



**Universitat de les  
Illes Balears**

Facultat de ciències

**Memòria del Treball de Fi de Grau**

# Efectos de la leptina sobre el metabolismo energético de la línea de cáncer de mama MCF-7

Juan Enrique Ramis Zaldívar

**Grau de Bioquímica**

Any acadèmic 2014-15

DNI de l'alumne: 43218450R

Treball tutelat per Adamo Valle Gómez.  
Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la salut.

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

Paraules clau del treball:  
Leptina, càncer de mama, MCF-7, metabolisme energètic.



# Índice

---

1. INTRODUCCIÓN .....	6
1.1 Cáncer de mama .....	6
1.2 Cáncer y obesidad .....	6
1.3 Leptina.....	7
1.3.1 Leptina y cáncer .....	9
1.3.2 Mecanismo molecular en el cáncer .....	9
1.3.3 Cambios metabólicos .....	12
2. Hipótesis.....	14
3. Objetivos .....	14
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	15
4.1 Diseño experimental.....	15
4.2 Cultivo celular .....	15
4.3 Niveles de ATP intracelular .....	15
4.4 Westernblot .....	16
4.5 Actividad piruvato deshidrogenasa .....	17
4.6 Análisis estadístico.....	17
5. RESULTADOS .....	18
6. DISCUSIÓN .....	22
7. CONCLUSIÓN .....	26
8. ABREVIATURAS .....	26
7. BIBLIOGRAFÍA.....	27

## RESUMEN

---

La obesidad es un factor de riesgo de cáncer de mama en mujeres post menopáusicas y se ha relacionado también con tumores más agresivos y con una mala prognosis. La obesidad produce una inflamación crónica del tejido adiposo favoreciendo un microambiente que predispone a la carcinogénesis del tejido mamario y a su progresión debido a la desregulación en la secreción de citoquinas pro inflamatorias, quimioquinas y adipoquinas. La más estudiada hasta ahora es la leptina, cuya señalización activa múltiples vías implicadas en la proliferación, la resistencia a la apoptosis, la adhesión celular, la invasión y la migración. Ya se conocía que las células tumorales muestran una mayor dependencia de la glucólisis para la obtención de energía en detrimento de la fosforilación oxidativa, pero estudios recientes en el grupo de investigación sugirieron que la leptina tiene capacidad para revertir parcialmente el proceso. De este modo, nos planteamos si la leptina tiene un efecto modulador sobre el metabolismo energético de las células cancerígenas; lo que podría repercutir sobre la malignidad y proliferación del tumor y ayudaría a sostener el gasto energético que esto supondría. Los resultados del estudio llevado a cabo sobre la línea celular de cáncer de mama MCF-7 mostraron que la leptina potencia la respiración mitocondrial como fuente de ATP, aumentando principalmente el uso de ácidos grasos como combustible energético, lo que permitiría el uso de la glucosa para la biosíntesis. Esta reprogramación metabólica causada por la leptina puede conferir beneficios para el crecimiento celular y contribuir, junto con otros factores, a un peor pronóstico asociado a la obesidad en el cáncer de mama.

## ABSTRACT

---

Obesity is a risk factor for breast cancer in post-menopausal women and has also been linked to more aggressive tumors and to a poor prognosis. Furthermore, obesity causes chronic inflammation of the adipose tissue, favoring a microenvironment that predisposes breast tissue carcinogenesis and progression due to deregulation in the secretion of proinflammatory cytokines, chemokines and adipokines. The most studied one is leptin, which activates multiple signaling pathways involved in proliferation, resistance to apoptosis, cell adhesion, invasion and migration. It was known that tumor cells showed a greater reliance on glycolysis for energy production and reduced oxidative phosphorylation, but recent studies in the research group suggested that leptin has the capacity to partially reverse the process. Thus, we considered whether leptin has a modulatory effect on the energy metabolism of cancer cells which could impact on the malignancy and tumor proliferation and help to sustain energy costs that this would entail. The results of the study carried out on MCF-7 breast cancer cell line showed that leptin enhanced mitochondrial respiration as ATP source, mainly by increasing the use of fatty acids as energy fuel which would allow the use of glucose for biosynthesis. This metabolic reprogramming caused by leptin may confer benefits for cell growth and contribute, along with other factors, to a worse prognosis associated with obesity in breast cancer.

# 1. INTRODUCCIÓN

---

## 1.1 Cáncer de mama

El cáncer de mama es el carcinoma que se forma en los tejidos de la mama. Hay diferentes tipos de cánceres de mama, siendo el más común de ellos el carcinoma ductal, que se inicia en el revestimiento de los conductos galactóforos. El denominado carcinoma lobulillar en cambio empieza en los lobulillos o también denominadas glándulas mamarias <sup>1</sup>.

Desde 1990 se observa una tendencia favorable en cuanto al pronóstico del cáncer de mama debido a la mejora en los tratamientos terapéuticos y en su detección. Se ha previsto que en 2015, la mortalidad debida a cáncer de mama en Europa disminuya un 10.2% en comparación con 2009. Aun así sigue siendo la principal causa de muerte por cáncer en mujeres europeas aunque se prevé que pronto pasará a serlo el cáncer de pulmón <sup>2</sup>.

## 1.2 Cáncer y obesidad

Otro de los problemas de salud más graves que amenaza nuestra sociedad es la obesidad que se define como la acumulación excesiva de grasa debida a factores genéticos, de comportamiento, socioeconómicos y ambientales <sup>3</sup>. En el año 2013 se describió que aproximadamente un tercio de la población mundial estaba obesa y que seguía una tendencia ascendente <sup>4</sup>. La preocupación por el incremento se debe el riesgo que corren las personas obesas a padecer enfermedades graves como enfermedades crónicas del corazón, diabetes, depresión y algunos cánceres, además de causar muerte prematura <sup>3</sup>.

En relación con el cáncer de mama, se ha visto que la obesidad es un factor de riesgo en mujeres post menopáusicas. Además se ha relacionado con tumores con un fenotipo más agresivo y con una mala prognosis independientemente del estado menopáusico <sup>5 6</sup>.

Tras la menopausia, el mecanismo que explica mejor la relación que hay entre obesidad y el riesgo a padecer la enfermedad es la elevada producción de estrógenos por parte de los adipocitos debido a un incremento en la actividad aromatasa <sup>7</sup>. Hay que recordar que la obesidad también ha sido asociada a fenotipos agresivos de tumores y con su mala prognosis independientemente del estado menopáusico o de la presencia de receptores de estrógenos. Estas evidencias sugieren que hay otro mecanismo relacionando la obesidad y el cáncer que sería la inflamación crónica producida en el tejido adiposo debido a la obesidad <sup>6</sup>. Esta

inflamación se ha visto asociada con enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2 y algunos cánceres <sup>5</sup>.

En humanos, la obesidad causa una inflamación subclínica en el tejido adiposo visceral y subcutáneo que se caracteriza por adipocitos necróticos rodeados de macrófagos formando las Crown-like structures (CLS) <sup>7</sup>. Estos cambios patológicos podrían ser los causantes de la inducción de aromatasa en el tejido local y de la capacidad agresiva y proliferativa del tumor a través de mecanismos que implican citoquinas <sup>5</sup>.

Es por ello que la inflamación que se produce en el tejido adiposo de la mama se considera un componente que favorece un microambiente que predispone la carcinogénesis del tejido mamario y su progresión <sup>5</sup>. Esto es debido a una desregulación en la secreción de citoquinas pro inflamatorias, quimioquinas y adipoquinas por parte del tejido graso en crecimiento y de las células inflamatorias que podrían contribuir de manera relevante en el inicio y progresión del cáncer <sup>8</sup>.

Las adipoquinas son proteínas sintetizadas por las células del tejido adiposo blanco, incluyéndose preadipocitos, adipocitos maduros y macrófagos asociados. Las dos más importantes y que se han relacionado con el cáncer de mama son la leptina y la adiponectina <sup>5</sup>.

### 1.3 Leptina

La leptina, producto del gen conocido como gen obeso (ob o LEP), es una adipoquina de 16 kDa que fue reconocida por primera vez en ratones como reguladora del peso corporal y del balance energético a nivel del hipotálamo <sup>9</sup>.

En humanos, la leptina es codificada por el gen LEP en el cromosoma 7 y actúa como un importante regulador del balance energético incrementando el gasto energético; además de reducir la ingesta de comida a nivel hipotalámico gracias a su interacción con un sistema de neuropéptidos. Al unirse a su receptor hipotalámico, la leptina activa una cascada de señalización que acaba provocando la inhibición de varios péptidos orexigénicos y la activación otros anoréxicos. Además, la leptina parece tener un efecto periférico sobre el metabolismo energético, alterando el flujo de sustratos <sup>10</sup>. También se ha visto su actuación durante el desarrollo fetal, la maduración sexual, la lactancia, la hematopoyesis y en la respuesta inmunitaria <sup>11</sup>.

Estudios iniciales indicaron que la expresión de la leptina solo se daba en el tejido adiposo pero su expresión no solo se limita a este tejido sino que también se incluyen otros como la placenta, mucosa gástrica fúndica, músculo esquelético y el epitelio mamario <sup>11</sup>.

En humanos, la concentración de leptina en plasma se ve influenciada por la masa del tejido adiposo. Se ha visto una fuerte correlación entre los niveles circulantes de leptina y el porcentaje de grasa corporal y una menor correlación con el índice de masa corporal <sup>11 12</sup>. Esto se evidencia por el incremento de mRNA ob en adipocitos y el aumento de leptina en suero en humanos obesos y en otros mamíferos, lo que sugiere que las personas obesas son más insensibles a la producción de leptina endógena <sup>13</sup>.

Los niveles circulantes de leptina son mayores en mujeres que en hombres incluso después de ajustarlo al total de masa grasa corporal. Esto parece ser debido a la diferente regulación por parte de las hormonas sexuales, de forma que los estrógenos aumentan su síntesis mientras que la testosterona la disminuye <sup>12</sup>.

La síntesis de leptina por los adipocitos se ve influenciada por diferentes factores, siendo los más importantes la insulina, el factor de necrosis tumoral alfa, los glucocorticoides, las hormonas sexuales, las prostaglandinas y las citoquinas pro-inflamatorias. De manera importante muchos de estos factores se han visto relacionados con el proceso de tumoración <sup>12</sup>.

Para que la leptina pueda llevar a cabo su acción biológica debe unirse a su receptor específico de membrana. El receptor de leptina (Ob-R) se incluye dentro de la superfamilia de receptores de citoquinas de clase I. Hasta ahora se han reportado seis isoformas diferentes generadas a través de splicing alternativo. Todas ellas tienen un dominio extracelular de unión al ligando muy similar en el extremo amino-terminal pero difieren en el dominio intracelular del extremo carboxi-terminal. Solamente la isoforma larga (Ob-Ra) tiene el dominio intracelular necesario para activar la señalización celular <sup>14 15</sup>.

Este tipo de receptores son internalizados una vez se les ha unido el ligando gracias a la formación de vesículas de clatrina por lo que una vez internalizado y dada la señalización, el ligando es degradado y se recicla el receptor devolviéndolo a la superficie <sup>15</sup>.

El receptor de leptina se expresa en varias regiones del sistema nervioso central incluido el hipotálamo, así como en numerosos tejidos periféricos como el hígado, los riñones, el tejido adiposo, los ovarios y el tracto gastrointestinal <sup>10</sup>.



### 1.3.1 Leptina y cáncer

Hace unos años había cierta controversia en cuanto a si existe una relación directa entre la concentración de leptina en sangre y el riesgo a padecer cáncer de mama debido a los diferentes resultados obtenidos por diferentes autores <sup>14</sup>. Gracias a la realización de un meta-análisis de 23 estudios se pudo evidenciar que niveles altos de leptina se correspondían con pacientes de cáncer de mama <sup>16</sup>. Es por esto que niveles altos de leptina se relacionan con el riesgo a padecer cáncer de mama.

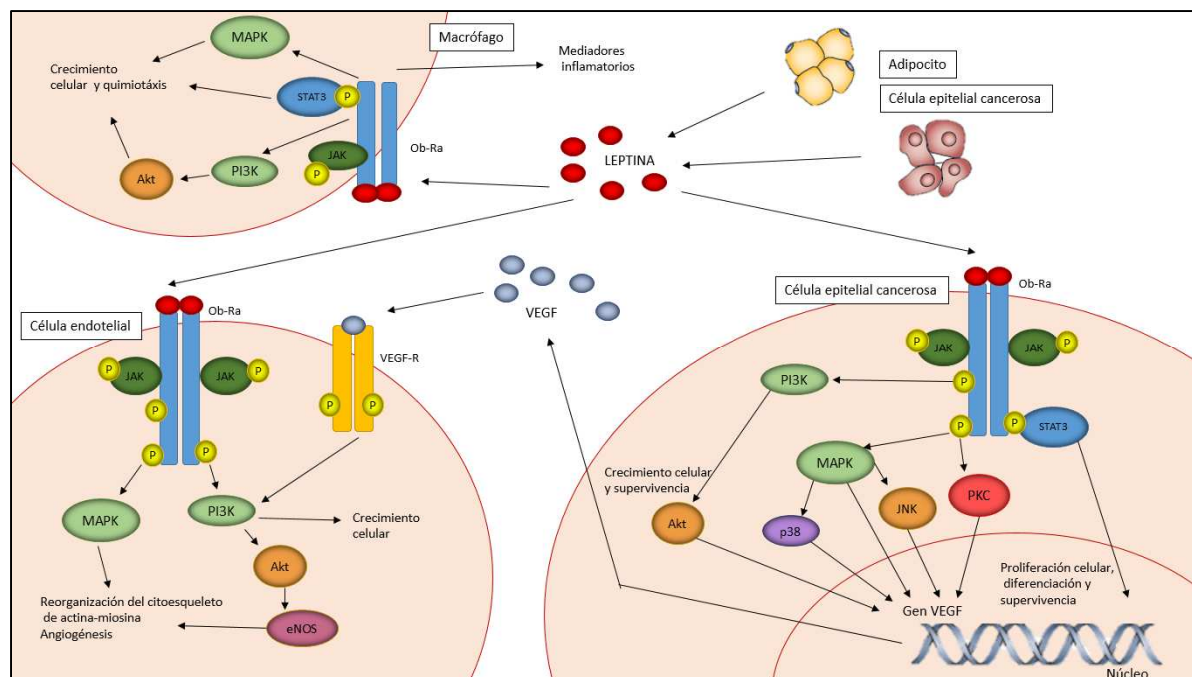
Se debe tener presente que los niveles plasmáticos de leptina no reflejan los altos niveles que realmente se encuentran en el núcleo del cáncer producidos por los adipocitos de la glándula mamaria, ya que no se tienen en cuenta ni las interacciones paracrinas con las células epiteliales mamarias ni con la producción de leptina por parte de las células cancerosas debido al efecto autocrino <sup>5</sup>.

Se ha visto que tanto la leptina como su receptor Ob-Ra se sobreexpresan en células de carcinomas mamarios primarios y malignos. Esta sobreexpresión puede deberse a diferentes estímulos relacionados con la obesidad como son el factor de crecimiento insulínico de tipo 1, estradiol <sup>17</sup> o el factor de inducción de hipoxia 1 debido a las condiciones de hipoxia <sup>18 12</sup>.

### 1.3.2 Mecanismo molecular en el cáncer

La patogenia del cáncer de mama es dependiente de las interacciones que se dan entre las células malignas y los diferentes componentes del microambiente del tejido mamario, entre los cuales se encuentran adipocitos, fibroblastos, macrófagos y células endoteliales, los cuales tendrán una gran influencia sobre el crecimiento y malignidad del cáncer <sup>5</sup>. En este caso, la leptina juega un papel importante, llevando a cabo una señalización endocrina, paracrína y autocrína entre los diferentes componentes del microambiente del carcinoma mamario <sup>19</sup>

Como se observa en la Imagen 1, la leptina, secretada por los adipocitos del tejido mamario tiene un efecto paracrino sobre las células epiteliales cancerosas. Estas células cancerosas también son capaces de secretar leptina por lo que ejercen un efecto autocrino. En las células epiteliales cancerosas, la unión de la leptina a su receptor activa numerosas vías de señalización como las vías de MAPK, la de PI3K-Akt y la JAK2-STAT3. La activación de estas vías incluye la activación del factor NF-κB y su translocación al núcleo, provocando la transcripción de genes que promoverán la supervivencia y la proliferación celular independientemente de la presencia del receptor de estrógenos (RE) <sup>5 20</sup>. Es por ello que la leptina actuaría como agente mitótico y antiapoptótico <sup>12</sup>.



### Imagen 1. Microambiente tumoral inducido por la leptina:

Señalización de la leptina. Tanto los adipocitos como las células epiteliales del cáncer de mama secretan leptina al medio. La unión de la leptina a su receptor en células epiteliales cancerosas provoca la activación de las vías MAPK, PI3K-Akt y JAK2-STAT3 que promueven la supervivencia y proliferación celular. A la vez, también se activan las vías MAPK, PI3K, PKC, JNK y p38 MAPK, lo que conduce a la transcripción de VEGF que tiene un efecto paracrina al unirse al su receptor VEGF-R sobre las células endoteliales periféricas, estimulando la migración celular. Además, la leptina actúa sobre los receptores de las células endoteliales activando las vías MAPK y PI3K-AKT-eNOS. Estas vías acaban estimulando la reorganización del citoesqueleto de actina-miosina de estas células provocando su migración y favoreciendo la angiogénesis. Por último, en macrófagos también se produce la señalización por leptina desencadenando la activación de las vías PI3K-Akt, JAK/STAT y MAPK, lo que media la migración celular, la quimiotaxis y la producción de mediadores inflamatorios. Imagen producida por el autor.

Además, la leptina ejerce un efecto angiogénico y estimulante de la neovascularización, lo que contribuye a la proliferación y crecimiento del cáncer. Esto es así, en cuanto a que la leptina actúa sobre los receptores de las células endoteliales activando las vías de señalización MAPK y PI3K-AKT-eNOS. Estas vías acaban estimulando la reorganización del citoesqueleto de actina-miosina de estas células provocando su migración y favoreciendo la angiogénesis<sup>20</sup>.

Cabe destacar que la acción de la leptina sobre las células epiteliales cancerosas conlleva la activación de las vías MAPK, PI3K, PKC, JNK y p38 MAPK, provocando la transcripción del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) el cual tiene un efecto paracrina

sobre las células endoteliales periféricas, estimulando también la migración celular de estas células y la angiogénesis debido a la activación de las vías PI3K- AKT-eNOS<sup>5 20</sup>.

Además, la leptina tiene un efecto como agente quimioatrayente para monocitos y macrófagos en el cáncer de mama. Altos niveles de leptina en el tejido mamario se han correlacionado con acumulaciones de macrófagos. Esto es debido a que tanto monocitos como macrófagos presentan el receptor Ob-Ra. Su activación desencadena la vía de señalización PI3K, JAK/STAT y MAPK, lo que media la migración celular y la quimiotaxis<sup>21</sup>. En macrófagos, la leptina también induce la producción de mediadores inflamatorios lo que dará lugar a un microambiente que favorece la proliferación del tumor<sup>5 20</sup>.

Asimismo, la leptina se cruza con la señalización de los estrógenos lo que contribuye al cáncer de mama<sup>22</sup>. Los estrógenos tienen un papel esencial durante el normal desarrollo de la glándula mamaria pero también se ha asociado con el potencial riesgo a padecer cáncer de mama<sup>23</sup>. Se ha visto que el estradiol es capaz de inducir la expresión de leptina y de su receptor en células MCF-7 ER-positivas<sup>20 22</sup>.

Se ha visto que, en fibroblastos y células del epitelio mamario cancerosas, una de las respuestas de la leptina al actuar con su receptor es amplificar la señalización por estrógenos a consecuencia del aumento de la expresión de la enzima aromatasa y del receptor de estrógenos. La leptina también tiene la capacidad de transactivar el receptor de estrógenos ER sin la presencia de su ligando, como se ha podido observar en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 ER-positivas<sup>24</sup>.

La aromatasa es una enzima encargada de sintetizar estrona, precursor del estradiol. Antes de la menopausia, el tejido que se encarga de sintetizar los estrógenos es el ovárico pero después de la menopausia, los estrógenos pasan a ser sintetizados, casi de manera exclusiva, por los pre-adipocitos del tejido adiposo. Tras la menopausia, se ve aumentada la actividad de esta enzima, lo que junto a un aumento del peso hace que los niveles de estrógenos se encuentren elevados<sup>5 20</sup>.

Esta elevación de estrógenos en sangre que se produce tras la menopausia incrementa el riesgo de padecer cáncer de mama en mujeres postmenopáusicas. Esta afirmación se ha visto que solo es válida para los carcinomas mamarios positivos para el receptor de estrógenos, que son el 80% de los cánceres de mama en mujeres post menopáusicas<sup>5</sup>.

Los fibroblastos que envuelven el núcleo del cáncer poseen una elevada actividad aromataasa, de manera que se estimula la formación de estrógenos por parte de estas células que actuarán de manera paracrína sobre las células del cáncer ER-positivas. Asimismo se ha observado que algunas de las propias células cancerosas tienen actividad aromataasa por lo que ellas mismas pueden estimularse de manera autocrína <sup>19</sup>

Por todo ello el aumento local de la producción de estrógenos debido a la señalización de la leptina también contribuye a moldear el microambiente del cáncer de mama <sup>20</sup>.

### 1.3.3 Cambios metabólicos

La alteración del metabolismo es uno de los marcadores relacionados con el cáncer. El trabajo de Warburg y su equipo en 1920 mostró que las células tumorales metabolizan la glucosa a lactato a pesar de la presencia de oxígeno, fenómeno que denominó efecto Warburg o glucólisis aeróbica <sup>25</sup>.

Este metabolismo alterado confiere a la célula tumoral una ventaja selectiva para la supervivencia y proliferación en el microambiente tumoral. En comparación con las células normales, las células cancerígenas incrementan la captación de glucosa y la vía de glucólisis forjando un mayor consumo de glucosa. Esto genera intermediarios que sirven como sustratos para las vías anabólicas que son necesarias para la biosíntesis de proteínas, ácidos grasos y ácidos nucleicos con el fin de proliferar más rápido <sup>26 27 28</sup>. Además, la mayor parte del piruvato formado por la glucólisis es metabolizado hacia lactato en lugar de ser dirigido a la mitocondria para su oxidación incluso en presencia de oxígeno <sup>26 27</sup>.

La limitación de la oxidación de la glucosa y la metabolización hacia lactato puede deberse a que durante la formación de lactato se produce el reciclaje de  $\text{NAD}^+$ , el cual es necesario para continuar con la glucólisis. A pesar de esto, la restitución de  $\text{NAD}^+$  por la fermentación láctica no llega a ser suficiente para garantizar la glucólisis debido a que una parte de la glucosa se dirige hacia vías anabólicas <sup>27</sup>.

También se habla de que la glucólisis produce menos especies reactivas de oxígeno (ROS) por lo que se previene el daño en el genoma de las células tumorales, dando lugar a la resistencia a la apoptosis <sup>27</sup>.

Debido a la expansión del tumor se compromete el suministro de sangre a la zona cancerígena dando un ambiente de hipoxia que promueve, a través del factor de hipoxia HIF,

iniciar un programa de transcripción para evitar este tipo de estrés; por lo que se desplaza el metabolismo celular hacia la glucólisis inhibiendo el metabolismo mitocondrial <sup>28</sup>.

Esta primera suposición de una respiración mitocondrial alterada fue refutada gracias a los recientes hallazgos que evidencian la presencia de mitocondrias funcionales en células tumorales <sup>29</sup>. De hecho, se ha visto que algunos tumores obtienen energía de ambas vías o incluso la obtienen mayoritariamente de la fosforilación oxidativa <sup>30</sup>.

Recientemente, se ha descrito en el cáncer de mama humano que la glucólisis aeróbica en realidad tiene lugar en los fibroblastos asociados a tumores, y no en las células epiteliales cancerosas <sup>31 32 33</sup>. Esta nueva hipótesis, denominada como "El efecto Warburg Reverso", propone que las células epiteliales cancerosas inducen el efecto Warburg a los fibroblastos cercanos. De esta manera estos fibroblastos asociados a las células cancerosas adoptan la glucólisis aeróbica produciendo metabolitos de alta energía (tales como lactato y piruvato), que luego son transferidos a las células epiteliales cancerosas adyacentes, que están experimentando el metabolismo mitocondrial oxidativo <sup>33</sup>. La inducción del efecto Warburg sobre los fibroblastos promovería la formación de un microambiente rico en energía, facilitando de esta manera el crecimiento del tumor y la angiogénesis.

Como se ha mencionado anteriormente, la señalización de leptina conduce a la activación de múltiples vías implicadas en la proliferación, la resistencia a la apoptosis, la adhesión celular, la invasión y la migración en el cáncer de mama <sup>5 20</sup>. A pesar de todos estos conocimientos, poco se sabe sobre los efectos de la leptina en el metabolismo del cáncer de mama. En otros tejidos tales como el músculo esquelético y el tejido adiposo, la unión de leptina a su receptor promueve la disipación de energía y evita la acumulación de ácidos grasos mediante el aumento de la oxidación de estos <sup>34 35</sup>.

Teniendo en cuenta que la leptina tiene la capacidad de influir en el metabolismo celular y la importancia de las vías energéticas y anabólicas para apoyar el crecimiento celular rápido, un estudio más completo de los efectos de esta adipocina sobre el metabolismo de las células del cáncer epitelial de mama podría ayudar a explicar mejor la asociación entre la obesidad y el mal pronóstico en el cáncer de mama.

## 2. Hipótesis

---

Teniendo en cuenta que:

1. Las células tumorales muestran una mayor dependencia de la glucólisis para la obtención de energía en detrimento de la fosforilación oxidativa.
2. Estudios recientes en el grupo de investigación sugieren que la leptina tiene capacidad para revertir parcialmente el proceso.
3. La leptina favorece la proliferación de células tumorales de mama, lo que supone un mal pronóstico.

Nos planteamos que la leptina tiene un efecto modulador sobre el metabolismo energético. Probablemente, esto podría repercutir sobre la malignidad y proliferación del tumor y ayudaría a sostener el gasto energético que esto supondría.

## 3. Objetivos

---

Los principales objetivos de este proyecto son:

1. Evaluar el efecto de la leptina sobre las diferentes rutas de obtención de energía de la célula (glucólisis y fosforilación oxidativa).
2. Determinar si la leptina provoca cambios en la preferencia por los combustibles metabólicos (glucosa, aminoácidos y ácidos grasos).
3. Analizar los niveles y la actividad de enzimas clave del metabolismo energético.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 4.1 Diseño experimental

Para comprobar el efecto de la leptina sobre el metabolismo energético de las células tumorales de mama se trataron células de la línea MCF-7 con leptina y se midieron los niveles de ATP tras aplicar inhibidores de la glucólisis y la fosforilación oxidativa.

Para analizar la preferencia por los distintos combustibles metabólicos, se realizó un ensayo similar al anterior midiendo los niveles de ATP en respuesta a una inhibición de la glucólisis combinada con deprivación de aminoácidos o inhibición de la  $\beta$ -oxidación.

A raíz de los resultados obtenidos, se determinaron los niveles de proteína y actividad de enzimas clave en el metabolismo energético.

### 4.2 Cultivo celular

Para el estudio se usó la línea celular MCF-7 de adenocarcinoma de tejido mamario de *Homo sapiens* de American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, EE.UU.) y se cultivaron en DMEM de alta concentración de glucosa, sin rojo fenol, suplementado con 10% FBS, tratado con carbón vegetal y 1% de antibióticos (penicilina y estreptomycin) a 37 ° C y al 5% de CO<sub>2</sub>. Una vez los cultivos alcanzaron el 80% de confluencia las células fueron tratadas proporcionando un nuevo medio fresco suplementado con 100 ng/ml de leptina o sin suplementar (células control) durante 24 horas.

### 4.3 Niveles de ATP intracelular

Las células MCF-7 fueron sembradas en placas de 96 pocillos, de manera que hubiera 8.000 células por pocillo, y se cultivaron durante 24 horas con tratamiento de leptina 100ng/ml o sin tratamiento. Pasadas 24 horas se realizaron los tratamientos con 2-deoxiglucosa 20mM, oligomicina 1uM o con el vehículo (0,01% DMSO) durante 30 min. Para la evaluación de la capacidad oxidativa de ácidos grasos de las células se preincubaron con 50  $\mu$ M de etomoxir durante 30 minutos antes de la adición de 2-deoxiglucosa. Para el experimento de privación de aminoácidos, se le cambió el tampón a las células por el tampón de Krebs-Ringer (145 mM NaCl; 4,86 mM KCl; 0,54 mM CaCl<sub>2</sub>; 1,22 mM MgSO<sub>4</sub>; 5,7 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 4,5 g/L glucosa y 10% charcoal-stripped FBS) 30 min antes de añadir 20 mM de 2-deoxiglucosa.

Los niveles de ATP se midieron utilizando el kit ApoSensor™ Cell Viability Assay (BioVision), basado en la acción del enzima luciferasa para catalizar la formación de luz a partir de ATP y luciferina, la cual puede ser medida usando un luminómetro (Bio-Tek).

Para la normalización de los datos, se determinó el número de células en pocillos tratados con el método de Cristal Violeta. De manera resumida, se añadieron 20 µl de solución de cristal violeta (0,5% de cristal violeta en ácido acético al 30%) a cada pocillo y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente. La placa se lavó dos veces con agua destilada y tinte solubilizado con 100 µl de metanol y se agitó durante 1 min. Finalmente, se midió la absorbancia a 570 nm utilizando un lector de microplacas (Power Wave XS, Bio-Tek).

## 4.4 Westernblot

Las células MCF-7 fueron sembradas en placas de 10cm y fueron tratadas con leptina 100ng/ml o sin tratamiento durante 24 horas. Se hizo un lavado con Phosphate buffered saline solution (PBS) (1.4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 8mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 140mM NaCl; 2.7 mM KCl; pH 7.3) y se prepararon los lisados, a partir del raspado de células en tampón RIPA (50 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 0.1% SDS; 0.5% deoxycholate; 1% Triton x-100; 1 mM EDTA; 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ; 2 mM PMSF; 0.01 mM leupeptin; 0.01 mM pepstatin y 1 mM NaF; pH 7.5) y sonicándolas a 3 pulsos de 10 segundos. Todo el proceso de obtención de lisado se realizó en hielo.

El contenido proteico se determinó con el kit Pierce™ BCA protein assay, en el que la presencia de proteína en un medio alcalino provoca la reducción del cobre a  $\text{Cu}^{+1}$ , el cual, unido al ácido bicinconínico, permite su detección colorimétrica a 562nm.

Para el análisis de los niveles de proteína por westernblot se cogieron 35 µg de proteína de lisados celulares, se separaron en geles de SDS-PAGE al 10% y se electrotransferieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron en una solución de bloqueo de 5% de leche en polvo no grasa en solución salina tamponada con Tris-Tween-20 (TBS con 0,05% Tween-20). A continuación se realizó un lavado con TBS. Los anticuerpos primarios se utilizaron para detectar las siguientes proteínas: CD36 (88kDa), CPT1 (90-94kDa), PDH (43kDa) y PPAR $\alpha$  (55kDa). Se dejó actuar el anticuerpo primario overnight y se volvieron a realizar lavados con TBS-T antes de añadir el anticuerpo secundario. Las bandas se visualizaron mediante el kit Immun-Star© Western C© Chemiluminescent Kit. La señal de quimioluminiscencia fue detectada con un densitómetro XRS ChemiDoc (Bio-Rad



Laboratories) y los resultados se analizaron con el software Quantity One (Bio-Rad Laboratories).

## 4.5 Actividad piruvato deshidrogenasa

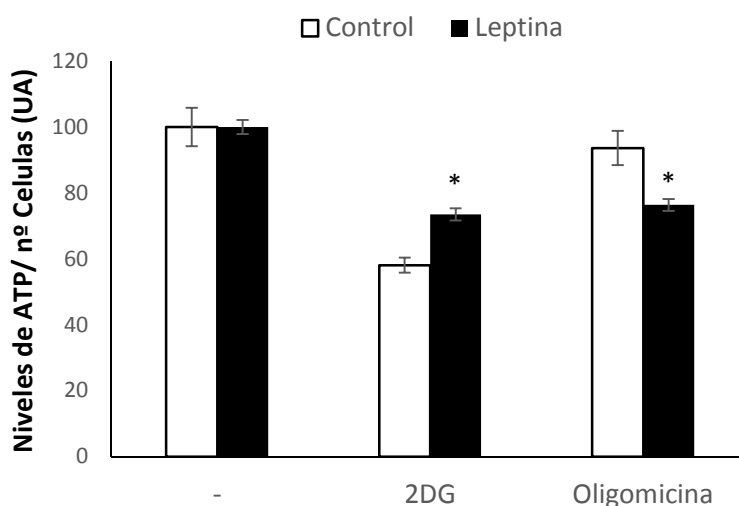
Las células MCF-7 fueron sembradas en placas de 6 pocillos y fueron tratadas con leptina 100ng/ml o sin tratamiento durante 24 horas. Se hizo un lavado con PBS y se recogieron las células mediante un raspado en PBS frío y se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos a 4°C para su precipitación. El precipitado celular se resuspendió con PBS más inhibidores de fosfatasas y proteasas. El contenido proteico del precipitado se determinó con el kit Pierce™ BCA protein assay. La actividad piruvato deshidrogenasa (CE 1.2.4.1) (PDH) se midió mediante el uso del kit Pyruvate dehydrogenase (PDH) Enzyme Activity Microplate Assay (abcam) en el que la enzima se inmunocapturó y la actividad fue medida siguiendo la reducción de NAD<sup>+</sup>, acoplada a la reducción de un colorante el cual se puede monitorizar midiendo su absorbancia a 450 nm en un lector de microplacas (Power Wave XS, Bio-Tek).

## 4.6 Análisis estadístico

El programa Microsoft Excel 2013 para Windows 7 fue utilizado para todos los análisis estadísticos. Los datos se presentan como medias  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Las diferencias estadísticas entre las células tratadas y no tratadas fueron analizadas por la prueba t-Student y significación estadística se estableció en  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

Para la determinación del efecto de la leptina sobre las diferentes rutas de obtención de energía en la línea MCF-7 se midieron los niveles de ATP después del tratamiento con 2-DG y oligomicina. Como se puede apreciar en la Figura 1, los niveles de ATP en células tratadas con leptina fueron más resistentes a la inhibición de la glucólisis con 2-DG ( $73,52 \pm 1,84\%$ ) en comparación con las células control ( $58,08 \pm 2,29\%$ ). De manera contraria, la inhibición de la fosforilación oxidativa con oligomicina mostró que los niveles de ATP son más dependientes de la producción mitocondrial en células tratadas con leptina ( $76,39 \pm 1,80\%$ ) en comparación con las células control ( $93,64 \pm 5,19\%$ ) que resultaron ser más glucolíticas al ser los niveles de ATP casi insensibles a la oligomicina.

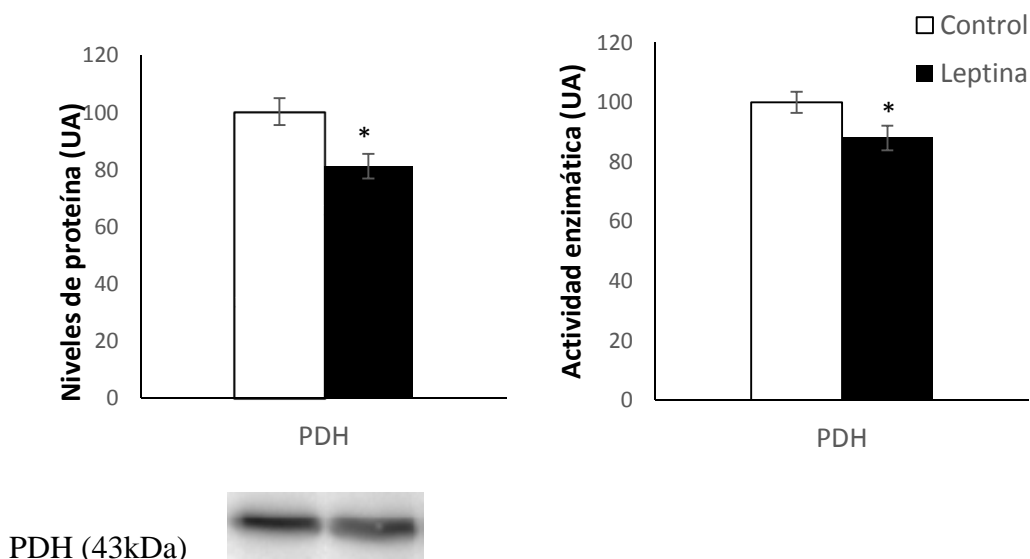


**Figura 1. Efecto de la leptina sobre los niveles de ATP.**

Histograma que muestra los niveles de ATP estimados a partir del kit ApoSENSOR™ Cell Viability Assay (BioVision) después de tratar las células con 2-DG 20mM, con oligomicina 1µM o con el vehículo durante 30 minutos. Los datos se expresan en unidades arbitrarias en referencia al 100% de las células tratadas con vehículo y están representados como la media  $\pm$  SEM de (N=5). \* Diferencia significativa entre células tratadas con leptina y las que no (test t-student;  $P \leq 0.05$ ). Abreviaturas: UA, unidades arbitrarias; 2-DG, 2-deoxiglucosa.

Los resultados mostraron una mayor dependencia del nivel de ATP de la fosforilación oxidativa en las células tratadas con leptina. Puesto que los niveles de ATP también se ven alterados con la inhibición de la glucólisis en las células tratadas con leptina, se quiso determinar si la fosforilación oxidativa era más dependiente en estas células del piruvato producido en la glucólisis. Por este motivo se analizaron los niveles y actividad de la PDH,

enzima clave que convierte el piruvato en acetil-CoA, siendo así la conexión entre la glucólisis y el metabolismo oxidativo mitocondrial. Como se puede apreciar en la Figura 2, tanto los niveles de PDH como su actividad fueron ligeramente menores, aunque de manera significativa, en las células tratadas con leptina comparados con las controles.



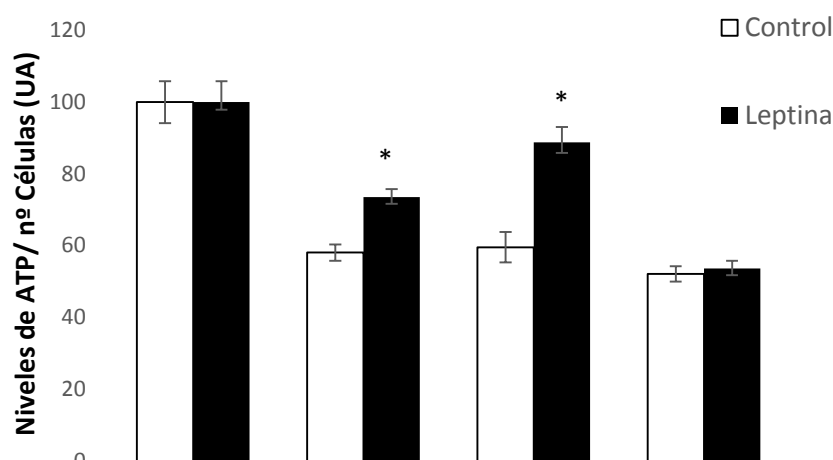
**Figura 2. Efecto de la leptina sobre los niveles de proteína y actividad enzimática de la piruvato deshidrogenasa (PDH).**

A la izquierda aparece el histograma y la captura obtenida del inmunoblot que muestran el efecto de la leptina sobre los niveles de proteína de la PDH y a la derecha el histograma de la actividad enzimática determinada con el kit Pyruvate dehydrogenase (PDH) Enzyme Activity Microplate Assay (abcam). Los datos se expresan en unidades arbitrarias en referencia al 100% de las células control y están representados como la media  $\pm$  SEM (n=6). \* Diferencia significativa entre células tratadas con leptina y las que no (test t-student;  $P \leq 0.05$ ). Abreviaturas: UA, unidades arbitrarias; PDH, piruvato deshidrogenasa.

Al ver que los niveles de ATP en las células MCF-7 tratadas con leptina mostraban una mayor dependencia de la fosforilación oxidativa pero que la entrada del piruvato procedente de la glucólisis al ciclo de Krebs (reacción de la PDH) se veía ligeramente disminuida, se decidió analizar cuál de los otros sustratos metabólico (aminoácidos y ácidos grasos) era el que usaban las mitocondrias de las células tratadas con leptina como combustible energético.

Para ello se midieron los niveles de ATP en respuesta a la privación de aminoácidos o la inhibición de la beta-oxidación con etomoxir (inhibidor de CPT1). Para evitar la activación compensatoria de la glucólisis, estas inhibiciones se realizaron en presencia de 2-DG.

Como se observa en la Figura 3, la restricción de aminoácidos no disminuyó la producción de ATP dependiente de la fosforilación oxidativa inducida por la leptina. Sin embargo, cuando se inhibió la entrada de ácidos grasos a la mitocondria con etomoxir, desapareció el efecto de la leptina sobre los niveles de ATP, comportándose de manera similar a las células control tratadas con 2-DG. Estos resultados permiten demostrar que el aumento de la respiración mitocondrial inducido por la leptina fue impulsado por la oxidación de los ácidos grasos.



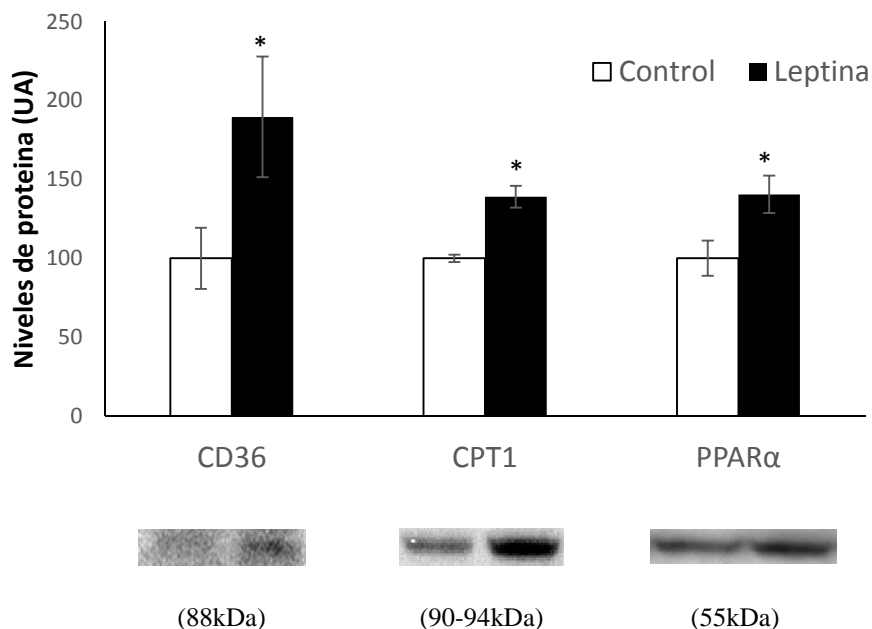
2-DG	-	+	+	+
Aminoácidos	+	+	-	+
Etomoxir	-	-	-	+

**Figura 3. Efecto de la leptina sobre los niveles de ATP.**

Histograma que muestra los niveles de ATP estimados a partir del kit ApoSENSOR™ Cell Viability Assay (BioVision) en células en donde se ha inhibido la glucólisis (20 mM 2-DG) con o sin tratamiento 50 etomoxir uM y / o privación de aminoácidos. Los datos se expresan en unidades arbitrarias en referencia al 100% de las células tratadas con vehículo y están representados como la media  $\pm$  SEM (N=5). \* Diferencia significativa entre células tratadas con leptina y las que no (test t-student;  $P \leq 0.05$ ). Abreviaturas: UA, unidades arbitrarias; 2-DG, 2-deoxiglucosa.

Para confirmar este incremento en el catabolismo de los lípidos, se midieron los niveles de proteínas clave implicadas en el uso de la grasa en nuestras células MCF-7 tratadas con leptina. Como se muestra en la figura 4, la leptina aumentó los niveles de proteínas clave que intervienen en la captación celular de ácidos grasos (FAT / CD36) y la entrada mitocondrial (CPT1), que son los dos pasos limitantes para la oxidación de ácidos grasos. Desde un punto

de vista regulatorio, la leptina aumentó la expresión de PPAR, regulador a largo plazo de la oxidación de ácidos grasos.



**Figura 4. Efecto de la leptina sobre los niveles de diferentes proteína relacionadas con el metabolismo lipídico.**

Histograma y capturas obtenidas del inmunoblot que muestran el efecto de la leptina sobre los niveles de proteína clave en el catabolismo de lípidos. Los datos se expresan en unidades arbitrarias en referencia al 100% de las células control y están representados como la media  $\pm$  SEM (N=6). \* Diferencia significativa entre células tratadas con leptina y las que no (test t-student;  $P \leq 0.05$ ). Abreviaturas: UA, unidades arbitrarias; CD36, clúster de diferenciación 36 o ácido graso translocasa; CPT1, carnitina palmitoiltransferasa I; PPAR, receptores activadores de la proliferación peroxisomal.

## 6. DISCUSIÓN

---

El trabajo de Otto Warburg y su equipo en 1920 mostró que las células tumorales metabolizan la glucosa a lactato a pesar de la presencia de oxígeno, fenómeno que llamó efecto Warburg o glucólisis aeróbica<sup>25</sup>. Desde entonces, la glucólisis aeróbica se ha atribuido a todos los tipos de tumores indistintamente sin una evaluación experimental apropiada. La realidad es que hay líneas celulares tumorales que obtienen energía a través de ambas vías, glucólisis y fosforilación oxidativa, o mayoritariamente de la fosforilación oxidativa<sup>30</sup>.

Ya ha sido documentada la relación entre niveles altos de leptina con el riesgo a padecer cáncer de mama<sup>16</sup>. Esto es debido a que la señalización de leptina conduce a la activación de múltiples vías implicadas en la proliferación, la resistencia a la apoptosis, la adhesión celular, la invasión y la migración<sup>5 20</sup>. Para poder llevar a cabo dicha actividad proliferativa e invasiva, la célula cancerígena requiere de altos niveles energéticos y sustratos anabólicos que dependerán del metabolismo de la célula tumoral. De esta manera, no sería de extrañar que el mismo factor que promueve el crecimiento celular en un tipo de célula, coordinaran también su metabolismo celular para apoyar el aumento de la proliferación.

Teniendo en cuenta que la leptina también tiene capacidad para influir en el metabolismo celular en algunos tejidos como el muscular y el graso<sup>34 35</sup>, se propuso investigar si existía un efecto modulador sobre el metabolismo energético de las células tumorales MCF-7; pudiendo repercutir sobre la malignidad y proliferación del tumor.

Los resultados mostraron una mayor dependencia de la producción de ATP por la fosforilación oxidativa en las células tratadas con leptina. Dado que la entrada del piruvato procedente de la glucólisis al ciclo de Krebs (reacción de la PDH) se vio ligeramente disminuida, otro sustrato metabólico (aminoácidos y ácidos grasos) estaba siendo usado por las mitocondrias de las células tratadas con leptina como combustible energético. Al inhibir la entrada de ácidos grasos a la mitocondria con etomoxir desapareció el efecto de la leptina sobre los niveles de ATP. Por consiguiente, se pudo atribuir el aumento de la respiración mitocondrial inducido por la leptina a la oxidación de los ácidos grasos.

Para profundizar más en ello, fueron medidos los niveles de expresión de proteínas clave implicadas en el metabolismo de ácidos grasos tales como FAT / CD36, CPT1 y PPAR $\alpha$ . Cabe destacar que la CPT1 representa el paso limitante de la velocidad de la  $\beta$ -oxidación mitocondrial ya que permite la entrada de los ácidos grasos a la mitocondria y FAT / CD36 es

el transportador de ácidos grasos dentro de la célula. La expresión de estas proteínas clave está orquestada por el factor de transcripción PPAR $\alpha$ , conocido como regulador a largo plazo de la oxidación de ácidos grasos. Los resultados de los experimentos mostraron un aumento de los niveles de cada una de ellas. Todo junto permitió explicar el aumento de la fosforilación oxidativa de ácidos grasos inducido por la leptina.

Estudios anteriores en el músculo han demostrado que la leptina activa la vía de señalización de AMPK, aumentando los niveles de PPAR $\alpha$  y por lo tanto, estimulando la oxidación de ácidos grasos <sup>36</sup>. Es por ello que la vía de señalización de la leptina-AMPK puede haberse conservado y activado en las células de cáncer de mama.

Aun sabiendo que la leptina promueve el uso de ácidos grasos como fuente de energía, es está bien establecido que la glucosa sigue siendo necesaria para las células cancerosas ya que no solamente suponen una fuente de ATP o NADH sino que además contribuyen a la formación de metabolitos para las vías anabólicas (glucosa-6-fosfato para la formación de ribosa-5-fosfato; dihidroxiacetona fosfato para formar fosfolípidos; 3-fosfo-glicerato para formar cisteína, serina y glicina; piruvato para la formación de alanina, malato y oxalacetato) <sup>30</sup>.

Experimentos posteriores en el grupo de investigación mostraron una disminución importante en la producción de lactato de las células tratadas con leptina mientras que el consumo de glucosa se mantuvo igual. Esto supondría que las células tratadas con leptina estarían dirigiendo una mayor cantidad de carbonos procedentes de la glucosa hacia rutas biosintéticas. Las principales vías para generar sustratos biosintéticos son la glucólisis, la vía de las pentosas fosfato y el ciclo de Krebs. Debido a que muchas de estos sustratos anabólicos provienen del ciclo de Krebs, es importante que dichos sustratos sean repuestos. Es por esto que el piruvato obtenido de la glucosa podría transformarse en oxalacetato y entrar en el ciclo de Krebs a través de la piruvato carboxilasa (PC), como vía anaplerótica. En varios cánceres se ha visto que la expresión de esta enzima está elevada <sup>37</sup>. Como se ha mencionado, otra fuente importante de precursores anabólicos es la vía de las pentosas fosfato, que produce NADPH y ribosas fosfato de glucosa para los lípidos y la biosíntesis de ácidos nucleicos. Se ha observado que estas enzimas anabólicas son fundamentales para el crecimiento de células de cáncer <sup>37 38</sup>.

Dado a que los adipocitos también expresan el receptor Ob-Ra, la leptina puede tener un efecto autocrino sobre los mismos adipocitos. Ya se ha visto que la administración *in vivo* de

leptina promueve la supresión de la lipogénesis, incrementa la lipólisis y además incrementa la oxidación de ácidos grasos en adipocitos <sup>35</sup>. Es por ello que, al estar el tejido mamario envuelto de tejido graso, se puede pensar que en el microambiente tumoral pudiera haber altos niveles de ácidos grasos secretados por los adipocitos inducidos por la leptina.

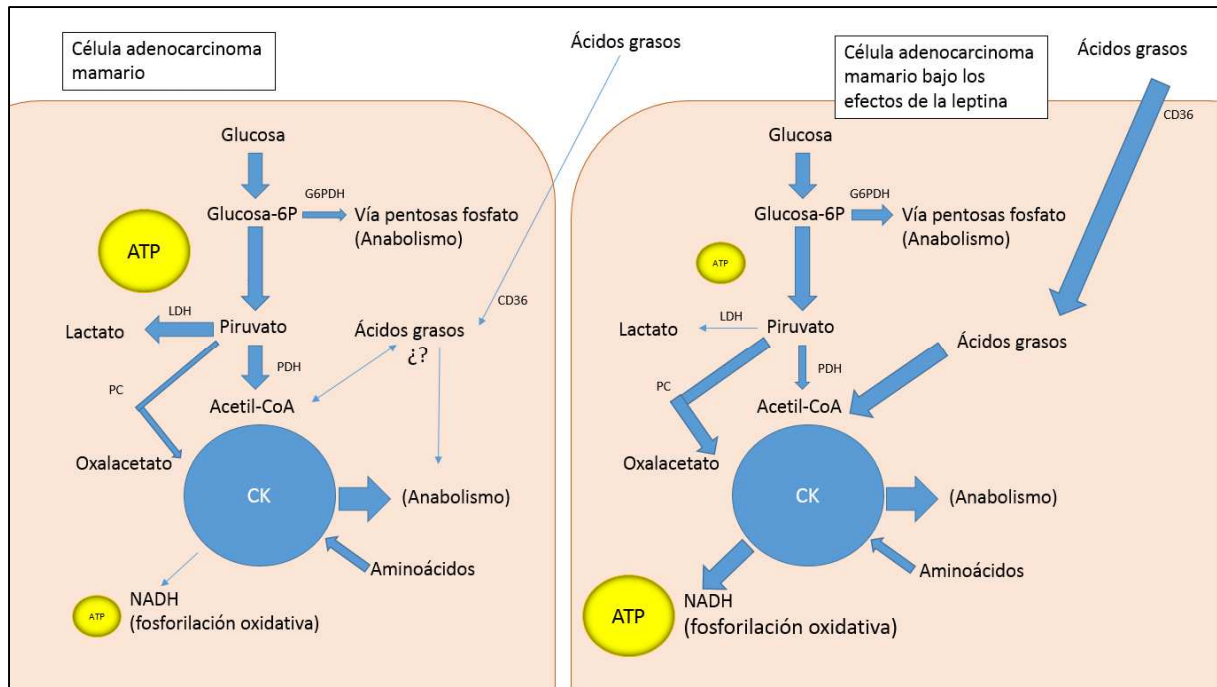
Con esta suposición se le puede dar un significado biológico a que la leptina promueva el uso de ácidos grasos como fuente de energía, ya que de esta manera la célula tumoral usaría el sustrato energético que más abunda en el medio que lo rodea. Además, si se emplean los ácidos grasos como fuente energética se centra el uso de glucosa y aminoácidos hacia las vías anabólicas lo que evitaría invertir carbonos hacia el anabolismo de lípidos ya que se obtendrían del medio.

Esta idea de sinergismo o acoplamiento metabólico entre las células del estroma y las células cancerígenas ya se observó en cánceres de mama en humanos y se llamó el Efecto Warburg Reverse <sup>33</sup>. De acuerdo con este modelo, la glucólisis aeróbica tiene lugar en los fibroblastos asociados al tumor produciendo metabolitos de alta energía como el lactato y el piruvato, que se transfieren a las células cancerosas epiteliales adyacentes, que están experimentando el metabolismo mitocondrial oxidativo. Esto permitiría una mayor producción de ATP en las células cancerosas, impulsando el crecimiento tumoral y la metástasis <sup>31 33</sup>. Teniendo en cuenta que las células del estroma que se encuentran en el microambiente del tumor de mama son mayoritariamente adipocitos, estos orquestados por la leptina, proporcionarían a las células cancerosas ácidos grasos y lactato para la respiración mitocondrial.

De este modo se puede interpretar que la leptina proporciona un modelo metabólico de biosíntesis para células cancerígenas basado en la formación de sustratos anabólicos a unos niveles suficientes para proliferar de manera rápida a partir de glucosa mientras se obtiene energía de la oxidación de ácidos grasos, como se observa ver en la Imagen 2.

Todavía queda un largo camino para llegar a conocer el papel de la leptina en el metabolismo de los tumores de mama por lo que se debería seguir investigando. Una mejor comprensión del metabolismo del cáncer proporcionará nuevas pistas sobre dianas estratégicas para la intervención terapéutica.





**Imagen 2. Modelo metabólico propuesto sobre los efectos inducidos por la leptina en el cáncer de mama.**

A la izquierda se muestra el modelo metabólico de las células de cáncer de mama basado en los resultados obtenidos en nuestras células control (sin leptina). En este modelo la mayoría del ATP generado provendría mayoritariamente de la vía glucolítica y la formación de lactato. Parte del piruvato se deriva al ciclo de Krebs para la formación de sustratos anabólicos. Los ácidos grasos podrían dirigirse hacia el anabolismo de fosfolípidos o integrarse en el ciclo de Krebs. A la derecha se muestra el modelo de metabolismo propuesto para las células de cáncer de mama basado en los datos obtenidos en nuestras células tratadas con leptina. La principal vía de obtención de energía provendría de la fosforilación oxidativa de ácidos grasos, los cuales podrían proceder del medio. La glucosa es dirigida hacia la formación de sustratos anabólicos a través de la vía de las pentosas fosfato y hacia el ciclo de Krebs a través de la PC. Imagen creada por el autor. Abreviaturas: G6PDH, glucosa 6 fosfato deshidrogenasa; LDH, lactato deshidrogenasa; PC, piruvato carboxilasa; PDH, piruvato deshidrogenasa.

## 7. CONCLUSIÓN

---

En la línea celular de cáncer de mama MCF-7, la leptina potencia la respiración mitocondrial como fuente de ATP, aumentando principalmente el uso de ácidos grasos como combustible energético.

Este cambio metabólico permitiría el uso de la glucosa para la biosíntesis por lo que esta reprogramación metabólica causada por la leptina puede conferir beneficios para el crecimiento celular y contribuir, junto con otros factores, a un peor pronóstico asociado a la obesidad en el cáncer de mama.

## 8. ABREVIATURAS

---

- MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos.
- PI3K: Fosfoinositol-3 quinasas.
- Akt: Proteína quinasa B.
- eNOS: Sintetasa de óxido nítrico endotelial.
- JAK2-STAT3: Janus quinasa 2 - Transductor de señales y activador de la transcripción-3.
- NF- $\kappa$ B: Factor nuclear  $\kappa$ B.
- PCK: Proteína quinasa C.
- JNK: Quinasas c-Jun N-terminal.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

1. Breast Cancer - National Cancer Institute.  
<http://www.cancer.gov/types/breast>. Accessed June 2, 2015.
2. Malvezzi M, Bertuccio P, Rosso T, et al. European cancer mortality predictions for the year 2015: does lung cancer have the highest death rate in EU women? *Ann Oncol*. 2015;26(4):779-786. doi:10.1093/annonc/mdv001.
3. Hruby A, Hu FB. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. *Pharmacoeconomics*. 2014. doi:10.1007/s40273-014-0243-x.
4. Ng M, Fleming T, Robinson M, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2014;384(9945):766-781. doi:10.1016/S0140-6736(14)60460-8.
5. Rose DP, Vona-Davis L. Biochemical and molecular mechanisms for the association between obesity, chronic inflammation, and breast cancer. *Biofactors*. 40(1):1-12. doi:10.1002/biof.1109.
6. Byers T, Sedjo RL. Body fatness as a cause of cancer: epidemiologic clues to biologic mechanisms. *Endocr Relat Cancer*. 2015;22(3):R125-R134. doi:10.1530/ERC-14-0580.
7. Morris PG, Hudis CA, Giri D, et al. Inflammation and increased aromatase expression occur in the breast tissue of obese women with breast cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2011;4(7):1021-1029. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-11-0110.
8. Guo S, Liu M, Wang G, Torroella-Kouri M, Gonzalez-Perez RR. Oncogenic role and therapeutic target of leptin signaling in breast cancer and cancer stem cells. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1825(2):207-222. doi:10.1016/j.bbcan.2012.01.002.
9. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994;372(6505):425-432. doi:10.1038/372425a0.
10. Havel PJ. Role of adipose tissue in body-weight regulation: mechanisms regulating leptin production and energy balance. *Proc Nutr Soc*. 2000;59(3):359-371. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10997652>. Accessed June 2, 2015.
11. Ahima RS, Flier JS. Leptin. *Annu Rev Physiol*. 2000;62:413-437. doi:10.1146/annurev.physiol.62.1.413.
12. Garofalo C, Surmacz E. Leptin and cancer. *J Cell Physiol*. 2006;207(1):12-22. doi:10.1002/jcp.20472.
13. Considine R V, Sinha MK, Heiman ML, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*. 1996;334(5):292-295. doi:10.1056/NEJM199602013340503.
14. Saxena NK, Sharma D. Multifaceted leptin network: the molecular connection between obesity and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2013;18(3-4):309-320. doi:10.1007/s10911-013-9308-2.
15. Frühbeck G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J*. 2006;393(Pt 1):7-20. doi:10.1042/BJ20051578.
16. Niu J, Jiang L, Guo W, Shao L, Liu Y, Wang L. The Association between Leptin Level and Breast Cancer: A

- Meta-Analysis. *PLoS One*. 2013;8(6):e67349. doi:10.1371/journal.pone.0067349.
17. Garofalo C, Koda M, Cascio S, et al. Increased expression of leptin and the leptin receptor as a marker of breast cancer progression: possible role of obesity-related stimuli. *Clin Cancer Res*. 2006;12(5):1447-1453. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-1913.
  18. Ambrosini G, Nath AK, Sierra-Honigmann MR, Flores-Riveros J. Transcriptional activation of the human leptin gene in response to hypoxia. Involvement of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*. 2002;277(37):34601-34609. doi:10.1074/jbc.M205172200.
  19. Vona-Davis L, Rose DP. Adipokines as endocrine, paracrine, and autocrine factors in breast cancer risk and progression. *Endocr Relat Cancer*. 2007;14(2):189-206. doi:10.1677/ERC-06-0068.
  20. Andò S, Catalano S. The multifactorial role of leptin in driving the breast cancer microenvironment. *Nat Rev Endocrinol*. 2012;8(5):263-275. doi:10.1038/nrendo.2011.184.
  21. Gruen ML, Hao M, Piston DW, Hasty AH. Leptin requires canonical migratory signaling pathways for induction of monocyte and macrophage chemotaxis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007;293(5):C1481-C1488. doi:10.1152/ajpcell.00062.2007.
  22. Andò S, Barone I, Giordano C, Bonofiglio D, Catalano S. The Multifaceted Mechanism of Leptin Signaling within Tumor Microenvironment in Driving Breast Cancer Growth and Progression. *Front Oncol*. 2014;4:340. doi:10.3389/fonc.2014.00340.
  23. Yager JD, Davidson NE. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N Engl J Med*. 2006;354(3):270-282. doi:10.1056/NEJMra050776.
  24. Phuong NTT, Lim SC, Kim YM, Kang KW. Aromatase induction in tamoxifen-resistant breast cancer: Role of phosphoinositide 3-kinase-dependent CREB activation. *Cancer Lett*. 2014;351(1):91-99. doi:10.1016/j.canlet.2014.05.003.
  25. Koppenol WH, Bounds PL, Dang C V. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(5):325-337. doi:10.1038/nrc3038.
  26. Wu W, Zhao S. Metabolic changes in cancer: beyond the Warburg effect. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2013;45(1):18-26. doi:10.1093/abbs/gms104.
  27. Lu J, Tan M, Cai Q. The Warburg effect in tumor progression: mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism. *Cancer Lett*. 2015;356(2 Pt A):156-164. doi:10.1016/j.canlet.2014.04.001.
  28. Hsu PP, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*. 2008;134(5):703-707. doi:10.1016/j.cell.2008.08.021.
  29. Whitaker-Menezes D, Martinez-Outschoorn UE, Flomenberg N, et al. Hyperactivation of oxidative mitochondrial metabolism in epithelial cancer cells in situ: visualizing the therapeutic effects of metformin in tumor tissue. *Cell Cycle*. 2011;10(23):4047-4064. doi:10.4161/cc.10.23.18151.
  30. Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Saavedra E. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J*. 2007;274(6):1393-1418. doi:10.1111/j.1742-4658.2007.05686.x.
  31. Martinez-Outschoorn U, Sotgia F, Lisanti MP. Tumor microenvironment

- and metabolic synergy in breast cancers: critical importance of mitochondrial fuels and function. *Semin Oncol.* 2014;41(2):195-216. doi:10.1053/j.seminoncol.2014.03.002.
32. Martinez-Outschoorn UE, Lisanti MP, Sotgia F. Catabolic cancer-associated fibroblasts transfer energy and biomass to anabolic cancer cells, fueling tumor growth. *Semin Cancer Biol.* 2014;25:47-60. doi:10.1016/j.semcancer.2014.01.005.
33. Pavlides S, Whitaker-Menezes D, Castello-Cros R, et al. The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle.* 2009;8(23):3984-4001. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19923890>. Accessed June 2, 2015.
34. Ceddia RB. Direct metabolic regulation in skeletal muscle and fat tissue by leptin: implications for glucose and fatty acids homeostasis. *Int J Obes (Lond).* 2005;29(10):1175-1183. doi:10.1038/sj.ijo.0803025.
35. Harris RBS. Direct and indirect effects of leptin on adipocyte metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1842(3):414-423. doi:10.1016/j.bbadis.2013.05.009.
36. Lee WJ, Kim M, Park H-S, et al. AMPK activation increases fatty acid oxidation in skeletal muscle by activating PPARalpha and PGC-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;340(1):291-295. doi:10.1016/j.bbrc.2005.12.011.
37. Bramwell ME, Humm SM. 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.* 1992;1139(1-2):115-121. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1610911>. Accessed June 2, 2015.
38. Lukey MJ, Wilson KF, Cerione RA. Therapeutic strategies impacting cancer cell glutamine metabolism. *Future Med Chem.* 2013;5(14):1685-1700. doi:10.4155/fmc.13.130.