

w\_title

w\_authors La capsaicina activa AMPK en células HepG2 a través de CaMKK $\beta$ .Alicia Bort<sup>a</sup>, Belén Sánchez Gómez<sup>b</sup>, Pedro Mateos-Gómez<sup>c</sup>, Irene de Miguel<sup>d</sup>, Nieves Rodríguez-Henche<sup>e</sup>, Inés Díaz-Laviada<sup>f</sup>

Departamento de Biología de Sistemas, Universidad de Alcalá. 28871, Alcalá de Henares, E-28871, Madrid, España.

a. aliciabort@gmail.com b. belensg.88@gmail.com c. pedroantonio.mateos@uah.es  
d. irenedemiguelgarcia@gmail.com e. nieves.rhenche@uah.es f. ines.laviada@uah.es

IV Congreso de Señalización Celular, SECUAH 2019.

20-22 de marzo, 2019. Universidad de Alcalá. Alcalá de Henares, Madrid. España

Sesión de paneles.

**Palabras clave:** capsaicina; HepG2; AMPK; CaMKK**Resumen**

Los compuestos naturales que tienen efectos beneficiosos para la salud han tomado relevancia como nuevos fármacos, al presentar la capacidad de modular distintos procesos celulares. Dentro de este grupo encontramos la capsaicina que es la responsable de la "sensación de calor" que produce el picante. Recientemente ha provocado gran interés debido a sus efectos antitumorales en muchos tipos de células, aunque su mecanismo de acción en muchos casos no ha sido descrito. Como recientemente se ha descrito que la desregulación metabólica es una característica de las células cancerosas y la quinasa activada por AMP (AMPK) es el sensor clave en el metabolismo, nos planteamos si la capsaicina es capaz de modular la actividad de AMPK y el posible mecanismo implicado. Los resultados mostraron que la capsaicina activa AMPK en las células HepG2 al aumentar su fosforilación y la de su sustrato directo ACC. Por otro lado, determinamos que la activación de AMPK inducida por capsaicina, se produce a través de la proteína quinasa de la quinasa dependiente de calcio/calmodulina tipo  $\beta$  (CaMKK $\beta$ ). Ya que se bloquea al silenciar CaMKK  $\beta$  con siRNA o al bloquearla farmacológicamente con el inhibidor STO-609. Además, la capsaicina disminuye la viabilidad celular en células HepG2, efecto que ejerce a través de la activación de AMPK.

**Cita:** Bort, Alicia; Sánchez Gómez, Belén; Mateos-Gómez, Pedro; de Miguel, Irene; Rodríguez-Henche, Nieves; Díaz-Laviada, Inés (2019) La capsaicina activa AMPK en células HepG2 a través de CaMKK $\beta$ . Actas del IV Congreso de Señalización Celular, SECUAH 2019. 20-22 de marzo, 2019. Universidad de Alcalá. Alcalá de Henares, Madrid. España. Sesión de paneles. *dianas* 8 (1): e201903fa03. ISSN 1886-8746 (electronic) <http://www3.uah.es/dianas?e201903fa03>. URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

**Copyright:** © Bort A, Sánchez-Gómez B, Mateos-Gómez P, de-Miguel I, Rodríguez-Henche N, Díaz-Laviada I. Algunos derechos reservados. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

**Introducción**

El cáncer hepático o carcinoma hepatocelular (HCC) es un cáncer de alta incidencia dentro de los cánceres primarios hepáticos y una de las neoplasias malignas más comunes y letales en todo el mundo a pesar del continuo desarrollo de diversas estrategias terapéuticas. El principal tratamiento es la cirugía, pero no es posible en estados avanzados de la enfermedad, siendo el pronóstico para pacientes con HCC avanzado extremadamente pobre debido a las altas tasas de recurrencia y metástasis. Esto ha generado la necesidad de buscar nuevos fármacos para el HCC (1).

Los compuestos naturales y los productos dietéticos proporcionan un área de investigación interesante debido a su baja toxicidad y su potente eficacia. La capsaicina (CAP) es un alcaloide natural y el principal ingrediente activo de los pimientos picantes que pertenecen al género *Capsicum*. Es la responsable de la sensación de calor o ardor que se experimenta al contacto con los chiles. Aunque tradicionalmente se asocia con efectos analgésicos, se ha propuesto recientemente que la capsaicina también muestra actividad antitumoral en varios tipos de células y aumenta la sensibilidad de las células cancerosas a los fármacos citotóxicos (2-4). Además, los datos de laboratorio respaldan la idea de que la capsaicina podría actuar como un medicamento contra la obesidad al aumentar el gasto de energía (5-7).

El hígado es el principal órgano metabólico y se ha descrito que la desregulación del metabolismo causa enfermedades hepáticas, incluido el cáncer. Las células cancerosas se someten a una reprogramación

metabólica para satisfacer las demandas de energía de un crecimiento continuo. Incluso en presencia de oxígeno, los tumores mantienen la glucólisis anaeróbica para asegurar niveles suficientes de carbohidratos intermedios para las reacciones anabólicas, como lo describió Otto Warburg (8). Por lo tanto, estudiar las reacciones metabólicas en las células cancerosas puede ser una nueva estrategia terapéutica para esta enfermedad.

El sensor metabólico clave para el estado de energía celular es la quinasa activada por AMP (AMPK). Su activación conduce a la activación de vías catabólicas para restaurar los niveles de ATP. AMPK es una serín/treonín quinasa heterotimérica, compuesta por una subunidad catalítica  $\alpha$  y dos subunidades reguladoras  $\beta$  y  $\gamma$ . La activación de AMPK está regulada por la fosforilación y la modulación alostérica. La fosforilación en el residuo conservado de Thr172 en el dominio catalítico  $\alpha$  aumenta aproximadamente 500 veces la actividad de AMPK.

Las principales quinasas situadas por encima de la cascada de fosforilación de AMPK son la quinasa hepática B1 (LKB1) y la quinasa dependiente de  $Ca^{2+}$ /calmodulina de tipo  $\beta$ , (CaMKK $\beta$ , también conocida como CaMKK2) y TASK (9). Además, AMPK puede activarse alostéricamente por unión de nucleótidos a la subunidad gamma, lo cual produce un cambio conformacional que aumenta la actividad de AMPK. Esto se da en situaciones de estrés celular en los que la relación AMP/ATP aumenta, provocando que AMP se una a subunidad gamma de AMPK ejerciendo una activación alostérica y un aumento de la actividad de AMPK en 5 veces (10).

La importancia de AMPK como objetivo terapéutico en el cáncer está comenzando a describirse. Los datos clínicos sugieren un mayor beneficio de la terapia anticancerígena en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 tratados con metformina, un activador de AMPK (11). También se ha observado recientemente que AMPK puede estar involucrada en la aparición de fenotipos resistentes. Por ejemplo, la pérdida de LKB1 en las células de cáncer de mama aumenta la agresividad, la capacidad de migración y la aparición del fenotipo de células troncales, mientras que la activación de LKB1 y, en consecuencia, de AMPK, reduce la formación de mamosferas y la expresión de factores pluripotentes (12).

Por lo tanto, AMPK está emergiendo como un nuevo objetivo terapéutico que, a través del metabolismo y la regulación de la señalización, podría reducir la progresión del cáncer. En el presente estudio examinamos si CAP podría modular AMPK en células HCC HepG2.

## Materiales y Metodos

### Reactivos químicos usados

La capsaicina se obtuvo de Tocris (Ellisville, EE. UU.). STO-609 se obtuvo de Sigma (St. Louis, MO, EE. UU.). El inhibidor de AMPK Dorsomorfina se obtuvo de Tocris Bioscience (Bristol, Reino Unido).

### Cultivo de células

Se utilizó la línea celular tumoral epitelial de hígado humana HepG2 (ATCC N° BH-8065) obtenida de ATCC (*American Type Culture Collection*, Rockville, MD, USA). Es una línea celular que proviene de un varón caucásico de 15 años de edad. La línea celular se descongela en pases bajos, y se mantiene hasta un máximo de 25 pases. Las células se cultivaron de manera rutinaria en frascos de cultivo con medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de solución de antibiótico, a 37°C en un ambiente húmedo y con un 5% de CO<sub>2</sub>. El medio se cambiaba cada cuatro días y cuando las células llegaban a un 70 % de confluencia, se les añadía tripsina/EDTA para levantarlas y se recogían con medio para volver a sembrar.

### Viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó mediante el método del bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich). En resumen, se sembró un total de 5000 células / pocillo en una placa de 12 pocillos en un volumen final de 1 ml. Después de los tratamientos, se añadieron 20  $\mu$ l de solución MTT (5 mg / ml en PBS) al medio y las células se incubaron a 37 ° C durante 4 h. Luego, se descartó el sobrenadante y se añadió isopropanol para disolver los cristales de formazano. Los tratamientos se llevaron a cabo por triplicado. La densidad óptica en cada pocillo se evaluó midiendo la absorbancia a 490 y 650 nm usando un lector de microplacas (ELX 800 Bio-Tek Instruments, INC). Los valores de IC50 se calcularon usando GraphPad Prism frente a 6.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EE. UU.). La viabilidad celular también se determinó contando células viables y muertas mediante tinción con azul tripán. Se contaron las células negativas y positivas de Trypan azul usando un contador celular automatizado Countess™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.). Los resultados se expresaron en relación con el número total de células contadas.

## Western Blot

Las células se lisaron en tampón de lisis (Tris 50 mM, pH 7,4, NaCl 0,8 M, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, Triton X-100 al 0,1%) que contenían inhibidores de la proteasa y cócteles inhibidores de la fosfatasa (Roche, Basilea, Suiza). Las concentraciones de proteína se midieron mediante el ensayo de proteínas BioRad™ (Richmond, CA, EE. UU.). Se separó una cantidad igual de proteína (20 µg) de cada muestra en geles de SDS-PAGE al 8% y se transfirió a membranas de PVDF (BioRad). Las membranas se bloquearon con tampón de bloqueo (1 × TBS, 0,1% de Tween 20 con 5% p / v de leche descremada sin grasa), se lavaron e incubaron con anticuerpos primarios a 4 ° C durante 12 h. Las membranas se lavaron posteriormente con TBS-T (1 × TBS y 0,1% de Tween 20) y se incubaron con anticuerpos IgG anti-ratón o anti-conejo conjugados con peroxidasa de rábano picante (Sigma, St Louis, MO, EE. UU.) A temperatura ambiente durante 1 h. El complejo inmune se visualizó con un sistema ECL (Cell Signaling Technology). Las películas se analizaron por densitometría. El anti-pAMPK $\alpha$ 1-thr172, pACC-ser79, pLKB1 y los anticuerpos contra las formas totales y anti-CaMKK $\beta$  correspondientes se obtuvieron de Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EE. UU.). Todos los demás productos químicos se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO, EE. UU.).

## Silenciamiento de AMPK y CaMKK

Para silenciar AMPK o CaMKK, las células HepG2 se transfectaron con 5 nM de siRNAs interferentes selectivos para AMPK o CaMKK y un control negativo siRNA (Ambion-Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) utilizando lipofectamina RNAi Max (Life Technologies, España) y siguiendo las instrucciones del fabricante. El control del silenciamiento de las proteínas se llevó a cabo mediante transferencia Western usando anticuerpos específicos de AMPK y CaMKK $\beta$ , respectivamente, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EE. UU.

## Microscopia de fluorescencia

Los cambios morfológicos en la cromatina nuclear de las células que experimentan apoptosis se detectaron mediante tinción con el fluorocromo de unión al ADN 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Las células se cultivaron en cubreobjetos de vidrio y después del tratamiento, los cubreobjetos se incubaron con una gota de 1 µg / ml de DAPI durante 20 min. Luego se lavaron los cubreobjetos en PBS, se montaron con Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE. UU.) Y se observaron por microscopía de fluorescencia.

## Determinación de apoptosis

Se utilizó el Kit comercial *Annexin V-FITC apoptosis detection Kit* (BD, Nueva Jersey). Las células se sembraron en placas de seis pocillos a una densidad de 15x10<sup>3</sup> células/cm<sup>2</sup>. Una vez finalizados los tratamientos las células se tripsinizaron y se centrifugaron a 400 g durante 5 min a 4 °C. Posteriormente, se resuspendieron en 150µl de tampón de unión, se añadieron 5µl de Anexina V-FITC y se incubaron 15 min en oscuridad a temperatura ambiente. Finalizado el tratamiento, se añadieron 300µl de tampón de unión y 5µl de yoduro de propidio (1mg/ml). Las células se analizaron con un citómetro FACSCalibur.

## Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante una prueba de ANOVA de una vía seguida de la diferencia mínima significativa de Fisher (LSD) o la prueba de comparación múltiple de Tukey, usando el intervalo de confianza del 95%. Cuando se indicó, la prueba t de Student se realizó para comparar la activación de AMPK entre los grupos tratados con **8c** y los grupos de control. La estadística se realizó con Microsoft Office Excel 2013. Los niveles de significación se definieron como P <0.05 (\*, #) y P <0.01 (\*\*, ##). Todos los gráficos fueron dibujados usando el software de Origin.

## Resultados

### La capsaicina activa AMPK en células HepG2

Para estudiar si la capsaicina activa AMPK en las células HepG2 del carcinoma hepatocelular, incubamos las células con capsaicina durante 1 hora y determinamos la fosforilación de AMPK en Thr172, así como la fosforilación de el objetivo de AMPK aguas debajo de su principal sustrato Acetil CoA carboxilasa (ACC).

### La Ca-calmodulina quinasa quinasa $\beta$ está implicada en la activación de AMPK por capsaicina en células HepG2

AMPK puede ser fosforilada por dos quinasas principales, LKB1 y la proteína quinasa dependiente de calcio / calmodulina quinasa  $\beta$ , CaMKK $\beta$ . Para estudiar qué quinasa estuvo involucrada en la activación de AMPK inducida por capsaicina, determinamos los niveles de fosforilación de LKB1 en

ser428 después del tratamiento celular con capsaicina. Como se muestra en la figura 2, la fosforilación de LKB1 no aumentó, ni los niveles de LKB1 total, lo que indica que la capsaicina no activa o aumenta los niveles de LKB1 en las células HepG2.

Para continuar con nuestro estudio, investigamos la participación de CaMKK $\beta$ . Primero, pretratamos las células con el inhibidor de CaMKK STO-609 y determinamos la activación de AMPK. Como observamos en la Figura 3 A, el pretratamiento con STO-609 evitó tanto la fosforilación de AMPK como la fosforilación de ACC, lo que indica que CaMKK $\beta$  era el mecanismo subyacente de la activación dependiente de capsaicina de AMPK. Para confirmar este hallazgo, silenciamos CaMKK $\beta$  con siRNA selectivo. Como se muestra en la figura 3 B, la regulación negativa de CaMKK $\beta$  bloqueó la fosforilación inducida por capsaicina en AMPK, así como la de ACC, confirmando que CaMKK $\beta$  es la quinasa por encima implicada en la activación de AMPK por capsaicina.

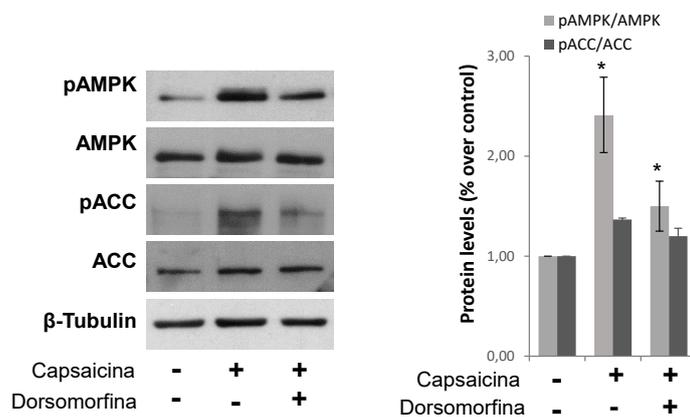


Figura 1. La capsaicina activa AMPK en las células HepG2. Las células se incubaron con capsaicina 200  $\mu$ M en presencia o no de dorsomorfina 10  $\mu$ M durante 1 h y los niveles de pAMPK, pACC y sus formas totales correspondientes se determinaron mediante Western. La  $\beta$ -tubulina sirve como control de carga. El análisis densitométrico de las bandas se muestra a la derecha. Los datos se presentan como la media  $\pm$  SEM de tres experimentos diferentes. \*, p <0.05 comparado con el grupo control y # p <0.05 comparado con capsaicina por la prueba t de Student.

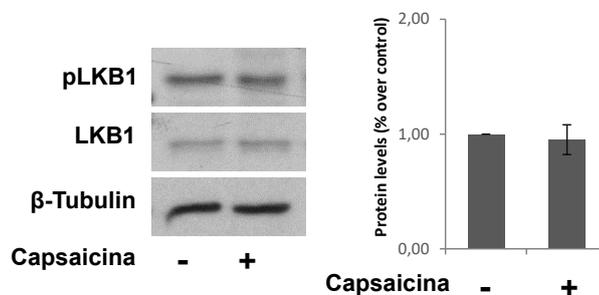


Figura 2. La activación de AMPK es independiente de LKB1. Las células se incubaron con capsaicina 200  $\mu$ M durante 1 h y los niveles de fosfo-LKB1, y el total de LKB1 se determinaron mediante transferencia Western. La  $\beta$ -tubulina sirve como control de carga. El análisis densitométrico de las bandas se muestra a la derecha. Los datos se presentan como la media  $\pm$  SEM de tres experimentos diferentes. \*, p <0.05 comparado con el grupo control y # p <0.05 comparado con capsaicina por la prueba t de Student.

### El efecto antiproliferativo de la capsaicina implica la activación de AMPK

Continuamos estudiando el efecto de la activación de AMPK en la proliferación de células HepG2. Para ello, pretratamos las células con Dorsomorfina y aumentamos las dosis de capsaicina durante 24 horas, midiendo la proliferación celular mediante MTT y recuento celular. Como se muestra en la Figura 4 A, la capsaicina reduce la viabilidad celular y la proliferación celular de forma dependiente de la dosis. El efecto inhibitorio de la capsaicina sobre la viabilidad celular fue bloqueado por el inhibidor de AMPK dorsomorfina, lo que sugiere que la capsaicina inhibe la proliferación celular a través de la AMPK.

Para confirmar la participación de AMPK en la muerte celular inducida por capsaicina, AMPK fue silenciada mediante transfección de células con siRNA selectivo como vemos en la Figura 4B. La eliminación de AMPK redujo el efecto antiproliferativo de la capsaicina en las células HepG2 indicando que AMPK está implicada en el efecto antiproliferativo de la capsaicina.

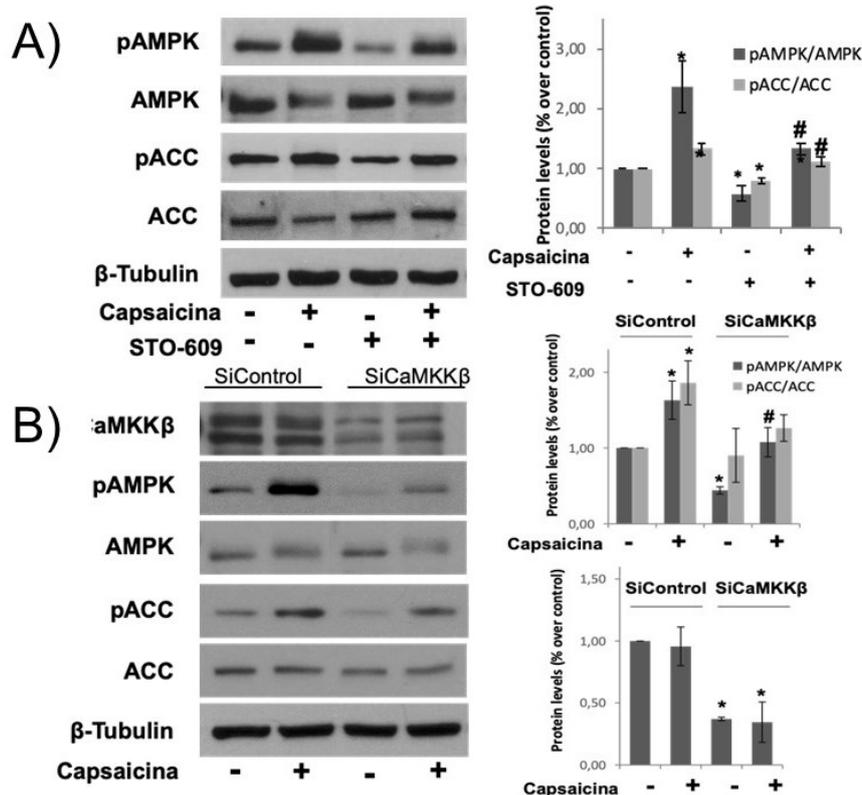


Figura 3. La Ca-calmodulina quinasa quinasa β está implicada en la activación de AMPK por capsaicina en las células HepG2. A), Efecto del inhibidor de CaMKK STO-609 sobre la activación de AMPK. Las células se incubaron previamente con STO-609 10 μM y luego se trataron con capsaicina 200 μM durante 1 hora. Los niveles de pAMPK, pACC y sus formas totales correspondientes se determinaron mediante transferencia Western. B), Las células se transfectoron con siRNA (siControl) o siRNA CaMKKβ selectivo y se incubaron con capsaicina 200 μM durante 1 h. Los niveles de pAMPK, pACC y sus formas totales correspondientes se determinaron por Western blot. La β-tubulina sirve como control de carga. Derecha, el análisis densitométrico de CaMKKβ y el análisis densitométrico de pAMPK y pACC. Los datos se presentan como la media ± SEM de tres experimentos diferentes. \*, p < 0.05 comparado con el grupo control y # p < 0.05 comparado con capsaicina por la prueba t de Student.

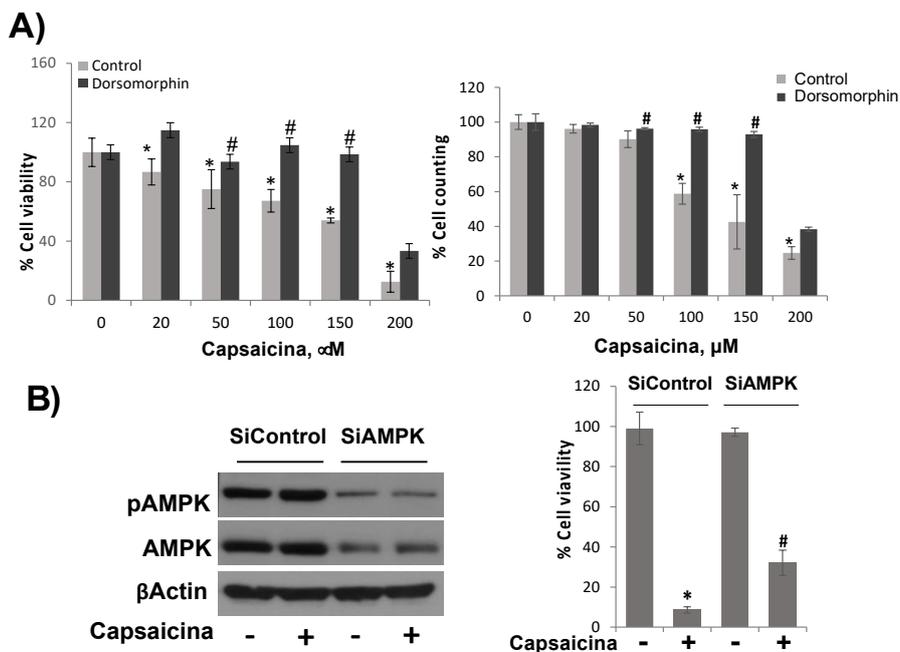


Figura 4. La activación de AMPK está implicada en la muerte celular inducida por capsaicina. A), Efecto del inhibidor de AMPK dorsomorfin sobre la proliferación de células HepG2. Las células se preincubaron con dorsomorfin 10 μM y luego se trataron con dosis crecientes de capsaicina durante 24 horas. Izquierda, viabilidad celular determinada por MTT. Derecha, recuento celular con azul tripán. B), Efecto del silenciamiento de AMPK sobre la muerte de células HepG2 inducida por capsaicina. Las células se transfectoron con siRNA (siControl) o siRNA selectivo de AMPK y se incubaron con capsaicina 200 μM durante 24 h. La viabilidad celular se determinó por MTT. Los datos se presentan como la media ± SEM de tres experimentos diferentes. \*, p < 0.

La capsaicina induce la muerte celular por apoptosis.

Para investigar si el tratamiento con capsaicina indujo apoptosis en células HepG2. Analizamos la apoptosis en células tratadas con capsaicina mediante anexina V / PI y citometría de flujo. Como se ve en la Figura 5 A, el tratamiento con capsaicina indujo un aumento de las células apoptóticas dependiente de la dosis, lo que confirma que la capsaicina induce la muerte de las células HepG2 al promover la apoptosis. Los cuerpos apoptóticos y la contracción de los núcleos podrían observarse mediante microscopía de fluorescencia con la sonda DAPI que tiñe específicamente los núcleos Figura 5 B.

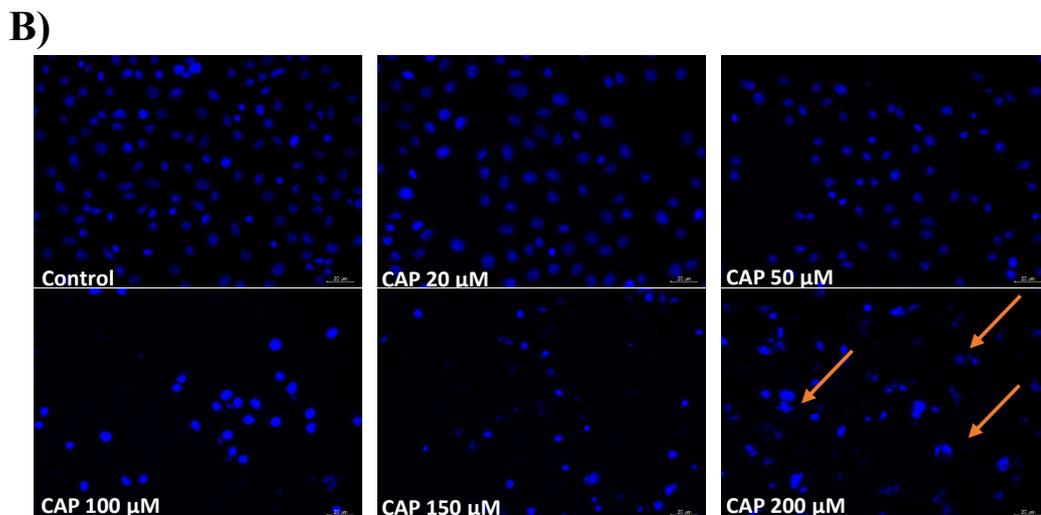
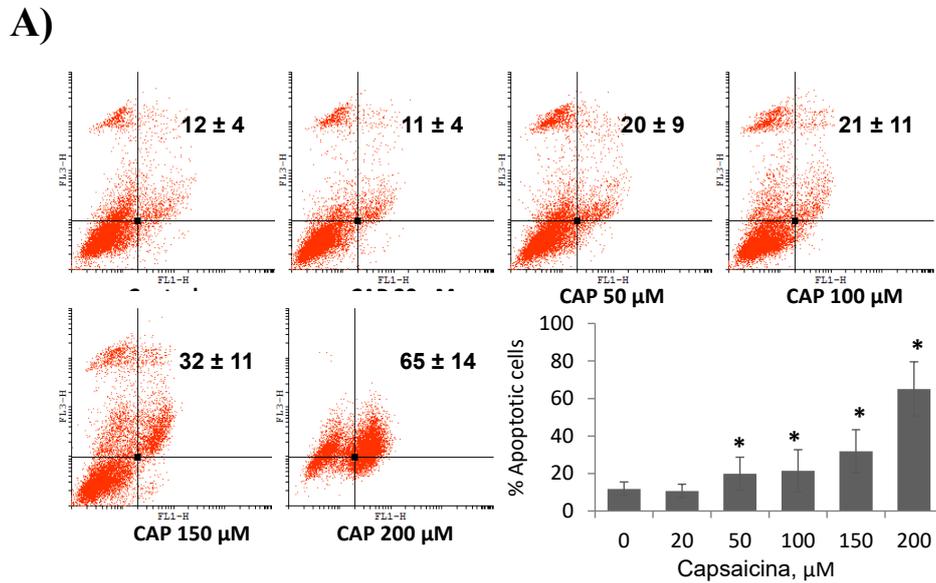


Figura5. Mecanismo de la muerte celular inducida por capsaicina. A), Las células HepG2 se trataron con vehículo (control) o las dosis indicadas de capsaicina, durante 24 horas y luego se tiñeron con anexina V y PI. Los gráficos representan fluorescencia PI (Y ax) versus fluorescencia de anexina V (x ax). Las primeras células apoptóticas (células positivas para anexina V, negativas para PI) y las células apoptóticas tardías (positiva para anexina V, Células positivas para PI) se indican como el porcentaje de células activadas. El histograma representa las células apoptóticas tardías para cada dosis. Los datos son la media  $\pm$  SEM de tres experimentos. \*  $p < 0.05$  vs control comparado por la prueba t de Student. B), las células se trataron con vehículo (control) o las dosis indicadas de capsaicina durante 24 h, los núcleos teñidos con DAPI se detectaron por inmunofluorescencia (azul) 20X. Los cuerpos apoptóticos se indican con una flecha.

## Conclusiones

En la última década, los fitoquímicos se han utilizado mucho como agentes quimioterapéuticos debido a su inhibición del tumor a través de la inhibición del crecimiento, la invasión, la progresión y la metástasis (2).

Además, los fitoquímicos tienen baja toxicidad, bajo coste y aceptación pública como suplementos dietéticos. En particular, la capsaicina ha demostrado ejercer efectos anticancerígenos en una variedad de

tipos de tumores, incluido el hepatocarcinoma, aunque el mecanismo subyacente sigue sin estar claro. La capsaicina presenta propiedades antiobesidad y aumenta el gasto de energía mediante la activación de rutas catabólicas, proporcionando así una estrategia novedosa para modular el metabolismo de las células cancerosas. La homeostasis de las células metabólicas se rige por el sensor de energía AMPK. De hecho, apuntar a AMPK se ha convertido en una estrategia novedosa para la prevención y el tratamiento del cáncer (13).

En este estudio investigamos el mecanismo que sustenta la activación de AMPK por capsaicina y la participación de AMPK en la muerte celular inducida por capsaicina en células de hepatocarcinoma HepG2. Encontramos que la capsaicina activa AMPK al inducir su fosforilación por CaMKK $\beta$ , que se convierten en objetivo potencial para modular la actividad de AMPK y la muerte celular. Por otro lado, la activación de AMPK por capsaicina reduce la viabilidad celular mediante un mecanismo que involucra la apoptosis.

Esto resalta la importancia de estudiar el metabolismo celular para inhibir la proliferación y considerar a AMPK como una nueva opción terapéutica para el HCC. La activación de AMPK por la capsaicina proporciona un nuevo mecanismo molecular para la acción de la capsaicina y contribuye a las futuras aplicaciones de la capsaicina en la medicina.

## Agradecimientos

Los autores desean agradecer a la Fundación Tatiana Pérez de Guzmán el Bueno (Beca n° Patrocinio 2013-001) y a la UAH (UAH-GC2018) por el apoyo económico en su investigación.

## Bibliografía

1. Li Z, Guan M, Lin Y, Cui X, Zhang Y, Zhao Z, et al. Metabolismo lipídico aberrante en el carcinoma hepatocelular revelado por lipidomics hepático. *Int J Mol Sci.* 2017; 18 (12). 10.3390 / ijms18122550.
2. Clark R, Lee SH. Propiedades anticancerígenas de la capsaicina contra el cáncer humano. *Anticancer Res.* 2016; 36 (3): 837–43.
3. Friedman JR, Nolan NA, Brown KC, Miles SL, Akers AT, Colclough KW, et al. Actividad anticancerígena de análogos de capsaicina natural y sintética. *J Pharmacol Exp Ther.* 2018; 364 (3): 462–73. 10.1124 / jpet.117.243691.
4. Díaz-Laviada I, Rodríguez-Henche N. Los posibles efectos antitumorales de la capsaicina. *Prog Drug Res.* 2014; 68: 181–208.
5. Leung FW. La capsaicina como medicamento contra la obesidad. *Prog Drug Res.* 2014; 68: 171–9.
6. Narang N, Jiraungkoorskul W, Jamrus P. Comprensión actual de la propiedad antiobesidad de la capsaicina. *Pharmacogn Rev.* 2017; 11 (21): 23-6. 10.4103 / phrev.phrev\_48\_16.
7. Shen W, Shen M, Zhao X, Zhu H, Yang Y, Lu S, et al. El efecto antiobesidad de la capsaicina en ratones alimentados con una dieta alta en grasas se asocia con un aumento de la población de la bacteria intestinal *Akkermansia muciniphila*. *Frente Microbiol.* 2017; 8: 272 10.3389 / fmicb.2017.00272.
8. Sun L, Suo C, Li ST, Zhang H, Gao P. Reprogramación metabólica para células cancerosas y su microambiente: más allá del efecto Warburg. *Biochim Biophys Acta.* 2018. 10.1016 / j.bbcan.2018.06.005.
9. Hardie DG. AMPK: regulación positiva y negativa, y su papel en la homeostasis energética de todo el cuerpo. *Curr Opin Cell Biol.* 2015; 33: 1–7. 10.1016 / j.ceb.2014.09.004.
10. Hardie DG, Schaffer BE, Brunet A. AMPK: una vía de detección de energía con múltiples entradas y salidas. *Trends Cell Biol.* 2016; 26 (3): 190-201. 10.1016 / j.tcb.2015.10.013.
11. Peng M, Darko KO, Tao T, Huang Y, Su Q, He C, et al. Combinación de metformina con fármacos quimioterapéuticos a través de diferentes mecanismos moleculares. *Cáncer tratar rev.* 2017; 54: 24–33. 10.1016 / j.ctrv.2017.01.005.
12. Sengupta S, Nagalingam A, Muniraj N, Bonner MY, Mistriotis P, Afthinos A, et al. La activación del supresor tumoral LKB1 por el honokiol anula el fenotipo similar al tallo del cáncer en el cáncer de mama mediante la inhibición de Stat3 oncogénico. *Oncogén.* 2017. 10.1038 / onc.2017.164.
13. Wang Z, Wang N, Liu P, Xie X. AMPK y Cáncer. *EXS.* 2016; 107: 203–26. Epub 05/11/2016. 10.1007 / 978-3-319-43589-3\_9.