenidas de cada una de las placas se realizaron dos “carreras”, una con oligomicina y otra con 2-deoxiglucosa. En cada carrera se dejó tres minutos de estabilización del consumo de oxígeno, y a continuación cada cuatro minutos se fue modificando la concentración del tratamiento (0; 0,25; 0,5; 1 μM) y (0; 5; 10; 20 mM),

respectivamente. Las condiciones a lo largo de todas las carreras fueron 37°C y 101,32 kPa y el DMSO se mantuvo siempre inferior a 0,05%.

3.3. Determinación de los niveles de AMPK mediante Western blot

Las células utilizadas para llevar a cabo la determinación inmunológica se recogieron de 6 placas de 100 mm control y 6 placas tratadas con leptina (100 ng/mL) durante 24 horas. Se eliminó el medio a las células y se lavaron con PBS. Seguidamente las células fueron tripsinizadas y centrifugadas a 2000 rpm durante 5 minutos. Después de hacer un lavado del pellet, las células se resuspendieron en tampón de solubilización (Tris-base 50 mM, pH 8,8, 1 mM EDTA, 1% Igepal, iodoacetamida e inhibidores de proteasas y fosfatasa) con rotación en la noria durante 1 hora a 4°C. Una vez transcurrido este tiempo las células se sometieron a la última centrifugación a 15000 rpm durante 30 minutos para obtener el sobrenadante. Finalmente, se cuantificó la proteína del sobrenadante por el método del BCA.

El ensayo del Western-blot se inició con una electroforesis SDS-PAGE (12% de poliacrilamida) cargando 35 µg de proteína por carril. Después de transferir el gel a la membrana de nitrocelulosa, esta se incubó en una solución de bloqueo (5% de leche en polvo descremada, Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,13 mM y 0,1% de Tween 20). En primer lugar se realizó la inmunodetección de pAMPK y posteriormente se realizó la de AMPK total. Para ello se utilizaron dos anticuerpos primarios diferentes: pAMPK (1:500) adquirido de Santa Cruz Biotechnology, y AMPK (1:500) adquirido de Cell-Signalling. La membrana se incubó con anticuerpo primario durante toda la noche. La incubación con el anticuerpo secundario (Rabbit 1:10000) fue de 1 hora). Las bandas obtenidas en el Western blot se visualizaron a través del sistema de detección mediante el kit Immun-Star Western C (*Bio-Rad Laboratories*). La señal de quimioluminiscencia se capturó con el densitómetro Chemidoc XRS (*Bio-Rad Laboratories*) y cuantificado con el software Quantity One (*Bio-Rad Laboratories*).

3.4. Análisis de datos y estadístico

Los resultados están expresados como la media \pm SEM (*Standard error of mean*) utilizando el programa Microsoft Excel de Microsoft Corporation, (Redmond, Washington, USA). Para llevar a cabo la estadística se utilizó el test de la t-Student para muestras independientes mediante la utilización del programa Statistical Package for Social Science (SPSS 15.0 de Windows®). Las diferencias entre los distintos grupos fueron consideradas como significativas con un nivel de probabilidad (*P*) inferior a 0,05; $P < 0,005$.

4. RESULTADOS

4.1. DETERMINACIÓN DEL ATP

El estudio de los niveles de ATP permite identificar las diferentes respuestas que hay entre las células control y las tratadas con leptina a medida que se inhibe la glucólisis o la fosforilación oxidativa con los respectivos inhibidores. La oligomicina (inhibidor del complejo V de OXPHOS), en las células control no provoca ningún cambio significativo en los niveles de ATP a ninguna de las concentraciones estudiadas. Sin embargo, en el caso de las células con leptina, se observan diferencias significativas respecto al vehículo ya a dosis de 0,5 μM ($P=0,04$) (Figura 7A).

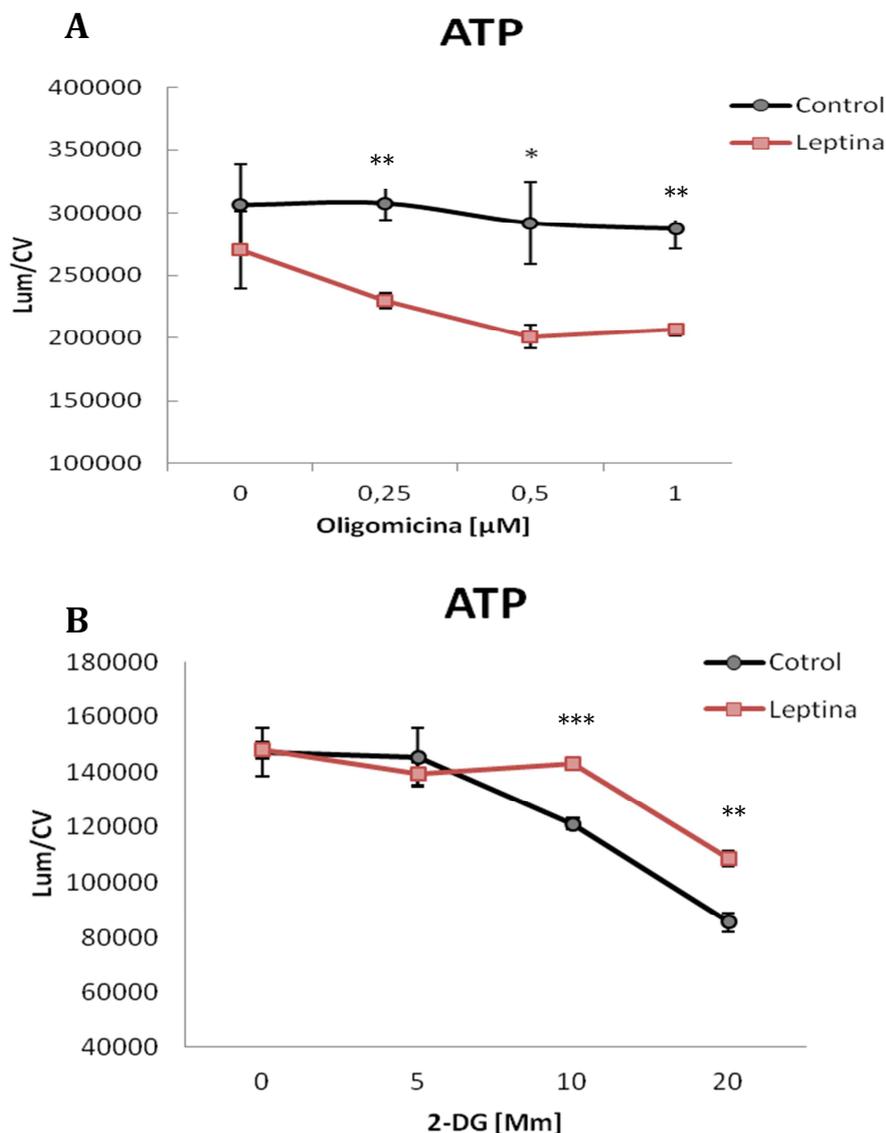


Figura 7: Disminución de los niveles de ATP debido al aumento de la concentración de los diferentes inhibidores. (A) Niveles de ATP en las células control y leptina tratadas con diferentes concentraciones de oligomicina (0, 0,25, 0,5, 1 μM) y (B) 2-deoxiglucosa (0, 5, 10, 20 mM) corregidos por cristal violeta. Los valores representan la media \pm SEM de un experimento por triplicado. * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$ comparando control y leptina con la misma dosis de tratamiento.

La 2-deoxiglucosa (inhibidor de la glucólisis), afecta tanto a las células control como a las tratadas con leptina. En el caso de las células control, a partir de la concentración 10 mM ya se observa una caída significativa en los niveles de ATP respecto a la cantidad inicial de en las células tratadas con vehículo ($P=0,02$). La disminución es aún mayor con una dosis de 20 mM ($P=0,001$). Sin embargo, las células con leptina no muestran una disminución significativa en los niveles de ATP respecto a la concentración de partida hasta que son expuestas a la concentración máxima utilizada (20 mM) $P=0,0003$ (Figura 7B). Además, tanto las células tratadas con leptina como las células control parten de una misma cantidad de ATP y no empiezan a manifestar diferencias entre sus valores hasta haber sido sometidas a una concentración de 10 mM de 2-DG, concentración que provoca que las células control disminuyan sus niveles de ATP mientras que no sucede así en las células suplementadas con leptina.

4.2. Determinación del lactato

El análisis de la concentración del lactato en el medio de las células control y leptina tras 1 hora de tratamiento con los distintos inhibidores, permite observar que las concentraciones de este metabolito no varían drásticamente en ninguno de los dos casos. En primer lugar, en el tratamiento con oligomicina (Figura 8A), las células control, mantienen prácticamente estable los niveles de lactato a una concentración cercana a 1,5 $\mu\text{mol/mL}$ a pesar de que la dosis de oligomicina vaya aumentando. En cuanto a las células con leptina, se puede observar un leve aumento en la concentración de lactato en el medio con las dosis de tratamiento de (0,25, 0,5 y 1 μM). Este aumento, a pesar de ser pequeño, es estadísticamente significativo respecto a la concentración de lactato inicial con un $P= 0,02$ en [0,25 μM]; $P= 0,0008$ en [0,5 μM] y $P=0,006$ en la dosis de [1 μM]. En cuanto a las diferencias entre las células control y leptina podemos ver que en el caso de las células con leptina los niveles de lactato son mayores que para las células control en la exposición a concentraciones de oligomicina de 0,5 y 1 μM .

En segundo lugar (Figura 8B), en el tratamiento con 2-DG, no se observan cambios en los niveles de lactato en ninguna de las células (control y leptina). Sin embargo existe una diferencia entre las células control y leptina que muestra como la concentración de lactato en las células que han sido previamente tratadas con leptina es mayor de 1,5 $\mu\text{mol/mL}$, mientras que en el caso de las células control, es inferior a esta misma concentración. La diferencia es significativa en todas las concentraciones de tratamiento.

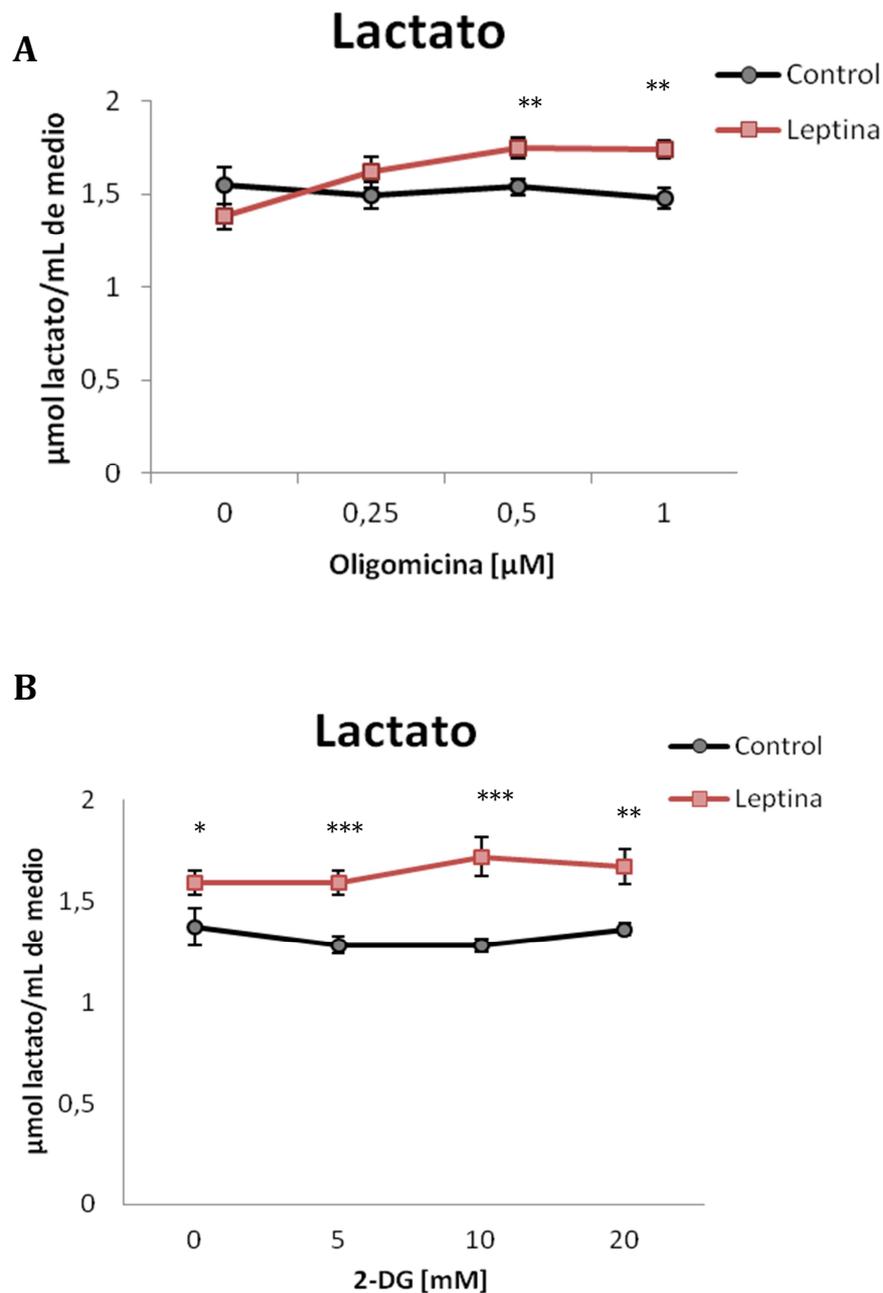


Figura 8: Concentración de lactato en el medio de las células control y leptina tras los diferentes tratamientos. (A) Variación de la concentración de lactato con diferentes concentraciones de oligomicina (0, 0'25, 0'5, 1 µM) y (B) 2-deoxiglucosa (0, 5, 10, 20 mM) corregido por cristal violeta. Los valores representan la media \pm SEM de un experimento por octuplicado. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ comparando control y leptina con la misma dosis de tratamiento.

4.3. Consumo de oxígeno

En el ensayo realizado para conocer el consumo de oxígeno con las diferentes concentraciones de los tratamientos utilizados nos permitió observar las siguientes diferencias. En primer lugar, el tratamiento con oligomicina (Figura 9A), provoca una disminución en la velocidad de consumo de oxígeno tanto en las células control como en las tratadas con leptina.

En el caso de las células con leptina la caída es algo mayor ya que empieza con un consumo de oxígeno de 5,8 nmolO₂/min y disminuye hasta una velocidad de consumo de 2,5 nmolO₂/min en presencia de oligomicina 1 μM. En este caso, la caída respecto al consumo basal (concentración cero) es significativa a partir de la concentración de tratamiento 0,5 μM, $P=0,04$ y $P=0,01$ para [1 μM]. En cambio, la disminución de la velocidad de consumo en las células control es algo más pequeña, ya que de inicio, parten de un consumo basal inferior (4,4 nmolO₂/min) respecto al consumo basal de las células con leptina. Las células control y las células con leptina finalizan el ensayo con una velocidad de consumo muy similar próxima a los 2 nmolO₂/min.

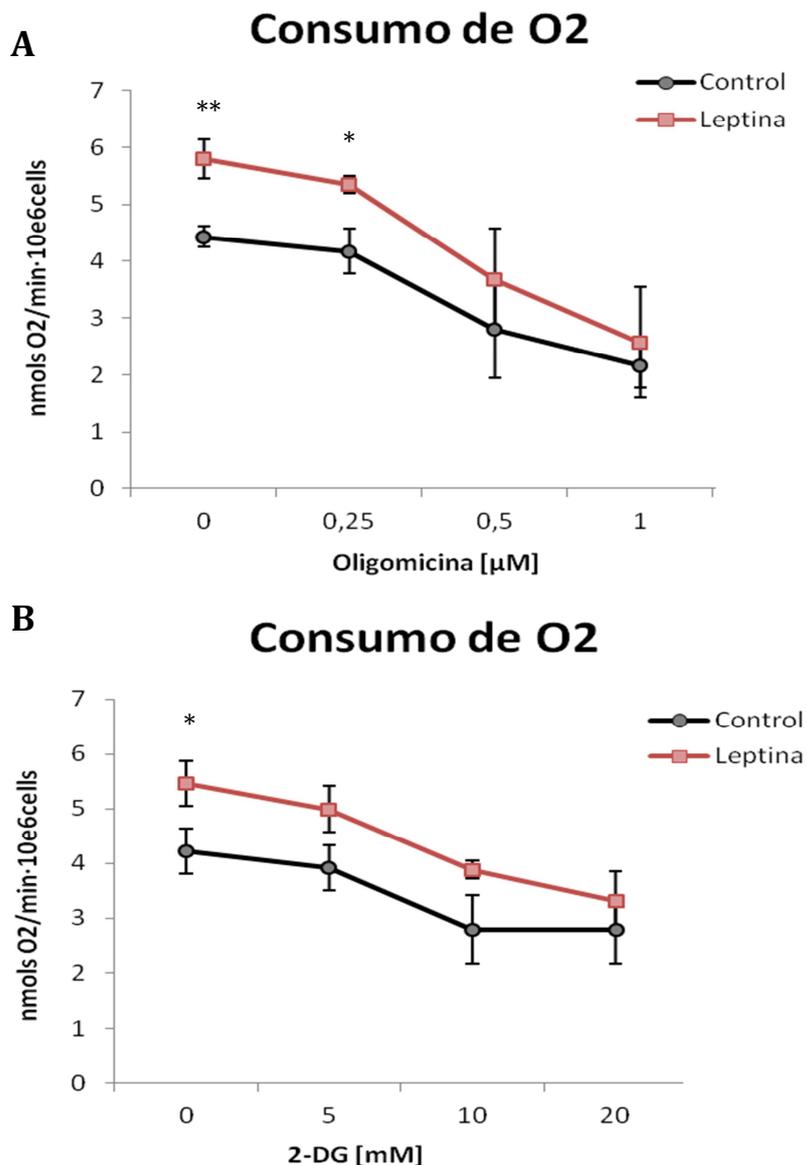


Figura 9: Consumo de ATP en nmol de oxígeno por minuto de 10⁶ células de las células control y leptina. A) Células tratadas con oligomicina (0, 0,25, 0,5, 1 μM) y B) con 2-deoxiglucosa (0, 5, 10, 20 mM) (B) La media ± SEM de un experimento por triplicado. * $P<0,05$; ** $P<0,01$ comparando control y leptina con la misma dosis de tratamiento.

En segundo lugar, en la figura 9B, se pueden observar los cambios que sufren las células control y las células con leptina cuando son sometidas a diferentes concentraciones de 2-deoxiglucosa. En los dos tipos de células, el consumo de oxígeno va disminuyendo a medida que aumenta la concentración de 2-DG a la que están expuestas, llegando en ambos casos a una velocidad de consumo cercano a 3 $\text{nmolO}_2/\text{min}$. La bajada del consumo en las células control no es significativa respecto al consumo basal. Las células tratadas con leptina y las células control presentan un consumo basal con diferencias significativas; 5,5 $\text{nmolO}_2/\text{min}$ en las células con leptina y 4,2 $\text{nmolO}_2/\text{min}$ en las células control. Es por este motivo que la bajada en la velocidad de consumo de oxígeno en las células con leptina es significativa en las concentraciones 10 y 20 mM , $P=0,01$ en ambos casos, sin embargo, en las células control no lo es.

4.4. Determinación de los niveles de AMPK mediante Western blot

En la detección de la proteína AMPK por la técnica de Western blot se analizó la AMPK total y la AMPK fosforilada. En la figura B se observa como en los carriles de las células que han sido tratadas con leptina aparece una segunda banda que no está presente en los carriles control. La cuantificación de estos resultados muestra que los niveles de AMPK en las células control y leptina no muestran diferencias significativas. Sin embargo, en las células tratadas con leptina se encuentra un 50 % más de AMPK fosforilada que en el caso de las células control (Figura 10A).

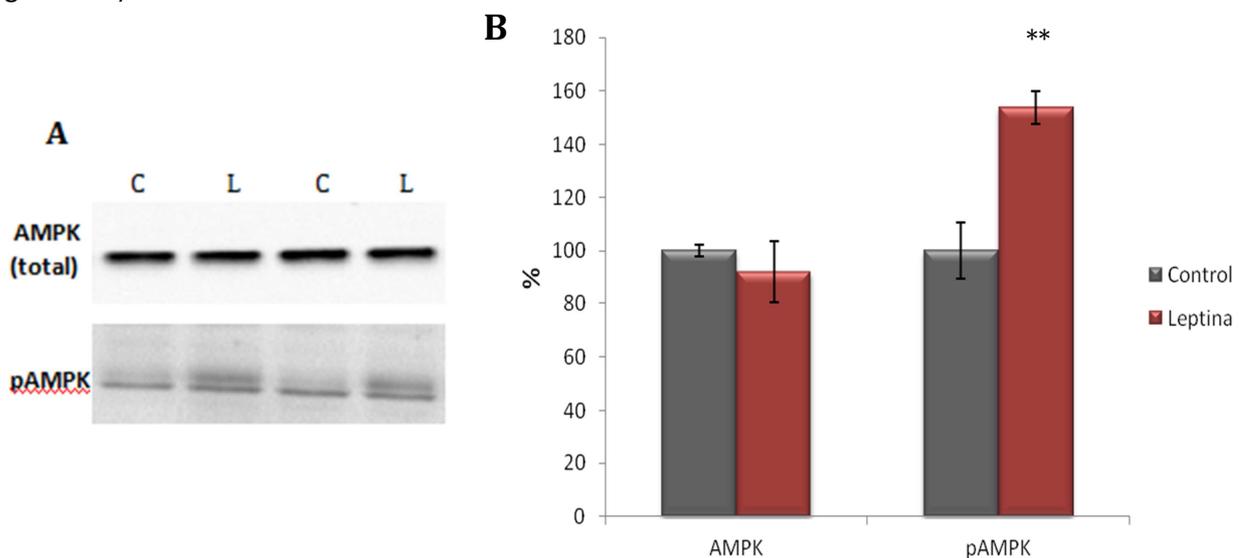


Figura 10: Aumento de los niveles de pAMPK en las células tratadas con leptina. (A) Imagen representativa del Western blot que muestra los niveles relativos de AMPK total y fosforilada. (B) Representación gráfica de los niveles de AMPK total y fosforilada (pAMPK) en porcentaje. $n=4$, $**P<0,01$.

6. DISCUSIÓN

Existe una alta relación entre el aumento de los niveles de leptina con la aparición de cáncer de mama, principalmente en mujeres obesas postmenopáusicas [6]. El tejido adiposo es capaz de variar los compuestos que produce en función de la cantidad de tejido adiposo que haya presente, de manera que, cuando hay un exceso de tejido adiposo, éste, aumenta la liberación de leptina y de factores pro-inflamatorios como TNF- α e interleuquina y disminuye la producción de adiponectina [9, 39]. Otro factor muy importante es el aumento de estrógenos, ya que en el periodo premenopáusico el principal tejido de producción de esta hormona sexual es el ovario, sin embargo, tras la menopausia, el tejido adiposo produce mayor cantidad de enzimas aromatasas que dan lugar a los estrógenos, usando como precursor a los progestágenos. La obesidad y la postmenopausia, junto con todo el cambio hormonal que se produce, favorecen vías de proliferación celular, supervivencia de las células tumorales, angiogénesis y vías anti-apoptóticas [10]. Por otra parte, se conoce que en muchas ocasiones, las células tumorales modifican su metabolismo activando en mayor medida la glucólisis acompañada de fermentación aeróbica dejando en parte, la utilización de la fosforilación oxidativa mitocondrial para conseguir energía, situación conocida como efecto Warburg [28, 29].

Partiendo de estos antecedentes, nuestro objetivo ha sido observar si la leptina ejerce alguna influencia sobre el efecto Warburg en la línea celular de cáncer de mama MCF-7. Para ello nos hemos centrado en la utilización de dos inhibidores, uno de ellos para bloquear la glucólisis (2-deoxiglucosa) y el otro para inhibir el último complejo de OXPHOS (oligomicina). Estos inhibidores se han utilizado en diferentes estudios del metabolismo para observar como respondían otras líneas celulares como PC3 (células de cáncer de próstata metastásico) [40] o para ver la adaptación metabólica a la que se sometían las células tras el tratamiento [34].

Nuestros resultados podrían situar a la leptina como hormona que revierte el efecto Warburg en las células de cáncer de mama de la línea MCF-7. En la observación de los niveles de ATP celulares, al inhibir el último paso de la fosforilación oxidativa mediante las distintas concentraciones de oligomicina, las células control mantienen muy estable los niveles de ATP sin embargo, en las células tratadas con leptina, los niveles de ATP caen significativamente tras la exposición a la primera concentración de oligomicina (Figura 7A). Estos resultados sugieren que las células control mantienen un metabolismo glucolítico muy activo [29, 41, 42] y son menos dependientes de OXPHOS para la síntesis de ATP, de manera que al inhibir la cadena respiratoria, éstas no se ven afectadas por que el ATP se produce principalmente mediante fosforilación a nivel de sustrato

(glucólisis). El efecto Warburg puede ser comprendido desde la perspectiva de las necesidades anabólicas del tumor: a las células tumorales no les interesa quemar los carbonos de la glucosa, si no, más bien, utilizarlos para producir nuevas moléculas necesarias para poder hacer frente a la elevada tasa de división celular [41, 42]. Por otra parte, las tratadas con leptina, demuestran ser más dependientes de la fosforilación oxidativa para la producción de ATP, observándose una caída significativa en sus niveles al inhibir la fosforilación oxidativa con oligomicina.

Cuando inhibimos la glucólisis con la 2-deoxiglucosa, la respuesta en los niveles de ATP también fue diferente. No obstante, en este caso, los niveles de ATP descienden en ambas, con la diferencia de que las células control fueron mucho más sensibles a la 2-DG (Figura 7B). Este resultado es de esperar ya que, si las células control son más dependientes de la glucólisis, el bloqueo de esta vía va a provocar una disminución en la producción de ATP. Por otra parte, las células tratadas con leptina parecen aguantar una concentración mayor del inhibidor 2-DG, es decir, no se ven afectadas hasta que son expuestas a la concentración máxima utilizada (20 mM), momento en el que caen los niveles de ATP. Este mantenimiento del ATP en las células con leptina con las primeras concentraciones de 2-DG podría deberse a que éste ATP fuese resultado en mayor medida de la fosforilación oxidativa, la cual puede nutrirse de otros sustratos que aporten NADH a la mitocondria como pueden ser los ácidos grasos por β -oxidación o bien los aminoácidos que incorporen sus esqueletos carbonados al ciclo de krebs. Por este motivo, a pesar de bloquear la entrada de sustrato glucolítico hacia la mitocondria, las mitocondrias pueden seguir produciendo ATP. No obstante, se constata que la glucólisis debe seguir siendo una de las principales entradas de fuel a la mitocondria puesto que inhibiéndola se consigue también afectar a la síntesis de ATP. [41].

Para detectar posibles aumentos de la glucólisis en las células tumorales, puesto que parte de los carbonos de la glucosa conducen a la producción de lactato como producto final de la fermentación aeróbica, se determinó los niveles de lactato excretado al medio. Cabe destacar que el lactato producido por las células tumorales debe ser solo una pequeña parte de los carbonos que entran en forma de glucosa ya que la mayoría de ellos deben destinarse a fines biosintéticos. No obstante, para mantener favorable la ratio NAD/NADH, parte de estos carbonos son convertidos a lactato y excretados al exterior. Los resultados muestran que, en la inhibición de OXPHOS con oligomicina a diferentes concentraciones, los niveles de lactato en el medio de las células control no se ven modificados respecto a la concentración inicial, sin embargo, en las células tratadas con leptina si se produce un aumento en la concentración de lactato (Figura 8A). Esta situación sugiere que las células expuestas a leptina, a pesar de parecer depender en mayor medida de la fosforilación oxidativa, cuando ésta se encuentra inhibida son capaces de reactivar el efecto Warburg, es decir,

dirigirse de nuevo hacia la vía glucolítica como las células tumorales no tratadas con leptina [34]. En cuanto a las células control, al presentar un perfil glucolítico de por sí [29, 41, 42], una inhibición en OXPHOS posiblemente no suponga una modificación en la actividad de la glucólisis.

Por otra parte, cuando la vía que se inhibe es la glucólisis mediante el uso de 2-DG, la situación es igual para las células control y las leptina, es decir, ambas mantienen los niveles de lactato (Figura 8B). Esta situación podría explicarse por cuestiones de diseño experimental. La concentración de lactato que observamos es resultado de la acumulación de lactato durante 24 horas, de las cuales, solo durante 1 hora las células están expuestas a la 2-DG u oligomicina. Esto implica que, una disminución de la producción de lactato durante 1 hora (tiempo de tratamiento con 2-DG), podría no suponer cambios que sean detectables en la concentración total de lactato (producción durante 23 horas), sin embargo, cuando el efecto supone una activación de la glucólisis, sí podría dar lugar a un aumento significativo en los niveles de lactato (situación de las células tratadas con leptina en presencia de oligomicina). Sería muy interesante repetir este experimento realizando un cambio a medio fresco justo antes de añadir la 2DG o la oligomicina, de manera que así el valor de background fuese menor y las diferencias fuesen mayores.

Para corroborar que la leptina potencia el metabolismo oxidativo en la célula tumoral se llevó a cabo el estudio del consumo de oxígeno en respuesta a concentración creciente de oligomicina y de 2-deoxiglucosa. En primer lugar, las células tratadas con leptina mostraron un mayor consumo de oxígeno que las células control cuando se utilizó la oligomicina, los resultados mostraron que la tasa de consumo de O_2 disminuía tanto en las células control como en las leptina pero la disminución de la velocidad de consumo fue más pronunciada en las leptina (Figura 9A). Estos resultados concuerdan con los resultados anteriores, ya que, como se ha comentado, si las células tratadas con leptina son más dependientes de OXPHOS, una inhibición a este nivel va a hacer que la tasa de consumo de oxígeno caiga más rápidamente. El hecho de que el consumo de O_2 también disminuya a medida que aumenta la concentración de oligomicina en las células control se deba a que, a pesar de ser más glucolíticas y producir hasta un 60% del ATP por esta vía, la respiración se mantiene activa pero participando en menor medida en el aporte de energía [28].

En segundo lugar, tras inhibir con 2-DG, se volvió a observar una bajada de la tasa de consumo de oxígeno en las células tratadas con leptina y las células control (Figura 9B). Esto es debido a que ambas dependen de la glucólisis y fosforilación oxidativa en mayor o en menor medida [28]. En el caso de las células con leptina, como ya hemos señalado anteriormente, parten de un consumo de O_2 más alto que las células control, y necesitan de la glucólisis para

obtener acetil-CoA que pueda ser oxidado en el ciclo de krebs para obtener NADH necesario para la fosforilación oxidativa. En el caso de las células control, a pesar de ser más glucolíticas, su respiración también es sensible, aunque menos, a la inhibición de la glucólisis. Por lo tanto, la fosforilación oxidativa, a pesar de participar en mayor o en menor medida en la obtención de energía, en ambas situaciones se ve afectada cuando se inhibe la glucólisis ya que la glucosa vía piruvato-acetilCoA posiblemente sea la entrada mayoritaria de fuel para la fosforilación oxidativa [41].

Finalmente, se determinaron los niveles de AMPK total y pAMPK (forma activa) en las células control y leptina. Los resultados sugieren que las células que han sido previamente tratadas con leptina presentan una mayor proporción de pAMPK en comparación con las células control (Figura 10A). Este resultado podría explicar el porqué las células tratadas con leptina, a pesar de ser tumorales como las células control “revierten el efecto Warburg” y recuperan la actividad de OXPHOS dejando de lado la vía glucolítica. Se conoce que mTOR participa en la activación del factor inducible de hipoxia *HIF-1 α* , y que mTOR puede ser inhibido por la pAMPK tras una fosforilación [42]. El factor inducible de hipoxia *HIF-1 α* , en primer lugar, activa la PDK (piruvato deshidrogenasa quinasa) que cuando está en su forma activa es capaz de fosforilar a la enzima PDH (piruvato deshidrogenasa). Cuando PDH es fosforilada queda inactiva y de esta manera se bloquea la síntesis de acetil-CoA desde el piruvato, inhibiendo así la fosforilación oxidativa. En segundo lugar, *HIF-1 α* , activa la vía de la glucólisis, dirigiendo todo ese piruvato que no puede ser transformado a acetil-CoA hacia la producción de lactato [27]. Las células tumorales generalmente suelen tener bajos niveles de AMPK [18], de manera que este no puede ejercer su efecto inhibitor sobre mTOR y consecuentemente *HIF-1 α* queda activo dando lugar al bloqueo de la fosforilación oxidativa y activación de la glucólisis glucólisis anaerobia [27, 42]. En las células tratadas con leptina, nuestros resultados muestran un aumento del 50 % de los niveles de pAMPK (activa) de manera que, ésta podría inhibir a mTOR y a *HIF-1 α* , recuperando la activación de OXPHOS y bloqueando la glucólisis. Sería por tanto muy interesante analizar el grado de fosforilación de mTOR así como los niveles de *HIF-1 α* en células tratadas con leptina a fin de comprobar esta hipótesis.

7. CONCLUSIÓN

Las células tumorales MCF-7 son principalmente glucolíticas puesto que al inhibir la fosforilación oxidativa, sus niveles de ATP no se ven alterados. Sin embargo, al inhibir la glucólisis con 2-DG, sus niveles de ATP disminuyen significativamente. Las células con leptina parecen depender

energéticamente en mayor medida del metabolismo aeróbico, es decir, sus niveles de ATP son más sensibles a una inhibición de la fosforilación oxidativa y menos sensibles a la inhibición de la glucólisis. Estos datos nos conducen a pensar que las células que han sido previamente tratadas con leptina parecen ser más dependientes de la fosforilación oxidativa para conseguir ATP y por lo contrario, las que no son tratadas con leptina realizan más la vía glucolítica.

Por otra parte, los datos de producción de lactato indican que las células tratadas con leptina parecen ser capaces de redirigir su metabolismo hacia la activación de la glucólisis (efecto Warburg) cuando inhibimos la fosforilación oxidativa mitocondrial.

Finalmente, las células MCF-7 tras ser tratadas con leptina muestran una mayor activación de la AMPK, lo que podría contribuir a explicar el "shift" metabólico inducido por la leptina.

Podemos concluir que la leptina en las células de cáncer de mama procedentes de la línea celular MCF-7 parecen revertir el efecto Warburg, a la vez que mantienen la capacidad de redirigir su metabolismo hacia la vía glucolítica cuando la respiración se ve comprometida. Esta mayor versatilidad así como la capacidad de lograr una mayor producción de ATP (mayor eficiencia de la fosforilación oxidativa) podría suponer algún tipo de ventaja para la célula tumoral. No obstante, todavía se precisa continuar investigando para poder conocer la participación de la leptina de manera completa en el efecto Warburg y las ventajas o inconvenientes que puede suponer para la célula tumoral.

8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] G. K. Malhotra, X. Zhao, H. Band, and V. Band, "Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers," *Cancer Biol Ther*, vol. 10, pp. 955-60, Nov 2010.
- [2] A. Prat, J. S. Parker, O. Karginova, C. Fan, C. Livasy, J. I. Herschkowitz, *et al.*, "Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer," *Breast Cancer Res*, vol. 12, p. R68, 2010.
- [3] V. Ayyasamy, K. M. Owens, M. M. Desouki, P. Liang, A. Bakin, K. Thangaraj, *et al.*, "Cellular model of Warburg effect identifies tumor promoting function of UCP2 in breast cancer and its suppression by genipin," *PLoS One*, vol. 6, p. e24792, 2011.
- [4] J. V. Lacey, A. R. Kreimer, S. S. Buys, P. M. Marcus, S. C. Chang, M. F. Leitzmann, *et al.*, "Breast cancer epidemiology according to recognized breast cancer risk factors in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Cohort," *BMC Cancer*, vol. 9, p. 84, 2009.
- [5] H. Samavat and M. S. Kurzer, "Estrogen metabolism and breast cancer," *Cancer Lett*, Apr 2014.
- [6] C. La Vecchia, S. H. Giordano, G. N. Hortobagyi, and B. Chabner, "Overweight, obesity, diabetes, and risk of breast cancer: interlocking pieces of the puzzle," *Oncologist*, vol. 16, pp. 726-9, 2011.

- [7] D. P. Rose and L. Vona-Davis, "Biochemical and molecular mechanisms for the association between obesity, chronic inflammation, and breast cancer," *Biofactors*, vol. 40, pp. 1-12, 2014 Jan-Feb 2014.
- [8] T. Jardé, S. Perrier, M. P. Vasson, and F. Caldefie-Chézet, "Molecular mechanisms of leptin and adiponectin in breast cancer," *Eur J Cancer*, vol. 47, pp. 33-43, Jan 2011.
- [9] A. Macciò and C. Madeddu, "Obesity, inflammation, and postmenopausal breast cancer: therapeutic implications," *ScientificWorldJournal*, vol. 11, pp. 2020-36, 2011.
- [10] S. Khan, S. Shukla, S. Sinha, and S. M. Meeran, "Role of adipokines and cytokines in obesity-associated breast cancer: therapeutic targets," *Cytokine Growth Factor Rev*, vol. 24, pp. 503-13, Dec 2013.
- [11] G. Sweeney, "Leptin signalling," *Cell Signal*, vol. 14, pp. 655-63, Aug 2002.
- [12] C. Garofalo, M. Koda, S. Cascio, M. Sulkowska, L. Kanczuga-Koda, J. Golaszewska, *et al.*, "Increased expression of leptin and the leptin receptor as a marker of breast cancer progression: possible role of obesity-related stimuli," *Clin Cancer Res*, vol. 12, pp. 1447-53, Mar 2006.
- [13] D. Cirillo, A. M. Rachiglio, R. la Montagna, A. Giordano, and N. Normanno, "Leptin signaling in breast cancer: an overview," *J Cell Biochem*, vol. 105, pp. 956-64, Nov 2008.
- [14] L. Sánchez-Cenizo, L. Formentini, M. Aldea, A. D. Ortega, P. García-Huerta, M. Sánchez-Aragó, *et al.*, "Up-regulation of the ATPase inhibitory factor 1 (IF1) of the mitochondrial H⁺-ATP synthase in human tumors mediates the metabolic shift of cancer cells to a Warburg phenotype," *J Biol Chem*, vol. 285, pp. 25308-13, Aug 2010.
- [15] K. J. Jeong, G. W. Kim, and S. H. Chung, "AMP-activated protein kinase: An emerging target for ginseng," *J Ginseng Res*, vol. 38, pp. 83-88, Apr 2014.
- [16] E. A. Roman, D. Reis, T. Romanatto, D. Maimoni, E. A. Ferreira, G. A. Santos, *et al.*, "Central leptin action improves skeletal muscle AKT, AMPK, and PGC1 alpha activation by hypothalamic PI3K-dependent mechanism," *Mol Cell Endocrinol*, vol. 314, pp. 62-9, Jan 2010.
- [17] J. Grisouard, K. Dembinski, D. Mayer, U. Keller, B. Müller, and M. Christ-Crain, "Targeting AMP-activated protein kinase in adipocytes to modulate obesity-related adipokine production associated with insulin resistance and breast cancer cell proliferation," *Diabetol Metab Syndr*, vol. 3, p. 16, 2011.
- [18] B. Faubert, E. E. Vincent, M. C. Poffenberger, and R. G. Jones, "The AMP-activated protein kinase (AMPK) and cancer: Many faces of a metabolic regulator," *Cancer Lett*, Jan 28 2014.
- [19] C. N. Perera, H. G. Chin, N. Duru, and I. G. Camarillo, "Leptin-regulated gene expression in MCF-7 breast cancer cells: mechanistic insights into leptin-regulated mammary tumor growth and progression," *J Endocrinol*, vol. 199, pp. 221-33, Nov 2008.
- [20] C. Garofalo and E. Surmacz, "Leptin and Cancer," vol. 207, ed. Cosenza, Italia: Journal of cellular physiology, 2006, pp. 12-22.
- [21] A. Valle, J. Sastre-Serra, J. Oliver, and P. Roca, "Chronic leptin treatment sensitizes MCF-7 breast cancer cells to estrogen," *Cell Physiol Biochem*, vol. 28, pp. 823-32, 2011.
- [22] N. J. Ollberding, Y. Kim, Y. B. Shvetsov, L. R. Wilkens, A. A. Franke, R. V. Cooney, *et al.*, "Prediagnostic leptin, adiponectin, C-reactive protein, and the risk of postmenopausal breast cancer," *Cancer Prev Res (Phila)*, vol. 6, pp. 188-95, Mar 2013.
- [23] M. E. Grossmann and M. P. Cleary, "The balance between leptin and adiponectin in the control of carcinogenesis - focus on mammary tumorigenesis," *Biochimie*, vol. 94, pp. 2164-71, Oct 2012.
- [24] J. Guadalupe, Á. Ordóñez, H. Mendieta, and L. M. Gómez, "La leptina en la carcinogénesis mamaria," in *Vías de señalización*, ed. Estado de México, México: QuímicaViva, 2012.
- [25] X. F. Huang and J. Z. Chen, "Obesity, the PI3K/Akt signal pathway and colon cancer," *Obes Rev*, vol. 10, pp. 610-6, Nov 2009.
- [26] H. K. Koul, M. Pal, and S. Koul, "Role of p38 MAP Kinase Signal Transduction in Solid Tumors," *Genes Cancer*, vol. 4, pp. 342-359, Sep 2013.

