



Universitat
de les Illes Balears

TRABAJO DE FIN DE GRADO

REGULACIÓN DE LA BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL POR LA INFLAMACIÓN ASOCIADA A LA OBESIDAD EN EL CÁNCER DE MAMA

Nicolae Ciobu

Grado de Bioquímica

Facultad de Ciencias

Año Académico 2019-20

REGULACIÓN DE LA BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL POR LA INFLAMACIÓN ASOCIADA A LA OBESIDAD EN EL CÁNCER DE MAMA

Nicolae Ciobu

Trabajo de Fin de Grado

Facultad de Ciencias

Universidad de les Islas Baleares

Año Académico 2019-20

Palabras clave del trabajo:

Biogénesis mitocondrial, mitocondria, cáncer de mama, ER α , ER β , inflamación, obesidad.

Nombre Tutor/Tutora del Trabajo Jorge Sastre Serra

Nombre Tutor/Tutora (si procede)

Se autoriza la Universidad a incluir este trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto i difusión en línea, con fines exclusivamente académicos i de investigación

Autor		Tutor	
Sí	No	Sí	No
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Índice

RESUMEN	- 5 -
ABSTRACT	- 5 -
ABREVIACIONES	- 7 -
INTRODUCCIÓN	- 8 -
OBJETIVO EXPERIMENTAL	- 15 -
MATERIALES Y MÉTODOS	- 16 -
REACTIVOS.....	- 16 -
CULTIVO DE CÉLULAS Y TRATAMIENTO	- 16 -
PCR CUANTITATIVA (qPCR).....	- 16 -
WESTERN BLOT.....	- 18 -
ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE CARDIOLIPINA	- 20 -
ANÁLISIS DE MASA MITOCONDRIAL.....	- 20 -
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	- 20 -
RESULTADOS	- 21 -
DISCUSIÓN	- 27 -
CONCLUSIÓN	- 31 -
BIBLIOGRAFÍA	- 32 -

Resumen

La obesidad es un importante factor de riesgo para la aparición de cáncer de mama, dónde distintas citoquinas proinflamatorias y hormonas secretadas por el tejido adiposo influyen en el proceso de carcinogénesis de la glándula mamaria. La biogénesis mitocondrial implica la regulación y coordinación del genoma nuclear y mitocondrial para la expresión de más de 1000 proteínas, siendo un proceso esencial para el estado metabólico y energético de la célula, y teniendo un papel relevante en el potencial tumorigénico de la célula cancerígena. En el presente estudio se ha examinado la influencia de un tratamiento inflamatorio (17 β -estradiol, leptina, IL-6 y TNF α), que pretende simular las condiciones hormonales de una mujer obesa postmenopáusica, sobre la biogénesis mitocondrial de las líneas celulares de cáncer de mama MCF7 y T47D, diferentes entre ellas por el contenido de receptores de estrógenos α y β . Los resultados han mostrado una disminución de la tasa de biogénesis mitocondrial y la masa mitocondrial en la línea MCF7 (elevada ratio ER α /ER β) frente a unos niveles mantenidos en la línea T47D (baja ratio ER α /ER β). Se ha postulado la expresión diferencial del gen ERR α como responsable del distinto comportamiento de la biogénesis mitocondrial entre líneas celulares con diferente expresión del ER β frente al tratamiento inflamatorio. Así pues, el estudio del rol del ER β y el ERR α sobre la funcionalidad mitocondrial y sus repercusiones sobre la célula cancerígena podrían tener mucha relevancia clínica en pacientes obesas con cáncer de mama.

Abstract

Obesity is a major risk factor for the occurrence of breast cancer, where different proinflammatory cytokines and hormones secreted by adipose tissue influence the process of carcinogenesis in the mammary gland. Mitochondrial biogenesis involves the regulation and coordination of the nuclear and mitochondrial genome for the expression of more than 1.000 proteins, being an essential process for the metabolic and energetic state of the cell and exhibiting a relevant role in the tumorigenic potential of a cancer cell. In the present study, it has been examined the influence of an inflammatory treatment (17 β -estradiol, leptin, IL-6 and TNF α), which aims to simulate the hormonal conditions of a postmenopausal obese woman, on the mitochondrial biogenesis of MCF7 and T47D breast cancer cell lines, which display a distinct content of α and β estrogen receptors. The results have shown a decrease in the rate of mitochondrial biogenesis and mitochondrial mass in the MCF7 line (high ratio ER α /ER β)

compared to a maintained status in the line T47D (low ratio ER α /ER β). The differential expression of ERR α gene has been postulated as responsible for the difference between cell lines in preserving a stable mitochondrial pool against inflammatory treatment. Therefore, the study of the role of ER β and ERR α on mitochondrial functionality and its repercussions on the cancer cell manifests clinical relevance in obese patients with breast cancer.

Abreviaciones

- **ATP:** Adenosín trifosfato
- **ATPasa F1:** ATP sintasa subunidad F1
- **COX:** Citocromo c oxidasa (subunidad I o IV)
- **EMT:** Transición Epitelio-Mesénquima
- **ER:** Receptor de estrógenos (puede ser α o β)
- **ERE:** Elementos de respuesta a estrógenos
- **ETC:** Cadena de transporte electrónico
- **GAPDH:** Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
- **IL-6:** Interleuquina 6
- **IMC:** Índice de Masa Corporal
- **mRNA:** RNA mensajero
- **mtDNA:** DNA mitocondrial
- **mtSSB:** Proteína de unión a DNA monocatenario
- **NRF1 y 2:** Factores de respiración nuclear 1 y 2
- **OXPHOS:** Fosforilación oxidativa
- **PGC-1 α :** Coactivador 1 α del receptor activado gamma del proliferador de peroxisoma
- **ROS:** Especies reactivas de oxígeno
- **siRNA:** RNA pequeño de interferencia
- **TFAM:** Factor de transcripción mitocondrial A
- **TNF α :** Factor de necrosis tumoral α
- **UCP2:** Proteína desacopladora 2

Introducción

El cáncer, patología caracterizada por la proliferación excesiva de células tumorales, es la segunda causa de muerte en el mundo, responsable de aproximadamente 9.6 millones de muertes en 2018 [1]. En concreto, el cáncer de mama es el tipo de cáncer más frecuente en mujeres, con 2.1 millones de nuevos diagnósticos en 2018, lo que supone un nuevo caso cada 18 segundos. En Estados Unidos, una de cada 8 mujeres desarrollará cáncer de mama durante su vida. Además, es responsable de más de medio millón de muerte anuales, proyectándose un aumento de su incidencia a un total de 3.2 millones de nuevos casos por año en 2050 [2,3]. Destaca su mayor incidencia en países y regiones de renta alta que en aquellas de renta baja, pero una relación inversa en cuanto a la mortalidad, la cual es mayor en países de renta media y baja que aquellos de renta alta, como se puede observar en la **Figura 1**. Esto se justifica por el acceso de los pacientes de países ricos a un diagnóstico temprano y terapias efectivas propiciando una mejor prognosis [2]. Estos datos justifican la necesidad de la investigación y el desarrollo de terapias nuevas para el tratamiento del cáncer de mama.

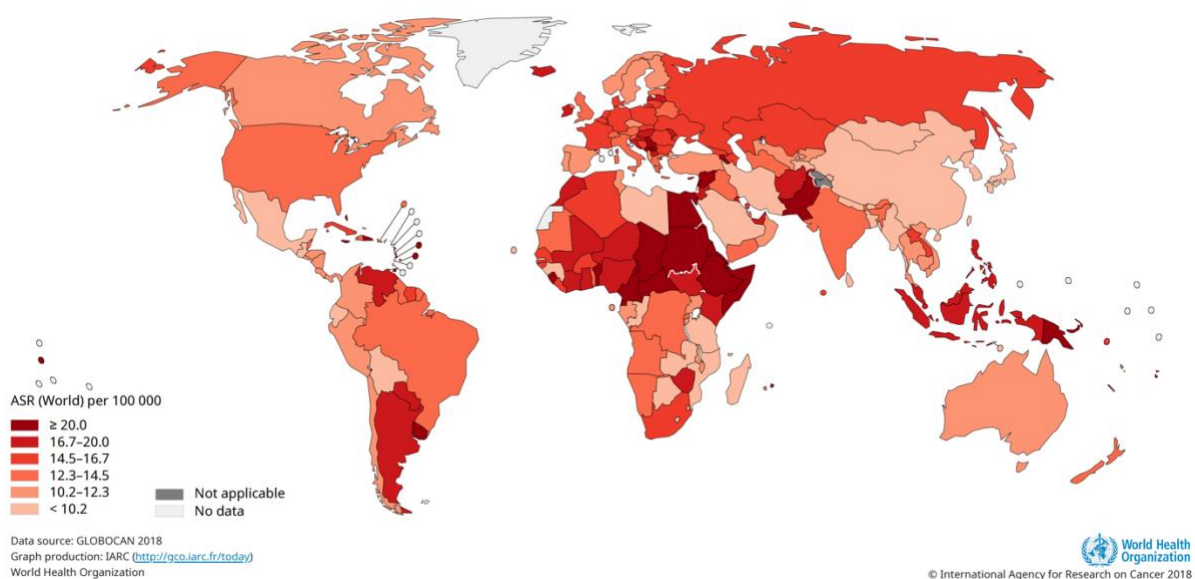


Figura 1. Mortalidad del cáncer de mama estandarizada por edad a nivel global. Extraído de Globocan y World Health Organization [4].

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea y multifactorial que envuelve tanto la predisposición genética, como el estilo de vida y factores ambientales. Dentro de éstos últimos, se ha estimado que cerca del 20% de los casos de cáncer de mama alrededor del mundo se atribuyen a factores de riesgo modificables, donde se incluye la obesidad [2]. La

obesidad es una enfermedad metabólica crónica que se caracteriza por el exceso de acumulación de grasa en el cuerpo, y su prevalencia ha aumentado marcadamente en las últimas dos décadas en los países más desarrollados [5], con un 38% de la población estadounidense obesa [6]. Estudios epidemiológicos sugieren que la adiposidad, expresada por el índice de masa corporal (IMC), aumenta la incidencia del cáncer de mama en un 30-50% en mujeres postmenopáusicas [7]. Un estado muy obeso en mujeres (IMC > 40.0 kg/m²) aumenta tres veces el riesgo de muerte por cáncer de mama respecto a mujeres delgadas (IMC < 20.5 kg/m²), dándose un aumento de riesgo del 12% por cada 5 kg/m² de aumento en el IMC [5,8].

El tejido adiposo, además de ser el principal almacén de energía del organismo, tiene una función endocrina activa, produciendo hormonas, factores de crecimiento y citoquinas (adipoquinas). En condiciones de obesidad, se produce una alteración del secretoma de los adipocitos, la cantidad de macrófagos infiltrados y las células estromales del tejido adiposo, lo que puede llevar a un desbalance de las adipoquinas secretadas, afectando a procesos como el metabolismo de ácidos grasos y glucosa, diferenciación, inflamación y respuesta inmune. Estos cambios pueden afectar a los procesos de proliferación celular, crecimiento invasivo, apoptosis, angiogénesis y metástasis en células tumorales de tejidos como la glándula mamaria [6,7,9]. Concretamente, las adipoquinas tienen un papel importante en establecer un microambiente favorable para la supervivencia y crecimiento de las células de cáncer de mama [10].

La principal alteración hormonal que relaciona la obesidad con el cáncer de mama es el aumento de los niveles circulantes de estrógenos. El tejido adiposo expresa varias enzimas que participan en la síntesis de estrógenos a partir de precursores androgénicos, entre las que destaca la aromatasa, responsable de la conversión de la testosterona en estradiol (17β-estradiol), principal estrógeno circulante en mujeres [11]. En las mujeres postmenopáusicas, el tejido adiposo es la principal fuente de síntesis de estrógenos, observándose una relación lineal directa entre la biodisponibilidad de estrógenos y el IMC [5,7]. Se ha observado mayor concentración de estradiol en tejido mamario maligno que normal, proveniente del tejido adiposo periférico, pero sobretodo del local, que compone el 90% de la glándula mamaria [6,12]. Así, el mayor riesgo de cáncer de mama asociado a la obesidad podría relacionarse con los altos niveles circulantes de estradiol y su papel en regular la diferenciación celular,

proliferación y supervivencia [5], lo que lo ha postulado como un factor de riesgo y un claro promotor del cáncer de mama [13].

Los efectos celulares del estradiol son mediados por su unión a los receptores de estrógenos (ER) α y β . El ER α y ER β son factores de transcripción de la familia de receptores nucleares que, tras unirse en el citoplasma al estradiol, homodimerizan y son translocados al núcleo, donde se unen a los elementos de respuesta a estrógenos (ERE) a través de sus dominios de unión al DNA. La unión a la cromatina y el reclutamiento de otros cofactores promueve la expresión de genes relacionados con el crecimiento celular, producción de energía y apoptosis. Aunque el ER α y el ER β presenten homología en los dominios de unión al DNA y al ligando, su actividad y afinidad por el estradiol son diferentes, teniendo mayor afinidad por éste el ER α . Además, el patrón de expresión de los receptores varían también según el tipo celular [11,13,14]. El ER α se postula como principal mediador de los efectos carcinógenos del estradiol en cáncer de mama. En caso del ER β , mucho menos estudiado, se asocia con un efecto anti-proliferativo, citostático y protector ante el desarrollo tumoral, aunque otros estudios han observado resultados contrarios, por lo que su papel en el cáncer de mama queda por aclarar [14,15,16].

Como parte de su acción endocrina, otra de las adipoquinas que sintetizan y secretan los adipocitos que componen el tejido adiposo es la leptina, los niveles circulantes de la cual se correlacionan de manera directamente proporcional con el IMC del individuo [7]. La leptina es una hormona no glucosilada multifuncional, que realiza un amplio rango de funciones biológicas: a nivel del hipotálamo regulando la ingesta de comida y el metabolismo energético, angiogénesis, formación del hueso y modulación de la respuesta inmunitaria [6,10]. Esta hormona tiene un papel importante como factor predictivo independiente de riesgo y pronóstico de cáncer de mama, que se ha correlacionado con sus niveles circulantes. Así, las mujeres con cáncer de mama tienen niveles de leptina plasmática y expresión de RNA en el tejido adiposo mayores que sujetos sanos [7,8]. La leptina ejerce su rol biológico por unión al receptor Ob-R, que es expresado en células epiteliales mamarias normales y líneas celulares de cáncer de mama (como MCF7 y T47D), observándose un efecto en la estimulación de la proliferación, división celular, invasión y metástasis, a través de la vía de señalización JAK2-STAT3, MAPKs y PI3K/Akt. Además, el mecanismo de transducción de señal parece estar envuelto en la regulación de la expresión de la aromatasa, síntesis de estrógenos y activación del ER. Existen evidencias de que la leptina puede inducir la activación directa independiente

de ligando del ER y regular al alza la vía de señalización del ER α en la línea celular de cáncer de mama MCF7 [7,10,17]. Como efecto indirecto, la leptina también es capaz de intensificar la expresión y actividad de la aromatasa [18], dando como resultado un aumento de los niveles circulantes de estrógenos, los cuáles a la vez se ha visto que puede incrementar la expresión de mRNA (RNA mensajero) y secreción de leptina desde el tejido adiposo [7].

La inflamación es uno de los *hallmarks* del cáncer [19], reconocido como un componente esencial en el microambiente tumoral para su progreso y desarrollo [20]. Uno de los factores ambientales que epidemiológicamente se ha relacionado con un mayor riesgo de cáncer es la inflamación crónica, promovida en muchas ocasiones por un estado de obesidad, relacionándose un 15-20% de las muertes por cáncer en el mundo a la inflamación [21,22]. El tejido adiposo inflamado parece aumentar el riesgo de cáncer predominantemente más que la obesidad por si misma y puede estimular eventos claves en el desarrollo del cáncer, incluyendo la transformación y supervivencia celular, proliferación, invasión, angiogénesis y metástasis [6]. Se ha observado que la obesidad asociada a la dieta incrementa el potencial metastásico en cáncer de mama y los mediadores proinflamatorios secretados por el tejido adiposo tienen un rol central la patogenia y prognosis del cáncer de mama [6,7]. Evidencias *in vitro* e *in vivo* ponen de manifiesto la secreción de varias citoquinas proinflamatorias por parte de adipocitos, macrófagos infiltrados y células estromales del tejido adiposo que podrían promover el cáncer de mama, entre los que destaca el factor de necrosis tumoral α (TNF α) y la interleuquina 6 (IL-6) [6,7,8].

El TNF α es una citoquina producida por los adipocitos, células estromavasculares y macrófagos, la expresión del cual incrementa con la obesidad y se relaciona positivamente con el IMC [7]. Como una citoquina principal en el microambiente tumoral, el TNF α influencia varios de los *hallmarks* del cáncer, como la estimulación del crecimiento tumoral, supervivencia, invasión, metástasis y angiogénesis [23]. En líneas celulares de cáncer de mama, el TNF α puede tener un rol tanto promoviendo como inhibiendo el crecimiento celular, sugiriéndose que la vía de señalización a través de la cual contribuye a la proliferación es la MAPK y PI3K/Akt [6]. Por el otro lado, se ha propuesto que la inhibición por parte del TNF α de la proliferación mediada por estradiol en líneas de MCF7 se da por la regulación a la baja del ER α a través de la vía PI3K/Akt [24]. Además, el TNF α es también un potente estimulador de la transición epitelio-mesénquima (EMT) en células de cáncer de mama, a través de la

activación de la vía NF- κ B [21], y la neutralización farmacológica del TNF α puede llevar a convertir la metástasis promovida por inflamación en una regresión tumoral [20].

La IL-6 es una citoquina inflamatoria secretada por macrófagos activados y adipocitos, y se ha observado mayores niveles de expresión en plasma y en el tejido adiposo bajo condiciones de obesidad, lo que correlaciona con un peor pronóstico en cáncer de mama [7]. A nivel genotípico, se ha observado polimorfismos en el promotor de la IL-6 que aumentan su expresión con mayor riesgo de progresión en cáncer de mama [22], limitando este efecto a pacientes sólo con tumores ER+, sugiriendo una influencia de la IL-6 a través de las vías de señalización hormonales [7]. Así, la IL-6 actúa como un regulador de la síntesis de estrógenos y expresión de la aromatasa en el tejido adiposo y tumoral (**Figura 2**), por la presencia del receptor de IL-6 soluble [12], contribuyendo así a la progresión y proliferación cancerígena de tumores ER+. Además, se ha visto que juega un rol importante en el potencial proinvasivo y metastásico de las células tumorales mamarias a través de la activación de la MAPK y STAT3 [6], [7].

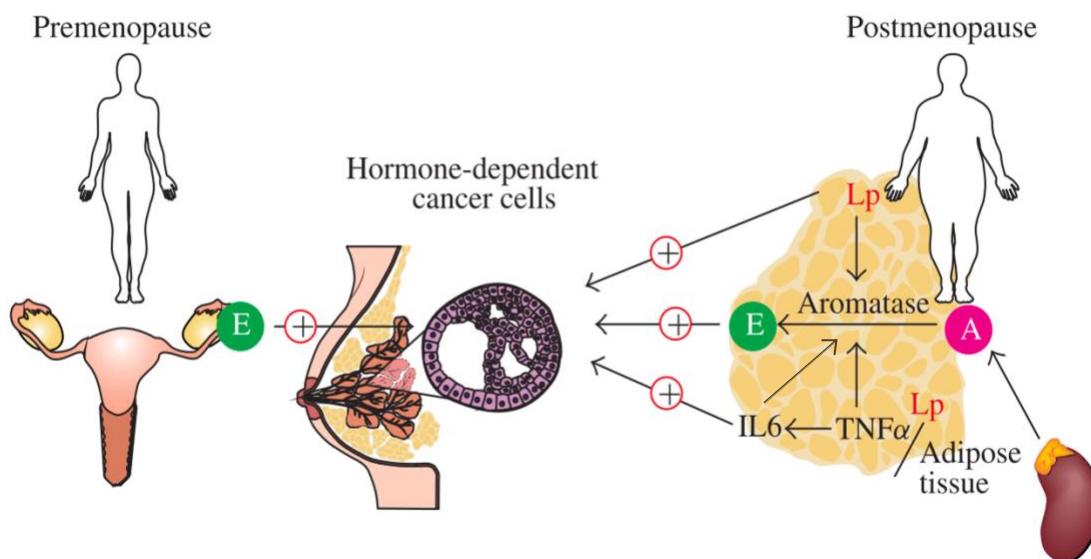


Figura 2. Implicación del tejido adiposo y las adipoquinas secretadas en la producción de estrógenos en mujeres obesas postmenopáusicas. A diferencia de las mujeres premenopáusicas, en las que la principal fuente de producción de estrógenos es el ovario, en las mujeres obesas postmenopáusicas el tejido adiposo se convierte en el principal tejido de síntesis de estrógenos, debido a la acción de la aromatasa, enzima que convierte los andrógenos en estrógenos, concretamente, testosterona en estradiol. Diversas adipoquinas, como la leptina, TNF α e IL-6 influyen la producción de estrógenos y la proliferación dependiente de hormonas de células cancerosas de la glándula mamaria. IL: interleuquina; TNF α : factor de necrosis tumoral α ; Lp: leptina, E: estradiol; A: aromatasa. Imagen modificada de [7].

Las mitocondrias son orgánulos dinámicos y semiautónomos que generan energía celular en forma de adenosín trifosfato (ATP) a través de la vía de la fosforilación oxidativa (OXPHOS), además de estar envueltas en procesos como las rutas biosintéticas del colesterol, lípidos o la síntesis nucleica. Además, las mitocondrias son una fuente importante de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), claves en el estrés oxidativo de la célula y en la regulación de procesos como el ciclo celular, proliferación y apoptosis [25]. Las mitocondrias tienen un rol importante en la carcinogénesis alterando el metabolismo energético celular, promoviendo la resistencia a la apoptosis e incrementando la producción de ROS, la que propicia cambios en el genoma mitocondrial [26].

Parece ser que la función mitocondrial depende de su morfología, cambios en forma, número y localización, lo que puede traducirse en modificaciones funcionales importantes. Así, la biogénesis mitocondrial envuelve la expresión de proteínas mitocondriales en el genoma mitocondrial y nuclear, que serán añadidas a los orgánulos preexistentes (ya que las mitocondrias no pueden ser sintetizadas *de novo*), lo que llevará a un crecimiento en su tamaño y masa [27]. La biogénesis mitocondrial supone la regulación compleja de la expresión de más de 1.000 proteínas, coordinando dos genomas en compartimentos diferentes (nuclear y mitocondrial) y alterando el nivel de aproximadamente el 20% de las proteínas celulares [25]. En el cáncer, se ha observado un incremento de la biogénesis mitocondrial en el proceso de carcinogénesis y una disminución de la proliferación de las células cancerosas en caso de la inhibición de este proceso [25,28]. Tradicionalmente, se ha considerado a las células cancerígenas como células con un metabolismo basado principalmente en la glucólisis aeróbica (efecto Warburg) debido a una función mitocondrial dañada [29]. Sin embargo, en los últimos años, se ha observado que diferentes subtipos de cáncer presentan un incremento de la fosforilación oxidativa, donde una mayor actividad mitocondrial se relaciona con mayor agresividad, sugiriéndose que las células cancerosas puedan beneficiarse metabólicamente de la mitocondria funcional [28]. Así, por ejemplo, en la línea celular de cáncer de mama MCF7, derivada de un adenocarcinoma epitelial de glándula mamaria, el sistema OXPHOS contribuye en un 80% al total de la energía celular [26].

La proteína reguladora principal del metabolismo energético y la biogénesis mitocondrial es el coactivador 1 α del receptor activado gamma del proliferador de peroxisoma (PGC-1 α), que actúa coordinando la actividad y expresión de multitud de factores de transcripción [30]. El regulador co-transcripcional PGC-1 α induce la biogénesis mitocondrial activando los factores de respiración nuclear 1 y 2 (NRF1 y 2) que, a su vez, en conjunto, promueven la expresión del factor de transcripción mitocondrial A (TFAM) [27]. NRF1 activa la expresión de componentes

de la cadena de transporte electrónico (ECT), transportadores mitocondriales y proteínas ribosomales mitocondriales, además de regular la expresión de TFAM, siendo por tanto una proteína importante para la expresión coordinada de genes nucleares y mitocondriales. TFAM es un factor de transcripción que actúa regulando la transcripción y replicación del DNA mitocondrial (mtDNA), punto esencial en la biogénesis mitocondrial [25,27] (Figura 3). Algunos estudios asocian un aumento de la biogénesis mitocondrial y la expresión de PGC1- α , NRF1, NRF2 y TFAM con una mayor crecimiento tumoral en ciertos tipos de cáncer [28].

La función y estructura mitocondrial puede ser regulada por la activación de los receptores ER α y ER β por unión del estradiol [11,31]. Los estrógenos han mostrado que estimulan la fosforilación oxidativa, inhiben la apoptosis y promueven la biogénesis mitocondrial [14]. Se ha observado que la interacción entre el estradiol y el ER α promueven la expresión de PGC1- α y NRF1 [32], entre otros, a través de la proteína SIRT3 y FOXO3A. En cuanto al rol de ER β , algunos estudios lo han implicado como un supresor tumoral en cáncer de mama [11]. Se ha visto que el ER β colocaliza en la mitocondria (mtER β) y media los efectos estrógenicos sobre la mitocondria, pudiendo aumentar el DNAm_t, incrementar la capacidad respiratoria, elevar la actividad antioxidante e inhibir la apoptosis [14]. El mtER β es capaz de interaccionar con

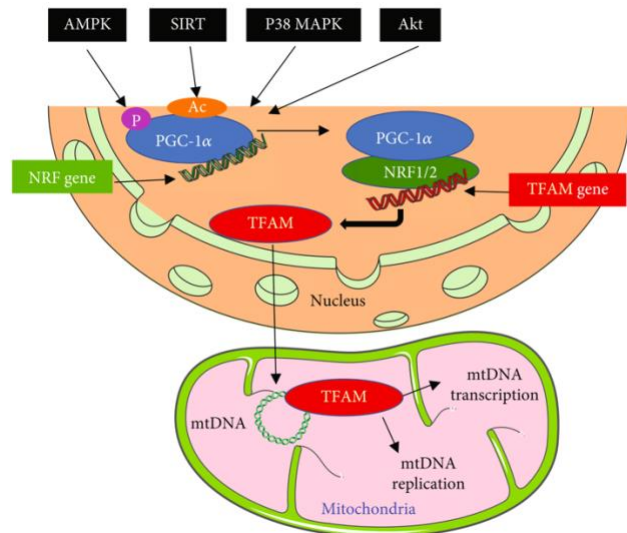


Figura 3. Regulación de la biogénesis mitocondrial por la vía PGC-1 α , NRF1/2, TFAM. El PGC-1 α activado promueve la expresión de los factores de transcripción NRF1/2, y en conjunto, promueven la expresión de TFAM. TFAM es un regulador transcripcional mitocondrial que, tras ser sintetizado en el núcleo, es importado a la mitocondria para estabilizar el mtDNA, promover su replicación y la transcripción de los genes de la ETC codificados en el mtDNA. Extraído de [41].

NRF1 y TFAM para estimular la biogénesis mitocondrial y cumplir los requerimientos energéticos necesarios de la célula tumorigénica para su progresión [32]. Por tanto, el efecto de los estrógenos sobre la mitocondria, a través de su interacción con ER α y ER β , queda por seguir siendo estudiado y elucidado [11].

En conjunto, existe una compleja interrelación recíproca entre el tejido adiposo y el tejido mamario tumoral, donde el secretoma adipocitario, alterado por la obesidad, reprograma a las células de la glándula mamaria y estimula a las células tumorales de cáncer de mama para promover su progresión y proliferación [33]. Así, se ha observado que la hiperleptinemia asociada a la obesidad promueve la inflamación crónica de bajo grado, estimulando la producción de citoquinas inflamatorias entre las cuales se encuentran TNF α y IL-6. Estas tres adipoquinas, con grandes niveles de secreción por parte del tejido adiposo en individuos obesos, han demostrado regular al alza la síntesis de la aromatasa y estrógenos, y la expresión de sus receptores ER, promoviendo un efecto de crecimiento tumoral y metástasis [6]. Pocos estudios *in vitro* han considerado la influencia de la obesidad en el comportamiento de la célula cancerosa, teniéndose poco conocimiento sobre los mecanismos celulares potenciales que llevan a la progresión cancerígena en la obesidad y el estado inflamatorio [33].

Objetivo experimental

La correlación entre la obesidad y la aparición de cáncer de mama pone de manifiesto la influencia de las adipoquinas secretadas por parte del tejido adiposo sobre el desarrollo y progresión tumoral de las células cancerígenas mamarias [33]. El estrógeno y la leptina son dos hormonas secretadas por los adipocitos en grandes cantidades en condiciones de obesidad, dónde además se instaura un estado de inflamación crónico marcado por relevantes citoquinas proinflamatorias como el TNF α y la IL-6 [6]. Así, se ha proporcionado como tratamiento un cóctel inflamatorio formado por 17 β -estradiol, leptina, IL-6 y TNF α (ELIT) que representa un modelo de las condiciones hormonales circulantes en una mujer obesa postmenopáusica. Bajo estas condiciones, se ha trabajado con las líneas celulares de cáncer de mama MCF7 y T47D, diferenciadas por el contenido de ER α y ER β que expresan, presentando las células MCF7 una elevada ratio ER α /ER β frente a las T47D, con una ratio ER α /ER β baja [31]. El objetivo experimental del presente estudio es analizar la biogénesis mitocondrial a nivel de expresión génica, proteica y mediante ensayos funcionales en las líneas celulares MCF7 y T47D expuestas al tratamiento inflamatorio ELIT.

Materiales y Métodos

Reactivos

Se ha obtenido el medio *Dulbecco's modified Eagle's medium without red phenol* (DMEM sin rojo fenol) de la casa comercial GIBCO (Paisley, UK). El suero fetal bovino (Fetal bovine serum, FBS), la penicilina y estreptomicina provienen de Biological Industries (Kibbutz Beit Haemek, Israel). Los componentes del tratamiento, la leptina, 17β -estradiol, IL-6 y TNF α , se han adquirido de Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA). Por último, los reactivos de rutina proviene de varias casas comerciales: Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA), Roche (Barcelona, España), Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA) y Panreac (Barcelona, España).

Cultivo de células y tratamiento

Las líneas celulares de cáncer de mama MCF7 y T47D se obtuvieron de American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA). Las células se sembraron e hicieron crecer en el medio DMEM sin rojo fenol suplementado con FBS al 10% (v/v) y una mezcla de antibióticos (penicilina y estreptomicina) al 1% (v/v), y fueron incubadas en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂ y a 37 °C. El tratamiento consistió en un coctel inflamatorio compuestos por leptina (100 ng/mL), 17β -estradiol (10nM), TNF α (10 ng/mL) y IL-6 (50 ng/mL), que simulaba las concentraciones fisiológicas circulantes de dichos componentes en mujeres obesas. A las 24 h de sembrar, con una confluencia celular del 80-90%, se retiraba el medio DMEM y se suministraba el tratamiento en medio DMEM fresco durante 48 h, tras lo cual se procedía a realizar las mediciones y ensayos correspondientes.

PCR cuantitativa (qPCR)

Las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos a razón de 400.000 células/pocillo en caso de las células MCF7 y 600.000 células/pocillo en las T47D, y tras alcanzar una confluencia cercana al 80% a las 24 h, fueron sometidas a 4 y 24 h de tratamiento con el cóctel inflamatorio. El RNA total de las células tratadas fue aislado usando el reactivo Tripure® (Roche, Barcelona, España) y cuantificado utilizando el espectrofotómetro BioSpec-nano a 260 nm (Shimadzu Biotech, Kioto, Japón). Un microgramo de RNA total fue retrotranscrito a cDNA a 42 °C durante 60 min con 25 U de retrotranscriptasa MuLV en 10 μ L de volumen del mix de reacción (10 mM Tris-HCl a pH 9.0; 50 mM KCl; 0.1% Triton X-100; 2.5 mM MgCl₂; 2.3 mM de hexámeros aleatorios, 10 U inhibidor de RNasa y 500 mM de cada dNTP). El cDNA obtenido

fue diluido 1/10 y sus alícuotas fueron guardadas congeladas (-20 °C) hasta el momento de realizar la qPCR.

Los genes analizados por qPCR, la secuencia de sus cebadores sentido y antisentido (adquiridos en TIB MOLBIOL, Grupo Taper, IDT) y la temperatura de hibridación se muestran en la **Tabla 1**. La qPCR se realizó utilizando la tecnología de SYBR Green en el termociclador LightCycler 480 System II (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza). El volumen total de reacción fue de 10 µL, conteniendo 7.5 µL de Lightcycler® 480 SYBR Green I Master (con una concentración de 0.5 µM de los cebadores específicos sentido y antisentido), además de 2.5 µL de cDNA. El programa de amplificación consistía en un paso de preincubación para la desnaturalización del cDNA (5 min, 95 °C), seguido de 30 ciclos de un paso de desnaturalización (10 s, 95 °C), un paso de hibridación según la temperatura de hibridación específica de cada gen y un último paso de elongación de la cadena (12 s, 72 °C). Además, se estudió también la temperatura de fusión para comprobar la amplificación del correspondiente amplicón deseado. En cada ensayo se realizó un control negativo carente de cDNA para evitar posibles contaminaciones. Los valores Ct de la qPCR fueron analizados y procesados teniendo en cuenta la eficiencia de la reacción y en base a la expresión del gen GAPDH como *housekeeping* utilizando el programa GenEx Standard Software (Multi-DAnalises, Suecia).

Tabla 1. Secuencias nucleotídicas sentido y antisentido de los cebadores específicos de cada gen y su temperatura de hibridación (°C) en la cuantificación de su expresión génica por qPCR.

Gen	Abreviación	Forward Primer (5'-3') Reverse Primer (5'-3')	Temperatura de hibridación (°C)
Subunidad 1 citocromo c oxidasa	COX I	TACGTTGTAGCCCACTTCCACT GGATAGGCCGAGAAAGTGTGT	62
Subunidad 4 citocromo c oxidasa	COX IV	AACGAGTGGAAGACGGTTGT TCATGTCCAGCATCCTCTTG	61
ATP sintasa subunidad F1	ATPasa F1	CATTGTGGACGTTCCAGTTG ATTGGCACCAAGCTATCCAC	55
Factor de respiración nuclear 1	NRF1	CCACGTTACAGGGAGGTGAG TGTAGCTCCCTGCTGCATCT	60

Factor de respiración nuclear 2	NRF2	GCGACGGAAAGAAGTATGAGC GTTGGCAGATCCACTGGTTT	60
Proteína de unión a DNA monocatenario	mtSSB	TGTGAAAAAGGGGTCTCGAA TGGCCAAAGAAGAATCATCC	60
Coactivador 1 α del receptor activado gamma del proliferador de peroxisoma	PGC-1 α	TCAGTCCTCACTGGTGGACA TGCTTCGTCGTCAAAAACAG	60
Factor de transcripción mitocondrial A	TFAM	GTGGTTTTTCATCTGTCTTGGC ACTCCGCCCTATAAGCATCTT	60
Proteína desacopladora 2	UCP2	ACAAGACCATTGCCCGAGAG GGCAAGGGAGGTCATCTGTC	60
Twinkle	Twinkle	GGGAGGAGGTGCTAGGAGAA TTCCTGGCTTGCTTTGGCT	61
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	GAPDH	CCACTCCTCCACCTTTGACG CTGGTGGTCCAGGGGTCTTA	60

Western Blot

Tras la siembra de 400.000 células/pocillo para MCF7 y 600.000 células/pocillo para T47D en placas de 6 pocillos, un periodo de crecimiento de 24 h y uno de tratamiento con el cóctel inflamatorio de 48 h, las células fueron recogidas con tripsina (0.25%) en 200 μ L de tampón RIPA (1 mM EDTA , 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.5% deoxicolato, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5) con inhibidores de proteasas (10 μ M Pepstatina, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF y 2 mM PMSF). Seguidamente, las células fueron lisadas mediante sonicación (40% de amplitud) durante 7-10 segundos en 3 pulsos (VibraCell 75185). La muestra era centrifugada a 14.000 xg durante 10 minutos a 4 °C y descartado el precipitado. La concentración proteica del sobrenadante fue determinada mediante el kit de ensayo del ácido bicinconónico (BCA™) (Pierce, Bonn, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La electroforesis se realizó en gel de poliacrilamida al 12% (a excepción de la proteína PGC-1 α , que fue al 8%) tras cargar 10 μ g de proteína de la muestra por pocillo previamente mezclada en tampón de carga (50% glicerol, 10% SDS, 300 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.05% azul de bromofenol, 10% de β -mercaptoetanol) y hervida 5 minutos. La etapa de *stacking*

(concentración de la muestra) se realizó a un voltaje de 80 V durante 15 minutos y el *resolving* a un voltaje de 150 V durante aproximadamente 60 minutos. Se realizó una transferencia semiseca de los geles de poliacrilamida a membranas de nitrocelulosa de 0.22 μm (Bio-Rad) mediante el sistema de transferencia Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad).

Las membranas se incubaron en una solución de bloqueo de leche en polvo desnatada al 5% en buffer salino Tris con Tween-20 (20 mM Tris-HCl, 0.13 mM NaCl y 0.05% Tween-20) (TBS-Tween) durante 1 h en agitación continua. Tras tres lavados rápidos y tres lentos (10 minutos cada uno en agitación) en TBS-Tween se incubaron con los anticuerpos primarios *overnight* a 4 °C cómo se indica en la **Tabla 2**. Al día siguiente, tras realizar el mismo proceso de lavados, las membranas fueron incubadas con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (Santa Cruz Biotechnology, Texas, CA, USA) de conejo o ratón, según el animal de origen del anticuerpo primario, en una dilución 1:10000 en TBS-Tween y leche desnatada en polvo al 2%. El paso final de revelado se realizó mediante el kit Immun-Star® Western C® (Bio-rad), leyéndose la señal quimioluminiscente con el densitómetro ChemiDoc XRS (Bio-rad). Para cuantificar las bandas obtenidas se empleó el software Quantity One (Bio-Rad).

Tabla 2. Características de los anticuerpos primarios utilizados para realizar el Western Blot. OXPPOS: 5 anticuerpos primarios simultáneos para detectar los complejos I-V de la ETC; PGC-1 α : coactivador 1 α del receptor activado gamma del proliferador de peroxisoma; GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa;

Anticuerpo primario	Peso Molecular (KDa)	Dilución	Animal de origen	Número Catálogo	Casa Comercial
OXPPOS	53-20	1:500	Mouse	ab110411	Abcam, Bristol, UK
PGC-1α	92	1:500	Rabbit	sc-13067	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
GAPDH	37	1:1000	Rabbit	sc-25778	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA

Análisis del contenido de cardiolipina

El contenido de cardiolipina fue analizado por el ensayo fluorimétrico de Naranja de Acridina Nonil (NAO), un colorante catiónico capaz de unirse selectivamente a la cardiolipina, lípido exclusivo de la membrana interna mitocondrial. Se sembraron 16.000 células/pocillo de MCF7 y 32.000 células/pocillo de T47D en placas de fluorímetro de 96 pocillos, se dejaron crecer 24 h hasta una confluencia cercana al 80% y, posteriormente, se sometieron a un tratamiento ELIT de 48 h. Se incubó la placa con NAO 250 nM durante 30 min y cuantificó utilizando el lector fluorescente de microplacas FLx800 (BIO-TEK Winooski, Vermont, USA) configurado a una onda de excitación de 485/20 nm y de emisión de 528/20 nm. La fluorescencia se corrigió por el ensayo de Hoescht 33342 (Sigma-Aldrich) en el mismo lector de fluorescencia a una excitación de 360/40 nm y de emisión de 469/40 nm.

Análisis de masa mitocondrial

La masa mitocondrial fue determinada fluorimétricamente por el ensayo de Mitotracker Green FM (MTG, Life Technologies, Paisley, UK). Se sembraron 16.000 células/pocillo de MCF7 y 32.000 células/pocillo de T47D en placas de fluorímetro de 96 pocillos, dejándose crecer 24 h hasta una confluencia del 80% y tratándose durante 48 h con el cóctel inflamatorio ELIT. Las células fueron incubadas con MTG 100 nM durante 40 min y la medición de la fluorescencia fue realizada en el lector fluorescente de microplacas FLx800 (BIO-TEK Winooski, Vermont, USA) configurado a una onda de excitación de 490 nm y de emisión de 516 nm. Los valores fueron normalizados al número de células viables por el ensayo de Hoescht 33342 (Sigma-Aldrich) en el mismo lector de fluorescencia a una excitación de 360/40 nm y de emisión de 469/40 nm.

Análisis estadístico

Se utilizó el software estadístico SPSS (Statistical Program for the Social Sciences, versión 25.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Los datos se han representado como las medias \pm error estándar de la media (SEM) y al grupo control se le ha asignado un valor absoluto del 100%, respecto al cual se ha comparado los otros grupos experimentales. La diferencia entre los grupos experimentales se comparó mediante la prueba t-student por muestras independientes. Se ha considerado y representado con un asterisco (*) una diferencia significativa de un p-valor < 0.05, mientras que una diferencia establecida en un p-valor < 0.10 se ha representado con una almohadilla (#).

Resultados

En primer lugar, se determinó la expresión génica a 4 y 24 h de tratamiento ELIT de los genes tardíos en el proceso de biogénesis mitocondrial, siendo éstos mtSSB, Twinkle, COX I, COX IV y ATPasa F1, en las dos líneas celulares de cáncer de mama MCF7 y T47D. En las células MCF7, todos los genes, a excepción de COX I y Twinkle, presentan una disminución estadísticamente significativa en las 4 primeras horas de tratamiento respecto al grupo control, que se vuelve más acentuada después de 24 h de tratamiento, en las que se observan bajadas de alrededor del 50% en todos los genes a excepción de COX I (**Figura 4**).

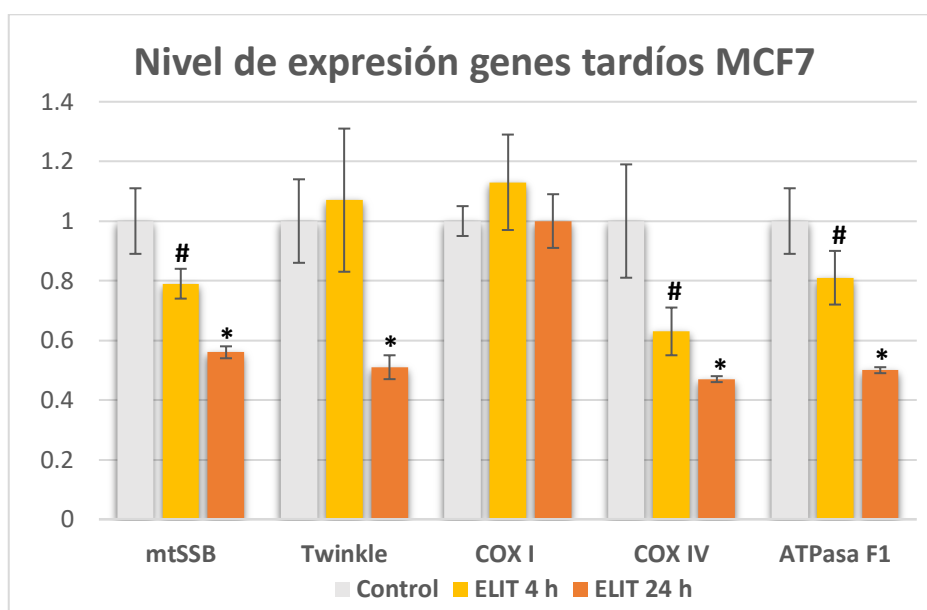


Figura 4. Representación gráfica de los niveles de expresión de los genes tardíos de la biogénesis mitocondrial en la línea celular MCF7. *,#: Diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control (prueba t-Student: $p < 0.05$, $p < 0.10$, respectivamente).

En caso de la línea celular T47D, Twinkle y COX presentan valores de expresión por encima del 200% respecto al grupo control a las 4h. Por la parte de Twinkle, sus niveles siguen manteniéndose por encima del 200% a las 24 h de tratamiento, mientras que, en el caso de COX I, los niveles a 24 h retornan a unos niveles no diferentes significativamente del grupo control. Los genes mtSSB, COX IV y ATPasa F1 muestran un patrón de expresión a la baja con una diferencia significativa a las 4 h, mientras que tales bajadas requieren de un intervalo de confianza mayor para ser estadísticamente significativas a las 24 h de tratamiento (**Figura 5**).

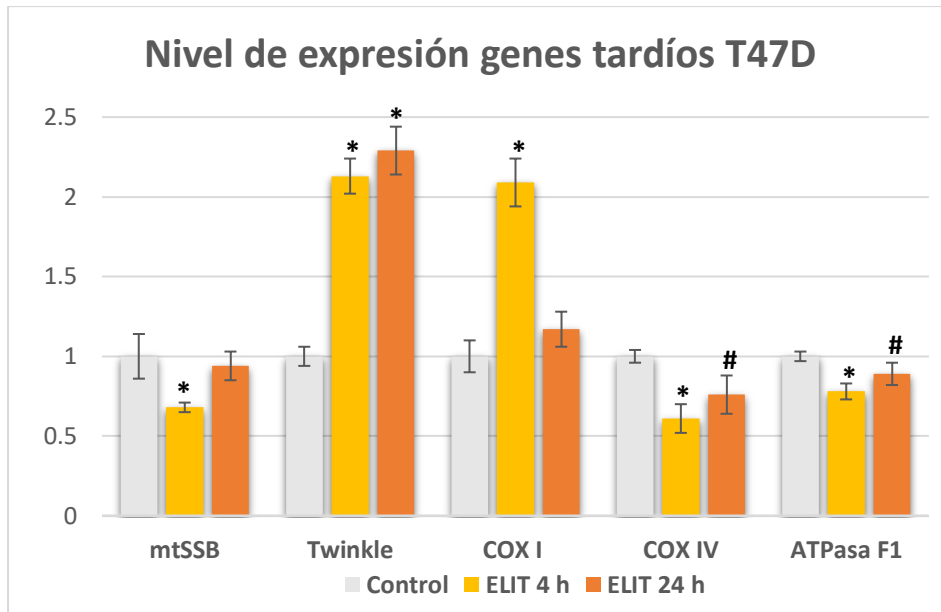


Figura 5. Representación gráfica de los niveles de expresión de los genes tardíos de la biogénesis mitocondrial en la línea celular T47D. *,#: Diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control (prueba t-Student: $p < 0.05$, $p < 0.10$, respectivamente).

Tras conocer los niveles de expresión génica, se quiso conocer los niveles proteicos de los complejos mitocondriales del sistema OXPHOS mediante Western Blot. Tal como se observa en la **Figura 6**, a las 48 h de tratamiento en las células MCF7, los niveles de todos los complejos mitocondriales, a excepción del complejo III, decaen drásticamente a niveles del 29% del complejo I, 28% en el complejo II, 21% en el complejo IV y del 45% en caso del complejo V, con una diferencia estadísticamente significativa.

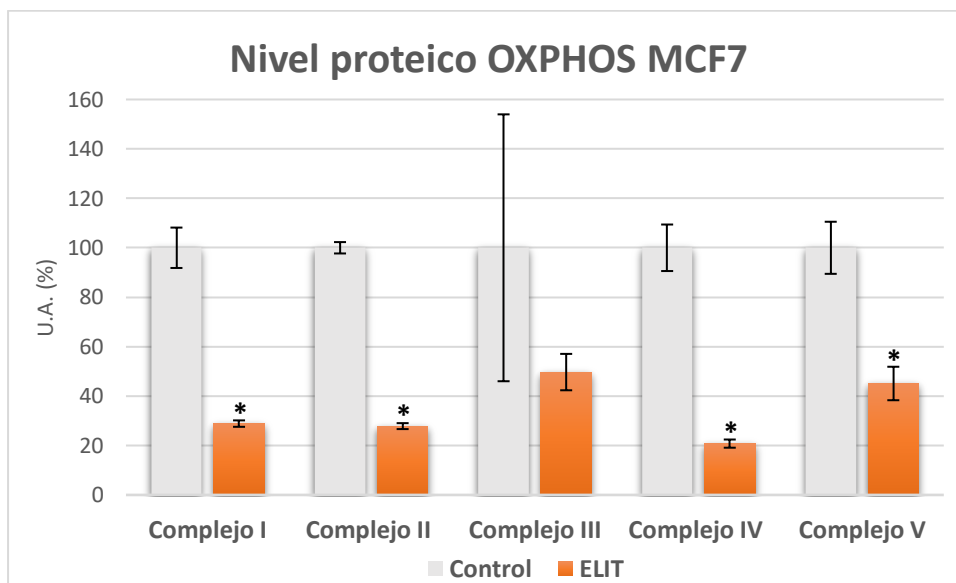


Figura 6. Representación gráfica de los niveles proteicos de los complejos mitocondriales del sistema OXPHOS en la línea celular MCF7 en el grupo control (gris) y grupo tratamiento ELIT a 48 h (naranja). *: Diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control (prueba t-Student: $p < 0.05$).

En la línea celular T47D, los niveles proteicos de los componentes de la ETC se mantienen sin diferencias estadísticamente significativas tras el tratamiento, a excepción del complejo IV, que baja a un valor del 65% respecto a su grupo control (**Figura 7**). Los resultados del complejo III del grupo control presentan un gran error experimental, razón por la que debería repetirse dicha determinación.

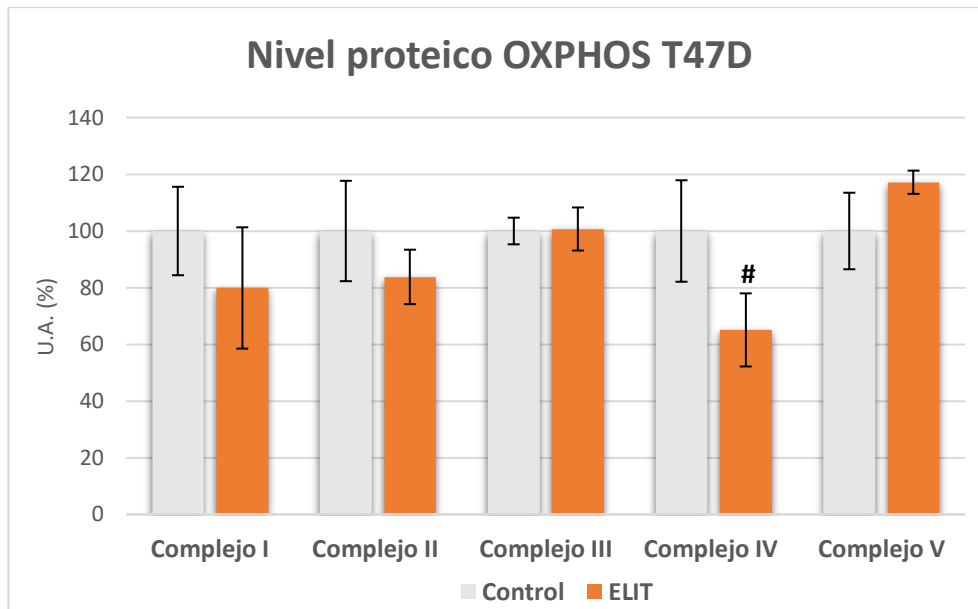


Figura 7. Representación gráfica de los niveles proteicos de los complejos mitocondriales del sistema OXPHOS en la línea celular T47D en el grupo control (gris) y grupo tratamiento ELIT a 48 h (naranja). #: Diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control (prueba t-Student: $p < 0.10$).

Además, se realizó los ensayos funcionales MTG y NAO para comprobar las diferencias de masa mitocondrial y el contenido de cardiolipina, respectivamente, entre el grupo control y el grupo tratamiento ELIT de 48 h.

Tabla 3. Resultados de la masa mitocondrial (MTG) y contenido de cardiolipina (NAO) en las líneas celulares MCF7 y T47D del grupo control y tratamiento ELIT de 48 h. *: Diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control (prueba t-Student: $p < 0.05$).

	MCF7		T47D	
	Control	ELIT	Control	ELIT
Masa mitocondrial (MTG) (%)	100 ± 5	76 ± 11*	100 ± 13	117 ± 33

Contenido de				
cardiolipina	100 ± 5	206 ± 9*	100 ± 1	114 ± 9
(NAO) (%)				

Como se observa en la **Tabla 3**, la masa mitocondrial de las células MCF7 disminuye significativamente un 24% respecto al control cuando se someten al tratamiento. En caso del contenido de cardiolipina, el tratamiento eleva sus niveles en un 106% de forma significativa, llegando a doblar los niveles de cardiolipina el grupo tratamiento respecto al control. Respecto a línea celular T47D, tanto la masa mitocondrial como el contenido de cardiolipina no muestran diferencias significativas entre los dos grupos experimentales.

Al conocer el estado de la expresión génica, niveles proteicos y medidas funcionales en torno a la biogénesis mitocondrial, se procedió a estudiar la expresión génica de los genes nucleares tempranos, como PGC-1 α , NRF1 y TFAM, reguladores principales del proceso de biogénesis mitocondrial. La **Figura 8** presenta los niveles de expresión de tales genes en la línea celular MCF7. A las 24 h de tratamiento, se observa una bajada estadísticamente significativa de cerca del 60% en NRF1 y TFAM respecto al grupo control. Por lo contrario, la expresión génica de PGC-1 α no varía significativamente a las 4 ni 24 h de tratamiento.

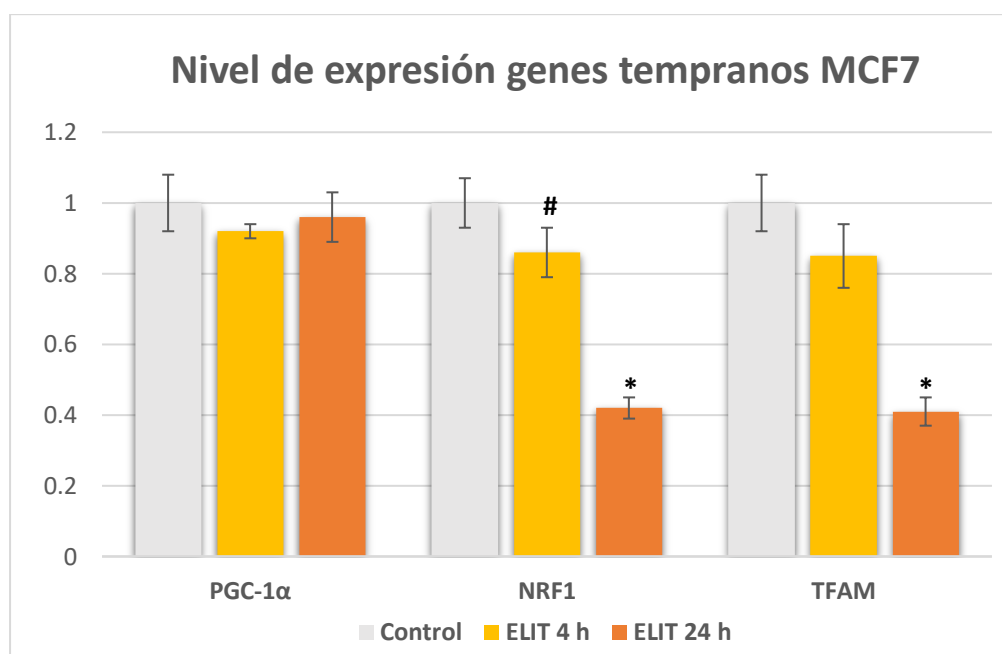


Figura 8. Representación gráfica de los niveles de expresión de los genes tempranos reguladores de la biogénesis mitocondrial en la línea celular MCF7. *, #: Diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control (prueba t-Student: $p < 0.05$, $p < 0.10$, respectivamente).

En cuanto a la línea T47D, los niveles a las 4 h de PGC-1 α disminuyen a un 62%, mientras que los de NRF1 sufren una ligera subida a un 113%. A las 24 h de tratamiento, no existen diferencias significativas entre los grupos experimentales y el control en ninguno de los genes tempranos analizados (**Figura 9**).

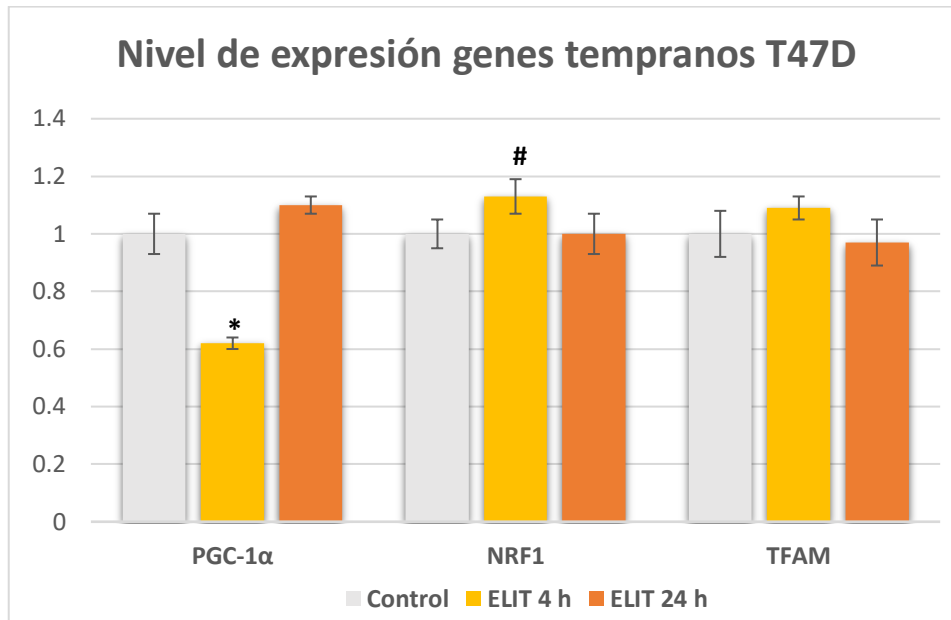


Figura 9. Representación gráfica de los niveles de expresión de los genes tempranos reguladores de la biogénesis mitocondrial en la línea celular T47D. *, #: Diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control (prueba t-Student: $p < 0.05$, $p < 0.10$, respectivamente).

Se comprobó los niveles de proteína por Western Blot del PGC-1 α , al ser un cofactor clave y central en el proceso de biogénesis mitocondrial (**Figura 10**). En la línea celular MCF7 se observó un aumento estadísticamente significativo del 42% en el grupo tratamiento ELIT de 48 h respecto al grupo control. Por el contrario, las células T47D no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre las medias de ambos grupos experimentales.

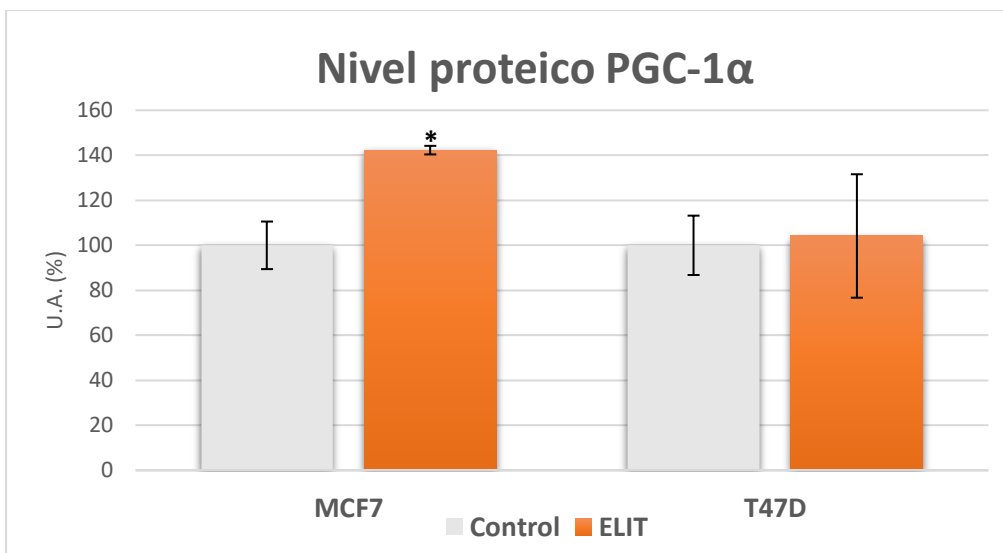


Figura 10. Representación gráfica del nivel proteico de PGC-1 α en ambas líneas celulares MCF7 y T47D en el grupo control (gris) y grupo tratamiento ELIT a 48 h (naranja). *: Diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control (prueba t-Student: $p < 0.05$).

Por último, se analizó la expresión génica de otro de los elementos clave en la red de regulación nuclear de la biogénesis mitocondrial, el receptor de estrógenos alfa relacionado (ERR α), un receptor nuclear huérfano no regulado por ligandos estrogénicos que presenta homología en la secuencia de DNA con el ER α [27]. En su caso, en la línea MCF7 sus niveles disminuyen en un 31% a las 24 h de tratamiento respecto al grupo control. Sin embargo, la línea T47D muestra unos niveles aumentados significativamente tanto a las 4 como 24 h de tratamiento ELIT, con unos valores de 160% y 222%, respectivamente, respecto al grupo control (**Figura 11**).

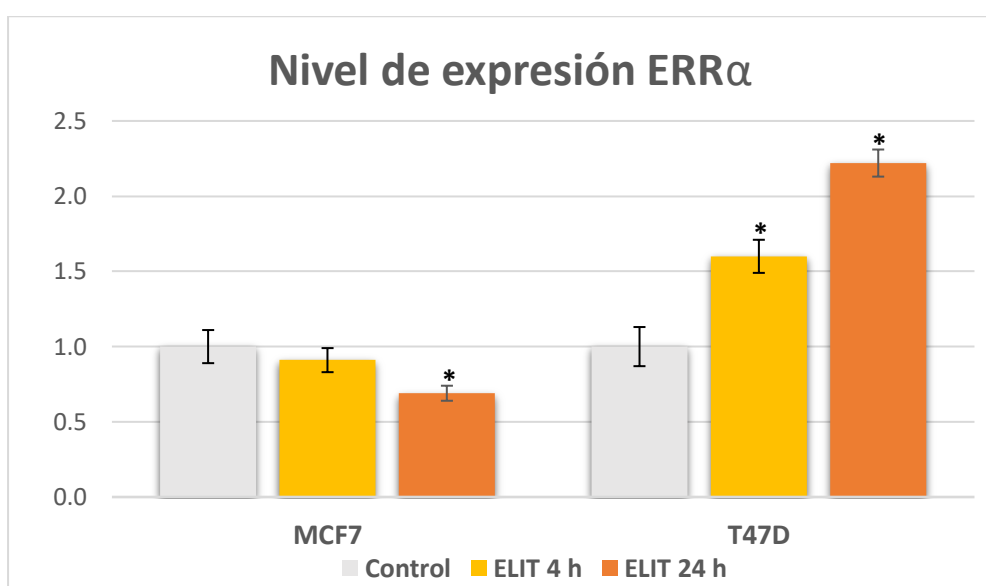


Figura 11. Representación gráfica de los niveles de expresión del ERR α en ambas líneas celulares MCF7 y T47D. *: Diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control (prueba t-Student: $p < 0.05$).

Discusión

Se ha constatado una diferencia a nivel de expresión génica de genes tardíos y niveles proteicos OXPHOS en la biogénesis mitocondrial entre las dos líneas celulares MCF7 y T47D. Aparentemente, la biogénesis mitocondrial se encuentra más perjudicada en la línea MCF7 cuando se expone al tratamiento ELIT que la línea T47D, que presenta, por lo general, niveles de expresión génica y proteica no diferentes entre el grupo control y el tratado. Se observa una disminución marcada e importante de genes tardíos que representan el estado de la biogénesis mitocondrial, como mtSSB, Twinkle, COX IV y ATPasa, en las células MCF7. El gen mtSSB es un elemento crucial conservado evolutivamente en la replicación y el mantenimiento del mtDNA [34], importante en el proceso de biogénesis mitocondrial al unirse y estabilizar la cadena monocatenaria del mtDNA durante su replicación. Siguiendo esta línea, Twinkle es la helicasa mitocondrial codificada por el DNA nuclear que actúa durante la replicación del mtDNA y se ha observado que su sobreexpresión se relaciona con una mayor biogénesis mitocondrial [35]. Así, la expresión de estos dos genes se encuentra significativamente disminuida a las 24 h de tratamiento en la línea MCF7. Mientras, las células T47D mantienen los mismos niveles de mtSSB a las 24 h de tratamiento y Twinkle incrementa más del doble su expresión a las 4 y 24 h de tratamiento respecto al grupo control, lo que es indicativo de una biogénesis mitocondrial mantenida o incluso incrementada en la línea T47D. De la misma manera, la expresión de la subunidad I de la COX se encuentra aumentada significativamente a las 4 h de tratamiento en T47D mientras que no se modifica en las células MCF7. En cuanto a la subunidad IV de la COX y la ATPasa F1, su expresión se encuentra disminuida en las dos líneas celulares, aunque no es tan pronunciada ni tan significativa en caso de las células T47D.

Tales evidencias se comprobaron a nivel de expresión proteica de los complejos del sistema de fosforilación oxidativa OXPHOS. Se observó una disminución muy remarcada de todos los complejos mitocondriales, a excepción del complejo III, lo que es indicativo de una condición deteriorada de la biogénesis mitocondrial en la línea MCF7. Sin embargo, los niveles proteicos de los complejos mitocondriales en las células T47D se mantienen sin diferencias significativas respecto al control, a excepción del complejo IV, que presenta cierta disminución en un intervalo de confianza amplio, lo que es muestra de una biogénesis mitocondrial que consigue mantenerse y adaptarse frente al tratamiento inflamatorio. El ensayo funcional de MTG,

indicador de la masa mitocondrial presente en las células, confirmó lo postulado con los datos de expresión génica y proteica. La línea celular MCF7 mostró una disminución significativa de su masa mitocondrial tras el tratamiento ELIT de 24 h, mientras que la línea T47D consiguió mantenerla en unos niveles similares al control. El conjunto de estos datos muestra que la biogénesis mitocondrial se encuentra mermada en la línea celular MCF7 tras exponerse al tratamiento inflamatorio, tanto a nivel de expresión génica y proteica como de masa mitocondrial, mientras que la línea T47D es capaz de mantener unos niveles de biogénesis y masa mitocondrial similares al grupo control. Este hecho podría indicar que la biogénesis mitocondrial de las células cancerígenas T47D es capaz de hacer frente y adaptarse a las condiciones inflamatorias que sufriría una mujer obesa posmenopáusicas.

A continuación, se analizaron los niveles de mRNA de genes tempranos nucleares responsables del control y regulación de la biogénesis mitocondrial, con el objetivo de entender las diferencias previamente expuestas entre ambas líneas cancerígenas. Las células MCF7 presentaron muy bajos niveles de expresión génica de NRF1 y TFAM, fundamentales en la regulación mitocondrial, mientras que los niveles de expresión de PGC-1 α no mostraron diferencias significativas entre grupos experimentales. Por parte de T47D, la expresión génica de estos 3 productos génicos no muestra diferencias estadísticamente significativas a las 24 h de tratamiento respecto al grupo control. Estos resultados ponen de manifiesto una disminución de la capacidad de regulación de la biogénesis mitocondrial en las células MCF7, mientras que las T47D es capaz de mantener los factores de transcripción nucleares en unos niveles suficientes como para que no se vea mermada si biogénesis mitocondrial. Sin embargo, estas observaciones no explican la subida tan pronunciada de genes tardíos como Twinkle o COX I en la línea celular T47D.

El PGC-1 α es un cofactor regulador central del metabolismo mitocondrial, con un rol primordial en la biogénesis mitocondrial [30], razón por la cuál se decidió comprobar sus niveles de expresión proteica a las 48 h de tratamiento ELIT. Se observó un aumento significativo del 40% respecto al control de los niveles de esta proteína en la línea celular MCF7, mientras que T47D no mostró diferencias significativas entre grupos experimentales. Tales resultados se explican por la necesidad de las células MCF7 de aumentar la biogénesis mitocondrial que se encuentra en estado perjudicado, lo que implicaría recuperar capacidad de síntesis de ATP e intermediarios metabólicos mitocondriales, por lo que se recurre a la elevación de la producción del PGC-1 α para llevar a cabo tal propósito. Por el otro lado, las

células T47D, aunque no eleven los niveles del cofactor, sí son capaces de mantener estable y en buen estado una población mitocondrial suficiente y similar al del grupo control. Ante tal situación, se postuló la implicación de otro factor aún no analizado que presentase un comportamiento diferencial y pudiese explicar las diferencias observadas en el estado de la biogénesis mitocondrial entre ambas líneas celulares.

Por tanto, se estudió la expresión génica del ERR α como otro factor regulador clave en el control de la biogénesis mitocondrial. En la línea MCF7 se observó un descenso significativo de cerca del 30% de su expresión. Sin embargo, las células T47D mostraron unos niveles mayores del 220% en la expresión de este factor a las 24 h de tratamiento inflamatorio respecto al grupo control. El ERR α pertenece a una superfamilia de receptores nucleares independientes de la activación por estrógenos, que podría activarse constitutivamente en falta de ligando. Su expresión es inducida y activada por PGC-1 α y los dos factores en conjunto son capaces de unirse a elementos de respuesta y promover el inicio y la elongación de la transcripción de genes diana metabólicos y mitocondriales [25]. Así, se postula el ERR α como posible factor responsable de la diferencia de la tasa de biogénesis mitocondrial entre ambas líneas celulares, dónde la mayor expresión del receptor nuclear en la línea T47D permite un mantenimiento del *pool* mitocondrial en la célula. Los niveles elevados de ERR α podrían explicar la elevación pronunciada de algunos genes tardíos, como Twinkle y COX I, en T47D. Además, estos datos también sugieren una razón en la discrepancia entre la baja tasa de biogénesis mitocondrial a pesar de los altos niveles proteicos de PGC-1 α en MCF7. Se postula que los bajos niveles de ERR α dificultarían la acción de los factores de transcripción nucleares, fundamentalmente el PGC-1 α , para mantener la expresión de genes tardíos importantes en la biogénesis mitocondrial. En contraste, pese a los valores proteicos similares al grupo control de PGC-1 α en la línea T47D durante el tratamiento, los altos niveles de expresión del ERR α posibilitarían una comunicación adecuada entre el genoma nuclear y mitocondrial para mantener estable el *pool* mitocondrial ante las condiciones de inflamación a las que se exponen las células. Además, se ha observado que la vía de STAT3, que en caso del presente tratamiento, la leptina y, sobretudo, la acción de la IL-6 activarían dicha vía, regula al alza la expresión de ERR α , ya que STAT3 fosforilado puede unirse a su promotor y promover su transcripción [36], pudiendo ser ésta una vía por la cual el tratamiento administrado incrementa los niveles de mRNA de ERR α .

Una de las diferencias fundamentales a nivel molecular entre las dos líneas celulares estudiadas es el contenido de los receptores nucleares ER α y β , en la que las células MCF7 presentan una elevada ratio ER α /ER β , mientras que la línea T47D muestra una ratio ER α /ER β baja. Así, los resultados obtenidos pueden sugerir que las distintas tasas de biogénesis mitocondrial observadas en las líneas celulares pueden ser debidas a los diferentes niveles de ERs presentes en las células, pudiendo tener éstas una acción diferencial sobre la regulación del proceso de biogénesis mitocondrial. Pese a no haberse esclarecido completamente el rol del ER β en el cáncer de mama, algunos estudios sugieren que su presencia estimula la biogénesis mitocondrial contribuyendo al potencial tumorigénico de la célula cancerosa. Además, se ha comprobado que el mtER β es capaz de interactuar con NRF1 y TFAM, incrementando la transcripción de COX I y IV, estimulando así la biogénesis mitocondrial [14]. Esto concordaría con los resultados obtenidos, dónde la presencia de mayores proporciones de ER β en la línea T47D parece capacitar a la célula para responder mejor al tratamiento inflamatorio manteniendo la biogénesis mitocondrial estable y en buenas condiciones. Teniendo en cuenta que los pacientes con tumores de ratios ER α /ER β bajas presentan peor prognosis [37], queda por elucidar si el mejor estado mitocondrial de las células T47D contribuye a la resistencia por parte de las células cancerígenas a condiciones de estrés, como es la inflamación asociada a la obesidad.

Por último, la cardiolipina, lípido exclusivo de la membrana interna mitocondrial, es un requerimiento para la actividad de la COX, el complejo I y III, y juega un papel importante en la biogénesis mitocondrial [38,39]. Además, la cardiolipina es necesaria para la formación de los supercomplejos mitocondriales, unas estructuras que comprenden la asociación física de varios complejos mitocondriales dando mayor eficiencia en el transporte de electrones a través de la ETC y disminuyendo así la producción de ROS [40]. El aumento tan pronunciado del contenido de cardiolipina en las células MCF7 respecto a la no variación de sus niveles entre grupos experimentales en las T47D han sido unos resultados algo inesperados dado lo expuesto previamente hasta el momento, los cuales parecen indicar una biogénesis lastrada en MCF7 y mantenida en T47D. Esta aparente discrepancia podría correlacionarse con el mismo comportamiento al alza de los niveles proteicos de PGC-1 α , que en conjunto se interpreta como un intento de las células MCF7 para conservar la biogénesis mitocondrial, aunque no lo consigue en última instancia. Sería interesante complementar estos resultados con el análisis de los niveles de los supercomplejos mitocondriales en las dos líneas celulares

por la técnica electroforética BN-PAGE, comprobando la formación de éstos según una mayor tasa de biogénesis mitocondrial en T47D o un mayor contenido de cardiolipina en MCF7.

Con perspectivas de futuro, los siguientes pasos a dar continuando este estudio serían verificar el aparente rol clave del $ERR\alpha$ en el mantenimiento de la biogénesis mitocondrial, evidenciado en los resultados de la línea T47D. Se analizaría la respuesta de la mitocondria ante una inhibición de la expresión génica del $ERR\alpha$ mediante una técnica de silenciamiento, como un RNA pequeño de interferencia (siRNA), dónde se esperaría una incapacidad de las células T47D de mantener su biogénesis mitocondrial a los mismos niveles que el grupo control ante el tratamiento inflamatorio. Por otro lado, queda por explorar y elucidar el papel del $ER\beta$ en la respuesta mitocondrial en el cáncer de mama, estudiada en este contexto a través de la biogénesis mitocondrial, debido a su importancia a nivel clínico. Se propone la inhibición de la expresión del $ER\beta$ en la línea celular T47D y la sobreexpresión de éste en la MCF7, con la finalidad de comprobar si el cambio de la ratio $ER\alpha/ER\beta$ antagoniza el comportamiento de la biogénesis mitocondrial respecto a las líneas celulares sin cambios en la expresión del $ER\beta$.

Conclusión

Se ha comprobado que un tratamiento modelo de la inflamación que sufre una mujer postmenopáusica obesa afecta diferencialmente a la biogénesis mitocondrial de dos líneas celulares de cáncer de mama con diferencias en su ratio $ER\alpha/ER\beta$. La biogénesis mitocondrial de la línea MCF7, que presenta una ratio $ER\alpha/ER\beta$ elevada, se encuentra mermada y disminuida, con genes implicados en la biogénesis mitocondrial expresados a la baja, disminución de los niveles proteicos de OXPHOS y menor masa mitocondrial. Sin embargo, la línea T47D es capaz de mantener una población mitocondrial estable, con una masa mitocondrial y sistema OXPHOS prácticamente inalterados respecto a su grupo control. Se propone el gen $ERR\alpha$ como un factor clave responsable de la diferencia del estado del *pool* mitocondrial entre las dos líneas celulares, al presentar un patrón de expresión marcadamente diferente tras exponerse al tratamiento inflamatorio. Queda por esclarecer en detalle el papel del $ER\beta$ sobre la situación mitocondrial, y la propia expresión del $ERR\alpha$, en las células de cáncer de mama, cómo la relación entre el receptor y la mitocondria influye sobre las características tumorales de la célula cancerígena y la relevancia clínica del estudio del $ER\beta$ en el diagnóstico y tratamiento de pacientes con cáncer de mama.

Bibliografía

- [1] C. Armitage, R. Dargie, and D. Payne, "Survival at all costs," *Nature*, vol. 580, 2020.
- [2] N. Harbeck *et al.*, *Breast cancer*, vol. 5, no. 1. 2019.
- [3] Z. Q. Tao, A. Shi, C. Lu, T. Song, Z. Zhang, and J. Zhao, "Breast Cancer: Epidemiology and Etiology," *Cell Biochem. Biophys.*, vol. 72, no. 2, pp. 333–338, 2015, doi: 10.1007/s12013-014-0459-6.
- [4] Globocan and World Health Organization, "Breast Cancer Fact Sheet," 2019.
- [5] E. E. Calle and R. Kaaks, "Overweight, obesity and cancer: Epidemiological evidence and proposed mechanisms," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 4, no. 8, pp. 579–591, 2004, doi: 10.1038/nrc1408.
- [6] C. Himbert, M. Delphan, D. Scherer, L. W. Bowers, S. Hursting, and C. M. Ulrich, "Signals from the adipose microenvironment and the obesity-cancer link-a systematic review," *Cancer Prev. Res.*, vol. 10, no. 9, pp. 494–506, 2017, doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-16-0322.
- [7] A. Macciò and C. Madeddu, "Obesity, inflammation, and postmenopausal breast cancer: therapeutic implications.," *ScientificWorldJournal.*, vol. 11, pp. 2020–36, 2011, doi: 10.1100/2011/806787.
- [8] V. Simone *et al.*, "Obesity and Breast Cancer: Molecular Interconnections and Potential Clinical Applications.," *Oncologist*, vol. 21, no. 4, pp. 404–17, Apr. 2016, doi: 10.1634/theoncologist.2015-0351.
- [9] R&D Systems, "Obesity, Adipocytokines, and Breast Cancer." <https://www.rndsystems.com/resources/articles/obesity-adipocytokines-and-breast-cancer> (accessed Apr. 08, 2020).
- [10] J. Li and X. Han, "Adipocytokines and breast cancer," *Curr. Probl. Cancer*, vol. 42, no. 2, pp. 208–214, 2018, doi: 10.1016/j.currprobcancer.2018.01.004.
- [11] C. M. Klinge, "Estrogenic control of mitochondrial function," *Redox Biol.*, vol. 31, no. August 2019, p. 101435, 2020, doi: 10.1016/j.redox.2020.101435.
- [12] A. Purohit, S. P. Newman, and M. J. Reed, "The role of cytokines in regulating estrogen synthesis: implications for the etiology of breast cancer," *Breast Cancer Res.*, pp. 2–6, 2002.
- [13] N. Harbeck *et al.*, "Breast cancer," *Nat. Rev. Dis. Prim.*, vol. 5, no. 1, 2019, doi: 10.1038/s41572-019-0111-2.
- [14] T. L. Liao, C. R. Tzeng, C. L. Yu, Y. P. Wang, and S. H. Kao, "Estrogen receptor- β in mitochondria: implications for mitochondrial bioenergetics and tumorigenesis," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1350, no. 1, pp. 52–60, 2015, doi: 10.1111/nyas.12872.
- [15] D. G. Pons, M. Torrens-Mas, M. Nadal-Serrano, J. Sastre-Serra, P. Roca, and J. Oliver, "The presence of Estrogen Receptor β modulates the response of breast cancer cells to therapeutic agents," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 66, pp. 85–94, 2015, doi: 10.1016/j.biocel.2015.07.014.
- [16] J. Sastre-Serra, M. Nadal-Serrano, D. G. Pons, P. Roca, and J. Oliver, "The over-expression of ERbeta modifies estradiol effects on mitochondrial dynamics in breast cancer cell line," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 45, no. 7, pp. 1509–1515, 2013, doi: 10.1016/j.biocel.2013.04.007.
- [17] N. Yin *et al.*, "Molecular mechanisms involved in the growth stimulation of breast cancer cells by leptin," *Cancer Res.*, vol. 64, no. 16, pp. 5870–5875, 2004, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0655.

- [18] S. Shouman, M. Wagih, and M. Kamel, "Leptin influences estrogen metabolism and increases DNA adduct formation in breast cancer cells," *Cancer Biol. Med.*, vol. 13, no. 4, pp. 505–513, Dec. 2016, doi: 10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0079.
- [19] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of cancer: The next generation," *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [20] S. I. Grivennikov, F. R. Greten, and M. Karin, "Immunity, Inflammation, and Cancer," *Cell*, vol. 140, no. 6, pp. 883–899, 2010, doi: 10.1016/j.cell.2010.01.025.
- [21] A. Mantovani, P. Allavena, A. Sica, and F. Balkwill, "Cancer-related inflammation," *Nature*, vol. 454, no. 7203, pp. 436–444, 2008, doi: 10.1038/nature07205.
- [22] S. W. Cole, "Chronic inflammation and breast cancer recurrence," *J. Clin. Oncol.*, vol. 27, no. 21, pp. 3418–3419, 2009, doi: 10.1200/JCO.2009.21.9782.
- [23] S. M. Crusz and F. R. Balkwill, "Inflammation and cancer: Advances and new agents," *Nature Reviews Clinical Oncology*, vol. 12, no. 10. Nature Publishing Group, pp. 584–596, Oct. 24, 2015, doi: 10.1038/nrclinonc.2015.105.
- [24] I. Nassiri, A. Inga, E. M. Meškytė, F. Alessandrini, Y. Ciribilli, and C. Priami, "Regulatory Crosstalk of Doxorubicin, Estradiol and TNF α Combined Treatment in Breast Cancer-derived Cell Lines," *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-51349-9.
- [25] F. Sanchis-Gomar, J. Garcia-Gimenez, M. Gomez-Cabrera, and F. Pallardo, "Mitochondrial Biogenesis in Health and Disease. Molecular and Therapeutic Approaches," *Curr. Pharm. Des.*, vol. 20, no. 35, pp. 5619–5633, 2014, doi: 10.2174/1381612820666140306095106.
- [26] K. Księżakowska-Łakoma, M. Żyła, and J. R. Wilczyński, "Mitochondrial dysfunction in cancer.," *Prz. menopauzalny = Menopause Rev.*, vol. 13, no. 2, pp. 136–44, May 2014, doi: 10.5114/pm.2014.42717.
- [27] F. R. . and S. G. I. Jornayvaz, "Regulation of mitochondrial biogenesis," *Essays Biochem.*, vol. 47, pp. 1–15, 2014, doi: 10.1042/bse0470069.Regulation.
- [28] U. E. Martinez-Outschoorn, S. Pavlides, F. Sotgia, and M. P. Lisanti, "Mitochondrial biogenesis drives tumor cell proliferation.," *Am. J. Pathol.*, vol. 178, no. 5, pp. 1949–52, May 2011, doi: 10.1016/j.ajpath.2011.03.002.
- [29] O. Warburg, "The Metabolism of Carcinoma Cells," *J. Cancer Res.*, vol. 9, no. 1, pp. 148–163, Mar. 1925, doi: 10.1158/jcr.1925.148.
- [30] P. Puigserver and B. M. Spiegelman, "Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α (PGC-1 α): Transcriptional coactivator and metabolic regulator," *Endocr. Rev.*, vol. 24, no. 1, pp. 78–90, 2003, doi: 10.1210/er.2002-0012.
- [31] J. Sastre-Serra, M. Nadal-Serrano, D. G. Pons, A. Valle, J. Oliver, and P. Roca, "The effects of 17 β -estradiol on mitochondrial biogenesis and function in breast cancer cell lines are dependent on the ER α /ER β Ratio," *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 29, no. 1–2, pp. 261–268, 2012, doi: 10.1159/000337607.
- [32] K. A. Mattingly, M. M. Ivanova, K. A. Riggs, N. S. Wickramasinghe, M. J. Barch, and C. M. Klinge, "Estradiol stimulates transcription of nuclear respiratory factor-1 and increases mitochondrial biogenesis," *Mol. Endocrinol.*, vol. 22, no. 3, pp. 609–622, 2008, doi: 10.1210/me.2007-0029.
- [33] A. J. Hoy, S. Balaban, and D. N. Saunders, "Adipocyte–Tumor Cell Metabolic Crosstalk in Breast Cancer," *Trends Mol. Med.*, vol. 23, no. 5, pp. 381–392, 2017, doi: 10.1016/j.molmed.2017.02.009.
- [34] G. Wang *et al.*, "Upregulation of mtSSB by interleukin-6 promotes cell growth through

- mitochondrial biogenesis-mediated telomerase activation in colorectal cancer," *Int. J. Cancer*, vol. 144, no. 10, pp. 2516–2528, 2019, doi: 10.1002/ijc.31978.
- [35] M. Ikeda *et al.*, "Overexpression of TFAM or twinkle increases mtDNA copy number and facilitates cardioprotection associated with limited mitochondrial oxidative stress," *PLoS One*, vol. 10, no. 3, pp. 1–19, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0119687.
- [36] J. H. Ma *et al.*, "STAT3 targets ERR- α to promote epithelial-mesenchymal transition, migration, and invasion in triple-negative breast cancer cells," *Mol. Cancer Res.*, vol. 17, no. 11, pp. 2184–2195, 2019, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-18-1194.
- [37] J. Sastre-Serra *et al.*, "The oxidative stress in breast tumors of postmenopausal women is ER α /ER β ratio dependent," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 61, pp. 11–17, 2013, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.005.
- [38] M. L. Genova and G. Lenaz, "Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes," *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, vol. 1837, no. 4, pp. 427–443, 2014, doi: 10.1016/j.bbabi.2013.11.002.
- [39] G. Paradies, V. Paradies, F. M. Ruggiero, and G. Petrosillo, "Role of Cardiolipin in Mitochondrial Function and Dynamics in Health and Disease: Molecular and Pharmacological Aspects," *Cells*, vol. 8, no. 7, p. 728, 2019, doi: 10.3390/cells8070728.
- [40] J. A. Enríquez, "Supramolecular Organization of Respiratory Complexes," no. December 2015, 2016, doi: 10.1146/annurev-physiol-021115-105031.