



Universitat
de les Illes Balears

TESI DOCTORAL

**EFFECTE MODULADOR DE LA LEPTINA I POLIFENOLS EN LA
FUNCIÓ MITOCONDRIAL I METABOLISME DE LA CÈL·LULA
TUMORAL**

M^a del Mar Blanquer Rosselló

2016



Universitat
de les Illes Balears

TESI DOCTORAL

**EFFECTE MODULADOR DE LA LEPTINA I POLIFENOLS EN LA
FUNCIÓ MITOCONDRIAL I METABOLISME DE LA CÈL·LULA
TUMORAL**

M^a del Mar Blanquer Rosselló

2016

Programa Oficial de Doctorat en Nutrició Humana

Directors: Dra. M^a del Pilar Roca Salom i Dr. Adamo Valle Gómez

Doctora per la Universitat de les Illes Balears

Amb el vistiplau dels directors

Dra. M^a del Pilar Roca Salom

Catedràtica d'Universitat

Dr. Adamo Valle Gómez

Professor Contractat Doctor

Àrea de Bioquímica i Biologia Molecular
Dept. Biologia Fonamental i Ciències de la Salut

La interessada

M^a del Mar Blanquer Rosselló



Universitat
de les Illes Balears

Dr. M^a del Pilar Roca Salom, de la Universitat de les Illes Balears

DECLARO:

Que la tesi doctoral que porta per títol *Efecte modulador de la leptina i polifenols en la funció mitocondrial i metabolisme de la cèl·lula tumoral*, presentada per M^a del Mar Blanquer Rosselló per a l'obtenció del títol de doctora, ha estat dirigida sota la meva supervisió i que compleix amb els requisits necessaris per optar al títol de Doctora Europea.

I per tal que quedi constància d'això, signo aquest document.

Firma

Palma de Mallorca, 19 d'octubre de 2016.



Universitat
de les Illes Balears

Dr. Adamo Valle Gómez, de la Universitat de les Illes Balears

DECLARO:

Que la tesi doctoral que porta per títol *Efecte modulador de la leptina i polifenols en la funció mitocondrial i metabolisme de la cèl·lula tumoral*, presentada per M^a del Mar Blanquer Rosselló per a l'obtenció del títol de doctora, ha estat dirigida sota la meva supervisió i que compleix amb els requisits necessaris per optar al títol de Doctora Europea.

I per tal que quedi constància d'això, signo aquest document.

Firma

Palma de Mallorca, 19 d'octubre de 2016.

**Als meus pares,
a la meva germana,
als amics**

Una experiència mai és un fracàs,
doncs sempre ve a demostrar alguna cosa

Thomas Alva Edison

AGRAÏMENTS

La consciència humana és limitada, així com la capacitat de recordar. Per això, agrair tot el que he rebut de les persones que m'han acompanyat durant aquests cinc anys es converteix en una feina complexa. Podria dir gràcies per tots els moments compartits en els quals les rialles, confidències i plorades hi han tingut cabuda. Podria dir gràcies per, tot i tenir maneres molt diferents d'entendre i afrontar les situacions del dia a dia, haver aportat el millor de cada un de vosaltres. Podria dir gràcies i ho dic, però, així i tot, aquesta paraula no arriba a fer justícia.

En primer lloc agrair als meus directors de tesi, la Dra. Pilar Roca i el Dr. Adamo Valle, l'ajuda inestimable e imprescindible per a la presentació d'aquest treball. Moltes gràcies Pilar per la teva visió simplista de situacions aparentment complicades i per estar sempre disposa a dissenyar nous projectes per seguir investigant. Adamo, moltes gràcies pel temps que m'has dedicat en aquests anys així com per les conversacions *de todo un poco*, tan necessàries per veure les situacions en perspectiva. També vull donar les gràcies al Dr. Jordi Oliver, que ha estat com un tercer director en la darrera etapa de feina i del qual he rebut ajuda incondicional.

Voldria agrair també a la resta de professors del grup amb els quals he compartit el dia a dia, Magdalena, Paco, Ana i Bel, que sempre amb simpatia i bones converses han amenitzat els dinars així com també han donat un cop de mà sempre que ho he necessitat. A la professora Ileana Martínez, que sempre és una sort conèixer persones amb una sensibilitat especial, gràcies.

Thanks to Dr. Pablo Rodríguez Viciana for giving me the opportunity to work in his magnificent group and for his support during my stay at University College London. Gracias por tu simpatía a la hora de acogerme y por la amabilidad en momentos en que el trabajo se acumulaba. Special thanks to my colleagues and friends of UCL, Greg, Lucy and my dear Nicole. You know that you are good guys, I wish you the best. You are definitively my cup of tea!

Sense els companys i amics de laboratori, el treball resultant hauria estat molt menys satisfactori a nivell personal, sense dubte. Moltes gràcies per donar el millor de vosaltres a la feina, no hauria pogut imaginar millor companyia en el procés de realitzar aquesta tesi. No soc capaç d'expressar amb paraules el meu enorme agraïment cap als companys GMOT que em van donar la benvinguda al laboratori i que ja no s'hi troben presents. Jordi, Mercedes i Dani, en els meus inicis (i no tan inicis) em vaig sentir segura en tot moment gràcies a que sabia que si necessitava alguna cosa vosaltres serieu allà. Jordi, ets un crack en molts de sentits, els moments de rialles que hem compartit amb tu simplement no tenen preu; Mercedes, no podries ser més optimista i alegre i això fa que treballar devora sigui un autèntic luxe, moltes gràcies per ajudar sempre i saber escoltar quan fa falta; Dani, ets capaç d'iniciar una conversació profunda d'un simple fet absurd, simplement ets un *jefazo*, a banda d'un gran... amic! Gràcies per estar sempre allà de forma incondicional i per estar disposat a ajudar amb una rialla perenne. Passant al grup GMEIN, Gabriela, una de les dones més carismàtiques i intel·ligents que he conegut, gràcies pels consells pràctics a l'hora de fer la feina bé. Miquel, saps que des que me vas ajudar amb "l'accident" del tanc de nitrogen te consider molt agut, jo de tu aniria alerta pel carrer... Ara fora conya, ets una de les persones més treballadores i generoses que he tingut el plaer de topar-me. Marcos... les converses sobre com hauria de ser el món per acostar-se a la perfecció em van amenitzar molts moments de feina, saps que vas per bon camí, ets un exemple de paciència i constància a seguir. Bel, en aquests 10 anys que fa que ens coneixem he après més de jo mateixa del que em podria haver imaginat, gràcies; ah! i per sabre moure la gent quan de festa se tracta, així com per trobar la part enginyosa de les situacions del dia a dia. Melanie, encara no nos hem pogut conèixer molt però em transmet molta bondat i paciència, et desig el millor en aquesta carrera investigadora que estàs iniciant. Agustí, ets un treballador incansable a banda d'un tertulià molt entretingut i extremadament simpàtic, sort en el camí de la tesi doctoral! *Los temibles* NUCOX... Miquelot, res del que pugui dir de tu te faria justícia, saps que romps tots els esquemes, a vegades he pensat que simplement no ets d'aquest planeta. Carla! La simpatia en persona, un tresor haver-te conegut i poder amenitzar els moments *tontos* amb tu. Xavi, saps que t'aprecio molt encara que nos estirem des monyo cada dos per tres, qui te sa coa de palla aviat s'encén sols dir! Gràcies per estar

sempre disposat a ajudar. Per acabar, torn de nou als GMOTs, però ara actuals... que no sé què hagués fet sense ells en els darrers moments d'aquest camí! Lida, gràcies per estar allà quan he necessitat una mà i per les converses compartides conspirant contra el món. Els darrers agraïments són per en Reyniel, ets simplement encantador i saps com crear un bon ambient de companyerisme, gràcies per això.

Dins aquests agraïments voldria incloure també els amics que res tenen a veure amb el món de la ciència. Aquells que sé que sempre són allà per escoltar qualsevol història que pugui sorgir i que em sent molt afortunada de tenir. A la meva pandilla *Okitetus luxury*, que som particulars tal qual som, si algú intenta entendre'ns tanmateix no podrà perquè ja sabem que la nostra exclusivitat no està a l'abast de tothom. Per totes les vegades que m'heu demanat a veure com estan les cèl·lules i llavors heu rigut conscients de que no sabíeu què estàveu demanant i que no entendríeu la meua resposta. Okis, sou la meua escapatòria als drames de la vida, gràcies. Vull mencionar també a una persona molt important que ha estat devora jo durant molts d'anys cultivant una bona amistat; Maria, ja saps que t'estimo tot i que a vegades he abusat de la teua gran capacitat d'escoltar, ets font d'inspiració, de valentia, d'alegria i sobretot..., sobretot... amb tu he viscut els millors moments de festa!

En darrer lloc i de forma un tant especial, voldria donar les gràcies a aquelles persones que des que he nascut han estat allà de forma incondicional. Mamà i papà, sabem que a hores d'ara no teniu molt clar què he estat fent durant aquests 5 anys. No passa res, jo vos ho perdono així com vosaltres m'heu perdonat el mal humor quan la feina no anava com hauria volgut. I a tu, germaneta petita, *loquilla*, valenta, tia exemplar... has estat un motor important en els moments més baixos i saps que no puc prescindir de tu. Gràcies per recordar-me que al final tot té un sentit.

Ah! I gràcies a l'ésser viu que ha seguit de ben aprop el procés d'escriptura d'aquesta tesi... la meua cussa, na puceta.

Gràcies a tots,

M^a del Mar

Aquesta tesi doctoral s'ha dut a terme en el Grup Multidisciplinar d'Oncologia Traslacional (GMOT) del Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut de la Universitat de les Illes Balears. Aquest grup d'investigació és membre de l'Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut (IUNiCS) i de l'Institut d'Investigació Sanitària de Palma (IdISPa). Aquest treball ha estat possible gràcies als projectes d'investigació finançats pel *Fondo de Investigaciones Sanitarias del Instituto de Salud Carlos III* del Govern d'Espanya (PI12/01827 i PI14/01434) així com a les ajudes de la Comunitat Autònoma de les Illes Balears (CAIB) cofinançades amb fons FEDER "*Una manera de hacer Europa*" (31/2011 i AAEE22/2014). A més, s'ha comptat també amb el finançament del *Centro de Investigaciones Biomédicas en Red de Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición* (Ciberobn, CBo6/03) del *Instituto de Salud Carlos III*. El doctorant ha disposat d'una beca predoctoral concedida pel Ministeri d'Educació Cultura i Deport del Govern d'Espanya.



Invertim en el seu futur



Unió Europea
Fons Social Europeu



ÍNDEX

SIGLES I ACRÒNIMS	I
LLISTAT DE PUBLICACIONS	III
COMPENDI D'ARTICLES	V
RESUM	VII
RESUMEN.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. Epidemiologia i etiologia del càncer de mama	3
1.2. Epidemiologia i etiologia del càncer de colon	4
1.3. Funció mitocondrial	5
1.3.1. Producció d'espècies reactives d'oxigen	6
1.3.2. Genoma mitocondrial.....	8
1.3.3. Biogènesi mitocondrial: proliferació i diferenciació	9
1.3.4. Dinàmica mitocondrial	12
1.4. Metabolisme del càncer	13
1.4.1. Captació de glucosa i aminoàcids desregulada	14
1.4.2. Reprogramació de les vies metabòliques	15
1.4.3. Alteracions en la regulació gènica	18
1.4.4. El metabolisme cancerós com a diana terapèutica.....	18
1.5. Càncer de mama. Leptina i obesitat	19
1.5.1. Leptina	19
1.5.2. Leptina i càncer de mama	20
1.6. Polifenols.....	21
1.6.1. Polifenols i càncer.....	22
1.6.2. Paper de les sirtuïnes en el càncer. Polifenols.....	23
1.6.3. Xantohumol, 8-prenilnaringenina i càncer de mama	24
1.6.4. Resveratrol i càncer de colon.....	24
2. OBJECTIUS I PLANTEJAMENT EXPERIMENTAL	27

3. MATERIALS I MÈTODES.....	35
3.1. Cultius cel·lulars.....	37
3.1.1. Característiques de les línies cel·lulars MCF-7 i SW620	37
3.1.2. Procediments generals de cultius: manteniment i subcultiu.....	37
3.1.3. Tractaments	38
3.2. Metodologia de les determinacions realitzades	38
3.2.1. Anàlisi de la viabilitat cel·lular.....	38
3.2.2. Determinació dels nivells i la producció de ROS	39
3.2.3. Determinació de la concentració de proteïnes	40
3.2.4. Determinació semiquantitativa dels nivells de proteïna per <i>Western blot</i>	40
3.2.4.1. Recollida de les mostres	40
3.2.4.2. Preparació de les mostres	41
3.2.4.3. Electroforesi SDS-PAGE.....	41
3.2.4.4. Electrotransferència humida	41
3.2.4.5. Immunodetecció	42
3.2.5. Quantificació de les proteïnes carbonilades	42
3.2.6. Anàlisi de les activitats enzimàtiques	42
3.2.6.1. Determinació de l'activitat catalasa.....	43
3.2.6.2. Determinació de l'activitat superòxid dismutasa.....	44
3.2.6.3. Determinació de l'activitat glutatió reductasa.....	45
3.2.6.4. Determinació de l'activitat ATPasa	46
3.2.6.5. Determinació de l'activitat citocrom c oxidasa	47
3.2.6.6. Determinació de l'activitat citrat sintasa	48
3.2.6.7. Determinació de l'activitat glucosa-6P deshidrogenasa	49
3.2.6.8. Determinació de l'activitat piruvat carboxilasa.....	49
3.2.6.9. Determinació de l'activitat piruvat deshidrogenasa	50
3.2.6.10. Determinació de l'activitat glutamat deshidrogenasa	51
3.2.7. Determinació de la producció de lactat	52
3.2.8. Determinació de la captació de glucosa	53
3.2.9. Determinació del rati de consum d'oxigen (OCR).....	54
3.2.10. Determinació dels nivells d'ATP intracel·lulars	55
3.2.11. Determinació de l'expressió gènica i dels nivells de mtDNA	56
3.2.12. Determinació de la massa mitocondrial	57
3.2.13. Determinació de la massa lisosomal	58
3.2.14. Determinació de l'autofàgia	59
3.2.15. Determinació del potencial de membrana.....	59
3.2.16. Determinació de l'activitat metabòlica.....	60
3.2.17. Determinació de l'apoptosi.....	60
3.2.18. Microscòpia confocal.....	62
3.2.19. Anàlisi estadístic.....	62

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ / RESULTS AND DISCUSSION	63
Manuscrit I. Leptin modulates mitochondrial function, dynamics and biogenesis in MCF-7 cells.....	65
Manuscrit II. Leptin regulates energy metabolism in MCF-7 breast cancer cells.....	77
Manuscrit III. Effect of xanthohumol and 8-prenylaringenin on MCF-7 breast cancer cells oxidative stress and mitochondrial complexes expression	89
Manuscrit IV. Resveratrol induces mitochondrial respiration and apoptosis in SW620 colon cancer cells.....	101
5. RECAPITULACIÓ	113
6. CONCLUSIONS / CONCLUSIONS	123
7. BIBLIOGRAFIA	129

SIGLES I ACRÒNIMS

$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
2-DG	2-deoxiglucosa
8-PN	8-prenilnaringenina
ADP	Difosfat d'adenosina
AMPK	Cinasa activada per monofosfat d'adenosina
ATP	Trifosfat d'adenosina
BSA	Albúmina sèrica bovina
CAT	Catalasa
COX	Citocrom c oxidasa
CPT ₁	Carnitina palmitoiltransferasa 1
CS	Citrat sintasa
DCFDA	2', 7' – diclorodihidrofluoresceïna diacetat
DMSO	Dimetilsulfòxid
DNA	Àcid desoxiribonucleic
DRP1	Proteïna relacionada amb la dinamina 1
EDTA	Àcid etilendiamintetraacètic
ER	Receptor d'estrògens
ERR	Receptor relacionat amb estrògens
FADH ₂	Flavina adenina dinucleòtid
FAT/CD36	Translocasa d'àcids grassos o clúster de diferenciació 36
FCCP	Carbonilcianur-4-trifluorometoxi-fenilhidrazona
FIS1	Proteïna de fissió 1
G6PDH	Glucosa-6-fosfat deshidrogenasa
GAPDH	Gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa
GDH	Glutamat deshidrogenasa
GLUT	Transportador de glucosa
GRd	Glutació reductasa
GTP	Trifosfat de guanosina
LDH	Lactat deshidrogenasa
MDC	Monodansilcadaverina

MFN ₁ , MFN ₂	Mitofusina 1 i 2
mtDNA	DNA mitocondrial
MTG	MitoTracker Green®
mtSSB	Proteïna d'unió a mtDNA de cadena senzilla
MTT	Bromur de tetrazoli
NADH	Nicotinamida adenina dinucleòtid
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat
NAO	Taronja de 10-nonil acridina
NRF ₁ , NRF ₂	Factor de respiració nuclear 1 i 2
OCR	Rati de consum d'oxigen
OPA ₁	Proteïna de l'atròfia òptica 1
OXPHOS	Fosforilació oxidativa
PARP	Poli (ADP-ribosa) polimerasa
PBS	Tampó fosfat salí
PC	Piruvat carboxilasa
PDH	Piruvat deshidrogenasa
PEP	Fosfoenolpiruvat
PGC-1 α	Coactivador 1 α de PPAR γ
PK	Piruvat cinasa
PPAR	Receptor activat per proliferadors de peroxisomes
PPAR α	Receptor activat per proliferadors peroxisomals alfa
RNA	Àcid ribonucleic
ROS	Espècies reactives de l'oxigen
RSV	Resveratrol
SIRT ₁ , SIRT ₃	Sirtuïna 1 i 3
SOD	Superòxid dismutasa
TBS-T	Tampó Tris salí amb Tween 20
TFAM	Factor de transcripció mitocondrial A
TMRM	Tetrametilrodamina metil èster
UCP ₂	Proteïna desacoblant 2
XN	Xantohumol

LLISTAT DE PUBLICACIONS

Aquesta tesi ha originat les següents publicacions:

- I. Blanquer-Rosselló MM, Santandreu FM, Oliver J, Roca P, Valle A. **Leptin modulates mitochondrial function, dynamics and biogenesis in MCF-7 cells.** J Cell Biochem. 2015 Sep; 116(9):2039-48. doi: 10.1002/jcb.25158.
- II. Blanquer-Rosselló MM, Oliver J, Sastre - Serra J, Valle A, Roca P. **Leptin regulates energy metabolism in MCF-7 breast cancer cells.** Int J Biochem Cell Biol. 2016 Mar; 72:18-26. doi: 10.1016/j.biocel.2016.01.002.
- III. Blanquer-Rosselló MM, Oliver J, Valle A, Roca P. **Effect of xanthohumol and 8-prenylnaringenin on MCF-7 breast cancer cells oxidative stress and mitochondrial complexes expression.** J Cell Biochem. 2013 Dec; 114(12):2785-94. doi: 10.1002/jcb.24627.
- IV. Blanquer-Rosselló MM, Hernández-López R, Roca P, Oliver J, Valle A. **Resveratrol induces mitochondrial respiration and apoptosis in SW620 colon cancer cells.** BBA General Subjects. 2016. doi: 10.1016/j.bbagen.2016.10.009.



Universitat
de les Illes Balears

COMPENDI D'ARTICLES

Aquesta tesi es presenta en forma de compendi d'articles de recerca prèviament publicats o acceptats. Les referències completes de les publicacions que constitueixen el nucli de la tesi i els seus indicis de qualitat són:

Blanquer-Rosselló MM, Santandreu FM, Oliver J, Roca P, Valle A. **Leptin modulates mitochondrial function, dynamics and biogenesis in MCF-7 cells.** J Cell Biochem. 2015 Sep; 116(9):2039-48. doi: 10.1002/jcb.25158. Factor d'impacte (2015): 3,446 (Q2 en les categories de Bioquímica i Biologia Molecular i de Biologia Cel·lular).

Blanquer-Rosselló MM, Oliver J, Sastre - Serra J, Valle A, Roca P. **Leptin regulates energy metabolism in MCF-7 breast cancer cells.** Int J Biochem Cell Biol. 2016 Mar; 72:18-26. doi: 10.1016/j.biocel.2016.01.002. Epub 2016 Jan 6. Factor d'impacte (2015): 3,905 (Q2 en les categories de Bioquímica i Biologia Molecular i de Biologia Cel·lular).

Blanquer-Rosselló MM, Oliver J, Valle A, Roca P. **Effect of xanthohumol and 8-prenylnaringenin on MCF-7 breast cancer cells oxidative stress and mitochondrial complexes expression.** J Cell Biochem. 2013 Dec; 114(12):2785-94. doi: 10.1002/jcb.24627. Factor d'impacte (2013): 3,368 (Q2 en les categories de Bioquímica i Biologia Molecular i de Biologia Cel·lular).

Blanquer-Rosselló MM, Hernández-López R, Roca P, Oliver J, Valle A. **Resveratrol induces mitochondrial respiration and apoptosis in SW620 colon cancer cells.** BBA General Subjects. 2016. doi: 10.1016/j.bbagen.2016.10.009. Factor d'impacte (2015): 5,083 (Q1 en les categories de Bioquímica i Biologia Molecular i de Biofísica).



Universitat
de les Illes Balears

Efecte modulador de la leptina i polifenols en la funció mitocondrial i metabolisme de la cèl·lula tumoral

Tesi doctoral, M^a del Mar Blanquer Rosselló

Grup Multidisciplinari d'Oncologia Traslacional, Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut

RESUM

Les cèl·lules canceroses presenten característiques diferencials tals com el manteniment de senyals proliferatives, l'evasió de la resposta als supressors tumorals, la resistència a l'apoptosi i la reprogramació metabòlica per sostenir una elevada proliferació. Els primers estudis sobre el metabolisme de les cèl·lules tumorals suggerien que, degut a una disfuncionalitat mitocondrial d'aquestes cèl·lules, l'oxidació de la glucosa a lactat era la principal via energètica per a la supervivència tumoral. No obstant, en els darrers anys s'ha vist que les cèl·lules canceroses requereixen de la presència de mitocondris funcionals, adquirint aquest orgànul una major importància en el metabolisme cancerós.

La leptina, hormona secretada pel teixit adipós, s'ha considerat el nexa d'unió entre l'obesitat i el risc incrementat de patir càncer de mama en dones postmenopàusiques. En aquesta tesi ens vam plantejar com a objectiu estudiar els efectes de la leptina en el càncer de mama a nivell metabòlic. D'altra banda, els polifenols són compostos consumits a través de la dieta que actuen com a antioxidants a dosis baixes, evitant l'aparició d'estats cancerosos, mentre que a dosis elevades exerceixen un paper prooxidant. En aquest sentit, un altre objectiu d'aquesta tesi va ser estudiar els efectes dels polifenols xantohumol (XN), 8-prenilnaringenina (8-PN) i resveratrol (RSV) sobre el metabolisme del càncer de mama i colon. Per assolir aquests objectius es va estudiar: i) els efectes de la leptina sobre la dinàmica i funcionament mitocondrials i metabolisme energètic en la línia de càncer de mama MCF-7; ii) la influència dels polifenols XN i 8-PN sobre l'estrès oxidatiu i funcionament mitocondrial en la línia MCF-7; i iii) els efectes del RSV en el funcionament mitocondrial i metabolisme energètic en la línia de càncer de colon SW620.

Els resultats indiquen que la leptina promou el funcionament mitocondrial en la línia de càncer de mama MCF-7 a través d'una millora del control de qualitat. A més, incrementa l'oxidació dels àcids grassos per mantenir la producció d'energia, mentre que la glucosa és destinada preferentment cap a rutes biosintètiques. D'aquesta manera, la leptina indueix una reprogramació metabòlica que fa possible un millor aprofitament dels substrats metabòlics i una reducció de l'estrès oxidatiu, conferint avantatges per a la supervivència cel·lular. D'altra banda, el XN i la 8-PN són capaços de modular l'estrès oxidatiu de la línia MCF-7 a través d'una regulació de la funcionalitat mitocondrial. Finalment, es va veure que el RSV estimula la biogènesi i metabolisme mitocondrials, afavorint l'oxidació dels àcids grassos com a principal font energètica, en la línia de càncer de colon SW620 i aquest estat d'oxidació lipídica incrementada condueix a un elevat estrès oxidatiu que resulta en apoptosi. En conclusió, els resultats de la present tesi contribueixen a explicar l'efecte promotor de la leptina en el càncer de mama així com l'efecte protector d'alguns polifenols en el càncer de mama i colon. A més, suggereixen la reprogramació del metabolisme tumoral com una estratègia interessant per incrementar l'efectivitat de les teràpies antitumorals.



Universitat
de les Illes Balears

Efecto modulador de la leptina y polifenoles en la función mitocondrial y metabolismo de la célula tumoral

Tesis doctoral, M^a del Mar Blanquer Rosselló

Grupo Multidisciplinar de Oncología Traslacional, Departamento de Biología Fundamental y Ciencias de la Salud

RESUMEN

Las células cancerosas presentan características diferenciales tales como el mantenimiento de señales proliferativas, la evasión de la respuesta a los supresores tumorales, la resistencia a la apoptosis y la reprogramación metabólica para sostener una elevada proliferación. Los primeros estudios sobre el metabolismo de las células tumorales sugerían que, debido a una disfuncionalidad mitocondrial de estas células, la oxidación de la glucosa a lactato era la principal vía energética para la supervivencia tumoral. No obstante, en los últimos años se ha visto que las células cancerosas requieren de la presencia de mitocondrias funcionales, adquiriendo este orgánulo una mayor importancia en el metabolismo canceroso.

La leptina, hormona secretada por el tejido adiposo, se ha considerado el nexo de unión entre la obesidad y el riesgo incrementado de padecer cáncer de mama en mujeres postmenopáusicas. En esta tesis nos planteamos como objetivo estudiar los efectos de la leptina en el cáncer de mama a nivel metabólico. Por otra parte, los polifenoles son compuestos consumidos a través de la dieta que actúan como antioxidantes a dosis bajas, evitando la aparición de estados cancerosos, mientras que a dosis elevadas desempeñan un papel prooxidante. En este sentido, otro objetivo de esta tesis fue estudiar los efectos de los polifenoles xantohumol (XN), 8-prenilnaringenina (8-PN) y resveratrol (RSV) sobre el metabolismo del cáncer de mama y colon. Para alcanzar estos objetivos se estudió: i) los efectos de la leptina sobre la dinámica y funcionamiento mitocondriales y metabolismo energético en la línea de cáncer de mama MCF-7; ii) la influencia de los polifenoles XN y 8-PN sobre el estrés oxidativo y funcionamiento mitocondrial en la línea MCF-7; y iii) los efectos del RSV en el funcionamiento mitocondrial y metabolismo energético en la línea de cáncer de colon SW620.

Los resultados indican que la leptina promueve el funcionamiento mitocondrial en la línea de cáncer de mama MCF-7 a través de una mejora del control de calidad. Además, incrementa la oxidación de los ácidos grasos para mantener la producción de energía, mientras que la glucosa es destinada preferentemente hacia rutas biosintéticas. Así, la leptina induce una reprogramación metabólica que posibilita un mejor aprovechamiento de los sustratos metabólicos y una reducción del estrés oxidativo, confiriendo ventajas para la supervivencia celular. Por otra parte, el XN y la 8-PN modulan el estrés oxidativo de la línea MCF-7 a través de una regulación de la funcionalidad mitocondrial. Finalmente, se vio que el RSV estimula la biogénesis y metabolismo mitocondriales, favoreciendo la oxidación de los ácidos grasos como principal fuente energética, en la línea de cáncer de colon SW620 y este estado de oxidación lipídica incrementada conduce a un elevado estrés oxidativo que resulta en apoptosis. En conclusión, los resultados de la presente tesis contribuyen a explicar el efecto promotor de la leptina en el cáncer de mama así como el efecto protector de algunos polifenoles en el cáncer de mama y colon. Además, sugieren la reprogramación del metabolismo tumoral como una estrategia interesante para incrementar la efectividad de las terapias antitumorales.



Universitat
de les Illes Balears

Modulatory effect of leptin and polyphenols on mitochondrial function and metabolism of tumoral cells

Doctoral thesis, M^a del Mar Blanquer Rosselló

Multidisciplinary Translational Oncology Group, Department of Fundamental Biology and Health Sciences

ABSTRACT

Cancer cells exhibit differential characteristics such as maintenance of proliferative signals, evasion of tumor suppressor response, resistance to apoptosis and metabolic reprogramming to sustain a high proliferation. First studies regarding metabolism of tumor cells suggested that, due to mitochondrial dysfunction of these cells, the oxidation of glucose to lactate was the main energy pathway for tumor survival. However, in the recent years it has been found that cancer cells require the presence of functional mitochondria, thus acquiring this organelle a greater importance in cancer metabolism.

Leptin, a hormone secreted by adipose tissue, has been considered the link between obesity and the increased risk of breast cancer in postmenopausal women. In this thesis we aimed to study the effects of leptin in breast cancer at the metabolic level. Moreover, polyphenols are compounds consumed through diet that act as antioxidants at low doses, preventing the appearance of cancerous conditions, while at high doses play a prooxidant role. In this regard, another objective of this thesis was to study the effects of the polyphenols xanthohumol (XN), 8-prenylnaringenin (8-PN) and resveratrol (RSV) on the metabolism of breast and colon cancer. To achieve these objectives it was studied: i) the effects of leptin on mitochondrial dynamics and functionality and energy metabolism in MCF-7 breast cancer line; ii) the influence of the polyphenols XN and 8-PN on oxidative stress and mitochondrial functionality in MCF-7 cell line; and iii) the effects of RSV on mitochondrial functionality and energy metabolism in SW620 colon cancer line.

The results indicate that leptin promotes mitochondrial functionality in MCF-7 breast cancer cells by improving quality control. This hormone also increases the oxidation of fatty acids to keep the energy production, while glucose is preferably allocated to biosynthetic pathways. Thus, leptin induces a metabolic reprogramming which makes it possible a better utilization of metabolic substrates and a reduced oxidative stress, conferring advantages for cell survival. Moreover, XN and 8-PN are able to modulate oxidative stress of MCF-7 cell line through regulation of mitochondrial functionality. Finally, it was found that RSV stimulates mitochondrial biogenesis and metabolism, favouring fatty acid oxidation as main energy source, in SW620 colon cancer cells and this state of increased lipid oxidation leads to a high oxidative stress which results in apoptosis. In conclusion, the results of this thesis contribute to explain the promoter effect of leptin in breast cancer and the protective effect of some polyphenols in breast and colon cancer. Furthermore, they also suggest the reprogramming of tumor metabolism as an interesting strategy to increase the effectiveness of antitumor therapies.

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Epidemiologia i etiologia del càncer de mama

El càncer de mama és el segon tipus de càncer més comú a nivell mundial i el primer entre la població femenina. És la causa més freqüent de mort per càncer entre les dones dels països menys desenvolupats i la segona en el cas dels països desenvolupats, per darrere el de pulmó. Les estadístiques més recents de GLOBOCAN, de l'Agència Internacional per a la Investigació del Càncer (*IARC – International Agency for Research on Cancer*) indiquen que en el 2012 hi va haver 14,1 milions de nous casos de càncer en tot el món i que a 1,7 milions de dones a nivell mundial se'ls va diagnosticar càncer de mama. A més, està previst que la incidència mundial sigui de 3,2 milions de nous casos anuals en el 2050 (1). La tendència actual en els països en vies de desenvolupament és un augment de la incidència del càncer de mama degut a una major esperança de vida juntament amb un estil de vida més sedentari, canvis alimentaris i retard en la maternitat.

Les causes del càncer de mama no es troben completament desxifrades però els estudis epidemiològics demostren que els estrògens són un dels principals factors de risc en la iniciació i progressió del càncer de mama (2). Coincidint amb aquesta idea, el risc de patir càncer de mama s'incrementa en dones amb una menarquia precoç, una menopausa tardana i la nul·liparitat, és a dir, situacions associades directament amb una major exposició als estrògens. Nombrosos estudis associen l'obesitat en dones postmenopàusiques amb un increment del risc de patir càncer de mama, mentre que l'obesitat en la premenopausa s'ha vist associada amb un risc menor de desenvolupar aquest tipus de càncer (3-5). Així, la relació entre obesitat i càncer de mama és complexa i es troba condicionada per l'estatus hormonal de la dona. El mecanisme molecular subjacent a la relació entre obesitat i càncer de mama encara no es troba del tot elucidat, però una de les teories més acceptades és l'augment dels nivells d'estrògens circulants que es produeix en una dona obesa (6, 7) degut a que, després de la menopausa, el teixit adipós passa a ser el principal productor d'estrògens a través de l'aromatització dels andrògens (8). No obstant això, amb el reconeixement del teixit adipós com a òrgan endocrí actiu i en vista de que l'obesitat incrementa el risc tant de càncers ER-positius com ER-negatius, les hormones derivades d'aquest teixit, les adipoquines, han estat proposades com a molècules clau en la relació entre

obesitat i càncer (9, 10). De les més de 50 adipoquines identificades com a reguladores del metabolisme energètic destaca especialment la leptina, de la qual s'han descrit efectes sobre el desenvolupament i progressió del càncer de mama (11).

El càncer de mama és molt heterogeni en quant a etiologia i característiques patològiques. A banda de les hormones, existeixen altres factors de risc tals com una dieta rica en carn vermella i grassa animal i pobra en vegetals (12). La història familiar és un altre dels factors que s'associa amb un risc elevat de patir càncer de mama. Les dones amb un familiar de primer ordre que ha desenvolupat aquest tipus de càncer presenten el doble de risc de patir aquesta malaltia mentre que el risc és molt menor quan el familiar afectat és de segon ordre (13). En aquest sentit, s'han identificat polimorfismes i mutacions en gens clau en la regulació de la proliferació, diferenciació i mort cel·lular que predisposen al desenvolupament de càncer de mama: *BRCA1*, *BRCA2*, *P53*, *PTEN*, *ATM*, *NBS1*, *RAD50*, *BRIP1*, *PALB2* i *CHECK2* (14).

1.2. Epidemiologia i etiologia del càncer de colon

El càncer de colon és el tercer tipus de càncer més comú en els homes arreu del món i el segon en les dones, després del de mama, així com també una de les principals causes de mort a nivell mundial (15). Segons la darrera estadística de GLOBOCAN, de l'IARC, en el 2012 es van diagnosticar 1,4 milions de nous casos de càncer de colon, el que representa un 9 % del total de càncers diagnosticats en aquell any. El 55 % dels casos de càncer de colon ocorren en les regions més desenvolupades (16). Segons l'IARC, la incidència d'aquest tipus de càncer varia de forma notable al llarg de la geografia mundial degut a que l'exposició als factors de risc és molt variable en diferents regions, així com també ho són l'existència de mesures preventives i l'evolució dels tractaments. Les taxes d'incidència més elevades es donen a Austràlia i Nova Zelanda mentre que l'Àfrica occidental és la regió mundial on es detecten menys casos. Encara que el càncer de colon és una malaltia del món desenvolupat, les taxes d'incidència en els països en via de desenvolupament segueixen una tendència ascendent a mesura que augmenta l'edat de la població i s'adopten estils de vida occidentals.

Les causes del càncer de colon són diverses, sent l'estil de vida un factor molt determinant. Un consum elevat de carn vermella o processada i aliments amb alt contingut de greixos i/o sucre incrementa el risc de patir aquesta malaltia. Per contra, una dieta rica en fruita i verdures, cereals integrals, peix i derivats de soja en disminueix el risc (17). De fet, el consum d'aliments amb fibra exerceix un paper especialment protector front aquesta malaltia (18). D'altra banda, s'ha vist que mantenir un pes corporal saludable i la pràctica regular d'exercici físic redueix substancialment el risc de patir càncer de colon (19) i que existeix una associació entre el consum d'alcohol i el risc de desenvolupar aquest tipus de càncer (20).

S'han identificat alteracions genètiques freqüents en aquest tipus de càncer. Com a exemple, l'activació de l'oncogen *KRAS* i la inactivació de supressors tumorals tals com *APC*, *p53* i *LOH*, a banda de mutacions en els gens *TGFBR* i *PI3KCA*. Certes alteracions epigenètiques també es troben implicades en aquest tipus de càncer (21).

1.3. Funció mitocondrial

Els mitocondris són orgànuls de les cèl·lules eucariotes que desenvolupen un paper central en el metabolisme energètic. Es troben formats per una doble membrana (membrana mitocondrial externa i membrana mitocondrial interna), que separa dos espais amb funcions clarament diferenciades: l'espai intermembrana i la matriu mitocondrial. Aquests orgànuls són responsables de generar el 90 % dels requeriments energètics de la cèl·lula en forma d'ATP a través del procés d'oxidació de substrats i de consum d'oxigen conegut com fosforilació oxidativa (OXPHOS) (22). En el metabolisme cel·lular, els combustibles metabòlics (carbohidrats, lípids i proteïnes) són oxidats i es dona una reducció acoblada dels coenzims NAD^+ i FAD , generant-se NADH i FADH_2 , respectivament. Les etapes finals d'aquesta oxidació, tals com la β -oxidació dels àcids grassos i el cicle de Krebs, tenen lloc al mitocondri i és en aquest orgànel on aquests coenzims reduïts cedeixen els seus electrons a una sèrie de complexos proteics de la cadena de transport electrònic, localitzats en la membrana mitocondrial interna. Els electrons flueixen a través dels centres d'oxidoreducció dels complexos a favor del seu potencial redox i és en el complex IV on l'oxigen molecular actua d'acceptor final d'aquests electrons donant lloc a una molècula d'aigua.

L'energia que s'allibera en la transferència d'electrons entre els centres redox és acoblada a un bombeig actiu de protons en els complexes I, III i IV des de la matriu mitocondrial cap a l'espai intermembrana. D'aquesta forma, es genera un gradient electroquímic de protons a través de la membrana mitocondrial interna que conserva l'energia alliberada durant la respiració. Els protons retornen a la matriu mitocondrial a través de l'ATP sintasa (complex V) que acobla l'energia alliberada a la síntesi d'ATP a partir d'ADP i Pi. D'aquesta forma, els nivells d'ADP i per tant la demanda energètica controlen el funcionament de la cadena respiratòria.

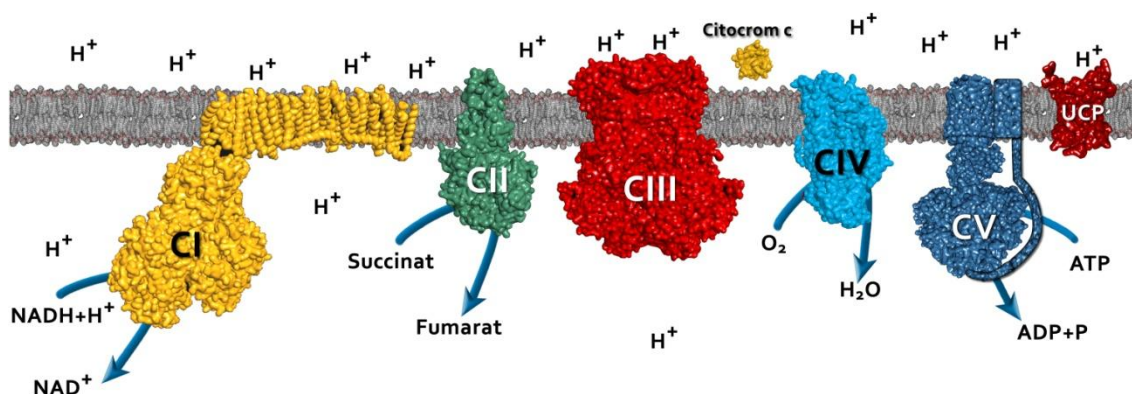


Figura 1. Esquema representatiu de la cadena respiratòria mitocondrial (complexes OXPHOS) i de la proteïna desacoblant (UCP).

No obstant, la funció dels mitocondris no és simplement satisfer la demanda energètica de la cèl·lula sinó que també participen en la biosíntesi de precursors anabòtics, en l'activació de programes d'apoptosi i en la regulació de la proliferació cel·lular i de l'homeòstasi del calci intracel·lular, entre d'altres processos (23, 24).

1.3.1. Producció d'espècies reactives d'oxigen

Els mitocondris són la principal font d'espècies reactives d'oxigen (ROS), subproductes tòxics del metabolisme oxidatiu altament nocius a concentracions elevades (25, 26). A concentracions baixes, els ROS es troben involucrats en múltiples processos fisiològics, actuant com a missatgers secundaris que activen gens relacionats amb el creixement cel·lular. No obstant, quan la seva producció sobrepassa la capacitat antioxidant de la cèl·lula passen a ser patològics (27), apareixent en aquest cas l'estrès oxidatiu. L'estrès oxidatiu és responsable de provocar alteracions en el material

genètic, de forma que juga un paper important en l'origen i l'evolució de la carcinogènesi (28, 29), a la vegada que indueix l'apoptosi cel·lular (26, 30, 31).

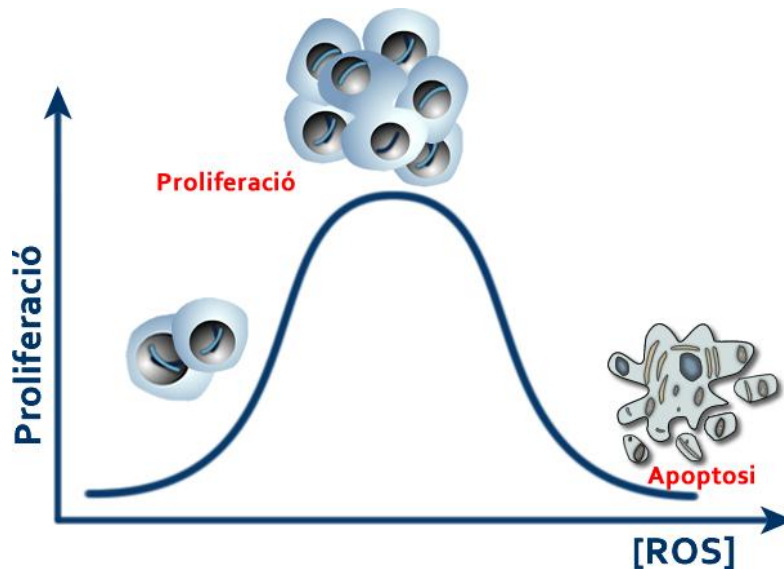


Figura 2. Esquema representatiu dels efectes dels nivells de ROS sobre la proliferació cel·lular i l'apoptosi.

En condicions fisiològiques, un 2 % dels electrons s'escapen de la cadena de transport electrònic durant la seva transferència, reduint l'oxigen a anió superòxid ($O_2^{\cdot-}$) i conduint a la cascada de formació de ROS (32). Els ROS són detoxificats per mecanismes enzimàtics i no enzimàtics. Entre els primers, es troba la superòxid dismutasa (SOD) que converteix ràpidament l'anió $O_2^{\cdot-}$ a peròxid d'hidrogen (H_2O_2). A partir d'aquí, existeixen diverses vies que impliquen la conversió directa del H_2O_2 a H_2O : mitjançant l'acció de la catalasa (CAT), la glutatió peroxidasa (GPx) o la peroxiredoxina III (Prx). La GPx, a diferència de la CAT, utilitza glutatió reduït (GSH) com a acceptor d'electrons per eliminar el H_2O_2 . El GSH és regenerat a partir del glutatió oxidat (GSSG) mitjançant l'acció de la glutatió reductasa (GRd) i utilitzant NADPH com a equivalent de reducció. S'ha descrit una altra família d'oxidoreductases amb un mecanisme idèntic al de la GRd, la tioredoxina reductasa (TrxR). En aquest sistema, la tioredoxina (Trx) és reduïda per la TrxR a través de l'oxidació de NADPH. La Prx utilitza la Trx reduïda com a acceptor d'electrons per eliminar el H_2O_2 , que a la vegada oxida la Trx convertint-la en substrat de la TrxR. Entre els mecanismes no enzimàtics es troba la vitamina C, antioxidant important en el compartiment aquós, i la

vitamina E, més predominant en la fracció lipídica de les membranes. Ambdues actuen com a dianes alternatives a la reactivitat dels ROS, evitant així els efectes deleteris sobre els components cel·lulars (25, 26).

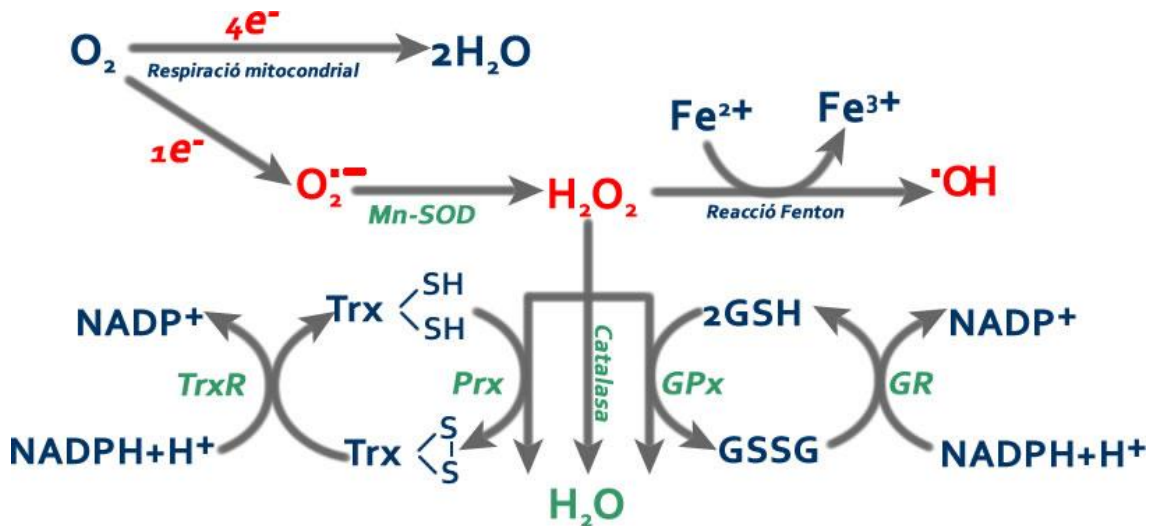


Figura 3. Mecanismes enzimàtics de detoxificació de les espècies reactives d'oxigen (ROS).

La generació de ROS en el mitocondri depèn exponencialment del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), de forma que la màxima producció de ROS s'associa a situacions on aquest potencial és elevat, per exemple degut a un augment de combustibles que condueix a una elevada producció de NADH (33, 34). Entre els mecanismes que prevenen la producció de ROS es troben les proteïnes desacoblants o UCPs que pertanyen a la superfamília de transportadors aniònics localitzats en la membrana mitocondrial interna. La seva funció és permetre el retorn dels protons a la matriu mitocondrial dissipant el gradient protònic, amb la consegüent disminució del potencial de membrana i de la producció de ROS (35-37). Es coneixen cinc isoformes d'UCPs amb distribució tissular específica (35) però la UCP2 és la que s'ha relacionat amb la tumorigènesi i la resistència quimioterapèutica (38).

1.3.2. Genoma mitocondrial

Els mitocondris consten de genoma propi (mtDNA) que consisteix en una doble cadena circular que es presenta en poliploidia, de forma que les cèl·lules dels mamífers tenen des de cents fins a mils de mitocondris i cada mitocondri presenta entre 2 i 10 còpies de mtDNA. Cada una de les cadenes del mtDNA conté una composició diferent

de nucleòtids de guanina i de timina, de forma que convencionalment es coneixen com a cadena pesada i cadena lleugera. El mtDNA consta d'uns 16.500 parells de bases que codifiquen 37 gens, distribuïts asimètricament entre les dues cadenes. La cadena pesada codifica per 2 RNAs ribosòmics, 14 RNAs de transferència i 12 dels 13 RNAs missatgers que codifica aquest genoma. La cadena lleugera codifica per 8 RNAs de transferència i un únic RNA missatger (39). Els 13 polipèptids codificats i sintetitzats en el mitocondri són subunitats dels complexos I, IV i V de forma que són essencials en el funcionament del mitocondri. No obstant això, encara que el mitocondri disposa de genoma propi, la majoria de proteïnes mitocondrials són producte de gens nuclears de forma que l'assemblatge i la funcionalitat mitocondrials requereixen de l'expressió i la interacció coordinada entre els productes gènics dels genomes mitocondrial i nuclear. Entre les proteïnes codificades pel genoma nuclear cal destacar la majoria de les subunitats dels complexos de la cadena respiratòria, els enzims del cicle de Krebs i de la β -oxidació dels àcids grassos, les proteïnes desacoblants i els factors implicats en la replicació i expressió del genoma mitocondrial (40).

1.3.3. Biogènesi mitocondrial: proliferació i diferenciació

El correcte manteniment de l'estructura i la funció mitocondrials depèn de la biogènesi mitocondrial, un procés que implica la proliferació i la diferenciació d'aquest orgànul (41). La proliferació consisteix en l'augment del nombre de mitocondris per cèl·lula, mentre que la diferenciació és l'adquisició de característiques estructurals i funcionals adequades pel desenvolupament de les funcions específiques dels mitocondris a les distintes cèl·lules de l'organisme. La biogènesi mitocondrial requereix d'una coordinació precisa entre el genoma mitocondrial i el nuclear la qual s'aconsegueix mitjançant una sèrie de proteïnes reguladores codificades en el nucli que coordinen l'expressió gènica de proteïnes mitocondrials als dos genomes.

Els processos de proliferació i diferenciació són possibles gràcies a la replicació i a la transcripció del mtDNA, processos molt relacionats ja que per tal que s'iniciï la replicació és necessari un encebador de RNA, producte de la transcripció de la cadena lleugera del mtDNA (42). La replicació i la transcripció del mtDNA es troben dirigides per una proteïna codificada pel DNA nuclear, el factor de transcripció mitocondrial A

(TFAM), que s'uneix a una regió promotora en les dues cadenes del mtDNA (43). A més, per tal d'iniciar la transcripció també és necessària la presència d'una RNA polimerasa específica (44) i dels factors de transcripció mitocondrials B1 i B2 (TFB1M i TFB2M), també codificats pel genoma nuclear (41). La transcripció i la replicació del genoma mitocondrial són dos processos coordinats. Quan hi ha baixos nivells de TFAM, la RNA polimerasa finalitza de manera prematura la transcripció, donant lloc a un RNA que actua com un encebador necessari per a la replicació del mtDNA. En canvi, quan els nivells de TFAM són elevats, aquest es pot unir al promotor de la cadena pesada i s'indueix la transcripció del mtDNA. Per tant, la regulació de la transcripció i la replicació del mtDNA depèn dels nivells de TFAM (41, 45).

Els factors de respiració nuclears 1 i 2 (NRF1 i NRF2) són factors de transcripció nuclears implicats en la regulació de la funció respiratòria mitocondrial ja que d'una banda controlen la transcripció nuclear de subunitats dels complexos de la cadena respiratòria (46) i d'altra banda activen l'expressió dels factors implicats en l'inici de la transcripció del genoma mitocondrial, tals com TFAM, TFB1M i TFB2M (47). Els factors NRF1 i NRF2 reconeixen regions específiques en el promotor de TFAM, fent possible així la coordinació entre el nucli i el mitocondri durant la biogènesi mitocondrial. No obstant, hi ha una sèrie de gens que no pareixen trobar-se regulats pels NRFs, com aquells que codifiquen les proteïnes que transporten els àcids grassos cap a l'interior del mitocondri i els que codifiquen els enzims que participen en l'oxidació dels àcids grassos els quals pareixen ser regulats pels receptors activats per proliferadors de peroxisomes (PPARs). Als mamífers hi ha tres isoformes, el PPAR α , el PPAR β/δ i el PPAR γ . El PPAR α fou el primer en identificar-se i s'expressa predominantment al fetge, al cor, al múscul esquelètic i al teixit adipós marró, i participa en la regulació de l'expressió de gens pel transport i l'oxidació d'àcids grassos (48).

Uns altres factors proteics implicats en la regulació de la biogènesi mitocondrial són els coactivadors del receptor activat per proliferadors peroxisomals γ (PGCs). Es tracta de coactivadors i per tant no presenten domini d'unió al DNA sinó que interaccionen amb altres factors i coactiven nombrosos factors de transcripció tals com els NRFs

sobre el promotor del TFAM. Destaca el PGC-1 α , el qual s'expressa sobretot en teixits amb una gran demanda energètica i, per tant, un gran contingut en mitocondris (49). D'aquesta manera, el PGC-1 α és el principal element regulador de la biogènesi mitocondrial ja que activa i integra les activitats dels diversos factors de transcripció implicats en l'expressió de les proteïnes mitocondrials (50). D'entre els mecanismes reguladors del PGC-1 α destaca la proteïna cinasa activada per AMP (AMPK). L'AMPK actua com a sensor energètic de la cèl·lula, activant-se quan els nivells d'ATP disminueixen i, per tant, els d'AMP augmenten. Una vegada activa, el paper de l'AMPK és activar les rutes d'obtenció d'energia per tal de suplir el dèficit energètic, de manera que s'activa la sirtuïna 1 (SIRT1), la qual desacetila i activa el PGC-1 α (51). D'aquesta manera, s'estableix una connexió entre l'estatus energètic cel·lular, l'estat redox i la biogènesi mitocondrial.

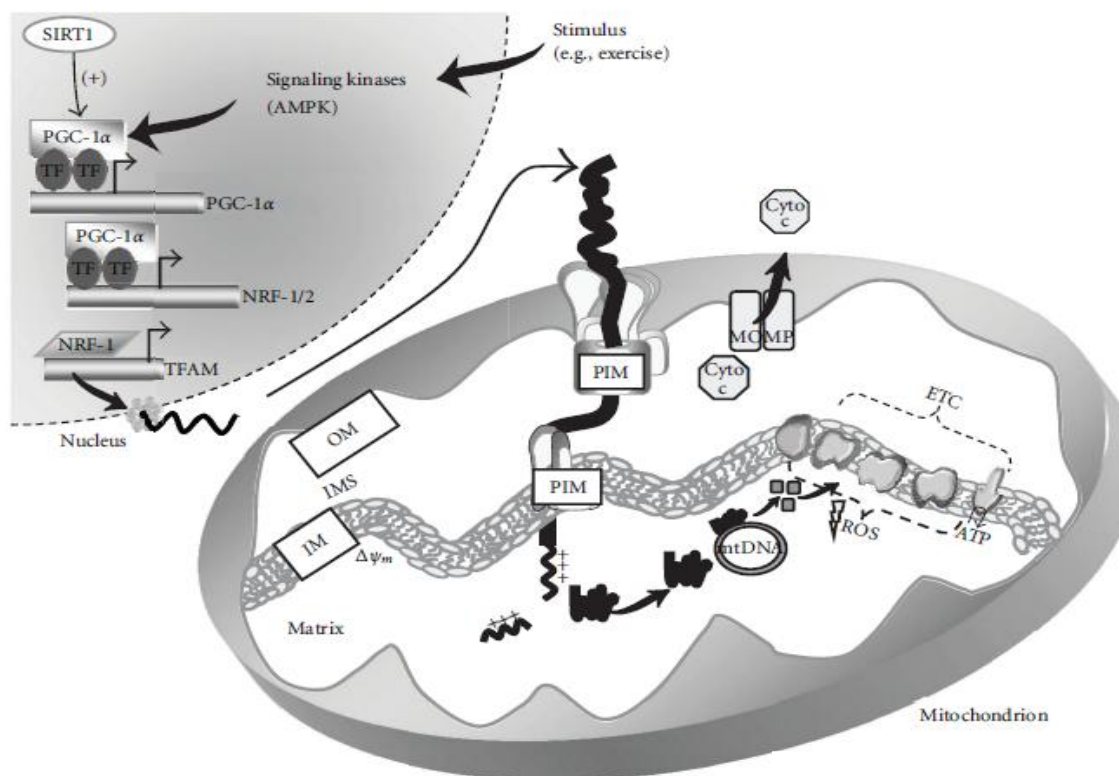


Figura 4. Representació esquemàtica de la regulació de la biogènesi mitocondrial. Imatge adaptada de Joseph, AM. *et al.* (2012) (52).

1.3.4. Dinàmica mitocondrial

Els mitocondris no es troben en forma d'òrgànuls aïllats dins la cèl·lula sinó que presenten entre si una elevada interconnectivitat distribuïnt-se en una xarxa que irradia des del nucli. A més, encara que anys enrere es pensava que els mitocondris eren òrgànuls estàtics, a dia d'avui es coneix que realment són estructures molt plàstiques que alteren la seva morfologia de forma contínua en resposta a senyals cel·lulars. Aquestes alteracions suposen la unió (fusió) i la divisió (fissió) dels mitocondris, processos que impliquen hidròlisi de GTP i són essencials per a un correcte funcionament mitocondrial (53, 54).

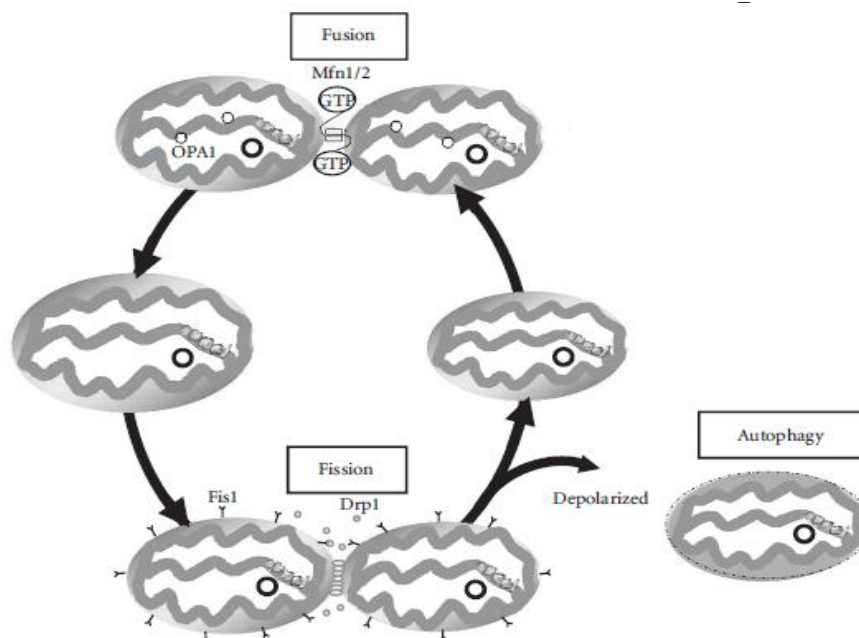


Figura 5. Esquema representatiu dels processos implicats en la dinàmica mitocondrial. Imatge adaptada de Joseph, AM. *et al.* (2012) (52).

Des d'un punt de vista fisiològic, la fusió és un mecanisme pel qual les membranes de mitocondris veïns es fusionen per tal de recuperar la funcionalitat de les membranes danyades (55) i està controlat per les mitofusines 1 i 2 (MFN1, MFN2) i per la proteïna de l'atròfia òptica (OPA1). La fusió mitocondrial implica una homogeneïtzació de la xarxa mitocondrial de la cèl·lula la qual cosa pot suposar un mecanisme de control en front a possibles mutacions (56). Per contra, la fissió és la fragmentació d'un mitocondri en varis i es troba regulada per la proteïna de fissió 1 (FIS1) i per la proteïna relacionada amb la dinamina 1 (DRP1) (57). En condicions normals, la fusió i la fissió

mitocondrials ocorren de forma equilibrada mantenint una morfologia tubular dels mitocondris relativament constant (58). Una pertorbació en el balanç fusió/fissió provoca deformacions en la xarxa mitocondrial que s'ha relacionat amb certes malalties (59, 60). El manteniment d'una adequada morfologia mitocondrial fa possible una producció i distribució d'ATP més eficients i això es correlaciona amb l'estabilitat metabòlica de la cèl·lula (60).

Davant una situació d'estrès, la fissió mitocondrial es pot veure accelerada per eliminar els mitocondris vells o danyats facilitant així el procés d'autofàgia mitocondrial, conegut com mitofàgia. L'eliminació dels mitocondris disfuncionals a través d'aquest procés és un mecanisme clau per alliberar les cèl·lules de mutacions al mtDNA provocades pels ROS que es generen en el mitocondri (61), de forma que funciona com un control de qualitat (62). Així, per mantenir un correcte funcionament mitocondrial es dona un procés de recanvi que implica l'existència d'un equilibri entre la biogènesi mitocondrial, els processos de fusió i fissió i l'autofàgia.

1.4. Metabolisme del càncer

Otto Warburg i col·laboradors van postular a principis del segle XX que les cèl·lules canceroses obtenen l'energia a partir de la metabolització de la glucosa cap a lactat en lloc de dirigir-la cap a la fosforilació oxidativa, inclús en presència d'oxigen, degut probablement a un mal funcionament mitocondrial propi dels estats cancerosos. Aquest fenomen és conegut com efecte Warburg o glicòlisi aeròbica (63). A partir d'aquestes observacions i en l'última dècada, l'estudi del metabolisme cancerós s'ha convertit en un tema d'interès renovat ja que s'han elucidat nombroses connexions entre les vies de senyalització cel·lular oncogèniques i el metabolisme. A partir d'aquests estudis s'ha fet evident que la glicòlisi aeròbica descrita per Warburg representa només la punta de l'iceberg referent a la reprogramació metabòlica que acompanya les transformacions malignes, ja que s'ha vist que el metabolisme cancerós va més enllà d'una simple interacció entre la glicòlisi i el mitocondri (64). De fet, s'ha descrit que les alteracions metabòliques associades a la tumorigènesi abasten totes les etapes del procés de nutrició cel·lular: les cèl·lules canceroses presenten major capacitat per captar nutrients de l'exterior i aquests, a la vegada, són destinats

dins la cèl·lula cap a vies metabòliques que afavoreixen la proliferació cel·lular. Aquestes alteracions provoquen com a conseqüència efectes importants en l'expressió dels gens, en la diferenciació cel·lular i en el microambient del tumor (65).

1.4.1. Captació de glucosa i aminoàcids desregulada

En un estat cancerós, l'elevada proliferació cel·lular representa una demanda biosintètica important i per tal de fer-hi front la importació de glucosa i glutamina des de l'ambient es veu notablement incrementada. L'oxidació de la glucosa genera poder reductor, en forma de NADH i FADH₂, per a l'obtenció d'ATP en la fosforilació oxidativa. D'altra banda, també s'obté NADPH i intermediaris metabòlics que entren a formar part de les rutes biosintètiques. El consum elevat de glucosa per part de les cèl·lules tumorals va ser descrit per primer cop per Otto Warburg i s'ha confirmat en nombrosos tumors tot relacionant-se amb un mal pronòstic (65). Aquesta característica de les cèl·lules tumorals dona fonament a una de les tècniques més importants usades en la clínica per a la detecció i monitorització de tumors, la tomografia per emissió de positrons (PET). En aquesta tècnica, les cèl·lules tumorals capten una major quantitat d'un anàleg radioactiu de la glucosa, permetent visualitzar la localització anatòmica i extensió dels tumors (66). Per una altra banda, l'elevada demanda de glutamina de les cèl·lules tumorals va ser descrita per primera vegada al 1950 per Harry Eagle (67). Aquest aminoàcid aporta el nitrogen necessari per a la biosíntesi dels compostos nitrogenats tals com nucleòtids, glucosamina-6-fosfat i aminoàcids no essencials, a la vegada que és una font de carboni per al cicle de Krebs.

Aquest consum voraç de nutrients per part de les cèl·lules canceroses és degut a una desregulació dels mecanismes de captació. Les cèl·lules sanes, tot i estar envoltades de plasma ric en nutrients, no els capten de forma constitutiva sinó que aquesta captació es troba estrictament regulada per factors de creixement (68) així com també per l'estat energètic de la cèl·lula a través del sensor AMPK i per la interacció de les cèl·lules amb la matriu extracel·lular. Les cèl·lules tumorals, per la seva banda, acumulen alteracions oncogèniques que les fan independents a aquestes senyals externes, de forma que consumeixen nutrients sense cap tipus de regulació (69). De fet, s'ha observat amb molta freqüència que la via de senyalització PI3K/Akt, que

actua com a reguladora del consum de glucosa i promou l'expressió i la translocació cap a la superfície cel·lular del transportador de glucosa GLUT₁, és una de les més alterades en estats cancerosos (70).

1.4.2. Reprogramació de les vies metabòliques

Quan les cèl·lules sanes no es troben proliferant, converteixen la glucosa preferentment a acetil-CoA el qual és oxidat en el cicle de Krebs i en última instància es genera ATP en la fosforilació oxidativa. En un estat cancerós, els nutrients són utilitzats principalment per a la biosíntesi de biomolècules tals com àcids grassos, colesterol, pentoses, nucleòtids i aminoàcids no essencials. Per a tal objectiu, els nutrients captats són destinats principalment a formar part d'un pool d'intermediaris estructurals que són redirigits cap a les rutes biosintètiques. D'aquesta manera, les cèl·lules canceroses necessiten tant la glicòlisi com la via de les pentoses fosfat i el cicle de Krebs per cobrir l'elevada biosíntesi.

Otto Warburg va suggerir que les cèl·lules canceroses, en lloc de conduir el piruvat al mitocondri per a que entri en el cicle de Krebs i mantenir així la fosforilació oxidativa, el transformen a lactat (63). Actualment s'ha vist que no tot el piruvat és convertit a lactat sinó que part d'aquest entra en el cicle de Krebs per obtenir intermediaris biosintètics. No obstant això, l'excés de piruvat no utilitzat en el cicle de Krebs és preferentment convertit a lactat per tal de preservar un pool de NAD⁺ suficient per mantenir la glicòlisi activa i per tal d'evitar saturar el mitocondri amb una aportació de NADH que inhibiria el cicle de Krebs. Per tal de controlar l'entrada de piruvat en el cicle de Krebs, les cèl·lules en proliferació han desenvolupat mecanismes per regular el darrer enzim de la glicòlisi, la piruvat cinasa (PK) (71). Aquest enzim converteix el fosfoenolpiruvat (PEP) a piruvat. Un altre punt de regulació que manté la via glucolítica activa consisteix en canalitzar el piruvat en excés que entra al mitocondri cap a la formació de citrat el qual es transloca al citosol on és convertit en acetil-CoA i oxalacetat. L'oxalacetat es converteix en malat i es reimporta al mitocondri mentre que l'acetil-CoA és usat com a precursor per a la biosíntesi de lípids i acetilació de proteïnes (65). La importància d'aquesta regulació es basa en el fet que el manteniment de la via glucolítica en les cèl·lules canceroses és essencial ja que

nombrosos intermediaris poden ser reconduïts cap a vies biosintètiques tals com ara la via de les pentoses fosfat on la glucosa-6-fosfat s'oxida parcialment per generar NADPH i ribosa-5-fosfat, component estructural de nucleòtids.

El cicle de Krebs també és una font de precursors per a la biosíntesi d'aminoàcids no essencials tals com l'aspartat i l'asparagina. Per tal de poder mantenir la síntesi d'aquests aminoàcids, la seva producció s'ha d'equilibrar amb un flux anapleròtic de glutamina que alimenta el cicle. La glutamina és incorporada al mitocondri per la glutaminasa tot convertint-se en glutamat el qual a través de la glutamat deshidrogenasa (GDH) o les transaminases és convertit en α -cetoglutarat que s'incorpora al cicle de Krebs. La majoria de cèl·lules tumorals depenen d'una aportació contínua de glutamina per tal de mantenir la integritat dels intermediaris del cicle de Krebs (72). La glutamina, a banda d'aportar esquelets de carboni al cicle de Krebs, és font indispensable del nitrogen necessari per a la formació dels aminoàcids així com també dels nucleòtids per cobrir l'elevada síntesi de DNA de les cèl·lules canceroses. D'altra banda, l'oxidació de l' α -cetoglutarat a oxalacetat contribueix a mantenir l'habilitat de les cèl·lules per sintetitzar citrat. L'oxalacetat resultant es pot convertir a malat, el qual pot ser oxidat fins a piruvat per l'enzim màlic en una reacció que genera NADPH de forma dependent de la glucosa. L' α -cetoglutarat derivat de la glutamina no és l'únic substrat anapleròtic que pot ser usat per les cèl·lules proliferatives, sinó que la glucosa també és una font important d'intermediaris del cicle de Krebs a través de la carboxilació del piruvat que dona lloc a l'oxalacetat, reacció catalitzada per la piruvat carboxilasa (PC) (73).

Tot i que Otto Warburg va assumir que la respiració mitocondrial estava danyada en les cèl·lules tumorals, les cèl·lules canceroses necessiten mitocondris funcionals per a la biosíntesi de macromolècules (74). De fet, s'ha observat que alguns tumors depenen principalment de la fosforilació oxidativa (75) o inclús alternen entre la glicòlisi aeròbica i un metabolisme oxidatiu en funció del microambient presentant així flexibilitat metabòlica (76). Alguns estudis posen de manifest que les subpoblacions quiescents de cèl·lules tumorals, al contrari del que ocorre amb les més proliferatives, són menys glucolítiques i més dependents de la fosforilació oxidativa a la vegada que

presenten una major expressió dels components respiratoris mitocondrials (77). D'altra banda, alguns autors han descrit un fenomen que han anomenat efecte Warburg revers en el qual la glicòlisi aeròbica té lloc en els fibroblasts associats al tumor i no pròpiament a les cèl·lules canceroses. Així, aquests fibroblasts produeixen lactat i piruvat que són transferits a les cèl·lules tumorals adjacents on són oxidats dins el mitocondri (78).

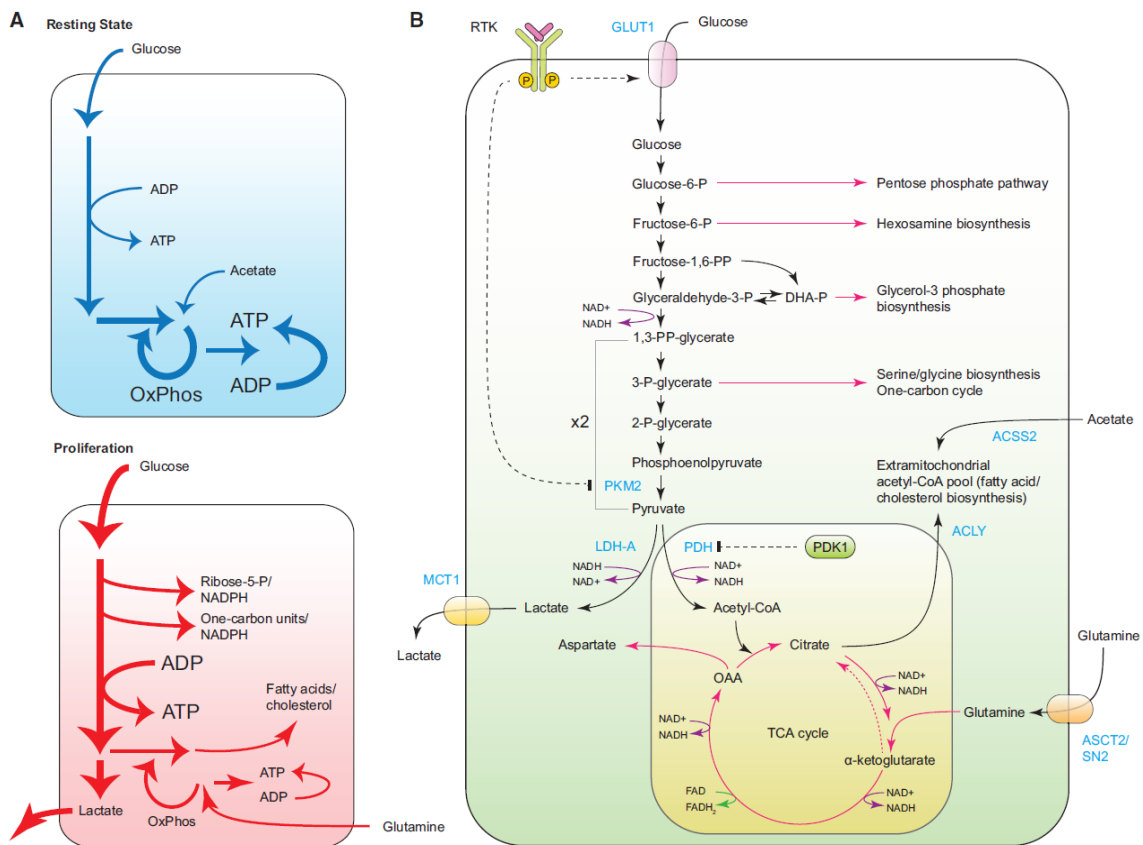


Figura 6. Esquema representatiu de la utilització dels intermediaris de la glicòlisi i del cicle de Krebs per a la biosíntesi i producció de NADH. A) Diferències en el metabolisme central del carboni entre una cèl·lula quiescent i una en estat de proliferació. B) Algunes de les principals sortides biosintètiques del metabolisme central del carboni. Imatge original de Pavlova, N. *et al.* (2016) (65).

D'altra banda, degut a la capacitat de les UCPs per desacoblar la síntesi d'ATP de la respiració cel·lular i pel fet que la UCP2 es troba sobreexpressada en cèl·lules quimioresistents, s'ha especulat amb l'existència d'una relació entre les UCPs i l'efecte Warburg (79).

1.4.3. Alteracions en la regulació gènica

L'activació constitutiva de les senyals de creixement i supervivència present als processos tumorals facilita la reprogramació del metabolisme de les cèl·lules canceroses per aconseguir una major captació de nutrients i una major taxa biosintètica. No obstant, les xarxes metabòliques per sí mateixes no són simplement receptores passives de senyals de creixement, sinó més bé al contrari, ja que transmeten de forma directa la informació sobre l'estat metabòlic de la cèl·lula a tot un conjunt d'enzims reguladors entre els quals destaquen aquells que intervenen en la deposició i eliminació de les marques epigenètiques de la cromatina (80).

L'acetil-CoA és un metabòlit que s'acumula en el citosol quan les cèl·lules metabolitzen més glucosa de la que necessiten per obtenir energia. Aquesta molècula serveix de substrat als enzims que acetilen histones i altres proteïnes. La deposició de grups acetil a les histones és associada amb l'augment de l'accessibilitat del DNA genòmic per interaccionar amb els complexos de transcripció. Així, l'acetilació de les histones és molt sensible a les alteracions de l'estat nutricional de la cèl·lula (81). D'altra banda, les histones també s'alteren per metilació i aquesta es troba regulada per part de certs metabòlits (82). L'eliminació dels grups acetil i metil també es troba regulada per l'estat metabòlic de la cèl·lula. Per exemple, les sirtuïnes, proteïnes amb activitat deacetilasa, utilitzen NAD⁺ i FAD com a cofactors de forma que són sensibles als canvis en la seva disponibilitat i orquestren canvis posttraduccional i epigenètics que promouen la conservació de l'energia (83).

1.4.4. El metabolisme cancerós com a diana terapèutica

En aquesta última dècada, la reprogramació metabòlica de les cèl·lules canceroses s'ha contemplat com a font prometedora de noves dianes farmacològiques per tractar el càncer. Ja s'han realitzat una sèrie d'intents que han conduït a la identificació d'alguns agents que a hores d'ara es troben pròxims a l'avaluació clínica (84), de forma que s'obre una nova finestra terapèutica per al tractament del càncer. S'han realitzat considerables esforços en l'estudi de la combinació de moduladors metabòlics amb les teràpies contra el càncer convencionals. No obstant això, serà necessari un estudi més profund en aquest aspecte de la biologia de les cèl·lules canceroses per impulsar el

desenvolupament d'una nova generació d'agents antineoplàsics cada vegada més selectius i eficients (85).

1.5. Càncer de mama. Leptina i obesitat

L'obesitat i el sobrepès en dones postmenopàusiques són dos factors que incrementen el risc de patir càncer de mama i l'agressivitat del tumor alhora que suposen una pitjor prognòsis (86-88). No obstant això, el mecanisme molecular subjacent que explica aquesta relació entre obesitat i càncer encara no s'ha elucidat. S'ha suggerit que la reacció d'aromatització d'andrògens a estrògens que es dona en el teixit adipós és responsable de l'augment de la taxa de producció local d'estrògens en situacions de sobrepès. D'aquesta manera, un increment d'estrògens podria contribuir al desenvolupament i a la patogenicitat dels càncers de mama sensible a hormones (89). No obstant, es va observar que l'obesitat incrementa el risc tant de càncers de mama ER-positius com ER-negatius. Aquest fet, juntament amb el reconeixement del teixit adipós com a òrgan endocrí actiu, ha conduït a la investigació de les adipoquines, molècules derivades del teixit adipós que podrien explicar millor l'increment del risc de càncer de mama en dones postmenopàusiques (9, 10). De fet s'ha vist que en condicions patològiques, tal com l'obesitat, es pot donar una desregulació de les adipoquines alliberades per aquest teixit desembocant en una situació d'estrès i desordres metabòlics (90, 91). Actualment, s'han identificat més de 50 adipoquines diferents com a reguladores del metabolisme energètic i, entre elles, la leptina ha sigut proposada com la que juga el paper més important en el càncer de mama (92).

1.5.1. Leptina

La leptina és una adipoquina codificada pel gen de la obesitat (*Ob*) que consisteix en una hormona peptídica de 16 kDa sintetitzada i secretada principalment en el teixit adipós i en menor mesura en altres teixits tals com estómac, placenta, múscul, cèl·lules immunitàries i la glàndula mamària (93, 94). Exerceix les seves accions fisiològiques principalment a través del receptor de leptina, producte del gen de la diabetis (*db*). En teixits humans s'han identificat sis isoformes del receptor sent la isoforma més llarga (*ObR_b*) la que presenta la màxima capacitat de senyalització (95).

La leptina és considerada un marcador clau de l'estat nutricional i del metabolisme energètic. Un increment en l'índex de massa corporal es tradueix en un augment de la concentració de leptina en sang la qual actua com a senyal reguladora de l'homeòstasi energètica suprimint la ingesta i incrementant el gast energètic tot actuant directament sobre l'hipotàlem (94, 96). A part de la seva acció a nivell del sistema nerviós central, també s'ha descrit la presència de receptors de leptina en altres teixits perifèrics tals com pàncrees, fetge, ronyons, pulmó, múscul esquelètic, medul·la òssia i mama, entre d'altres (93). En aquests teixits perifèrics, la leptina participa en múltiples funcions com en el desenvolupament fetal, la maduració sexual, la lactància, l'hematopoesi i les respostes immunes (97).

1.5.2. Leptina i càncer de mama

En el desenvolupament normal de la glàndula mamària, la leptina hi juga un paper important (98). No obstant, també ha estat descrita com a factor mitogènic necessari per a la tumorigènesi mamària (97, 99). Estudis inicials en ratolins *knockout* pel gen de la leptina o el seu receptor presentaren una important disfunció del desenvolupament de la glàndula mamària així com també una menor incidència de tumors mamaris espontanis i induïts (100, 101). De fet, s'ha vist que el receptor ObR es troba en la glàndula mamària i que tant aquest com la leptina es troben sobreexpressats en carcinomes ductals invasius (102), considerant-se senyals de mal pronòstic (103). En concordança amb aquests resultats, treballs *in vitro* també han mostrat que el tractament amb leptina (25-100 ng/mL) estimula la proliferació en línees de càncer de mama ER-positives (MCF-7, T47D), ER-negatives (MDA-MB-231, SKBR3) i en la línia epitelial de mama no transformada HBL100 (98, 104).

La leptina és una citocina que activa diverses vies de senyalització que estan fortament relacionades amb la proliferació cel·lular i la supervivència (incloent JAK2/STAT3, Ras/ERK1/2, PI3K/AKT/GSK3 (95, 99, 105)), resistència a l'apoptosi, adhesió cel·lular, invasió i migració en càncer de mama (11). No obstant això, encara es coneix poc sobre els efectes de la leptina en el metabolisme de les cèl·lules canceroses de mama, mentre que els efectes metabòlics de la leptina en teixits sans han estat més estudiats. Un estudi realitzat en ratolins transgènics que

sobreexpressen aquesta hormona va mostrar que aquests presentaven un consum més elevat d'oxigen (106), així com també s'ha vist que la leptina incrementa el consum d'oxigen en fetge de rates (107). A més, en múscul esquelètic i teixit adipós, la leptina promou la dissipació d'energia a través d'un increment de l'oxidació dels àcids grassos (108). En concordança amb aquests resultats, alguns estudis suggereixen que la diana d'acció de la leptina en aquests teixits és l'AMPK, que juga un paper important en la regulació en el metabolisme energètic de la cèl·lula (109, 110).

1.6. Polifenols

Els polifenols són compostos naturals que sintetitzen els vegetals i la principal funció és la de protecció front infeccions de patògens bacterians o fúngics i altres agents nocius, com la radiació ultraviolada (111). Tots els polifenols deriven d'un intermediari comú, la fenilalanina, o de l'àcid shikímic. Es caracteritzen per presentar varis anells fenòlics per molècula i en funció del nombre d'anells i de les característiques dels elements estructurals que els uneixen es classifiquen en àcids fenòlics, flavonoids, estilbens, lignans i tanins (112).

Els polifenols són constituents naturals de la dieta ja que es troben en abundància en les fruites, verdures, cereals integrals i begudes derivades d'aquets aliments tals com el te, el cafè, la cervesa i el vi. Aquests compostos aporten amargor, astringència, color, sabor, olor i estabilitat oxidativa a l'aliment que els conté (113). Cap a finals del segle XX, estudis epidemiològics suggerien fermament que el consum d'una dieta rica en polifenols a llarg termini s'atribueix a un risc menor de patir problemes cardiovasculars, inflamació crònica, diabetis, obesitat, malalties neurodegeneratives i altres malalties associades amb l'envelliment, així com el càncer (114, 115). Així, els polifenols són objecte d'interès científic creixent degut als seus possibles efectes beneficiosos sobre la salut humana.

La biodisponibilitat dels polifenols depèn en major mesura de la seva estructura que de la concentració en la que es troben en els aliments. L'estructura molecular determina com és la seva absorció i si té lloc a l'intestí prim o al colon. Alguns polifenols poden ser absorbits en la forma nativa però la majoria necessiten ser

hidrolitzats pels enzims intestinals o la flora bacteriana, de forma que es modifiquen de manera significativa: primer són conjugats en les cèl·lules intestinals i després són modificats en el fetge per metilació, sulfatació i/o glucuronidació (116). Així, les formes polifenòliques que arriben a la sang i teixits difereixen de les que es troben en els aliments, la qual cosa dificulta la identificació dels metabòlits i l'avaluació de l'activitat biològica (117).

1.6.1. Polifenols i càncer

Un gran nombre d'estudis de tipus epidemiològic, preclínic i clínic posen de manifest la capacitat dels polifenols per prevenir i tractar el càncer en diversos models cel·lulars i animals (118, 119). Els polifenols són capaços d'inhibir la iniciació, promoció i progressió dels estats cancerosos (120), de forma que constitueixen un grup de compostos prometedors per ser usats en tractaments anticancerígens.

Molts polifenols han estat estudiats per la seva activitat antioxidant, però també s'ha vist que poden actuar com a oxidants en funció de la dosi (121). L'efecte anticancerígen d'aquest grup de compostos s'atribueix al paper antioxidant que s'ha vist que exerceixen a dosis fisiològiques. A dosis més elevades, difícils d'aconseguir a través del consum diari normal, s'ha vist que exerceixen un efecte prooxidant que podria contribuir a l'aparició d'estats cancerosos (122). És precisament aquest efecte prooxidant el que converteix aquests compostos en potencials teràpies coadjuvants juntament amb els actuals fàrmacs prooxidants que s'usen per tractar el càncer.

S'ha vist que els polifenols exerceixen efectes anticancerígens a través de múltiples mecanismes d'acció: eliminació d'agents carcinogènics, activació dels enzims antioxidants, regulació del sistema immunitari, activitat antiinflamatòria, modulació de la senyalització cel·lular, inducció de l'apoptosi i aturada del cicle cel·lular (123). Alguns polifenols poden ser considerats fitoestrògens degut a que presenten una estructura similar a la dels estrògens i es consideren moduladors selectius dels receptors estrogènics (124). Especial interès ha suscitat el paper dels fitoestrògens en el càncer de mama degut a que les propietats estrogèniques d'aquests compostos podrien ser perjudicials en el càncer de mama sensible a estrògens (125).

En la darrera dècada, han sorgit tota una sèrie d'estudis relacionats amb la capacitat de certs polifenols per modular el metabolisme de la cèl·lula tumoral (126). Com a exemple, s'ha vist que els polifenols són capaços de modular la dinàmica de la cromatina i certes vies epigenètiques (127) tot afectant l'activitat reguladora de proteïnes clau en el metabolisme cancerós, tals com la SIRT1 (128). Aquests estudis apunten cap a un futur dels polifenols com a eina per modular el metabolisme cancerós tot forçant les cèl·lules cap a unes rutes metabòliques menys avantatjoses per a la seva supervivència, contribuint així en la destrucció de les cèl·lules tumorals conjuntament amb les teràpies anticancerígenes convencionals.

1.6.2. Paper de les sirtuïnes en el càncer. Polifenols

Les sirtuïnes són una família de proteïnes amb activitat deacetilasa que detecten i responen als canvis energètics cel·lulars degut a que la seva activitat depèn del cofactor NAD⁺ (129). Juguen un paper essencial en les vies de senyalització que regulen la longevitat, a través de l'activació de respostes per assegurar l'estabilitat genòmica, el manteniment de l'homeòstasi metabòlica, la supervivència en condicions d'estrès així com la proliferació i diferenciació cel·lulars (130). En mamífers s'han descrit set tipus de sirtuïnes amb diferent localització subcel·lular. Múltiples evidències estableixen que el càncer és una malaltia associada a l'envelliment, de forma que ha estat inevitable estudiar la relació entre les sirtuïnes i la carcinogènesi sent les SIRT1 i SIRT3 les que han rebut més atenció en aquesta malaltia.

Com ja s'ha comentat, el mitocondri juga un paper central en la carcinogènesi a través de la generació de ROS. La disfunció mitocondrial associada a l'alteració del metabolisme oxidatiu s'ha observat en cèl·lules tumorals i sembla contribuir a l'estrès oxidatiu crònic. Tant la SIRT1 com la SIRT3 es troben involucrades en la modulació de la funció mitocondrial: la SIRT1 controla la inducció i progressió de la biogènesi mitocondrial (131) i la SIRT3 es troba principalment en el mitocondri i regula l'estrès oxidatiu a través de la desacetilació de substrats involucrats en la producció i detoxificació de ROS (132, 133), així com també en la β -oxidació i metabolisme dels aminoàcids tot activant el metabolisme energètic (134). La hipòtesi actual indica que la SIRT3 podria conduir a les cèl·lules tumorals cap a un metabolisme més oxidatiu,

revertint parcialment l'efecte Warburg (135). En aquest sentit, en els darrers anys alguns estudis manifesten la capacitat d'alguns tipus de polifenols per modular l'expressió i/o activitat de les sirtuïnes. Especialment s'ha vist que alguns polifenols poden activar la SIRT₁ (136).

1.6.3. Xantohumol, 8-prenilnaringenina i càncer de mama

El xantohumol (XN) és el principal flavonoid prenilat de les inflorescències femenines del llúpul (*Humulus lupulus* L.). Aquesta planta també conté el flavonoid 8-prenilnaringenina (8-PN), amb importants propietats estrogèniques. El llúpul és utilitzat en l'elaboració de la cervesa per aportar sabor i amargor de forma que és la principal font dietètica d'aquests polifenols (137). El XN s'ha descrit com a agent anticancerós d'ampli espectre en estudis *in vitro* (137). L'estudi del XN com a agent quimiopreventiu i quimioterapèutic contra el càncer ha guanyat importància en la darrera dècada ja que s'ha vist que inhibeix la iniciació, promoció i progressió de la carcinogènesi (138, 139) així com també la metastasi (140). Específicament en la línia de càncer de mama MCF-7 s'ha vist que el XN inhibeix el creixement cel·lular i indueix l'apoptosi (141, 142) i un dels mecanismes que ho expliquen és que el XN causa un efecte oxidant a través d'un increment de ROS (143, 144). D'altra banda, també s'ha vist que la 8-PN exerceix activitat quimiopreventiva contra el càncer (145) i inhibeix l'activitat aromatasa (146).

1.6.4. Resveratrol i càncer de colon

El resveratrol (RSV) és un polifenol que es troba en els cacauets, en les baies i en grans quantitats en la pell del raïm vermell tot convertint el vi en una font important d'aquest compost (147). El paper antienvelliment del RSV ha rebut especial importància i es basa en que actua com a un mimètic de la restricció calòrica, condició que allarga la vida en models animals i protegeix front malalties associades a l'edat. D'aquesta forma, s'ha demostrat la seva funció protectora davant patologies cardiovasculars, tals com l'arteriosclerosi i la hipertensió, així com també la diabetis, obesitat i malalties neurodegeneratives (114).

En els darrers anys, les propietats anticancerígenes del RSV han estat estudiades en més profunditat. Com a resultat, s'ha descrit la seva capacitat per inhibir la iniciació, promoció i progressió dels estats cancerosos en línies cel·lulars i models animals (118, 119). No obstant, els estudis en humans són escassos ja que la seva biodisponibilitat en alguns teixits és limitada degut a que després de ser consumit amb la dieta es metabolitza ràpidament en les cèl·lules intestinals. Per aquest motiu, els efectes anticancerígens en el tracte gastrointestinal són els que adquireixen més importància, degut a l'efecte local del RSV abans de la seva metabolització (148).

El mitocondri s'ha descrit com a diana important del RSV, de forma que molts dels seus efectes són atribuïts a una modulació de la funció i dinàmica mitocondrials (149). En relació amb aquests efectes sobre el mitocondri, alguns estudis han suggerit que el RSV és capaç de modular el metabolisme cancerós. Per exemple, en càncer d'ovari i de mama el RSV redueix el metabolisme glucídic disminuït la viabilitat cel·lular i induint apoptosi (150, 151). Aquests resultats suggereixen que la reprogramació metabòlica podria ser un dels mecanismes anticancerígens del RSV. Pel que fa a les dianes d'acció d'aquest polifenol, les sirtuïnes han estat suggerides com a possibles candidates ja que s'ha vist que és capaç d'activar la SIRT1 (152). La identificació de les dianes d'acció cel·lulars responsables dels efectes del RSV serà necessària per incrementar l'eficàcia terapèutica d'aquest compost.

En resum, les evidències científiques que demostren que el metabolisme és un component clau del procés carcinogènic i que pot constituir una finestra terapèutica que permeti atacar el tumor de manera més selectiva o bé incrementar l'eficàcia de teràpies ja desenvolupades, són cada vegada més nombroses. Les senyals que regulen el metabolisme cel·lular, tant les hormones com compostos que mimetitzen o antagonitzen la seva acció, es converteixen en una clau mestra per poder modular el particular metabolisme de la cèl·lula tumoral i comprometre la seva viabilitat. En aquest context, la modulació metabòlica per part de la leptina i alguns polifenols suposen un model excepcional per estudiar el metabolisme de la cèl·lula tumoral.

2. OBJECTIUS I PLANTEJAMENT EXPERIMENTAL

Els estudis d'aquesta tesi doctoral s'emmarquen dins dels objectius de tres projectes desenvolupats en el Grup Multidisciplinar d'Oncologia Traslacional (GMOT) del departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut de la Universitat de les Illes Balears (UIB). Els projectes "*Metabolismo energético de la célula tumoral: una posible diana en el tratamiento del cáncer de mama (PI12-01827)*", "*Acción del flavonoide 8-prenilnaringenina (8-PN), principio estrogénico contenido en el lúpulo de la cerveza, sobre la modulación de los niveles de producción de ROS en líneas celulares de cáncer de mama con diferente ratio ER α /ER β* ", de tipus més aplicat, i el tercer "*Hacia un diagnóstico personalizado en el cáncer colorectal: influencia del metabolismo energético y estrés oxidativo en la respuesta al tratamiento (PI14/01434)*" presenten com a objectiu l'estudi de les característiques del metabolisme energètic tumoral com a diana per desenvolupar noves estratègies terapèutiques amb el denominador comú d'atacar el càncer des del seu particular metabolisme.

Estudis previs en el nostre grup d'investigació han posat de manifest la capacitat de la leptina per induir la proliferació cel·lular i disminuir l'estrès oxidatiu en la línia de càncer de mama MCF-7 (104, 153), tot aportant propietats avantatjoses per a l'avanç de l'estat cancerós. Actualment, es coneix que aquesta adipoquina es troba involucrada en el desenvolupament normal i tumoral del creixement mamari (94, 96-99) i que els seus nivells en sèrum s'incrementen a mesura que ho fa l'adipositat (154) de forma que la hiperleptinèmia associada a l'obesitat és un factor de risc per al desenvolupament de càncer de mama en dones postmenopàusiques obeses (86). D'altra banda, i al contrari del que va postular inicialment Otto Warburg (63), en la darrera dècada s'ha vist que el manteniment de mitocondris funcionals és un factor important per a la supervivència i proliferació de les cèl·lules canceroses (155). Per mantenir una funcionalitat adequada els mitocondris sofreixen contínuament processos de fusió i fissió (156), mentre que la biogènesi mitocondrial i la mitofàgia són dos processos coordinats que també contribueixen a aquest fi (157). Atesa la relació entre leptina i càncer de mama i la recent reconeguda importància de les funcions mitocondrials en les cèl·lules canceroses, ens vam plantejar analitzar els efectes d'aquesta hormona sobre la funcionalitat, dinàmica, biogènesi i mitofàgia mitocondrials en la línia de càncer de mama MCF-7. Amb aquesta finalitat, es va

començar per corroborar els efectes de la leptina sobre la proliferació cel·lular, la producció de ROS i el dany oxidatiu en proteïnes. A continuació, per a l'estudi dels efectes de la leptina sobre la funcionalitat mitocondrial, es van determinar els nivells d'ATP a nivell basal i també en presència d'un inhibidor de la glicòlisi (2-DG) o de l'ATPasa (oligomicina). A més, es va determinar el rati de consum d'oxigen (OCR) basal, en presència d'oligomicina i amb un inhibidor de la cadena de transport electrònic (antimicina A) de forma que es va poder conèixer el consum d'oxigen dependent de la producció d'ATP i del *proton leak*. D'altra banda, es va estudiar la biogènesi i dinàmica mitocondrials a partir de la determinació de l'expressió dels gens involucrats en la biogènesi mitocondrial (PGC-1 α , TFAM i mtSSB), en la fusió (OPA1, MNF1 i MFN2) i en la fissió (FIS1 i DRP1) mitjançant RT-PCR i *Western blot*. Per a l'estudi de la biomassa mitocondrial es va analitzar l'expressió dels complexos de l'OXPPOS per *Western blot* així com les activitats màximes de l'ATPasa i la COX. A més, es va determinar la biomassa mitocondrial, lisosomal i autofagosomal amb marcadors fluorescents i es va analitzar la mitofàgia a partir de la colocalització de mitocondris i lisosomes per microscòpia confocal i de la determinació de la fosforilació de l'AMPK, principal regulador de l'autofàgia. Els resultats i conclusions obtinguts es presenten en el **Manuscrit I**.

A partir de l'observació en el treball anterior de la capacitat de la leptina per estimular el funcionament mitocondrial, vam voler estudiar els efectes d'aquesta hormona en el metabolisme mitocondrial tumoral. Quan una cèl·lula sana es transforma en tumoral, necessita reprogramar el seu metabolisme per fer front a l'elevada proliferació pròpia de les cèl·lules canceroses (64, 74). En els darrers anys, s'està reavaluant la teoria de l'efecte Warburg segons la qual les cèl·lules tumorals obtenen l'energia de la glicòlisi degut a que els mitocondris són disfuncionals (158). I és que el funcionament de les vies anabòliques, tals com la via de les pentoses fosfat i el cicle de Krebs, és essencial per mantenir una elevada síntesi de proteïnes, àcids grassos i àcids nucleics pròpies d'un estat cancerós (74). D'aquesta forma, la presència de mitocondris funcionals es fa necessària i, de fet, s'ha vist que alguns tumors depenen principalment de la fosforilació oxidativa per a la seva supervivència (75, 159). La importància de l'estudi de les característiques del metabolisme energètic tumoral radica en el fet que aquest

està sent avaluat com a diana per al desenvolupament d'estratègies terapèutiques que ataquen el càncer des del seu particular metabolisme. En aquesta línia, i en vista de que en el treball anterior la leptina és capaç d'estimular el funcionament mitocondrial, vam voler seguir profunditzant en els efectes d'aquesta adipoquina sobre el metabolisme i la bioenergètica tumorals en la línia MCF-7, especialment en relació al rol del mitocondri en aquets processos. Per a tal fi es va analitzar l'ús metabòlic dels distints combustibles dels que disposa la cèl·lula tumoral: glucosa, àcids grassos i aminoàcids. Les cèl·lules van ser tractades amb leptina i es va determinar l'efecte sobre l'OCR, la producció d'ATP, la captació de glucosa i la producció de lactat. Per a una millor comprensió dels canvis que la leptina indueix en les distintes vies bioenergètiques, es van utilitzar inhibidors específics de la glicòlisi (2-DG), de la β -oxidació (etomoxir) o es va privar les cèl·lules d'aminoàcids. L'activació de determinades rutes metabòliques es va confirmar mitjançant l'anàlisi dels nivells de proteïnes reguladores d'aquestes vies mitjançant *Western blot* (CD36, CPT1, PPAR α , pAMPK, AMPK, OXPHOS, GLUT2, GAPDH, LDH i PDH) i mesurant les activitats dels enzims metabòlics CS, G6PDH, PC i PDH. Els resultats d'aquest estudi i les seves conclusions es compilen en el **Manuscrit II**.

El nostre grup d'investigació ha comprovat, en estudis anteriors, la capacitat del fitoestrogen genisteïna per modular la viabilitat cel·lular, l'estrès oxidatiu i la funcionalitat mitocondrial en la línia de càncer de mama MCF-7 (160, 161). En vista d'aquests resultats i amb l'objectiu d'aprofundir en l'efecte dels fitoestrògens sobre el funcionament mitocondrial, es va voler estudiar l'efecte dels polifenols xantohumol (XN) i 8-prenilnaringenina (8-PN), considerat un dels fitoestrògens més potents, sobre el metabolisme oxidatiu mitocondrial en la línia de càncer de mama MCF-7. El XN i la 8-PN es troben de forma natural en la planta del llúpul la qual és utilitzada en el procés d'elaboració de cervesa per aportar sabor i amargor (137). Els efectes preventius i quimioterapèutics d'aquests compostos en relació al càncer han estat estudiats i s'ha vist que el XN inhibeix *in vitro* la iniciació, promoció i progressió de la carcinogènesi (138), sent la inducció de l'estrès oxidatiu un dels mecanismes antiproliferatius del XN (143). A dosis fisiològiques, la majoria de polifenols exerceixen un efecte protector davant l'aparició del càncer el qual és atribuït al seu paper antioxidant (121). No

obstant, aquests compostos juguen un doble rol ja que a dosis més elevades, difícils d'aconseguir a través del consum diari normal, provoquen un efecte prooxidant que podria contribuir a l'aparició d'estats cancerosos (122). Aquest paper prooxidant, a la vegada, converteix aquests compostos en potencials teràpies coadjuvants en el tractament del càncer. A partir d'aquest paper dual que poden exercir els polifenols, ens vam proposar estudiar els efectes d'un rang de dosis de XN i 8-PN en la viabilitat cel·lular de la línia de càncer de mama MCF-7. A més, es va investigar el paper oxidant d'aquests compostos determinant els nivells de ROS, l'estat de carbonilació proteica així com l'activitat dels enzims antioxidants CAT, SOD i GRd. L'efecte sobre la funcionalitat mitocondrial es va comprovar a través de la determinació dels nivells proteics de SIRT₁, SIRT₃ i dels complexos de l'OXP_{HOS}. El **Manuscrit III** recull els principals resultats i conclusions d'aquest treball.

En la mateixa línia d'investigació dels efectes dels fitoestrògens en el càncer, en un estudi previ en el nostre grup, vam observar que el resveratrol (RSV) exerceix un efecte citotòxic en la línia de càncer de colon SW620 (162). El RSV és un fitoestrogen que es troba en abundància a la pell del raïm vermell, convertint així el vi negre en la principal font dietètica d'aquest compost. La relació existent entre el RSV i càncer es basa en l'observació de que aquest fitoestrogen és capaç d'inhibir la iniciació, promoció i progressió d'estats cancerosos (120). Degut a que el RSV és eficientment absorbit en el tracte gastrointestinal abans de ser metabolitzat, els efectes anticancerígens més notables s'han descrit en aquest teixit (148, 163). A més, nombrosos estudis in vitro i en models animals han demostrat que el mitocondri és una diana d'acció important del RSV però els efectes moduladors sobre la dinàmica i funció mitocondrials són en certa manera controvertits (149, 164, 165). Mentre que en algunes línies cel·lulars sanes i canceroses així com en models animals s'ha vist que el RSV millora la funcionalitat i/o biogènesi mitocondrial (149, 164, 166), en altres provoca disfuncionalitat d'aquest orgànul (165, 167). Tenint en compte que els mecanismes pels quals el RSV regula la funcionalitat mitocondrial no es troben a hores d'ara elucidats i considerant el seu potencial anticancerigen, vam decidir estudiar els efectes d'aquest fitoestrogen en el metabolisme i bioenergètica mitocondrials de la línia de càncer de colon SW620. Per això, es van tractar les cèl·lules amb una dosi

fisiològica de RSV i es va analitzar la funcionalitat mitocondrial a partir de l'OCR en presència d'inhibidors mitocondrials (oligomicina, FCCP i antimicina A) per conèixer l'oxigen consumit a nivell basal, en la producció d'ATP i en el *proton leak* així com la respiració màxima i la capacitat respiratòria de reserva. A més, es va realitzar un assaig MTT per conèixer l'activitat de les oxidoreductases i es va determinar l'activitat COX. Per ampliar l'estudi de l'efecte del RSV sobre el mitocondri, es va analitzar la biogènesi mitocondrial amb tècniques de *Western blot* (OXPHOS, PGC-1 α , NRF1, NRF2 i TFAM) així com amb marcadors fluorescents (MTG i NAO) i determinant els nivells de mtDNA. Amb l'objectiu d'analitzar possibles efectes del RSV en les vies metabòliques, es va determinar l'ús dels diferents combustibles metabòlics mitjançant l'estudi de l'OCR, els nivells d'ATP i la producció de lactat en presència d'inhibidors específics de la glicòlisi (2-DG), de la β -oxidació (etomoxir) o en deprivació d'aminoàcids, així com també es van determinar els nivells proteics de PDH i LDH. Amb la finalitat d'identificar possibles dianes d'acció del RSV es van determinar els nivells proteics de les SIRT1 i 3 i dels receptors estrogènics (ER α , ER β i ERR α). La viabilitat cel·lular, la producció de ROS, el potencial de membrana i els nivells d'autofàgia (MDC) i d'apoptosi (ruptura de la PARP, nivells d'annexina V i cicle cel·lular) van aportar informació sobre els efectes citotòxics del RSV en la línia SW620. Per últim, es va analitzar l'efecte citotòxic d'una combinació de RSV i del quimioterapèutic 5-fluorouracil. Els resultats obtinguts en aquest estudi i les seves conclusions es discuteixen en el **Manuscrit IV**.

Els treballs recollits en aquesta tesi s'han dut a terme sota la direcció de la Dra. M^a del Pilar Roca Salom i del Dr. Adamo Valle Gómez en el Grup Multidisciplinari d'Oncologia Traslacional (GMOT) de l'Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut (IUNICS) de la Universitat de les Illes Balears (UIB) i de l'Institut d'Investigació Sanitària de Palma (IdISPa). Durant la realització d'aquesta tesi, la doctoranda ha gaudit d'una beca d'investigació de postgrau del programa *Becas de Investigación Manuel de Oya del Centro de Información, Cerveza y Salud* (Madrid, Espanya) i principalment d'una beca predoctoral del *Programa Nacional de Formación de Profesorado Universitario* (FPU) del Ministeri d'Educació, Cultura i Deport del Govern Espanyol. A més, gràcies a l'obtenció d'una ajuda del programa *Ayudas*

complementarias para beneficiarios de ayudas FPU, del mateix ministeri, la doctoranda ha pogut realitzar una estada doctoral de tres mesos en el *Research Department of Cancer Biology* del *Cancer Institute* a la *University College London (UCL)* sota la tutela del Dr. Pablo Rodríguez Viciano. D'altra banda, el present treball ha estat possible gràcies als projectes d'investigació finançats pel *Fondo de Investigaciones Sanitarias del Instituto de Salud Carlos III* del Govern d'Espanya (PI12/01827 atorgat en el 2012 i PI14/01434 atorgat en el 2014) així com a les ajudes de la Comunitat Autònoma de les Illes Balears (CAIB) cofinançades amb fons FEDER "Una manera de hacer Europa" (31/2011 i AAEE22/2014). Finalment, s'ha comptat també amb el finançament del *Centro de Investigaciones Biomédicas en Red de Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición* (Ciberobn, CBo6/03) del *Instituto de Salud Carlos III*.

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1. Cultius cel·lulars

3.1.1. Característiques de les línies cel·lulars MCF-7 i SW620

La línia cel·lular MCF-7, de l'*American Type Culture Collection*, va ser obtinguda al 1970 d'un adenocarcinoma mamari metastàtic d'una dona caucàsica de 69 anys. Es tracta de cèl·lules epitelials adherents amb un temps de duplicació de la població de 29 h que creixen en monocapa. Són àmpliament utilitzades en estudis del càncer de mama *in vitro* degut a que conserven característiques particulars de l'epiteli mamari, tals com la capacitat de resposta a estrògens a través de receptors estrogènics del citoplasma. D'aquí que siguin un model molt emprat per a l'estudi del càncer mamari hormonodependent.

La línia cel·lular SW620, també de l'*American Type Culture Collection*, procedeix d'un adenocarcinoma colorectal metastàtic d'un home caucàsic de 51 anys. Aquesta línia es troba formada per cèl·lules epitelials adherents, principalment de morfologia petita, individual i esfèrica així com també bipolar. Són de creixement ràpid i molt tumorigèniques en ratolins immunodeprimits.

3.1.2. Procediments generals de cultius: manteniment i subcultiu

El treball amb les cèl·lules es realitza en condicions estàndard de cultiu cel·lular mantenint un ambient estèril per reduir el risc de contaminació. Les línies treballades requereixen un nivell de bioseguretat I, de forma que s'empren cabines de seguretat de classe I. Les cèl·lules es mantenen a 37 °C en una atmosfera al 5 % de CO₂. El medi de cultiu rutinari és *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM) amb una elevada concentració de glucosa (4,5 g/l) suplementat amb un 10 % de sèrum fetal boví (FBS) i un 1 % d'antibiòtics (penicil·lina 100 U/ml, estreptomicina 0,1 mg/ml). Pel manteniment de les cèl·lules s'empren plaques p100, amb una superfície de creixement aproximada de 55 cm².

Quan la confluència cel·lular arriba al 70 – 80 % es realitzen subcultius emprant una solució de tripsina al 0,25 % i 0,02 % d'EDTA, per obtenir les cèl·lules en suspensió i fer-les créixer en plaques noves. Després d'eliminar el medi de cultiu, s'eliminen les restes de medi amb un rentat amb tampó PBS i es pipeteja 1 ml de tripsina-EDTA que

es deixa incubar durant cinc minuts a 37 °C per desenganxar les cèl·lules de la placa. Seguidament s'inactiva la solució de tripsina-EDTA amb 4 ml de medi complet i les cèl·lules recollides es dipositen en una placa nova. El rati de subcultiu emprat varia entre 1:3 i 1:4 per les MCF-7 i entre 1:4 i 1:6 en el cas de les SW620.

3.1.3. Tractaments

Es sembren les cèl·lules a una confluència tal que el dia del tractament sigui del 80 %. En el Manuscrit II i III, 24 h abans del tractament, el medi de les cèl·lules es canvia a DMEM sense roig fenol suplementat amb un 10 % de *charcoal-stripped* FBS i un 1 % d'antibiòtics (penicil·lina 100 U/ml, estreptomicina 0,1 mg/ml) i el dia del tractament aquest es subministra dissolt en aquest mateix tipus de medi. Els tractaments realitzats en aquesta tesi són:

Manuscrit	Compost	Concentració	Durada	Vehicle	Canvi previ de medi
I	Leptina	50 ng/ml	24 h	Medi	No
II	Leptina	100 ng/ml	24 h	Medi	Si
III	XN	0,001 – 20 µM 0,01 i 5 µM	48 h	0,1 % DMSO	Si
III	8-PN	0,001 – 20 µM 0,01 i 1 µM	48 h	0,1 % DMSO	Si
IV	RSV	5 – 160 µM 10 µM	48 h	0,03 % DMSO	No

3.2. Metodologia de les determinacions realitzades

3.2.1. Anàlisi de la viabilitat cel·lular

L'efecte dels tractaments sobre la viabilitat cel·lular es determina sembrant les cèl·lules en plaques de 96 pouets (de fluorimetria per a la tècnica del hoechst i d'espectrofotometria per al cristall violeta), realitzant els tractaments pertinents i determinant la densitat cel·lular mitjançant l'ús d'una de les següents tècniques:

- Hoechst 33342. S'elimina el medi dels pouets, es realitza un rentat amb PBS i es pipetegen 100 µL d'una solució de hoechst 0,01 mg/ml en PBS dins cada pouet. Es deixa incubar la placa durant 5 minuts a 37 °C. A continuació, es determina la fluorescència de forma puntual amb unes longituds d'ona d'excitació i d'emissió de 360 i 460 nm, respectivament.

- Cristall violeta. Sense eliminar el medi dels pouets, s'afegeixen 20 µl de cristall violeta 0,5 % (p/v) en àcid acètic al 30 % i es deixa incubar durant 10 minuts a temperatura ambient. A continuació, s'elimina el medi i es realitzen varis rentats amb aigua destil·lada. Finalment es solubilitza el cristall violeta amb metanol, s'agita la placa uns minuts i es llegeix l'absorbància a 570 nm.

Aquests mètodes s'utilitzen també per referenciar alguns paràmetres determinats pel nombre de cèl·lules.

3.2.2. Determinació dels nivells i la producció de ROS

Una de les tècniques emprades per avaluar el nivell d'estrès oxidatiu cel·lular és la determinació dels nivells i de la producció de ROS. Per a tal fi, es sembren les cèl·lules en plaques de fluorimetria de 96 pouets, es realitzen els tractaments pertinents i es procedeix amb una de les següents tècniques:

- DCFDA (diacetat de 2',7'-diclorofluoresceïna), compost que s'oxida en presència de ROS i emet fluorescència. S'elimina el medi dels pouets, es realitza un rentat amb PBS i es pipetegen dins cada pouet 100 µL d'una solució de DCFDA 10 µM en PBS suplementada amb glucosa 20 mM. Es deixa incubar la placa durant 15 minuts a 37 °C. A continuació, es determina la fluorescència de forma puntual amb unes longituds d'ona d'excitació i d'emissió de 485 i 528 nm, respectivament.

- Amplex Red® (10-acetil-3,7-dihidrofenoaxina de *Thermo Fisher Scientific*), compost que reacciona amb el H₂O₂ i, mitjançant una reacció catalitzada per la peroxidasa, es forma el compost fluorescent resorufina. S'elimina el medi dels pouets, es fa un rentat amb PBS i s'introdueixen 100 µL de tampó Krebs-Ringer fosfat (NaCl 145 mM, KCl 4,86 mM, CaCl₂ 0,54 mM, MgSO₄ 1,22 mM, glucosa 5,5 mM i fosfat de sodi 5,7 mM a pH 7,4), suplementat amb Amplex Red® 50 µM i peroxidasa de rave (HRP) 0,1 U/ml. Es monitoritza la fluorescència durant una hora amb unes longituds d'ona d'excitació i d'emissió de 570 i 585 nm, respectivament.

Aquests paràmetres es normalitzen per la densitat cel·lular determinada amb els mètodes del hoechst o cristall violeta, descrits anteriorment.

3.2.3. Determinació de la concentració de proteïnes

La tècnica del *Western blot* i l'anàlisi de les activitats enzimàtiques requereixen la determinació de la concentració de proteïnes de la mostra per carregar en el gel la mateixa quantitat de proteïna de totes les mostres i per referenciar els valors d'activitat per mg de proteïna, respectivament. Per a tal fi, s'utilitza el mètode de l'àcid bicinconínic (BCA) que es basa en la capacitat de les proteïnes per reduir ions cúprics a cuprosos en condicions alcalines. Aquests ions cuprosos reaccionen amb el BCA i aquest passa d'un color verdós a un color rosat, la intensitat del qual és proporcional a la quantitat de proteïna de la mostra. Per dur-ho a terme, s'usa un *kit* comercial (BCA *protein assay kit*, de *Thermo Fisher Scientific*), seguint les indicacions del fabricant.

3.2.4. Determinació semiquantitativa dels nivells de proteïna per *Western blot*

Per quantificar de forma relativa els nivells de certes proteïnes individuals de les mostres s'utilitza la tècnica del *Western blot*. Aquesta comprèn una separació inicial de les proteïnes en funció del seu pes en un gel, la seva transferència a una membrana i finalment la detecció de la proteïna desitjada mitjançant l'ús d'anticossos específics.

3.2.4.1. Recollida de les mostres

El primer pas de la tècnica del *Western blot* és recollir les cèl·lules i obtenir-ne un lisat. Per això, s'elimina en medi de les cèl·lules sembrades en p100 i es fa un rentat amb PBS per eliminar restes de medi, a continuació s'afegeixen 800 µl de tampó de lisi RIPA fred la composició del qual és: Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, SDS 0,1 %, deoxicolat sòdic 0,5 %, Tritó x-100 1 %, EDTA 1 mM, Na₃VO₄ 1 mM, PMSF 1 mM, leupeptina 0,01 mM, pepstatina 0,01 mM i NaF 1 mM a pH 7,5. Una vegada pipetejat el tampó, es recullen les cèl·lules mitjançant l'ús de *scrappers* i es transfereixen a tubs. Seguidament, es soniquen les mostres (amplitud 40 %, tres polsos de 10 segons), en gel per evitar que s'encalenteixin. Finalment, es realitza una centrifugació a 14.000 g durant 10 minuts a 4 °C i el sobrenedant és utilitzat per carregar el gel mentre que el precipitat es descarta. Seguidament, es determina la concentració proteica de les mostres tal i com s'ha descrit anteriorment mitjançant el mètode del BCA.

3.2.4.2. Preparació de les mostres

Una vegada que les proteïnes cel·lulars es troben ben solubilitzades i s'ha determinat la concentració proteica, es procedeix a preparar les mostres. En aquesta tesi s'han carregat els gels amb una concentració de proteïna d'entre 30 i 40 µg. Es preparen les mostres en tubs pipetejant el volum de mostra que conté la quantitat de proteïna desitjada, tampó de càrrega amb una relació 3:1 (volum final:tampó) i el volum de tampó RIPA necessari per ajustar i carregar el mateix volum de totes les mostres. Els components del tampó de càrrega i la seva concentració són: Tris 0,25 M pH 6,8, SDS 10 % (v/v), glicerol 40 % (v/v), blau de bromofenol 0,1 % (p/v) i s'afegeix un 10 % de β-mercaptoetanol en el moment de la seva utilització. Una vegada preparades les mostres i abans de carregar-les en el gel, es bullen durant 5 minuts per tal de desnaturalitzar les proteïnes i facilitar la unió del SDS.

3.2.4.3. Electroforesi SDS-PAGE

Per a l'electroforesi de les proteïnes es preparen gels de poliacrilamida formats per un gel concentrador de menor concentració i un gel separador de concentració superior. Aquesta diferència de concentracions fa possible una major resolució en la separació de proteïnes. Es disposen els gels en cubetes electroforètiques que s'omplen amb tampó d'electroforesi i es carreguen les mostres preparades. Es tanca el sistema i es connecta a una font d'electroforesi aplicant un voltatge de 80 V durant els primers 15 minuts i posteriorment de 100 V, deixant córrer les mostres el temps desitjat en funció del pes molecular de les proteïnes a determinar.

3.2.4.4. Electrotransferència humida

S'utilitza l'electrotransferència humida per a que les proteïnes, mitjançant l'aplicació d'una corrent elèctrica, passin del gel a una membrana de nitrocel·lulosa. Es realitza el muntatge del sistema de transferència, el qual es basa en col·locar junts el gel i la membrana col·locant entre ells i els elèctrodes cartons i esponges banyats en tampó de transferència per tal que la unió entre el gel i la membrana sigui compacta. És important submergir el sistema de transferència en un recipient amb gel així com també usar plaques de gel dins la cubeta de transferència. El voltatge utilitzat per aquest procés és de 100V durant 90 minuts.

3.2.4.5. Immunodetecció

Una vegada les proteïnes es troben sobre la membrana, es procedeix a la immunodetecció de la proteïna d'interès. Per això, primer es realitza un bloqueig amb llet, seguit de rentats per eliminar restes, incubació amb l'anticòs primari, rentats amb TBS-T, incubació amb l'anticòs secundari i finalment rentats i revelat. La detecció de les bandes es realitza amb el *kit* comercial *Immunostar Western Chemiluminescence Kit* de *Bio-Rad laboratories*. Aquest sistema es basa en el fet que l'anticòs secundari té unida una molècula de peroxidasa de rave que oxida el luminol en presència de peròxid d'hidrogen i es produeix una emissió de llum que és detectada amb el captador *Chemidoc XRS* (*Bio-Rad laboratories*) i el software *Quantity one*.

3.2.5. Quantificació de les proteïnes carbonilades

Els ROS cel·lulars poden oxidar les proteïnes modificant-les de forma covalent. Una de les modificacions que tenen lloc quan això ocorre és la formació de grups carbonils, especialment degut a la interacció del radical hidroxil amb la cadena lateral dels aminoàcids Pro, Arg, Lys i Thr. La detecció d'aquests grups carbonils és indicador del dany oxidatiu en proteïnes i es basa en la seva reacció amb la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNP) per formar 2,4-dinitrofenilhidrazona (DNPH), compost reconegut amb un anticòs específic. Per detectar l'oxidació proteica de les mostres, es separen 20 µg de proteïna dels lisats cel·lulars en un gel SDS-PAGE al 12 % i es transfereixen a una membrana de nitrocel·lulosa. Posteriorment, les proteïnes sobre la membrana es derivatitzen amb el *kit* comercial *Oxiselect Protein Carbonyl Immunoblot Kit* (*Cell Biolabs*), seguint les instruccions del fabricant, el qual es basa en una incubació inicial amb DNP i una posterior neutralització. Finalment es bloqueja la membrana i s'incuba amb un anticòs específic per detectar la DNPH.

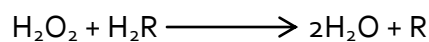
3.2.6. Anàlisi de les activitats enzimàtiques

Per determinar les activitats enzimàtiques de les mostres, el primer pas consisteix en recollir les cèl·lules de les plaques, generalment de 6 pouets (9,5 cm²). Per això, s'aspira el medi de les plaques i es fa un rentat amb PBS. Seguidament, es pipeteja 1 ml de PBS fred i amb l'ajuda d'un *scraper* es recull el contingut de les plaques en tubs. A continuació, es centrifuguen a 5.000 rpm durant 5 minuts a 4 °C i es descarta el

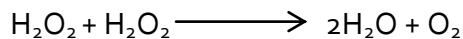
sobrenedant, mentre que el precipitat es resuspèn en 200 µl d'una solució tamponada (Tris-base 3,6 mM, Tris-HCl 16,4 mM, EDTA 2mM, KCl 40 mM, pH 7,4) i es sotmet a sonicació mantenint els tubs en gel (amplitud 40 %, tres polsos de 10 segons). A continuació, es procedeix a la determinació de les activitats enzimàtiques així com també la concentració de proteïnes mitjançant la tècnica del BCA, explicada anteriorment. Per cada determinació, es preparen les mostres i blancs per duplicat.

3.2.6.1. Determinació de l'activitat catalasa

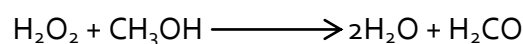
La catalasa (CAT, EC 1.11.1.6) és un enzim oxidoreductasa implicat en la destrucció del peròxid d'hidrogen (H₂O₂) generat en el metabolisme cel·lular. La reacció general implica la reducció del H₂O₂ a través de l'acceptació dels àtoms d'hidrogen del donador (H₂R):



La CAT presenta dos tipus d'activitats, la catalítica i la peroxidativa. En la funció catalítica, el donador és una altra molècula de H₂O₂ i aquesta funció només la pot realitzar l'enzim en la seva forma tetramèrica:



En la reacció peroxidativa, l'enzim pot utilitzar com a donadors d'hidrogen el metanol, l'etanol, l'àcid fòrmic, el fenol i el formaldehid i aquesta funció la pot realitzar l'enzim en forma de monòmer, dímer i tetràmer. La determinació de l'activitat de la CAT es basa en el mètode descrit per Johansson i Borg (1968) en el qual s'utilitza la funció peroxidativa de la CAT i el metanol (CH₃OH) com a donador d'hidrògens. El mètode es basa en la reacció entre l'enzim i el metanol en presència d'una concentració òptima de H₂O₂. Com a resultat de la reacció, es forma el formaldehid (H₂CO) que es determina colorimètricament mitjançant el cromogen Purpald[®] de *Sigma* (*4-amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole*). El producte de reacció entre el formaldehid i el Purpald[®] és oxidat pel periodat de potassi donant-se un canvi de color:



Reactius:

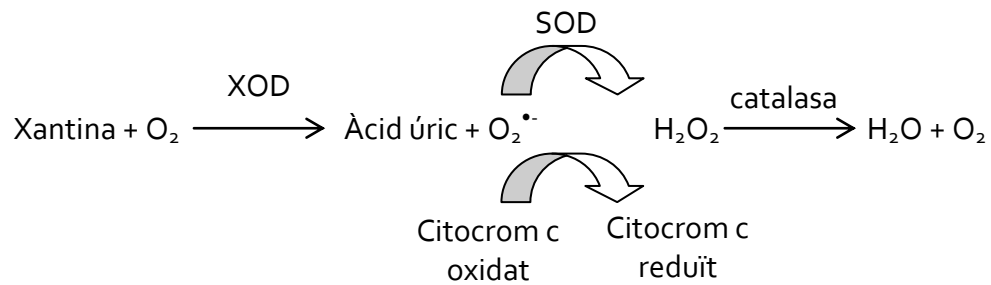
- Tampó d'assaig: K_2HPO_4/KH_2PO_4 100 mM, pH 7,0
- Tampó de mostra: K_2HPO_4/KH_2PO_4 25 mM, EDTA 1 mM i BSA al 0,1 %, pH 7,5
- Patró de formaldehid: es prepara una dissolució 4,25 M de formaldehid la qual es dilueix 1/1.000 i a partir d'aquesta es realitza un patró de tubs estàndards amb les concentracions 0, 5, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135 i 150 μ M
- KOH 10 M
- H_2O_2 35 mM
- Purpald[®] 34,2 mM en HCl 0,5 M
- KIO_4 65,2 mM en KOH 0,5 M

Procediment: S'utilitzen plaques de 96 pouets d'espectrofotometria. Per preparar el patró de formaldehid, a cada pouet del patró es pipetegen 100 μ l de tampó d'assaig, 30 μ l de metanol i 20 μ l de cada un dels tubs estàndards preparats. Per a les mostres, es pipetegen 115 μ l de tampó d'assaig, 30 μ l de metanol i 5 μ l de mostra per pouet. A continuació, s'afegeixen 20 μ l de H_2O_2 a tots els pouets per iniciar la reacció, es cobreix la placa i s'incuba durant 20 minuts en agitació a temperatura ambient. Passat aquest temps, s'afegeixen 30 μ l de KOH a tots els pouets per a que finalitzi la reacció i seguidament 30 μ l de Purpald[®]. Es cobreix la placa i s'incuba durant 10 minuts en agitació a temperatura ambient. S'afegeixen 10 μ l de KIO_4 a cada pouet, es cobreix la placa i s'incuba de nou durant 5 minuts en agitació a temperatura ambient. Finalment, es llegeix l'absorbància a 540 nm.

3.2.6.2. Determinació de l'activitat superòxid dismutasa

La superòxid dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1) és el principal enzim antioxidant que neutralitza l'anió superòxid ($O_2^{\bullet -}$), format principalment a nivell dels complexos de la cadena respiratòria mitocondrial. La determinació d'aquesta activitat es basa en el mètode descrit per Quick et al. (1969) el qual es fonamenta en el fet que quan es genera $O_2^{\bullet -}$ a través de l'acció de la xantina oxidasa (XOD), al ser aquest radical una espècie molt reactiva, aleshores redueix el citocrom c. No obstant, en presència de SOD, part de l'anió superòxid es transforma en peròxid d'hidrogen i per tant la reducció del

citocrom c es veu reduïda. D'aquesta forma, es detecta la reducció del citocrom c a 550 nm la qual és inversament proporcional a l'activitat SOD de la mostra:



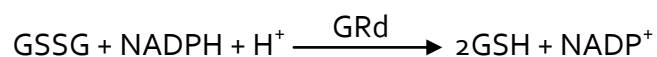
Reactius:

- Tampó d'assaig: PBS, pH 7,4
- Citocrom c 1,95 mM
- SOD 10.200 U/ml
- XOD 335 mU/ml
- Xantina 10 mM
- Catalasa 6.000 U/ml

Procediment: Es treballa amb plaques de 96 pouets d'espectrofotometria amb un volum final de 250 µL. En els pouets amb mostra es pipetegen 205 µl de PBS, 25 µl de mostra, 9 µl de XOD, 2,5 µl de xantina, 2,5 µl de catalasa i 6 µl de citocrom c. Paral·lelament hi ha un control 1 que no conté mostra (es substitueix per PBS), un control 2 que conté 25 µl de SOD en lloc de mostra i un blanc amb 250 µl del tampó on s'ha dissolt la mostra. Una vegada pipetejat tots els reactius, s'agita la placa i es llegeix l'augment d'absorbància a 550 nm degut a la reducció del citocrom c.

3.2.6.3. Determinació de l'activitat glutatió reductasa

La glutatió reductasa (GRd, EC 1.8.1.7) catalitza la reducció del glutatió oxidat (GSSG) a glutatió reduït (GSH) utilitzant NADPH com a agent reductor. L'activitat d'aquest enzim pot ser quantificada seguint la disminució de l'absorbància a 340 nm degut a l'oxidació del NADPH a partir del mètode de Carlberg i Mannervik (170):



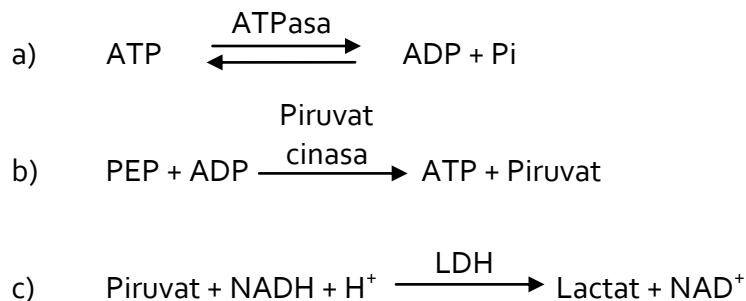
Reactius:

- Tampó d'assaig: K₂HPO₄/KH₂PO₄ 50 mM, EDTA-Na⁺ 1 mM, pH 7,6
- NADPH 1,4 mM
- GSSG 3,5 mM

Procediment: S'utilitzen plaques de 96 pouets d'espectrofotometria i dins cada pouet es pipeteja en el següent ordre: 220 µl de tampó d'assaig, 10 µl de NADPH i 50 µl de mostra. S'incuba la placa a 37 °C durant 5 minuts i a continuació s'inicia la reacció afegint 20 µl de GSSG. Es llegeix la disminució d'absorbància a 340 nm.

3.2.6.4. Determinació de l'activitat ATPasa

L'ATPasa (EC 3.6.1.3) és un enzim mitocondrial encarregat de la producció d'ATP des del gradient protònic mitocondrial en la cadena respiratòria. La determinació d'aquesta activitat es basa en un mètode espectrofotomètric fonamentat en l'acoblament de varies reaccions enzimàtiques de forma que finalment s'avalua el descens d'absorbància a 340 nm a causa de l'oxidació del NADH:



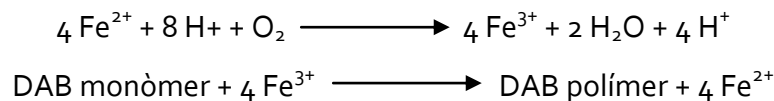
Reactius:

- Tampó d'assaig: sacarosa 0,333 M, MgSO₄ 6,3 mM, HEPES 63,33 mM, NADH 0,442 mM, pH 8
- Fosfoenolpiruvat (PEP) 0,1 M
- Piruvat cinasa (PK) 10 µg/ml
- Lactat deshidrogenasa (LDH) 10 µg/ml
- Antimicina 2 µg/ml
- Trifosfat d'adenosina (ATP) 0,1 M

Procediment: S'utilitzen plaques de 96 pouets d'espectrofotometria i dins cada pouet es pipeteja en el següent ordre: 150 µl de tampó d'assaig, 5 µl de PEP, 10 µl de PK, 5 µl de LDH, 10 µl d'antimicina i 10 µl de mostra. Seguidament s'agita la placa durant 1 minut i després es deixa que el sistema s'estabilitzi durant 5 minuts. Per acabar, s'afegeixen 10 µl d'ATP per tal que comenci tota la cadena de reaccions. S'agita la placa durant 15 segons i es llegeix la disminució d'absorbància a 340 nm, que serà deguda a la desaparició del NADH.

3.2.6.5. Determinació de l'activitat citocrom c oxidasa

La citocrom c oxidasa (COX, EC 1.9.3.1) és un complex enzimàtic integral de la membrana mitocondrial interna i suposa el darrer complex de la cadena respiratòria. Catalitza la reducció de l'oxigen a aigua a partir de quatre electrons que provenen del citocrom c reduït. La seva determinació es basa en el mètode descrit per Chrzanowska-Lightowlers et al. (171) el qual es fonamenta en el fet que el citocrom c reduït es pot tornar a oxidar en una reacció en la qual el tetraclorur 3,3'-diaminobenzidina (DAB) polimeritza i es detecta a 450 nm:



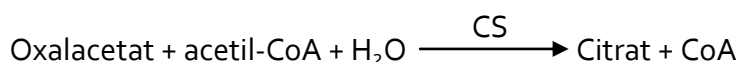
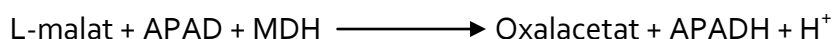
Reactius:

- Tampó d'assaig: NaH_2PO_4 0,1 M pH 7
- DAB 5 mM
- Catalasa 2 µg/ml
- Citocrom c reduït 100 µM

Procediment: S'utilitzen plaques de 96 pouets d'espectrofotometria i dins cada pouet es pipeteja en el següent ordre: 90 µl de tampó d'assaig, 10 µl de catalasa, 40 µl de mostra i 20 µl de DAB. S'agita la placa durant 30 segons i s'afegeixen 30 µl de citocrom c reduït, s'agita de nou durant uns segons i es mesura l'augment d'absorbància a 450 nm.

3.2.6.6. Determinació de l'activitat citrat sintasa

La citrat sintasa (CS, EC 2.3.3.1) catalitza la primera reacció del cicle de Krebs mitjançant la qual l'acetil-CoA es condensa amb l'oxalacetat per formar citrat. En el mètode utilitzat per mesurar la seva activitat, la quantitat d'oxalacetat utilitzat per unitat de temps és una mesura de l'activitat catalítica de la CS. En absència d'altres reaccions en les que intervé l'oxalacetat, la seva utilització es pot monitoritzar per la relació d'acetilpiridina adenina dinucleòtid (APAD) que s'ha reduït. Amb malat i excés de malat deshidrogenasa (MDH), la reacció afavoreix l'aparició d'oxalacetat i una reducció concomitant d'APAD. Durant la prova, a mesura que l'oxalacetat es consumeix per acció de la CS, la concentració d'APAD reduït s'incrementa al mateix temps que l'oxalacetat disminueix. Es monitoritza la reducció de l'APAD a 365 nm:



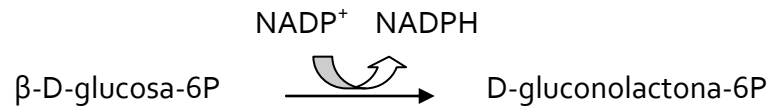
Reactius:

- Tampó d'assaig: TEA 0,1 M, tritó x-100 al 0,07 %, pH 8,5
- L-malat 140 mM pH 7,5
- APAD 10 mM
- MDH 600 UI/ml
- Acetil-CoA 8,4 mM

Procediment: S'utilitzen plaques de 96 pouets d'espectrofotometria i dins cada pouet es pipetegen 200 µl de tampó, 10 µl de malat, 10 µl d'APAD, 10 µl de MDH i 10 µl de mostra. Finalment, s'afegeixen 10 µl d'acetil-CoA (volum final 250 µl) i es mesura l'absorbància a 365 nm de forma contínua.

3.2.6.7. Determinació de l'activitat glucosa-6P deshidrogenasa

La glucosa-6-fosfat deshidrogenasa (G6PDH, EC 1.1.1.49) és l'enzim que catalitza la reacció clau de la via de les pentoses fosfat, la qual permet generar el poder reductor en forma de NADPH necessari per a la síntesi d'àcids grassos i pentoses fosfat per a la formació d'àcids nucleics. La determinació de la seva activitat es realitza monitoritzant l'aparició de NADPH a 340 nm:



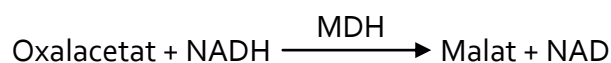
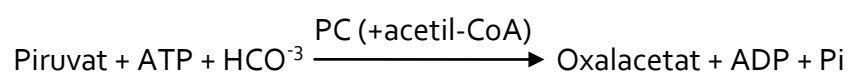
Reactius:

- Tampó d'assaig: TEA 0,1 M, MgCl₂ 2,5 mM, pH 7,4
- NADP⁺ 26 mM
- Glucosa-6P 66 mM

Procediment: S'utilitzen plaques de 96 pouets d'espectrofotometria i dins cada pouet es pipetegen 200 µl de tampó, 10 µl de NADP⁺ i 10 µl de mostra. Finalment, i per començar la reacció, s'afegeixen 30 µl de glucosa-6P (volum final 250 µl), s'agita la placa i es mesura l'absorbància a 340 nm de forma contínua.

3.2.6.8. Determinació de l'activitat piruvat carboxilasa

La piruvat carboxilasa (PC, EC 6.4.1.1) és l'enzim que catalitza la conversió del piruvat en oxalacetat, de forma dependent d'ATP i utilitzant l'acetil-CoA com a activador al·lostèric. Es tracta d'un enzim clau en una reacció anapleròtica ja que intervé en mantenir concentració suficient dels diversos components del cicle de Krebs. La determinació de la seva activitat es basa en un mètode adaptat de Warren i Tripton (172) en el qual es mesura la conversió del piruvat a oxalacetat a través d'una reacció acoblada catalitzada per la màlic deshidrogenasa (MDH) que oxida el NADH a NAD:



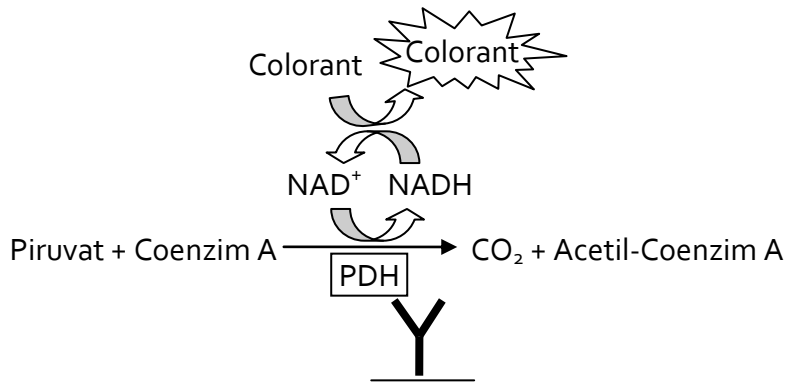
Reactius:

- Substrat: trietanolamina 135 mM, MgSO₄ 7 mM, piruvat 9 mM i BSA al 0,15 % (p/v), pH 8
- Agent A: acetil-CoA 0,15 mM i MDH 15 U/ml
- Agent B: trietanolamina 100 mM, ATP 30 mM i KHCO₃ 450 mM, pH 8
- NADH 2,6 mM

Procediment: Es realitza una mescla del substrat, l'agent A i el NADH en una proporció 20:5:2,5 i s'ajusta a pH 7,8. S'utilitzen plaques de 96 pouets d'espectrofotometria i dins cada pouet es pipetegen 235 µl de la mescla anterior i 5 µl de mostra. S'agita la placa i seguidament s'afegeixen 10 µl de l'agent B, s'agita la placa i es llegeix l'absorbància a 340 nm de forma contínua.

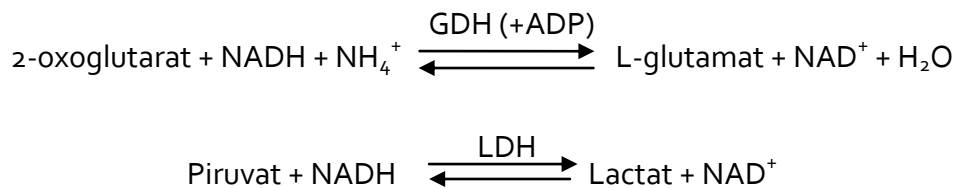
3.2.6.9. Determinació de l'activitat piruvat deshidrogenasa

La piruvat deshidrogenasa (PDH, EC 1.2.4.1) és l'enzim regulador clau del metabolisme cel·lular ja que uneix el cicle de Krebs i la fosforilació oxidativa amb la glicòlisi i la gluconeogènesi així com també amb el metabolisme lipídic i aminoacídic. L'activitat d'aquest enzim es troba regulada per fosforilació, de forma que quan es troba fosforilat és inactiu mentre que en estat desfosforilat és actiu. La determinació de l'activitat PDH es realitza amb el *kit* comercial *PDH Enzyme Activity Microplate Assay Kit (Abcam)*. Consisteix així en un *kit* ELISA amb anticossos monoclonals que immunocapturen la PDH de les mostres en estat intacte i funcional en una microplaca abans de la determinació de la seva activitat. Una vegada la PDH es troba immobilitzada en els pouets de la placa, s'afegeix el substrat i es segueix la reducció del NAD⁺ a NADH, reacció que es troba acoblada a la reducció d'un colorant indicador que dona com a resultat un producte groc la concentració del qual es pot monitoritzar mesurant l'increment d'absorbància a 450 nm:



3.2.6.10. Determinació de l'activitat glutamat deshidrogenasa

La glutamat deshidrogenasa (GDH, EC 1.4.1.3) és un enzim present a la matriu mitocondrial que catalitza la desaminació del glutamat per donar α -cetoglutarat. Es troba en una posició que connecta el metabolisme dels aminoàcids, el cicle de Krebs i el cicle de la urea. L'activitat de l'enzim es mesura amb un assaig de dues reaccions, en les quals es consumeix oxoglutarat i es genera NAD^+ :



L'equilibri de la reacció està afavorit cap a la formació de glutamat i la GDH necessita 2-oxoglutarat i amoni com a substrats i NADH com a coenzim. La reacció se segueix per la disminució de l'absorbància per l'oxidació del NADH a NAD^+ . Per evitar la inhibició de l'activitat de la GDH per un excés de NADH, 2-oxoglutarat i NH_4^+ , s'afegeix a la reacció ADP, que activa l'enzim. A més, s'afegeix LDH per eliminar el piruvat abans d'iniciar la reacció d'interès, ja que aquest pot interferir en la lectura. Per això, es fa una primera lectura i després s'afegeix el substrat de la GDH i es fa la segona lectura.

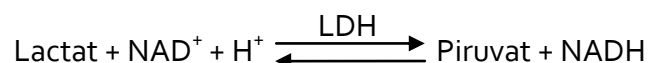
Reactius:

- Tampó d'assaig: TEA 64, 5 mM, EDTA 3,22 mM i acetat d'amoni 129 mM, pH 8
- 2-oxoglutarat 217 mM
- NADH 6,45 mM, ADP 32,3 mM i 65 kU/L LDH

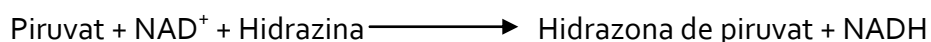
Procediment: Es realitza una mescla de 25 parts de tampó d'assaig amb 2 parts de NADH/ADP/LDH i s'afegeixen 200 µl d'aquesta mescla a cada pouet en plaques de 96 pouets d'espectrofotometria. A continuació, s'afegeixen 80 µl de mostra, s'agita la placa i s'incuba durant 5 minuts a temperatura ambient. Es fa una primera lectura a 334 nm. S'afegeixen 20 µl de 2-oxoglutarat i es fa una segona lectura a la mateixa longitud d'ona. Per fer els càlculs, cal restar la pendent dels blancs i de la primera lectura als valors de pendent de la segona lectura.

3.2.7. Determinació de la producció de lactat

El mètode es basa en la capacitat de la lactat deshidrogenasa (LDH) per convertir el lactat en piruvat en presència de NAD⁺ segons la següent reacció:



D'aquesta forma, els nivells de lactat es poden determinar mesurant la formació de NADH amb un espectrofotòmetre o fluorímetre. Per desplaçar la reacció cap a la formació de piruvat, de manera que es transformi tot el lactat present, s'afegeix hidrat d'hidrazina que reacciona amb el piruvat i forma una hidrazona, evitant així l'acumulació de piruvat. A més, s'utilitza NAD⁺ en excés i la isoforma cardíaca de la LDH, ja que els seus paràmetres cinètics són els millors per catalitzar la reacció en direcció lactat → piruvat:



Reactius:

- Tampó A: glicina 840 mM i hidrat d'hidrazina 660 mM, pH 9
- NAD⁺ 40 mM
- LDH 125 U/ml
- L-lactat 2,5 mM

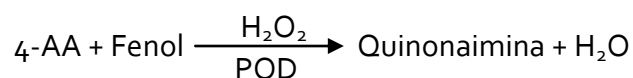
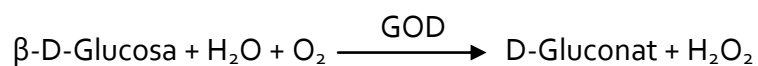
Procediment: En plaques de fluorimetria de 96 pouets, es prepara un patró de lactat pipetejant un volum de L-lactat 2,5 mM i aigua tal per tenir les concentracions 0, 25,

50, 75, 100 i 125 nmols lactat/pouet amb un volum final de 100 µl. A continuació, es pipetegen 10 µl de les mostres i se'ls hi afegeix 90 µl d'aigua. Tot seguit, a tots els pouets (mostres i patró) s'afegeixen 160 µl de tampó i 20 µl de NAD⁺. S'agita la placa i es llegeix la fluorescència amb unes longituds d'ona d'excitació i emissió de 360 nm i 460 nm, respectivament. Seguidament, es pipetegen 10 µl de l'enzim LDH i es deixa la placa una hora a temperatura ambient protegida de la llum. Passat aquest temps, es torna a llegir la fluorescència. L'increment de fluorescència entre la primera lectura i la segona s'utilitza per calcular la concentració de lactat amb l'ajuda de la recta patró.

Disseny experimental: Es sembren les cèl·lules en plaques de fluorimetria de cultius de 96 pouets i es realitza el tractament pertinent. Després d'aquest, es substitueix el medi de les cèl·lules per medi fresc amb renovació del tractament juntament amb 2-DG, oligomicina o vehicle (DMSO) i seguidament es recol·lecten alíquotes de medi dels pouets cada dues hores durant les pròximes 6 o 8 hores. Aquestes alíquotes són usades per determinar la concentració de lactat i una alíquota de medi fresc representa la concentració de lactat a temps 0. Immediatament després de recollir el medi, es determina la densitat cel·lular pel mètode del cristall violeta per poder referenciar la concentració de lactat al nombre de cèl·lules.

3.2.8. Determinació de la captació de glucosa

Es realitza mitjançant l'ús del *kit* comercial *Glucose MR Kit* de *Linear Chemicals/Cromatest*. Aquest *kit* es basa en la reacció de Trinder (173, 174), segons la qual la glucosa és oxidada a D-gluconat per la glucosa oxidasa (GOD), amb formació de peròxid d'hidrogen. En presència de peroxidasa (POD), el fenol i la 4-aminoantipirina (4-AA) es condensen per acció del peròxid d'hidrogen, formant una quinonaimina vermella proporcional a la concentració de glucosa de la mostra:



Disseny experimental: Es sembren les cèl·lules en plaques de colorimetria de cultius de 96 pouets i es realitza el tractament pertinent. Després d'aquest, es substitueix el medi de les cèl·lules per medi fresc amb renovació del tractament juntament amb oligomicina o vehicle (DMSO) i es deixa incubar la placa durant 24 h més. El següent dia, es recol·lecta una alíquota de medi de cada pou i s'utilitza per determinar la concentració de glucosa, utilitzant una alíquota de medi fresc com a indicadora de la concentració de glucosa a temps 0. Immediatament després de recollir el medi, es determina la densitat cel·lular pel mètode del cristall violeta per poder referenciar la glucosa consumida per cèl·lula.

3.2.9. Determinació del rati de consum d'oxigen (OCR)

Per determinar el consum d'oxigen cel·lular es treballa amb elèctrodes d'oxigen polarogràfic de tipus *Clark (Oxygraph-Hansatech Instruments)*. El procediment general consisteix en incubar les cèl·lules en càmeres termostatitzades en contacte amb elèctrodes que detecten la concentració d'oxigen i que es troben connectats a un ordinador amb un software adequat per aquest fi.

Disseny experimental i procediment: Es sembren les cèl·lules en plaques p100 de cultius i es realitza el tractament desitjat. El dia de la determinació, s'elimina el medi de les plaques, es fa un rentat amb PBS, es tripsinitzen, es recullen en un tub adequat per centrífuga i es realitza un recompte cel·lular. A continuació, es centrifuga el tub a 1.600 rpm durant 5 minuts. S'elimina el medi sobrenedant i es resuspèn el precipitat de cèl·lules en 1 ml de medi. En el cas de voler mesurar el consum d'oxigen en condicions especials, com en absència d'aminoàcids, una vegada eliminat el medi sobrenedant del tub es realitza un rentat amb PBS i es centrifuga de nou. A continuació, s'elimina el PBS sobrenedant i es resuspèn el precipitat de cèl·lules en 1 ml de tampó Krebs-Ringer lliure d'aminoàcids (NaCl 145 mM, KCl 4,86 mM, CaCl₂ 0,54 mM, MgSO₄ 1,22 mM, NaH₂PO₄ 5,7 mM, glucosa 4,5 g/l i 10 % FBS a pH 7,4). A partir de la concentració de cèl·lules en el tub, es determina el volum necessari a introduir en la càmera de l'*oxygraph* per obtenir un nombre suficient de cèl·lules per mesurar el consum d'oxigen ($1E^6$ en el cas de les MCF-7 i $10E^6$ per a les SW620). S'inoculen les cèl·lules en la càmera i s'incuben durant 6 minuts per obtenir la respiració basal.

Seguidament, es van afegint alíquotes de les drogues que es volen usar per obtenir les concentracions desitjades en la càmera i es mesura la respiració durant 6 minuts més després de cada nou afegiment. En aquesta tesi, s'han utilitzat les drogues 2-DG, oligomicina, etomoxir, antimicina A i FCCP.

3.2.10. Determinació dels nivells d'ATP intracel·lulars

Per determinar els nivells d'ATP intracel·lulars s'usa el *kit* comercial *ApoSENSOR™ Cell Viability Assay Kit (BioVision)*. Aquest fa possible detectar els nivells d'ATP per bioluminescència, mitjançant un luminòmetre, utilitzant la luciferasa per catalitzar la formació de llum a partir d'ATP i luciferina:



Disseny experimental i procediment: Es sembren les cèl·lules en plaques de luminometria de cultius de 96 pouets i s'aplica el tractament desitjat. En paral·lel, es sembra i es tracta una placa de colorimetria de cultius de 96 pouets en les mateixes condicions exactes que la de la luminometria. El dia de la determinació, es pipetegen les drogues de les quals es vol testar l'efecte sobre la bioenergètica cel·lular en les plaques de luminometria i es deixen el temps desitjat dins l'incubador. En aquesta tesi, s'han utilitzat les drogues 2-DG, oligomicina, etomoxir i vehicle (DMSO) com a control, en combinació o per separat i durant 15 – 30 minuts. En el cas dels experiments en deprivació d'aminoàcids, 30 minuts abans de pipetejar les drogues es realitza un canvi de medi per tampó Krebs-Ringer lliure d'aminoàcids. Després dels tractaments, s'elimina el medi de les cèl·lules i es pipeteja una solució preparada d'ATP a alguns pous sense cèl·lules (control positiu). A continuació, es pipetegen 100 µl de *Nuclear Releasing Buffer* a tots els pous (mostres, controls positius i a pous on no hi ha cèl·lules (blanc)) i s'agita la placa durant 5 minuts. Tot seguit, es pipetegen 10 µl de l'*ATP Monitoring Enzyme* a tots els pous i es llegeix la placa dins dels següents dos minuts en un luminòmetre. La placa de colorimetria sembrada en paral·lel s'utilitza per determinar la densitat cel·lular pel mètode del cristall violeta per poder referenciar els nivells d'ATP al nombre de cèl·lules.

3.2.11. Determinació de l'expressió gènica i dels nivells de mtDNA

La PCR a temps real és una variant de la PCR convencional que permet amplificar i quantificar simultàniament el producte d'amplificació. Empra els components convencionals de la PCR (tampó, DNA mostra, encebadors, dNTPs, Mg²⁺ i DNA polimerasa) i, a la vegada, incorpora una sonda que permet la detecció. En aquesta tesi s'ha fet servir el *SYBR Green I*, un agent intercalant que quan s'introdueix a la doble hèlix de DNA incrementa la seva emissió fluorescent.

Disseny experimental i procediment: Es sembren les cèl·lules en plaques de cultius de 6 pouets i s'aplica el tractament durant el temps desitjat. El dia de la determinació, s'elimina el medi de les plaques i s'aïlla el RNA utilitzant 1 ml/pou de *TriPure Isolation Reagent*[®] (*Roche Diagnostics*) seguint les instruccions del fabricant. El procediment implica una extracció amb fenol:cloroform basada en una separació de fases per centrifugació d'una mostra que conté fenol, cloroform i un agent caotrópic. Després de l'extracció, es quantifica el RNA amb un espectrofotòmetre mesurant l'absorbància a 260 nm i s'analitza la qualitat de l'extracció amb el rati A₂₆₀/A₂₈₀, indicador de la puresa del RNA i la presència de proteïnes. A continuació es realitza la retrotranscripció, que consisteix en què a partir d'una molècula de RNA s'obté la complementària de DNA (cDNA). Per a tal fi, s'utilitza el termociclador *GeneAmp 9700* (*Applied Biosystems*). Per una altra banda, per a l'obtenció del mtDNA, s'elimina el medi de les plaques i s'aïlla el DNA utilitzant 1 ml/pou de *TriPure Isolation Reagent*[®] seguint les instruccions del fabricant. Una vegada obtingut el DNA, aquest es quantifica mitjançant la mesura de l'absorbància a 260 nm.

La PCR a temps real es realitza a partir de 2,5 µl de mostra de cDNA. El medi de reacció conté 3,74 µM de cada un dels dos encebadors i 5 µl de *SYBR Green Master* (*Roche Diagnostics*) el qual duu incorporat la resta de components de la reacció. La PCR a temps real es realitza amb el termociclador *LightCycler*[®] *480 System II* (*Roche Diagnostics*). El programa d'amplificació es basa en una desnaturalització inicial del DNA (95°C, 10 segons), seguit per 40-45 cicles que consisteixen en una desnaturalització (94°C, 2 minuts), alineament (temperatura depenent dels encebadors, 10 segons), extensió (72°C, 12 segons) i un pas de captació de la

fluorescència. Per a la determinació dels nivells de mtDNA, s'amplifiquen 5 ng de DNA obtingut a partir de l'extracció amb *Tripure*[®] i s'empra un parell d'encebadors per un gen mitocondrial (subunitat 4 de la NADH deshidrogenasa) i un per un gen nuclear (rRNA 18S).

Els valors de *crossing point* (Cp) de la PCR a temps real s'obtenen utilitzant el programari *LightCycler Software 3.5.3* mitjançant el mètode de la segona derivada màxima. Els valors de Cp s'analitzen considerant l'eficiència de la reacció i referenciant aquests resultats al 18S utilitzant el *GenEx Standard Software (Multi-DAnalises)*.

3.2.12. Determinació de la massa mitocondrial

En aquesta tesi s'utilitzen dos marcadors fluorescents per quantificar la biomassa mitocondrial de les cèl·lules:

- *MitoTracker*[®] *Green* (MTG) (*Thermo Fisher Scientific*). Es basa en un clorometil que difon passivament a través de la membrana plasmàtica i s'acumula en els mitocondris actius on és segrestat i oxidat i en aquesta forma reacciona amb tiols de proteïnes i pèptids per formar un conjugat aldehid fluorescent.

Disseny experimental i procediment: Es sembren les cèl·lules en plaques de fluorimetria de cultius de 96 pouets, s'aplica el tractament i es deixen incubar les plaques durant el temps desitjat. El dia de la determinació, s'afegeix directament al medi de les cèl·lules una concentració final de 100 nM de MTG, es deixa a l'incubador de cultius durant 40 minuts, s'aspira el medi i es pipetegen 100 µl de medi fresc i es deixa incubar durant 10 minuts més. Finalment, s'aspira el medi i es fa un rentat amb PBS. Per determinar la fluorescència, s'afegeixen 100 µl de PBS i es llegeix amb unes longituds d'ona d'excitació i d'emissió de 490 i 516 nm, respectivament. En paral·lel i de la mateixa manera es tracten alguns pouets sense cèl·lules que serviran de blanc. Tot seguit, es determina la densitat cel·lular pel mètode del cristall violeta per poder referenciar pel nombre de cèl·lules.

- Taronja de 10-nonil acridina (NAO) (*Thermo Fisher Scientific*). Es tracta d'un marcador de la membrana mitocondrial interna que s'uneix a fosfolípids carregats

negativament tals com cardiolipina, fosfatidilinositol i fosfatidilserina i és retingut en el mitocondri de forma independent al potencial de membrana.

Disseny experimental i procediment: Es sembren les cèl·lules en plaques de fluorimetria de cultius de 96 pouets, s'aplica el tractament i es deixen incubar les plaques durant el temps desitjat. El dia de la determinació, s'aspira el medi dels pous i s'afegeixen 100 µl de PBS-glucosa 20 mM amb NAO 250 nM i es deixen les plaques a l'incubador durant 30 minuts. Passat aquest temps, es mesura la fluorescència amb unes longituds d'ona d'excitació i d'emissió de 485 i 528 nm, respectivament. En paral·lel i de la mateixa manera, es tracten alguns pouets sense cèl·lules que serviran de blanc. Tot seguit, es determina la densitat cel·lular pel mètode del cristall violeta per poder referenciar pel nombre de cèl·lules.

3.2.13. Determinació de la massa lisosomal

La massa lisosomal es determina utilitzant el compost *LysoTracker® Red* (LTR) (*Thermo Fisher Scientific*). Es tracta d'un fluoròfor unit a una base dèbil que a pH neutre es troba només dèbilment protonada, la qual cosa permet entrar a través de la membrana cel·lular. Una vegada dintre, s'acumula de forma selectiva en els orgànuls amb pH baix.

Disseny experimental i procediment: Es sembren les cèl·lules en plaques de fluorimetria de cultius de 96 pouets, s'aplica el tractament i es deixen incubar les plaques durant el temps desitjat. El dia de la determinació, s'afegeix directament al medi de les cèl·lules una concentració final de 77 nM de LTR, es deixa a l'incubador de cultius durant 20 minuts, s'aspira el medi i es pipetegen 100 µl de medi fresc i es deixa incubar durant 10 minuts més. Finalment, s'aspira el medi i es fa un rentat amb PBS. Per determinar la fluorescència, s'afegeixen 100 µl de PBS i es llegeix amb unes longituds d'ona d'excitació i d'emissió de 530 i 590 nm, respectivament. En paral·lel i de la mateixa manera es tracten alguns pouets sense cèl·lules que serviran de blanc. Tot seguit, es determina la densitat cel·lular pel mètode del cristall violeta per poder referenciar pel nombre de cèl·lules.

3.2.14. Determinació de l'autofàgia

Per determinar la massa fagosomal s'utilitza la monodansilcadaverina (MDC) (*Sigma*). Es tracta d'un compost fluorescent que marca selectivament els vacúols autofàgics tot interaccionat amb els lípids de membrana que s'hi troben altament concentrats.

Disseny experimental i procediment: Es sembren les cèl·lules en plaques de fluorimetria de cultius de 96 pouets, s'aplica el tractament i es deixen incubar les plaques durant el temps desitjat. El dia de la determinació, s'afegeix directament en el medi una concentració de MDC 50 μ M i es deixen les plaques dins l'incubador durant 15 minuts. Passat aquest temps, s'aspira el medi i s'afegeixen 100 μ l de medi fresc i es deixen incubar les plaques de nou durant 10 minuts. A continuació, s'aspira el medi i es fa un rentat amb PBS. Per determinar la fluorescència, s'afegeixen 100 μ l de PBS i es llegeix amb unes longituds d'ona d'excitació i d'emissió de 340 i 535 nm, respectivament. En paral·lel i de la mateixa manera es tracten alguns pouets sense cèl·lules que serviran de blanc. Tot seguit, es determina la densitat cel·lular pel mètode del cristall violeta per poder referenciar pel nombre de cèl·lules.

3.2.15. Determinació del potencial de membrana

Per determinar el potencial de membrana dels mitocondris funcionals s'ha utilitzat la tetrametil rodamina metil èster (TMRM) (*Thermo Fisher Scientific*). Es tracta d'un compost carregat positivament que s'acumula en la matriu mitocondrial en funció de la càrrega d'aquest compartiment. D'aquesta forma, els mitocondris polaritzats acumulen més TMRM ja que la matriu mitocondrial es torna negativa, mentre que els mitocondris despolaritzats presenten un interior menys negatiu i acumulen menys quantitat d'aquest compost.

Disseny experimental i procediment: Es sembren les cèl·lules en plaques de fluorimetria de cultius de 96 pouets, s'aplica el tractament i es deixen incubar durant el temps desitjat. El dia de la determinació, s'afegeix directament en el medi una concentració de TMRM 100 nM i es deixen les plaques dins l'incubador durant 15 minuts. Passat aquest temps, s'aspira el medi i s'afegeixen 100 μ l de medi fresc i es deixen incubar les plaques de nou durant 10 minuts. A continuació, s'aspira el medi i es

fa un rentat amb PBS. Per determinar la fluorescència, s'afegeixen 100 µl de PBS i es llegeix amb unes longituds d'ona d'excitació i d'emissió de 552 i 576 nm, respectivament. En paral·lel i de la mateixa manera es tracten alguns pouets sense cèl·lules que serviran de blanc. Tot seguit, es determina la densitat cel·lular pel mètode del cristall violeta per poder referenciar pel nombre de cèl·lules.

3.2.16. Determinació de l'activitat metabòlica

El compost *thiazolyl blue tetrazolium bromide* (MTT) (Sigma) pot ser utilitzat per determinar l'activitat metabòlica cel·lular. Aquest compost passa de groc a púrpura quan es veu reduït per part de les oxidoreductases cel·lulars depenents de NADH o NADPH. El nivell d'activitat de les oxidoreductases cel·lulars és un reflex de l'activitat metabòlica.

Disseny experimental i procediment: Es sembren les cèl·lules en plaques de colorimetria de cultius de 96 pouets, s'aplica el tractament i es deixen incubar les plaques durant el temps desitjat. El dia de la determinació, s'afegeix directament en el medi una concentració de MTT de 0,5 mg/ml i es deixen les plaques dins l'incubador durant 1 hora. Passat aquest temps, s'aspira el medi i s'afegeixen 100 µl de DMSO a cada pouet i a continuació es determina l'absorbància a 570 nm amb sostracció de blanc a 650 nm. En paral·lel, es sembren cèl·lules i es tracten de la mateixa manera en altres pouets que s'utilitzaran per determinar la densitat cel·lular pel mètode del cristall violeta i poder referenciar els valors de MTT pel nombre de cèl·lules.

3.2.17. Determinació de l'apoptosi

En aquesta tesi s'utilitzen dues tècniques diferents per determinar el grau d'apoptosi de les cèl·lules:

- *Annexin V, Alexa Fluor® 350 conjugate* (Thermo Fisher Scientific). En les cèl·lules viables, la fosfatidilserina es localitza a la cara citoplasmàtica de la membrana plasmàtica, mentre que en el procés d'apoptosi es transloca cap a la superfície externa d'aquesta membrana i s'exposa al medi extracel·lular. La proteïna anexina V conjugada amb un fluoròfor es pot unir a les molècules de fosfatidilserina exposades a l'exterior.

Disseny experimental i procediment: Es sembren les cèl·lules en plaques de fluorimetria de cultius de 96 pouets, s'aplica el tractament i es deixen incubar les plaques durant el temps desitjat. El dia de la determinació, s'aspira el medi dels pouets i es fixen les cèl·lules afegint 50 µl de paraformaldehid al 2 % durant 30 minuts. Passat aquest temps, s'aspira i es fan dos rentats amb PBS. A continuació, es tenyeixen les cèl·lules durant 10 minuts dins l'incubador amb el fluoròfor dissolt en tampó format per Hepes/NAOH 10 mM, NaCl 140 mM i CaCl₂ 2,5 mM i pH 7,4 (39 µl de tampó + 1 µl de fluoròfor per pouet). Després de la tinció, s'utilitza aquest mateix tampó però sense fluoròfor per realitzar un rentat i per llegir la fluorescència amb unes longituds d'ona d'excitació i d'emissió de 346 i 442 nm, respectivament. En paral·lel i de la mateixa manera es tracten alguns pouets sense cèl·lules que serviran de blanc. Tot seguit, es determina la densitat cel·lular pel mètode del cristall violeta per poder referenciar pel nombre de cèl·lules.

- Tinció del DNA amb iodur de propidi i anàlisi del cicle cel·lular per citometria de flux. El iodur de propidi s'intercala entre els parells de bases dels àcids nucleics de forma que quan aquest compost s'excita a 480 nm, les cèl·lules emeten fluorescència vermella al voltant dels 620 nm de forma proporcional al contingut de DNA. La mesura del contingut de DNA per citometria de flux proporciona informació sobre el percentatge de cèl·lules en cada fase del cicle cel·lular així com també en apoptosi.

Disseny experimental i procediment: Es sembren les cèl·lules en plaques p100, s'aplica el tractament i es deixen incubar durant el temps desitjat. El dia de la determinació, es recull el medi de les plaques en tubs i es tripsinitzen les cèl·lules tot inhibint la tripsina amb el medi recollit inicialment (les cèl·lules mortes es troben en aquest medi). Es recullen les cèl·lules en tubs de citometria i es centrifuguen a 1.600 rpm durant 5 minuts. A continuació, es descarta el sobrenedant i es fixen les cèl·lules amb 1 ml de metanol fred al 100 % i es deixa durant 1 hora a 4 °C. A continuació, es centrifuga de nou amb les mateixes condicions i s'elimina el sobrenedant, es fa un rentat amb PBS, es torna a centrifugar i finalment s'elimina el sobrenedant. S'afegeixen 500 µl de la solució de tinció de DNA formada per RNasa i iodur de propidi a 50 µg/ml ambdós compostos. A continuació, s'incuben els tubs durant 30 minuts en l'obscuritat i es

realitza la determinació en un citòmetre de flux *Coulter Epics XLMCL* (*Beckman Coulter*).

3.2.18. Microscòpia confocal

Una de les tècniques usades en aquesta tesi per determinar el nivell d'autofàgia és la microscòpia confocal. Aquesta tècnica permet tenyir els mitocondris i lisosomes d'una mateixa mostra amb fluoròfors diferents i observar-los en el microscopi, de forma que es pot determinar i quantificar cada senyal per separat així com també el grau de solapament entre elles. El grau de colocalització dels mitocondris i lisosomes dona una idea del nivell d'autofàgia present en la mostra.

Disseny experimental i procediment: Es sembren les cèl·lules en plaques on s'hi ha col·locat un cobreobjectes, s'aplica el tractament i es deixen incubar durant el temps desitjat. El dia de la determinació, les cèl·lules es tenyeixen amb *MitoTracker[®] Green* 0,5 µM durant 60 minuts, en els darrers 20 minuts de tinció s'afegeix *LysoTracker[®] Red* 77 nM i en els darrers 5 minuts Hoechst 33342. Passat el temps de tinció, es col·loca el cobreobjectes sobre un portaobjectes i es detecta la fluorescència amb el microscopi confocal *Leica TCS-SP2*, analitzant tres camps diferents de cada mostra amb el programari *Leica LAS AF*. Per excitar el MTG s'utilitza un làser d'argó a 488 nm i es recull l'emissió entre els 500 i 550 nm. En el cas del LTR, s'excita amb un làser d'heli/neó a 532 nm i es recull l'emissió entre 560 i 700 nm.

3.2.19. Anàlisi estadístic

Per a l'anàlisi estadístic s'ha fet ús del programa *SPSS 21.0* per a Windows (Chicago, EUA). Les dades es presenten com a mitjana ± error estàndard de la mitjana (SEM). Les diferències estadístiques entre els tractaments i controls o entre diferents tractaments s'han analitzat mitjançant una prova *t-Student* i es consideren significatives quan el *p-value* és inferior a 0,05.

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ / RESULTS AND DISCUSSION

Manuscrit I

Blanquer-Rosselló MM, Santandreu FM, Oliver J, Roca P, Valle A.

Leptin modulates mitochondrial function, dynamics and biogenesis in MCF-7 cells

J Cell Biochem. 2015 Sep; 116(9):2039-48. doi: 10.1002/jcb.25158

Leptin Modulates Mitochondrial Function, Dynamics and Biogenesis in MCF-7 Cells

M Mar Blanquer-Rosselló,^{1,2} Francisca M. Santandreu,^{1,2} Jordi Oliver, Pilar Roca,^{1,2*} and Adamo Valle^{1,2}

¹Grupo Multidisciplinar de Oncología Traslacional, Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut (IUNICS), Palma de Mallorca, Illes Balears, Spain

²Ciber Fisiopatología Obesidad y Nutrición (CB06/03), Instituto Salud Carlos III, Madrid, Spain

ABSTRACT

The adipokine leptin, known for its key role in the control of energy metabolism, has been shown to be involved in both normal and tumoral mammary growth. One of the hallmarks of cancer is an alteration of tumor metabolism since cancerous cells must rewire metabolism to satisfy the demands of growth and proliferation. Considering the sensibility of breast cancer cells to leptin, the objective of this study was to explore the effects of this adipokine on their metabolism. To this aim, we treated the MCF-7 breast cancer cell line with 50 ng/mL leptin and analyzed several features related to cellular and mitochondrial metabolism. As a result, leptin increased cell proliferation, shifted ATP production from glycolysis to mitochondria and decreased the levels of the glycolytic end-product lactate. We observed an improvement in ADP-dependent oxygen consumption and an amelioration of oxidative stress without changes in total mitochondrial mass or specific oxidative phosphorylation (OXPHOS) complexes. Furthermore, RT-PCR and western blot showed an up-regulation for genes and proteins related to biogenesis and mitochondrial dynamics. This expression signature, together with an increased mitophagy observed by confocal microscopy suggests that leptin may improve mitochondrial quality and function. Taken together, our results propose that leptin may improve bioenergetic efficiency by avoiding the production of reactive oxygen species (ROS) and conferring benefits for growth and survival of MCF-7 breast cancer cells. *J. Cell. Biochem.* 116: 2039–2048, 2015. © 2015 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: BREAST CANCER; LEPTIN; MITOCHONDRIA; BIOENERGETIC; BIOGENESIS; FISSION; FUSION; MITOPHAGY

Leptin is a 167-aminoacid peptide hormone (16 kDa) product of Ob gene, mainly synthesized by adipocytes and to a lesser extent by other tissues such as stomach, placenta, muscle, immune cells, and mammary gland [Schubring et al., 1999; Ahima and Flier, 2000]. Leptin concentration in blood rises as body weight and fat mass increase [Sweeney, 2002] and regulates energy homeostasis by suppressing food intake and increasing energy expenditure by acting on transmembrane

Ob-R receptors located in hypothalamic nuclei [Cohen, 2006]. From studies performed to date, it is known that Ob-R receptors are expressed, in addition to central nervous system, in many other tissues including islet cells, liver, kidney, lung, skeletal muscle, bone marrow, and breast, among others [Margetic et al., 2002; Bjorbaek and Kahn, 2004]. In these peripheral tissues, leptin has been shown to influence multiple functions including fetal development, sex maturation,

Abbreviations: 2-DG, 2-deoxyglucose; AMPK, 5' AMP-activated protein kinase; pAMPK, phosphorylated 5' AMP-activated protein kinase; COX, cytochrome C oxidase; DCFDA, 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate; DNPH, 2, 4-dinitrophenylhydrazine; DRP1, dynamin-related protein-1; ETC, electron transport chain; FIS1, mitochondrial fission protein 1; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; LTR, lysotracker red; MDC, monodansylcadaverine; MFN1, mitofusin-1; MFN2, mitofusin-2; MTG, mitotrackergreen; MTSSB, mitochondrial single strand DNA binding protein; OCR, oxygen consumption rate; OPA1, optic atrophy-1; OXPHOS, oxidative phosphorylation; PGC-1 α , peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha; ROS, reactive oxygen species; TFAM, mitochondrial transcription factor.

Grant sponsor: Fondo de Investigaciones Sanitarias of Instituto de Salud Carlos III of the Spanish Government cofinanced by FEDER-Unión Europea ("Una manera de hacer Europa"); Grant numbers: PI12/01827, PI14/01434; Grant sponsor: Comunitat Autònoma de les Illes Balears and FEDER; Grant number: 31/2011; Grant sponsor: FPU grant of Ministerio de Educación, Cultura y Deporte of Spanish Government.

*Correspondence to: Prof. Pilar Roca, Departamento de Biología Fundamental y Ciencias de la Salud, Universitat de les Illes Balears, Cra de Valldemossa, km 7'5.07122 Palma de Mallorca, España. Ciber Fisiopatología Obesidad y Nutrición (CB06/03), Instituto Salud Carlos III, Madrid, Spain. E-mail: pilar.roca@uib.es

Manuscript Received: 21 October 2014; Manuscript Accepted: 3 March 2015

Accepted manuscript online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com): 9 March 2015

DOI 10.1002/jcb.25158 • © 2015 Wiley Periodicals, Inc.

lactation, hematopoiesis, and immune responses [Grossmann and Cleary, 2012]. In mammary gland, leptin has been shown to be a mitogenic factor necessary for normal development [Hu et al., 2002].

In previous studies, it has been reported that leptin increases cell proliferation and inhibits apoptosis in several human cell lines, including breast [Nakao et al., 1998; Konopleva et al., 1999; Saxena et al., 2007; Liu et al., 2011; Han et al., 2012]. In fact, it has been found that Ob-R receptor is present in human breast cancer cells [Grossmann and Cleary, 2012], and both leptin and its receptor are overexpressed in invasive ductal carcinomas [Ishikawa et al., 2004]. High levels of serum leptin, together with a high Ob-R expression in the tumor, have been pointed to be a poor prognosis predictor in patients with breast cancer [Miyoshi et al., 2006]. Hence, the hyperleptinemia associated with obesity is currently a subject of intense investigation since obesity is a known risk factor for breast cancer in postmenopausal women [Cleary and Maihle, 1997; Willett, 1997; Calle and Thun, 2004].

Cancer cells must rewire cellular metabolism to satisfy the demands of growth and proliferation. As commonly accepted, most tumor cells rely on their ATP synthesis by glycolysis rather than on oxidative phosphorylation, a phenomenon known as the Warburg effect [Warburg, 1956]. Despite this fact was initially attributed to mitochondrial dysfunction, this hypothesis is now being re-evaluated due to the important role of this organelle in cancer. In fact, in cancerous states, anaplerotic and cataplerotic mitochondrial reactions work together to provide enough biosynthetic precursors to sustain growth and proliferation. Thus, in contrast to Warburg's first observations, maintaining functional mitochondria appears to be key for cancer cell survival and proliferation [Wallace, 2012]. Mitochondria are dynamic organelles that continually undergo fusion and fission. These apparently opposite processes, termed mitochondrial dynamics, work in concert to maintain the shape, size, number, and function of mitochondrion [Chan, 2012]. Furthermore, mitochondrial biogenesis and mitophagy represent two co-ordinated processes that also determine mitochondrial content, structure, and function [Zhu et al., 2013].

To date, little effort has been made to study the link between leptin and metabolism in breast cancer cells. There is one previous report in the literature showing that mice deficient in the peripheral leptin receptor have an ATP production less reliant on glycolysis and an increased capacity for β -oxidation [Park et al., 2010]. In contrast to this observation in breast, other authors have found that leptin stimulates fatty acid oxidation, glucose uptake and ROS production in muscle, endothelial cells and adipocytes [Yamagishi et al., 2001; Minokoshi et al., 2002; Luo et al., 2008], thus activating mitochondrial function [Henry et al., 2011].

Taking into account the sensibility of breast cancer to leptin and the lack of studies exploring its metabolic effects in this tissue, our goal was to analyze the effects of a physiological dose of this hormone in several features of cellular and mitochondrial metabolism in the widely used MCF-7 breast cancer cell line.

MATERIALS AND METHODS

REAGENTS

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) high glucose was from GIBCO (Paisley, UK). Fetal bovine serum (FBS) and penicillin-

streptomycin were from Biological Industries (Kibbutz Beit Haemek, Israel). Hoechst 33342, 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA), 2-deoxyglucose (2-DG), oligomycin, antimycin A, monodansylcadaverine (MDC), and leptin were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). ApoSensor™ Cell Viability Assay Kit was purchased from BioVision (Milpitas, CA), TriPure® isolation reagent from Roche (Barcelona, Spain), primers used were from Metabion (Germany), BCA protein assay from Pierce (Bonn, Germany), and Total OXPHOS human WB antibody cocktail (#MS601) from MitoSciences (Eugene, OR). TFAM (SC-30962), MFN2 (SC-50331), DRP1 (SC-32898), total AMPK α (SC-25792), phospho-AMPK α (SC-33524), and GAPDH (sc-25778) human WB antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Texas), Immun-Star® Western C® Chemiluminescent Kit from Bio Rad Laboratories (Hercules, CA), and OxySelect™ Protein Carbonyl Immunoblot kit was from Cell Biolabs (San Diego, CA). Finally, LysoTracker Red DND-99 (LTR) and Mitotracker Green (MTG) were from Invitrogen-Molecular Probes.

CELL CULTURE AND PROLIFERATION ASSAY

MCF-7 breast cancer cell line was purchased from American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA) and cultured in DMEM supplemented with 10% FBS and 1% antibiotic (penicillin and streptomycin) at 37°C in 5% CO₂. Cells were treated when cultures reached 80% confluence by providing fresh medium supplemented with 50 ng/mL leptin or without (control cells). For proliferation assay, cells were seeded in 96-well plates (7,500 per well) and leptin-treated for 24 h; next, cell proliferation was determined by staining DNA with Hoechst 33342 at a concentration of 0.01 mg/mL for 5 min at 37°C. Cell culture medium was shifted to PBS and fluorescence was measured in a FLx800 microplate fluorescence reader (BIO-TEK Winooski, VT) set at 360 nm excitation and 460 nm emission wavelengths.

INTRACELLULAR ATP LEVELS

For measurement of ATP levels after glycolysis or ATP synthase inhibition, cells were seeded in 96-well plates and cultured for 24 h with leptin. Next, 10 mM 2-DG, 1 μ M oligomycin (glycolysis and mitochondrial ATP synthase inhibitors, respectively) or vehicle were added and incubated for 30 min and ATP levels were measured using the ApoSensor™ Cell Viability Assay Kit. Cell number was determined by the crystal violet method [Nagamine et al., 2009], in parallel-treated wells, in order to normalize ATP levels. Briefly, 20 μ L of Violet Crystal solution (0.5% of Violet Crystal in 30% acetic acid) were added to each well and incubated for 10 min at room temperature. The medium was removed and the plate was washed twice with water. Finally, to solubilize the dye, 100 μ L of methanol were added and plate was shaken for 1 min. Absorbance was measured at 570 nm using a microplate reader (Power Wave XS, BIO-TEK).

LACTATE PRODUCTION

Cells were seeded in a 96-well plates and treated with leptin 50 ng/mL for 24 and 48 h. After treatment, media was replaced by fresh media supplemented or not with leptin and 10 mM 2-DG, 1 μ M oligomycin or vehicle. Within the next 8 h, aliquots of media were collected to determine lactate production by an enzymatic assay. Briefly, lactate was converted into pyruvate in presence of NAD⁺ by

lactate dehydrogenase and NADH formation measured by monitoring the fluorescence in a microplate fluorescence reader (BIO-TEK Winooski, VT) set at 360 nm excitation and 460 nm emission. Immediately after collecting media, cell density was determined by the crystal violet method as described previously.

REAL-TIME QUANTITATIVE PCR

After 6 h of treatment with leptin 50 ng/mL, cell culture medium was removed and total RNA was isolated using TriPure[®] isolation reagent following the manufacturer's protocol and quantified using a spectrophotometer (BioSpec-nano Shimadzu-Biotech) set at 260 nm. One microgram of the total RNA was reverse transcribed to cDNA, and PCR was done for target genes: dynamin-related protein-1 (*DRP1*), mitochondrial fission protein 1 (*FIS1*), mitofusin-1 (*MFN1*), mitofusin-2 (*MFN2*), mitochondrial single strand DNA binding protein (*MTSSB*), optic atrophy-1 (*OPA1*), peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (*PGC-1α*), mitochondrial transcription factor (*TFAM*), and 18S (such as housekeeping), using specific primers (see Table 1) with SYBR Green technology on a LightCycler 480 System II rapid thermal cycler (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). The amplification program consisted of a preincubation step for denaturation of the template cDNA (5 min, 95°C), followed by 45 cycles consisting of denaturation (10 s, 95°C), annealing (10 s, T is detailed in Table 1), and extension steps (12 s, 72°C min). Ct values of the real-time PCR were calculated using the LightCycler Software 3.5.3 by the Second Derivative Maximum method. Ct values were analyzed taking into account the efficiency of the reaction and referring these results to the 18S using the GenEx Standard Software (Multi-DAnalyses, Sweden).

WESTERN BLOT

MCF-7 cells were treated with leptin and lysates were prepared by scraping cells in lysis buffer (20 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl₂, 140 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40, 10% glycerol, 1 mM EGTA, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μg/mL leupeptin,

and 10 μg/mL pepstatin; pH 7.4) and disrupted by sonication. Protein content was determined with a BCA protein assay kit. For Western blot analysis, 35 μg of protein from cell lysates were separated on a 15% SDS-PAGE gel and electrotransferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were incubated in a blocking solution of 5% non-fat powdered milk in Tris-buffered saline-Tween-20 (TBS with 0.05% Tween-20). Total OXPHOS antibody cocktail, TFAM, MFN2, DRP1, total AMPKα, phospho-AMPKα, and GAPDH (housekeeping) antibodies were used as primary antibodies. Protein bands were visualized by Immuno-Star[®] Western C[®] Chemiluminescent Kit Western blotting detection systems. The chemiluminescence signal was acquired with a Chemidoc XRS densitometer (Bio-Rad Laboratories) and results were analyzed with Quantity One Software (Bio-Rad).

ENZYMATIC ACTIVITIES

Cells treated with leptin for 24 h were harvested by scraping them out with PBS buffer and then were centrifuged at 2,500 g for 5 min at 4°C to remove cell debris. The resultant cell pellet was resuspended in sterile water and the lysates were kept on ice and protein measured as previously described. ATP synthase (complex V; EC 3.6.1.3) activity was measured by following the oxidation of NADH at 340 nm and 37°C [Ragan et al., 1987] and the extinction coefficient used was 6.22 M/cm. Cytochrome c oxidase (COX) (complex IV or COX; EC 1.9.3.1) was measured using a spectrophotometric method [Chrzanowska-Lightowlers et al., 1993]. Briefly, cell lysate was incubated in 0.1 M NaPO₄H₂, pH 7, in the presence of 2 μg/mL catalase and 5 mM substrate DAB (3, 3'-diaminebenzidine tetrachloride). After 30 s, 100 μM reduced cytochrome c was added to start the reaction, and absorbance variation was followed over 15 min at 450 nm.

OXYGEN CONSUMPTION RATE (OCR)

After 24 h with leptin 50 ng/ml, 10⁶ cells were harvested and incubated in 1 mL DMEM-FBS in a water-thermostatically

TABLE 1. Primers and Temperature Used for RT-PCR.

Gene	Forward primer (5'-3') Reverse primer (5'-3')	T An. (°C)
<i>DRP1</i>	AAgAACCAACCACAggCAAC gTTCACggCATgACCTTTT	51
<i>FIS1</i>	CTTgCTgTgTCCAAGTCCAA gCTgAAggACgAATCTCAgg	53
<i>MFN1</i>	TTggAgCggAgACTTAgCAT TTCgATCAAgtTCCggATTC	51
<i>MFN2</i>	AgAggCATCAGTgAggTgCT gCAGAACTTTgTCCCAgAgC	56
<i>MTSSB</i>	TgTgAAAAAggggTCTCgAA TggCCAAAgAATCATCC	60
<i>OPA1</i>	ggCCAgCAAATTAgCTACg ACAATgTCAggCACAATCCA	51
<i>PGC-1α</i>	TCATgCCgTggTAAgTACCA gTgCAAAgTTCCTCTCTgC	60
<i>TFAM</i>	AgATTggggTCgggTCACT CAAgACAgATgAAAAACCACCTC	61
<i>18S</i>	ggACACggACAaggATTgACA ACCCACggAATCgAgAAAgA	61

18S, 18S ribosomal RNA; *DRP1*, dynamin-related protein-1; *FIS1*, mitochondrial fission protein 1; *MFN1*, mitofusin-1; *MFN2*, mitofusin-2; *MTSSB*, mitochondrial single strand DNA binding protein; *OPA1*, optic atrophy-1; *PGC-1α*, peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha; T An., annealing temperature; *TFAM*, mitochondrial transcription factor.

regulated chamber with a computer-controlled Clark-type O₂ electrode (Oxygraph; Hansatech, Norfolk, UK). Cells were pre-incubated for 5 min at 37°C and basal respiration rate was measured three times during the following 5 min. Next, compounds modulating mitochondrial function were added sequentially into the assay medium: oligomycin 1 μM was added to reveal ATP synthase-dependent oxygen consumption and antimycin A 1 μM was added to inhibit electron transport chain (ETC) and stop mitochondrial oxygen consumption. Difference between ATP synthase- and ETC-inhibited oxygen consumption was attributed to proton leak.

ROS PRODUCTION ASSAY

ROS production was determined by DCFDA method. Eight-thousand cells were seeded per well in 96-well plates and treated with leptin for 24 h. Plates were incubated for 15 min with 10 μM DCFDA and fluorescence measured in a FLx800 96-well microplate reader (BIO-TEK Winooski, VT) set at excitation and emission wavelengths of 485 and 528 nm, respectively. To normalize ROS production to cell number, culture medium was removed and cell number was measured by staining with Hoechst 33342 as described below.

CARBONYL CONTENT

MCF-7 cells were treated with leptin for 24 h and the presence of carbonyl groups, a measure of protein oxidation, was determined by an immunological method using the OxySelect™ Protein Carbonyl Immunoblot kit. For this purpose, 10 μg of protein from cell lysate were separated on a 12% SDS-PAGE gel and electrotransferred onto nitrocellulose membranes. Protein carbonyls were detected by incubating the membrane with 2, 4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) for 5 min. Unspecific binding sites on the membranes were blocked in 5% non-fat milk in Tris-buffered saline-Tween (TBS with 0.05% Tween-20). After incubation with the DNP-antibody, bands were visualized using the Immuno-Star® Western C® Chemiluminescent Kit (Bio-Rad) Western blotting detection systems. The chemiluminescence signal was captured with a Chemidoc XRS densitometer (Bio-Rad Laboratories) and results were analyzed with Quantity One software (Bio-Rad Laboratories).

MITOCHONDRIAL, LYSOSOMAL, AND AUTOPHAGOSOMAL MASS

Cells were seeded in 96-well plates and treated with leptin for 24 h. After treatment and in order to determine mitochondrial mass, cells were stained with 0.5 μM mitochondrial specific probe mitotracker

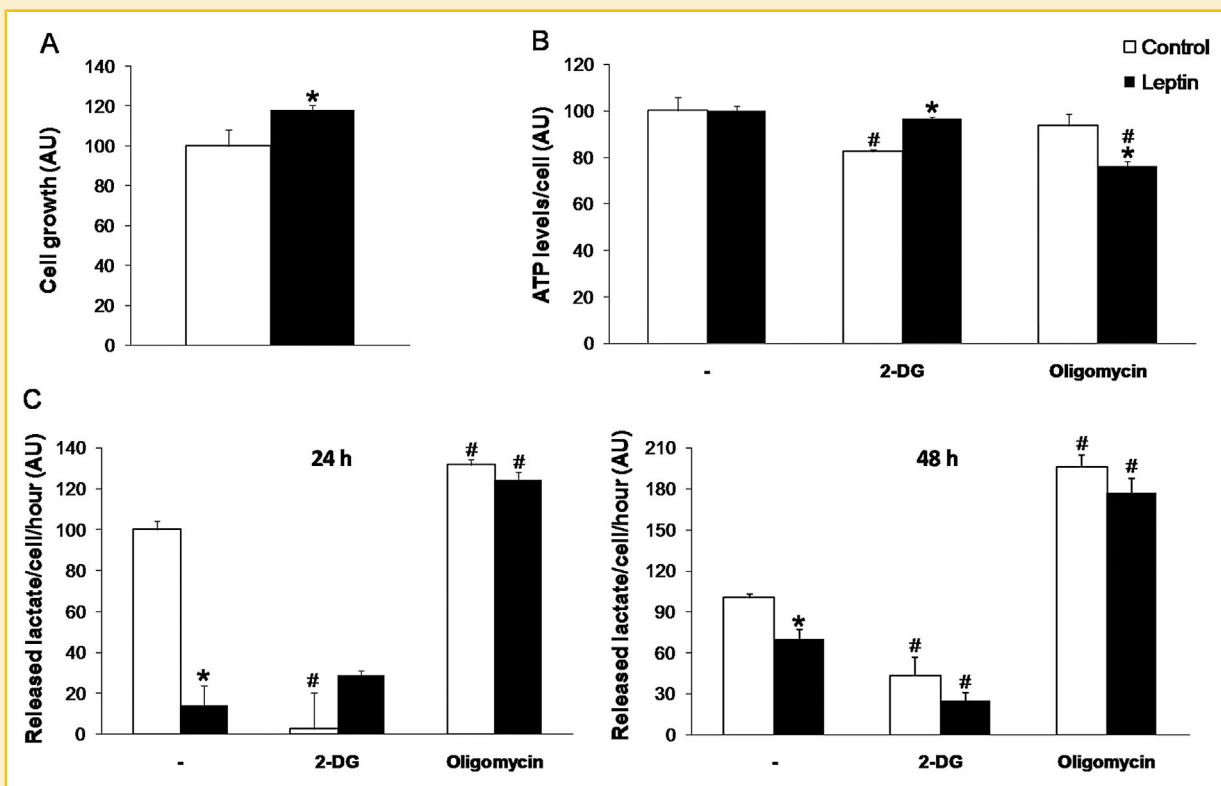


Fig. 1. Cell growth, ATP levels, and released lactate. A) Leptin for 24 h increased cell growth compared to control cells. B) ATP levels were similar between leptin and control cells but leptin increased sensibility to oligomycin (1 μM) and resistance to 2-DG inhibitor (10 mM). C) Leptin-treated cells for 24 h and 48 h presented a lower release of lactate than control cells. Differences between leptin and control cells were annulated after 2-DG or oligomycin addition. Data are expressed in arbitrary units and represent means ± SEM. * Significant difference between leptin-treated and untreated cells (Student's *t*-test; $P \leq 0.05$). # Significant difference between 2-DG or oligomycin-treated and untreated cells (Student's *t*-test; $P \leq 0.05$). 2-DG, 2-deoxyglucose; AU, arbitrary units.

green (MTG) for 60 min. Lysosomes specific probe lysotracker red (LTR) at 77 nM was added for 20 min to evaluate lysosomal mass. To further evaluate the autophagosome formation, after 6 h of leptin treatment cells were incubated with the fluorescent probe monodansylcadaverine (MDC) at 50 μ M for 15 min as described by Dando et al. [2013] with modifications. After incubation with the specific probes, culture medium was replaced by PBS and fluorescence was measured in a microplate fluorescence reader (BIO-TEK Winooski, VT) (Ex 485 nm and Em528 nm for MTG, Ex 530 nm and Em590 nm for LTR, Ex 340 nm and Em535 for MDC). The values were normalized per cell density measured by Crystal Violet assay, as described above.

CONFOCAL MICROSCOPY

Cells were co-stained with LTR, MTG, and Hoechst 33342 as described previously by Rodriguez-Enriquez et al. [2009] with some modifications. MCF-7 cells grown in coverslips were stained with 0.5 μ M MTG for 60 min at 37°C in culture medium, 20 and 5 min prior to image acquisition 77 nM LTR and 1 μ g/mL Hoechst 33342 were added, respectively, to the media. The fluorescence was monitored with a Leica TCS-SP2 confocal microscope and three different fields for each sample were analyzed with *Leica LAS AF* software.

STATISTICAL ANALYSIS

The Statistical Program for the Social Sciences software for Windows (SPSS, version 18.0; SPSS Inc, Chicago, IL) was used for all statistical analyses. Data are presented as means or as linear fold change (in the case of mRNA levels) \pm standard error of the mean (SEM). Statistical differences between treated and non-treated cells were analyzed by Student's *t*-test and statistical significance was set at $P < 0.05$. For confocal microscopy images measurements, the tools comprised in the software *Leica LAS AF* were used.

RESULTS AND DISCUSSION

Previous studies have clearly demonstrated that leptin stimulates proliferation of normal and cancerous mammary epithelial cells [Hu et al., 2002; Artac and Altundag, 2012; Grossmann and Cleary, 2012; Guo et al., 2012]. In accordance, 24 h leptin treatment increased cell growth by 18% with respect to untreated MCF-7 cells (Fig. 1A). Considering that cell metabolism reprogramming is needed to sustain this enhanced cell growth in cancerous states, we decided to explore the effects of leptin on MCF-7 metabolism. Cancer cells rely mainly on aerobic glycolysis for ATP production in detriment of oxidative phosphorylation, phenomenon known as Warburg effect

TABLE 2. Parameters Related to Mitochondrial Biogenesis and Bioenergetics. (A) An increased expression of mRNA biogenesis-related markers was observed after 6 h leptin treatment. Data are expressed as linear fold change (leptin vs. control) and positive values indicate up-regulation. The increase in TFAM protein levels also points towards an enhanced biogenesis. No differences were observed in OXPHOS protein levels (48 h leptin) or in maximal ATP synthase or COX activities (24 h leptin), which suggests that mitochondrial mass was not affected. Control values were set at 100, data are expressed in arbitrary units and represent means \pm SEM (n = 6). (B) Immunoblots showing representative bands of OXPHOS complexes, TFAM, and GAPDH as housekeeping.

mRNA (Linear fold change)		
Leptin vs. control		
<i>PGC-1α</i>	1.69 \pm 0.22*	
<i>TFAM</i>	1.11 \pm 0.10	
<i>MTSSB</i>	1.31 \pm 0.06*	
Protein levels (AU)		
	Control	Leptin
Complex V	100 \pm 2.22	102 \pm 8.14
Complex III	100 \pm 4.02	98.8 \pm 4.24
Complex II	100 \pm 9.53	104 \pm 10.9
Complex IV	100 \pm 11.7	125 \pm 33.9
Complex I	100 \pm 16.7	86.9 \pm 16.1
TFAM	100 \pm 8.15	151 \pm 20.5*
Maximum activity (AU)		
	Control	Leptin
ATPase	100 \pm 3.55	104 \pm 4.50
COX	100 \pm 16.5	104 \pm 8.16

Control		Leptin		
				Complex V (53 kDa)
				Complex III (47 kDa)
				Complex II (30 kDa)
				Complex IV (24 kDa)
				Complex I (20 kDa)
Control		Leptin		
				TFAM (25 kDa)
				GAPDH (37 kDa)

AU, arbitrary units; complex I, subunit NDUFB8-"CI-20"-20 kDa; complex II, FeS subunit 30 kDa-"CII-30"-30 kDa; complex III, subunit core 2-"CIII-core2"-47 kDa; complex IV, subunit II-"CIV-II"-24 kDa; Complex V, ATP synthase subunit alpha-"CV- α "-53 kDa; COX, cytochrome C oxidase; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; MTSSB, mitochondrial single strand DNA binding protein; PGC-1 α , peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha; TFAM, mitochondrial transcription factor.

*Significant difference between leptin-treated and untreated cells (Student's *t*-test; $P \leq 0.05$).

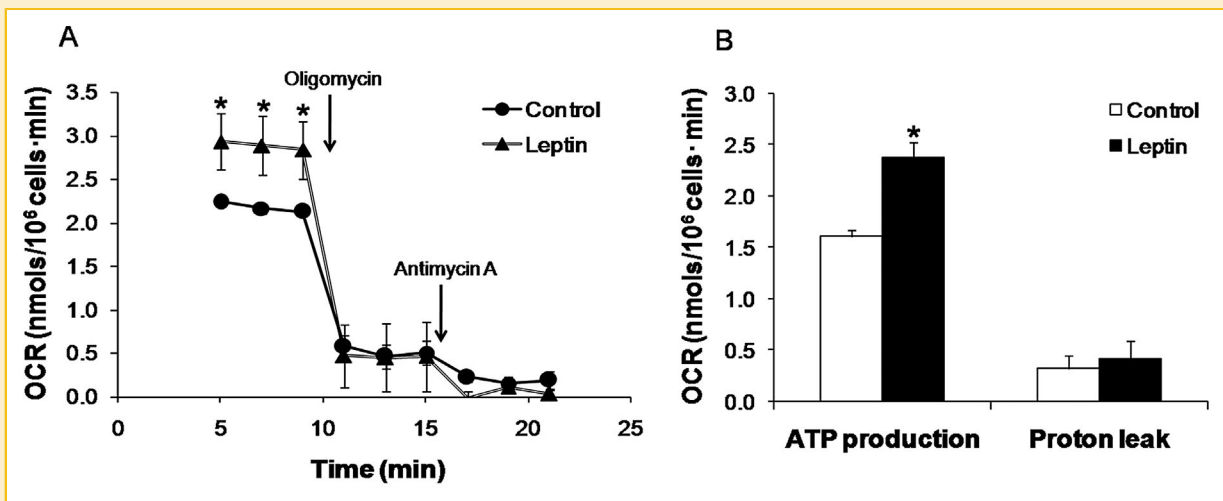


Fig. 2. Oxygen consumption rate. (A) Leptin-treated cells exhibited a higher basal respiration rate than control cells. Respiration rate dropped to similar levels in control and leptin-treated cells after ATP synthase inhibition (oligomycin) and no differences were found after inhibition of electron transport chain (antimycin A). (B) Histograms show ATP synthase- or proton leak-dependent oxygen consumption. Leptin increased the oxygen consumed for ATP production in basal conditions whereas the oxygen consumed for proton leak was unaltered. Data represent means \pm SEM ($n = 3$). *Significant difference between leptin-treated and untreated cells (Student's t -test; $P < 0.05$). 2-DG, 2-deoxyglucose; OCR, oxygen consumption rate.

[Soga, 2013; Wu and Zhao, 2013]. To test whether leptin may shift the source of ATP production, we measured ATP levels after the addition of 2-DG and oligomycin (glycolysis and mitochondrial ATP synthase inhibitors, respectively). As shown in Figure 1B, after 24 h of leptin exposure, cellular ATP levels were more reliant on mitochondria in leptin-treated cells compared to the more glycolysis-dependent metabolism of control cells. In accordance, the rate of glycolysis measured by the release of lactate was

decreased after 24 h of leptin treatment in MCF-7 cells (Fig. 1C). Nevertheless, as shown in the figure, the ability to activate glycolysis after mitochondrial respiration inhibition with oligomycin was preserved in both leptin and control cells.

To explore how leptin increases mitochondrial metabolism we measured the expression of key markers of mitochondrial biogenesis and function. As shown in Table 2, leptin increased the expression of *PGC-1 α* ($P < 0.05$), the master regulator of mitochondrial biogenesis [Jager et al., 2007; Rohas et al., 2007]. In agreement, it has been reported an enhanced expression of *PGC-1 α* with leptin in adipocytes [Luo et al., 2008]. One of the roles of *PGC-1 α* is to promote the expression of *TFAM*, the transcription factor involved in the expression of mitochondrial genome codified genes. We did not find statistical differences in mRNA expression of *TFAM*, but we observed higher protein levels by western blot (Table 2). This apparent discrepancy between mRNA and protein *TFAM* levels may be explained by regulation at translational level. In fact, Jiang et al. [2013] have recently found that *TFAM* expression may be regulated by miRNAs in glioma cells. These authors showed that *TFAM* protein levels were increased by down-regulation of miRNA-23b, which represses *TFAM* mRNA translation. *MTSSB*, another important factor necessary for mtDNA replication and thus for novel mitochondria formation, was also increased by leptin (Table 2). Increased expression of these biogenesis-related markers depicts a scenario of new mitochondria formation, according to the accelerated cell proliferation induced by leptin. Surprisingly, we found no differences in OXPHOS protein levels or in maximal ATP synthase or COX activities after leptin treatment (Table 2). These puzzling findings could be explained if leptin increases mitochondrial functionality rather than mitochondrial mass. To test this assumption, we analyzed cellular oxygen consumption in live cells. Oxygen consumed by mitochondria can be divided into: (i) oxygen

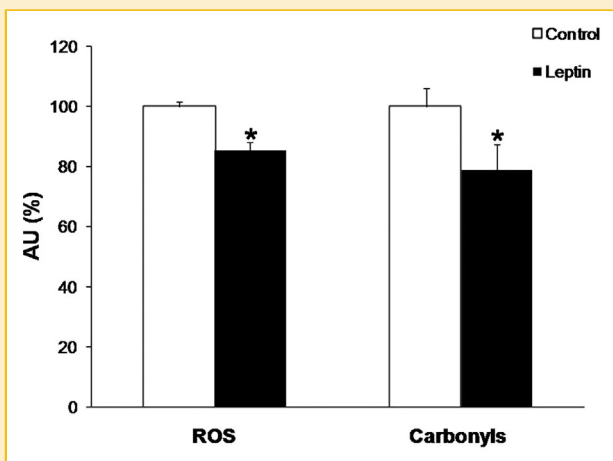


Fig. 3. Oxidative stress status. Histograms show the ROS production and carbonyls levels in control and leptin-treated cells. MCF-7 cells decreased H_2O_2 production and total protein carbonyl levels, thus ameliorating oxidative stress status. Control values were set at 100, data are expressed in arbitrary units and represent means \pm SEM ($n = 6$). *Significant difference between leptin-treated and untreated cells (Student's t -test; $P < 0.05$). AU, arbitrary units; ROS, reactive oxygen species.

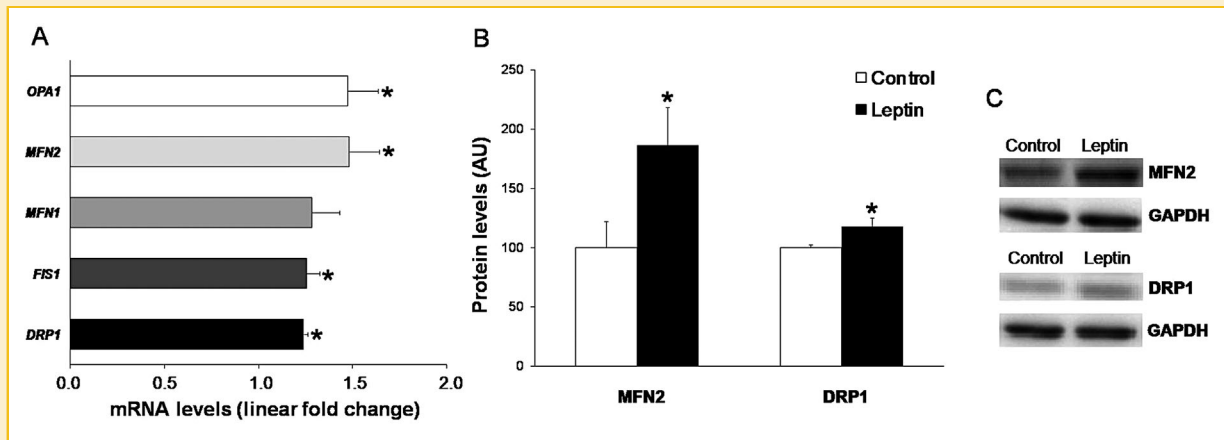


Fig. 4. Expression of mitochondrial fusion and fission related-genes and protein levels. A) Six hours of leptin-treatment elevated mRNA levels of fusion (*OPA1*, *MFN1*, *MFN2*) and fission (*FIS1*, *DRP1*) related-genes. Data are expressed as linear fold change (Leptin vs Control) and positive values indicate up-regulation. B) Histograms show an increase in MFN2 and DRP1 protein levels in leptin-treated cells for 48 h. Control values were set at 100, data are expressed in arbitrary units and represent means \pm SEM ($n = 6$). C) Immunoblots showing representative bands of MFN2, DRP1, and GAPDH as housekeeping. * Significant difference between leptin-treated and untreated cells (Student's *t*-test; $P < 0.05$). DRP1, dynamin-related protein-1; FIS1, mitochondrial fission protein 1; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; MFN1, mitofusin-1; MFN2, mitofusin-2; OPA1, optic atrophy-1.

consumed for ATP production and (ii) oxygen consumed for proton leak [Brand and Nicholls, 2011]. These two components can be estimated by measuring the OCR in the presence of specific inhibitors. As shown in Figure 2A and B, basal OCR was significantly higher in leptin-treated cells compared to untreated ones. After oligomycin addition, OCR dropped to similar levels in both leptin and control cells. The difference between basal- and oligomycin-OCR is the amount of oxygen that is consumed for ATP production [Brand and Nicholls, 2011]. As shown, leptin increases basal oxygen consumption in an ATP synthase-dependent manner. On the other

hand, in order to assess the mitochondrial proton leak, we added antimycin A to entirely inhibit mitochondrial oxygen consumption. The difference between oligomycin- and antimycin A-OCR allows the calculation of the oxygen consumed by proton leak. We did not find differences in proton leak between leptin and control cells. Altogether, OCR analysis suggests that leptin activates state 3 respiration, increasing ATP production, without alteration of uncoupling.

An improvement in mitochondrial function may be revealed not only by increased bioenergetic efficiency but also by a low

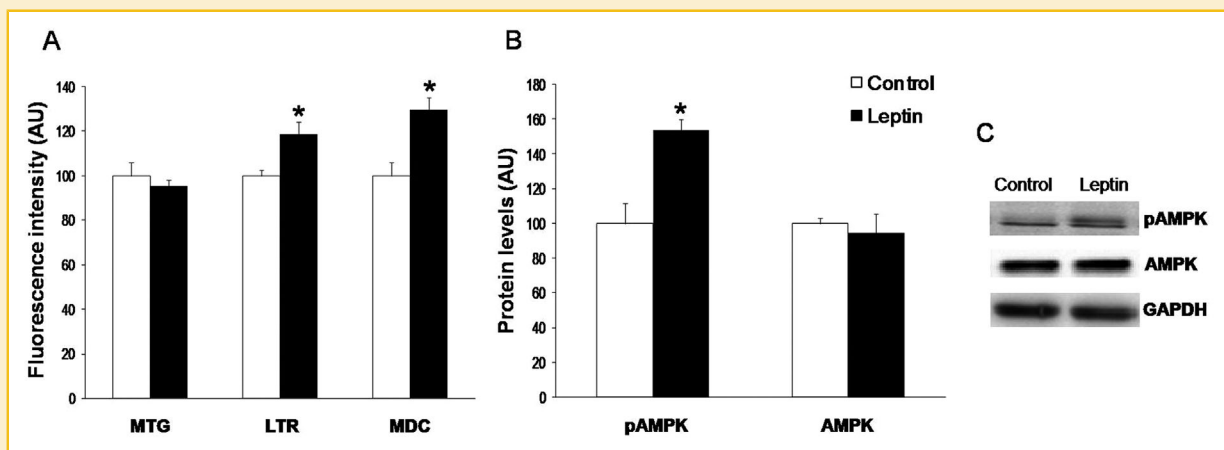


Fig. 5. Mitochondrial and lysosomal mass and autophagy assay. A) Cells treated with leptin showed an increase in the uptake of the fluorescent probe lysotracker red (LTR) and the specific autophagosome probe monodansylcadaverine (MDC). No differences were observed in the uptake of the mitochondrial specific probe (MTG). B) Histograms showing an increase in the phosphorylation of the master regulator of autophagy AMPK. Control values were set at 100, data are expressed in arbitrary units and represent means \pm SEM ($n = 6$). C) Immunoblots showing representative bands of pAMPK, AMPK, and GAPDH as housekeeping. * Significant difference between leptin-treated and untreated cells (Student's *t*-test; $P < 0.05$). AMPK, 5' AMP-activated protein kinase; AU, arbitrary units; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; MDC, monodansylcadaverine; MTG, mitotracker green; LTR, lysotracker red; pAMPK, phosphorylated 5' AMP-activated protein kinase.

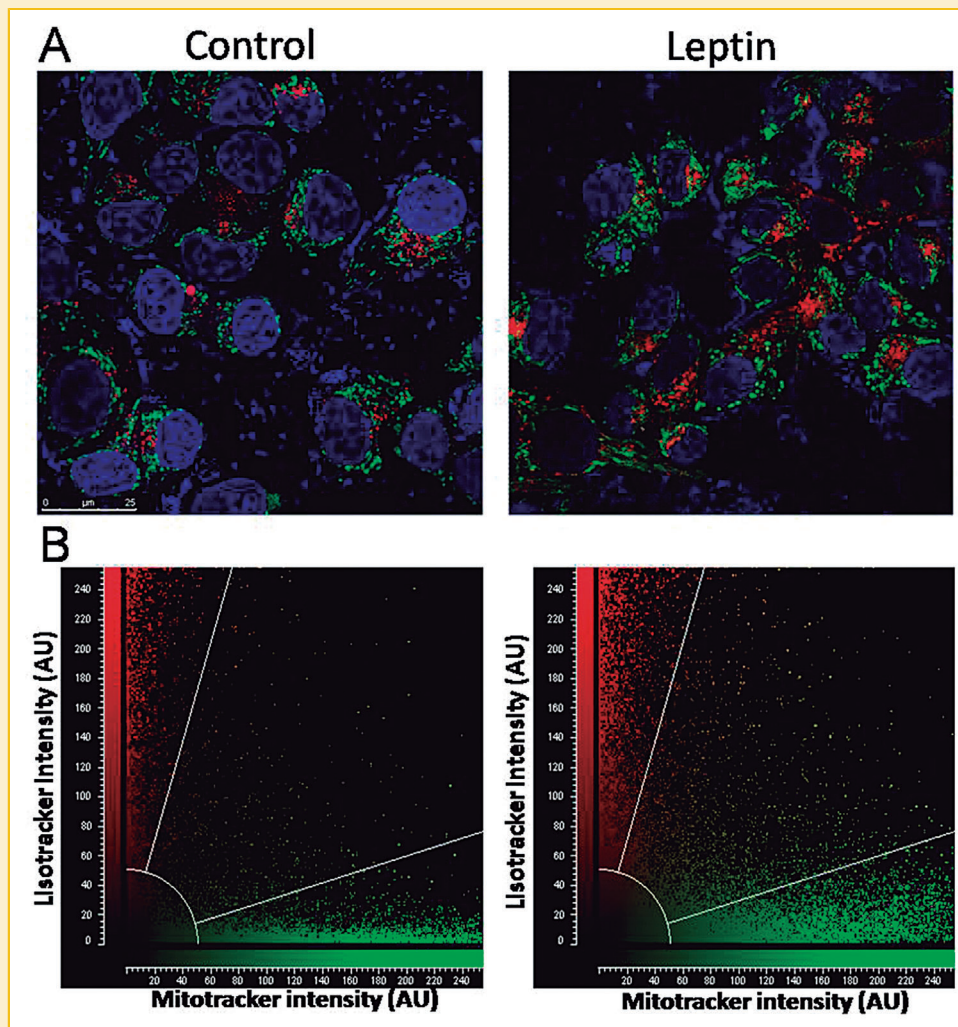


Fig. 6. Confocal microscopy imaging. A) Cells were co-stained with MTG for mitochondria (green), LTR for lysosomes (red) and Hoechst 33342 for nuclei (blue). B) Cytofluorograms show that cells treated with leptin present an increased colocalization between lysosomes and mitochondria. AU, arbitrary units.

production of ROS, the toxic byproduct of oxygen metabolism. To evaluate mitochondria from this point of view, oxidative stress parameters such as H_2O_2 production and carbonyl protein levels were determined. Figure 3 shows a statistically significant decrease in the levels of both parameters after 24 h of leptin exposure (-15% and -20% , respectively). The amelioration of oxidative damage along with the higher ATP production suggests that leptin improves mitochondrial respiratory chain function.

At this point, the question about how leptin improves mitochondrial function on MCF-7 breast cancer cells may arise. Mitochondria are highly dynamic organelles and undergo constant fusion and fission, processes essential for maintaining physiological functions of cells and help maximize the capacity for oxidative phosphorylation under stressful conditions [Grandemange et al., 2009; Youle and van der Bliek, 2012]. To determine whether leptin affects mitochondrial dynamics, mRNA and levels of proteins involved in fusion (OPA1, MFN1, and MFN2) and fission (FIS1 and DRP1) were examined. Figure 4A shows that the expression of *OPA1*, *MFN2*,

FIS1 and *DRP1* genes was significantly increased by leptin in MCF-7 cells. Higher levels of the proteins MFN2 and DRP1 were confirmed by western blot (Fig. 4B). Mitochondrial fusion helps to mitigate stress by mixing and complementing the contents of partially damaged mitochondria, whereas fission is part of the process of mitochondrial biogenesis but also contributes to quality control by enabling the removal of damaged mitochondria by mitophagy [Novak, 2012; Youle and van der Bliek, 2012]. Accelerated fusion-fission cycles, in balance with increased biogenesis and mitophagy, allow cells to purge damaged mitochondria by its excision from the network and their autophagy by lysosomes [Chan, 2012; Youle and van der Bliek, 2012]. In this regard, a net increase of lysosomes ($+19\%$) and autophagosomes ($+30\%$) without net changes in mitochondrial mass were observed in cells exposed to leptin using the specific probes LTR, MDC, and MTG, respectively (Fig. 5A). Furthermore, leptin induced the phosphorylation of AMPK, considered the master regulator of autophagy (Fig. 5B) [Hoyer-Hansen et al., 2007; Kim et al., 2011]. Confocal microscopy analysis

of co-stained cells with LTR and MTG showed a greater colocalization between mitochondria and lysosomes after leptin treatment, which points towards an increased mitophagy induced by leptin (Fig. 6). Thus, accelerated fusion–fission cycles in balance with increased biogenesis and mitophagy may be a mechanism by which leptin allows cells to purge a greater number of damaged mitochondria.

Leptin is known to modulate cell metabolism through central nervous system and directly in leptin-sensitive-tissues [Anubhuti and Arora, 2008]. Previous work using *ob/ob* mice found that hepatic basal metabolic rate was decreased with leptin as a result of a reduction in mitochondrial volume and mitochondrial respiratory chain components [Singh et al., 2009]. Although these findings in liver are opposite to our findings in breast cancer cells, both studies evidence the ability of leptin to modulate mitochondrial metabolism in different tissues. Previous work by Park et al. [2010] using a breast cancer model of *db/db* mice deficient in Ob-R in peripheral tissues found strong evidence that leptin signaling supports the Warburg effect by suppressing mitochondrial respiration *in vivo*. Here, in the widely used MCF-7 breast cancer cells, we have found higher mitochondrial oxygen consumption without changes in mitochondrial volume density or respiratory chain proteins. In agreement with our study, other authors have reported that leptin increases mitochondrial biogenesis through PGC-1 α activation in muscle [Jager et al., 2007; Rohas et al., 2007]. Regarding to the molecular mechanisms involved in leptin action, previous studies have shown that leptin selectively stimulates phosphorylation and activation of AMPK in skeletal muscle which in turn stimulates fatty-acid oxidation [Minokoshi et al., 2002]. It is well known that activation of AMPK results in mitochondrial biogenesis in skeletal muscle [Bergeron et al., 2001; Zong et al., 2002] and reduction of intracellular ROS levels [Kukidome et al., 2006; Ouedraogo et al., 2006]. Thus, in contrast to the study of Park et al. [2010] our results support a role for leptin increasing oxidative metabolism in breast cancer cells, similar as occurs in muscle cells [Minokoshi et al., 2002]. A common candidate mechanism of the action of leptin in mitochondria of breast cancer and muscle cells could be the activation of the energy sensor AMPK. This enzymatic complex acts as a signaling hub orchestrating mitochondrial biogenesis, metabolism, and autophagy, allowing cells to set up the mitochondrial machinery to face an energetic challenge. Future work addressing leptin effects in breast cancer compared to normal breast cell lines would also be of interest to determine specific features of leptin role on cancerous metabolism. On the other hand, further studies using a wider panel of cell lines and other animal models such as the *ob/ob* mice will shed more light on the complex relationship between leptin and breast cancer metabolism.

CONCLUSIONS

To sum up, our results suggest a role for leptin in mitochondrial biogenesis and dynamics with an amelioration of oxidative stress and higher mitochondrial ATP production. Changes in mitochondria quality control or metabolic reprogramming may be underlying leptin action, which probably confers benefits for the growth and survival of breast cancer cells.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Fondo de Investigaciones Sanitarias of Instituto de Salud Carlos III (PI12/01827 and PI14/01434) of the Spanish Government cofinanced by FEDER-Unión Europea (“Una manera de hacer Europa”) and funds from Comunitat Autònoma de les Illes Balears and FEDER (31/2011). MM. Blanquer-Rosselló was funded by FPU grant of Ministerio de Educación, Cultura y Deporte of Spanish Government.

REFERENCES

- Ahima RS, Flier JS. 2000. Leptin. *Annu Rev Physiol* 62:413–437.
- Anubhuti, Arora S. 2008. Leptin and its metabolic interactions: An update. *Diabetes Obes Metab* 10:973–993.
- Artac M, Altundag K. 2012. Leptin and breast cancer: An overview. *Med Oncol* 29:1510–1514.
- Bergeron R, Ren JM, Cadman KS, Moore IK, Perret P, Pypaert M, Young LH, Semenkovich CF, Shulman GI. 2001. Chronic activation of AMP kinase results in NRF-1 activation and mitochondrial biogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281:E1340–E1346.
- Bjorbaek C, Kahn BB. 2004. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog Horm Res* 59:305–331.
- Brand MD, Nicholls DG. 2011. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J* 435:297–312.
- Calle EE, Thun MJ. 2004. Obesity and cancer. *Oncogene* 23:6365–6378.
- Cleary MP, Maihle NJ. 1997. The role of body mass index in the relative risk of developing premenopausal versus postmenopausal breast cancer. *Proc Soc Exp Biol Med* 216:28–43.
- Cohen MM, Jr. 2006. Role of leptin in regulating appetite, neuroendocrine function, and bone remodeling. *Am J Med Genet A* 140:515–524.
- Chan DC. 2012. Fusion and fission: Interlinked processes critical for mitochondrial health. *Annu Rev Genet* 46:265–287.
- Chrzanoska-Lightowlers ZM, Turnbull DM, Lightowlers RN. 1993. A microtiter plate assay for cytochrome c oxidase in permeabilized whole cells. *Anal Biochem* 214:45–49.
- Dando I, Fiorini C, Pozza ED, Padroni C, Costanzo C, Palmieri M, Donadelli M. 2013. UCP2 inhibition triggers ROS-dependent nuclear translocation of GAPDH and autophagic cell death in pancreatic adenocarcinoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1833:672–679.
- Grandemange S, Herzog S, Martinou JC. 2009. Mitochondrial dynamics and cancer. *Semin Cancer Biol* 19:50–56.
- Grossmann ME, Cleary MP. 2012. The balance between leptin and adiponectin in the control of carcinogenesis—focus on mammary tumorigenesis. *Biochimie* 94:2164–2171.
- Guo S, Liu M, Wang G, Torroella-Kouri M, Gonzalez-Perez RR. 2012. Oncogenic role and therapeutic target of leptin signaling in breast cancer and cancer stem cells. *Biochim Biophys Acta* 1825:207–222.
- Han G, Wang L, Zhao R, Yue Z, Zhou X, Hu X, Cao Y, Dai D, Liu J. 2012. Leptin promotes human glioblastoma growth through activating Signal Transducers and Activators of Transcription 3 signaling. *Brain Res Bull* 87:274–279.
- Henry BA, Andrews ZB, Rao A, Clarke IJ. 2011. Central leptin activates mitochondrial function and increases heat production in skeletal muscle. *Endocrinology* 152:2609–2618.
- Hoyer-Hansen M, Bastholm L, Szyniarowski P, Campanella M, Szabadkai G, Farkas T, Bianchi K, Fehrenbacher N, Elling F, Rizzuto R, Mathiasen IS, Jaattela M. 2007. Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2. *Mol Cell* 25:193–205.

- Hu X, Juneja SC, Maihle NJ, Cleary MP. 2002. Leptin—a growth factor in normal and malignant breast cells and for normal mammary gland development. *J Natl Cancer Inst* 94:1704–1711.
- Ishikawa M, Kitayama J, Nagawa H. 2004. Enhanced expression of leptin and leptin receptor (OB-R) in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 10:4325–4331.
- Jager S, Handschin C, St-Pierre J, Spiegelman BM. 2007. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . *Proc Natl Acad Sci USA* 104:12017–12022.
- Jiang J, Yang J, Wang Z, Wu G, Liu F. 2013. TFAM is directly regulated by miR-23b in glioma. *Oncol Rep* 30:2105–2110.
- Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. 2011. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* 13:132–141.
- Konopleva M, Mikhail A, Estrov Z, Zhao S, Harris D, Sanchez-Williams G, Kornblau SM, Dong J, Kliche KO, Jiang S, Snodgrass HR, Estey EH, Andreeff M. 1999. Expression and function of leptin receptor isoforms in myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes: Proliferative and anti-apoptotic activities. *Blood* 93:1668–1676.
- Kukidome D, Nishikawa T, Sonoda K, Imoto K, Fujisawa K, Yano M, Motoshima H, Taguchi T, Matsumura T, Araki E. 2006. Activation of AMP-activated protein kinase reduces hyperglycemia-induced mitochondrial reactive oxygen species production and promotes mitochondrial biogenesis in human umbilical vein endothelial cells. *Diabetes* 55:120–127.
- Liu Y, Lv L, Xiao W, Gong C, Yin J, Wang D, Sheng H. 2011. Leptin activates STAT3 and ERK1/2 pathways and induces endometrial cancer cell proliferation. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 31:365–370.
- Luo GF, Yu TY, Wen XH, Li Y, Yang GS. 2008. Alteration of mitochondrial oxidative capacity during porcine preadipocyte differentiation and in response to leptin. *Mol Cell Biochem* 307:83–91.
- Margetic S, Gazzola C, Pegg GG, Hill RA. 2002. Leptin: A review of its peripheral actions and interactions. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26:1407–1433.
- Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Muller C, Carling D, Kahn BB. 2002. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 415:339–343.
- Miyoshi Y, Funahashi T, Tanaka S, Taguchi T, Tamaki Y, Shimomura I, Noguchi S. 2006. High expression of leptin receptor mRNA in breast cancer tissue predicts poor prognosis for patients with high, but not low, serum leptin levels. *Int J Cancer* 118:1414–1419.
- Nagamine MK, da Silva TC, Matsuzaki P, Pinello KC, Cogliati B, Pizzo CR, Akisue G, Haraguchi M, Gorniak SL, Sinhonorini IL, Rao KV, Barbuto JA, Dagli ML. 2009. Cytotoxic effects of butanolic extract from *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) on cultured human breast cancer cell line MCF-7. *Exp Toxicol Pathol* 61:75–82.
- Nakao T, Hino M, Yamane T, Nishizawa Y, Morii H, Tatsumi N. 1998. Expression of the leptin receptor in human leukaemic blast cells. *Br J Haematol* 102:740–745.
- Novak I. 2012. Mitophagy: A complex mechanism of mitochondrial removal. *Antioxid Redox Signal* 17:794–802.
- Ouedraogo R, Wu X, Xu SQ, Fuchsel L, Motoshima H, Mahadev K, Hough K, Scalia R, Goldstein BJ. 2006. Adiponectin suppression of high-glucose-induced reactive oxygen species in vascular endothelial cells: Evidence for involvement of a cAMP signaling pathway. *Diabetes* 55:1840–1846.
- Park J, Kusminski CM, Chua SC, Scherer PE. 2010. Leptin receptor signaling supports cancer cell metabolism through suppression of mitochondrial respiration in vivo. *Am J Pathol* 177:3133–3144.
- Ragan CI, Wilson MT, Darley-USmar VM, Lowe PN. 1987. Sub-fractionation of mitochondria and isolation of the proteins of oxidative phosphorylation. In: *Mitochondria: A practical approach*. London: IRL Press. pp 79–112.
- Rodriguez-Enriquez S, Kai Y, Maldonado E, Currin RT, Lemasters JJ. 2009. Roles of mitophagy and the mitochondrial permeability transition in remodeling of cultured rat hepatocytes. *Autophagy* 5:1099–1106.
- Rohas LM, St-Pierre J, Uldry M, Jager S, Handschin C, Spiegelman BM. 2007. A fundamental system of cellular energy homeostasis regulated by PGC-1 α . *Proc Natl Acad Sci USA* 104:7933–7938.
- Saxena NK, Vertino PM, Anania FA, Sharma D. 2007. Leptin-induced growth stimulation of breast cancer cells involves recruitment of histone acetyltransferases and mediator complex to CYCLIN D1 promoter via activation of Stat3. *J Biol Chem* 282:13316–13325.
- Schubring C, Prohaska F, Prohaska A, Englaro P, Blum W, Siebler T, Kratzsch J, Kiess W. 1999. Leptin concentrations in maternal serum and amniotic fluid during the second trimester: Differential relation to fetal gender and maternal morphometry. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 86:151–157.
- Singh A, Wirtz M, Parker N, Hogan M, Strahler J, Michailidis G, Schmidt S, Vidal-Puig A, Diano S, Andrews P, Brand MD, Friedman J. 2009. Leptin-mediated changes in hepatic mitochondrial metabolism, structure, and protein levels. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:13100–13105.
- Soga T. 2013. Cancer metabolism: Key players in metabolic reprogramming. *Cancer Sci* 104:275–281.
- Sweeney G. 2002. Leptin signalling. *Cell Signal* 14:655–663.
- Wallace DC. 2012. Mitochondria and cancer. *Nat Rev Cancer* 12:685–698.
- Warburg O. 1956. On the origin of cancer cells. *Science* 123:309–314.
- Willett WC. 1997. Fat, energy, and breast cancer. *J Nutr* 127:921S–923S.
- Wu W, Zhao S. 2013. Metabolic changes in cancer: Beyond the Warburg effect. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 45:18–26.
- Yamagishi SI, Edelstein D, Du XL, Kaneda Y, Guzman M, Brownlee M. 2001. Leptin induces mitochondrial superoxide production and monocyte chemo-attractant protein-1 expression in aortic endothelial cells by increasing fatty acid oxidation via protein kinase A. *J Biol Chem* 276:25096–25100.
- Youle RJ, van der Blik AM. 2012. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science* 337:1062–1065.
- Zhu J, Wang KZ, Chu CT. 2013. After the banquet: Mitochondrial biogenesis, mitophagy, and cell survival. *Autophagy* 9:1663–1676.
- Zong H, Ren JM, Young LH, Pypaert M, Mu J, Birnbaum MJ, Shulman GI. 2002. AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:15983–15987.

Manuscrit II

Blanquer-Rosselló MM, Oliver J, Sastre - Serra J, Valle A, Roca P.

Leptin regulates energy metabolism in MCF-7 breast cancer cells

Int J Biochem Cell Biol. 2016 Mar; 72:18-26. doi: 10.1016/j.biocel.2016.01.002



Leptin regulates energy metabolism in MCF-7 breast cancer cells



M^a del Mar Blanquer-Rosselló^{a,b,c}, Jordi Oliver^{a,b,c}, Jorge Sastre-Serra^{a,b,c},
Adamo Valle^{a,b,c,*}, Pilar Roca^{a,b,c}

^a Grupo Multidisciplinar de Oncología Traslacional, Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut (IUNICS), Palma de Mallorca, Illes Balears, Spain

^b Ciber Fisiopatología Obesidad y Nutrición (CB06/03) Instituto Salud Carlos III, Madrid, Spain

^c Instituto de Investigación Sanitaria de Palma (IdISPa), Hospital Universitario Son Espases, edificio S., E-07120 Palma de Mallorca, Illes Balears, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 October 2015

Received in revised form

14 December 2015

Accepted 5 January 2016

Available online 6 January 2016

Keywords:

Breast cancer

Leptin

Warburg effect

Metabolism

Lipid oxidation

Glycolysis

ABSTRACT

Obesity is known to be a poorer prognosis factor for breast cancer in postmenopausal women. Among the diverse endocrine factors associated to obesity, leptin has received special attention since it promotes breast cancer cell growth and invasiveness, processes which force cells to adapt their metabolism to satisfy the increased demands of energy and biosynthetic intermediates. Taking this into account, our aim was to explore the effects of leptin in the metabolism of MCF-7 breast cancer cells. Polarographic analysis revealed that leptin increased oxygen consumption rate and cellular ATP levels were more dependent on mitochondrial oxidative metabolism in leptin-treated cells compared to the more glycolytic control cells. Experiments with selective inhibitors of glycolysis (2-DG), fatty acid oxidation (etomoxir) or aminoacid deprivation showed that ATP levels were more reliant on fatty acid oxidation. In agreement, levels of key proteins involved in lipid catabolism (FAT/CD36, CPT1, PPAR α) and phosphorylation of the energy sensor AMPK were increased by leptin. Regarding glucose, cellular uptake was not affected by leptin, but lactate release was deeply repressed. Analysis of pyruvate dehydrogenase (PDH), lactate dehydrogenase (LDH) and pyruvate carboxylase (PC) together with the pentose-phosphate pathway enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) revealed that leptin favors the use of glucose for biosynthesis. These results point towards a role of leptin in metabolic reprogramming, consisting of an enhanced use of glucose for biosynthesis and lipids for energy production. This metabolic adaptations induced by leptin may provide benefits for MCF-7 growth and give support to the reverse Warburg effect described in breast cancer.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Altered tumor metabolism is one of the hallmarks of cancer. The pioneer work of Warburg and colleagues in 1920s showed that cancer cells metabolize glucose to lactate despite oxygen presence, phenomenon known as the Warburg effect or aerobic glycolysis

Abbreviations: 2-DG, 2-deoxyglucose; AMPK, 5' AMP-activated protein kinase; FAT/CD36, fatty acid translocase or cluster of differentiation 36; CPT1, carnitine palmitoyltransferase I; CS, citrate synthase; G6PDH, glucose-6-phosphate dehydrogenase; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GLUT2, glucose transporter 2; LDH, lactate dehydrogenase; PDH, pyruvate dehydrogenase; pAMPK, phosphorylated 5' AMP-activated protein kinase; OCR, oxygen consumption rate; OXPHOS, oxidative phosphorylation; PC, pyruvate carboxylase; PDH, pyruvate dehydrogenase; PPAR α , peroxisome proliferator-activated receptor alpha.

* Corresponding author at: Departamento de Biología Fundamental y Ciencias de la Salud, Universitat de les Illes Balears, Ed. Guillem Colom Cas. Cra Valldemossa Km 7.5, 07122 Palma de Mallorca, Spain. Tel.: +34 971259644; fax: +34 971 173184.

E-mail address: adamo.valle@uib.es (A. Valle).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biociel.2016.01.002>

1357-2725/© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

(Koppenol et al., 2011). Recently it has been demonstrated that cancer cell metabolism goes beyond a simple interplay between glycolysis and mitochondria, given that the anabolic pathways are necessary to provide proteins, fatty acids and nucleic acids for rapid tumor proliferation (Vander Heiden et al., 2009). Thus, cancer cells need the glycolytic and pentose phosphate pathway as well as the Krebs cycle for their biosynthetic intermediates. In spite of Warburg's first assumption that mitochondrial respiration is impaired in tumor cells, recent findings evidence the presence of functional mitochondria in these cells. Indeed, some tumors either rely mainly on oxidative phosphorylation (Moreno-Sanchez et al., 2007; Ward and Thompson, 2012; Whitaker-Menezes et al., 2011a) or switch between aerobic glycolysis and oxidative metabolism depending on their microenvironment, thus giving them metabolic flexibility (Rodríguez-Enriquez et al., 2001). Recently, Lisanti and colleagues have described for human breast cancer that aerobic glycolysis actually takes place in tumor-associated fibroblasts, and not properly in the epithelial cancer cells (Pavlidis et al., 2009). This innovative idea, termed as "The Reverse Warburg effect", proposes

that aerobic glycolysis in cancer-associated fibroblasts results in the production of high-energy metabolites (such as lactate and pyruvate), which can then be transferred to adjacent epithelial cancer cells undergoing oxidative mitochondrial metabolism (Pavlidis et al., 2009; Bonuccelli et al., 2010; Whitaker-Menezes et al., 2011b).

Obesity greatly influences risk, prognosis and progression of certain types of cancer (Wolin et al., 2010; Majed et al., 2008). The prevalence of breast cancer in postmenopausal obese women has been attributed to altered endocrine status, with estrogen and leptin being the most prominent involved factors (Calle and Thun, 2004; Cleary and Maihle, 1997; Willett, 1997; Porter et al., 2006). In fact, various studies have shown that leptin influences almost all stages of tumorigenesis acting in an endocrine, paracrine and autocrine manner (Saxena and Sharma, 2013). Leptin is a peptide hormone principally secreted by adipocytes and to a lesser extent by other tissues (Saxena and Sharma, 2013; Muoio and Lynis Dohm, 2002). Serum leptin levels rise with increasing adiposity (Muoio and Lynis Dohm, 2002) and regulate energy intake and expenditure through its receptor located in the neurons of the hypothalamic nuclei (Schwartz et al., 1996). However, the leptin receptor (OB-R) has a widespread expression in peripheral tissues including liver, pancreas, adipose tissue, skeletal muscle and mammary gland (Mercer et al., 1996; Ahima and Flier, 2000; Schubring et al., 1999). This ubiquitous OB-R distribution in almost all tissues explains the underlying pleiotropic roles of leptin (Fruhbeck, 2006; Anubhuti and Sarika Arora, 2008).

A hyperactive leptin-signaling network leads to the concurrent activation of multiple pathways involved in proliferation, resistance to apoptosis, cell adhesion, invasion and migration in breast cancer cells (Saxena and Sharma, 2013; Saxena et al., 2007; Somasundar et al., 2004). Nevertheless, little is known about the effects of leptin in breast cancer metabolism. In other tissues such as skeletal muscle and fat, receptor-leptin binding promotes energy dissipation and prevents fatty acid accumulation by increasing fatty acid oxidation (Ceddia, 2005). Several reports suggest that one of the targets of leptin action in these tissues is the energy sensing 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) which plays a major role in the regulation of cellular lipid and protein metabolism (Minokoshi et al., 2002; Janovska et al., 2008; Steinberg et al., 2003).

Given the ability of leptin to influence cellular metabolism and taking into consideration the importance of energy production and the biosynthetic processes necessary to support rapid cell growth, a more comprehensive assessment of the influence of this adipokine on the metabolic features of breast epithelial cancer cells may shed new light on the association between obesity and a poor prognosis for breast cancer. Thus, the aim of this work is to better understand the role of leptin in MCF-7 breast cancer cells metabolism to further elucidate how this adipokine participates in the induction of the proliferative response in cancer cells.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) high glucose without phenol red was from GIBCO (Paisley, UK). Charcoal-stripped fetal bovine serum (FBS) and penicillin-streptomycin were from Biological Industries (Kibbutz Beit Haemek, Israel). 2-DG, oligomycin, etomoxir and leptin were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). ApoSensor™ Cell Viability Assay Kit was purchased from BioVision (Milpitas, CA) and BCA protein assay from Pierce (Bonn, Germany). The Glucose MR Kit was from Bioquímica lineal Chemicals/Cromatest (Barcelona, Spain). Total OXPHOS human WB antibody cocktail (#MS601) was from MitoSciences (Eugene,

OR, USA). Human WB antibodies AMPK α (SC-25792), phospho-AMPK α (SC-33524), FAT/CD36 (SC-9154), CPT1 (SC-20669), GAPDH (SC-25778), PDH-E1 (SC-377092), PPAR α (SC-9000) and tubulin (SC-5286) were from Santa Cruz Biotechnology (Texas, USA). Human WB antibody GLUT2 (AB-1342) was from Chemicon International (Temecula, CA, USA) and LDH (#2012) was from Cell Signaling (Danvers, MA, USA). Immun-Star® Western C^o Chemiluminescent Kit was from Bio Rad Laboratories (Hercules, CA). Finally, PDH Enzyme Activity Microplate Assay Kit was from Abcam (Cambridge, UK).

2.2. Cell culture

MCF-7 breast cancer cell line was purchased from American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA) and cultured in DMEM high glucose without phenol red supplemented with 10% charcoal-stripped FBS and 1% antibiotic (penicillin and streptomycin) at 37 °C in 5% CO₂. Cell were treated when cultures reached 80% confluence by providing fresh medium supplemented with 100 ng/mL leptin or without (control cells) for 24 h.

2.3. Oxygen consumption rate

After leptin treatment, cells were harvested and 10⁶ cells were incubated in 0.5 mL of DMEM high glucose without phenol red supplemented with 10% charcoal-stripped FBS in a water-thermostatically regulated chamber with a computer-controlled Clark-type O₂ electrode (Oxygraph; Hansatech, Norfolk, UK). Cells were preincubated for 5 min at 37 °C and basal respiration rate was measured three times during the following 5 min. Next, sequential aliquots of 2-DG were added in order to obtain concentrations of 5, 10 and 20 mM into the chamber and respiration rate was measured. The same procedure was followed for oligomycin (0.25, 0.5 and 1 μ M).

2.4. Intracellular ATP levels

Cells were seed in 96-well plates and cultured for 24 h with leptin. ATP levels were measured using the ApoSensor™ Cell Viability Assay Kit, after treatment with different concentrations of 2-DG or oligomycin for 30 min. For assessment of fatty acid oxidation cells were preincubated with 50 μ M etomoxir for 30 min prior to 2-DG addition. For amino acid deprivation experiment, media was shifted to Krebs-Ringer modified buffer (NaCl 145 mM, KCl 4.86 mM, CaCl₂ 0.54 mM, MgSO₄ 1.22 mM, 5.7 mM NaH₂PO₄, glucose 4.5 g/L and 10% charcoal-stripped FBS) 30 min before 20 mM 2-DG addition. For data normalization, cell number was determined in parallel treated wells by the Crystal Violet method (Nagamine et al., 2009). Briefly, 20 μ L of violet crystal solution (0.5% of violet crystal in 30% acetic acid) were added to each well and incubated for 10 min at room temperature. The plate was washed twice with distilled water and dye solubilized with 100 μ L of methanol shaking for 1 min. Finally, absorbance was measured at 570 nm using a microplate reader (Power Wave XS, Bio-Tek).

2.5. Western blot

MCF-7 cells were treated with leptin for 24 h and lysates were prepared by scraping cells in RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% deoxycholate, 1% Triton x-100, 1 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 2 m PMSF, 0.01 mM leupeptin, 0.01 mM pepstatin and 1 mM NaF; pH 7.5) and disrupted by sonication. Protein content was determined with a BCA protein assay kit. For Western blot analysis, 35 μ g of protein from cell lysates were separated on SDS-PAGE gels and electrotransferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were incubated in a blocking solution of 5%

non-fat powdered milk in Tris-buffered saline-Tween-20 (TBS with 0.05% Tween-20). Primary antibodies were used to detect the following proteins: AMPK, phospho-AMPK, FAT/CD36, CPT1, GAPDH, GLUT2, LDH, OXPHOS complexes, PDH, PPAR α and tubulin as a housekeeping. Protein bands were visualized by Immuno-Star[®] Western C[®] Chemiluminescent Kit Western blotting detection systems. The chemiluminescence signal was acquired with a Chemidoc XRS densitometer (Bio-Rad Laboratories) and results were analyzed with Quantity One Software (Bio-Rad).

2.6. Lactate production

Cells were seeded in 96-well plates and treated with 100 ng/mL leptin for 24 h. After treatment, media was replaced by fresh media with or without leptin containing 20 mM 2-DG, 1 μ M oligomycin or vehicle (0.05% DMSO) and aliquots of media were collected every 2 h to determine lactate concentration. The enzymatic assay used is based on the capacity of lactate dehydrogenase to convert lactate into pyruvate in presence of NAD⁺ and lactate levels were measured following the NADH formation by monitoring the fluorescence in a microplate fluorescence reader (BIO-TEK Winooski, Vermont, USA) set at 360 nm excitation and 460 nm emission. Immediately after collecting media, cell number was determined by the crystal violet method, as described previously.

2.7. Glucose uptake

Cells were seeded in 96-well plates and leptin treatment maintained for 24 h. After treatment, media was replaced by fresh media with or without leptin containing 0.5 μ M oligomycin or vehicle (0.05% DMSO) and left for further 24 h. The following day, an aliquot of media was collected from each well and glucose concentration was determined by using the Glucose MR Kit. Data were normalized by cell density measured by crystal violet method, as described previously.

2.8. Enzymatic activities

Cells treated with leptin for 24 h were harvested by scraping with ice-cold PBS and then centrifuged at 5000 rpm for 5 min at 4 °C to remove cell debris. Cell pellets were suspended in a buffered solution (20 mM Tris, 2 mM EDTA and 40 mM KCl; pH 7.4) and disrupted by sonication. Protein concentration was determined with the BCA protein assay kit. Cell extract was used to determine the next enzymatic activities. Citrate synthase (CS) activity (EC 2.3.3.1.) was measured by following APAD reduction to APADH at 365 nm by citrate synthase-dependent malate dehydrogenase reaction (Lee et al., 2008). Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) activity (EC 1.1.1.49) was determined by monitoring the reduction of

NADP⁺ at 340 nm with glucose-6-phosphate as substrate. Pyruvate carboxylase (PC) activity (EC 6.4.1.1.) was monitored by following the oxidation of NADH at 340 nm by malic dehydrogenase coupled reaction (adapted from (Warren and Tipton, 1974)). Pyruvate dehydrogenase (PDH) activity (EC 1.2.4.1) was measured by using a PDH Enzyme Activity Microplate Assay Kit in which the enzyme is immunocaptured and activity measured by following the reduction of NAD⁺ to NADH, coupled to the reduction of a reporter dye monitored by following absorbance at 450 nm.

2.9. Statistical analysis

The Statistical Program for the Social Sciences software for Windows (SPSS, version 18.0; SPSS Inc, Chicago, IL) was used for all statistical analyses. Data are presented as means \pm standard error of the mean (SEM). Statistical differences between treated and non-treated cells were analyzed by Student's t-test and statistical significance was set at $P < 0.05$.

3. Results

The use of mitochondrial respiration, i.e. aerobic metabolism, can be detected conveniently by measuring the oxygen consumption rate (OCR). As shown in Fig. 1A, the basal OCR was increased by leptin in intact MCF-7 cells. Inhibition of glycolysis with 2-DG resulted in a significant drop in OCR, which was similar in leptin and control cells (Fig. 1A and B). However, when mitochondrial ATP synthase was inhibited with oligomycin, the effects were greater in cells exposed to leptin (Fig. 1A and B). Next, to test whether the leptin-induced OCR increase was associated with a higher mitochondrial ATP production, we analyzed ATP levels after the addition of 2-DG and oligomycin. As shown in Fig. 2A, ATP levels in leptin-treated cells were more resistant to glycolysis inhibition by 2-DG compared to control cells. In contrast, inhibition of oxidative phosphorylation by oligomycin showed that ATP levels were more dependent on mitochondria in leptin-treated cells compared to the more glycolytic control cells in which ATP levels were almost insensitive to oligomycin. Considering that the impact of glycolysis inhibition on OCR was similar in leptin and control cells, we decided to analyze the effects of etomoxir (an inhibitor of fatty acid oxidation) to examine the involvement of fatty acids in mitochondrial ATP production. Etomoxir is an irreversible inhibitor of carnitine palmitoyltransferase I (CPT-1) (Lilly et al., 1992) and hence an effective inhibitor of fatty acid oxidation (Zhou et al., 2003; Thupari et al., 2001). We repeated the measurements of ATP levels in response to glycolysis inhibition in cells pretreated with etomoxir, to avoid compensatory activation of β -oxidation. As shown in Fig. 2B, differences in ATP levels in response to 2-DG disappeared between leptin and control cells, which suggests that the increased

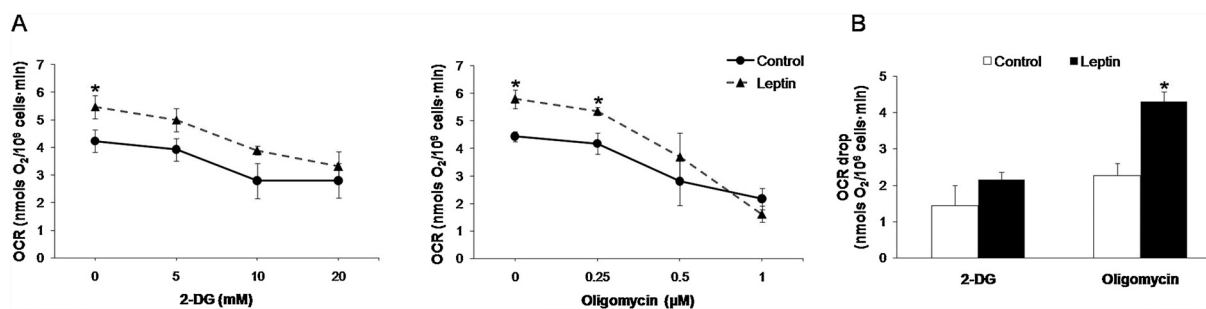


Fig. 1. Effects of leptin on oxygen consumption rate (OCR). (A) Inhibition curve of oxygen consumption rate (OCR) in response to increasing doses of 2-deoxyglucose (2-DG) and oligomycin. Cells exposed 24 h to leptin exhibited higher basal respiration rate than control cells. (B) Bar chart highlighting the differences in OCR drop from basal levels after addition of 2-DG (20 mM) or oligomycin (1 μ M). Data represent means \pm SEM ($n = 3$). * Significant difference between leptin-treated and control cells (Student's *t*-test; $P < 0.05$).

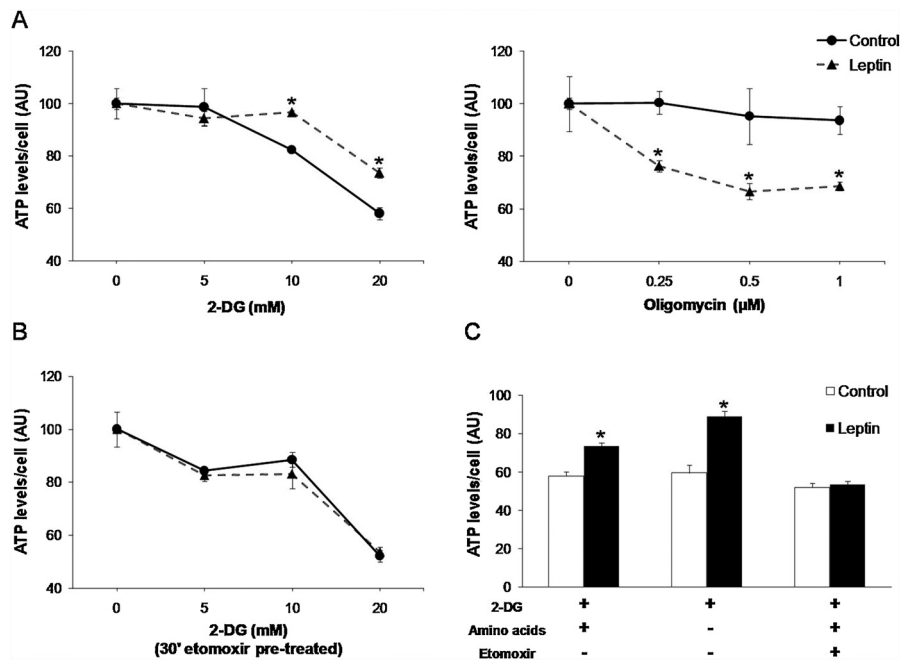


Fig. 2. Effects of leptin on ATP levels. (A) Decline in cellular ATP levels in response to increasing doses of 2-DG or oligomycin. ATP levels were measured in cells lysated after 30 min of incubation with the indicated doses of 2-DG, oligomycin or vehicle. Cells exposed 24 h to leptin showed statistically significant differences in ATP levels curve compared to control cells. (B) ATP levels curve in response to increasing 2-DG in cells pre-treated for 30 min with 50 μM etomoxir. After fatty acid oxidation inhibition with etomoxir, no differences were observed in ATP levels between leptin and control cells. (C) Histograms showing cellular ATP levels in glycolysis inhibited cells (20 mM 2-DG) with or without 50 μM etomoxir and/or aminoacid deprivation. Differences in ATP levels between leptin and control cells were dependent on fatty acid oxidation. Data represent means ± SEM ($n = 3$). * Statistically significant differences between leptin-treated and untreated cells (Student's *t*-test; $P < 0.05$).

mitochondrial respiration of leptin cells was fueled by fatty acids. To explore the use of other metabolic fuels able to feed Krebs cycle, such as amino acids, we measured ATP levels in glycolysis-inhibited cells (2-DG) with etomoxir or aminoacid deprivation (by changing from complete media to Krebs-Ringer buffer supplemented with glucose and FBS). As previously observed, in a complete media leptin decreased the sensibility of ATP levels to glycolysis inhibition with 2-DG (Fig. 2C). This difference in ATP levels was maintained despite amino acid deprivation. Nevertheless, when mitochondrial lipid uptake was inhibited, the ATP levels in leptin-treated cells responded in a similar manner as to control cells, despite that amino acids were available. These results indicate that the use of fatty acids is necessary for the increased mitochondrial respiration induced by leptin.

In order to confirm this increase in lipid catabolism, we measured the levels of key proteins involved in the use of free fatty acids in our leptin-treated MCF-7 cells. As shown in Fig. 3, leptin increased the levels of key proteins involved in cellular fatty acid uptake (FAT/CD36) and mitochondrial entry (CPT1), the two limiting-steps for fatty acid oxidation. From a regulatory point of view, leptin increased the activation of AMPK and the expression of PPAR α , critical regulators of short-term and long-term fatty acid oxidation, respectively. Nevertheless, markers of mitochondrial mass or recruitment such as citrate synthase activity (CS) or oxidative phosphorylation complexes (OXPHOS) protein levels were not affected by leptin (Fig. 4A and B).

To further examine the changes that leptin may be exerting in glucose metabolism, we measured the rate of lactate release, the end-product of glucose fermentation. Fig. 5A shows a noticeable release of lactate in MCF-7 control cells, which was sensitive to inhibition of glycolysis by 2-DG, as expected. When mitochondrial respiration was inhibited by oligomycin, this release was stimulated to compensate the lack of energy production. However, the release of lactate in cells exposed for 24 h to leptin was not detectable in either basal or 2-DG conditions, and only was

significant after respiration inhibition with oligomycin. One possibility is that this lower release of lactate in leptin cells is due to decreased use of glucose. To test this hypothesis, we measured glucose uptake and protein levels of the glucose transporter 2 (GLUT2). As shown in Fig. 5B–D, no differences were observed between leptin and control cells for either glucose uptake (both in basal or oligomycin-stimulated conditions) or GLUT2 levels. In fact, protein levels of the glycolytic enzyme glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were quite similar in leptin and control cells (Fig. 5C and D) which when taken together with the above results suggests that glycolytic capacity is not affected by leptin. Nevertheless, accordingly due to the scarce lactate production in leptin treatment, the levels of lactate dehydrogenase (LDH) were down-regulated, which suggests that the main effect of leptin over glycolysis is to divert pyruvate from lactate formation.

Pyruvate is the key link between glycolysis and Krebs cycle. It can be converted to acetyl-CoA by pyruvate dehydrogenase complex (PDH) to yield energy. Leptin was found to decrease both activity and protein levels of PDH in MCF-7 cells (Fig. 6A–C). Thus, leptin appears to reduce both the conversion of pyruvate to acetyl-CoA as well as to lactate. Nevertheless, pyruvate can also be converted into oxalacetate by pyruvate carboxylase (PC). This enzyme plays a key anaplerotic role for the Krebs cycle when intermediates are removed for different biosynthetic purposes, and thus, channels the carbons of glucose to biosynthesis. As shown in Fig. 6C, leptin increased the activity of PC, suggesting a greater use of the pyruvate derived from glucose to replenish the Krebs cycle in order to sustain biosynthesis. Thus, the ratio between PC and PDH enzymatic activities is higher in leptin-treated cells (Fig. 6D). Furthermore, glucose can provide other important metabolites for biosynthesis such as ribose-phosphate and NADPH through the pentose-phosphate pathway and we also found that leptin increased the activity of the glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), the key enzyme that channels glucose into the pentose-phosphate pathway (Fig. 6C).

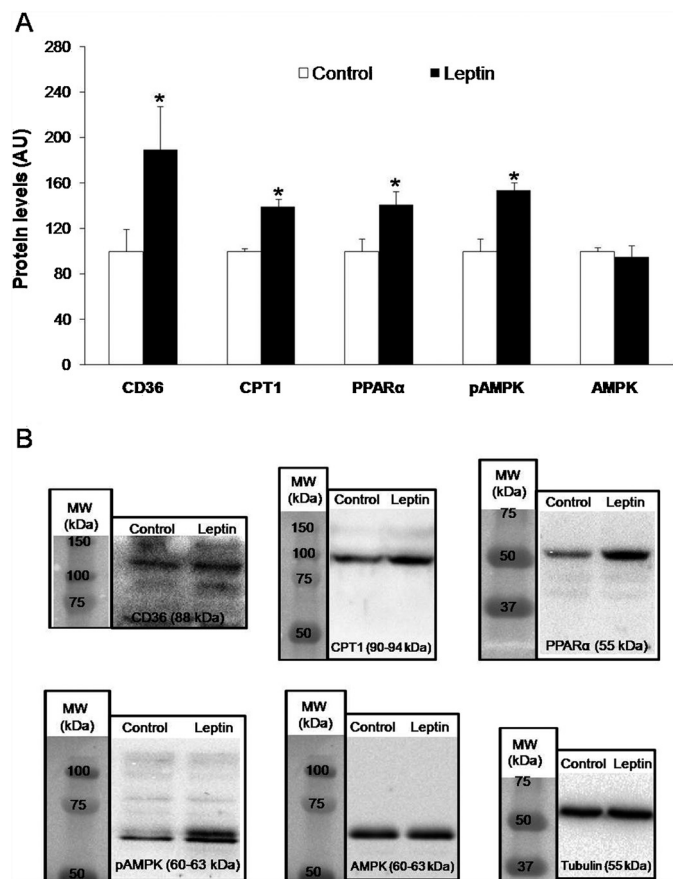


Fig. 3. Effects of leptin on protein levels of lipid metabolism. (A) and (B) Histograms and immunoblots showing levels of key proteins involved in lipid catabolism. Data represent means \pm SEM ($n=6$). * Significant difference between leptin-treated and untreated cells (Student's *t*-test; $P<0.05$). AMPK: 5' AMP-activated protein kinase; AU: arbitrary units; CD36: the protein cluster of differentiation 36 or fatty acid translocase; CPT1: carnitine palmitoyltransferase I; pAMPK: phosphorylated 5' AMP-activated protein kinase; PPAR α : peroxisome proliferator-activated receptor alpha.

4. Discussion

One of the hallmarks of cancer cells is their particular metabolism. More than a century ago, Otto Warburg observed that tumor cells rely on glycolysis oxidizing glucose to lactate, which is contrary to normal differentiated cells which rely primarily on mitochondrial oxidative phosphorylation to generate the energy needed for cellular processes (2). As most invasive tumors display the Warburg effect, this has proven of great clinical importance in detecting malignancies with 18-fluorine 2-deoxyglucose

positron emission tomography (FDG-PET) scans (Jones and Price, 2012). While it can be conceived that fast-growing cancer cells will require more energy than normal cells, paradoxically cancer cells use a primitive inefficient reaction, aerobic glycolysis, to generate considerable amounts of their energy. Possible reasons for this bioenergetic alteration are the requirement to produce other metabolic end products to support their rapid growth and proliferation under low oxygen tension, a possible adaptation to evade death in toxic environments or due to the effects of cytotoxic agents (revised in Vander Heiden et al., 2009).

In our *in vitro* study with MCF-7 cells, mitochondrial respiration as source for ATP production was increased by leptin. Hyperleptinemia associated with obesity has been linked to poorer prognosis in breast cancer (Majed et al., 2008; Dutta et al., 2012). Indeed, leptin promotes breast cancer proliferation, metastasis and invasiveness (Saxena and Sharma, 2013; Surmacz, 2007). Since an elevated proliferation of tumor cells involves a high energy and biosynthetic precursors demand, it is not surprising that, the same factors that promote cell growth in a given cell type, coordinate cellular metabolism to support the increased cell division (Straus, 2013). Similarly to this study, Tanaka et al. (2005) found that transgenic mice overexpressing leptin had increased oxygen consumption. Leptin also increased oxygen consumption in the liver of rats (Huang et al., 2004) and in the white fat tissue of transgenic mice (Marti et al., 1998). This enhanced mitochondrial respiration and ATP production has been shown to be linked to invasiveness of cancer cells (LeBleu et al., 2014), and thus invading cancer cells upregulate oxidative phosphorylation in order to generate the ATP required for relocating to distal tissues. Indeed, leptin has been shown to promote the migration of several cancer cell lines (Saxena et al., 2007; Sharma et al., 2006), thus an enhanced mitochondrial functionality by this adipokine could aid cell motility.

Our results showed that ATP levels were more reliant on mitochondrial respiration and less on glycolysis when cells were exposed to leptin. This increased mitochondrial ATP production with leptin was not due to a higher glucose oxidation via acetyl-CoA conversion, since inhibition of glycolysis with 2-DG had similar effects on OCR in leptin and control cells and pyruvate dehydrogenase activity (PDH) was even slightly repressed by leptin. Indeed, our experiments showed that only etomoxir annulled the differences observed in ATP levels after glycolysis inhibition between leptin and control cells, suggesting that fatty acids are the alternative fuel fostered by leptin. In support of these measurements, the expression of key proteins involved in fatty acid metabolism such as FAT/CD36 and CPT1 were found to be increased by leptin. It is noteworthy that CPT1 represents the rate-limiting step in mitochondrial β -oxidation of fatty acids and that FAT/CD36 is the transporter of fatty acids within the cell. The expression of these key proteins is orchestrated by the transcription factor PPAR α , whose levels were actually increased by leptin in this study. In turn,

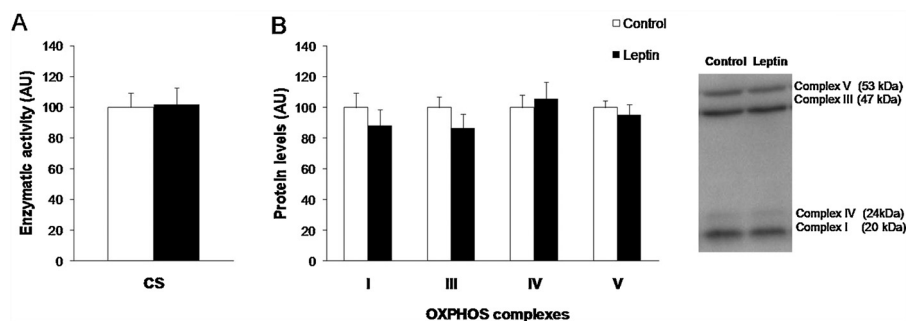


Fig. 4. Effects of leptin on mitochondrial oxidative capacity. (A) Histogram showing citrate synthase (CS) activity in control and leptin-treated cells. (B) Histograms and immunoblot showing the protein levels of OXPHOS complexes. Data represent means \pm SEM ($n=6$). AU: arbitrary units; OXPHOS: oxidative phosphorylation.

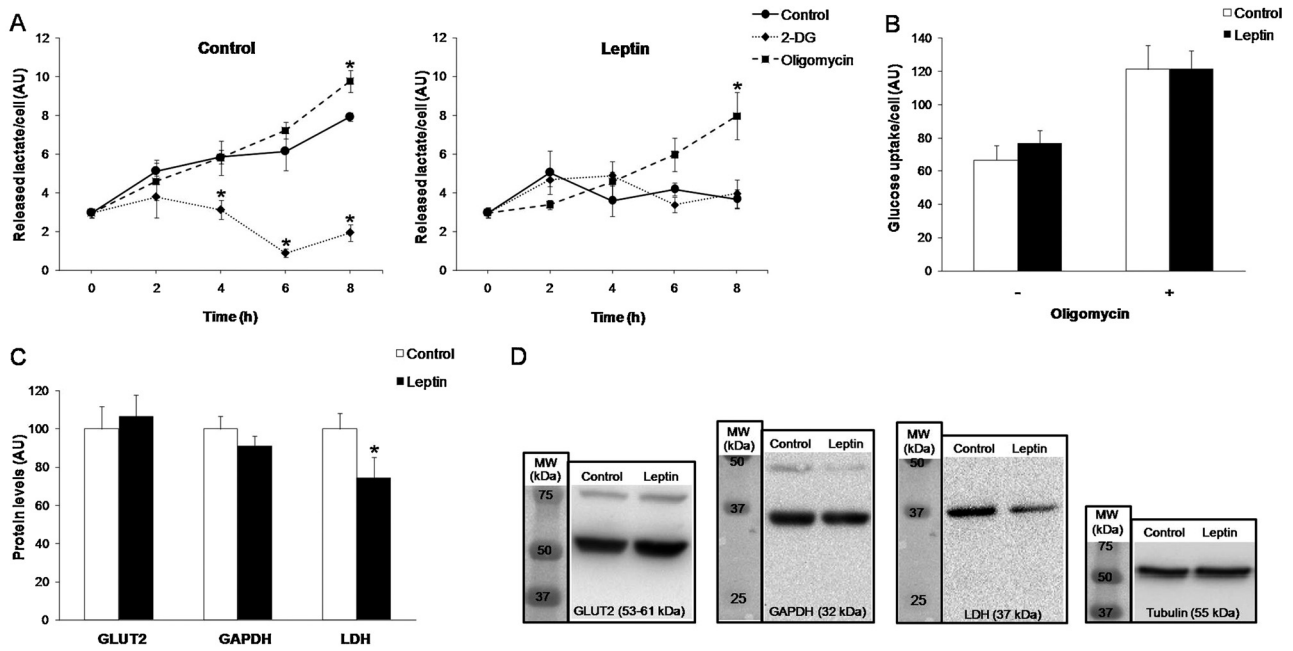


Fig. 5. Effects of leptin on glucose metabolism. (A) Lactate release kinetics in response to 2-DG (20 mM), oligomycin (1 μ M) or vehicle (0.05% DMSO) in control and 24 h leptin-treated cells. Data represent means \pm SEM ($n=3$). * Statistically significant differences between 2-DG or oligomycin and vehicle-treated cells (Student's t -test; $P<0.05$). (B) Bar chart showing glucose uptake for 24 h in control and leptin-treated cells (with or without 0.5 μ M oligomycin). (C) and (D) Histograms and immunoblots showing the levels of proteins involved in glucose metabolism: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), glucose transporter 2 (GLUT2) and lactate dehydrogenase (LDH). Data represent means \pm SEM ($n=6$). * Statistically significant differences between leptin-treated and control cells (Student's t -test; $P<0.05$). AU: arbitrary units.

PPAR α is known to be controlled by AMPK (Lee et al., 2006), whose phosphorylation was consistently induced by leptin. In agreement, previous studies in muscle have demonstrated that leptin activates AMPK signaling pathway, stimulating fatty acid oxidation (Minokoshi et al., 2002; Suzuki et al., 2007). Therefore, it seems that the leptin-AMPK signaling pathway is conserved and activated in breast cancer cells and it may be underlying key to the adaptations of energy metabolism for cell growth.

Several studies have previously demonstrated increased lipolysis in cancer, suggesting the use of fatty acids as fuels (Das et al., 2011; Nieman et al., 2011). The enhanced use of fatty acids involves functional mitochondria as the β -oxidation pathway is highly dependent on functional oxidative phosphorylation. To test whether leptin increases mitochondrial recruitment, markers of mitochondrial activity such as citrate synthase (CS) and oxidative phosphorylation complexes (OXPHOS) were determined. We failed to find differences in CS or OXPHOS between control and leptin-treated cells, which suggests that leptin enhances fatty acid

oxidation mainly through metabolic flux reprogramming rather than by improving mitochondrial oxidative capacity.

Although this study shows that leptin promotes the use of fatty acids as an energy source, it is well established that glucose is needed for cancer cells. Thus, one question that arises from our analysis is what is occurring with glucose metabolism. First, we analyzed the fermentation rate of glucose, i.e. anaerobic glycolysis, by measuring the lactate production rate. As expected, the glycolytic control cells showed a noticeable release of lactate. However, lactate release in leptin-treated cells was only detectable when mitochondrial respiration was inhibited with oligomycin. As shown by glucose uptake assay and GLUT2 levels, this low lactate production was not due to decreased uptake of glucose with leptin. Thus, the entry of glucose to the glycolytic pathway appears not to be depressed by leptin, although the fate of glucose may be changed. In fact, the levels of the glycolytic enzyme glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were quite similar to control cells even though the lactate dehydrogenase (LDH) levels, enzyme

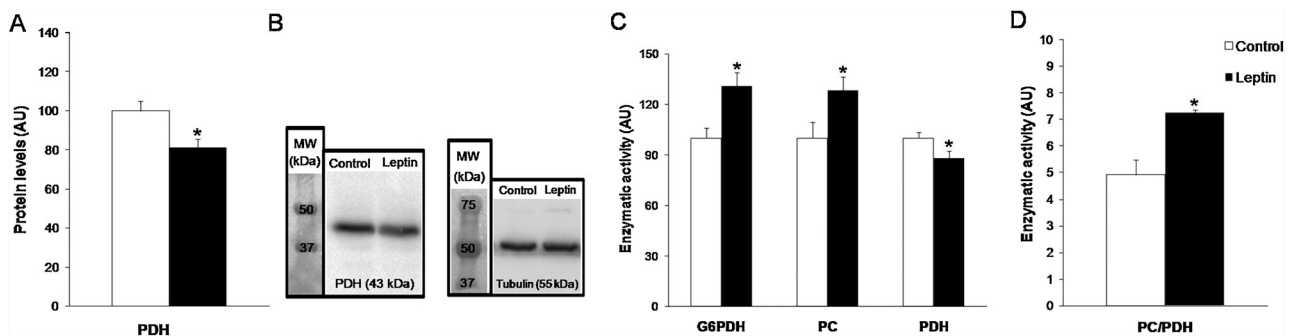


Fig. 6. Effects of leptin on pyruvate dehydrogenase and anabolic enzymes. (A) and (B) Histogram and immunoblot showing the effect of leptin on pyruvate dehydrogenase (PDH) protein levels. (C) Enzymatic activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) and pyruvate carboxylase (PC) were increased with 24 h leptin treatment while PDH activity was decreased. (D) PC/PDH enzymatic activities ratio is higher in leptin-treated cells. Data represent means \pm SEM ($n=6$). * Statistically significant difference between leptin-treated and control cells (Student's t -test; $P<0.05$). AU: arbitrary units.

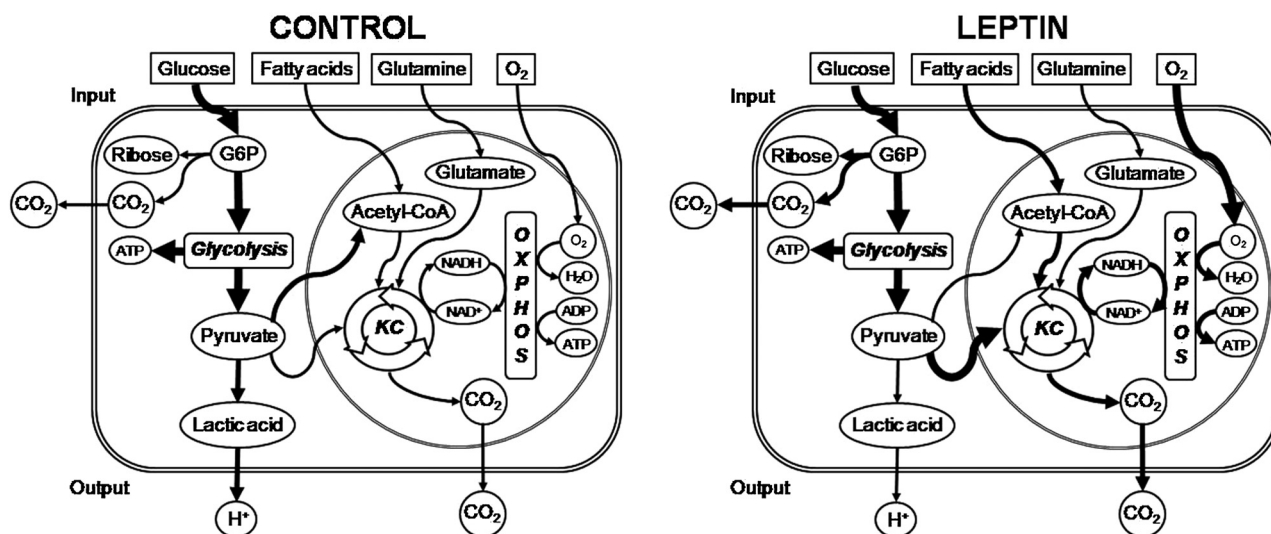


Fig. 7. Summary figure. Leptin rescues mitochondrial respiration as ATP source, mainly increasing the use of fatty acids as fuel. This metabolic shift enables the use of glucose for biosynthesis.

that diverts pyruvate towards lactate, were decreased. Accordingly, in a study with muscle of transgenic mice overexpressing leptin, the LDH/CS ratio was significantly lower than in non transgenic mice, thus indicating that leptin reduces the ratio of glycolytic to oxidative capacity (Masuda et al., 2014).

Glucose can be converted to pyruvate, which is at the crossroads of the central metabolic pathways. The fate of pyruvate in intermediary metabolism can be simplified in the conversions addressed to obtain energy or anabolic precursors. Under aerobic conditions, pyruvate undergoes oxidative decarboxylation by PDH, ultimately yielding acetyl-CoA, which feeds directly into the Krebs cycle to generate energy. Nevertheless, in our leptin exposed cells, PDH protein and activity were slightly decreased; suggesting that pyruvate derived from glucose is not being used for this purpose. In recent years, a “biosynthesis model” has been proposed for cancer cells. This model is based on the fact that intermediates for protein, fatty acids and nucleic acid biosynthesis must be supplied at sufficiently high rates for rapid tumor cell proliferation (Vander Heiden et al., 2009). The main pathways serving as suppliers of biosynthetic intermediates are glycolysis, the pentose phosphate pathway as well as the Krebs cycle. The mitochondrial respiration chain drives the Krebs cycle, and thus functional mitochondria in tumor cells are necessary for their contribution to anabolic flux (Vander Heiden et al., 2009). Moreover, the constant efflux of intermediates for biosynthesis extracted from the Krebs cycle must be replenished by anaplerotic reactions. In this manner, the most important anaplerotic reaction is pyruvate carboxylase (PC) which converts pyruvate into oxalacetate. This enzyme is actually increased in several cancer cell lines (Bramwell and Humm, 1992) and in our study leptin was found to increase its activity, which gives meaning to the metabolic shift driven by leptin in these cells. As aforementioned, other important source of anabolic precursors is the pentose phosphate pathway, which yields NADPH and ribose phosphates from glucose for lipid and nucleic acid biosynthesis. Leptin was also shown to increase the rate-limiting enzyme of this pathway (G6PDH), which reinforces the idea that this adipokine promotes the use of glucose in a biosynthetic mode. It is worthy to note that anabolic enzymes, such as PC or G6PDH, are pivotal for cancer cell growth and are therefore good candidates for therapeutical intervention (Hu et al., 2014; Galluzzi et al., 2013).

Here we report that leptin shifts the catabolism of glucose towards biosynthetic pathways in order to supply the intermediate precursors necessary for cell proliferation, whereas lipids are

being used as fuel (Fig. 7). This idea contrasts with the work of Park and colleagues, which is based on a model of mice that lacked the peripheral leptin receptor, and it reports that leptin suppresses mitochondrial respiration and supports the Warburg effect (Park et al., 2010). It must be considered, however, that in vivo tumors different cell populations may exist in metabolic cooperation in tumors, so that the glycolytic cells would provide lactate for those who generate ATP by oxidative phosphorylation (Sonveaux et al., 2008). This innovative idea, termed as the Reverse Warburg effect, has been clearly reported in human breast cancer by Lisanti et al. (Pavlidis et al., 2009). Accordingly to this model, aerobic glycolysis takes place in tumor-associated fibroblasts and results in the production of high-energy metabolites such as lactate and pyruvate, which are transferred to adjacent epithelial cancer cells undergoing oxidative mitochondrial metabolism. This would allow increased ATP production in cancer cells, driving tumor growth and metastasis (Pavlidis et al., 2009; Bonuccelli et al., 2010; Whitaker-Menezes et al., 2011b). Nevertheless, it is worth noting that the stromal cells in a breast tumor microenvironment are mainly adipocytes, and this can have two important implications: (i) they can supply cancer cells with fatty acids for mitochondrial respiration and (ii) they can secrete leptin, which may be orchestrating this metabolic interplay between stromal and epithelial cancer cells. In agreement with this hypothesis, here we report that leptin promotes the use of fatty acids as energy source enabling the use of glucose for biosynthesis. As mentioned above, the metabolic shifting towards increased mitochondrial respiration may contribute to the progression and malignancy of tumor cells (LeBleu et al., 2014), and leptin could be a promoter of these features thus linking obesity with a poorer cancer prognosis. Further work in this direction is needed for a whole comprehension of the role of leptin in the metabolism of breast tumor. Moreover, a better understanding of cancer metabolism will provide new clues about strategic targets for therapeutic intervention.

5. Conclusions

In the MCF-7 breast cancer cell line, leptin rescues mitochondrial respiration as ATP source, mainly increasing the use of fatty acids as fuel. This metabolic shift enables the use of glucose for biosynthesis, as evidenced by the increased activities of pyruvate carboxylase or glucose-6 phosphate dehydrogenase. The metabolic reprogramming orchestrated by leptin may confer benefits for cell

growth and contribute, together with other factors, to the worse prognosis of breast cancer associated to obesity.

Acknowledgements

This work was supported by grants from *Fondo de Investigaciones Sanitarias of Instituto de Salud Carlos III* (P112/01827 and P114/01434) of the Spanish Government cofinanced by *FEDER-Unión Europea* (“Una manera de hacer Europa”) and funds from *Comunitat Autònoma de les Illes Balears* and *FEDER* (AAEE 22/2014 and 31/2011). M.M. Blanquer-Rosselló was funded by FPU grant of *Ministerio de Educación, Cultura y Deporte* of Spanish Government.

References

- Ahima, R.S., Flier, J.S., 2000. Leptin. *Annu. Rev. Physiol.* 62, 413–437, PubMed PMID:10845097.
- Anubhuti, Sarika Arora, 2008. Leptin and its metabolic interactions: an update. *Diabetes Obes. Metab.* 10 (11), 973–993, PubMed PMID:18284436.
- Bonuccelli, G., Tsigos, A., Whitaker-Menezes, D., Pavlides, S., Pestell, R.G., Chiavarina, B., et al., 2010. Ketones and lactate “fuel” tumor growth and metastasis: evidence that epithelial cancer cells use oxidative mitochondrial metabolism. *Cell Cycle* 9 (Sep (17)), 3506–3514, PubMed PMID: 20818174, Pubmed Central PMCID:3047616.
- Bramwell, M.E., Humm, S.M., 1992. Variations in the relative amounts of biotin-containing enzymes present in both tumorigenic and non-tumorigenic hybrid cells and other cell lines. *Biochim. Biophys. Acta* 1139 (Jun (1–2)), 115–121, PubMed PMID:1610911.
- Calle, E.E., Thun, M.J., 2004. Obesity and cancer. *Oncogene* 23 (Aug (38)), 6365–6378, PubMed PMID:15322511.
- Ceddia, R.B., 2005. Direct metabolic regulation in skeletal muscle and fat tissue by leptin: implications for glucose and fatty acids homeostasis. *Int. J. Obes.* 29 (10), 1175–1183, PubMed PMID:16030519.
- Cleary, M.P., Maihle, N.J., 1997. The role of body mass index in the relative risk of developing premenopausal versus postmenopausal breast cancer. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 216 (Oct (1)), 28–43, PubMed PMID: 9316608.
- Das, S.K., Eder, S., Schauer, S., Diwoky, C., Temmel, H., Guertl, B., et al., 2011. Adipose triglyceride lipase contributes to cancer-associated cachexia. *Science* 333 (Jul (6039)), 233–238, PubMed PMID:21680814.
- Dutta, D., Ghosh, S., Pandit, K., Mukhopadhyay, P., Chowdhury, S., 2012. Leptin and cancer: Pathogenesis and modulation. *Indian J. Endocrinol. Metab.* 16 (Dec (Suppl. 3)), S596–S600, PubMed PMID: 23565495, Pubmed Central PMCID:3602989.
- Fruhbeck, G., 2006. Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem. J.* 393 (Pt 1), 7–20, PubMed PMID: 16336196, Pubmed Central PMCID: 1383660.
- Galluzzi, L., Kepp, O., Vander Heiden, M.G., Kroemer, G., 2013. Metabolic targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Drug Discovery* 12 (11), 829–846, PubMed PMID:24113830.
- Hu, H., Ding, X., Yang, Y., Zhang, H., Li, H., Tong, S., et al., 2014. Changes in glucose-6-phosphate dehydrogenase expression results in altered behavior of HBV-associated liver cancer cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 307 (Sep (6)), G611–G622, PubMed PMID:24994855.
- Huang, W., Dedouis, N., Bhatt, B.A., O’Doherty, R.M., 2004. Impaired activation of phosphatidylinositol 3-kinase by leptin is a novel mechanism of hepatic leptin resistance in diet-induced obesity. *J. Biol. Chem.* 279 (May (21)), 21695–21700, PubMed PMID:14993225.
- Janovska, A., Hatzinikolas, G., Staikopoulos, V., McInerney, J., Mano, M., Wittert, G.A., 2008. AMPK and ACC phosphorylation: effect of leptin, muscle fibre type and obesity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 284 (Mar (1–2)), 1–10, PubMed PMID:18255222.
- Jones, T., Price, P., 2012. Development and experimental medicine applications of PET in oncology: a historical perspective. *Lancet Oncol.* 13 (3), e116–e125, PubMed PMID: 22381934.
- Koppenol, W.H., Bounds, P.L., Dang, C.V., 2011. Otto Warburg’s contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat. Rev. Cancer* 11 (5), 325–337, PubMed PMID: 21508971.
- LeBleu, V.S., O’Connell, J.T., Gonzalez Herrera, K.N., Wikman, H., Pantel, K., Haigis, M.C., et al., 2014. PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. *Nat. Cell Biol.* 16 (10), 992–1003, PubMed PMID: 25241037, 1–15.
- Lee, W.J., Kim, M., Park, H.S., Kim, H.S., Jeon, M.J., Oh, K.S., et al., 2006. AMPK activation increases fatty acid oxidation in skeletal muscle by activating PPAR α and PGC-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340 (Feb (1)), 291–295, PubMed PMID:16364253.
- Lee, C.P., Eubel, H., O’Toole, N., Millar, A.H., 2008. Heterogeneity of the mitochondrial proteome for photosynthetic and non-photosynthetic Arabidopsis metabolism. *Mol. Cell. Proteomics: MCP* 7 (7), 1297–1316, PubMed PMID:18385124.
- Lilly, K., Chung, C., Kerner, J., VanRenterghem, R., Bieber, L.L., 1992. Effect of etomoxiryl-CoA on different carnitine acyltransferases. *Biochem. Pharmacol.* 43 (Jan (2)), 353–361, PubMed PMID:1739421.
- Majed, B., Moreau, T., Senouci, K., Salmon, R.J., Fourquet, A., Asselain, B., 2008. Is obesity an independent prognosis factor in woman breast cancer? *Breast Cancer Res. Treat.* 111 (Sep (2)), 329–342, PubMed PMID: 17939036.
- Marti, A., Novo, F.J., Martinez-Anso, E., Zaratiegui, M., Aguado, M., Martinez, J.A., 1998. Leptin gene transfer into muscle increases lipolysis and oxygen consumption in white fat tissue in ob/ob mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246 (May (3)), 859–862, PubMed PMID:9618302.
- Masuda, S., Tanaka, T., Masuzaki, H., Nakao, K., Taguchi, S., 2014. Overexpression of leptin reduces the ratio of glycolytic to oxidative enzymatic activities without changing muscle fiber types in mouse skeletal muscle. *Biol. Pharm. Bull.* 37 (1), 169–173, PubMed PMID:24389492.
- Mercer, J.G., Hoggard, N., Williams, L.M., Lawrence, C.B., Hannah, L.T., Trayhurn, P., 1996. Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Lett.* 387 (Jun (2–3)), 113–116, PubMed PMID: 8674530.
- Minokoshi, Y., Kim, Y.B., Peroni, O.D., Fryer, L.G., Muller, C., Carling, D., et al., 2002. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 415 (Jan (6869)), 339–343, PubMed PMID:11797013.
- Moreno-Sanchez, R., Rodriguez-Enriquez, S., Marin-Hernandez, A., Saavedra, E., 2007. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J.* 274 (Mar (6)), 1393–1418, PubMed PMID:17302740.
- Muoio, D.M., Lynis Dohm, G., 2002. Peripheral metabolic actions of leptin. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 16 (Dec (4)), 653–666, PubMed PMID: 12468413.
- Nagamine, M.K., da Silva, T.C., Matsuzaki, P., Pinello, K.C., Cogliati, B., Pizzo, C.R., et al., 2009. Cytotoxic effects of butanolic extract from *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) on cultured human breast cancer cell line MCF-7. *Exp. Toxicol. Pathol.* 61 (1), 75–82, PubMed PMID:18485683; official journal of the Gesellschaft für Toxikologische Pathologie.
- Nieman, K.M., Kenny, H.A., Penicka, C.V., Ladanyi, A., Buell-Gutbrod, R., Zillhardt, M.R., et al., 2011. Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat. Med.* 17 (11), 1498–1503, PubMed PMID: 22037646, Pubmed Central PMCID:4157349.
- Park, J., Kusminski, C.M., Chua, S.C., Scherer, P.E., 2010. Leptin receptor signaling supports cancer cell metabolism through suppression of mitochondrial respiration in vivo. *Am. J. Pathol.* 177 (Dec (6)), 3133–3144, PubMed PMID: 21056997, Pubmed Central PMCID:2993284.
- Pavlides, S., Whitaker-Menezes, D., Castello-Cros, R., Flomenberg, N., Witkiewicz, A.K., Frank, P.G., et al., 2009. The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle* 8 (Dec (23)), 3984–4001, PubMed PMID: 19923890.
- Porter, G.A., Inglis, K.M., Wood, L.A., Vevegers, P.J., 2006. Effect of obesity on presentation of breast cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 13 (3), 327–332, PubMed PMID: 16485153.
- Rodriguez-Enriquez, S., Juarez, O., Rodriguez-Zavala, J.S., Moreno-Sanchez, R., 2001. Multisite control of the Crabtree effect in ascites hepatoma cells. *Eur. J. Biochem./FEBS* 268 (Apr (8)), 2512–2519, PubMed PMID: 11298771.
- Saxena, N.K., Sharma, D., 2013. Multifaceted leptin network: the molecular connection between obesity and breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 18 (Dec (3–4)), 309–320, PubMed PMID: 24214584.
- Saxena, N.K., Sharma, D., Ding, X., Lin, S., Marra, F., Merlin, D., et al., 2007. Concomitant activation of the JAK/STAT, PI3K/AKT, and ERK signaling is involved in leptin-mediated promotion of invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res.* 67 (Mar (6)), 2497–2507, PubMed PMID: 17363567, Pubmed Central PMCID:2925446.
- Schubring, C., Prohaska, F., Prohaska, A., Englaro, P., Blum, W., Siebler, T., et al., 1999. Leptin concentrations in maternal serum and amniotic fluid during the second trimester: differential relation to fetal gender and maternal morphometry. *Eur. J. Obstet. Gynaecol. Reprod. Biol.* 86 (Oct (2)), 151–157, PubMed PMID:10509783.
- Schwartz, M.W., Baskin, D.G., Bukowski, T.R., Kuijper, J.L., Foster, D., Lasser, G., et al., 1996. Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice. *Diabetes* 45 (4), 531–535, PubMed PMID: 8603777.
- Sharma, D., Saxena, N.K., Vertino, P.M., Anania, F.A., 2006. Leptin promotes the proliferative response and invasiveness in human endometrial cancer cells by activating multiple signal-transduction pathways. *Endocr. Relat. Cancer* 13 (Jun (2)), 629–640, PubMed PMID: 16728588, Pubmed Central PMCID:2925427.
- Somasundar, P., McFadden, D.W., Hileman, S.M., Vona-Davis, L., 2004. Leptin is a growth factor in cancer. *J. Surg. Res.* 116 (2), 337–349, PubMed PMID: 15013374.
- Sonveaux, P., Vegran, F., Schroeder, T., Wergin, M.C., Verrax, J., Rabbani, Z.N., et al., 2008. Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J. Clin. Invest.* 118 (12), 3930–3942, PubMed PMID: 19033663, Pubmed Central PMCID:2582933.
- Steinberg, G.R., Rush, J.W., Dyck, D.J., 2003. AMPK expression and phosphorylation are increased in rodent muscle after chronic leptin treatment. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 284 (3), E648–E654, PubMed PMID:12441311.
- Straus, D.S., 2013. TNF α and IL-17 cooperatively stimulate glucose metabolism and growth factor production in human colorectal cancer cells. *Mol. Cancer* 12, 78, PubMed PMID: 23866118, Pubmed Central PMCID:3725176.
- Surmacz, E., 2007. Obesity hormone leptin: a new target in breast cancer? *Breast Cancer Res.: BCR* 9 (1), 301, PubMed PMID: 17274833, Pubmed Central PMCID:1851379.

- Suzuki, A., Okamoto, S., Lee, S., Saito, K., Shiuchi, T., Minokoshi, Y., 2007. Leptin stimulates fatty acid oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene expression in mouse C2C12 myoblasts by changing the subcellular localization of the alpha2 form of AMP-activated protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 27 (Jun (12)), 4317–4327, PubMed PMID: 17420279. Pubmed Central PMCID:1900064.
- Tanaka, T., Hidaka, S., Masuzaki, H., Yasue, S., Minokoshi, Y., Ebihara, K., et al., 2005. Skeletal muscle AMP-activated protein kinase phosphorylation parallels metabolic phenotype in leptin transgenic mice under dietary modification. *Diabetes* 54 (8), 2365–2374, PubMed PMID:16046303.
- Thupari, J.N., Pinn, M.L., Kuhajda, F.P., 2001. Fatty acid synthase inhibition in human breast cancer cells leads to malonyl-CoA-induced inhibition of fatty acid oxidation and cytotoxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285 (Jul (2)), 217–223, PubMed PMID:11444828.
- Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., Thompson, C.B., 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324 (5930), 1029–1033, PubMed PMID: 19460998. Pubmed Central PMCID:2849637.
- Ward, P.S., Thompson, C.B., 2012. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer Cell.* 21 (3), 297–308, PubMed PMID: 22439925. Pubmed Central PMCID:3311998.
- Warren, G.B., Tipton, K.F., 1974. Pig liver pyruvate carboxylase. The reaction pathway for the carboxylation of pyruvate. *Biochem. J.* 139 (May (2)), 311–320, PubMed PMID: 4447612. Pubmed Central PMCID:1166286.
- Whitaker-Menezes, D., Martinez-Outschoorn, U.E., Flomenberg, N., Birbe, R.C., Witkiewicz, A.K., Howell, A., et al., 2011a. Hyperactivation of oxidative mitochondrial metabolism in epithelial cancer cells in situ: visualizing the therapeutic effects of metformin in tumor tissue. *Cell Cycle* 10 (Dec (23)), 4047–4064, PubMed PMID: 22134189. Pubmed Central PMCID: 3272287.
- Whitaker-Menezes, D., Martinez-Outschoorn, U.E., Lin, Z., Ertel, A., Flomenberg, N., Witkiewicz, A.K., et al., 2011b. Evidence for a stromal-epithelial “lactate shuttle” in human tumors: MCT4 is a marker of oxidative stress in cancer-associated fibroblasts. *Cell Cycle* 10 (Jun (11)), 1772–1783, PubMed PMID: 21558814. Pubmed Central PMCID:3142461.
- Willett, W.C., 1997. Fat, energy and breast cancer. *J. Nutr.* 127 (5 Suppl), 921S–923S, PubMed PMID: 9164264.
- Wolin, K.Y., Carson, K., Colditz, G.A., 2010. Obesity and cancer. *Oncologist* 15 (6), 556–565, PubMed PMID: 20507889. Pubmed Central PMCID:3227989.
- Zhou, W., Simpson, P.J., McFadden, J.M., Townsend, C.A., Medghalchi, S.M., Vadlamudi, A., et al., 2003. Fatty acid synthase inhibition triggers apoptosis during S phase in human cancer cells. *Cancer Res.* 63 (Nov (21)), 7330–7337, PubMed PMID:14612531.

Manuscrit III

Blanquer-Rosselló MM, Oliver J, Valle A, Roca P.

Effect of xanthohumol and 8-prenylnaringenin on MCF-7 breast cancer cells oxidative stress and mitochondrial complexes expression

J Cell Biochem. 2013 Dec; 114(12):2785-94. doi: 10.1002/jcb.24627

Effect of Xanthohumol and 8-Prenylnaringenin on MCF-7 Breast Cancer Cells Oxidative Stress and Mitochondrial Complexes Expression

M. Mar Blanquer-Rosselló,^{1,2} Jordi Oliver,^{1,2} Adamo Valle,^{1,2} and Pilar Roca^{1,2*}

¹Grupo Multidisciplinar de Oncología Translacional, Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut (IUNICS), Palma de Mallorca, Illes Balears, Spain

²Ciber Fisiopatología Obesidad y Nutrición (CB06/03) Instituto Salud Carlos III, Madrid, Spain

ABSTRACT

Xanthohumol (XN) and 8-prenylnaringenin (8PN) are hop (*Humulus lupulus* L.) polyphenols studied for their chemopreventive effects on certain cancer types. The breast cancer line MCF-7 was treated with doses ranging from 0.001 to 20 μ M of XN or 8PN in order to assess the effects on cell viability and oxidative stress. Hoechst 33342 was used to measure cell viability and reactive oxygen species (ROS) production was determined by 2',7'-dichlorofluorescein diacetate. Catalase, superoxide dismutase, and glutathione reductase enzymatic activities were determined and protein expression of sirtuin1, sirtuin3, and oxidative phosphorylation system (OXPHOS) were done by Western blot. Treatments XN 0.01, 8PN 0.01, and 8PN 1 μ M led to a decrease in ROS production along with an increase of OXPHOS and sirtuin expression; in contrast, XN 5 μ M gave rise to an increase of ROS production accompanied by a decrease in OXPHOS and sirtuin expression. These results suggest that XN in low dose (0.01 μ M) and 8PN at all assayed doses (0.001–20 μ M) presumably improve mitochondrial function, whereas a high dose of XN (5 μ M) worsens the functionality of this organelle. *J. Cell. Biochem.* 114: 2785–2794, 2013. © 2013 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: BREAST CANCER; MCF-7; 8-PRENYLNARINGENIN; XANTHOTHUMOL; OXIDATIVE STRESS; OXIDATIVE PHOSPHORYLATION SYSTEM; MITOCHONDRIA; SIRTUINS

Xanthohumol (XN) is the main prenylated flavonoid of the female inflorescence of the hop plant, *Humulus lupulus* L. (Cannabaceae). This plant also contains the estrogenic flavonoid 8-prenylnaringenin (8PN), considered to be the most potent phytoestrogen isolated to date. Hops are used in beer elaboration process to add flavor and bitterness, thereby the main dietetic source of XN and 8PN is through beer consumption [Stevens and Page, 2004].

For over a decade, studies have been performed to evaluate the chemopreventive and chemotherapeutic potential of these and other hop compounds against cancer. In fact, XN is the hops compound which has been given more attention, owing to its ability to inhibit in vitro the states of initiation, promotion, and progression of carcinogenesis, hence XN seems to have a wide spectrum as chemopreventive agent [Stevens and Page, 2004; Gerhauser, 2005; Colgate et al., 2007]. Specifically, XN has been shown to inhibit

growth and to induce apoptosis in breast cancer line MCF-7, among others [Lust et al., 2005; Vanhoecke et al., 2005; Zanolli and Zavatti, 2008]. One of the mechanisms through which XN inhibits cellular proliferation is by causing an oxidizing effect through inducing an increase in reactive oxygen species (ROS) in tumor cells [Yang et al., 2007; Strathmann et al., 2010; Festa et al., 2011].

ROS, mainly generated through the mitochondrial respiratory chain, are necessary for proper cell function by acting as intracellular messengers regulating proliferation and other biological processes [Festa et al., 2011]. Nevertheless, when produced in excess, ROS induce lipid peroxidation, protein carbonylation, and DNA damage leading to the activation of apoptotic pathways and cell death [Festa et al., 2011]. For this reason, enzymatic (glutathione reductase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase) and non-enzymatic detoxification systems are necessary for removing

Grant sponsor: Instituto de Salud Carlos III; Grant number: PI12/01827; Grant sponsor: FEDER-Unión Europea ("Una manera de hacer Europa"); Grant sponsor: Centro de Información Cerveza y Salud (CICS, Madrid, Spain).

*Correspondence to: Prof Pilar Roca, Departamento de Biología Fundamental y Ciencias de la Salud, Universitat de les Illes Balears, Cra de Valldemossa, km 7'5, 07122 Palma de Mallorca, España. E-mail: pilar.roca@uib.es

Manuscript Received: 19 March 2013; Manuscript Accepted: 26 June 2013

Accepted manuscript online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com): 8 July 2013

DOI 10.1002/jcb.24627 • © 2013 Wiley Periodicals, Inc.

ROS excess and to maintain a low level of oxidative stress. A common feature of cancer cells is that they have elevated levels of ROS and therefore they have a higher level of oxidative stress without an activation of the apoptotic pathways. Among the explanations given for the high level of ROS in cancer cells are either the existence of defects in the oxidative phosphorylation system (OXPHOS) or by a malfunction of antioxidant systems. Because of their cancer promoting effect, high levels of ROS are considered to be adverse factors; however, the oxidative damage caused by these radicals can be seen as an opportunity to exploit their cytotoxic potential by using exogenous agents that increase intracellular ROS levels and induce cell death [Trachootham et al., 2006]. Thus, compounds with oxidant activity may act selectively on those cells with an increased level of oxidative stress by inducing apoptosis.

Sirtuins are a class of proteins which have recently been given importance in the oxidative stress response. These proteins are NAD⁺ dependent class III histone deacetylases and of which seven types have been described [Hallows et al., 2008; Park et al., 2011]. Through their deacetylase action, sirtuins are able to modify histones causing chromatin remodeling so that they can regulate gene expression [Shahbazian and Grunstein, 2007]. Sirtuins are involved in several physiological processes such as stress response, metabolism regulation, gene silencing, aging and carcinogenesis [Haigis and Guarente, 2006; Finkel et al., 2009]. Two sirtuin isoforms, sirtuin1 (Sirt1) and sirtuin3 (Sirt3), have been shown to play a central role in the regulation of mitochondrial maintenance and metabolism [Lombard et al., 2007]. In fact, studies have shown that Sirt3 acts as a tumor suppressor due to its ability to reduce mitochondrial ROS production [Kong et al., 2010; Bell et al., 2011; Yu et al., 2012]; however, the mechanism that explains how Sirt3 regulates ROS production and carcinogenesis has not been fully elucidated. Moreover, Sirt1 controls mitochondrial biogenesis induction and progression through PGC-1 α regulation [Menzies and Hood, 2012]. Interestingly, phytoestrogens have been shown to modulate sirtuin levels and activity; for instance, genistein at 25 μ M is capable of reducing the expression of Sirt1 [Kikuno et al., 2008] while resveratrol activates both Sirt1 transcription and function [Tseng et al., 2011; Shakibaei et al., 2012] promoting mitochondrial biogenesis [Rasbach and Schnellmann, 2008]. These data suggest that phytoestrogens may exert effects on ROS production by modulating sirtuin levels and activity.

Taking this background information into account, the objective of this paper was to investigate the effect of XN and 8PN on the viability and oxidative stress levels of breast cancer cells. In tackling this aim, ROS production, antioxidant enzyme activities as well as Sirt1, Sirt3, and OXPHOS protein levels were determined in MCF-7 cells treated with different doses of these phytoestrogens.

MATERIALS AND METHODS

CHEMICALS

XN and 8PN were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Routine chemicals were supplied by Roche (Barcelona, Spain), Sigma-Aldrich, Panreac (Barcelona, Spain), and Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA).

CELL CULTURES AND TREATMENTS

Human breast cancer cell line MCF-7 was purchased from American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA) and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% antibiotic (penicillin and streptomycin) in a 5% CO₂ humidified atmosphere at 37°C. To evaluate the effects of XN and 8PN, cells were shifted 24 h prior to treatment to a phenol red-free DMEM containing 10% charcoal-stripped FBS and 1% antibiotic (penicillin and streptomycin). XN and 8PN treatments were performed when cell cultures reached confluence by providing fresh medium supplemented with XN or 8PN for 48 h. Control cells were treated with 0.1% DMSO as a vehicle. For cell proliferation and ROS production assay, cells were plated in 96-well plates, whereas for Western blot and enzyme assays, cells were cultured in 100 mm culture dishes.

CELL VIABILITY ASSAY

Cells were plated at 8,000 cells per well in 96-well plates and shifted to phenol red-free medium 24 h prior to treatment as described previously. Cells were treated with XN or 8PN at different concentrations (0.001, 0.01, 0.1, 1, 5, 10, 15, and 20 μ M) for 48 h. After treatment, cell culture medium was removed and DNA was stained with Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) at a concentration of 0.01 mg/ml. Plates were incubated for 5 min at 37°C and the fluorescence was measured using a microplate fluorescence reader FLx800 (BIO-TEK Winooski, Vermont, USA) set at 360 nm excitation and 460 nm emission wavelengths.

ROS PRODUCTION ASSAY

Cells were plated at 8,000 cells per well in 96-well plates and shifted to phenol red-free medium 24 h prior to treatment as described previously. Cells were treated with XN or 8PN at the same concentrations used in cell viability assay for 48 h. After treatment, cell culture medium was removed and cells were treated with PBS supplemented with glucose 20 mM and 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) (Sigma-Aldrich) 10 μ M. Plates were incubated for 15 min at 37°C and the assay was performed at the same temperature in a 96-well microplate fluorescence reader FLx800 (BIO-TEK Winooski) set at excitation and emission wavelengths of 485 and 528 nm, respectively. To normalize ROS production to cell number, cell culture medium was removed, and cells were stained with Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) as described below.

MEASUREMENT OF ANTIOXIDANT ACTIVITY

Cells were harvested by scraping them out with PBS buffer and then were centrifuged at 5,000 rpm for 5 min at 4°C to remove cell debris. The resultant cell pellet was resuspended in RNase-free water and the lysates were kept on ice and the protein content was determined by a bicinchoninic acid protein assay kit (Pierce, Bonn, Germany). Catalase (CAT; EC 1.11.1.6) activity was measured according to an adaptation of the Johansson method [Johansson and Borg, 1988] based on the peroxidative function of the enzyme; superoxide dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) activity was determined by following the reduction of cytochrome c by measuring the absorbance at 550 nm on a PowerWave XS Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments, Inc.) at 37°C, as described previously [Quick et al., 2000].

Finally, glutathione reductase (GRd; 1.8.1.7) activity was measured monitoring the oxidation of NADPH at 340 nm, according to an adaptation of the Carlberg method [Carlberg and Mannervik, 1985].

WESTERN BLOT ANALYSIS

Cells were harvested by scraping them out with lysis buffer [Miro et al., 2011] and disrupted by sonication. Afterwards, protein content was determined with a bicinchoninic acid protein assay kit (Pierce). For Western blot analysis, 40 μg of protein from cell lysates were separated on a SDS-PAGE gel (15% for OXPHOS and 12% for the other proteins) and electrotransferred onto nitrocellulose membranes. After the transfer, membranes were incubated in a blocking solution of 5% non-fat powdered milk in Tris-buffered saline-Tween (TBS with 0.05% Tween-20). Antisera against Sirt1 (H-300; Sc-15404) and α -tubulin (B-7; Sc-5286), the latter used as a housekeeping protein, were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA); while Sirt3 (#07-1596) was from Millipore (Billerica, MA, USA) and total OXPHOS (#MS601) was from Millipore (Billerica, MA, USA). Finally, protein bands were visualized by Immun-Star[®] Western C[®] Chemiluminescent Kit (Bio-Rad) Western blotting detection systems. The chemiluminescence signal was captured with a Chemidoc XRS densitometer (Bio-Rad Laboratories) and results were analyzed with Quantity One Software (Bio-Rad).

MEASUREMENT OF CARBONYL CONTENT

The presence of carbonyl groups, a measure of protein oxidation, was determined by an immunological method using the OxySelect[™] Protein Carbonyl Immunoblot kit (Cell Biolabs, San Diego, CA). For this purpose, 20 μg of protein from cell lysate were separated on a

12% SDS-PAGE gel and electrotransferred onto nitrocellulose membranes. Protein carbonyls were detected by incubating the membrane with 2, 4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) for 5 min. Unspecific binding sites on the membranes were blocked in 5% non-fat milk in Tris-buffered saline-Tween (TBS with 0.05% Tween-20). After incubation with the DNP-antibody, bands were visualized using the Immun-Star[®] Western C[®] Chemiluminescent Kit (Bio-Rad) Western blotting detection systems. The chemiluminescence signal was captured with a Chemidoc XRS densitometer (Bio-Rad Laboratories) and results were analyzed with Quantity One software (Bio-Rad Laboratories).

STATISTICAL ANALYSIS

All data are expressed as means \pm SEM (standard error of the mean) with $n = 6$. Statistical analysis was carried out using the Statistical Program for the Social Sciences software (SPSS 18.0 for Windows, Inc., Chicago, IL, USA). Statistical differences between treated and control cells were analyzed with the unpaired Student's *t*-test for proliferation and ROS production assays. One-way ANOVA analysis was used for data of Western blot and enzyme assays.

RESULTS

EFFECTS OF XN AND 8PN ON CELL VIABILITY

To evaluate the effect of XN and 8PN on MCF-7 breast cancer cell line viability, cells were treated with different concentrations of these compounds and cell number was assessed using Hoechst 33342 staining (Fig. 1). Treatments with XN in a concentration range of 0.001–20 μM for 48 h had a biphasic effect on cell proliferation in a

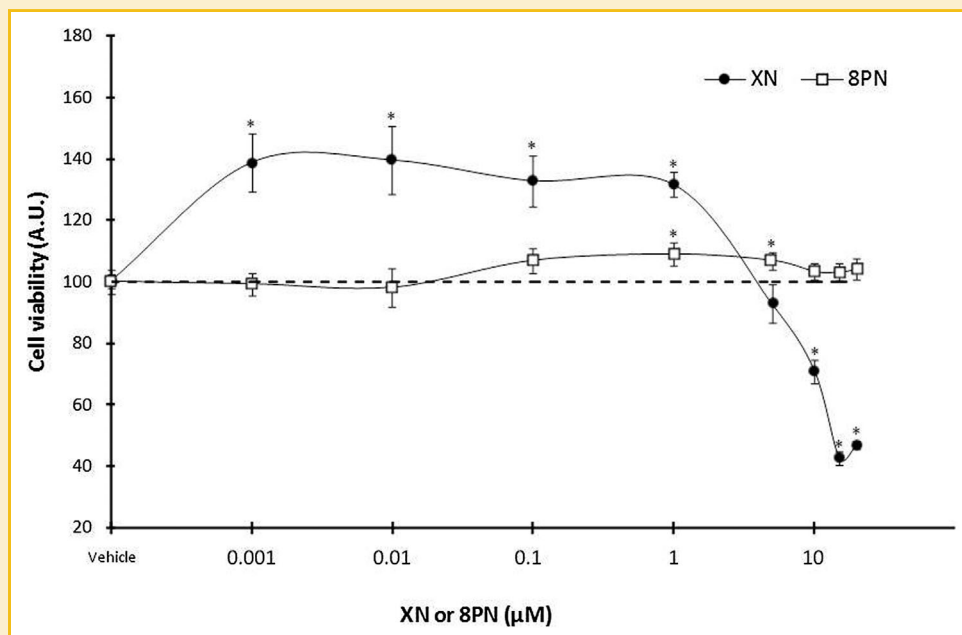


Fig. 1. Influence of XN and 8PN on MCF-7 cell line viability. Cells were plated in 96-well plates and treated with XN or 8PN (0.001, 0.01, 0.1, 1, 5, 10, 15, and 20 μM) for 48 h. Cell viability was assessed by DNA staining with Hoechst 33342 and represented as percentage with respect to vehicle-treated cells (0.1% DMSO, showed as dashed line at 100%). A.U.: arbitrary units. XN and 8PN: xanthohumol and 8-prenylnaringenin. Data are means \pm SEM. *Statistically significant difference between treated and vehicle-treated cells (Student's *t*-test; $P < 0.05$, $n = 6$).

dose-dependent manner; low concentrations of XN (0.001–1 μM) significantly increased cell proliferation (+39.62% at XN 0.01 μM with respect to vehicle-treated cells) whereas high concentrations (10–20 μM) caused a statistically significant decrease on cell proliferation (–57.32% at XN 15 μM compared to vehicle-treated cells). Otherwise, 8PN resulted in a slightly but statistically significant increase of cell number at 1 and 5 μM .

EFFECTS OF XN AND 8PN ON ROS PRODUCTION

To evaluate the antioxidant properties of XN and 8PN on MCF-7 cell line, ROS production was analyzed by the DCFDA assay (Fig. 2). Cells treated with low XN doses resulted in a statistically significant reduction of ROS production at 0.001 μM (–32.16% with respect to vehicle-treated cells) and 0.01 μM (–27.65% compared to vehicle-treated cells); otherwise, high XN doses ranging from 1 to 15 μM resulted in a marked increase of ROS production with a maximum peak at 5 μM (three times higher than vehicle-treated cells). Samples treated with 8PN showed a significant decrease of ROS production at all tested concentrations except at the lowest one (0.001 μM), reaching at 15 μM dose a 26.07% decrease with respect to vehicle-treated cells.

EFFECTS OF XN AND 8PN ON ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITY, PROTEIN OXIDATION LEVELS AND SIRT1, SIRT3, AND OXPHOS EXPRESSION LEVELS

To examine the effect that phytoestrogens XN and 8PN exert on antioxidant enzymes and different mitochondrial proteins, cells were treated with two different concentrations of each compound depending on the results obtained in cell viability and ROS production assays. A XN concentration was chosen at which this compound decreased ROS levels (0.01 μM) as well as a concentration at which there was a maximum ROS production (5 μM). Nevertheless, 8PN reduced ROS production at all tested doses so a low concentration

(0.01 μM) and a high one (1 μM) were chosen to detect possible differing effects to dosage.

ANTIOXIDANT ENZYMES ACTIVITY

Figure 3 shows the activities of the antioxidant enzymes CAT, SOD, and GR. There was a statistically significant decrease on CAT activity with respect to vehicle-treated cells with XN 0.01 μM (–44.72%) and 5 μM (–31.83%) as well as with 8PN 0.01 μM (–41.24%) and 1 μM (–32.24%) (Fig. 3A). In the case of SOD activity (Fig. 3B), a statistically significant decrease on the activity with respect to vehicle-treated cells could also be observed with XN 0.01 μM as well as with 8PN 0.01 and 1 μM (in all there was a 50% decrease); treatment with XN 5 μM resulted in a non-statistically significant decrease of SOD activity with respect to vehicle-treated cells. Finally, GR activity (Fig. 3C) showed a statistically significant decrease with respect to vehicle-treated cells with XN 0.01 μM (–38.17%), 8PN 0.01 μM (–45.28%), and 1 μM (–44.70%); treatment with XN 5 μM resulted in an increase of GRd activity with respect to treatment XN 0.01 μM (+39.72%).

PROTEIN OXIDATIVE DAMAGE LEVELS

The presence of carbonyl groups, a marker of protein oxidation, was determined in order to evaluate the damage protein levels on treated cells (Fig. 4). Cells treated with XN 0.01 μM and 8PN showed a non-statistically significant downward trend in their carbonyl content with respect to vehicle-treated cells. In contrast, cells treated with XN 5 μM showed an upward trend in carbonyl content, with levels reaching statistically significant differences compared to XN 0.01 μM XN treated cells.

SIRT1 AND SIRT3 EXPRESSION LEVELS

Figure 5 shows the effects of XN and 8PN on Sirt1 (Fig. 5A) and Sirt3 (Fig. 5B) expression levels. Treatment with XN 0.01 μM induced a

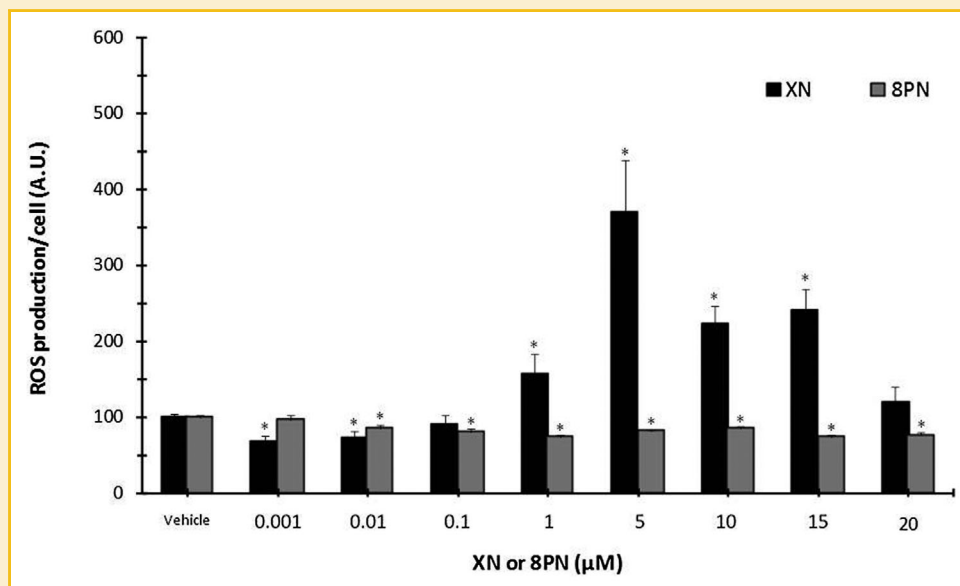


Fig. 2. Effect of XN and 8PN on MCF-7 cell line ROS production. Cells were plated in 96-well plates and treated with XN or 8PN (0.001, 0.01, 0.1, 1, 5, 10, 15, and 20 μM) for 48 h. ROS production was determined by DCFDA and represented as percentage with respect to vehicle-treated cells (0.1% DMSO, showed as 100%). A.U.: arbitrary units; XN and 8PN: xanthohumol and 8-prenylnaringenin. Data are means \pm SEM. *Statistically significant difference between treated and vehicle-treated cells (Student's *t*-test; $P < 0.05$, $n = 6$).

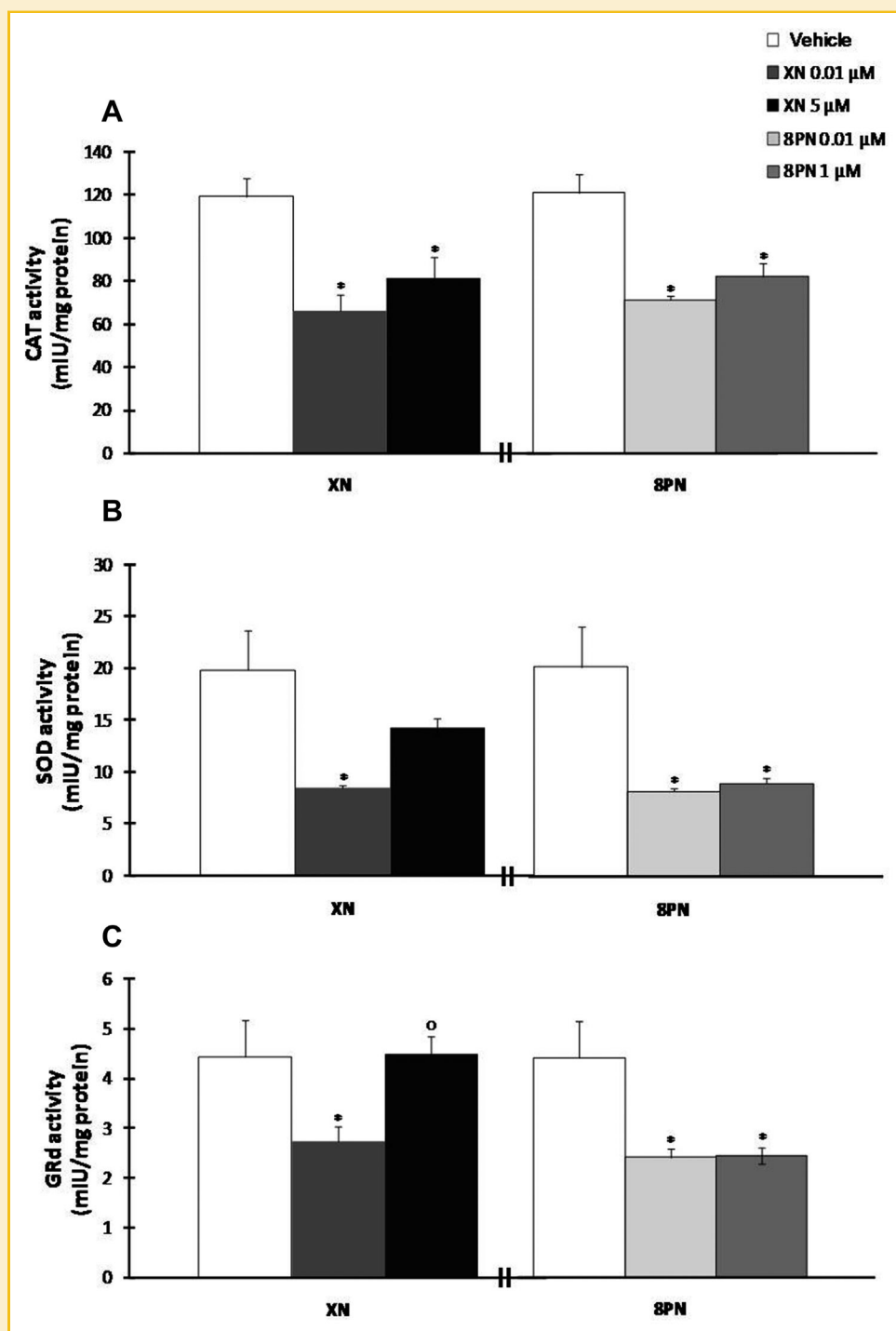


Fig. 3. Influence of XN and 8PN on MCF-7 cell line antioxidant enzymes activity CAT (A), SOD (B), and GRd (C). Cells were treated with XN (0.01 and 5 μ M) or 8PN (0.01 and 1 μ M) for 48 h. Spectrophotometric methods were used and data are presented as mIU/mg protein. Vehicle-treated cells were treated with 0.1% DMSO. CAT, SOD, and GRd: catalase, superoxide dismutase, and glutathione reductase; IU: international units; XN and 8PN: xanthohumol and 8-prenylnaringenin. Data are means \pm SEM. *Statistically significant difference between treated and vehicle-treated cells (One-way ANOVA test; $P < 0.05$, $n = 6$). ° Statistically significant difference respect previous treatment (One-way ANOVA test; $P < 0.05$, $n = 6$).

sixfold significant increase in sirt1 expression; moreover, Sirt3 also experimented an increase in expression with this treatment but it was not statistically significant. Treatments with 8PN resulted in an increase of Sirt1 and Sirt3 expression with respect to vehicle-treated

cells in a dose-dependent manner, although this increase was only significant in the case of Sirt1 with 8PN 1 μ M (sixfold over vehicle-treated cells). In contrast, treatment with XN 5 μ M resulted in a statistically significant decrease of Sirt1 with respect to treatment XN

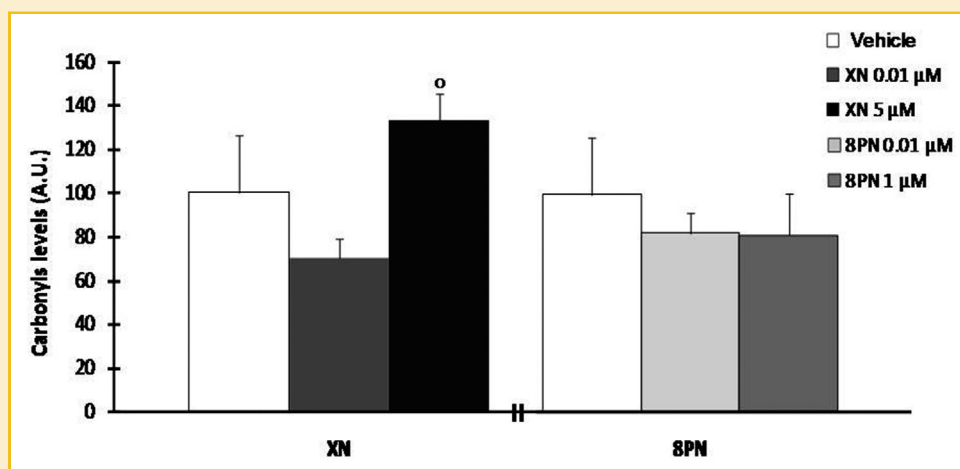


Fig. 4. Effect of XN 0.01 μM , XN 5 μM , 8PN 0.01 μM , and 8PN 1 μM on carbonylated protein levels after 48 h of treatment. Levels were determined by Western blot and represented as percentage of carbonyls with respect to vehicle-treated cells (0.1% DMSO, showed as 100%). A.U.: arbitrary units; XN and 8PN: xanthohumol and 8-prenylnaringenin. Data are means \pm SEM. *Statistically significant difference between treated and vehicle-treated cells (One-way ANOVA test; $P < 0.05$, $n = 6$). ° Statistically significant difference respect previous treatment (One-way ANOVA test; $P < 0.05$, $n = 6$).

0.01 μM , equalizing vehicle-treated cells levels; XN 5 μM also decreased Sirt3 expression with respect to vehicle-treated cells but it was not statistically significant.

OXPHOS EXPRESSION LEVELS

OXPHOS expression levels (Fig. 6A and B) were determined as a measure of mitochondrial functionality after treatment with XN and 8PN at selected treatments. Treatment with XN 0.01 μM caused an expression increase of all mitochondrial complexes with respect to vehicle-treated cells, with this increase only significant in case of complex II (+43.37%) and V (+75.77%). Treatment with 8PN 0.01 and 1 μM also led to an upward trend in the expression of all mitochondrial complexes with respect to vehicle-treated cells but only complex II (+41.48% with 8PN 1 μM), III (+71.66% with 8PN 0.01 μM and +77.85% with 8PN 1 μM), and V (+71.23 with 8PN 1 μM) increments were statistically significant. Otherwise, treatment with XN 5 μM produced a downward trend on all mitochondrial complexes with respect to vehicle-treated cells except on complex III and V, where a slight increase was observed; and although these results were not statistically significant with respect to vehicle-treated cells they were with respect to treatment XN 0.01 μM on complexes I, II, and IV.

DISCUSSION

The aim of the present study was to determine the effects that phytoestrogens XN and 8PN, which are present in beer, exert on mitochondrial oxidative metabolism of the MCF-7 breast cancer cell line. In this study, we have observed that i) these compounds have effects on oxidative stress by means of changes in mitochondrial OXPHOS and sirtuins and ii) these effects are opposite in a dose-dependent manner (see summary Table I).

Low concentrations of XN (0.001–0.01 μM) and almost all tested doses of 8PN (0.001–20 μM) exerted an antioxidant function when

causing significant decrease of ROS levels (–32% with XN 0.001 μM and –26% with 8PN 15 μM) along with an increase in cell viability (+40% with XN 0.01 μM and +9% with 8PN 1 μM). This increase of cell viability caused by 8PN has already been observed in previous studies although these authors reported that this compound also exerts cytotoxic effects on MCF-7 cell line when used at concentrations of 1 μM or higher [Matsumura et al., 2005; Brunelli et al., 2009]. Otherwise, higher doses of XN (1–15 μM) resulted in a marked increase of ROS production (near threefold vs. vehicle-treated cells) along with a marked decrease of cell viability (–57% with XN 15 μM). These results are consistent with previous works in other cell lines treated with XN [Miranda et al., 1999; Lust et al., 2005; Pan et al., 2005; Vanhoecke et al., 2005; Delmulle et al., 2006; Monteiro et al., 2007; Yang et al., 2007; Ho et al., 2008; Monteiro et al., 2008; Szliszka et al., 2009; Deeb et al., 2010; Dorn et al., 2010; Strathmann et al., 2010; Drenzek et al., 2011; Festa et al., 2011; Zajc et al., 2012]. In fact, despite that many dietary polyphenols have been studied for their antioxidant activity, recent publications have shown that several polyphenols may also act as oxidants [Lee and Lee, 2006; Antosiewicz et al., 2008; Khan et al., 2008; Trachootham et al., 2009; Strathmann et al., 2010].

Protein carbonyl content, which is an end-marker of oxidative damage, showed a downward trend consistent with the mild decrease in ROS production induced by XN 0.01, 8PN 0.01, and 8PN 1 μM . The lack of statistical significance in the decrease of protein oxidation may be in relation to its end-marker nature, since antioxidant activities, protein turnover, and repairing systems may blunt the ROS effects. Moreover, the low antioxidant activity observed in these same treatments could be explained by the fact that they are not activated precisely because ROS levels are low, and therefore, the low oxidative stress observed in these treatments could not be due to detoxifying activity of antioxidant enzymes. These results could indicate that XN and 8PN exert a modulatory effect on ROS production although by a separate path to the regulation of the antioxidant enzyme activity.

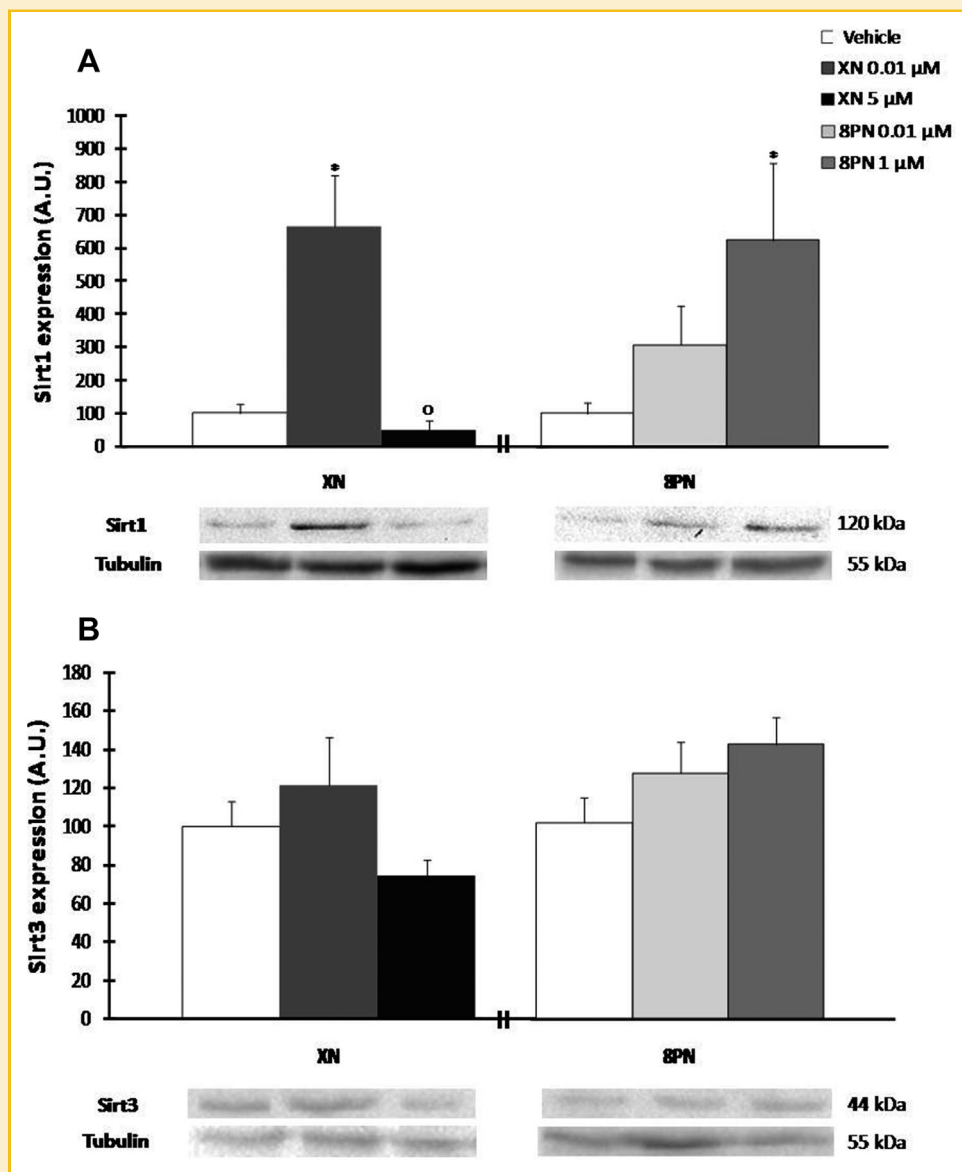


Fig. 5. Influence of XN 0.01 μ M, XN 5 μ M, 8PN 0.01 μ M, and 8PN 1 μ M on Sirt1 (A) and Sirt3 (B) expression levels after 48 h of treatment. Levels were determined by Western blot and represented as percentage of expression with respect to vehicle-treated cells (0.1% DMSO, showed as 100%). Representative bands of Western blot are shown. A.U.: arbitrary units; XN and 8PN: xanthohumol and 8-prenylnaringenin. Data are means \pm SEM. *Statistically significant difference between treated and vehicle-treated cells (One-way ANOVA test; $P < 0.05$, $n = 6$). Statistically significant difference respect previous treatment (One-way ANOVA test; $P < 0.05$, $n = 6$).

Furthermore, these treatments (XN 0.01, 8PN 0.01, and 8PN 1 μ M) caused an increase of OXPHOS expression levels, as well as a marked increase of Sirt1. From these results it appears that the reduction of ROS production observed in these treatments might be due to an improvement in mitochondrial function.

In contrast, samples treated with XN 5 μ M showed an increase of carbonylated protein content in accordance with their higher ROS levels. Besides, this treatment leads to a downward trend in CAT and SOD activities; this could be due to the fact that this treatment causes an increase of ROS production too high to be offset by antioxidant enzymes activity or it even could be that their activity is damaged by ROS. Another possibility to explain this decrease of the antioxidant activities with XN 5 μ M could be that XN exerts a direct inhibitory

effect of antioxidant enzymes activity. Furthermore, the increase in ROS production induced by XN 5 μ M may be due to decreased OXPHOS expression observed with this treatment which would indicate why perhaps mitochondrial functioning would be altered. In fact, in an earlier work with mitochondrial subparticles, it was already noted that high concentrations of XN cause a decrease of the activity of certain OXPHOS complexes accompanied by an increase of ROS levels [Strathmann et al., 2010]. Furthermore, this treatment also caused a significant reduction of Sirt1 and less marked Sirt3 expression.

These results show that XN exerts a dual effect on ROS production and cell viability in a dose-dependent manner and acts by reducing ROS production at low concentrations while promoting ROS

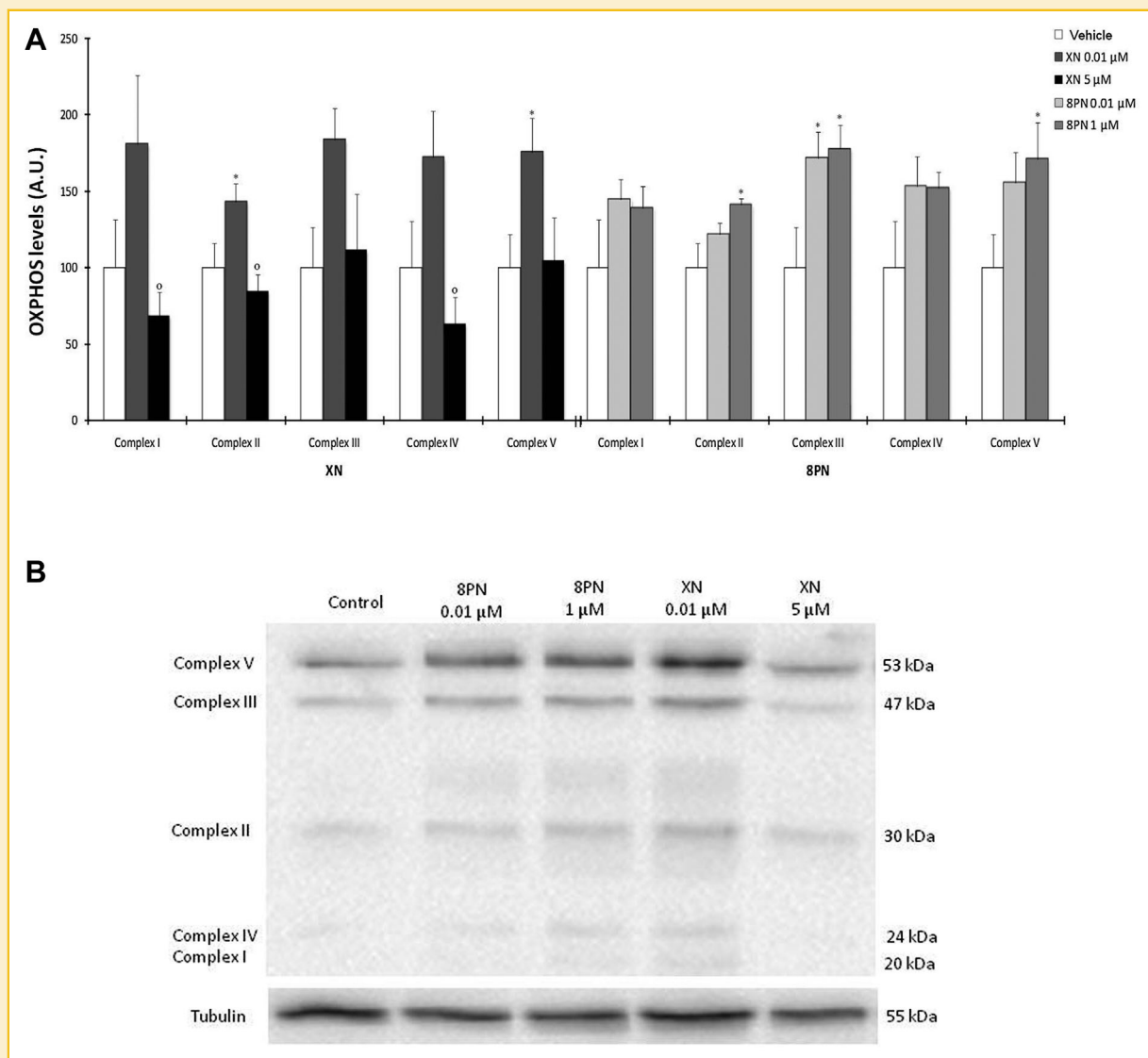


Fig. 6. A: Influence of XN 0.01 μ M, XN 5 μ M, 8PN 0.01 μ M, and 8PN 1 μ M on OXPPOS expression levels after 48 h of treatment. Levels were determined by Western blot and represented as percentage of expression with respect to vehicle-treated cells (0.1% DMSO, showed as 100%). A.U.: arbitrary units; XN and 8PN: xanthohumol and 8-prenylnaringenin. Data are means \pm SEM. *Statistically significant difference between treated and vehicle-treated cells (One-way ANOVA test; $P < 0.05$, $n = 6$). \circ Statistically significant difference respect previous treatment (One-way ANOVA test; $P < 0.05$, $n = 6$). B: Influence of XN 0.01 μ M, XN 5 μ M, 8PN 0.01 μ M and 8PN 1 μ M on OXPPOS expression levels after 48 h of treatment. Levels were determined by Western blot and representative bands are shown.

formation at high concentrations; this dual effect has already been observed previously for other phytoestrogens like genistein and resveratrol [Matsumura et al., 2005; Signorelli and Ghidoni, 2005]. In summary, from results one could postulate that XN at low concentrations and 8PN induce sirtuin expression and these proteins stimulate mitochondrial biogenesis which thereby decreases mitochondrial ROS production; otherwise, the oxidizing doses of XN might inhibit the expression of sirtuin proteins, which would adversely affect mitochondrial function which in consequence lead to an increase in ROS levels. Previous studies have found that phytoestrogens may modulate cell sirtuin levels and activity; for instance, genistein at 50 μ M is capable of reducing Sirt1 expression [Kikuno et al., 2008]. Sirtuins have been found to be involved in the

modulation of mitochondrial function in the cell; as a matter of fact, Sirt1 controls mitochondrial biogenesis induction and progression [Menzies and Hood, 2012] and Sirt3 resides mainly in mitochondria and regulates oxidative stress through the deacetylation of substrates involved in both ROS production and detoxification, so that this protein could maintain mitochondrial redox homeostasis [Finley et al., 2011; Bause and Haigis, 2012; Giralto and Villarroya, 2012]. In the present study, OXPPOS expression levels showed a pattern of changes depending on the compound and dosage used for treatment. From these results, a possible regulation of ROS production by XN and 8PN could be proposed; these phytoestrogens may modulate mitochondrial function, and therefore ROS production, through Sirt1 and Sirt3, and thus sirtuins could mediate the action between

TABLE I. Statistically Significant Changes (Increase ↑ or Decrease ↓) with Respect to Vehicle-Treated Cells (Student's *t*-test and One-Way ANOVA Test; *P* < 0.05, *n* = 6)

	XN, 0.01 μM	XN, 5 μM	8PN, 0.01 μM	8PN, 1 μM
Cell growth	↑			↑
ROS levels	↓	↑	↓	↓
Antioxidant activity				
CAT	↓	↓	↓	↓
SOD	↓		↓	↓
GRd	↓		↓	↓
Carbonyl levels				
Sirt1	↑			↑
Sirt3				
OXPPOS				
Complex I				
Complex II	↑			↑
Complex III			↑	↑
Complex IV				
Complex V	↑			↑

MCF-7 cells were treated with XN or 8PN for 48 h. CAT, SOD, and GRd, catalase, superoxide dismutase, and glutathione reductase; OXPPOS, oxidative phosphorylation system; ROS, reactive oxygen species; Sirt1, sirtuin 1; Sirt3, sirtuin 3; XN and 8PN, xanthohumol and 8-prenylnaringenin.

these compounds and OXPPOS expression levels. These results suggest that XN at high concentrations share functional similarities with “mitocans,” compounds that selectively affect and destabilize mitochondrial function until they kill the cells by a redox imbalance; in fact, several action targets of mitocans have been identified amongst which one is the OXPPOS complex [Strathmann et al., 2010]. Particularly, it has been seen that XN precisely appears to act specifically against cells displaying altered redox balance [Jacob et al., 2011], so this compound may be a potential candidate as pro-oxidative drug in cancer treatment.

Beer is the most important dietary source of XN and 8PN. The USDA estimates that a daily average consumption of beer (225 ml) provides an intake of 0.14 mg of prenylflavonoids (including XN, isoxanthohumol, and 8PN) [Stevens and Page, 2004]. On the other hand, other study found that serum of women receiving a dietary hop supplement (6.12 mg XN and 0.3 mg 8PN) during 5 days reached a 5 and 2 nM concentration of XN and 8PN, respectively. This study also detected these compounds in breast tissue, showing values in the range of pmols per g tissue [Bolca et al., 2010]. The doses observed by Bolca et al. [2010] in mammary gland of supplemented women were in the low range of the doses tested in our study and far from the high dose of XN (5 μM) eliciting oxidative effects. Considering the bioavailability data [Stevens and Page, 2004], it is likely that a dietary hop supplementation may provide low XN and 8PN doses ameliorating ROS production. On the other hand, the ROS promoting effect of high XN concentrations deserves special attention since it could be a promising chemotherapeutic agent in breast cancer therapy. Cancer cells have higher oxidative stress than normal cells but their ROS threshold for apoptotic induction is greater. Thus, high XN doses may prompt cancer cells to a higher oxidative stress able to trigger apoptosis. Future studies are needed to determine whether these oxidant effects of XN are specific and relevant enough in animal models to be considered a promising tool for breast cancer therapy.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Fondo de Investigaciones Sanitarias of Instituto de Salud Carlos III (PI12/01827) of the Spanish Government, cofinanced by FEDER-Unión Europea (“Una manera de hacer Europa”), and from Centro de Información Cerveza y Salud (CICS, Madrid, Spain).

REFERENCES

- Antosiewicz J, Ziolkowski W, Kar S, Powolny AA, Singh SV. 2008. Role of reactive oxygen intermediates in cellular responses to dietary cancer chemopreventive agents. *Planta Med* 74:1570–1579.
- Bause AS, Haigis MC. 2012. SIRT3 regulation of mitochondrial oxidative stress. *Exp Gerontol*.
- Bell EL, Emerling BM, Ricoult SJ, Guarente L. 2011. SirT3 suppresses hypoxia inducible factor 1alpha and tumor growth by inhibiting mitochondrial ROS production. *Oncogene* 30:2986–2996.
- Bolca S, Li J, Nikolic D, Roche N, Blondeel P, Possemiers S, De Keukeleire D, Bracke M, Heyerick A, van Breemen RB, Depypere H. 2010. Disposition of hop prenylflavonoids in human breast tissue. *Mol Nutr Food Res* 54(Suppl2): S284–S294.
- Brunelli E, Pinton G, Chianale F, Graziani A, Appendino G, Moro L. 2009. 8-Prenylnaringenin inhibits epidermal growth factor-induced MCF-7 breast cancer cell proliferation by targeting phosphatidylinositol-3-OH kinase activity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 113:163–170.
- Carlberg I, Mannervik B. 1985. Glutathione reductase. *Methods Enzymol* 113:484–490.
- Colgate EC, Miranda CL, Stevens JF, Bray TM, Ho E. 2007. Xanthohumol, a prenylflavonoid derived from hops induces apoptosis and inhibits NF-kappaB activation in prostate epithelial cells. *Cancer Lett* 246:201–209.
- Deeb D, Gao X, Jiang H, Arbab AS, Dulchavsky SA, Gautam SC. 2010. Growth inhibitory and apoptosis-inducing effects of xanthohumol, a prenylated chalcone present in hops, in human prostate cancer cells. *Anticancer Res* 30:3333–3339.
- Delmule L, Bellahcene A, Dhooge W, Comhaire F, Roelens F, Huvaere K, Heyerick A, Castronovo V, De Keukeleire D. 2006. Anti-proliferative properties of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus* L.) in human prostate cancer cell lines. *Phytomedicine* 13:732–734.
- Dorn C, Weiss TS, Heilmann J, Hellerbrand C. 2010. Xanthohumol, a prenylated chalcone derived from hops, inhibits proliferation, migration and interleukin-8 expression of hepatocellular carcinoma cells. *Int J Oncol* 36:435–441.
- Drenzek JG, Seiler NL, Jaskula-Sztul R, Rausch MM, Rose SL. 2011. Xanthohumol decreases Notch1 expression and cell growth by cell cycle arrest and induction of apoptosis in epithelial ovarian cancer cell lines. *Gynecol Oncol* 122:396–401.
- Festa M, Capasso A, D’Acuneto CW, Masullo M, Rossi AG, Pizzi C, Piacente S. 2011. Xanthohumol induces apoptosis in human malignant glioblastoma cells by increasing reactive oxygen species and activating MAPK pathways. *J Nat Prod* 74:2505–2513.
- Finkel T, Deng CX, Mostoslavsky R. 2009. Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. *Nature* 460:587–591.
- Finley LW, Haas W, Desquiret-Dumas V, Wallace DC, Procaccio V, Gygi SP, Haigis MC. 2011. Succinate dehydrogenase is a direct target of sirtuin 3 deacetylase activity. *PLoS ONE* 6:e23295.
- Gerhauser C. 2005. Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *Eur J Cancer* 41:1941–1954.
- Giralt A, Villarroya F. 2012. SIRT3, a pivotal actor in mitochondrial functions: metabolism, cell death and aging. *Biochem J* 444:1–10.
- Haigis MC, Guarente LP. 2006. Mammalian sirtuins—emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes Dev* 20:2913–2921.

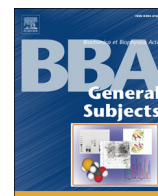
- Hallows WC, Albaugh BN, Denu JM. 2008. Where in the cell is SIRT3?-functional localization of an NAD⁺-dependent protein deacetylase. *Biochem J* 411:e11-e13.
- Ho YC, Liu CH, Chen CN, Duan KJ, Lin MT. 2008. Inhibitory effects of xanthohumol from hops (*Humulus lupulus* L.) on human hepatocellular carcinoma cell lines. *Phytother Res* 22:1465-1468.
- Jacob C, Jamier V, Ba LA. 2011. Redox active secondary metabolites. *Curr Opin Chem Biol* 15:149-155.
- Johansson LH, Borg LA. 1988. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Anal Biochem* 174:331-336.
- Khan N, Afaq F, Mukhtar H. 2008. Cancer chemoprevention through dietary antioxidants: progress and promise. *Antioxid Redox Signal* 10:475-510.
- Kikuno N, Shiina H, Urakami S, Kawamoto K, Hirata H, Tanaka Y, Majid S, Igawa M, Dahiya R. 2008. Genistein mediated histone acetylation and demethylation activates tumor suppressor genes in prostate cancer cells. *Int J Cancer* 123:552-560.
- Kong X, Wang R, Xue Y, Liu X, Zhang H, Chen Y, Fang F, Chang Y. 2010. Sirtuin 3, a new target of PGC-1 α , plays an important role in the suppression of ROS and mitochondrial biogenesis. *PLoS ONE* 5:e11707.
- Lee KW, Lee HJ. 2006. The roles of polyphenols in cancer chemoprevention. *Biofactors* 26:105-121.
- Lombard DB, Alt FW, Cheng HL, Bunkenborg J, Streeper RS, Mostoslavsky R, Kim J, Yancopoulos G, Valenzuela D, Murphy A, Yang Y, Chen Y, Hirschey MD, Bronson RT, Haigis M, Guarente LP, Farese RV, Jr. Weissman S, Verdin E, Schwer B. 2007. Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation. *Mol Cell Biol* 27:8807-8814.
- Lust S, Vanhoecke B, Janssens A, Philippe J, Bracke M, Offner F. 2005. Xanthohumol kills B-chronic lymphocytic leukemia cells by an apoptotic mechanism. *Mol Nutr Food Res* 49:844-850.
- Matsumura A, Ghosh A, Pope GS, Darbre PD. 2005. Comparative study of oestrogenic properties of eight phytoestrogens in MCF7 human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 94:431-443.
- Menzies KJ, Hood DA. 2012. The role of SirT1 in muscle mitochondrial turnover. *Mitochondrion* 12:5-13.
- Miranda CL, Stevens JF, Helmrich A, Henderson MC, Rodriguez RJ, Yang YH, Deinzer ML, Barnes DW, Buhler DR. 1999. Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus*) in human cancer cell lines. *Food Chem Toxicol* 37:271-285.
- Miro AM, Sastre-Serra J, Pons DG, Valle A, Roca P, Oliver J. 2011. 17 β -Estradiol regulates oxidative stress in prostate cancer cell lines according to ER α /ER β ratio. *J Steroid Biochem Mol Biol* 123:133-139.
- Monteiro R, Faria A, Azevedo I, Calhau C. 2007. Modulation of breast cancer cell survival by aromatase inhibiting hop (*Humulus lupulus* L.) flavonoids. *J Steroid Biochem Mol Biol* 105:124-130.
- Monteiro R, Calhau C, Silva AO, Pinheiro-Silva S, Guerreiro S, Gartner F, Azevedo I, Soares R. 2008. Xanthohumol inhibits inflammatory factor production and angiogenesis in breast cancer xenografts. *J Cell Biochem* 104:1699-1707.
- Pan L, Becker H, Gerhauser C. 2005. Xanthohumol induces apoptosis in cultured 40-16 human colon cancer cells by activation of the death receptor- and mitochondrial pathway. *Mol Nutr Food Res* 49:837-843.
- Park SH, Ozden O, Jiang H, Cha YI, Pennington JD, Aykin-Burns N, Spitz DR, Gius D, Kim HS. 2011. Sirt3, mitochondrial ROS, ageing, and carcinogenesis. *Int J Mol Sci* 12:6226-6239.
- Quick KL, Hardt JI, Dugan LL. 2000. Rapid microplate assay for superoxide scavenging efficiency. *J Neurosci Methods* 97:139-144.
- Rasbach KA, Schnellmann RG. 2008. Isoflavones promote mitochondrial biogenesis. *J Pharmacol Exp Ther* 325:536-543.
- Shahbazian MD, Grunstein M. 2007. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu Rev Biochem* 76:75-100.
- Shakibaei M, Shayan P, Busch F, Aldinger C, Buhmann C, Lueders C, Mobasheri A. 2012. Resveratrol mediated modulation of Sirt-1/Runx2 promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells: potential role of Runx2 deacetylation. *PLoS ONE* 7:e35712.
- Signorelli P, Ghidoni R. 2005. Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. *J Nutr Biochem* 16:449-466.
- Stevens JF, Page JE. 2004. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! *Phytochemistry* 65:1317-1330.
- Strathmann J, Klimo K, Sauer SW, Okun JG, Prehn JH, Gerhauser C. 2010. Xanthohumol-induced transient superoxide anion radical formation triggers cancer cells into apoptosis via a mitochondria-mediated mechanism. *FASEB J* 24:2938-2950.
- Szliszka E, Czuba ZP, Mazur B, Sedek L, Paradysz A, Krol W. 2009. Chalcones enhance TRAIL-induced apoptosis in prostate cancer cells. *Int J Mol Sci* 11:1-13.
- Trachootham D, Zhou Y, Zhang H, Demizu Y, Chen Z, Pelicano H, Chiao PJ, Achanta G, Arlinghaus RB, Liu J, Huang P. 2006. Selective killing of oncogenically transformed cells through a ROS-mediated mechanism by beta-phenylethyl isothiocyanate. *Cancer Cell* 10:241-252.
- Trachootham D, Alexandre J, Huang P. 2009. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov* 8:579-591.
- Tseng PC, Hou SM, Chen RJ, Peng HW, Hsieh CF, Kuo ML, Yen ML. 2011. Resveratrol promotes osteogenesis of human mesenchymal stem cells by upregulating RUNX2 gene expression via the SIRT1/FOXO3A axis. *J Bone Miner Res* 26:2552-2563.
- Vanhoecke B, Derycke L, Van Marck V, Depypere H, De Keukeleire D, Bracke M. 2005. Antiinvasive effect of xanthohumol, a prenylated chalcone present in hops (*Humulus lupulus* L.) and beer. *Int J Cancer* 117:889-895.
- Yang JY, Della-Fera MA, Rayalam S, Baile CA. 2007. Effect of xanthohumol and isoxanthohumol on 3T3-L1 cell apoptosis and adipogenesis. *Apoptosis* 12:1953-1963.
- Yu W, Dittenhafer-Reed KE, Denu JM. 2012. SIRT3 protein deacetylates isocitrate dehydrogenase 2 (IDH2) and regulates mitochondrial redox status. *J Biol Chem* 287:14078-14086.
- Zajc I, Filipic M, Lah TT. 2012. Xanthohumol induces different cytotoxicity and apoptotic pathways in malignant and normal astrocytes. *Phytother Res* 26:1709-1713.
- Zanoli P, Zavatti M. 2008. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. *J Ethnopharmacol* 116:383-396.

Manuscrit IV

Blanquer-Rosselló MM, Hernández-López R, Roca P, Oliver J, Valle A.

Resveratrol induces mitochondrial respiration and apoptosis in SW620 colon cancer cells

BBA General Subjects. 2016. doi: 10.1016/j.bbagen.2016.10.009



Resveratrol induces mitochondrial respiration and apoptosis in SW620 colon cancer cells

M^a del Mar Blanquer-Rosselló, Reyniel Hernández-López, Pilar Roca, Jordi Oliver ^{*}, Adamo Valle

Grupo Multidisciplinar de Oncología Traslacional, Instituto Universitario de Investigación en Ciencias de la Salud (IUNICS), Palma de Mallorca, Illes Balears, Spain
Ciber Fisiopatología Obesidad y Nutrición (CB06/03), Instituto Salud Carlos III, Madrid, Spain
Instituto de Investigación Sanitaria de Palma (IdISPa), Hospital Universitario Son Espases, edificio S. E-07120, Palma de Mallorca, Illes Balears, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 July 2016

Received in revised form 10 October 2016

Accepted 12 October 2016

Available online xxxxx

Keywords:

Resveratrol

SW620

Colon cancer

Mitochondria

Metabolism

Apoptosis

ABSTRACT

Background: The polyphenol resveratrol (RSV) is found in the skin of red grapes and has been reported to exhibit anticancer properties. The antitumor effects of RSV in the gastrointestinal tract have gained considerable interest due to the high exposure of this tissue to this dietary compound. One of the hallmarks of cancer cells is their particular metabolism mainly relying on glycolysis for ATP production rather than mitochondrial oxidative phosphorylation. Although RSV has been described to act as a calorie-restriction mimetic, modulating energy metabolism in normal tissues, little efforts have been done to study the effects of this polyphenol in the metabolism of cancer cells. Taking this into account, the aim of this study was to explore metabolic effects of this polyphenol in colon cancer.

Methods: Oxygen consumption, ATP levels, Western blotting and other molecular biology techniques were carried out to characterize the metabolic signature of RSV in SW620 colon cancer cells.

Results: Paradoxically, the cytotoxic effects of RSV were associated with an increase in oxygen consumption supported by mitochondrial biogenesis and increased fatty acid oxidation. This partial reversion of the Warburg effect was followed by hyperpolarization of mitochondrial membrane and ROS production, leading to an increased apoptosis.

Conclusions: Our results propose that the anticancer mechanisms of RSV could reside in targeting cancer cell metabolism, promoting mitochondrial electron transport chain overload and, ultimately, increasing ROS production.

General significance: These results shed new light into the anticancer mechanism of RSV supporting the ability of this compound in potentiating the effects of chemotherapy.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Resveratrol (RSV) is a polyphenol found in peanuts, Japanese knotweed plant, some berries and in large quantities in the skin of red

grapes, which makes red wine the main source of RSV [1]. Within the last 10 years, a great deal of evidence has been found indicating the cancer prevention and treatment properties of RSV in a plethora of cellular and animal models [2,3]. RSV is a promising multi-target anticancer agent since it has been shown to act on diverse mechanisms, simultaneously inhibiting initiation, promotion and progression of cancerous states [4]. Furthermore, RSV has been demonstrated to have multiple therapeutic effects against cardiovascular diseases such as atherosclerosis, hypertension and heart failure, as well as diabetes, obesity and neurodegenerative ailments associated with aging [5].

Despite its promising anticancer and anti-aging effects, dietary RSV is rapidly metabolized in the intestinal cells, thus limiting its bioavailability to certain tissues. After oral administration in humans, intact RSV is detectable in plasma in nanomolar range while its resulting metabolites are in the micromolar, on account of the metabolic processes occurring in the intestinal cells [6]. Despite these metabolic changes, RSV is efficiently absorbed in the gastrointestinal tract and exerts local effects before its metabolism, thus explaining the beneficial effects of RSV in this system; for example, colorectal and esophageal antitumor effects [7,8]. Clinical evidence in favor of RSV as an effective supplement

Abbreviations: $\Delta\psi_m$, mitochondrial membrane potential; 2-DG, 2-deoxyglucose; 5-FU, 5-fluorouracil; ANT A, antimycin A; COX, cytochrome c oxidase; ER α , estrogen receptor alpha; ER β , estrogen receptor beta; ERR α , estrogen-related receptor alpha; ETO, etomoxir; FCCP, carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone; LDH, lactate dehydrogenase; MDC, monodansylcadaverine; mtDNA, mitochondrial DNA; MTG, MitoTracker Green®; MTT, thiazolyl blue tetrazolium bromide; NAC, N-acetyl cysteine; NAO, 10-nonyl acridine orange bromide; NRF1, nuclear respiratory factor 1; NRF2, nuclear respiratory factor 2; OCR, oxygen consumption rate; OLI, oligomycin; OXPHOS, oxidative phosphorylation; PARP, poly(ADP-ribose) polymerase; PDH, pyruvate dehydrogenase; PGC-1 α , peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α ; ROS, reactive oxygen species; RSV, resveratrol; SIRT1, sirtuin 1; SIRT3, sirtuin 3; TFAM, mitochondrial transcription factor; TMRM, tetramethylrhodamine methyl ester; UCP2, uncoupling protein 2.

^{*} Corresponding author at: Departamento de Biología Fundamental y Ciencias de la Salud, Universitat de les Illes Balears, Cra de Valldemossa, km 7.5, 07122 Palma de Mallorca, Spain.

E-mail address: jordi.oliver@uib.es (J. Oliver).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.10.009>

0304-4165/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

for cancer prevention and treatment is scarce, but in one of the few existing clinical trials it has been suggested that daily consumption of RSV can provide a concentration in the colon sufficient to elicit anticarcinogenic effects [9].

RSV is considered to be a potential caloric restriction mimetic and thereby by modulating energetic metabolism it conveys beneficial effects against numerous diseases in tissue culture and animal models [10]. Accordingly to this, mitochondria, as the cell powerhouse, is known to be one of the main targets of RSV. However, the modulatory effects of RSV in mitochondrial function and dynamics are not clear and controversial reports are found in the literature [11–13]. On one hand, RSV has been reported to protect endothelial cells by inducing antioxidant systems to prevent mitochondrial dysfunction [12]. In HepG2 cells, RSV has been shown to induce mitochondrial biogenesis [14]. Consistent with these findings, the physiological improvements induced by RSV in rodent models of aging and metabolic syndrome are accompanied by an increase in the mitochondrial content of liver, skeletal muscle and blood vessels [11,12]. Nonetheless, RSV has been demonstrated to induce mitochondrial dysfunction by inhibiting oxidative phosphorylation in rat brain and liver [13,15], which in turn increases ROS levels and induces cell death by apoptosis or necrosis. Therefore, the mechanisms by which RSV regulates mitochondrial function and dynamics are yet not fully understood, since there are many factors that may influence the impact of RSV on mitochondria such as cell type, concentration, duration of exposure, gender, age and cellular differentiation state [11].

Altered cellular metabolism is one of the most important hallmarks of cancer. Cancer cells exhibit increased glucose uptake and rely on glycolysis for ATP production, even in aerobic conditions (Warburg effect) [16]. In this regard, some studies have shown that in ovarian and breast cancer, RSV is able to decrease glucose metabolism, which leads to decreased cell viability and apoptosis [17–19]. These recent findings suggest that metabolic reprogramming may be underlying the anticancer effects of this compound. Taking this into account along with the higher bioavailability of this dietary compound in the digestive tract, our aim was to gain further insight in the modulatory effects of RSV on SW620 colon cancer cell metabolism. To tackle this aim, we determined oxygen consumption rate (OCR), ATP levels, mitochondrial enzymatic activities and mitochondrial biogenesis-related parameters in SW620 cell culture lines treated with 10 μ M of RSV for 48 h. Furthermore, cytotoxic effects of RSV were tested by measuring cell viability, oxidative stress and apoptosis.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) high glucose was from GIBCO (Paisley, UK). Fetal bovine serum (FBS) and penicillin-streptomycin were from Biological Industries (Kibbutz Beit Haemek, Israel). 2-deoxyglucose (2-DG), 5-fluorouracil (5-FU), oligomycin (OLI), carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP), antimycin A (ANT A), thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT), etomoxir (ETO), monodansylcadaverine (MDC) and resveratrol (RSV) were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). N-acetyl cysteine (NAC) was from Panreac AppliChem (Barcelona, Spain), ApoSensor™ Cell Viability Assay Kit was purchased from BioVision (Milpitas, CA), TriPure® Isolation Reagent from Roche (Barcelona, Spain), primers used were from TIB MOLBIOL (Berlin, Germany) and from Metabion (Martinsried, Germany) and BCA™ Protein Assay Kit from Pierce (Bonn, Germany). Human Western blot antibodies SIRT1 (sc-15404), ER α (sc-542), ER β (sc-8974), Tubulin (sc-5286), PDH (sc-377092) and UCP2 (sc-6526) were from Santa Cruz Biotechnology (Texas, USA); NRF1 (#12381), TFAM (#7495), SIRT 3 (#26275), ERR α (#13826), LDH (#2012) and PARP (#9542) were from Cell Signaling (Danvers, MA, USA); NRF2 (ab89443) and PGC-1 α (ab54481) were from Abcam (Cambridge, UK) and Total OXPHOS human WB antibody cocktail (#MS601) from

MitoSciences (Eugene, OR, USA). Immun-Star® Western C® Chemiluminescent Kit was from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA). Finally, 10-nonyl acridine orange bromide (NAO), Amplex® Red Reagent, Annexin V Alexa Fluor® 350 conjugate, MitoTracker® Green (MTG) and tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM) were from Invitrogen - Molecular Probes - Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).

2.2. Cell culture

SW620 colon cancer cell line was purchased from American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA) and cultured in DMEM supplemented with 10% FBS and 1% antibiotic (penicillin and streptomycin) at 37 °C in 5% CO₂. Cells were seeded, incubated overnight and treated the following day by providing fresh medium supplemented with RSV or vehicle (0.03% DMSO, control cells) for 48 h. The dosage of RSV used was 5, 10, 20, 40, 80 and 160 μ M for cell viability assay and 10 μ M for the other determinations.

2.3. Cell viability

For cell viability assays, cells were seeded in 96-well plates and RSV-treated alone or in combination with other drugs for 48 h. Next, cell proliferation was determined by the crystal violet method [20]. Briefly, 20 μ L of violet crystal solution (0.5% of violet crystal in 30% acetic acid) were added to each well and incubated for 10 min at room temperature. The plate was washed twice with distilled water and dye solubilized with 100 μ L of methanol shaking for 1 min. Finally, absorbance was measured at 570 nm using a microplate reader (Power Wave XS, BIO-TEK Winooski, Vermont, USA).

2.4. Oxygen consumption rate (OCR)

After 48 h with 10 μ M of RSV, cells were incubated in 1 mL of DMEM-FBS in a water-thermostatically regulated chamber with a computer-controlled Clark-type O₂ electrode (Oxygraph; Hansatech, Norfolk, UK). Cells were preincubated for 5 min at 37 °C and basal respiration rate was measured three times during the following 5 min. Next, compounds modulating mitochondrial function were sequentially added to the assay medium: 1 μ M OLI to inhibit ATP synthase, 5 μ M FCCP as uncoupler and 1 μ M ANT A to inhibit electron transport chain. Oxygen consumption from adding these mitochondrial inhibitors was used to calculate OCR associated to basal respiration (basal conditions - ANT A); ATP production (basal - OLI); proton leak (OLI - ANT A); maximal respiration (FCCP - ANT A) and spare respiratory capacity (FCCP - basal conditions). To assess the influence of the main metabolic substrates on OCR, cells were incubated in 1 mL of DMEM-FBS or alternatively with amino acid free Krebs-Ringer modified buffer (NaCl 145 mM, KCl 4.86 mM, CaCl₂ 0.54 mM, MgSO₄ 1.22 mM, 5.7 mM NaH₂PO₄, glucose 4.5 g/L and 10% FBS) and treated with inhibitors of glycolysis (20 mM 2-DG) and/or fatty acid oxidation (150 μ M ETO). After each addition, respiration rate was measured as afore mentioned.

2.5. Intracellular ATP levels

Cells were seed in 96-well plates and cultured for 48 h with 10 μ M of RSV. ATP levels were measured using the ApoSensor™ Cell Viability Assay Kit in basal conditions and after 20 mM 2-DG, 150 μ M ETO or 2-DG + ETO for 15 min. For amino acid deprivation experiment, media was shifted to Krebs-Ringer modified buffer (NaCl 145 mM, KCl 4.86 mM, CaCl₂ 0.54 mM, MgSO₄ 1.22 mM, 5.7 mM NaH₂PO₄, glucose 4.5 g/L and 10% FBS) 30 min before 2-DG addition. Luminescence resultant from the reaction of the assay kit was measured in a microplate reader (FLx800, BIO-TEK Winooski, Vermont, USA). For data normalization, cell number was determined in parallel treated wells by the crystal violet method, as described above.

2.6. Enzyme activities

Cells treated with RSV for 48 h were harvested by scraping with ice-cold PBS and then centrifuged at 5000 rpm for 5 min at 4 °C to remove cell debris. Cell pellets were suspended in a buffered solution (20 mM Tris, 2 mM EDTA and 40 mM KCl; pH 7.4) and disrupted by sonication. Protein concentration was determined with the BCA™ Protein Assay Kit and mitochondrial cytochrome c oxidase (COX, EC 1.9.3.1) activity was measured using a spectrophotometric method [21]. Briefly, cell lysates were incubated in 0.1 M NaPO₄H₂ pH 7 in the presence of 2 µg/mL catalase and 5 mM substrate DAB (3,3'-diaminebenzidine tetrachloride). After 30 s, 100 µM reduced cytochrome c was added to start the reaction and absorbance variation was followed over 15 min at 450 nm in a microplate reader (BIO-TEK Winooski, Vermont, USA). Glutamate dehydrogenase (EC 1.4.1.3) activity was determined by adding 6.45 mM NADH, 32.3 mM ADP and 65 kU/L LDH to cell lysates in presence of ammonium acetate buffer. Next, 217 mM 2-oxoglutarate was added to the well and NADH oxidation was followed by measuring the absorbance at 334 nm for 20 min using the microplate reader.

2.7. Western blot

SW620 cells were scraped in RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% deoxycholate, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, 0.01 mM leupeptin, 0.01 mM pepstatin and 1 mM NaF; pH 7.5) and disrupted by sonication. Protein content was determined with a BCA™ Protein Assay Kit. For Western blot analysis, 30 µg of protein from cell lysates were separated on SDS-PAGE gels and electrotransferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were incubated in a blocking solution of 5% non-fat powdered milk in Tris-buffered saline-Tween-20 (TBS with 0.05% Tween-20). Primary antibodies were used to detect the following proteins: estrogen receptor alpha (ER α), estrogen receptor beta (ER β), estrogen-related receptor alpha (ERR α), lactate dehydrogenase (LDH), nuclear respiratory factor 1 (NRF1), nuclear respiratory factor 2 (NRF2), oxidative phosphorylation (OXPHOS) complexes, poly(ADP-ribose) polymerase (PARP), pyruvate dehydrogenase (PDH), peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 α), sirtuin1 (SIRT1), sirtuin 3 (SIRT3), mitochondrial transcription factor (TFAM), uncoupling protein 2 (UCP2) and tubulin as a housekeeping. Protein bands were visualized by Immuno-Star® Western C® Chemiluminescent Kit Western blotting detection systems. The chemiluminescence signal was acquired with a Chemidoc XRS densitometer (Bio-Rad Laboratories) and results were analyzed with Quantity One Software (Bio-Rad).

2.8. Mitochondrial mass determination

Cells were seeded in 96-well plates and treated with RSV for 48 h. Cells were stained with 100 nM mitochondrial specific probe MTG for 40 min at 37 °C in 5% CO₂. After incubation, culture medium was replaced by PBS and fluorescence was measured in a microplate fluorescence reader (FLx800, BIO-TEK Winooski, Vermont, USA) set at excitation and emission wavelengths of 490 and 516 nm, respectively. To further evaluate mitochondrial mass, RSV treated cells were stained with the cardiolipin mitochondrial specific probe NAO. For this purpose, culture medium was replaced by 20 mM NAO in PBS-glucose and incubated for 30 min at 37 °C in 5% CO₂. After incubation, fluorescence was measured in a microplate fluorescence reader set at excitation and emission wavelengths of 485 and 528 nm, respectively. MTG and NAO fluorescence values were normalized per cell density measured by crystal violet assay, as described above.

2.9. mtDNA quantification

Total DNA was isolated from cultured cells using TriPure® Isolation Reagent following the manufacturer's protocol and 5 ng of DNA was

amplified using specific primers for the nuclear 18S and the mitochondrial encoded gene NADH dehydrogenase subunit 4, with SYBR Green technology on a LightCycler 480 System II (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). The amplification program consisted of a preincubation step for denaturation (5 min, 95 °C) followed by 45 cycles consisting of a denaturation step (10 s, 95 °C), an annealing step (10 s, 60 °C), and an extension step (12 s, 72 °C). A negative control without cDNA template was run in each assay. The primers used were: forward 5'-ggACACgACAgATTgACA-3' and reverse 5'-ACC CACgAATCgAgAAAgA-3' for 18S and forward 5'-CgTgACTCCTACCCCTCACA-3' and reverse 5'-ATCgggTgATgATAgCCAAG-3' for the NADH dehydrogenase subunit 4 (mtDNA). Ct values of the real-time PCR were calculated using LightCycler Software 3.5.3 by the Second Derivative Maximum method. Ct values were analyzed taking into account the efficiency of the reaction and referring these results to the 18S using the GenEx Standard Software (Multi-DAnalyses, Sweden).

2.10. Real-time quantitative PCR

Total RNA was isolated from cultured cells using TriPure® Isolation Reagent following the manufacturer's protocol and quantified using a spectrophotometer (BioSpec-nano Shimadzu-Biotech) set at 260 nm. One microgram of the total RNA was reverse transcribed to cDNA and PCR was done for target genes with SYBR Green technology on a LightCycler 480 System II rapid thermal cycler (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). The amplification program consisted of a preincubation step for denaturation of the template cDNA (5 min, 95 °C), followed by 45 cycles consisting of denaturation (10 s, 95 °C), annealing (10 s, T_a depends on the primer) and extension steps (12 s, 72 °C min). The primers used were forward 5'-ggACACgACAgATTgACA-3' and reverse 5'-ACCCACgAATCgAgAAAgA-3' for the 18S ribosomal RNA gene (61 °C annealing temperature), forward 5'-AATTCAGATAATCgACgCCAg-3' and reverse 5'-gTgTTCAACATTCTCCCTCCTC-3' for the ER α gene (61 °C annealing temperature), and forward 5'-TAgTggTCCATgCCAgTTAT-3' and reverse 5'-gggAgCCACACTTCACCAT-3' for the ER β gene (64 °C annealing temperature). The resulting PCR products were analyzed with the same method before described for real-time quantitative PCR determinations.

2.11. Lactate production

Cells were seeded in 96-well plates and treated for 48 h with 10 µM of RSV. After treatment, media was replaced by fresh media supplemented or not with RSV and 20 mM 2-DG, 1 µM OLI or vehicle (0.01% DMSO). Aliquots of media were collected every two hours in the next 6 h to determine lactate concentration. The enzymatic assay used is based on the capacity of lactate dehydrogenase to convert lactate into pyruvate in presence of NAD⁺. Lactate levels were measured following the NADH formation by monitoring the fluorescence in a microplate fluorescence reader (FLx800, BIO-TEK Winooski, Vermont, USA) set at 360 nm excitation and 460 nm emission. Immediately after collecting media, cell number was determined by the crystal violet method as described previously.

2.12. MTT assay, mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and ROS production

Reduction of MTT as a measure of mitochondrial metabolic activity was evaluated by incubating RSV-treated cells with 0.5 mg/mL MTT for 1 h at 37 °C in 5% CO₂. Next, media was replaced by DMSO and absorbance measured using a microplate reader (BIO-TEK Winooski, Vermont, USA). The resulting absorbance was the difference between 570 and 650 nm (blank) lectures. To evaluate $\Delta\Psi_m$, cells seeded in 96-well plates were incubated with 100 nM of the fluorescent probe TMRM for 15 min at 37 °C in 5% CO₂. After incubation, culture medium was replaced by PBS and fluorescence was measured in a microplate fluorescence reader (FLx800, BIO-TEK Winooski, Vermont, USA) set at

excitation and emission wavelengths of 552 and 576, respectively. ROS production was determined using Amplex Red® hydrogen peroxide assay kit following manufacturer's protocol. After 48 h of treatment, media was replaced by Krebs-Ringer phosphate buffer (145 mM NaCl, 4.86 mM KCl, 0.54 mM CaCl₂, 1.22 mM MgSO₄, 5.5 mM glucose, 5.7 mM sodium phosphate, pH 7.4) supplemented with 50 μM Amplex® Red Reagent and 0.1 U/mL horseradish peroxidase. Fluorescence was monitored during 1 h using a microplate fluorescence reader set at excitation and emission wavelengths of 570 and 585 nm, respectively. All measurements were normalized to cell density determined by crystal violet method as described previously.

2.13. Autophagy and apoptosis analysis

To evaluate the effects of RSV on autophagy, cells seeded in 96-well plates and treated with RSV for 48 h were incubated with the fluorescent probe MDC (50 μM) for 15 min at 37 °C in 5% CO₂. After incubation, culture medium was replaced by PBS and fluorescence was measured in a microplate fluorescence reader (FLx800, BIO-TEK Winooski, Vermont, USA) set at excitation and emission wavelengths of 340 and 535, respectively. Apoptosis was measured using the Annexin V Alexa Fluor® 350 conjugate. Briefly, after RSV treatment, cells were fixed with 2% paraformaldehyde in PBS at room temperature for 30 min. Next, cells were stained with the fluorescent dye in binding buffer (10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl and 2.5 mM CaCl₂) for 10 min at room temperature in the dark. After incubation, buffer was replaced by dye free buffer and fluorescence measured in a microplate reader set at excitation and emission wavelengths of 346 and 442 nm, respectively. MDC and Annexin V fluorescence values were normalized to cell density by the crystal violet assay, as described above.

2.14. Flow cytometry

SW620 cells treated with 10 μM of RSV or vehicle for 48 h were trypsinized, washed with PBS and fixed in methanol for 1 h at 4 °C. Next, cells were washed twice and incubated in the dark with 50 μg/mL of propidium iodide and 50 μg/mL of RNase A. Samples were analyzed for DNA ploidy using a Coulter Epics XLMLC Flow Cytometer (Beckman Coulter, Miami, FL, USA).

2.15. Statistical analysis

The Statistical Program for the Social Sciences software for Windows (SPSS, version 21.0; SPSS Inc., Chicago, IL) was used for all statistical analyses. Data are presented as means ± standard error of the mean (SEM). Statistical differences between treated and non-treated cells and between different treatments were analyzed by Student's *t*-test and statistical significance was set at *p* < 0.05.

3. Results

Resveratrol (RSV) effects on SW620 colon cancer cells growth were assessed by treating them with increasing doses of this polyphenol and then measuring cell viability. As shown in Fig. 1, a significant decrease in cell number (20%) was achieved by a minimum dose of 10 μM of RSV. Taking into account the low oral bioavailability of RSV in physiological conditions [6], we decided to use this minimum effective dose to perform the following experiments.

Given that one of the hallmarks of cancer cells is their particular metabolism and taking into consideration the great amount of studies examining the modulatory effects of RSV on mitochondria, we decided to determine the effects of RSV on oxygen consumption in SW620 colon cancer cells. After measuring the basal oxygen consumption rate (OCR), specific mitochondrial inhibitors were added sequentially to evaluate the components of mitochondrial oxygen consumption: oxygen consumed for ATP production, proton leak and maximal and

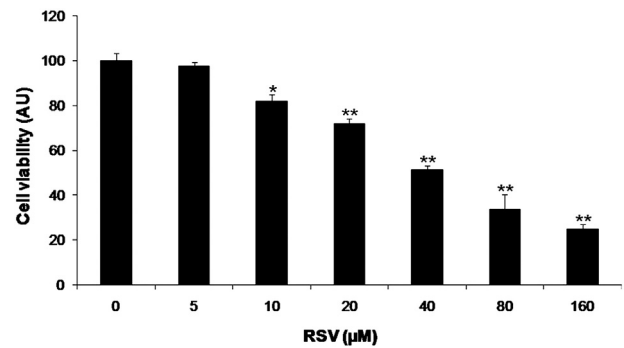


Fig. 1. Effects of RSV on cell viability of SW620 colon cancer cells. Cell viability was measured by crystal violet staining after 48 h RSV or vehicle treatment, (*n* = 6). Data represent means ± SEM. **p* < 0.05, ***p* < 0.01 (Student's *t*-test; RSV vs. vehicle). AU, arbitrary units.

spare respiratory capacities [22]. As shown in Fig. 2A and B, basal OCR was significantly higher in cells treated with RSV, compared to the vehicle. After addition of oligomycin (OLI), an ATP synthase inhibitor, OCR dropped to similar levels in RSV and control cells, suggesting that the increased basal respiration induced by RSV was ATP synthase activity dependant. After addition of the uncoupler carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazine (FCCP), OCR increased above the basal respiration levels. Finally, the addition of an electron transport chain inhibitor (antimycin A, ANT A) allowed the calculation of the residual non-mitochondrial oxygen consumption and the calculation of maximal capacity (FCCP-AA). By taking the difference between uncoupled (FCCP) and basal OCR, the spare respiratory capacity was calculated. As shown in Fig. 2B, RSV-treated cells presented higher values of maximal and spare respiratory capacities, which suggest that RSV increases the mitochondrial respiratory capacity of SW620 cells. On the other hand, no differences were found in proton leak between RSV and control cells. To further confirm the higher rate of cellular metabolism induced by RSV, we performed a thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) reduction assay and measured cytochrome c oxidase (COX) activity and ATP levels after 48 h of RSV treatment. Tetrazolium dye reduction is dependent on cellular NAD(P)H-dependent oxidoreductase enzymes in the cytosol and mitochondria. RSV induced a 20% increase in the reduction of MTT to formazan, suggesting a statistically significant increase in cellular oxidoreductase enzymes. The activity of the specific mitochondrial COX enzyme showed a 45% increase and ATP levels were about 30% higher in RSV- compared to the vehicle-treated cells (Fig. 2C). Altogether, these parameters suggest that RSV induces a state of energized cellular metabolism with increased mitochondrial respiration.

Next, several markers of mitochondrial mass were used to determine whether the increased mitochondrial functionality was matched with a higher mitochondrial recruitment. As shown in Fig. 3A and B, protein levels of oxidative phosphorylation (OXPHOS) complexes were significantly increased by at least 40% in presence of RSV. Furthermore, SW620 cells showed a higher staining with the specific mitochondrial probes MitoTracker® Green (MTG) and 10-nonyl acridine orange bromide (NAO) (Fig. 3C). To test whether this increase in mitochondrial mass was accompanied by an increase in mitochondria number, mitochondrial DNA (mtDNA) levels were determined by real time PCR. Despite the higher mitochondrial mass of RSV-treated cells, no differences were observed in mtDNA copy number (Fig. 3C), which suggests that RSV promotes mitochondrial biogenesis by increasing the mass of pre-existing mitochondria rather than increasing the cellular mitochondrial population.

Mitochondrial biogenesis relies on the concerted and synchronized expression of nuclear and mitochondrial genes. Nuclear respiratory factors (NRFs) regulate the expression of mitochondrial proteins whose genes are located in the nucleus, including mitochondrial transcription

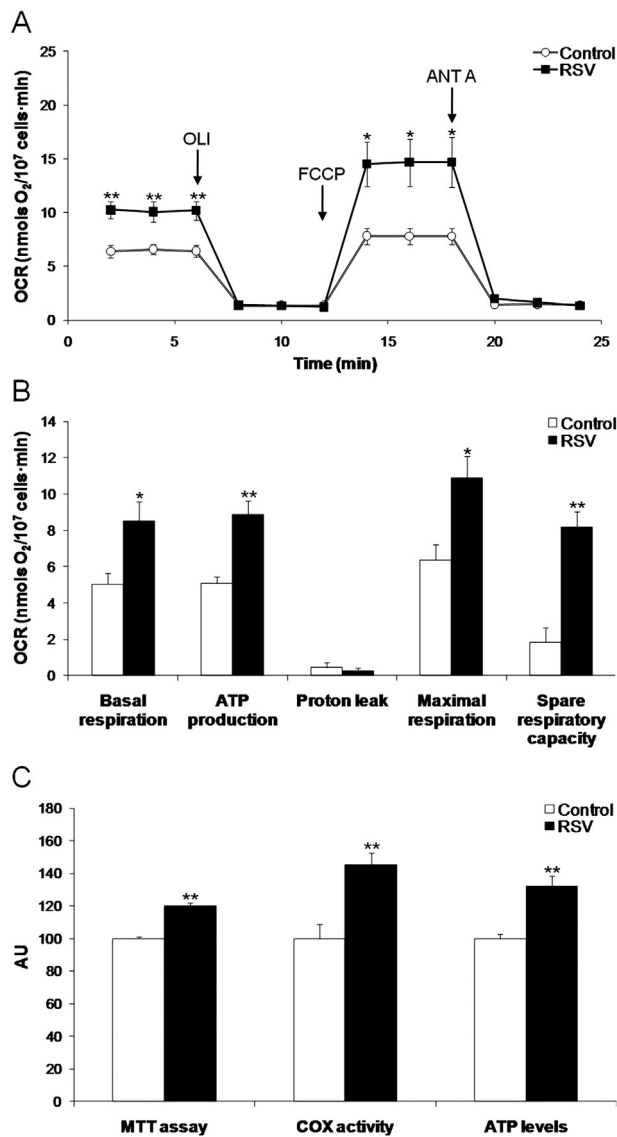


Fig. 2. Effects of RSV on mitochondrial respiration and functionality. (A) Polarographic analysis of oxygen consumption rate (OCR) in SW620 colon cancer cells after 48 h 10 μ M RSV or vehicle treatment under basal conditions or following the addition of oligomycin (OLI), the uncoupler carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP) or the electron transport inhibitor antimycin A (ANT A), ($n = 4$). (B) Quantification of the basal respiration (basal conditions - ANT A); ATP production (basal conditions - OLI); proton leak (OLI - ANT A); maximal respiration (FCCP - ANT A) and spare respiratory capacity (FCCP - basal conditions) from the polarographic analysis shown in A). (C) Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) reduction assay, cytochrome c oxidase (COX) activity and ATP levels in SW60 colon cancer cells after 48 h 10 μ M RSV treatment or vehicle alone, ($n = 6$). Data represent means \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Student's t -test; RSV vs. vehicle). AU, arbitrary units.

factor A (TFAM), which in turn regulates the expression of mitochondrial genome codified genes [23]. The coordination and activation of TFAM and NRFs are in turn controlled by the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α (PGC-1 α). As shown in Fig. 4, PGC-1 α , NRF1 and TFAM were up-regulated by RSV, although there were no effects on NRF2 levels. Among the known RSV targets, sirtuins and estrogen receptors have been reported to influence energy metabolism [24,25]. Sirtuins are NAD⁺-dependent deacetylases which participate in mitochondrial biogenesis and functionality. Among the seven isoforms described, SIRT1 and SIRT3 isoforms have shown clear effects in energy and mitochondrial metabolism [26]. Whereas SIRT1 is located mainly in the nucleus, SIRT3 is found into the mitochondria

and activates proteins related to energy metabolism such as some of the OXPHOS complexes. Although SIRT1 expression was not enhanced by RSV, protein levels of SIRT3 were increased by 50% in presence of this polyphenol (Fig. 4A and B). In addition to sirtuins, it is well known that RSV is a phytoestrogen compound able to bind to estrogen receptors (ERs). To examine the expression of ERs in our SW620 colon cancer cells, we determined the protein levels of the two ER isoforms (ER α and ER β) and estrogen-related receptor alpha (ERR α) by Western blot. As shown in Fig. 4A and B, immunoblot bands for ERs and ERR α were faint and no difference in the level of these receptors were observed in relation to RSV treatment. To confirm this low expression, mRNA levels were determined by RT-PCR (data not shown). Little amplification of ER β mRNA was detected ($C_t = 33$), with no differences in presence of RSV, while ER α was considered non-detectable ($C_t > 40$).

Considering that cancer cells depend on aerobic glycolysis, to the detriment of mitochondrial oxidative phosphorylation (Warburg effect), along with the promotion of mitochondrial recruitment and oxidative phosphorylation exerted by RSV, our next objective was to test whether the cytostatic effects of RSV were related to a reversion of the Warburg effect, i.e., a shift from glycolysis to the Krebs cycle. To examine the effects of RSV on glycolysis, we measured the rate of lactate release: in basal conditions, after glycolysis stimulation by inhibition of mitochondrial respiration with OLI and in presence of the glycolysis inhibitor 2-deoxyglucose (2-DG). As shown in Table 1, lactate production rate was not affected by RSV in any of the conditions assayed. Furthermore, we analyzed the levels of the enzymes controlling pyruvate conversion to lactate (lactate dehydrogenase, LDH) or alternatively to acetyl-CoA (pyruvate dehydrogenase, PDH), which diverts pyruvate carbons to the Krebs cycle. No differences were found in the protein levels of these enzymes, supporting the finding that glycolysis was not impaired by RSV (Table 1 A and B).

Glutamine and lipids can supply the Krebs cycle via glutaminolysis and β -oxidation, respectively. In order to test whether these substrates are supporting the increased mitochondrial respiration in RSV-treated cells, we analyzed OCR in RSV-treated cells exposed to the β -oxidation inhibitor etomoxir (ETO) in complete media and in absence of amino acids. As shown in Fig. 5A, basal OCR was increased by RSV as previously seen. Inhibition of glycolysis with 2-DG resulted in a significant drop in OCR, which was similar for RSV and control cells, supporting the findings that glucose was oxidized at the same rate in both conditions. However, in the presence of ETO, the decrease in OCR was higher in RSV-treated cells, implicating that RSV-induced OCR was fatty acid oxidation dependant. After ETO addition, OCR of control and RSV cells was the same, suggesting that the increased basal respiration induced by RSV was due to an increment of fatty acid oxidation. Next, to test the use of amino acids as metabolic fuel, we measured OCR in an amino acid-deprived medium (by changing from complete media to a Krebs-Ringer buffer supplemented with glucose and FBS). As shown in Fig. 5B, the effect of RSV on oxygen consumption was independent on the presence of amino acids. Furthermore, no changes were observed in the enzymatic activity of glutamate dehydrogenase (data not shown) which supports the idea that RSV has no modulatory effects on amino acid metabolism. To further confirm the metabolic reliance of RSV-treated cells on fatty acid oxidation, OCR was measured in the presence of ETO and the oxygen consumed for ATP production, proton leak, maximal and spare respiratory capacities were determined as previously described. As shown in Fig. 5C and D, ETO abrogated differences between control and RSV-treated cells in all these components except for maximal respiration.

Next, we measured ATP levels after inhibition of glycolysis and/or fatty acid oxidation in media with or without amino acids (Fig. 5E). RSV-treated cells showed higher ATP levels compared to control cells, even when glycolysis or fatty acid oxidation were alternatively inhibited. These differences in ATP levels disappeared only when both metabolic pathways were simultaneously inhibited. These data show that RSV-treated cells are able to keep their higher ATP levels even

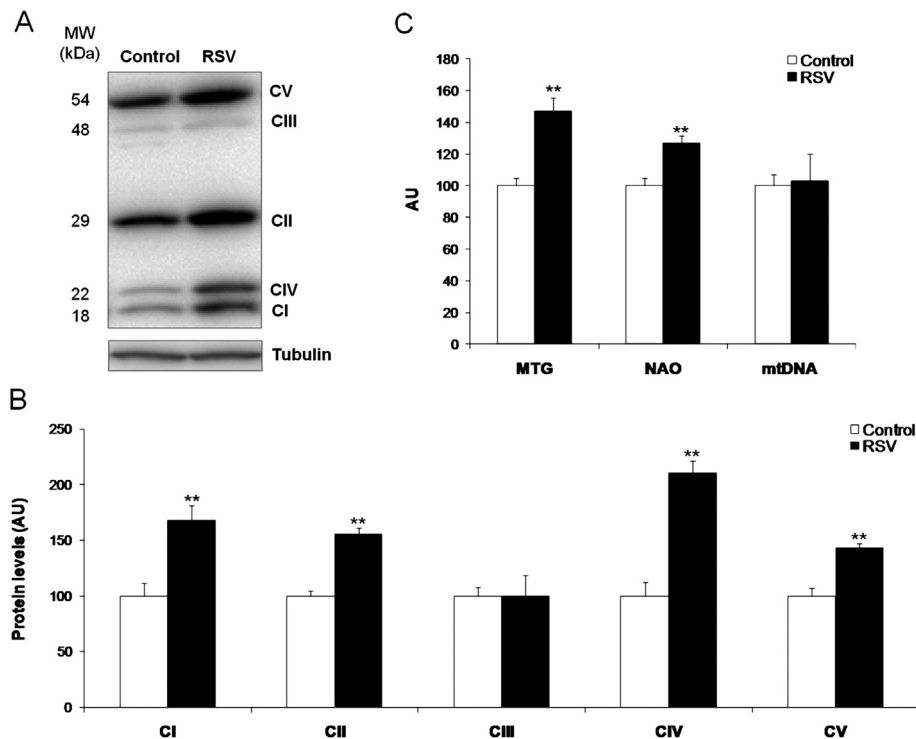


Fig. 3. Effects of RSV on mitochondrial recruitment. (A) Representative subunits of each electron transport complex were detected by Western blotting using a cocktail of monoclonal antibodies (see the [Materials and methods](#) section). The identities of the probed subunits are as follows: CI, complex I - NADH dehydrogenase 1 beta subcomplex 8 (NDUFB8); CII, complex II - succinate dehydrogenase subunit B (SDHB); CIII, complex III - ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 2 (UQCRC2); CIV, complex IV - cytochrome c oxidase subunit I (COX1); CV, complex V - ATP synthase subunit alpha (ATP5A). Cells were treated with 10 μ M RSV or vehicle for 48 h. (B) Quantification of the OXPHOS complexes subunits from immunoblots, ($n = 6$). (C) Quantification of MitoTracker Green® (MTG) and 10-nonyl acridine orange bromide (NAO) mitochondrial staining and mitochondrial DNA (mtDNA) levels by qPCR in control and RSV-treated cells, ($n = 6$). Data represent means \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Student's t -test; RSV vs. vehicle). AU, arbitrary units.

when fatty acid oxidation is inhibited. This compensatory production of ATP seems to rely on anaerobic glycolysis, since ETO decreases oxygen consumption but no ATP levels.

Excessive fatty acid oxidation may overwhelm the electron transport system, resulting in an overproduction of reactive oxygen species (ROS). To assess this hypothesis in our RSV-treated cells, mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and ROS production were measured. As shown in [Fig. 6A](#), RSV significantly increased $\Delta\Psi_m$ and ROS production. This increased $\Delta\Psi_m$ may be due to the higher amount and activity of respiratory chain complexes. Furthermore, this situation was not compensated by an increase of the mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2), and it is consistent with the lack of differences in proton leak observed in

[Fig. 2B](#). ROS producing mitochondria may induce its own removal by autophagy (mitophagy), or alternatively, induce the “removal of the whole cell” by triggering apoptosis. [Fig. 6B](#) shows no differences in the selective probe for autophagic vacuoles, monodansylcadaverine (MDC), whereas analysis of cell cycle after 48 h of RSV treatment showed an increased subG0 peak, suggesting a higher rate of apoptosis ([Fig. 6D](#)). Apoptosis activation was confirmed by increased levels of Annexin V and PARP cleavage RSV-treated cells ([Fig. 6B](#) and C). The effects of RSV on ROS production and cell viability were rescued when fatty acid oxidation was inhibited with ETO or a ROS scavenger was added ([Fig. 6E](#) and F). These results support the link between metabolic shift to fatty acid oxidation and oxidative stress as part of the cytotoxic effects of RSV.

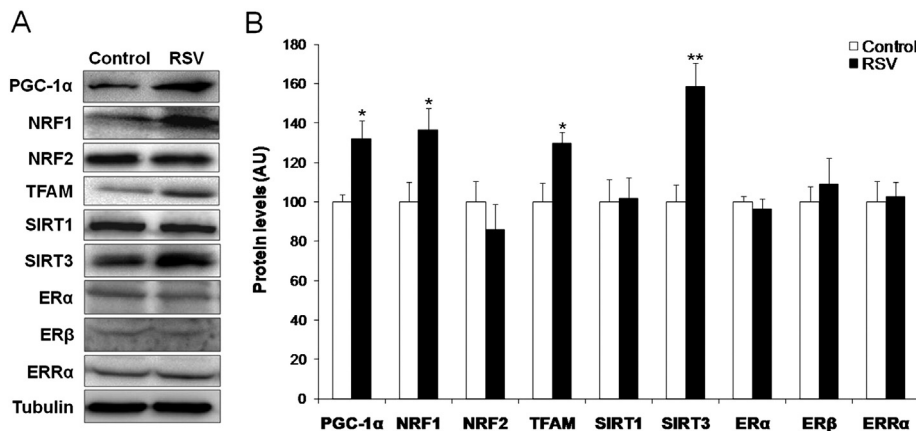
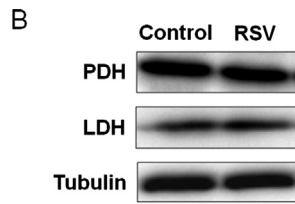


Fig. 4. Effects of RSV on the levels of proteins associated to mitochondrial biogenesis regulation. (A) Representative immunoblots. (B) Quantification of key proteins involved in mitochondrial biogenesis, ($n = 6$). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC1 α), nuclear respiratory factor 1 (NRF1), nuclear respiratory factor 2 (NRF2), mitochondrial transcription factor A (TFAM), sirtuin 1 (SIRT1), sirtuin 3 (SIRT3), estrogen receptor α (ER α), estrogen receptor β (ER β), estrogen-related receptor α (ERR α). Data represent means \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Student's t -test; RSV vs. vehicle). AU, arbitrary units.

Table 1

Effects of RSV on glucose metabolism. (A) Lactate release rate in SW620 colon cancer cells pre-treated for 48 h with 10 μ M RSV or vehicle. Lactate released by the cells to the culture media was measured during 6 h after addition of 20 mM 2-deoxyglucose (2-DG, glycolysis inhibitor), 1 μ M oligomycin (OLI, ATP synthase inhibitor) or vehicle, ($n = 3$). Quantification of protein levels of pyruvate dehydrogenase (PDH) and lactate dehydrogenase (LDH) measured by Western blot, ($n = 6$). (B) Representative immunoblots. Data represent means \pm SEM. AU, arbitrary units.

Released lactate/cell/h (AU)		
	Control	RSV
Control	0.26 \pm 0.04	0.35 \pm 0.04
2-DG	0.14 \pm 0.03	0.15 \pm 0.02
Oligomycin	0.65 \pm 0.02	0.63 \pm 0.07
Protein levels (AU)		
	Control	RSV
PDH	100 \pm 7.78	105 \pm 7.22
LDH	100 \pm 6.64	113 \pm 2.76



Given the ability of RSV to induce ROS production and apoptosis, we decided to explore the adjuvant use of this polyphenol to enhance the sensitivity of colon cancer cells to pro-oxidant antitumor therapies. As shown in Fig. 6E and F, the combined treatment of RSV and 5-fluorouracil (5-FU) led to a greater increase of ROS production and consequently to a higher cell toxicity than RSV or 5-FU alone.

4. Discussion

The role of resveratrol (RSV) as anticancer agent in colorectal cancer has been established *in vitro* and *in vivo* [3,7,8]. In this study, RSV has proven to be cytotoxic for SW620 colon cancer cells at concentrations that can be easily reached in the gastrointestinal tract [9]. Paradoxically, this inhibitory effect on cell growth was accompanied by an increase of mitochondrial oxygen consumption rate (OCR) associated with ATP production. Both the functional and molecular data in this study showed that RSV promotes mitochondrial recruitment, increasing mitochondrial respiratory capacity and ATP production. RSV induced higher levels of the master transcriptional factors regulating mitochondrial biogenesis (PGC-1 α , NRF1 and TFAM), which resulted in increased mitochondrial mass, OXPHOS levels, COX and MTT activity, as well as higher maximal and spare mitochondrial respiratory capacities. This ability of RSV to improve mitochondrial function through induction of mitochondrial biogenesis has been previously described for several cell types [11]. In HepG2 cells, 1 μ M RSV for 12 h increased the expression of mitochondrial biogenesis regulatory factors and mitochondrial proteins [14] and an induction of mitochondrial mass formation is also stimulated in endothelial cells treated with the same dose of RSV used in the present study [27]. In our study, the RSV-induced increase in mitochondrial mass was consistently assessed using probes targeting the organelle (MTG, NAO), mitochondrial specific proteins (OXPHOS) and mitochondrial activity (COX, MTT, OCR). The only exception was mtDNA copy number, which suggests that RSV enhances the mitochondrial mass of pre-existing organelles rather than forming new mitochondria. In contrast, other authors have described an increase in mtDNA copy number, together with the RSV-induced increase in mitochondrial biogenesis in non-cancer cells [28,29]. Nevertheless, in cancer cells, a previous work has reported that RSV depletes mtDNA, which leads to dysfunctional mitochondria and increased autophagy as part of the RSV-induced apoptosis mechanism [30]. These genotoxic effects exerted by RSV on cancer cell mtDNA may be dose-dependent, as the low dose used in our study was not able to neither decrease mtDNA content nor increase autophagy. Further experiments would be required to understand how RSV influences mitochondrial DNA replication and how it is integrated into the triggering of autophagy and/or apoptosis in cancer cells.

In mice, SIRT1 activation induced by RSV leads to increased aerobic capacity associated with an induction of OXPHOS and mitochondrial biogenesis [28]. We did not find differences in SIRT1 levels but, in contrast,

SIRT3 levels were significantly increased in SW620 after RSV treatment. SIRT3 is the isoform localized in mitochondria and it has been described to deacetylate mitochondrial enzymes regulating fatty acid β -oxidation, amino acid metabolism and the electron transport chain, resulting in an activation of energy metabolism [31]. Interestingly, a previous work in HepG2 cells has shown the ability of RSV to stimulate mitochondrial complex I activity, leading to an increased mitochondrial NAD⁺/NADH ratio, which in turn initiates a SIRT3-dependent increase in the mitochondrial substrate supply pathways [32]. In our work, we reported an increase of SIRT3 protein levels, supporting the involvement of this protein in the RSV-induced mitochondrial recruitment here described. On the other hand, phytoestrogenic activity of RSV through binding to estrogen receptors (ERs) has also been described [33]. In fact, RSV has been shown to exhibit mixed estrogen agonist/antagonist activity depending on the tissue [34]. In the current work, the presence of ER α in SW620 cancer cell line was almost undetectable by RT-PCR, whereas ER β was detectable, although at low levels. In any case, RSV-treated cells did not show modifications of ER expression pattern. From these data, it cannot be discarded that ER β could be one possible target for RSV modulatory effects, despite that a more comprehensive study is necessary to establish direct interactions of RSV with ER β in SW620 cancer cell line.

One of the hallmarks of cancer cells is the Warburg effect, the metabolic preference for glucose fermentation over oxidative phosphorylation, even in the presence of oxygen [16]. The effects of RSV on glucose metabolism are controversial. Some studies have shown that RSV impairs glucose metabolism in some types of cancer, which leads to decreased cell viability [17–19]. In contrast, it has also been reported that RSV increases glycolytic ATP synthesis flux in rat liver [35]. In view of the increased oxidative metabolism induced by RSV in this study, we hypothesized that the inhibitory effect of RSV on SW620 cell growth could be associated with a metabolic shift from glycolysis to mitochondrial respiration. To check this point we determined glycolytic rate and capacity by measuring lactate production and the levels of the enzymes LDH and PDH. Surprisingly, no differences were observed between control and RSV-treated cells in any of these parameters, thus suggesting that RSV is not able to modify the glycolytic rate or pyruvate conversion to acetyl-CoA. Our polarographic analyses revealed that the higher respiration found in RSV-treated cells was targeted only by etomoxir, the fatty acid oxidation inhibitor. In contrast, the higher ATP levels found in RSV-treated cells were kept even in the presence of this inhibitor. This suggests that anaerobic glycolysis is able to compensate for the inhibition of fatty acid oxidation to keep the levels of ATP. These results suggest that fatty acid oxidation is the main source fuelling RSV-induced mitochondrial respiration. In support, the ability of RSV to enhance fatty acid oxidation has been previously shown in human cells [36].

Fatty acid oxidation consists of cyclical reactions that shorten fatty acids and generate NADH and FADH₂, which enter the electron transport chain to produce ATP and thus yield large amounts of energy but also promote ROS generation [37]. In adipocytes, high levels of fatty acid oxidation increase oxidative stress, which is an important pathogenic mechanism of obesity-associated metabolic syndrome [38]. Another study conducted in kidney cortical tubes of diabetic rats showed that oxidation of fatty acids is the source of increased mitochondrial ROS production [37]. Increased NADH generation from fatty acid oxidation together with an increase in levels and activities of OXPHOS complexes may boost proton translocation from the mitochondrial matrix to the intermembrane space. If this situation is not relieved by protons re-entering the matrix through a highly active ATP synthase or by the mitochondrial uncoupling proteins (UCPs), hyperpolarization of mitochondrial membrane can occur and electron transport chain is decelerated, which leads to higher chances of non-canonical electron transfer to molecular oxygen and consequently to the onset of ROS production. We have recapitulated here the events occurring in mitochondria of RSV-treated cells, showing that these cells have a higher mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$), increased hydrogen peroxide production and elevated ATP levels.

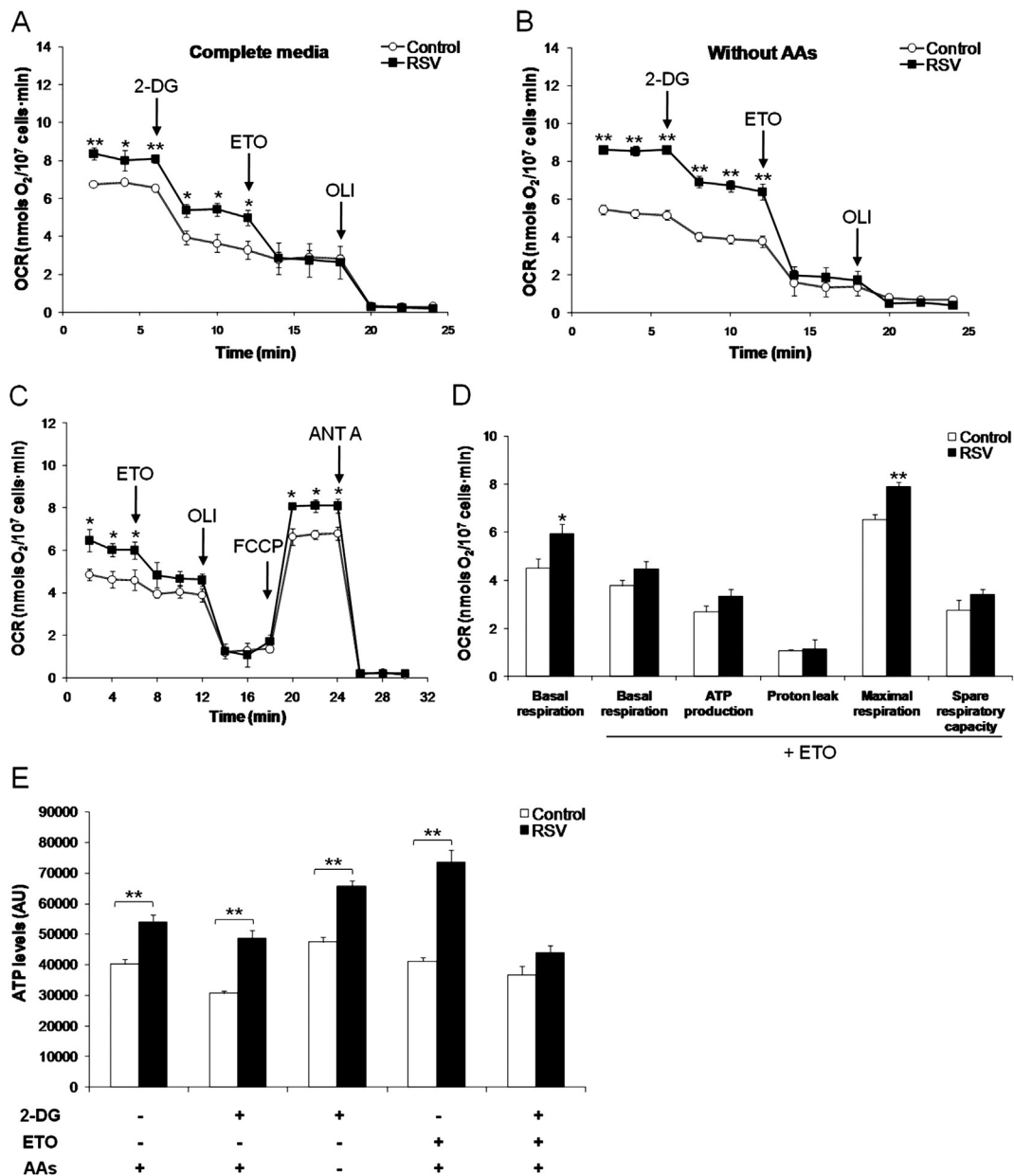


Fig. 5. Effects of RSV on the relative usage of metabolic fuels for mitochondrial respiration and ATP production. Inhibition curve of oxygen consumption rate (OCR) in complete media (A) or amino acid (AAs) free buffer (B) in response to 2-deoxyglucose (2-DG), etomoxir (ETO) and oligomycin (OLI), (*n* = 4). (C) OCR of SW620 colon cancer cells in complete media after 48 h of 10 μM RSV or vehicle treatment under basal conditions and following the addition of ETO, oligomycin (OLI), the uncoupler carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP) or the electron transport inhibitor antimycin A (ANT A), (*n* = 4). (D) Quantification of the basal respiration (basal conditions - ANT A) in the absence and presence of ETO. With ETO inhibition, ATP production (basal conditions - OLI), proton leak (OLI - ANT A), maximal respiration (FCCP - ANT A) and spare respiratory capacity (FCCP - basal conditions) are shown in D). (E) Histograms showing cellular ATP levels with or without 2-DG, ETO and/or AAs deprivation, (*n* = 6). Data represent means ± SEM. **p* < 0.05, ***p* < 0.01 (Student's *t*-test; RSV vs. vehicle). AU, arbitrary units.

A previous study showed that excessive production of fatty acid oxidation-derived ATP is detrimental to the survival of leukemia cells [39]. Similarly, here we report that RSV stimulates an increase of ATP levels from fatty acid oxidation together with a decrease of cell growth. ROS production may be a reasonable mechanism for linking higher respiration with cell growth inhibition. In fact, here we showed that both etomoxir and N-acetyl cysteine were able to attenuate the effects of RSV on ROS production and cell survival in SW620 cells. The apoptotic cell death described here and in previous studies suggests that this dietary polyphenol may be useful as an adjuvant candidate for cancer treatment [3,40,41]. High doses of RSV in combination with 5-fluorouracil (5-FU) have been shown to be more effective in the inhibition of cell growth rather than 5-FU alone [43]. Here we report evidence that low

doses of RSV are able to sensitize colon cancer cells to ROS production and improve the effectiveness of 5-FU.

5. Conclusions

Current chemotherapeutic agents are associated with serious side effects in patients, therefore researchers are trying to find alternative agents that are effective against cancer or able to potentiate the effectiveness of chemotherapy, allowing the use of lower doses decreasing side effects. The dietary polyphenol RSV has shown promising anticancer properties, despite that its low oral bioavailability limits its therapeutic potential. Nevertheless, intestinal epithelia may take advantage of the beneficial effects of this dietary compound. Here we show that

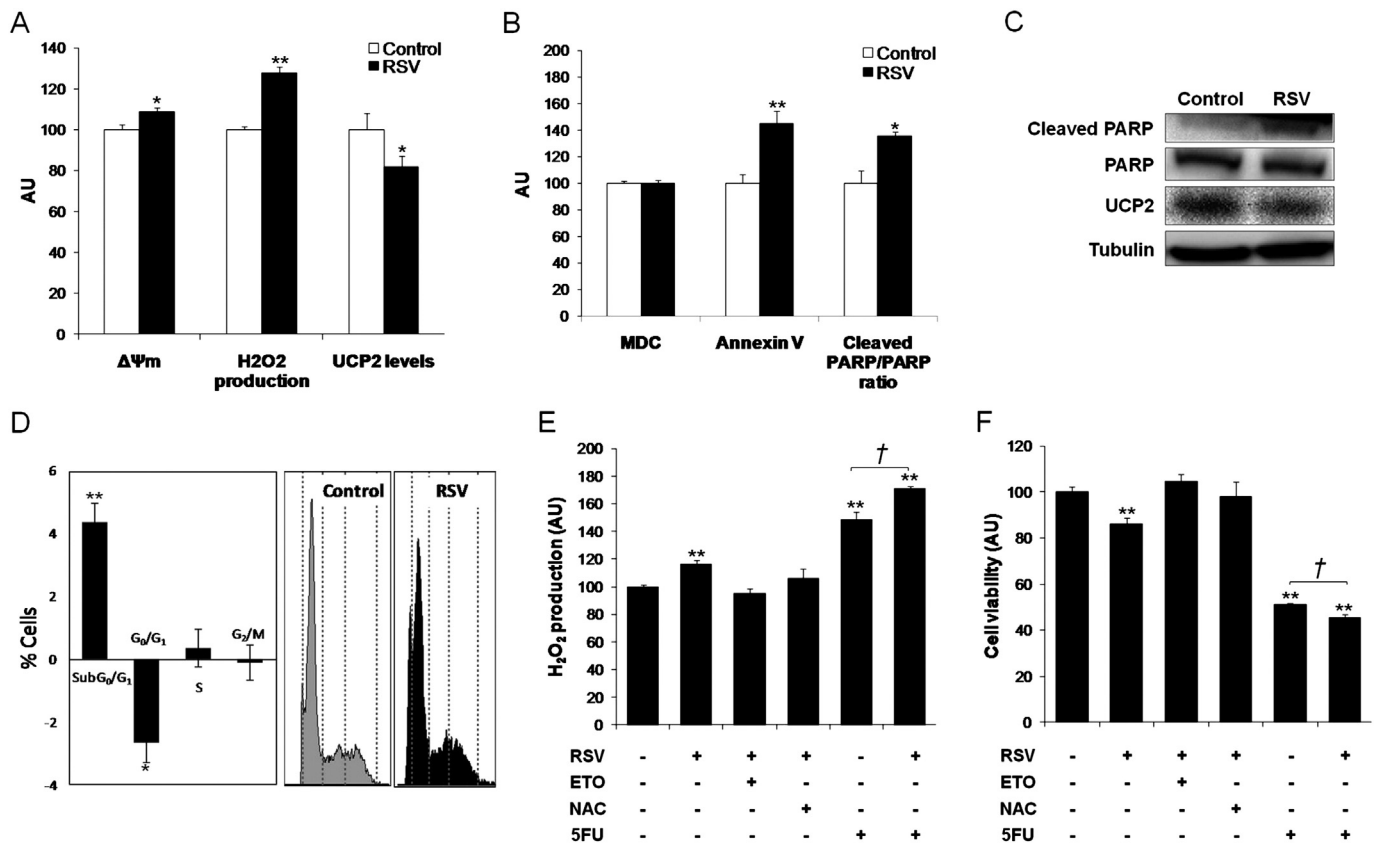


Fig. 6. Effects of RSV on oxidative stress-related parameters and cell viability in combination with 5-FU. (A) Histograms showing mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$), hydrogen peroxide production and levels of mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2) measured by Western blot, ($n = 6$). (B) Quantification of autophagy using the autophagosome monodansylcadaverine (MDC) probe and apoptosis measuring annexin V levels and poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage, ($n = 6$). (C) Representative immunoblots showing PARP cleavage and UCP2 levels. (D) Flow cytometry analysis of propidium iodide-stained SW620 cells with or without 10 μ M RSV treatment for 48 h. Bars represent the mean \pm SEM of the difference between RSV-treated vs. untreated control cells distributed on cell cycle phases and expressed as percentage of total viable cells. Representative histograms are shown (right panels). Hydrogen peroxide production (E) and cell viability (F) with combined treatments of RSV (10 μ M), etomoxir (ETO, 15 μ M), N-acetyl cysteine (NAC, 1 mM) and/or 5-fluorouracil (5-FU, 10 μ M), ($n = 6$). Data represent means \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Student's t -test; RSV vs. vehicle). † $p < 0.05$ (Student's t -test, RSV + 5-FU vs. 5-FU). AU, arbitrary units.

RSV triggers mitochondrial recruitment and fatty acid oxidation in SW620 colon cancer cells. This partial reversion of the Warburg effect is associated with increased mitochondrial membrane potential and ROS production and a concomitant increase of apoptosis and cell growth inhibition. These results shed new light on the anticancer mechanism of RSV, showing the ability of this compound to target cancer cell metabolism and enhance the effects of chemotherapy.

Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found, in the online version.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Fondo de Investigaciones Sanitarias of Instituto de Salud Carlos III (PI12/01827 and PI14/01434) of the Spanish Government cofinanced by FEDER-Unión Europea ("Una manera de hacer Europa"). M.M. Blanquer-Rosselló was funded by FPU grant of Ministerio de Educación, Cultura y Deporte of Spanish Government.

References

- [1] J. Burns, T. Yokota, H. Ashihara, M.E. Lean, A. Crozier, Plant foods and herbal sources of resveratrol, *J. Agric. Food Chem.* 50 (11) (May 22 2002) 3337–3340.

- [2] E.M. Varoni, A.F. Lo Faro, J. Sharifi-Rad, M. Iriti, Anticancer molecular mechanisms of resveratrol, *Front. Nutr.* 3 (2016) 8.
- [3] J.K. Aluyen, Q.N. Ton, T. Tran, A.E. Yang, H.B. Gottlieb, R.A. Bellanger, Resveratrol: potential as anticancer agent, *J. Diet. Suppl.* 9 (1) (Mar 2012) 45–56.
- [4] M.E. Juan, I. Alfaras, J.M. Planas, Colorectal cancer chemoprevention by trans-resveratrol, *Pharmacol. Res.* 65 (6) (Jun 2012) 584–591.
- [5] T. Yang, L. Wang, M. Zhu, L. Zhang, L. Yan, Properties and molecular mechanisms of resveratrol: a review, *Pharmazie* 70 (8) (Aug 2015) 501–506.
- [6] T. Walle, F. Hsieh, M.H. DeLegge, J.E. Oatis Jr., U.K. Walle, High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans, *Drug Metab. Dispos.* 32 (12) (Dec 2004) 1377–1382.
- [7] Z.G. Li, T. Hong, Y. Shimada, I. Komoto, A. Kawabe, Y. Ding, et al., Suppression of N-nitrosomethylbenzylamine (NMBA)-induced esophageal tumorigenesis in F344 rats by resveratrol, *Carcinogenesis* 23 (9) (Sep 2002) 1531–1536.
- [8] L. Tessitore, A. Davit, I. Sarotto, G. Caderni, Resveratrol depresses the growth of colorectal aberrant crypt foci by affecting bax and p21(CIP) expression, *Carcinogenesis* 21 (8) (Aug 2000) 1619–1622.
- [9] K.R. Patel, V.A. Brown, D.J. Jones, R.G. Britton, D. Hemingway, A.S. Miller, et al., Clinical pharmacology of resveratrol and its metabolites in colorectal cancer patients, *Cancer Res.* 70 (19) (Oct 1 2010) 7392–7399.
- [10] J.H. Chung, V. Manganiello, J.R. Dyck, Resveratrol as a calorie restriction mimetic: therapeutic implications, *Trends Cell Biol.* 22 (10) (Oct 2012) 546–554.
- [11] M.R. de Oliveira, S.F. Nabavi, A. Manayi, M. Daglia, Z. Hajheydari, S.M. Nabavi, Resveratrol and the mitochondria: from triggering the intrinsic apoptotic pathway to inducing mitochondrial biogenesis, a mechanistic view, *Biochim. Biophys. Acta* 1860 (4) (Apr 2016) 727–745.
- [12] M.P. Valdecantos, P. Perez-Matute, P. Quintero, J.A. Martinez, Vitamin C, resveratrol and lipoic acid actions on isolated rat liver mitochondria: all antioxidants but different, *Redox Rep.* 15 (5) (2010) 207–216.
- [13] J. Zheng, V.D. Ramirez, Inhibition of mitochondrial proton F0F1-ATPase/ATP synthase by polyphenolic phytochemicals, *Br. J. Pharmacol.* 130 (5) (Jul 2000) 1115–1123.
- [14] S.K. Kim, Y. Joe, M. Zheng, H.J. Kim, J.K. Yu, G.J. Cho, et al., Resveratrol induces hepatic mitochondrial biogenesis through the sequential activation of nitric oxide and carbon monoxide production, *Antioxid. Redox Signal.* 20 (16) (Jun 1 2014) 2589–2605.

- [15] R. Zini, C. Morin, A. Bertelli, A.A. Bertelli, J.P. Tillement, Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain, *Drugs Exp. Clin. Res.* 25 (2-3) (1999) 87–97.
- [16] O. Warburg, On the origin of cancer cells, *Science* 123 (3191) (Feb 24 1956) 309–314.
- [17] A. Kueck, A.W. Opipari Jr., K.A. Griffith, L. Tan, M. Choi, J. Huang, et al., Resveratrol inhibits glucose metabolism in human ovarian cancer cells, *Gynecol. Oncol.* 107 (3) (Dec 2007) 450–457.
- [18] L.S. Gomez, P. Zancan, M.C. Marcondes, L. Ramos-Santos, J.R. Meyer-Fernandes, M. Sola-Penna, et al., Resveratrol decreases breast cancer cell viability and glucose metabolism by inhibiting 6-phosphofructo-1-kinase, *Biochimie* 95 (6) (Jun 2013) 1336–1343.
- [19] H. Gwak, G. Haegeman, B.K. Tsang, Y.S. Song, Cancer-specific interruption of glucose metabolism by resveratrol is mediated through inhibition of Akt/GLUT1 axis in ovarian cancer cells, *Mol. Carcinog.* 54 (12) (Dec 2015) 1529–1540.
- [20] M.K. Nagamine, T.C. da Silva, P. Matsuzaki, K.C. Pinello, B. Cogliati, C.R. Pizzo, et al., Cytotoxic effects of butanolic extract from *Pfafia paniculata* (Brazilian ginseng) on cultured human breast cancer cell line MCF-7, *Exp. Toxicol. Pathol.* 61 (1) (Jan 2009) 75–82.
- [21] Z.M. Chrzanowska-Lightowlers, D.M. Turnbull, R.N. Lightowlers, A microtiter plate assay for cytochrome c oxidase in permeabilized whole cells, *Anal. Biochem.* 214 (1) (Oct 1993) 45–49.
- [22] M.D. Brand, D.G. Nicholls, Assessing mitochondrial dysfunction in cells, *Biochem. J.* 435 (2) (Apr 15 2011) 297–312.
- [23] D.P. Kelly, R.C. Scarpulla, Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function, *Genes Dev.* 18 (4) (Feb 15 2004) 357–368.
- [24] X. Li, N. Kazgan, Mammalian sirtuins and energy metabolism, *Int. J. Biol. Sci.* 7 (5) (2011) 575–587.
- [25] J.Q. Chen, T.R. Brown, J. Russo, Regulation of energy metabolism pathways by estrogens and estrogenic chemicals and potential implications in obesity associated with increased exposure to endocrine disruptors, *Biochim. Biophys. Acta* 1793 (7) (Jul 2009) 1128–1143.
- [26] M.N. Sack, T. Finkel, Mitochondrial metabolism, sirtuins, and aging, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4 (12) (Dec 2012).
- [27] A. Csiszar, N. Labinsky, J.T. Pinto, P. Ballabh, H. Zhang, G. Losonczy, et al., Resveratrol induces mitochondrial biogenesis in endothelial cells, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 297 (1) (Jul 2009) H13–H20.
- [28] M. Lagouge, C. Argmann, Z. Gerhart-Hines, H. Meziane, C. Lerin, F. Daussin, et al., Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α , *Cell* 127 (6) (Dec 15 2006) 1109–1122.
- [29] M. Sugiyama, R. Kawahara-Miki, H. Kawana, K. Shirasuna, T. Kuwayama, H. Iwata, Resveratrol-induced mitochondrial synthesis and autophagy in oocytes derived from early antral follicles of aged cows, *J. Reprod. Dev.* 61 (4) (2015) 251–259.
- [30] V. Prabhu, P. Srivastava, N. Yadav, M. Amadori, A. Schneider, A. Seshadri, et al., Resveratrol depletes mitochondrial DNA and inhibition of autophagy enhances resveratrol-induced caspase activation, *Mitochondrion* 13 (5) (Sep 2013) 493–499.
- [31] B. Kincaid, E. Bossy-Wetzel, Forever young: SIRT3 a shield against mitochondrial meltdown, aging, and neurodegeneration, *Front. Aging Neurosci.* 5 (2013) 48.
- [32] V. Desquirit-Dumas, N. Gueguen, G. Leman, S. Baron, V. Nivet-Antoine, S. Chupin, et al., Resveratrol induces a mitochondrial complex I-dependent increase in NADH oxidation responsible for sirtuin activation in liver cells, *J. Biol. Chem.* 288 (51) (Dec 20 2013) 36662–36675.
- [33] B.D. Gehm, J.M. McAndrews, P.Y. Chien, J.L. Jameson, Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (25) (Dec 9 1997) 14138–14143.
- [34] J.L. Bowers, V.V. Tyulmenkov, S.C. Jernigan, C.M. Klinge, Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors alpha and beta, *Endocrinology* 141 (10) (Oct 2000) 3657–3667.
- [35] M.C. Beauvieux, A. Stephant, H. Gin, N. Serhan, P. Couzigou, J.L. Gallis, Resveratrol mainly stimulates the glycolytic ATP synthesis flux and not the mitochondrial one: a saturation transfer NMR study in perfused and isolated rat liver, *Pharmacol. Res.* 78 (Dec 2013) 11–17.
- [36] V. Aires, D. Delmas, C. Le Bachelier, N. Lutruffe, D. Schlemmer, J.F. Benoist, et al., Stilbenes and resveratrol metabolites improve mitochondrial fatty acid oxidation defects in human fibroblasts, *Orphanet J. Rare Dis.* 9 (2014) 79.
- [37] M.G. Rosca, E.J. Vazquez, Q. Chen, J. Kerner, T.S. Kern, C.L. Hoppel, Oxidation of fatty acids is the source of increased mitochondrial reactive oxygen species production in kidney cortical tubules in early diabetes, *Diabetes* 61 (8) (Aug 2012) 2074–2083.
- [38] S. Furukawa, T. Fujita, M. Shimabukuro, M. Iwaki, Y. Yamada, Y. Nakajima, et al., Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome, *J. Clin. Invest.* 114 (12) (Dec 2004) 1752–1761.
- [39] I. Samudio, M. Fiegl, T. McQueen, K. Clise-Dwyer, M. Andreeff, The warburg effect in leukemia-stroma cocultures is mediated by mitochondrial uncoupling associated with uncoupling protein 2 activation, *Cancer Res.* 68 (13) (Jul 1 2008) 5198–5205.
- [40] H.Y. Lin, H.Y. Tang, F.B. Davis, P.J. Davis, Resveratrol and apoptosis, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1215 (Jan 2011) 79–88.
- [41] J.H. Zhou, H.Y. Cheng, Z.Q. Yu, D.W. He, Z. Pan, D.T. Yang, Resveratrol induces apoptosis in pancreatic cancer cells, *Chin. Med. J.* 124 (11) (Jun 2011) 1695–1699.
- [42] F.M. Santandreu, A. Valle, J. Oliver, P. Roca, Resveratrol potentiates the cytotoxic oxidative stress induced by chemotherapy in human colon cancer cells, *Cell. Physiol. Biochem.* 28 (2) (2011) 219–228.

5. RECAPITULACIÓ

Una de les característiques de les cèl·lules canceroses és la reprogramació del seu metabolisme per poder fer front a l'augment de les demandes d'energia i d'intermediaris biosintètics necessaris per mantenir una elevada proliferació (64, 74). Segons les primeres observacions fetes per Otto Warburg, les cèl·lules tumorals presenten un consum de glucosa elevat i es basen principalment en la glicòlisi per a l'obtenció d'ATP, inclús en presència d'oxigen. Aquesta situació, coneguda com efecte Warburg, es va atribuir inicialment a un mal funcionament mitocondrial que relegava l'obtenció d'energia a la conversió de glucosa a lactat (158). No obstant això, a hores d'ara es sap que per poder fer front a les demandes energètiques i estructurals que caracteritzen un estat d'elevada proliferació és necessari un metabolisme mitocondrial actiu i, per tant, és indispensable que les cèl·lules canceroses presentin mitocondris funcionals (74, 75, 159). En qualsevol cas, aquesta reprogramació metabòlica que sofreixen les cèl·lules tumorals els confereix característiques diferencials respecte a les cèl·lules sanes, de forma que es presenta com una diana potencial per al desenvolupament d'estratègies terapèutiques més específiques (84, 85).

La leptina és una hormona que juga un paper essencial com a senyal indicadora de les reserves de grassa de l'organisme i promotora del gast energètic (84, 85). D'altra banda, participa en el desenvolupament mamari normal així com també és responsable d'estimular la proliferació tumoral en aquest teixit (98, 175). De fet, s'ha vist que participa en l'activació de múltiples vies involucrades en la proliferació, resistència a l'apoptosi, adhesió cel·lular, invasió i migració en cèl·lules canceroses de mama (11, 176). S'ha vist que l'obesitat és un factor de mal pronòstic en dones postmenopàusiques que pateixen càncer de mama (86) i aquest fenomen s'ha associat a l'increment dels nivells de leptina en sang (11, 177). Tenint en compte el rol que desenvolupa la leptina en l'homeòstasi energètica de l'organisme (178, 179) i amb la finalitat de profunditzar en la relació entre leptina i càncer, en aquesta tesi s'han estudiat els efectes d'aquesta hormona sobre la bioenergètica mitocondrial en el càncer de mama.

Els resultats obtinguts van corroborar les observacions realitzades en estudis previs consistents en una promoció de la proliferació cel·lular al mateix temps que una disminució de l'estrès oxidatiu per part de la leptina en la línia de càncer de mama MCF-7 (153, 180). Tenint en compte que tant la proliferació cel·lular com l'estrès oxidatiu es troben íntimament relacionats amb el metabolisme energètic, vam decidir estudiar els efectes de la leptina sobre la respiració cel·lular. Com a resultat, es va veure que aquesta hormona promou una major respiració cel·lular com a font de producció d'ATP. En aquesta direcció, en estudis previs s'ha vist que la leptina estimula el consum d'oxigen en fetge de rata (107), en teixit adipós blanc de ratolins ob/ob (181), així com també en ratolins transgènics que la sobreexpressen (106). Aquesta major respiració mitocondrial que es va observar en les cèl·lules MCF-7 exposades a la leptina, no és dependent del consum de glucosa donat que es va observar una baixada tant de l'activitat com dels nivells proteics de l'enzim clau en la conversió del piruvat a acetil-CoA, la PDH. L'estudi dels nivells d'ATP en presència de diferents inhibidors de les rutes metabòliques va posar de manifest que la major producció d'ATP mitocondrial induïda per la leptina només quedava anul·lada amb un inhibidor de la CPT₁, enzim que catalitza el transport d'àcids grassos cap al mitocondri, tot suggerint que els àcids grassos són el combustible que suporta l'elevada respiració mitocondrial provocada per la leptina. A més, l'expressió de proteïnes implicades en el metabolisme dels àcids grassos (FAT/CD36 i CPT₁), així com del factor de transcripció que en regula la seva expressió (PPAR α), es va incrementar en presència de leptina. El factor de transcripció PPAR α es troba a la vegada controlat per l'AMPK (182), la qual també es va veure activada per fosforilació. Aquests resultats indiquen que la leptina estimula l'ús dels àcids grassos per generar l'energia cel·lular. En concordança, estudis previs en múscul han demostrat que la leptina activa l'AMPK, estimulant l'oxidació dels àcids grassos (109, 183). Per a l'oxidació de les grans quantitats d'acetil-CoA generades a partir de la β -oxidació dels àcids grassos són necessaris un cicle de Krebs i una cadena de transport electrònic actius, la qual cosa implica la presència de mitocondris funcionals.

En vista dels efectes de la leptina sobre el metabolisme dels àcids grassos, vam voler profunditzar en el paper de la leptina en el metabolisme glucídic. Per això, es va

estudiar l'efecte d'aquesta hormona sobre del destí metabòlic de la glucosa i es va veure que l'expressió de la LDH i la producció de lactat es trobaven disminuïdes en presència d'aquesta adipoquina, sense que la captació de glucosa es veiés alterada. Aquests resultats suggereixen que la leptina redirigeix el destí metabòlic de la glucosa en la cèl·lula reduint la seva conversió a lactat. Per mantenir l'elevada proliferació, la qual suposa un increment de la biosíntesi de proteïnes, àcids grassos i àcids nucleics, les principals vies generadores d'intermediaris biosintètics (la glicòlisi, la via de les pentoses fosfat i el cicle de Krebs) han d'estar actives (74). A la vegada, per mantenir la producció d'intermediaris biosintètics per part del cicle de Krebs són necessàries les reaccions anapleròtiques que aporten estructures de carboni al cicle per mantenir-lo en funcionament. Una font important de carboni per aquest cicle és el piruvat que en deriva de la glucosa, el qual és convertit a oxalacetat per acció de la PC. Per una altra banda, la via de les pentoses fosfat utilitza la glucosa per generar NADPH i riboses fosfat per a la biosíntesi lipídica i d'àcids nucleics, respectivament. Els resultats d'aquesta tesi mostren que tant l'activitat de la PC com de la G6PDH, enzim limitant de la via de les pentoses fosfat, experimenten un augment en presència de leptina. En aquest sentit, s'ha vist que els enzims anabòlics PC i G6PDH són essencials per al creixement tumoral i per tant bons candidats per ser usats com a dianes en intervencions terapèutiques (84, 184). Aquests resultats suggereixen que la leptina promou una reprogramació metabòlica caracteritzada per la utilització de la glucosa en les rutes biosintètiques, mentre que els àcids grassos són oxidats en el mitocondri per generar l'ATP necessari per a la supervivència i proliferació cel·lulars. Aquesta situació té bastant de sentit en la glàndula mamària, on la disponibilitat de grassa és elevada degut al teixit adipós circumdant.

L'absència de canvis en les activitats COX, ATPasa i CS i en els nivells proteics dels complexos de l'OXPPOS en presència de leptina indica que l'estimulació del metabolisme mitocondrial promogut per aquesta hormona no va acompanyat d'un increment efectiu de la biomassa mitocondrial. No obstant, els marcadors de biogènesi mitocondrial PGC-1 α , TFAM i mtSSB van veure augmentada la seva expressió. L'increment de PGC-1 α amb aquesta adipoquina s'ha vist prèviament en adipòcits (185) i, en múscul, la leptina indueix la biogènesi mitocondrial a través de

l'activació d'aquest factor (186). D'altra banda, l'estudi de la dinàmica mitocondrial va mostrar que els factors proteics implicats en la fusió (OPA₁, MFN₁ i MFN₂) i la fissió (FIS₁ i DRP₁) experimenten un increment quan les cèl·lules són exposades a la leptina. Aquesta activació dels processos de fusió i fissió, pot contribuir a reduir l'estrès oxidatiu ja que mitjançant la fusió es combinen membranes mitocondrials parcialment danyades per tal de recuperar la funcionalitat mitocondrial (55), a la vegada que la fissió facilita l'eliminació d'aquelles porcions danyades de la xarxa mitocondrial per mitofàgia (62). En aquest sentit, es va observar un augment de la biomassa lisosomal i autofagosomal i de la colocalització dels mitocondris i lisosomes així com també una activació per fosforilació de l'AMPK, principal regulador de l'autofàgia (187, 188), situació que suggereix un increment dels processos mitofàgics per part de la leptina. Una acceleració dels cicles de fusió i fissió juntament amb una biogènesi mitocondrial i mitofàgia incrementats confereixen a les cèl·lules un control de qualitat mitocondrial més eficient i, en conseqüència, uns mitocondris més funcionals.

D'aquesta manera, la leptina indueix una millora del control de qualitat mitocondrial acompanyada d'una reprogramació metabòlica que fa possible una millor distribució i aprofitament dels combustibles cel·lulars amb la finalitat d'incrementar la proliferació tumoral. A més, aquesta reprogramació metabòlica promoguda per la leptina es realitza a través d'un control dels fluxos metabòlics i no amb un augment de la biomassa mitocondrial. Aquesta millora del funcionament mitocondrial induïda per la leptina fa possible una millor eficiència bioenergètica mitocondrial i una reducció de la producció de ROS, la qual cosa podria contribuir a explicar els avantatges que aquesta adipokina aporta per al creixement de la línia de càncer de mama MCF-7.

Els ROS generats en la cadena respiratòria mitocondrial presenten un paper dual en la cèl·lula. Per una banda, són necessaris per a un correcte funcionament de la cèl·lula ja que actuen com a missatgers secundaris regulant processos biològics importants (27). D'altra banda, quan la seva producció sobrepassa la capacitat antioxidant de la cèl·lula passen a ser patològics (27), apareixent en aquest cas l'estrès oxidatiu, responsable de provocar alteracions en el material genètic que originen la carcinogènesi (28, 29) i en última instància promouen la mort cel·lular. Les cèl·lules canceroses, no obstant, es

caracteritzen per presentar nivells elevats d'estrès oxidatiu sense que es doni una activació de les vies apoptòtiques. Aleshores, molts tractaments anticancerígens es basen en l'ús d'agents prooxidants amb la finalitat d'aconseguir uns nivells d'estrès suficientment elevats com per afavorir l'activació de l'apoptosi en aquestes cèl·lules (189).

Els polifenols són compostos naturals que es troben en les plantes i s'ha lligat el seu consum en la dieta amb un efecte protector front el càncer, paper atribuït a l'efecte antioxidant que exerceixen a dosis fisiològiques. Malgrat això, a dosis elevades, s'ha vist que actuen com a prooxidants de forma que constitueixen potencials teràpies coadjuvants per al tractament del càncer (118, 119, 121, 122, 190). Tenint en compte la importància del metabolisme en l'estrès oxidatiu i el paper que poden desenvolupar els polifenols en aquest context, vam estudiar la influència d'aquests compostos sobre el metabolisme de la cèl·lula tumoral.

En aquesta tesi s'han estudiat els efectes dels polifenols xantohumol (XN) i 8-prenilnaringenina (8-PN), components del llúpul utilitzat per a l'elaboració de la cervesa, en el metabolisme oxidatiu de la línia de càncer de mama MCF-7. Els resultats mostren la capacitat d'aquests compostos per modular l'estrès oxidatiu, involucrant canvis en els nivells d'expressió de les sirtuïnes i dels complexos de l'OXPPOS. Concentracions baixes de XN i quasi totes les dosis testades de 8-PN van exercir una funció antioxidant a la vegada que la viabilitat cel·lular es va veure en certa manera promoguda. D'altra banda, dosis elevades de XN van resultar en efectes prooxidants i citotòxics, resultats consistents amb treballs previs en altres línees cel·lulars tractades amb XN (191, 192). Les activitats dels enzims antioxidants CAT, SOD i GRd es van veure disminuïdes o no alterades amb ambdós compostos, la qual cosa apunta a que el XN i la 8-PN podrien exercir un efecte modulador de l'estrès oxidatiu per vies alternatives a la regulació dels enzims antioxidants. De fet, l'estudi de l'expressió de la SIRT1 i dels complexos de l'OXPPOS va mostrar que la dosi antioxidant de XN i la 8-PN l'incrementen, mentre que una dosi alta de XN la disminueix. Aquests resultats suggereixen que la regulació de l'estrès oxidatiu d'aquests compostos es realitza a través d'una modulació de la funcionalitat mitocondrial més que dels sistemes

antioxidants. A més, el XN exerceix un efecte dual en funció de la dosi en la viabilitat cel·lular i l'estrès oxidatiu, paper descrit en altres fitoestrògens tals com la genisteïna o el resveratrol (193, 194). Considerant la biodisponibilitat d'aquests compostos (137), a través de la dieta es poden aconseguir concentracions baixes de XN i 8-PN en la circulació sanguínia, molt allunyades de les dosis prooxidants, les quals poden exercir un efecte antioxidant protector front a l'inici d'un estat cancerós. Per una altra part, l'efecte prooxidant del XN converteix aquest compost en un candidat potencial per ser usat en el tractament del càncer de mama.

El resveratrol (RSV) és un polifenol present en la pell del raïm vermell considerat un agent anticancerigen des que s'han relacionat els seus efectes locals en el sistema gastrointestinal amb la prevenció del càncer colorectal i esofàgic (148, 163). En la present tesi vam comprovar que el RSV és un important promotor de l'estrès oxidatiu i d'efectes citotòxics en la línia de càncer de colon SW620. Paradoxalment, les cèl·lules tractades amb RSV presentaren un increment del consum d'oxigen mitocondrial associat a la producció d'ATP. A més, l'expressió dels factors proteics implicats en la biogènesi mitocondrial (PGC-1 α , NRF1 i TFAM), els nivells dels complexos de l'OXPPOS, les activitats COX i MTT, els nivells d'ATP basals, així com les capacitats respiratòries màxima i de reserva també es van veure incrementats. De fet, l'ús de sondes específiques per al mitocondri (MTG i NAO) va posar de manifest un augment net de la biomassa d'aquest orgànu. Aquestes dades suggereixen que el RSV podria millorar la funcionalitat mitocondrial a través d'una inducció de la biogènesi mitocondrial en la línia cancerosa SW620. No obstant, els nivells de mtDNA no es van veure alterats amb RSV la qual cosa suggereix que l'increment de biomassa mitocondrial no es troba associat a la formació de nous mitocondris. La proteïna mitocondrial SIRT3 està implicada en l'activació del metabolisme energètic, desacetilant enzims mitocondrials que regulen la β -oxidació dels àcids grassos, el metabolisme dels aminoàcids i la cadena de transport electrònic (134). Els resultats d'aquesta tesi mostren que el RSV indueix de forma significativa un increment de l'expressió d'aquesta proteïna, la qual cosa suggereix la seva implicació en la millora de la bioenergètica mitocondrial exercida pel RSV.

En vista dels resultats obtinguts indicant que el RSV exerceix un increment del metabolisme oxidatiu en la línia SW620, vam voler profunditzar en els canvis metabòlics subjacents. Existeixen evidències que mostren la capacitat del RSV per reduir la viabilitat cel·lular i induir l'apoptosi en càncer d'ovari i mama a través d'una regulació negativa del metabolisme de la glucosa (150, 151, 195). Pel contrari, també s'ha vist que el RSV és capaç d'incrementar el flux glucolític de síntesi d'ATP (196). En aquesta tesi, es va veure que el RSV no modifica la producció de lactat així com tampoc l'expressió de les proteïnes LDH i PDH, implicades en el metabolisme de la glucosa, la qual cosa suggereix que aquest compost no altera la taxa glucolítica. D'altra banda, la major respiració mitocondrial observada en les cèl·lules tractades amb RSV no es va veure afectada per la privació d'aminoàcids, mentre que sí es va veure alterada per la inhibició del transport d'àcids grassos al mitocondri, tot suggerint que l'oxidació dels àcids grassos és la principal font d'energia que alimenta la respiració induïda pel RSV.

Aquesta major oxidació dels àcids grassos permet explicar tant l'elevada respiració com els majors nivells d'ATP observats en les cèl·lules tractades amb RSV. A més, l'elevada saturació a la que pot estar sotmesa la cadena de transport electrònic mitocondrial a causa d'aquesta elevada oxidació dels àcids grassos podria explicar l'increment de producció de ROS observada en aquestes cèl·lules (197). Un increment en la taxa d'oxidació dels àcids grassos es tradueix en una elevada translocació protònica cap a l'espai intermembrana que, si no es veu alleugerida per una entrada de protons cap a la matriu, resulta en un increment de l'estrès oxidatiu i del potencial de membrana (33, 34). De fet, l'estudi de la producció de ROS i del potencial de membrana va posar de manifest que el RSV provoca un increment d'ambdós paràmetres. Un augment de l'estrès oxidatiu pot conduir a la mort cel·lular (198), de forma que l'augment de la producció de ROS estimulat pel RSV podria explicar els efectes citotòxics d'aquest compost. Els resultats de les determinacions del cicle cel·lular, nivells d'annexina V i ruptura de la PARP dutes a terme en aquesta tesi mostren que el RSV indueix l'apoptosi en la línia SW620. En concordança, els efectes del RSV sobre la viabilitat cel·lular i producció de ROS es veuen anul·lats quan s'inhibeix l'oxidació dels àcids grassos així com en presència d'un antioxidant. A més,

quan el RSV és combinat amb el citotòxic 5-fluorouracil, els efectes promotors de mort cel·lular i producció de ROS es veuen incrementats.

Aquests resultats suggereixen, tot plegat, que el RSV indueix un increment de la biomassa mitocondrial i de l'oxidació dels àcids grassos en la línia SW620 tot estimulant la funcionalitat mitocondrial i promovent una reversió parcial de l'efecte Warburg. Aquest estat es troba associat, a la vegada, amb un increment de l'estrès oxidatiu i de l'apoptosi cel·lular. Així, els resultats d'aquest estudi posen de manifest la modulació metabòlica subjacent als efectes citotòxics del RSV, aportant nova llum al mecanisme anticancerígen d'aquest compost.

En conjunt, en aquesta tesi hem analitzat l'efecte de moduladors metabòlics, tant endògens (leptina) com exògens (polifenols) en models cel·lulars de càncer de mama i colon. Els resultats obtinguts d'aquests estudis mostren com la leptina i alguns polifenols tenen la capacitat de modular el metabolisme cancerós contribuint, en última instància, a una promoció o inhibició del càncer. La millora de la funcionalitat mitocondrial exercida per la leptina, la 8-PN i dosis baixes de XN en la línia de càncer de mama MCF-7 està associada a una disminució de l'estrès oxidatiu i, en conseqüència, a una inducció de la proliferació cel·lular. Pel contrari, dosis altes de XN provoquen una disfuncionalitat mitocondrial acompanyada d'una estimulació de l'estrès oxidatiu i finalment una reducció de la viabilitat cel·lular. En el cas del RSV en la línia de càncer de colon SW620, encara que indueix una millora significativa de la funcionalitat mitocondrial, aquesta va acompanyada d'un augment de l'estrès oxidatiu i efectes citotòxics. Aquests resultats aporten noves evidències per a l'aprofitament de la reprogramació metabòlica de les cèl·lules canceroses com a diana terapèutica amb la finalitat de potenciar l'especificitat i l'efectivitat dels tractaments anticancerígens.

6. CONCLUSIONS / *CONCLUSIONS*

- I. La leptina activa la biogènesi i dinàmica mitocondrials, així com també la mitofàgia, en la línia de càncer de mama MCF-7. Aquest fet suposa un major recanvi mitocondrial associat a una millora de l'eficiència energètica i a una reducció de l'estrès oxidatiu, situació que ve acompanyada d'un increment de la proliferació cel·lular.
- II. La leptina indueix, en la línia de càncer de mama MCF-7, una reprogramació metabòlica a favor d'una major oxidació dels àcids grassos. Aquesta reprogramació del metabolisme permet destinar una major quantitat de glucosa a les rutes biosintètiques i podria estar relacionada amb la major proliferació cel·lular promoguda per aquesta hormona.
- III. El tractament amb xantohumol en la línia cel·lular MCF-7 exerceix efectes antioxidants a dosis fisiològiques i prooxidants a dosis més elevades, mentre que la 8-prenilnaringenina manifesta majoritàriament efectes antioxidants. El paper d'aquests compostos sobre l'estrès oxidatiu ve mediat per canvis en la funcionalitat mitocondrial més que en els sistemes antioxidants.
- IV. El resveratrol indueix la biogènesi mitocondrial promovent una major capacitat respiratòria en la línia de càncer de colon SW620. Aquests efectes s'observen juntament amb una inducció important de l'expressió de la SIRT3, proteïna clau en el control de la funcionalitat mitocondrial.
- V. La major respiració mitocondrial induïda pel resveratrol en la línia cel·lular SW620 s'associa a una major oxidació dels àcids grassos. A la vegada, aquesta situació es troba acompanyada d'una reducció de la viabilitat cel·lular, un major estrès oxidatiu i una inducció de l'apoptosi.
- VI. Els efectes promotors sobre l'estrès oxidatiu i la mort cel·lular per part del xantohumol i del resveratrol converteixen aquests polifenols en candidats potencials per ser usats en teràpies coadjuvants en el tractament del càncer.

1. Leptin activates mitochondrial biogenesis and dynamics, as well as mitophagy, in breast cancer cell line MCF-7. This fact involves an increased mitochondrial replacement associated with an improvement of energy efficiency and a reduction of oxidative stress, situation that is accompanied by increased cell proliferation.
2. Leptin induces, in breast cancer cell line MCF-7, a metabolic reprogramming in favour of a greater fatty acid oxidation. This metabolic reprogramming allows a major input of glucose to the biosynthetic pathways and it could be related to the increased cell proliferation promoted by this hormone.
3. Xanthohumol treatment in MCF-7 cell line exerts antioxidant effects at physiological doses and prooxidant at higher doses, while 8-prenylnaringenin manifests mainly antioxidant effects. The role of these compounds on oxidative stress is mediated by modifications on mitochondrial functionality rather than on antioxidant systems.
4. Resveratrol induces mitochondrial biogenesis thus promoting a greater respiratory capacity in colon cancer cell line SW620. These effects are observed along with a significant induction of SIRT3 expression, a key protein in mitochondrial functionality control.
5. The increased mitochondrial respiration induced by resveratrol in SW620 cell line is associated with an increased fatty acid oxidation. In turn, this situation is accompanied by cell viability reduction, increased oxidative stress and apoptosis induction.
6. The promotional effects on oxidative stress and cell death by xanthohumol and resveratrol turn these polyphenols into potential candidates to be used in coadjuvant therapies in cancer treatment.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Hortobagyi GN, de la Garza Salazar J, Pritchard K, Amadori D, Haidinger R, Hudis CA, et al. The global breast cancer burden: variations in epidemiology and survival. *Clin Breast Cancer*. 2005 Dec;6(5):391-401.
2. Key TJ, Verkasalo PK, Banks E. Epidemiology of breast cancer. *The Lancet Oncology*. 2001 Mar;2(3):133-40.
3. Huang Z, Hankinson SE, Colditz GA, Stampfer MJ, Hunter DJ, Manson JE, et al. Dual effects of weight and weight gain on breast cancer risk. *Jama*. 1997 Nov 5;278(17):1407-11.
4. van den Brandt PA, Spiegelman D, Yaun SS, Adami HO, Beeson L, Folsom AR, et al. Pooled analysis of prospective cohort studies on height, weight, and breast cancer risk. *American journal of epidemiology*. 2000 Sep 15;152(6):514-27.
5. Reeves GK, Pirie K, Beral V, Green J, Spencer E, Bull D. Cancer incidence and mortality in relation to body mass index in the Million Women Study: cohort study. *Bmj*. 2007 Dec 1;335(7630):1134.
6. Lahmann PH, Hoffmann K, Allen N, van Gils CH, Khaw KT, Tehard B, et al. Body size and breast cancer risk: findings from the European Prospective Investigation into Cancer And Nutrition (EPIC). *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2004 Sep 20;111(5):762-71.
7. Cleary MP, Grossmann ME. Minireview: Obesity and breast cancer: the estrogen connection. *Endocrinology*. 2009 Jun;150(6):2537-42.
8. Goodwin PJ. Obesity and endocrine therapy: host factors and breast cancer outcome. *Breast*. 2013 Aug;22 Suppl 2:S44-7.
9. Paz-Filho G, Lim EL, Wong ML, Licinio J. Associations between adipokines and obesity-related cancer. *Frontiers in bioscience*. 2011;16:1634-50.
10. Newman G, Gonzalez-Perez RR. Leptin-cytokine crosstalk in breast cancer. *Molecular and cellular endocrinology*. 2014 Jan 25;382(1):570-82.
11. Saxena NK, Sharma D. Multifaceted leptin network: the molecular connection between obesity and breast cancer. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 2013 Dec;18(3-4):309-20.
12. Dong JY, Zhang L, He K, Qin LQ. Dairy consumption and risk of breast cancer: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Breast cancer research and treatment*. 2011 May;127(1):23-31.
13. Pharoah PD, Day NE, Duffy S, Easton DF, Ponder BA. Family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 1997 May 29;71(5):800-9.
14. Walsh T, King MC. Ten genes for inherited breast cancer. *Cancer cell*. 2007 Feb;11(2):103-5.
15. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2015 Mar;65(2):87-108.
16. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2015 Mar 1;136(5):E359-86.
17. Yusof AS, Isa ZM, Shah SA. Dietary patterns and risk of colorectal cancer: a systematic review of cohort studies (2000-2011). *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2012;13(9):4713-7.
18. Park Y, Hunter DJ, Spiegelman D, Bergkvist L, Berrino F, van den Brandt PA, et al. Dietary fiber intake and risk of colorectal cancer: a pooled analysis of prospective cohort studies. *Jama*. 2005 Dec 14;294(22):2849-57.
19. Chao A, Connell CJ, Jacobs EJ, McCullough ML, Patel AV, Calle EE, et al. Amount, type, and timing of recreational physical activity in relation to colon and rectal cancer in older adults: the Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort. *Cancer epidemiology,*

- biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology. 2004 Dec;13(12):2187-95.
20. Reidy J, McHugh E, Stassen LF. A review of the relationship between alcohol and oral cancer. *Surgeon*. 2011 Oct;9(5):278-83.
 21. Armaghany T, Wilson JD, Chu Q, Mills G. Genetic alterations in colorectal cancer. *Gastrointest Cancer Res*. 2012 Jan;5(1):19-27.
 22. Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*. 1961 Jul 8;191:144-8.
 23. Chen JQ, Brown TR, Yager JD. Mechanisms of hormone carcinogenesis: evolution of views, role of mitochondria. *Advances in experimental medicine and biology*. 2008;630:1-18.
 24. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science*. 1998 Aug 28;281(5381):1309-12.
 25. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical journal*. 2009 Jan 1;417(1):1-13.
 26. Fariss MW, Chan CB, Patel M, Van Houten B, Orrenius S. Role of mitochondria in toxic oxidative stress. *Mol Interv*. 2005 Apr;5(2):94-111.
 27. Sena LA, Chandel NS. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Molecular cell*. 2012 Oct 26;48(2):158-67.
 28. Schumacker PT. Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword. *Cancer cell*. 2006 Sep;10(3):175-6.
 29. Sainz RM, Lombo F, Mayo JC. Radical decisions in cancer: redox control of cell growth and death. *Cancers (Basel)*. 2012;4(2):442-74.
 30. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nature reviews Cancer*. 2011 Feb;11(2):85-95.
 31. Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free radical biology & medicine*. 2010 Mar 15;48(6):749-62.
 32. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological reviews*. 1979 Jul;59(3):527-605.
 33. Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *The Journal of biological chemistry*. 2003 Sep 19;278(38):36027-31.
 34. Hirst J, King MS, Pryde KR. The production of reactive oxygen species by complex I. *Biochemical Society transactions*. 2008 Oct;36(Pt 5):976-80.
 35. Echtay KS. Mitochondrial uncoupling proteins--what is their physiological role? *Free radical biology & medicine*. 2007 Nov 15;43(10):1351-71.
 36. Baffy G, Derdak Z, Robson SC. Mitochondrial recoupling: a novel therapeutic strategy for cancer? *British journal of cancer*. 2011 Aug 9;105(4):469-74.
 37. Valle A, Oliver J, Roca P. Role of uncoupling proteins in cancer. *Cancers (Basel)*. 2010;2(2):567-91.
 38. Robbins D, Zhao Y. New aspects of mitochondrial Uncoupling Proteins (UCPs) and their roles in tumorigenesis. *International journal of molecular sciences*. 2011;12(8):5285-93.
 39. Attardi G, Schatz G. Biogenesis of mitochondria. *Annual review of cell biology*. 1988;4:289-333.
 40. Scarpulla RC, Vega RB, Kelly DP. Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2012 Sep;23(9):459-66.
 41. Fernandez-Silva P, Enriquez JA, Montoya J. Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Experimental physiology*. 2003 Jan;88(1):41-56.
 42. Clayton DA. Transcription and replication of animal mitochondrial DNAs. *International review of cytology*. 1992;141:217-32.

43. Fisher RP, Clayton DA. A transcription factor required for promoter recognition by human mitochondrial RNA polymerase. Accurate initiation at the heavy- and light-strand promoters dissected and reconstituted in vitro. *The Journal of biological chemistry*. 1985 Sep 15;260(20):11330-8.
44. Tiranti V, Savoia A, Forti F, D'Apolito MF, Centra M, Rocchi M, et al. Identification of the gene encoding the human mitochondrial RNA polymerase (h-mtRPOL) by cyberscreening of the Expressed Sequence Tags database. *Human molecular genetics*. 1997 Apr;6(4):615-25.
45. Campbell CT, Kolesar JE, Kaufman BA. Mitochondrial transcription factor A regulates mitochondrial transcription initiation, DNA packaging, and genome copy number. *Biochimica et biophysica acta*. 2012 Sep-Oct;1819(9-10):921-9.
46. Xia Y, Buja LM, Scarpulla RC, McMillin JB. Electrical stimulation of neonatal cardiomyocytes results in the sequential activation of nuclear genes governing mitochondrial proliferation and differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997 Oct 14;94(21):11399-404.
47. Gleyzer N, Vercauteren K, Scarpulla RC. Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators. *Molecular and cellular biology*. 2005 Feb;25(4):1354-66.
48. Poulsen L, Siersbaek M, Mandrup S. PPARs: fatty acid sensors controlling metabolism. *Seminars in cell & developmental biology*. 2012 Aug;23(6):631-9.
49. Puigserver P, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocrine reviews*. 2003 Feb;24(1):78-90.
50. Scarpulla RC. Nuclear control of respiratory chain expression by nuclear respiratory factors and PGC-1-related coactivator. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008 Dec;1147:321-34.
51. Fernandez-Marcos PJ, Auwerx J. Regulation of PGC-1alpha, a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *The American journal of clinical nutrition*. 2011 Apr;93(4):884S-90.
52. Joseph AM, Joanisse DR, Baillot RG, Hood DA. Mitochondrial dysregulation in the pathogenesis of diabetes: potential for mitochondrial biogenesis-mediated interventions. *Experimental diabetes research*. 2012;2012:642038.
53. Zungu M, Schisler J, Willis MS. All the little pieces. -Regulation of mitochondrial fusion and fission by ubiquitin and small ubiquitin-like modifier and their potential relevance in the heart. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*. 2011;75(11):2513-21.
54. Palmer CS, Osellame LD, Stojanovski D, Ryan MT. The regulation of mitochondrial morphology: intricate mechanisms and dynamic machinery. *Cellular signalling*. 2011 Oct;23(10):1534-45.
55. Hales KG. The machinery of mitochondrial fusion, division, and distribution, and emerging connections to apoptosis. *Mitochondrion*. 2004 Aug;4(4):285-308.
56. Kuzmicic J, Del Campo A, Lopez-Crisosto C, Morales PE, Pennanen C, Bravo-Sagua R, et al. [Mitochondrial dynamics: a potential new therapeutic target for heart failure]. *Rev Esp Cardiol*. 2011 Oct;64(10):916-23.
57. Youle RJ, van der Bliek AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science*. 2012 Aug 31;337(6098):1062-5.
58. Huang P, Galloway CA, Yoon Y. Control of mitochondrial morphology through differential interactions of mitochondrial fusion and fission proteins. *PloS one*. 2011;6(5):e20655.
59. Bossy-Wetzel E, Barsoum MJ, Godzik A, Schwarzenbacher R, Lipton SA. Mitochondrial fission in apoptosis, neurodegeneration and aging. *Curr Opin Cell Biol*. 2003 Dec;15(6):706-16.

60. Chen H, Chan DC. Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. *Human molecular genetics*. 2005 Oct 15;14 Spec No. 2:R283-9.
61. Lemasters JJ. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation research*. 2005 Spring;8(1):3-5.
62. Ong SB, Hausenloy DJ. Mitochondrial morphology and cardiovascular disease. *Cardiovascular research*. 2010 Oct 1;88(1):16-29.
63. Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nature reviews Cancer*. 2011 May;11(5):325-37.
64. Schulze A, Harris AL. How cancer metabolism is tuned for proliferation and vulnerable to disruption. *Nature*. 2012 Nov 15;491(7424):364-73.
65. Pavlova NN, Thompson CB. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell metabolism*. 2016 Jan 12;23(1):27-47.
66. Almuhaideb A, Papathanasiou N, Bomanji J. 18F-FDG PET/CT imaging in oncology. *Ann Saudi Med*. 2011 Jan-Feb;31(1):3-13.
67. Eagle H. The minimum vitamin requirements of the L and HeLa cells in tissue culture, the production of specific vitamin deficiencies, and their cure. *J Exp Med*. 1955 Nov 1;102(5):595-600.
68. Thompson CB. Rethinking the regulation of cellular metabolism. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 2011;76:23-9.
69. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70.
70. Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, Gonzalez-Baron M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev*. 2004 Apr;30(2):193-204.
71. Yang W, Lu Z. Regulation and function of pyruvate kinase M2 in cancer. *Cancer letters*. 2013 Oct 10;339(2):153-8.
72. DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E, Nissim I, Yudkoff M, Wehrli S, et al. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007 Dec 4;104(49):19345-50.
73. Sellers K, Fox MP, Bousamra M, 2nd, Slone SP, Higashi RM, Miller DM, et al. Pyruvate carboxylase is critical for non-small-cell lung cancer proliferation. *The Journal of clinical investigation*. 2015 Feb;125(2):687-98.
74. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009 May 22;324(5930):1029-33.
75. Moreno-Sanchez R, Rodriguez-Enriquez S, Marin-Hernandez A, Saavedra E. Energy metabolism in tumor cells. *The FEBS journal*. 2007 Mar;274(6):1393-418.
76. Rodriguez-Enriquez S, Juarez O, Rodriguez-Zavala JS, Moreno-Sanchez R. Multisite control of the Crabtree effect in ascites hepatoma cells. *European journal of biochemistry / FEBS*. 2001 Apr;268(8):2512-9.
77. Viale A, Pettazzoni P, Lyssiotis CA, Ying H, Sanchez N, Marchesini M, et al. Oncogene ablation-resistant pancreatic cancer cells depend on mitochondrial function. *Nature*. 2014 Oct 30;514(7524):628-32.
78. Pavlides S, Whitaker-Menezes D, Castello-Cros R, Flomenberg N, Witkiewicz AK, Frank PG, et al. The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell cycle*. 2009 Dec;8(23):3984-4001.
79. Samudio I, Fiegl M, Andreeff M. Mitochondrial uncoupling and the Warburg effect: molecular basis for the reprogramming of cancer cell metabolism. *Cancer research*. 2009 Mar 15;69(6):2163-6.
80. Katada S, Imhof A, Sassone-Corsi P. Connecting threads: epigenetics and metabolism. *Cell*. 2012 Jan 20;148(1-2):24-8.

81. Cai L, Sutter BM, Li B, Tu BP. Acetyl-CoA induces cell growth and proliferation by promoting the acetylation of histones at growth genes. *Molecular cell*. 2011 May 20;42(4):426-37.
82. Chiang EP, Wang YC, Chen WW, Tang FY. Effects of insulin and glucose on cellular metabolic fluxes in homocysteine transsulfuration, remethylation, S-adenosylmethionine synthesis, and global deoxyribonucleic acid methylation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2009 Mar;94(3):1017-25.
83. Hino S, Sakamoto A, Nagaoka K, Anan K, Wang Y, Mimasu S, et al. FAD-dependent lysine-specific demethylase-1 regulates cellular energy expenditure. *Nature communications*. 2012;3:758.
84. Galluzzi L, Kepp O, Vander Heiden MG, Kroemer G. Metabolic targets for cancer therapy. *Nature reviews Drug discovery*. 2013 Nov;12(11):829-46.
85. Vander Heiden MG. Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. *Nature reviews Drug discovery*. 2011 Sep;10(9):671-84.
86. Calle EE, Thun MJ. Obesity and cancer. *Oncogene*. 2004 Aug 23;23(38):6365-78.
87. Cleary MP, Maihle NJ. The role of body mass index in the relative risk of developing premenopausal versus postmenopausal breast cancer. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine*. 1997 Oct;216(1):28-43.
88. Porter GA, Inglis KM, Wood LA, Veugelers PJ. Effect of obesity on presentation of breast cancer. *Annals of surgical oncology*. 2006 Mar;13(3):327-32.
89. Toniolo PG, Levitz M, Zeleniuch-Jacquotte A, Banerjee S, Koenig KL, Shore RE, et al. A prospective study of endogenous estrogens and breast cancer in postmenopausal women. *Journal of the National Cancer Institute*. 1995 Feb 1;87(3):190-7.
90. Makki K, Froguel P, Wolowczuk I. Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines. *ISRN inflammation*. 2013 Dec 22;2013:139239.
91. Choe SS, Huh JY, Hwang IJ, Kim JI, Kim JB. Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Frontiers in endocrinology*. 2016;7:30.
92. MacDougald OA, Burant CF. The rapidly expanding family of adipokines. *Cell metabolism*. 2007 Sep;6(3):159-61.
93. Bjorbaek C, Kahn BB. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent progress in hormone research*. 2004;59:305-31.
94. Ahima RS, Flier JS. Leptin. *Annual review of physiology*. 2000;62:413-37.
95. Sweeney G. Leptin signalling. *Cellular signalling*. 2002 Aug;14(8):655-63.
96. Cohen MM, Jr. Role of leptin in regulating appetite, neuroendocrine function, and bone remodeling. *American journal of medical genetics Part A*. 2006 Mar 1;140(5):515-24.
97. Grossmann ME, Cleary MP. The balance between leptin and adiponectin in the control of carcinogenesis - focus on mammary tumorigenesis. *Biochimie*. 2012 Oct;94(10):2164-71.
98. Hu X, Juneja SC, Maihle NJ, Cleary MP. Leptin--a growth factor in normal and malignant breast cells and for normal mammary gland development. *Journal of the National Cancer Institute*. 2002 Nov 20;94(22):1704-11.
99. Cirillo D, Rachiglio AM, la Montagna R, Giordano A, Normanno N. Leptin signaling in breast cancer: an overview. *Journal of cellular biochemistry*. 2008 Nov 1;105(4):956-64.
100. Cleary MP, Juneja SC, Phillips FC, Hu X, Grande JP, Maihle NJ. Leptin receptor-deficient MMTV-TGF-alpha/Lepr(db)Lepr(db) female mice do not develop oncogene-induced mammary tumors. *Experimental biology and medicine*. 2004 Feb;229(2):182-93.
101. Cleary MP, Phillips FC, Getzin SC, Jacobson TL, Jacobson MK, Christensen TA, et al. Genetically obese MMTV-TGF-alpha/Lep(ob)Lep(ob) female mice do not develop mammary tumors. *Breast cancer research and treatment*. 2003 Feb;77(3):205-15.

102. Ishikawa M, Kitayama J, Nagawa H. Enhanced expression of leptin and leptin receptor (OB-R) in human breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004 Jul 1;10(13):4325-31.
103. Miyoshi Y, Funahashi T, Tanaka S, Taguchi T, Tamaki Y, Shimomura I, et al. High expression of leptin receptor mRNA in breast cancer tissue predicts poor prognosis for patients with high, but not low, serum leptin levels. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2006 Mar 15;118(6):1414-9.
104. Valle A, Sastre-Serra J, Oliver J, Roca P. Chronic leptin treatment sensitizes MCF-7 breast cancer cells to estrogen. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2011;28(5):823-32.
105. Neville MC, McFadden TB, Forsyth I. Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 2002 Jan;7(1):49-66.
106. Tanaka T, Hidaka S, Masuzaki H, Yasue S, Minokoshi Y, Ebihara K, et al. Skeletal muscle AMP-activated protein kinase phosphorylation parallels metabolic phenotype in leptin transgenic mice under dietary modification. *Diabetes*. 2005 Aug;54(8):2365-74.
107. Huang W, Dedousis N, Bhatt BA, O'Doherty RM. Impaired activation of phosphatidylinositol 3-kinase by leptin is a novel mechanism of hepatic leptin resistance in diet-induced obesity. *The Journal of biological chemistry*. 2004 May 21;279(21):21695-700.
108. Ceddia RB. Direct metabolic regulation in skeletal muscle and fat tissue by leptin: implications for glucose and fatty acids homeostasis. *International journal of obesity*. 2005 Oct;29(10):1175-83.
109. Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Muller C, Carling D, et al. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature*. 2002 Jan 17;415(6869):339-43.
110. Janovska A, Hatzinikolas G, Staikopoulos V, Mclnerney J, Mano M, Wittert GA. AMPK and ACC phosphorylation: effect of leptin, muscle fibre type and obesity. *Molecular and cellular endocrinology*. 2008 Mar 12;284(1-2):1-10.
111. Dixon RA. Natural products and plant disease resistance. *Nature*. 2001 Jun 14;411(6839):843-7.
112. Lewandowska H, Kalinowska M, Lewandowski W, Stepkowski TM, Brzoska K. The role of natural polyphenols in cell signaling and cytoprotection against cancer development. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2015 Nov 24;32:1-19.
113. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2009 Nov-Dec;2(5):270-8.
114. Yang T, Wang L, Zhu M, Zhang L, Yan L. Properties and molecular mechanisms of resveratrol: a review. *Die Pharmazie*. 2015 Aug;70(8):501-6.
115. Arts IC, Hollman PC. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *The American journal of clinical nutrition*. 2005 Jan;81(1 Suppl):317S-25S.
116. Day AJ, Williamson G. Biomarkers for exposure to dietary flavonoids: a review of the current evidence for identification of quercetin glycosides in plasma. *The British journal of nutrition*. 2001 Aug;86 Suppl 1:S105-10.
117. Setchell KD, Faughnan MS, Avades T, Zimmer-Nechemias L, Brown NM, Wolfe BE, et al. Comparing the pharmacokinetics of daidzein and genistein with the use of ¹³C-labeled tracers in premenopausal women. *The American journal of clinical nutrition*. 2003 Feb;77(2):411-9.
118. Varoni EM, Lo Faro AF, Sharifi-Rad J, Iriti M. Anticancer Molecular Mechanisms of Resveratrol. *Frontiers in nutrition*. 2016;3:8.
119. Aluyen JK, Ton QN, Tran T, Yang AE, Gottlieb HB, Bellanger RA. Resveratrol: potential as anticancer agent. *Journal of dietary supplements*. 2012 Mar;9(1):45-56.

120. Juan ME, Alfaras I, Planas JM. Colorectal cancer chemoprevention by trans-resveratrol. *Pharmacological research*. 2012 Jun;65(6):584-91.
121. Lee KW, Lee HJ. The roles of polyphenols in cancer chemoprevention. *BioFactors*. 2006;26(2):105-21.
122. Bouayed J, Bohn T. Exogenous antioxidants-Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2010 Jul-Aug;3(4):228-37.
123. Garcia-Lafuente A, Guillamon E, Villares A, Rostagno MA, Martinez JA. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflamm Res*. 2009 Sep;58(9):537-52.
124. Kostelac D, Rechkemmer G, Briviba K. Phytoestrogens modulate binding response of estrogen receptors alpha and beta to the estrogen response element. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2003 Dec 17;51(26):7632-5.
125. Setchell KD, Brown NM, Zhao X, Lindley SL, Heubi JE, King EC, et al. Soy isoflavone phase II metabolism differs between rodents and humans: implications for the effect on breast cancer risk. *The American journal of clinical nutrition*. 2011 Nov;94(5):1284-94.
126. Mileo AM, Miccadei S. Polyphenols as Modulator of Oxidative Stress in Cancer Disease: New Therapeutic Strategies. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2016;2016:6475624.
127. Vanden Berghe W. Epigenetic impact of dietary polyphenols in cancer chemoprevention: lifelong remodeling of our epigenomes. *Pharmacological research*. 2012 Jun;65(6):565-76.
128. Ayissi VB, Ebrahimi A, Schluesener H. Epigenetic effects of natural polyphenols: a focus on SIRT1-mediated mechanisms. *Molecular nutrition & food research*. 2014 Jan;58(1):22-32.
129. McGuinness D, McGuinness DH, McCaul JA, Shiels PG. Sirtuins, bioageing, and cancer. *J Aging Res*. 2011;2011:235754.
130. Dali-Youcef N, Lagouge M, Froelich S, Koehl C, Schoonjans K, Auwerx J. Sirtuins: the 'magnificent seven', function, metabolism and longevity. *Ann Med*. 2007;39(5):335-45.
131. Menzies KJ, Hood DA. The role of SirT1 in muscle mitochondrial turnover. *Mitochondrion*. 2012 Jan;12(1):5-13.
132. Finley LW, Haas W, Desquiret-Dumas V, Wallace DC, Procaccio V, Gygi SP, et al. Succinate dehydrogenase is a direct target of sirtuin 3 deacetylase activity. *PloS one*. 2011;6(8):e23295.
133. Bause AS, Haigis MC. SIRT3 regulation of mitochondrial oxidative stress. *Exp Gerontol*. 2013 Jul;48(7):634-9.
134. Kincaid B, Bossy-Wetzel E. Forever young: SIRT3 a shield against mitochondrial meltdown, aging, and neurodegeneration. *Frontiers in aging neuroscience*. 2013;5:48.
135. Finley LW, Carracedo A, Lee J, Souza A, Egia A, Zhang J, et al. SIRT3 opposes reprogramming of cancer cell metabolism through HIF1alpha destabilization. *Cancer cell*. 2011 Mar 8;19(3):416-28.
136. Chung S, Yao H, Caito S, Hwang JW, Arunachalam G, Rahman I. Regulation of SIRT1 in cellular functions: role of polyphenols. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2010 Sep 1;501(1):79-90.
137. Stevens JF, Page JE. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! *Phytochemistry*. 2004 May;65(10):1317-30.
138. Gerhauser C. Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *European journal of cancer*. 2005 Sep;41(13):1941-54.
139. Colgate EC, Miranda CL, Stevens JF, Bray TM, Ho E. Xanthohumol, a prenylflavonoid derived from hops induces apoptosis and inhibits NF-kappaB activation in prostate epithelial cells. *Cancer letters*. 2007 Feb 8;246(1-2):201-9.

140. Wang Y, Chen Y, Wang J, Chen J, Aggarwal BB, Pang X, et al. Xanthohumol, a prenylated chalcone derived from hops, suppresses cancer cell invasion through inhibiting the expression of CXCR₄ chemokine receptor. *Curr Mol Med*. 2012 Feb;12(2):153-62.
141. Vanhoecke B, Derycke L, Van Marck V, Depypere H, De Keukeleire D, Bracke M. Antiinvasive effect of xanthohumol, a prenylated chalcone present in hops (*Humulus lupulus* L.) and beer. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2005 Dec 20;117(6):889-95.
142. Zanolì P, Zavatti M. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. *J Ethnopharmacol*. 2008 Mar 28;116(3):383-96.
143. Strathmann J, Klimo K, Sauer SW, Okun JG, Prehn JH, Gerhauser C. Xanthohumol-induced transient superoxide anion radical formation triggers cancer cells into apoptosis via a mitochondria-mediated mechanism. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2010 Aug;24(8):2938-50.
144. Festa M, Capasso A, D'Acunto CW, Masullo M, Rossi AG, Pizza C, et al. Xanthohumol induces apoptosis in human malignant glioblastoma cells by increasing reactive oxygen species and activating MAPK pathways. *J Nat Prod*. 2011 Dec 27;74(12):2505-13.
145. Hemachandra LP, Madhubhani P, Chandrasena R, Esala P, Chen SN, Main M, et al. Hops (*Humulus lupulus*) inhibits oxidative estrogen metabolism and estrogen-induced malignant transformation in human mammary epithelial cells (MCF-10A). *Cancer prevention research*. 2012 Jan;5(1):73-81.
146. Berruti A, Tucci M, Mosca A, Vana F, Ardine M, Dogliotti L, et al. Changes in bone mineral density after adjuvant aromatase inhibitors and fracture risk in breast cancer patients. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007 Apr 10;25(11):1455-6.
147. Burns J, Yokota T, Ashihara H, Lean ME, Crozier A. Plant foods and herbal sources of resveratrol. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2002 May 22;50(11):3337-40.
148. Tessitore L, Davit A, Sarotto I, Caderni G. Resveratrol depresses the growth of colorectal aberrant crypt foci by affecting bax and p21(CIP) expression. *Carcinogenesis*. 2000 Aug;21(8):1619-22.
149. de Oliveira MR, Nabavi SF, Manayi A, Daglia M, Hajheydari Z, Nabavi SM. Resveratrol and the mitochondria: From triggering the intrinsic apoptotic pathway to inducing mitochondrial biogenesis, a mechanistic view. *Biochimica et biophysica acta*. 2016 Apr;1860(4):727-45.
150. Kueck A, Pipari AW, Jr., Griffith KA, Tan L, Choi M, Huang J, et al. Resveratrol inhibits glucose metabolism in human ovarian cancer cells. *Gynecologic oncology*. 2007 Dec;107(3):450-7.
151. Gomez LS, Zancan P, Marcondes MC, Ramos-Santos L, Meyer-Fernandes JR, Sola-Penna M, et al. Resveratrol decreases breast cancer cell viability and glucose metabolism by inhibiting 6-phosphofructo-1-kinase. *Biochimie*. 2013 Jun;95(6):1336-43.
152. Borra MT, Smith BC, Denu JM. Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol. *The Journal of biological chemistry*. 2005 Apr 29;280(17):17187-95.
153. Nadal-Serrano M, Sastre-Serra J, Valle A, Roca P, Oliver J. Chronic-leptin attenuates Cisplatin cytotoxicity in MCF-7 breast cancer cell line. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2015;36(1):221-32.
154. Muoio DM, Lynis Dohm G. Peripheral metabolic actions of leptin. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2002 Dec;16(4):653-66.
155. Wallace DC. Mitochondria and cancer. *Nature reviews Cancer*. 2012 Oct;12(10):685-98.
156. Chan DC. Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health. *Annu Rev Genet*. 2012;46:265-87.

157. Zhu J, Wang KZ, Chu CT. After the banquet: mitochondrial biogenesis, mitophagy, and cell survival. *Autophagy*. 2013 Nov 1;9(11):1663-76.
158. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956 Feb 24;123(3191):309-14.
159. Ward PS, Thompson CB. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer cell*. 2012 Mar 20;21(3):297-308.
160. Pons DG, Nadal-Serrano M, Blanquer-Rossello MM, Sastre-Serra J, Oliver J, Roca P. Genistein modulates proliferation and mitochondrial functionality in breast cancer cells depending on ERalpha/ERbeta ratio. *Journal of cellular biochemistry*. 2014 May;115(5):949-58.
161. Nadal-Serrano M, Pons DG, Sastre-Serra J, Blanquer-Rossello Mdel M, Roca P, Oliver J. Genistein modulates oxidative stress in breast cancer cell lines according to ERalpha/ERbeta ratio: effects on mitochondrial functionality, sirtuins, uncoupling protein 2 and antioxidant enzymes. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2013 Sep;45(9):2045-51.
162. Santandreu FM, Valle A, Oliver J, Roca P. Resveratrol potentiates the cytotoxic oxidative stress induced by chemotherapy in human colon cancer cells. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2011;28(2):219-28.
163. Li ZG, Hong T, Shimada Y, Komoto I, Kawabe A, Ding Y, et al. Suppression of N-nitrosomethylbenzylamine (NMBA)-induced esophageal tumorigenesis in F344 rats by resveratrol. *Carcinogenesis*. 2002 Sep;23(9):1531-6.
164. Valdecantos MP, Perez-Matute P, Quintero P, Martinez JA. Vitamin C, resveratrol and lipoic acid actions on isolated rat liver mitochondria: all antioxidants but different. *Redox report : communications in free radical research*. 2010;15(5):207-16.
165. Zheng J, Ramirez VD. Inhibition of mitochondrial proton FoF1-ATPase/ATP synthase by polyphenolic phytochemicals. *British journal of pharmacology*. 2000 Jul;130(5):1115-23.
166. Kim SK, Joe Y, Zheng M, Kim HJ, Yu JK, Cho GJ, et al. Resveratrol induces hepatic mitochondrial biogenesis through the sequential activation of nitric oxide and carbon monoxide production. *Antioxidants & redox signaling*. 2014 Jun 1;20(16):2589-605.
167. Zini R, Morin C, Bertelli A, Bertelli AA, Tillement JP. Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain. *Drugs under experimental and clinical research*. 1999;25(2-3):87-97.
168. Johansson LH, Borg LA. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Analytical biochemistry*. 1988 Oct;174(1):331-6.
169. Quick KL, Hardt JI, Dugan LL. Rapid microplate assay for superoxide scavenging efficiency. *J Neurosci Methods*. 2000 Apr 15;97(2):139-44.
170. Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. *Methods in enzymology*. 1985;113:484-90.
171. Chrzanowska-Lightowlers ZM, Turnbull DM, Lightowlers RN. A microtiter plate assay for cytochrome c oxidase in permeabilized whole cells. *Analytical biochemistry*. 1993 Oct;214(1):45-9.
172. Warren GB, Tipton KF. Pig liver pyruvate carboxylase. The reaction pathway for the carboxylation of pyruvate. *The Biochemical journal*. 1974 May;139(2):311-20.
173. Trinder P. Determination of blood glucose using 4-amino phenazone as oxygen acceptor. *Journal of clinical pathology*. 1969 Mar;22(2):246.
174. Barham D, Trinder P. An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. *The Analyst*. 1972 Feb;97(151):142-5.
175. Artac M, Altundag K. Leptin and breast cancer: an overview. *Medical oncology*. 2012 Sep;29(3):1510-4.
176. Saxena NK, Sharma D, Ding X, Lin S, Marra F, Merlin D, et al. Concomitant activation of the JAK/STAT, PI3K/AKT, and ERK signaling is involved in leptin-mediated promotion of

- invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells. *Cancer research*. 2007 Mar 15;67(6):2497-507.
177. Saxena NK, Vertino PM, Anania FA, Sharma D. leptin-induced growth stimulation of breast cancer cells involves recruitment of histone acetyltransferases and mediator complex to CYCLIN D1 promoter via activation of Stat3. *The Journal of biological chemistry*. 2007 May 4;282(18):13316-25.
 178. Park HK, Ahima RS. Physiology of leptin: energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism. *Metabolism: clinical and experimental*. 2015 Jan;64(1):24-34.
 179. Rosenbaum M, Leibel RL. 20 years of leptin: role of leptin in energy homeostasis in humans. *The Journal of endocrinology*. 2014 Oct;223(1):T83-96.
 180. Perera CN, Chin HG, Duru N, Camarillo IG. Leptin-regulated gene expression in MCF-7 breast cancer cells: mechanistic insights into leptin-regulated mammary tumor growth and progression. *The Journal of endocrinology*. 2008 Nov;199(2):221-33.
 181. Marti A, Novo FJ, Martinez-Anso E, Zaratiegui M, Aguado M, Martinez JA. Leptin gene transfer into muscle increases lipolysis and oxygen consumption in white fat tissue in ob/ob mice. *Biochemical and biophysical research communications*. 1998 May 29;246(3):859-62.
 182. Lee WJ, Kim M, Park HS, Kim HS, Jeon MJ, Oh KS, et al. AMPK activation increases fatty acid oxidation in skeletal muscle by activating PPARalpha and PGC-1. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006 Feb 3;340(1):291-5.
 183. Suzuki A, Okamoto S, Lee S, Saito K, Shiuchi T, Minokoshi Y. Leptin stimulates fatty acid oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene expression in mouse C2C12 myoblasts by changing the subcellular localization of the alpha2 form of AMP-activated protein kinase. *Molecular and cellular biology*. 2007 Jun;27(12):4317-27.
 184. Hu H, Ding X, Yang Y, Zhang H, Li H, Tong S, et al. Changes in glucose-6-phosphate dehydrogenase expression results in altered behavior of HBV-associated liver cancer cells. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2014 Sep 15;307(6):G611-22.
 185. Luo GF, Yu TY, Wen XH, Li Y, Yang GS. Alteration of mitochondrial oxidative capacity during porcine preadipocyte differentiation and in response to leptin. *Molecular and cellular biochemistry*. 2008 Jan;307(1-2):83-91.
 186. Jager S, Handschin C, St-Pierre J, Spiegelman BM. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007 Jul 17;104(29):12017-22.
 187. Hoyer-Hansen M, Bastholm L, Szyniarowski P, Campanella M, Szabadkai G, Farkas T, et al. Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2. *Molecular cell*. 2007 Jan 26;25(2):193-205.
 188. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature cell biology*. 2011 Feb;13(2):132-41.
 189. Trachootham D, Zhou Y, Zhang H, Demizu Y, Chen Z, Pelicano H, et al. Selective killing of oncogenically transformed cells through a ROS-mediated mechanism by beta-phenylethyl isothiocyanate. *Cancer cell*. 2006 Sep;10(3):241-52.
 190. Hu ML. Dietary polyphenols as antioxidants and anticancer agents: more questions than answers. *Chang Gung medical journal*. 2011 Sep-Oct;34(5):449-60.
 191. Drenzek JG, Seiler NL, Jaskula-Sztul R, Rausch MM, Rose SL. Xanthohumol decreases Notch1 expression and cell growth by cell cycle arrest and induction of apoptosis in epithelial ovarian cancer cell lines. *Gynecologic oncology*. 2011 Aug;122(2):396-401.
 192. Zajc I, Filipic M, Lah TT. Xanthohumol induces different cytotoxicity and apoptotic pathways in malignant and normal astrocytes. *Phytotherapy research : PTR*. 2012 Nov;26(11):1709-13.

193. Matsumura A, Ghosh A, Pope GS, Darbre PD. Comparative study of oestrogenic properties of eight phytoestrogens in MCF7 human breast cancer cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2005 Apr;94(5):431-43.
194. Signorelli P, Ghidoni R. Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2005 Aug;16(8):449-66.
195. Gwak H, Haegeman G, Tsang BK, Song YS. Cancer-specific interruption of glucose metabolism by resveratrol is mediated through inhibition of Akt/GLUT1 axis in ovarian cancer cells. *Molecular carcinogenesis*. 2015 Dec;54(12):1529-40.
196. Beauvieux MC, Stephant A, Gin H, Serhan N, Couzigou P, Gallis JL. Resveratrol mainly stimulates the glycolytic ATP synthesis flux and not the mitochondrial one: a saturation transfer NMR study in perfused and isolated rat liver. *Pharmacological research*. 2013 Dec;78:11-7.
197. Rosca MG, Vazquez EJ, Chen Q, Kerner J, Kern TS, Hoppel CL. Oxidation of fatty acids is the source of increased mitochondrial reactive oxygen species production in kidney cortical tubules in early diabetes. *Diabetes*. 2012 Aug;61(8):2074-83.
198. Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2000 Nov;5(5):415-8.

