



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultad de Ciencias

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Efecto de la leptina sobre la captación de proteínas séricas en el cáncer de mama

Yazmine Bejarano Condezo

Grado de Bioquímica

Año académico 2013-14

DNI de la alumna: Y2067870-T

Trabajo tutelado por Adamo del Valle Gómez
Departamento de Biología Fundamental i Ciències de la Salut

Se autoriza a la Universidad a incluir mi trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con finalidades exclusivamente académicas y de investigación.

Palabras clave del trabajo:

Albúmina, leptina, cáncer de mama.

Índice

1-Resumen	3
2-Introducción	4
2.1. Cáncer de mama	4
2.2. Obesidad y cáncer de mama	4
2.3. Leptina y cáncer de mama	5
2.3.1. Mecanismo de acción de la leptina	5
2.4. Proteínas séricas y cáncer de mama	6
2.4.1. Albúmina	7
2.4.2. α -2-HSglicoproteína (AHSG)	7
2.5. Utilización de la albúmina en el tratamiento del cáncer de mama	8
3-Diseño experimental	10
4-Materiales y métodos	11
4.1. Cultivo celular	11
4.2. Fluorimetría	11
4.3. Análisis de la captación de albumina-FITC por microscopía confocal	11
4.4. Citometría de flujo	12
4.5. Determinación proteica: Análisis por Western Blot	12
4.7. Análisis estadístico	13
5-Resultados	14
5.1. Efecto de la leptina en la captación de albúmina por Fluorimetría	14
5.2. Análisis de la captación de albumina-FITC por microscopía confocal	14
5.3. Efecto de la leptina en la captación de albúmina por Citometría de flujo	16
5.4. Determinación y cuantificación de albúmina sérica y SPARC (de las células y el medio)	17
5.5 Análisis de la captación de AHSG marcada	18
6-Discusión	19
7-Referencias	21

1-Resumen

El cáncer de mama es el más frecuente en mujeres sobre todo en los países desarrollados, de ahí la intensa lucha para mejorar los sistemas que permitan un diagnóstico precoz, así como la búsqueda de estrategias para mejorar la calidad de vida de las mujeres que lo padecen.

Se ha encontrado una estrecha relación entre la progresión del cáncer y la leptina, observándose que la leptina favorece el crecimiento tumoral, proliferación, supervivencia y angiogénesis. Además se han encontrado indicios de que la leptina podría potenciar la capacidad de las células tumorales para captar proteínas séricas, a fin de satisfacer la elevada demanda plástica de las células cancerígenas.

Se quiere aprovechar esta capacidad como herramienta para potenciar el efecto de agentes antineoplásicos que utilicen dichas proteínas séricas como vehículo, haciendo así que sean captadas con mayor avidéz por las células tumorales y de esta forma reducir la dosis de fármaco consiguiendo una mejor respuesta con menores efectos secundarios.

Este trabajo se centra en comprobar el efecto de la leptina en la captación de proteínas séricas (albúmina y α -2-HSglicoproteína), que podría establecer una base para futuras investigaciones dirigidas a desarrollar su uso como adyuvante en los tratamientos del cáncer de mama.

2-Introducción

2.1. Cáncer de mama

El cáncer de mama es el crecimiento anormal de células malignas en el tejido mamario, es el tumor maligno más frecuente en las mujeres de países desarrollados siendo la primera causa de muerte por cáncer del género femenino.

En España se diagnostican alrededor de 22000 nuevos cánceres de mama al año, lo que representa casi el 30% de todos los tumores del sexo femenino. Tanto el número de casos como las tasas de incidencia aumentan lentamente en España y en el mundo, probablemente debido al envejecimiento de la población. Se estima que el riesgo de padecer cáncer de mama a lo largo de la vida es, aproximadamente, de 1 de cada 8 mujeres.^[1]

Los principales factores de riesgo de contraer cáncer de mama incluyen una edad avanzada (post-menopáusicas), la primera menstruación a temprana edad, edad avanzada en el momento del primer parto o nunca haber dado a luz, antecedentes familiares de cáncer de mama, el hecho de consumir hormonas, tales como estrógenos y progesterona, el consumo de alcohol. Solo el 5-10% de los casos de cáncer de mama son causados por mutaciones genéticas heredadas.^[2]

2.2. Obesidad y cáncer de mama

La obesidad que se asocia con una gran variedad de desórdenes metabólicos es también uno de los factores de riesgo del desarrollo de cáncer de mama en mujeres de edad avanzada, sobre todo mujeres post-menopáusicas con obesidad androide (el tejido adiposo predomina en la parte superior del cuerpo). Esta clase de obesidad se asocia con una mayor agresividad del tumor así como un peor pronóstico. Se sugiere que mujeres post-menopáusicas que tienen cinturas más pequeñas tienen un 39% menos riesgo de padecer cáncer de mama en comparación con las de mayor cintura.^[3]

El nexo entre la obesidad y el cáncer de mama se encuentra en que la obesidad se potencia numerosas vías proliferativas, y consecuentemente los pacientes obesos tienen tumores más agresivos, en este mismo sentido altas concentraciones de insulina se relacionan con el incremento de las recurrencias así como el descenso de supervivencia en el cáncer de mama. Además a las pacientes obesas se les suministra dosis más bajas de quimioterapia debido a que son más sensibles a la toxicidad del tratamiento.^[4]

El tejido adiposo no es solo un componente clave en la progresión del cáncer de mama, también parece afectar en las etapas tempranas de la carcinogénesis y en la respuesta al tratamiento de un tumor ya establecido.^[5] Se sabe que el tejido adiposo actúa como un tejido endocrino, por tanto, tiene la capacidad de secretar una serie de hormonas, factores de crecimiento, factores del complemento, componentes de las cascadas de coagulación y fibrinolíticas así como varias citoquinas como TNF α , interleucinas y leptina.^[6]

2.3. Leptina y cáncer de mama

La leptina es una hormona descubierta en 1994, se trata de una proteína de 16 kDa secretada principalmente por los adipocitos blancos [7]. Se expresa en una gran variedad de tejidos como la placenta, ovarios, epitelio mamario, estómago, médula ósea y tejidos linfoides. Actúa a través de receptores específicos (ObRs) que se encuentran en el hipotálamo para modular el peso corporal y el gasto energético pero también se pueden encontrar en tejidos periféricos donde ejerce su función de forma directa. [8]

Esta hormona ha demostrado tener efectos sobre el crecimiento, supervivencia, apoptosis y capacidad metastásica en diversas líneas celulares del cáncer de mama así como en modelos animales, según diversos estudios [6] [9] [10] [12]. Existen evidencias que sugieren que la leptina juega un papel muy importante en la regulación de la proliferación del tejido epitelial mamario en condiciones normales (durante el embarazo hay incrementos de la concentración de leptina en suero tanto en roedores como en humanos) y en condiciones malignas durante el desarrollo de un tumor mamario. [9]

2.3.1. Mecanismo de acción de la leptina

La forma en que la leptina induce la proliferación epitelial comprende una serie de mecanismos celulares complejos [6] [9]. La leptina potencia la supervivencia y la proliferación celular mediante la inhibición de la apoptosis (induciendo la expresión de genes anti-apoptóticos y reduce la expresión de genes apoptóticos), promoviendo la invasión celular, modulando la matriz extracelular e inhibiendo factores que suprimen la proliferación epitelial (Fig.1).

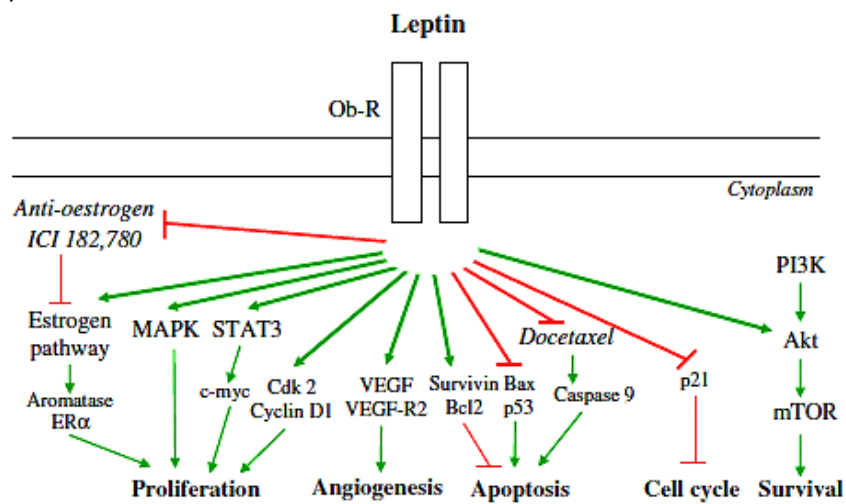


Fig.1- Vías de señalización de la leptina en el cáncer de mama. La leptina al unirse a su receptor promueve una serie de vías de transducción que se encargan sobretodo de promover la malignidad e invasividad del cáncer. [9]

Los receptores de leptina (ObRs) se encuentran en el sistema nervioso central y en numerosos tejidos periféricos, este receptor actúa mayoritariamente mediante la vía de transducción JAK/STAT. [8]

Además parece que la leptina activa las vías de señalización STAT3, MAPK, la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3), y el factor de transcripción JUN durante la proliferación celular del epitelio mamario. También se observa una disminución de la apoptosis gracias a la inhibición de la Caspasa-9 y aumenta la supervivencia celular a través de la vía PI3K. ^{[9] [11]}

Un estudio similar ^[6], observó que la línea celular MCF-7 expresaba los receptores de leptina y respondía a leptina humana recombinante, activándose las vías STAT3 y MAPK incrementando así la proliferación celular. También se sugiere que la leptina actúa *in vivo* como un factor de crecimiento a través de las células epiteliales mamarias contribuyendo a explicar por qué la obesidad es un riesgo en el desarrollo de cáncer de mama.

Experimentos *in vitro* muestran que la actividad proliferativa de la leptina esta mediada por diferentes vías de señalización. Cuando se incubó la línea MCF-7 durante 24 horas con leptina, hubo una reducción significativa de la expresión de p53, así como de Bax, y además hubo un aumento de la expresión de genes anti-apoptóticos. ^[10] La leptina también favorece la sobreexpresión de Cdk2 y la ciclina D1 (genes que promueven el ciclo celular) de esta forma se produce la proliferación celular debido una alteración en los puntos de regulación del ciclo celular. ^[11]

Recientemente, estudios proteómicos ^[12] han mostrado que la leptina puede inducir la captación de proteínas séricas en las células tumorales de cáncer de mama, posiblemente con la finalidad de aportar combustible metabólico y plástico para su crecimiento acelerado. Por tanto, la leptina juega un papel en múltiples mecanismos que pueden conducir a la progresión del tumor mamario.

2.4. Proteínas séricas y cáncer de mama

Los primeros indicios de que las proteínas del plasma podrían estar implicadas en la nutrición del tumor fueron reportados en 1948 y se llegó a la conclusión que los tumores actúan como trampas de nitrógeno después de comparar el metabolismo proteico del tejido normal y el tejido tumoral ^[13].

También se han considerado de importancia la identificación de las proteínas séricas implicadas en este proceso, para ser usadas como biomarcadores para la detección del cáncer de mama ^[14]. La mayoría de estas proteínas son importantes constituyentes del suero en humanos como la albúmina que representa entre un 50-70% de la reserva proteica.

Tanto la albúmina, como la α -2-HSglicoproteína (AHSG) son proteínas séricas que se encargan de transportar sustancias insolubles en el plasma como hormonas liposolubles, vitaminas, etc. Se ha propuesto que una exposición prolongada a factores de crecimiento y hormonas contribuye a la patogénesis del cáncer de mama, puesto que el tumor tiene grandes demandas metabólicas ^[15].

2.4.1. Albúmina

La albúmina tiene una serie de características que la hacen un vehículo atractivo en la oncología ya que actúa como un transportador endógeno de diversas moléculas hidrofóbicas que tanto pueden ser nutrientes para el tumor, como fármacos contra él ^[16].

El transporte que realiza la albúmina comprende una serie de componentes, por una parte cuando una sustancia hidrofóbica viaja unida a la albúmina por la sangre, ésta interactúa con el receptor de glicoproteínas de 60 kDa (GP60) que se encuentra en la superficie celular del endotelio vascular. El receptor a su vez se encuentra asociada a la caveolina-1 (proteína transmembranal), por lo que una vez que la albúmina interactúa con su receptor resulta en la invaginación de la membrana endotelial, atrapando a su paso los constituyentes plasmáticos en estructuras vesiculares, las caveolas. Éstas internalizan la albúmina a través del endotelio hasta llegar al tejido que la necesite. ^[17-20]

La osteonectina (conocida como una proteína secretada rica en cisteína, SPARC) se une a la albúmina a través de una secuencia homóloga con GP60 ^[21]. La SPARC es la que se encarga de asociarse a la albúmina una vez ésta ha atravesado en endotelio vascular, con lo que participa en el proceso de internalización de la albúmina en la célula ^[16]. Esta proteína se encuentra implicada en la calcificación del hueso pero también en la síntesis de la matriz extracelular así como en la promoción de cambios en la forma celular. Se la relaciona con neoplasias por los cambios de forma que pueden promover la invasión celular, con que se explica por qué la albúmina se acumula en algunos tumores y facilita su acumulación intratumoral ^[22].

En general entre un 50-60% de los cánceres de mama sobreexpresan SPARC y su aumento se relaciona a un mal pronóstico, puesto que quiere decir que el tumor consume material metabólico con mayor afinidad mediante la captación de albúmina. Se sugiere que SPARC juega un papel en la concentración de albúmina en eras del tumor ^[23]. Por tanto cuando hay una acumulación de albúmina en los tumores resulta en una acumulación intratumoral preferencial de los nutrientes que eran transportados por la albúmina.

Hay un estudio ^[24] que manifiesta que la leptina regula la SPARC, y a su vez la SPARC regula la expresión del gen de la leptina en pre-adipocitos de ratón, lo que explica los niveles altos de leptina observados en ratones knock-out para la SPARC. Además que cuando se administra leptina a un explante primario de pre-adipocitos se observa un aumento significativo de los niveles proteicos de SPARC.

2.4.2. α -2-HSglicoproteína (AHSG)

Se ha observado en distintos cánceres que suele haber una expresión de proteínas fetales, puesto que existe una similitud entre el rápido crecimiento celular en las etapas fetales y en el cáncer. El análogo de la albúmina en el feto es la AHSG. La AHSG se ha identificado como un antígeno tumoral incrementado en la orina en pacientes con cáncer de mama ^[25]. Además, se determinó que esta proteína estaba incrementada en la línea celular MCF-7

cuando fue tratada con leptina ^[11]. Los anticuerpos contra esta proteína pueden ser detectados selectivamente en la sangre de pacientes con cáncer de mama en comparación a mujeres sanas, se expone que podría ser un biomarcador tanto en el *screening* como diagnóstico del cáncer de mama ^[26].

2.5. Utilización de la albúmina en el tratamiento del cáncer de mama

Dado que en células cancerosas muestran un aumento de la captación de proteínas transportadoras séricas ^[12], hay interés en utilizarlas como vehículos de fármacos para llegar con mayor avidez al tumor. De tal forma que se puede permitir reducir las dosis evitando mejor los efectos secundarios. Un ejemplo de dichos fármacos es el Abraxane®, que se trata de un tratamiento para el cáncer de mama metastásico basado en el uso del paclitaxel unido a nanopartículas de albúmina. ^{[27] [28]}

El mecanismo propuesto para el transporte de dicho fármaco (paclitaxel) implica a la GP60 y la acumulación del mismo en el área del tumor mediante la unión de la albúmina con SPARC **(Fig.2)** ^[16]. El paclitaxel promueve la asociación de los microtúbulos de los dímeros de tubulina y los estabiliza de tal forma que previene la despolimerización. Esta estabilidad inhibe la dinámica normal de la reorganización de la red de los microtúbulos que es esencial para la función mitótica celular. Por tanto, el paclitaxel interfiere con la mitosis, resultando en la muerte celular de las células tumorales. ^[28]

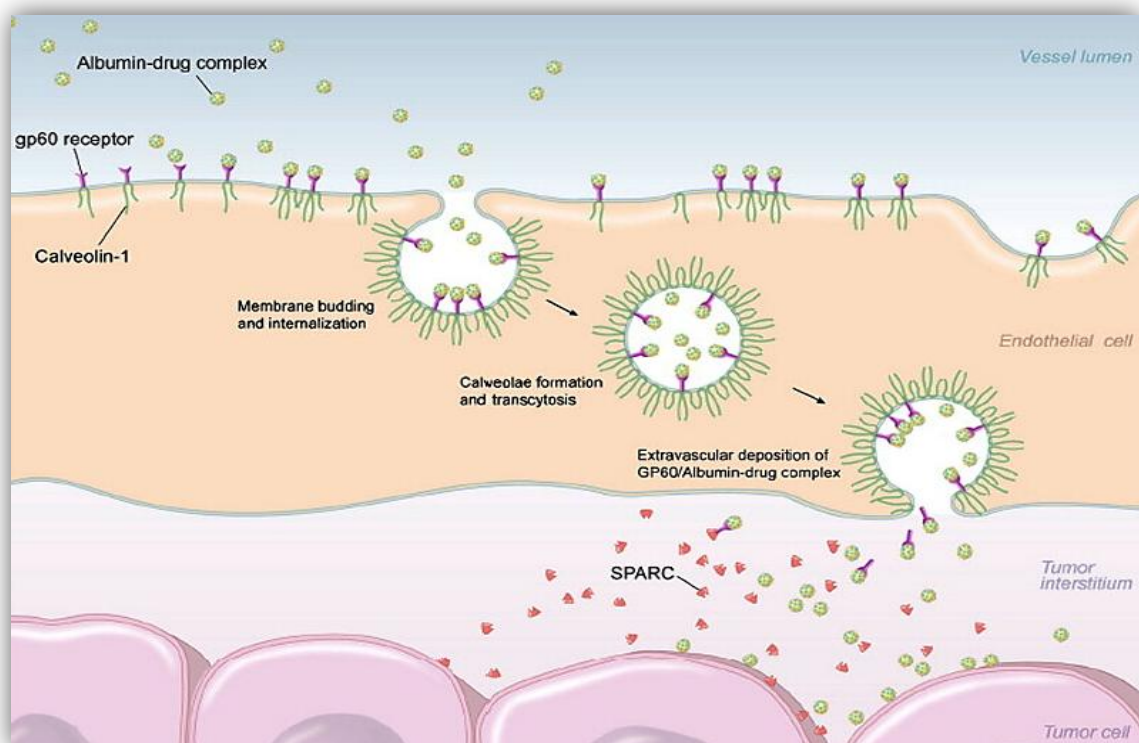


Fig.2- Proceso por el cual GP60 media la transcitosis de la albúmina a través del endotelio vascular. ^[16]

El Abraxane® transporta el paclitaxel a través de la captación pasiva del complejo albúmina-paclitaxel al tumor, además este medicamento supera con creces al Taxol® en la lucha contra el cáncer de mama. Las principales ventajas de utilizar la albúmina en este

medicamento radica en su abundancia, además contiene un sitio de unión específico para ácidos grasos y dos sitios de unión para medicamentos^[27], y es soluble en agua con lo que se evita la combinación del paclitaxel con CremophorEL (solvente tóxico responsable de los efectos secundarios de la terapia con taxanos).^[29]

El uso de este medicamento se ha extendido al tratamiento de otros tumores, como el cáncer de páncreas, melanoma y el cáncer de cuello y cabeza, a menudo en combinación con la quimioterapia convencional.^[30]

Tal y como se ha visto, la comprensión de cómo la leptina estimula la captación de proteínas transportadoras contribuye al futuro desarrollo de nuevas estrategias para mejorar la terapia del cáncer de mama.

El **objetivo** del trabajo es evaluar si la leptina *in vitro* incrementa la captación de proteínas séricas en la línea de cáncer de mama MCF-7 mediante técnicas de biología molecular.

3-Diseño experimental

A modo de comprobar que la leptina induce captación de proteínas séricas más concretamente de la albúmina y la AHSG en la línea celular MCF-7 se procedió a una serie de experimentos:

- Análisis de la captación de albúmina-FITC mediante: fluorimetría, microscopía confocal y citometría de flujo.
- Confirmación de los resultados mediante Western Blot.
- Análisis de proteínas claves en el mecanismo de captación de albúmina (SPARC) mediante Western Blot.

En estos experimentos las células fueron sembradas 24 horas antes, tratadas con 50 y 100 ng/mL de leptina durante 24-48h y se añadieron 200 µg/mL de albúmina-FITC. De esta forma se podrá valorar a través de la fluorescencia la cantidad de albúmina que haya podido captar la célula tumoral. De igual manera se marcarán con reactivo Hoechst los núcleos celulares para normalizar los datos por número de células, evitando así diferencias debidas al efecto proliferativo que induce la leptina. Esta determinación se analizará mediante microscopía de confocal y citometría de flujo.

Posteriormente, se realizó la determinación y cuantificación de la albúmina sérica y SPARC mediante Western Blot.

4-Materiales y métodos

4.1. Cultivo celular

El medio de rutina para el mantenimiento de la línea celular MCF-7 es *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) de GIBCO (Pailsey, UK) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1% de antibiótico (penicilina y estreptomocina) a 37°C, 5% de CO₂. Para la realización de los experimentos se sustituyó el medio por DMEM sin rojo fenol y 1% de antibiótico suplementado con 10% de FBS Charcoal-striped. Con este medio se reduce los niveles de estrógenos que tiene un potente efecto proliferativo sobre la línea MCF-7 enmascarando los efectos de la leptina.

El medio con FBS Charcoal es una preparación comercial de suero bovino que ha sido tratado con carbón vegetal para reducir los niveles de hormonas lipofílicas. El uso de este suero representa una alternativa al medio convencional a la hora de determinar los efectos de tratamientos hormonales. Además, el medio Charcoal puede ser utilizado para reemplazar el medio convencional en el estudio de las respuestas estrogénicas y el control de la proliferación en células MCF-7 de cáncer de mama.^[31]

4.2. Fluorimetría

Se cultivaron 7000 células MCF-7 por pocillo, en una placa de 96 pocillos y se trataron con 0, 50 y 100 ng/mL de leptina (Sigma-Aldrich®) durante 24 h. De esta manera se verifica cual es la mejor concentración de respuesta de la leptina en las células MCF-7. Transcurrido ese tiempo, se incorpora 200 µg/mL de albúmina marcada con el fluorocromo FITC (Sigma-Aldrich®), como control negativo se dejaron pocillos sin albumina-FITC, y se incubó hasta el día siguiente a 37°C al 5% CO₂, el cual será el día de lectura de la fluorescencia. Cinco minutos antes de leer la fluorescencia se añade 1 µg/µL de reactivo Hoechst.

Para realizar la lectura de fluorescencia se retira el medio para eliminar la albúmina-FICT no incorporada, se lava con PBS y se lee la fluorescencia de la albúmina-FITC a una longitud de onda de 490 nm excitación y 519 nm emisión y el Hoechst a 405 nm en el BIO-TEK (Winooski, Vermont, USA).

4.3. Análisis de la captación de albumina-FITC por microscopía confocal

Se coloca un cubre en la base de la placa de cultivo de 60 mm y se siembra las células MCF-7 y se incuban hasta llegar al 60% de confluencia con medio DMEM sin rojo fenol y 1% de antibiótico suplementado con 10% de FBS Charcoal-striped, que provienen del cultivo en mantenimiento. Al día siguiente se inicia el tratamiento con 50 ng/mL de leptina durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo, se procede a la preparación de las células para su análisis en el confocal, para ello se elimina el medio de la placa, se lava con PBS, se añade medio DMEM sin rojo fenol y 1% de antibiótico y se incubó durante 10 minutos a 37°C (de esta forma mejorar la viabilidad de las células durante su análisis). Se añade 200 µg/mL de albúmina durante una hora y en última instancia se añade 10 µg/mL del reactivo Hoechst. Se elimina el

medio, se lava tres veces con PBS, se añade el medio DMEM sin rojo fenol y 1% de antibiótico y se procede a la observación de las células en el microscopio confocal.

La captación de las imágenes se lleva a cabo mediante el software *Leica Application Suite*® que lleva incorporado el microscopio Confocal. Se excita con el láser de 405 nm el Hoechst y el de 488 nm para la albumina-FITC. La emisión del Hoechst se recogió en el rango de 438-472 nm, y la de FITC 510-520 nm. Se captaron 8 campos representativos de cada tratamiento y se analizó la relación FITC/Hoechst así como el número de células positivas mediante inspección visual de cada imagen.

4.4. Citometría de flujo

Las 1×10^6 células MCF-7 fueron sembradas en una placa de 60 mm con medio DMEM sin rojo fenol y 1% de antibiótico suplementado con 10% de FBS Charcoal-stripped. A las 24 h se trataron con 100 ng/mL de leptina y se incubaron por 24 horas más. Una hora antes de la citometría, el medio fue reemplazado por medio sin suero y se añade 200 µg/mL albúmina-FITC y se incubó a 37°C. Transcurrido este tiempo se lava tres veces con PBS y se recogen las células con Tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich®), se colocan las células en los tubos de citómetro, se centrifuga 1600 rpm durante 5 minutos, y se resuspenden en 2 mL de PBS. Las muestras fueron analizadas usando el citómetro de flujo "*Coulter Epics XLMCL*" (Beckman Coulter, Miami, FL, USA) a una longitud de onda de excitación de 497 nm y 515 nm de emisión.

4.5. Determinación proteica: Análisis por Western Blot

Para la preparación de las células para la determinación por Western Blot se parte de un cultivo de células MCF-7 que han sido previamente tratadas o no con leptina, y se recogen las células por tripsinización. Las células recogidas se lisaron con tampón de solubilización (50 mM Tris-Base pH 8,8, 1 mM EDTA, 1% Igepal, 10 mM iodoacetamida, 1 mM PMSF, 1 mM pepstatin en agua bidestilada). Se mantienen en rotación durante una hora a 4°C. Finalmente se vuelve a centrifugar a 15000 rpm durante 30 minutos y el sobrenadante es el que se utilizará para la determinación de proteína total mediante el método del BCA. Para el análisis por Western Blot, 35 µg de proteína del lisado celular fue fraccionada por SDS-PAGE (12% gel de poliacrilamida) y electrotransferida a membranas de nitrocelulosa. Estas membranas fueron incubadas y bloqueadas en una solución de 5% de leche descremada en 20 mM Tris-HCl, 0,13 mM NaCl y 0,1% Tween 20. El anticuerpo primario de BSA (1:1000) y también el anticuerpo primario de SPARC (1:1000) provenientes ambos de Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). Las bandas de la proteína fueron visualizadas por el kit *Immun-Star Western C* (Bio-Rad Laboratories) *Western blotting detection system*. La señal quimioluminiscente fue capturada con el densitómetro *Chemidoc XRS* (Bio-Rad Laboratories) y analizada con el software Quantity One (Bio-Rad Laboratories).

En cuanto al análisis por Western Blot de la SPARC en el medio de cultivo, se concentra la muestra mediante el liofilizador. La liofilización es el proceso en el que se congela la muestra y posteriormente se introduce en una cámara de vacío para realizar la separación del agua

por sublimación. De esta manera se elimina el agua desde el estado sólido al gaseoso del ambiente sin pasar por el estado líquido.

A estas muestra liofilizadas, se le añade tampón de solubilización (50 mM Tris-Base pH 8,8, 1 mM EDTA, 1% Igepal, 10 mM iodoacetamida, 1 mM PMSF, 1 mM pepstatin en agua bidestilada) hasta tener una concentración de 1/20 de las muestras. Tres cantidades diferentes de muestra (10, 20, 30 fueron fraccionadas por SDS-PAGE (12% gel de poliacrilamida) y electrotransferida a membranas de nitrocelulosa. Estas membranas fueron incubadas y bloqueadas en una solución de 5% de leche descremada en 20 mM Tris-HCl, 0,13 mM NaCl y 0,1% Tween 20. El anticuerpo primario de SPARC (1:1000) provenientes ambos de Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). Las bandas de la proteína fueron visualizadas por el mismo kit nombrado con anterioridad.

4.7. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se hicieron con el software *Statistical Program for the Social Sciences* para Windows (SPSS, versión 18.0; SPSS Inc. Chicago, IL). Los datos presentados son la media y error estándar de la media (SEM). Las diferencias estadísticas entre control y tratados con leptina se analizaron por el test T-Student. La significancia estadística fue de $P < 0,05$.

5-Resultados

5.1. Efecto de la leptina en la captación de albúmina por Fluorimetría

Tal como se observa en la **Figura 3**, la concentración óptima para el tratamiento con leptina a 48 horas fue de 100 ng/mL. Por otra parte se observa que a 50 ng/mL la respuesta no es la esperada, es más parece ser que hay una disminución de la fluorescencia de la albúmina a esta concentración. Se estableció la concentración del tratamiento óptima con leptina a 100 ng/mL para las futuras determinaciones.

Pese a que los resultados no son significativos, se observa una fuerte tendencia a que en una concentración de 100 ng/mL hay una mayor captación de albúmina por parte de las células MCF-7 con respecto al control.

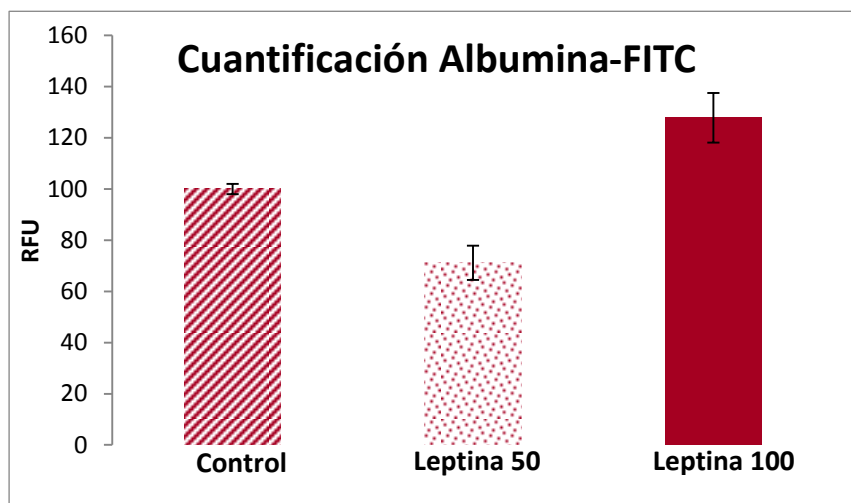


Figura 3. Cuantificación de fluorescencia de Albumina-FITC corregido por Hoechst. Se sometieron a las células MCF-7 a diferentes concentraciones del tratamiento con leptina (50 ng/mL y 100 ng/mL) durante 48h y la albúmina-FITC durante 24h.

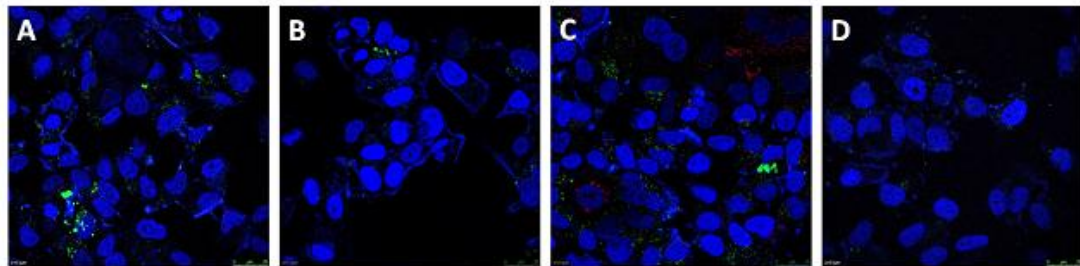
5.2. Análisis de la captación de albumina-FITC por microscopía confocal

Una vez establecida la concentración óptima para el tratamiento de leptina (100 ng/mL), se procedió al análisis del confocal para tener unos resultados más visibles del efecto de la leptina sobre la captación de albúmina por parte de las células MCF-7.

Al principio mantuvimos las mismas condiciones experimentales que en el experimento de fluorimetría, no obstante, no se observaba la albumina-FITC en las células. Debido a posibles diferencias de sensibilidad entre una técnica y la otra, hicimos una búsqueda bibliográfica de métodos para mirar captación de albumina-FITC mediante microscopía confocal. Esto nos permitió adaptar el método y poder obtener células que presentaban un marcaje albumina-FITC positivo, no obstante, como se puede apreciar en las imágenes (**Fig.4**), las células que mostraban captación eran una minoría en cada campo.

Las adaptaciones metodológicas consistieron básicamente en eliminar el suero para evitar competencia de la albumina no marcada y añadir la albumina marcada solo 1 hora antes del ensayo.

CONTROL



LEPTINA

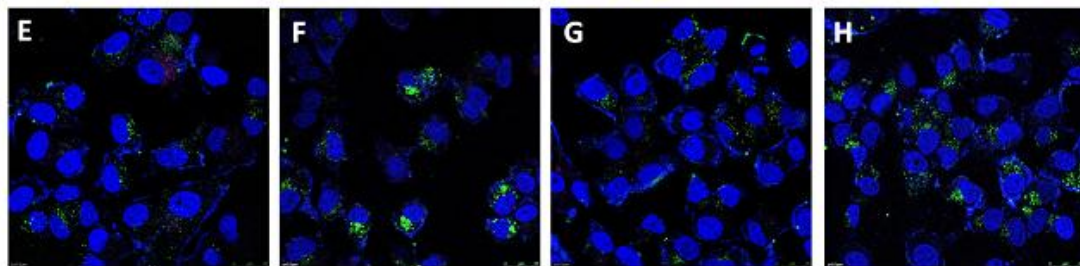


Figura 4. Imágenes de las células MCF-7 mediante microscopía confocal. A, B, C y D corresponden con el control (sin leptina). E, F, G y H corresponden con el tratamiento con 100 ng/mL de leptina. La fluorescencia azul corresponde a los núcleos que se han teñido con el reactivo Hoechst y la albúmina-FITC se corresponde con la fluorescencia verde.

La albúmina-FITC cuando se internaliza aparece de forma localizada en el citoplasma celular (**Fig.5**), indicando que es ávidamente incorporada y seguramente será utilizada como nutriente en la célula cancerígena de cáncer de mama, aunque hay pocas células positivas.

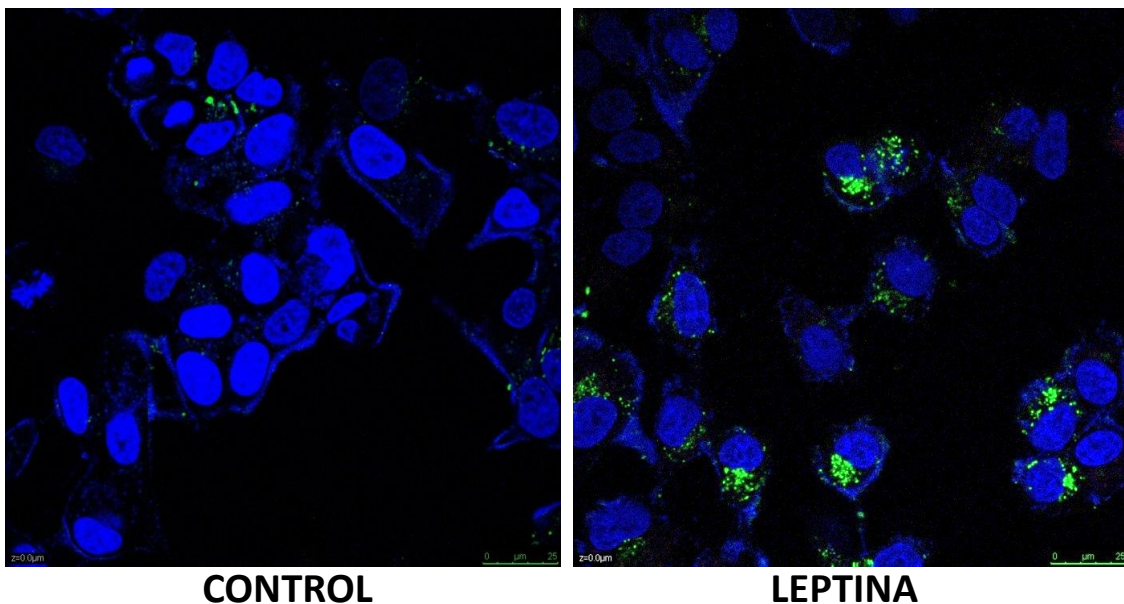


Figura 5. Imagen en detalle de las células MCF-7 mediante microscopía confocal. Imagen en detalle de la Figura 4 (B, F).

La captación de albúmina aparentemente es mayor con la leptina (**Fig.6, izq.**), cabe destacar que la determinación de la fluorescencia está corregida por la fluorescencia del reactivo Hoechst por lo que en la determinación se tiene en cuenta la cantidad de células para evitar el efecto proliferativo de la leptina en las células de cáncer de mama.

Se decide repetir esta determinación ya que pese a haber una mayor captación de albúmina no podemos estar seguros de ello debido al error estadístico producido (**Fig.6, der.**) y tal como se observa, en este caso podemos observar que no se ven diferencias entre el control y las tratadas con 100 ng/mL de leptina, por tanto no podemos afirmar que haya una mayor captación de albúmina por parte de las células MCF-7 tratadas con leptina.

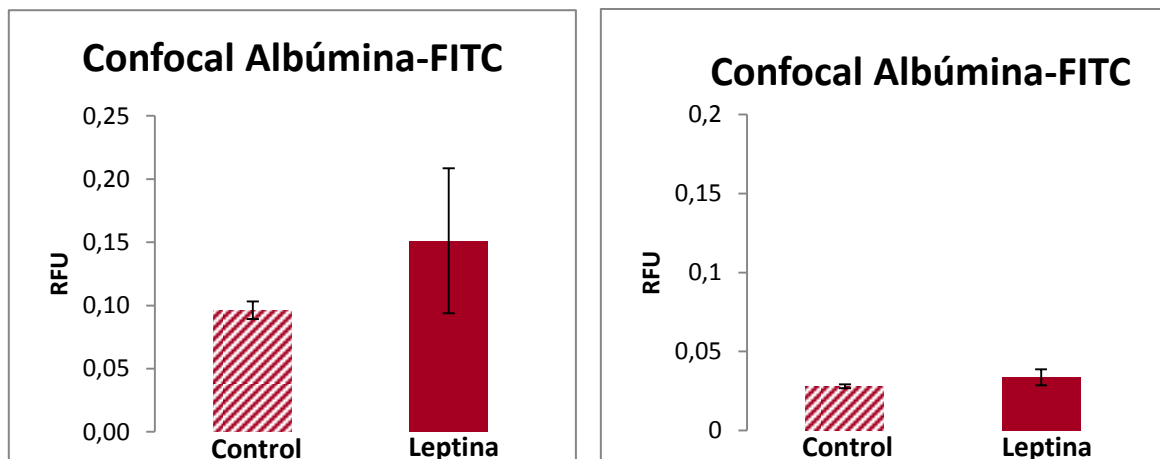


Figura 6. Cuantificación de fluorescencia de la albúmina por microscopía confocal. Tratamiento con 100 ng/mL de leptina durante 48 horas.

5.3. Efecto de la leptina en la captación de albúmina por Citometría de flujo

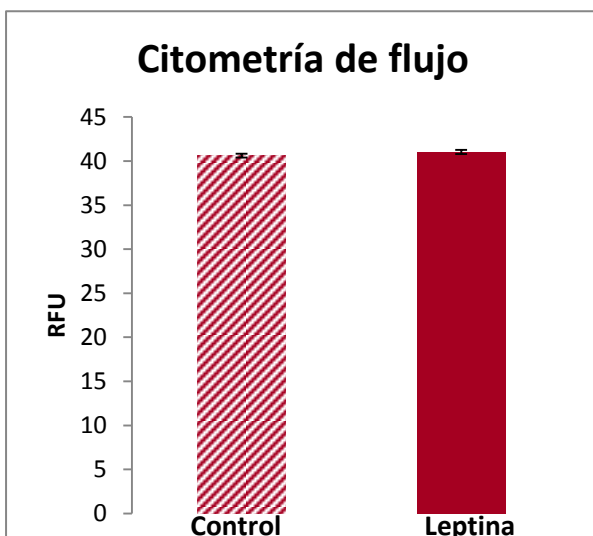


Figura 7. Determinación de Albúmina-FITC mediante Citometría de flujo.

Teniendo en cuenta el bajo número de células que se analizan mediante la microscopía confocal, decidimos analizar las células mediante Citometría de flujo que permite el análisis individual de miles de células. Además, el Citómetro de flujo dará un resultado más acurado puesto que corrige la fluorescencia por número de células o eventos y no por fluorescencia del Hoechst, la cual puede ser variable también entre células (fase del ciclo, plano confocal, artefactos) vista en resultados anteriores (Fluorimetría y microscopía de confocal).

Tal como se aprecia en la **Fig. 7** no hay diferencias significativas entre la situación control y el tratamiento con 100 ng/mL de leptina. Por tanto, los resultados no permiten validar la hipótesis de partida de que la leptina induzca la captación de albumina.

5.4. Determinación y cuantificación de albúmina sérica y SPARC (de las células y el medio)

Para descartar que la posible falta de efecto de la leptina estuviese relacionada con problemas para captar la albumina-FITC, es decir, que la presencia del fluoróforo en la estructura de la proteína pudiese suponer un impedimento para su captación, se realizó la determinación de albúmina mediante Western-Blot en células MCF-7 tratadas durante 24 horas con 100 ng/mL de leptina.

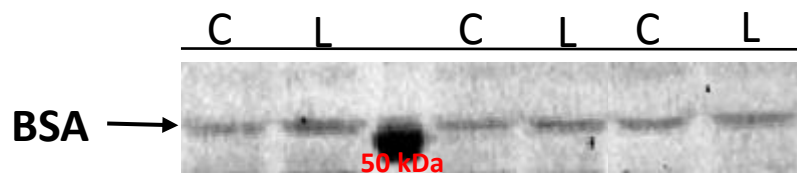


Figura 8. Análisis de la presencia de albúmina sérica en las células MCF-7. La proteína BSA tiene un peso de 67kDa.

En la **Fig.8** se representa el Western Blot de la albúmina, aparentemente no hay cambios entre el tratamiento control y el de 100 ng/mL de leptina. Pero sí que se aprecia un leve aumento de la presencia de albúmina con el tratamiento de leptina, mediante la cuantificación de la imagen se puede observar con más precisión esta valoración.

En la cuantificación (**Fig.10, A**), parece ser que hay un aumento de la captación de albúmina en las células MCF-7 debido al tratamiento con leptina pese a que los resultados no fueron estadísticamente significativos.

En cuanto a la determinación de SPARC mediante Western Blot (**Fig.9**) se realiza en paralelo a la albúmina sérica ya que tal como se ha explicado en la introducción la SPARC juega un papel importante en el mecanismo de transporte de la albúmina en las células tumorales. Aunque en este caso no se observan diferencias entre las células control y las tratadas con leptina. Ni en la determinación de SPARC celular ni SPARC del medio celular.

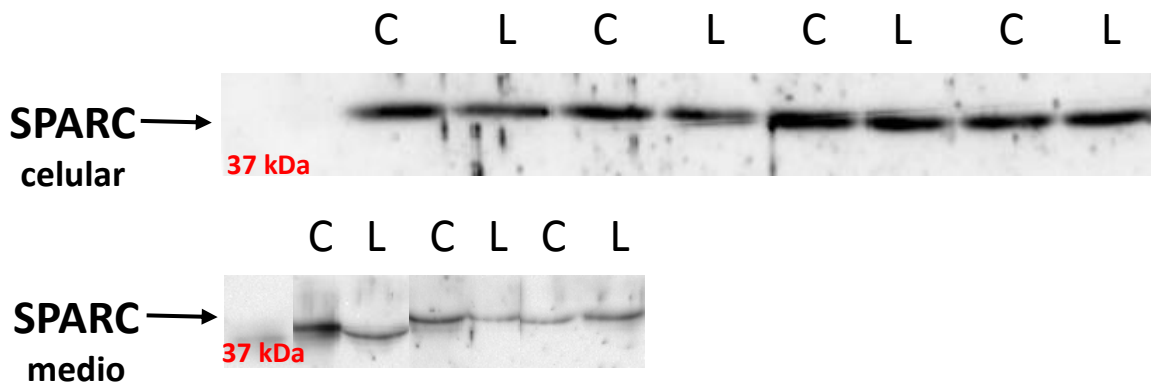


Figura 9. Análisis de la presencia de SPARC en las células MCF-7 y en el medio de cultivo. La proteína SPARC tiene un peso de 43 kDa.

En cuanto a la cuantificación de la SPARC (**Fig.10, B, C**) no parece que haya un aumento de SPARC en las células MCF-7. Por lo que son resultados no concluyentes.

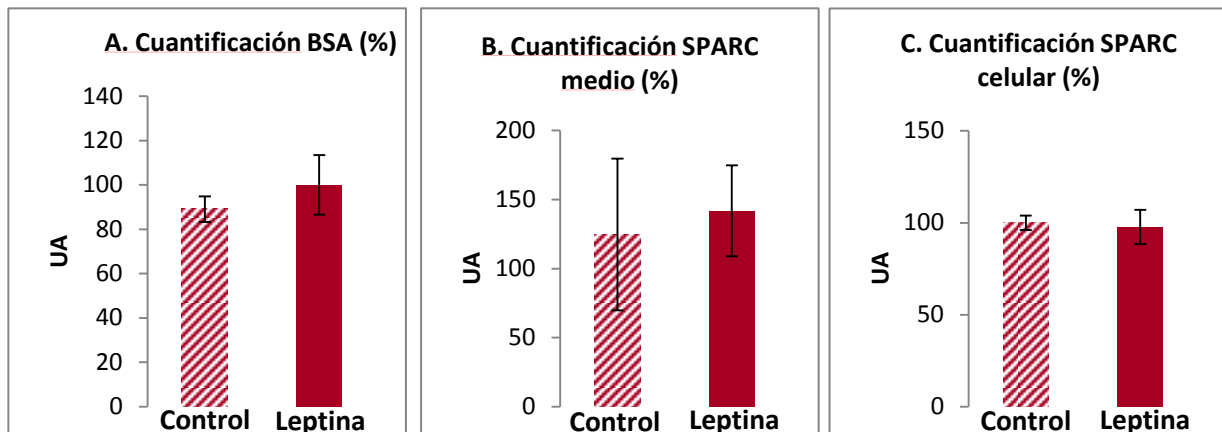


Figura 10. Cuantificación de BSA y SPARC celular y en el medio (%) en las células MCF-7.

5.5 Análisis de la captación de AHSG marcada

El análisis de la captación de AHSG por parte de las células MCF-7 se realizó en paralelo a los experimentos con la albúmina. Al tratarse de una proteína menos común que la albúmina comercialmente no se encontraba disponible ya marcada con un fluoróforo. Por tanto, utilizamos el Kit *DyLight Microscale Antibody Labeling* (Thermo Scientific) para marcar esta proteína. Hubo una serie de problemas para conseguir una cantidad suficiente de proteína marcada por lo que no se pudo realizar el ensayo de captación. Se requiere una mayor optimización de los resultados, no obstante también se realizaron ensayos por Western Blot para intentar probar que las células MCF-7 captaban esta proteína, pero tampoco se pudo validar esta hipótesis.

6-Discusión

Este estudio se basaba en corroborar los resultados previos observados en el estudio de proteómica ^[12], donde un tratamiento de 50 ng/mL de leptina aumentaba significativamente la captación de albúmina y AHSG. Por lo que se intentaba relacionar esta captación con una mayor demanda metabólica de las células tumorales, y utilizar este mecanismo como una trampa para el tumor y en lugar de transportar nutrientes, transportar fármacos específicos para su completa eliminación.

Otros estudios afirman que la leptina induce la secreción de SPARC ^[24] en el tejido adiposo blanco, y sabiendo que la SPARC participa activamente en el mecanismo de transporte de la albúmina hacia los tejidos, y que hay una sobreexpresión de la misma en diversos tumores, entre ellos en cáncer de mama ^[23] se puede presumir que la leptina puede inducir la captación de proteínas séricas en el cáncer. Considerando que la albúmina se utiliza como estrategia en fármacos contra el cáncer ^[16], más específicamente el Abraxane® que ha conjugado la albúmina con el paclitaxel en nanopartículas, aprovechando el mecanismo de endocitosis de la albúmina, con lo que consigue llegar al tejido tumoral a través de la sangre ^{[27] [28] [30]}, se consideró importante evaluar si la leptina es capaz de inducir la captación de la proteínas séricas como la albúmina o la AHSG (forma fetal de la albúmina).

Los resultados iniciales de la fluorimetría mostraron una cierta tendencia a que con 100 ng/mL de leptina se induce la captación de albúmina (**Fig.3**), fue sorprendente que a dosis de 50 ng/mL no se observara esta captación ya que fueron las condiciones utilizadas en los estudios de proteómica ^[12]. El ensayo de fluorimetría tiene limitaciones importantes (marcaje de los núcleos, fluorescencia residual) por las que se decidió utilizar un método que nos permita comprobar esta captación de forma más visual, mediante el microscopio confocal.

Al principio se tuvo problemas para observar células positivas (que habían incorporado la albúmina de forma localizada), por lo que se procedió a eliminar todo el suero y tratar con 200 µg/mL de albúmina-FITC durante una hora para su observación tal como había especificado un estudio, donde se encontraron los mismos problemas a la hora de la visualización de células positivas ^[32]. De esta forma conseguimos ver más células positivas en el campo, aunque realmente fueron una pequeña parte las que resultaron positivas (**Fig.5**).

Este ensayo parecía que había una mayor captación de albúmina pero no fue reproducible puesto que el número de células positivas fue bajo, por lo que se recurrió a una técnica que analiza un mayor número de células, la Citometría de flujo que es capaz de analizar 10⁴ células en cada tratamiento).

Los resultados no mostraron diferencias significativas (**Fig.7**). Teniendo en cuenta que la presencia del fluoróforo podría afectar de alguna forma a la dinámica de captación de albúmina, tal y como habían descrito en un estudio anterior ^[33]. Concretamente en este estudio, concluían que el mecanismo de transporte en presencia de FITC en la línea celular

epitelial RLE-6TB, tenía menos afinidad para el receptor de albúmina y posiblemente el transporte estaba mediado por una macropinocitosis, además que una vez incorporada parte de la albúmina-FITC era degradada gradualmente por los lisosomas.

Teniendo en cuenta estos precedentes, se decidió analizar la captación de albúmina por Western Blot donde la albúmina no se encuentra marcada. Tal como se observa en la **Fig.8** esta determinación nos permite observar cierta tendencia pero no fue estadísticamente significativa, por lo que tampoco permitió confirmar la hipótesis inicial. De la misma manera el Western Blot de la SPARC que se encuentra implicada en el mecanismo de captación de la albúmina no se observaron resultados concluyentes ni en el interior celular ni en el medio de cultivo (**Fig.9**).

Por otra parte, se describió que la leptina es inestable cuando se encuentra libre en el medio de cultivo mientras que en los seres vivos se estabiliza por la forma secretada del receptor que le confiere cierta protección a la degradación ^[34]. Esto podría contribuir también a que los experimentos presenten problemas de reproducibilidad dependiendo de factores variables como puede ser, por ejemplo, el lote del suero.

Una forma de solventar los problemas padecidos en los experimentos, sería volver a emular las condiciones utilizadas en el estudio de proteómica ^[12] donde se utilizaba un tratamiento de 50 ng/mL de leptina y utilizando el suero completo. No se realizaron de esta forma desde un principio ya que habían dudas razonables sobre el efecto de la leptina, ya que se observó que en medio completo los ensayos de proliferación eran bajos ya que los estrógenos podrían estar enmascarando el efecto de la leptina, en cambio con el medio libre de estrógenos había más proliferación con leptina respecto a las células control.

Se ha de tener en cuenta que cualquier hormona que puede potenciar de manera selectiva la efectividad de un fármaco, en este caso, fármacos que utilicen como vehículo proteínas séricas, son altamente interesantes para la generación de nuevas estrategias terapéuticas (Abraxane©) ^[16]. Por este motivo se realizarán un mayor número de experimentos ampliando las condiciones de estudio antes de descartar totalmente la hipótesis inicial.

7-Referencias

- ^[1] https://www.aecc.es/cancermama_incidencia
- ^[2] HARTZ, A.J. and HE, T., 2013. Cohort study of risk factors for breast cancer in post-menopausal women *Epidemiology and health*, **35**, pp. e2013003.
- ^[3] HARVIE, M., HOOPER, L. and HOWELL, A.H., 2003. Central obesity and breast cancer risk: a systematic review *Obesity reviews: an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, **4**(3), pp. 157-173.
- ^[4] PROTANI, M., COORY, M. and MARTIN, J.H., 2010. Effect of obesity on survival of women with breast cancer: systematic review and meta-analysis *Breast cancer research and treatment*, **123**(3), pp. 627-635.
- ^[5] WANG, Y.Y., LEHUEDE, C., LAURENT, V., DIRAT, B., DAUVILLIER, S., BOCHET, L., LE GONIDEC, S., ESCOURROU, G., VALET, P. and MULLER, C., 2012. Adipose tissue and breast epithelial cells: a dangerous dynamic duo in breast cancer *Cancer letters*, **324**(2), pp. 142-151.
- ^[6] DIEUDONNE, M.N., MACHINAL-QUELIN, F., SERAZIN-LEROY, V., LENEVEU, M.C., PECQUERY, R. and GIUDICELLI, Y., 2002. Leptin mediates a proliferative response in human MCF7 breast cancer cells *Biochemical and biophysical research communications*, **293**(1), pp. 622-628.
- ^[7] SCHERER, T. and BUETTNER, C., 2011. Yin and Yang of hypothalamic insulin and leptin signaling in regulating white adipose tissue metabolism *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, **12**(3), pp. 235-243.
- ^[8] NALABOLU, M.R., PALASAMUDRAM, K. and JAMIL, K., 2014. Adiponectin and Leptin Molecular Actions and Clinical Significance in Breast Cancer *International journal of hematology-oncology and stem cell research*, **8**(1), pp. 31-40.
- ^[9] PERERA, C.N., CHIN, H.G., DURU, N. and CAMARILLO, I.G., 2008. Leptin-regulated gene expression in MCF-7 breast cancer cells: mechanistic insights into leptin-regulated mammary tumor growth and progression *The Journal of endocrinology*, **199**(2), pp. 221-233.
- ^[10] JARDE, T., PERRIER, S., VASSON, M.P. and CALDEFIE-CHEZET, F., 2011. Molecular mechanisms of leptin and adiponectin in breast cancer *European journal of cancer (Oxford, England: 1990)*, **47**(1), pp. 33-43.
- ^[11] MARGETIC, S., GAZZOLA, C., PEGG, G.G. and HILL, R.A., 2002. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions *International journal of obesity and related metabolic disorders: journal of the International Association for the Study of Obesity*, **26**(11), pp. 1407-1433.
- ^[12] VALLE, A., SASTRE-SERRA, J., POL, C., MIRO, A.M., OLIVER, J. and ROCA, P., 2011. Proteomic analysis of MCF-7 breast cancer cell line exposed to leptin *Analytical cellular pathology (Amsterdam)*, **34**(3), pp. 147-157.
- ^[13] STEHLE, G., SINN, H., WUNDER, A., SCHRENK, H.H., STEWART, J.C., HARTUNG, G., MAIER-BORST, W. and HEENE, D.L., 1997. Plasma protein (albumin) catabolism by the tumor itself--implications for tumor metabolism and the genesis of cachexia *Critical reviews in oncology/hematology*, **26**(2), pp. 77-100.
- ^[14] SCHAUB, N.P., JONES, K.J., NYALWIDHE, J.O., CAZARES, L.H., KARBASSI, I.D., SEMMES, O.J., FELIBERTI, E.C., PERRY, R.R. and DRAKE, R.R., 2009. Serum proteomic biomarker discovery reflective of stage and obesity in breast cancer patients *Journal of the American College of Surgeons*, **208**(5), pp. 970-8; discussion 978-80.
- ^[15] DAYE, D. and WELLEN, K.E., 2012. Metabolic reprogramming in cancer: unraveling the role of glutamine in tumorigenesis *Seminars in cell & developmental biology*, **23**(4), pp. 362-369.

- [16] ELSADEK, B. and KRATZ, F., 2012. Impact of albumin on drug delivery--new applications on the horizon *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, **157**(1), pp. 4-28.
- [17] VOGEL, S.M., MINSHALL, R.D., PILIPOVIC, M., TIRUPPATHI, C. and MALIK, A.B., 2001. Albumin uptake and transcytosis in endothelial cells in vivo induced by albumin-binding protein *American journal of physiology.Lung cellular and molecular physiology*, **281**(6), pp. L1512-22.
- [18] JOHN, T.A., VOGEL, S.M., TIRUPPATHI, C., MALIK, A.B. and MINSHALL, R.D., 2003. Quantitative analysis of albumin uptake and transport in the rat microvessel endothelial monolayer *American journal of physiology.Lung cellular and molecular physiology*, **284**(1), pp. L187-96.
- [19] MINSHALL, R.D., TIRUPPATHI, C., VOGEL, S.M. and MALIK, A.B., 2002. Vesicle formation and trafficking in endothelial cells and regulation of endothelial barrier function *Histochemistry and cell biology*, **117**(2), pp. 105-112.
- [20] CARVER, L.A. and SCHNITZER, J.E., 2003. Caveolae: mining little caves for new cancer targets *Nature reviews.Cancer*, **3**(8), pp. 571-581.
- [21] SPARC secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin) [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6678>
- [22] WATKINS, G., DOUGLAS-JONES, A., BRYCE, R., MANSEL, R.E. and JIANG, W.G., 2005. Increased levels of SPARC (osteonectin) in human breast cancer tissues and its association with clinical outcomes *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*, **72**(4), pp. 267-272.
- [23] BRIGGS, J., CHAMBOREDON, S., CASTELLAZZI, M., KERRY, J.A. and BOS, T.J., 2002. Transcriptional upregulation of SPARC, in response to c-Jun overexpression, contributes to increased motility and invasion of MCF7 breast cancer cells *Oncogene*, **21**(46), pp. 7077-7091.
- [24] KOS, K., WONG, S., TAN, B., GUMMESSON, A., JERNAS, M., FRANCK, N., KERRIGAN, D., NYSTROM, F.H., CARLSSON, L.M., RANDEVA, H.S., PINKNEY, J.H. and WILDING, J.P., 2009. Regulation of the fibrosis and angiogenesis promoter SPARC/osteonectin in human adipose tissue by weight change, leptin, insulin, and glucose *Diabetes*, **58**(8), pp. 1780-1788
- [25] SAKWE, A.M., KOUMANGOYE, R., GOODWIN, S.J. and OCHIENG, J., 2010. Fetuin-A (α 2HS-glycoprotein) is a major serum adhesive protein that mediates growth signaling in breast tumor cells *The Journal of biological chemistry*, **285**(53), pp. 41827-41835.
- [26] YI, J.K., CHANG, J.W., HAN, W., LEE, J.W., KO, E., KIM, D.H., BAE, J.Y., YU, J., LEE, C., YU, M.H. and NOH, D.Y., 2009. Autoantibody to tumor antigen, alpha 2-HS glycoprotein: a novel biomarker of breast cancer screening and diagnosis *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, **18**(5), pp. 1357-1364.
- [27] GRADISHAR, W.J., 2006. Albumin-bound paclitaxel: a next-generation taxane *Expert opinion on pharmacotherapy*, **7**(8), pp. 1041-1053.
- [28] MIELE, E., SPINELLI, G.P., MIELE, E., TOMAO, F. and TOMAO, S., 2009. Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane ABI-007) in the treatment of breast cancer *International journal of nanomedicine*, **4**, pp. 99-105.

- [29] CAMPOS, F.C., VICTORINO, V.J., MARTINS-PINGE, M.C., CECCHINI, A.L., PANIS, C. and CECCHINI, R., 2014. Systemic toxicity induced by paclitaxel in vivo is associated with the solvent cremophor EL through oxidative stress-driven mechanisms *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, **68**, pp. 78-8.
- [30] KUDLOWITZ, D. and MUGGIA, F., 2014. Nanoparticle albumin-bound paclitaxel (nab-paclitaxel): extending its indications *Expert opinion on drug safety*, **13**(6), pp. 681-685.
- [31] WELSHONS, W.V., GRADY, L.H., ENGLER, K.S. and JUDY, B.M., 1992. Control of proliferation of MCF-7 breast cancer cells in a commercial preparation of charcoal-stripped adult bovine serum *Breast cancer research and treatment*, **23**(1-2), pp. 97-104.
- [32] YUMOTO, R., NISHIKAWA, H., OKAMOTO, M., KATAYAMA, H., NAGAI, J. and TAKANO, M., 2006. Clathrin-mediated endocytosis of FITC-albumin in alveolar type II epithelial cell line RLE-6TN *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, **290**(5), pp. L946-55.
- [33] TAGAWA, M., YUMOTO, R., ODA, K., NAGAI, J. and TAKANO, M., 2008. Low-affinity transport of FITC-albumin in alveolar type II epithelial cell line RLE-6TN *Drug metabolism and pharmacokinetics*, **23**(5), pp. 318-327.
- [34] ANDO, S. and CATALANO, S., 2011. The multifactorial role of leptin in driving the breast cancer microenvironment *Nature reviews. Endocrinology*, **8**(5), pp. 263-275.