

Efecto de la quinasa activada por AMP (AMPK) sobre el metabolismo lipídico en células de carcinoma hepatocelular resistentes a sorafenib.

Alicia Bort^a, Belén Sánchez Gómez^b, Irene de Miguel^c, Jose María Mora Rodríguez^d, Pedro Mateos-Gómez^e, Inés Díaz-Laviada^f

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

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

Palabras clave: HCC; resistencia; sorafenib; metabolismo lipídico; AMPK

Resumen

El carcinoma hepatocelular (HCC) es la tercera causa de muerte por cáncer en todo el mundo, siendo su principal tratamiento la quimioterapia con el inhibidor de tirosina quinasa sorafenib. Sin embargo, este tratamiento está obstaculizado frecuentemente por la aparición de quimiorresistencia. Estudios recientes afirman que los cambios metabólicos en las células tumorales pueden causar una desregulación en la señalización que puede participar en el desarrollo, resistencia y recurrencia del tumor y, por ello el objetivo de este trabajo ha sido estudiar la relación entre el metabolismo lipídico y los mecanismos moleculares de resistencia. Para ello, creamos un modelo de HCC resistente a sorafenib, generando dos líneas celulares (HepG2SF1 y Huh7SF1) mediante incubación con concentraciones crecientes de sorafenib durante 12 meses. En estas líneas hemos analizado los cambios metabólicos que se producen a fin de encontrar una diana que permita combatir la quimiorresistencia. Las células HepG2SF1 y Huh7SF1 mostraron acumulación intracelular de lípidos neutros, determinados mediante citometría de flujo y microscopía confocal. El estudio del metabolismo lipídico reveló que las células HepG2SF1 y Huh7SF1 tenían aumentada la expresión de las enzimas involucradas en la síntesis de novo de lípidos, ATP-citrato liasa (ACLY), acetil-CoA carboxilasa (ACC) y ácido graso sintasa (FASN) y la del transportador de ácidos grasos CD36. Por otro lado, analizamos la quinasa activada por AMP (AMPK), sensor metabólico celular, observando que tanto la fosforilación como los niveles totales de AMPK disminuyeron en las células resistentes en comparación con las células parentales. Es interesante resaltar que, la transfección de AMPK en las células HepG2SF1 y Huh7SF1 restableció los niveles de las enzimas lipogénicas y disminuyó la acumulación de lípidos intracelulares además de disminuir la resistencia a sorafenib. Estos resultados indican que AMPK puede ser una diana prometedoras en células resistentes a sorafenib.

Cita: Bort, Alicia; Sánchez Gómez, Belén; de Miguel, Irene; Mora Rodríguez, Jose María; Mateos-Gómez, Pedro; Díaz-Laviada, Inés (2020) Efecto de la quinasa activada por AMP (AMPK) sobre el metabolismo lipídico en células de carcinoma hepatocelular resistentes a sorafenib. *Actas del V Congreso de Señalización Celular, SECUAH 2020*. 16-18 de marzo, 2020. Universidad de Alcalá. Alcalá de Henares, Madrid, España. *dianas* 9(2):e20200901. ISSN 1886-8746 (electronic) [journal.dianas.e20200901](http://www3.uah.es/dianas?e20200901)
<http://www3.uah.es/dianas?e20200901>. URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Copyright: © Bort A, Sánchez-Gómez B, de-Miguel I, Mora-Rodríguez JM, Mateos-Gómez P, 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 de parénquima hepático o carcinoma hepatocelular, es un cáncer de alta incidencia dentro de los cánceres primarios hepáticos y la segunda causa de muerte por cáncer en el mundo. Los principales factores de riesgo son hepatitis vírica (B y C) y abuso de alcohol (1).

El cáncer de hígado es asintomático en sus etapas iniciales, lo que provoca que se diagnostique mayormente en estadios intermedios o avanzados de la enfermedad, donde los tratamientos no son tan eficaces. La cirugía es el principal tratamiento, pero sólo es aplicable en tumores localizados y de pequeño tamaño. Cuando no es posible la cirugía se recurre a la quimioterapia, siendo el sorafenib (SF) el principal fármaco utilizado. El sorafenib es un inhibidor inespecífico de proteínas con actividad tirosina quinasa que inhibe la proliferación, la angiogénesis y aumenta la apoptosis de las células tumorales de HCC (2). Pese a la supervivencia global obtenida con el tratamiento con sorafenib, el 80% de los pacientes presentan algún efecto secundario siendo los más comunes el síndrome mano-pie, fuertes diarreas, sangrado gastrointestinal, efectos sobre la función hepática y fatiga. Esto produce que un 44% de los pacientes tengan que reducir las dosis o suspender el tratamiento (3,4).

Otro de los problemas que presenta el tratamiento con sorafenib es la aparición de resistencia al fármaco en la mayoría de los pacientes, lo que conduce a un crecimiento más acelerado del tumor y obliga a interrumpir el tratamiento por presentar el efecto contrario al esperado (5,6).

Estudios recientes afirman que cambios metabólicos en las células tumorales pueden causar desregulación en las vías de señalización que participan en el desarrollo del tumor, en la resistencia a fármacos o en la recurrencia del mismo (7,8). Por lo tanto decidimos estudiar los cambios en enzimas metabólicas implicadas en el metabolismo de lípidos, que son de especial relevancia en el carcinoma hepatocelular ya que el hígado juega un papel muy importante en la homeostasis de lípidos del organismo. Las enzimas seleccionadas fueron las relacionadas tanto con la síntesis de novo de ácidos grasos (sintasa de ácido grasos (FASN), Acetil-CoA carboxilasa (ACC) o ATP-citrato liasa (ACLY)) como con la beta oxidación (carnitina palmitoiltransferasa 1A, CPT1A) o con el transporte de lípidos (CD36). También decidimos estudiar activadores y factores de transcripción implicados en la expresión de enzimas del metabolismo lipídico (receptor activado por proliferador de peroxisomas γ (PPAR γ), coactivador transcripcional del PPAR (PGC1 α), o la proteína de unión al elemento de respuesta al colesterol 1c (SRBP1c)) (9,10).

La proteína quinasa activada por AMP (AMPK) es conocida por su papel regulador del metabolismo energético celular, por lo que estudiar su actividad en células tumorales puede ser muy relevante (11, 12). AMPK fue descubierta por su efecto inductor del metabolismo de lípidos (13). Desde entonces se ha visto que actúa como un sensor de la energía celular y se comporta como regulador del metabolismo energético, inhibiendo rutas anabólicas y activando rutas catabólicas (14). Por esta razón, AMPK es esencial en la homeostasis y regulación del metabolismo celular. Su papel como regulador metabólico, la ha llevado a convertirse en una importante diana terapéutica en cáncer y otras enfermedades. AMPK es una proteína heterotrimérica formada por una subunidad catalítica α y dos subunidades reguladoras β y γ . La subunidad α contiene un residuo de treonina conservado (Thr 172), cuya fosforilación permite la activación de la enzima (15).

El objetivo de este trabajo fue el estudio del metabolismo lipídico y el papel de AMPK en un modelo celular de resistencia a sorafenib. Los resultados indican que AMPK puede ser una diana prometedoras en células resistentes a sorafenib.

Materiales y Metodos

Reactivos químicos usados

El compuesto A-769662 se adquirió en Tocris Bioscience (Bristol, Reino Unido). BODIPY (493/503) se compró a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). Todos los demás productos químicos se compraron a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.).

Cultivo de células

Se utilizó la línea celular tumoral epitelial humana de hígado HepG2 obtenida de American Type Culture Collection (ATCC N° BH-8065, Rockville, MD, USA). Es una línea celular que proviene de un varón caucásico de 15 años de edad. La línea celular de hepatoma humano Huh7 fue proporcionada por L. Boscá (Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, Madrid). 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 CO₂. 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.

Para generar células resistentes, las células HepG2 y Huh7 se cultivaron durante 12 meses aumentando gradualmente la concentración de sorafenib (comenzando con 0,75 μ m y aumentando la concentración en 0,15 μ m en cada pase hasta una concentración final de 8 μ m). Las células se seleccionaron y se denominaron células HepG2SF1 y Huh7SF1. Las células parentales HepG2 y Huh7 se cultivaron en paralelo sin sorafenib y sirvieron como controles.

Western Blot

Las células se lisaron en tampón de lisis (Tris 50 mM, pH 7,4, NaCl 0,8 M, MgCl₂ 2,5 mM, Triton X-100 al 0,1%) que contenía inhibidores de proteasas y de fosfatasas (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 μ g) 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 \times 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 \times TBS y 0,1% de Tween 20) y se incubaron con anticuerpos IgG anti-ratón o anti-conejo conjugados con peroxidasa (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. Los anticuerpos primarios anti-p-AMPK α 1-thr172, p-ACC-ser79, p-Akt-ser473, p-ACLY-ser455, p-SIRT-ser47 y los anticuerpos contra las formas totales correspondientes y p-SRBPIC-ser372, PPAR γ , FAS, N-cadherina y E-cadherina se obtuvieron de Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EE. UU.).

PGC1 α se obtuvo de Novus (St. Louis, MO, EE. UU.) y CD36 se obtuvo de Abcam (Cambridge, Reino Unido).

Viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó mediante el método de 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 μ 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).

Tinción de lípidos neutros con BODIPY 493/503 y cuantificación por citometría de flujo

Previamente a su análisis se añadió a las células el fluorocromo, BODIPY 493/503 con afinidad por lípidos neutros. La emisión fluorescente de cada célula es por tanto proporcional al contenido intracelular de lípidos neutros. Las células se sembraron en placas de seis pocillos y 30 minutos antes de finalizar el tratamiento se agregó el fluorocromo al medio de cultivo a una concentración de 5 μ g/ml. Posteriormente se recogieron tanto las células que estaban en suspensión, como las adheridas a la placa mediante la adición de 200 μ l de tripsina. Se centrifugaron 5 min a 2000 g a 4°C, se resuspendieron en 300 μ l de PBS frío y se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson Labware, New Jersey, USA), en el canal FL1 (493/503). Para determinar el contenido de lípidos neutros se utilizó el programa Cyflogic (vs 1.2.1. Perttu Terho, Mika Korkeamaki, CyFlo Ltd. TURKU, FINLANDIA).

Microscopia de fluorescencia

Las células se sembraron en cubreobjetos, se lavaron en medio EMEM sin suero y se tiñeron con BODIPY (493/503) a 5 ng / ml, durante 30 minutos. Las células se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS. Luego se montaron cubreobjetos con medio de montaje Mowiol (Sigma-Aldrich). La obtención de imágenes se realizó con un microscopio Leica DM100 con el software LAS V4.6 IMAGING utilizando un objetivo de aceite de 65 \times .

Transfecciones transitorias

Los plásmidos que codifican para AMPK humana α 1, β 1 y γ 1. Fueron amablemente cedidos por G. Hardie (Universidad de Dundee, Reino Unido) Las células HepG2 y Huh7 sensibles y resistentes se cotransfectaron con 4 μ g de los plásmidos α 1 (pcDNA5 - FRT α 1 - Flag), β 1 (pCMV β 1 sin etiquetar) y γ 1 WT (pcDNA5 - Flpln - T10 γ 1 WT - Flag) usando 6 μ L Lipofectamina 3000 (Thermo Fisher). Después de 48 h de transfección, las células se recogieron y se analizó la expresión de la proteína mediante Western blot.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante GraphPad Prism 6.0 (La Jolla, CA, USA). Las comparaciones entre dos valores donde varían dos o más parámetros se realizaron mediante ANOVA y Test de Sidak. Los niveles de significación se definieron como P <0.05 (*, #) y P <0.01 (**, ##).

Resultados

Para estudiar el metabolismo lipídico en células resistentes a sorafenib, generamos dos líneas celulares mediante tratamiento a largo plazo con concentraciones crecientes de sorafenib como se describe en la sección de métodos. Esas células, llamadas HepG2SF1 y Huh7SF1, tenían una morfología celular diferente en comparación con sus células parentales (Fig. 1 A), así como mayor resistencia al fármaco sorafenib, ya que su viabilidad no disminuyó en presencia de sorafenib como lo hacen las líneas parentales (Fig. 1 B).

Con el fin de investigar el metabolismo de los lípidos, primero examinamos el contenido de lípidos neutros mediante citometría de flujo en las células resistentes a sorafenib. Como se observa en la Fig. 2A, las células HepG2SF1 y Huh7SF1 mostraron un mayor contenido de lípidos en comparación con sus células parentales (HepG2 y Huh7). Los lípidos neutros como los triglicéridos y los ésteres de colesterol se acumulan en orgánulos citoplasmáticos altamente dinámicos llamados gotas de lípidos. Los análisis por microscopía de fluorescencia revelaron que las células resistentes tenían más gotas de lípidos citoplasmáticos y más grandes, lo que confirma la acumulación de lípidos en esas células (Fig. 2 B).

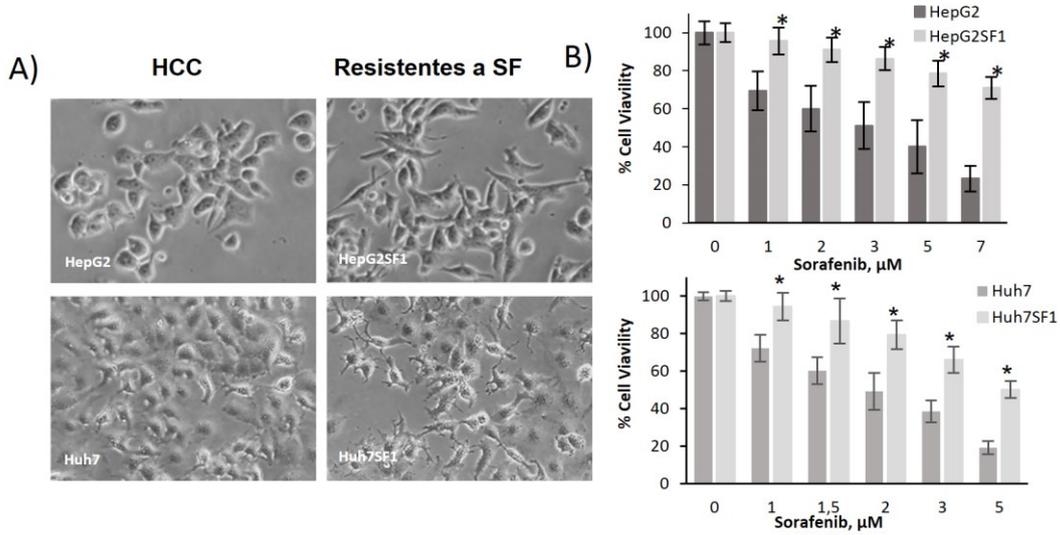


Figura 1. Resistencia a sorafenib de las líneas de HCC. A) Morfología celular de las células HCC HepG2 y Huh7 parentales y las células HepG2SF1 y Huh7SF1 detectadas por contraste de fase (20X). B) Las células se trataron con sorafenib a las concentraciones indicadas durante 24 h. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo MTT y se expresa como el porcentaje del control. Los datos representan la media \pm DE de los niveles de viabilidad celular en 3 experimentos independientes. ** P <0.01 diferencia significativa entre células resistentes y parentales mediante ANOVA bidireccional y la prueba de comparaciones múltiples de Sidak.

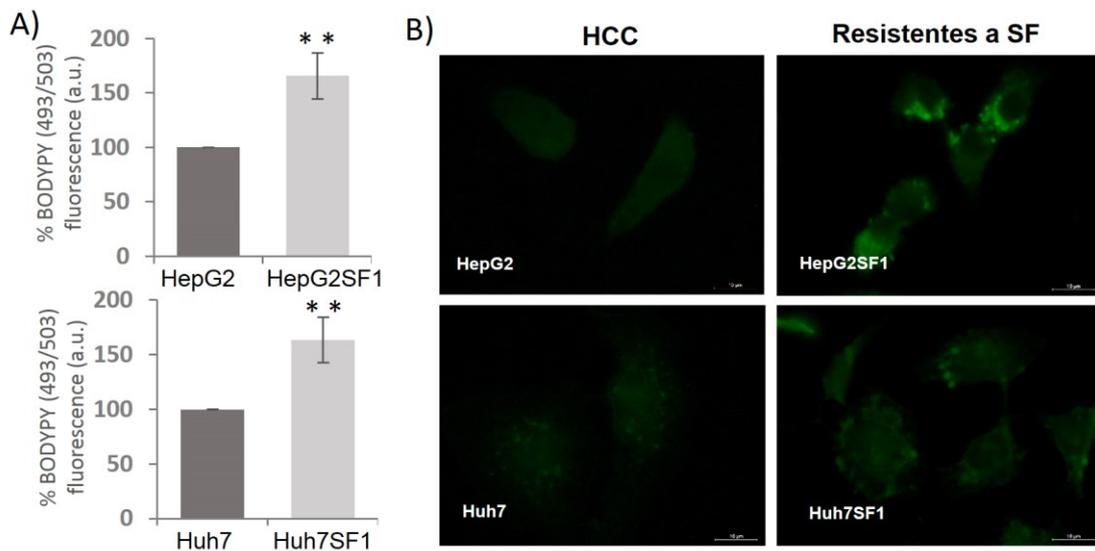


Figura 2. El contenido de lípidos neutros intracelulares aumenta en las células HepG2SF1 y Huh7SF1. A, cuantificación del contenido de lípidos neutros intracelulares por citometría de flujo en células parentales (HepG2 y Huh7) y células resistentes HepG2SF1 y Huh7SF1. Las células se incubaron durante 30 minutos con la sonda BODIPY 493/503 a 5 ng / ml. Los datos representan la media \pm DE de los niveles de fluorescencia celular en 4 experimentos independientes. ** P <0.01 diferencia significativa entre resistentes y parentales mediante ANOVA bidireccional y la prueba de comparaciones múltiples de Sidak. B, Localización intracelular de las acumulaciones de lípidos, en HCC parental (HepG2 y Huh7) y células HepG2SF1 y Huh7SF1 resistentes mediante microscopía de fluorescencia. Se muestra una imagen representativa de tres experimentos diferentes.

Continuando con el estudio del metabolismo lipídico en las líneas resistentes a sorafenib, detectamos por Western blot varias de las enzimas y factores de transcripción implicados en las síntesis de novo de ácidos grasos. En primer lugar, observamos un descenso de la fosforilación del factor de transcripción SREBP1c en las células resistentes, lo que supone un aumento de su actividad. Este factor de transcripción regula la expresión de varias enzimas implicadas en la síntesis de lípidos como FASN y ACLY. Para corroborar la activación de SREBP1c, determinamos la expresión de FASN y ACLY que se vio aumentada (Figura 3 A). Por otro lado, también se observó un aumento en la expresión del transportador de ácidos grasos CD36, en las células resistentes lo que podría contribuir al aumento de lípidos intracelulares (Figura 3B). Estos resultados indican que tanto la síntesis de ácidos grasos de novo, como su absorción está aumentada en las células resistentes a sorafenib (HepG2SF1 y Huh7SF1).

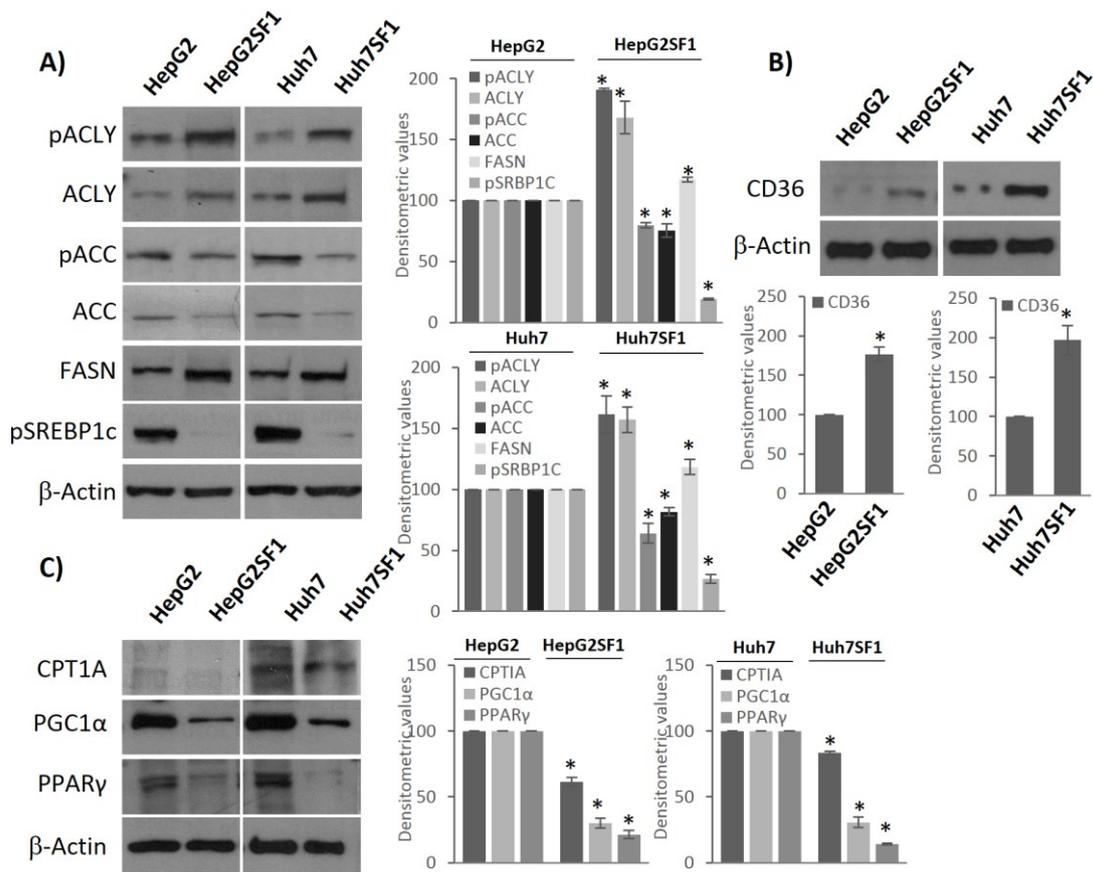


Figura 3. Metabolismo lipídico desregulado en células HepG2SF1 y Huh7SF1. A, Formas fosforiladas y totales de proteínas involucradas en la síntesis de lípidos de novo, ACLY ACC, FAS y del factor de transcripción SREBP1c en células parentales (HepG2 y Huh7) y resistentes HepG2SF1 y Huh7SF1 determinadas por Western blot. B, Niveles de proteínas involucradas en la oxidación de ácidos grasos CD36. C, Niveles de proteínas involucradas en la oxidación de ácidos grasos CPT1A, el factor de transcripción PPARγ y su coadyuvante PGC1α en células parentales (HepG2 y Huh7) y resistentes HepG2SF1 y Huh7SF1 determinadas por Western blot. La β-actina se muestra como un control de carga. Se muestra una imagen representativa de tres experimentos diferentes. Los valores densitométricos (media ± DE, n = 3) relativos a los controles se muestran a la derecha. * P < 0.005 diferencia significativa entre las células parentales y resistentes por ANOVA bidireccional y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

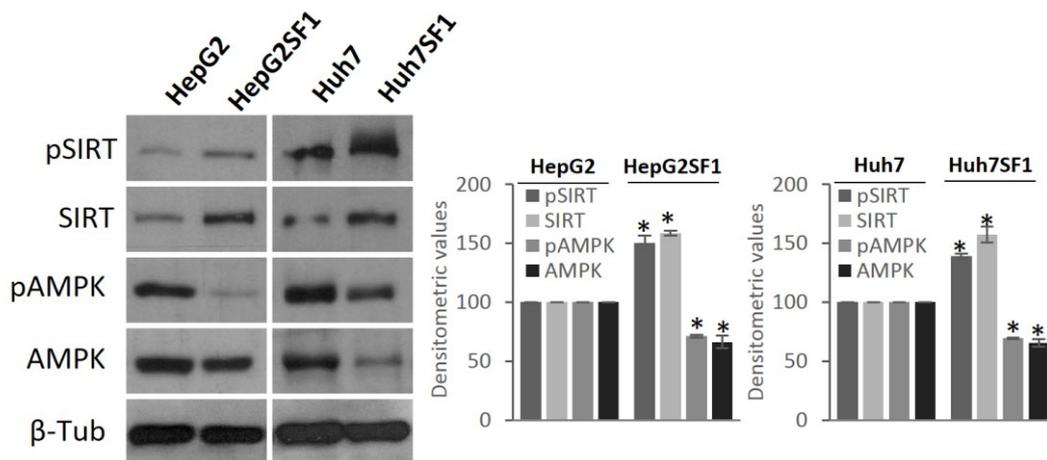


Figura 4. Los niveles de AMPK disminuyen en las células HepG2SF1 y Huh7SF1. Los niveles de formas fosforiladas y totales de AMPK y SIRT en células parentales (HepG2 y Huh7) y células resistentes HepG2SF1 y Huh7SF1 se determinaron mediante transferencia Western. La β-tubulina (β-Tub) se muestra como un control de carga. Se muestra una imagen representativa de tres experimentos diferentes. Los valores densitométricos (media ± DE, n = 3) relativos a los controles se muestran a la derecha. * P < 0.005 diferencia significativa entre las células madre y parentales por ANOVA bidireccional y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

Para estudiar la degradación de lípidos, analizamos los niveles de los factores de transcripción PPAR γ y de su activador PGC1 α que están implicados en la biogénesis mitocondrial. La Figura 3C muestra una disminución de los niveles de PGC1 y de PPAR γ en las células resistentes a sorafenib en comparación a las sensibles. Por otro lado se observó también una disminución del sistema de transporte CPT1A implicado en introducir ácidos grasos en la mitocondria para su oxidación. Estos resultados sugieren que la β -oxidación de lípidos podría estar inhibida en las células resistentes a sorafenib (HepG2SF1 y Huh7SF1) (Figura 3 C).

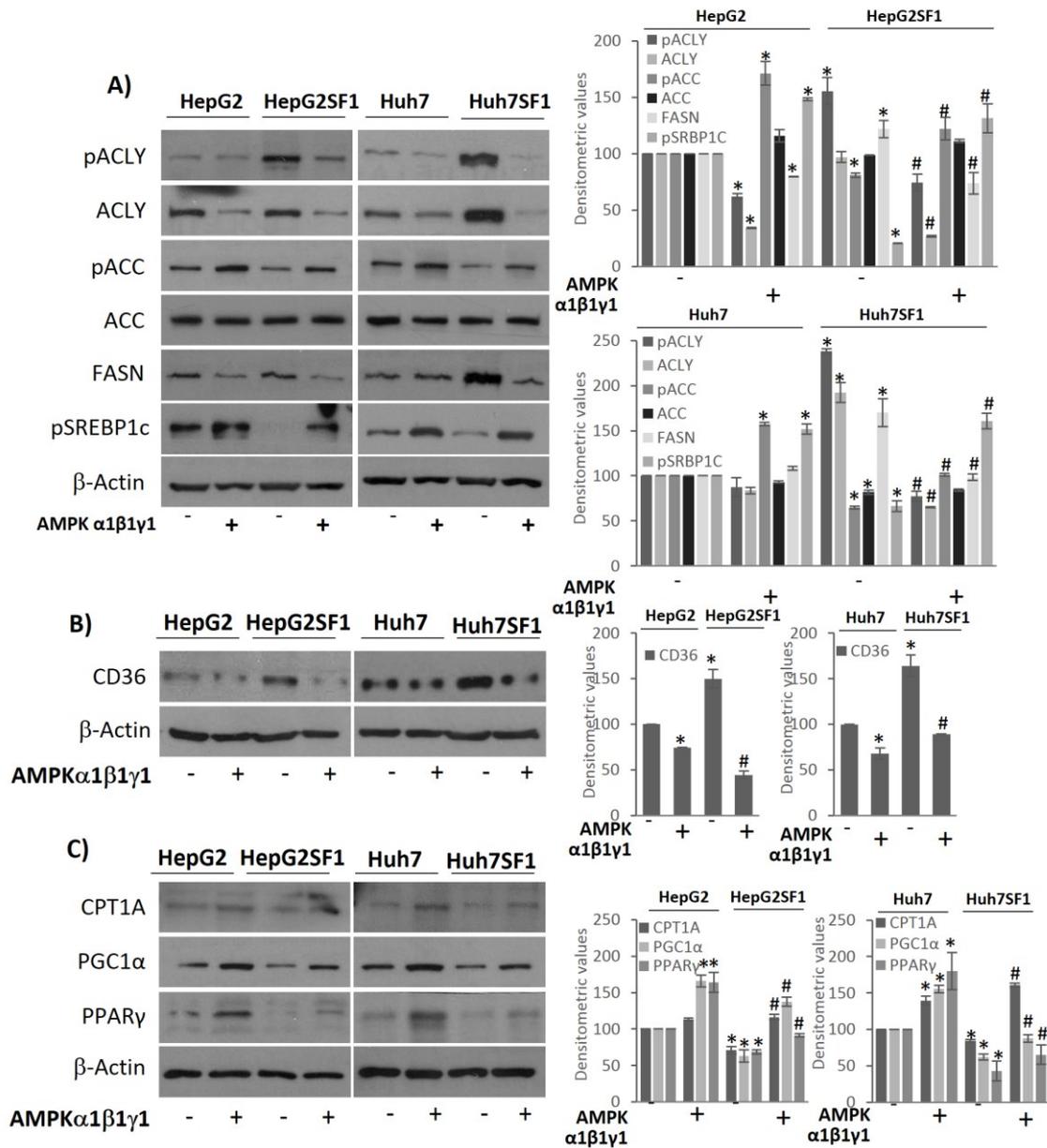


Figura 5. La transfección con AMPK restaura el perfil lipogénico en las células resistentes a sorafenib. A, Formas fosforiladas y totales de proteínas involucradas en la síntesis de lípidos de novo, ACLY ACC, FAS y el factor de transcripción SREBP1c en células parentales HepG2 y Huh7 y células resistentes HepG2SF1 y Huh7SF1 transfectadas con AMPK α 1 β 1 γ 1. B, Niveles del transportador de ácidos grasos CD36. C, Niveles de proteínas involucradas en la oxidación de ácidos grasos CPT1A y el factor de transcripción PPAR γ y su ayudante PGC1 α en células (HepG2 y Huh7) y células resistentes HepG2SF1 y Huh7SF1 determinados por Western blot. La β -actina se muestra como un control de carga. Se muestra una imagen representativa de tres experimentos diferentes. Los valores densitométricos (media \pm DE, n = 3) relativos a los controles se muestran a la derecha. * P < 0.005 diferencia significativa entre células resistentes y parentales por ANOVA bidireccional y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, #P < 0.005 diferencia significativa entre células transfectadas con AMPK y no transfectadas.

Otra proteína estudiada fue SIRT1 la cual se ha convertido en una molécula esencial en el control de las vías metabólicas y que se vio activada en las células resistentes a sorafenib. Continuando con el estudio, medimos el estado del sensor metabólico AMPK, observando una disminución tanto en la expresión como en su fosforilación en las células resistentes a sorafenib. La disminución de los niveles de AMPK podría explicar la acumulación de lípidos que observamos en las células resistentes (Figura 4).

Para corroborar esta idea, transfectamos las células sensibles (HepG2 y Huh7) y resistentes a sorafenib (HepG2SF1 y Huh7SF1) con un plásmido que codifica AMPK y, posteriormente, verificamos el estado de las enzimas lipogénicas y del factor de transcripción SREBP1c. La sobreexpresión de AMPK en las células resistentes inhibió la activación de ACLY, ACC y FAS observadas y disminuyó la fosforilación inhibitoria de SREBP1c (Figura 5 A). Además, los niveles del transportador de lípidos CD36 se restablecieron en las células resistentes con la transfección de AMPK (Fig. 5 B). Los niveles de CPT1A, PGC1 α y PPAR γ aumentaron en las células transfectadas con AMPK, lo que sugiere una recuperación de la oxidación β .

Posteriormente examinamos los efectos de la transfección de AMPK en la acumulación de lípidos intracelulares. Para analizar los efectos anti-hiperlipidémicos de AMPK en las células resistentes, se determinaron los lípidos neutros en células transfectadas con AMPK mediante citometría de flujo. Como se muestra en la Fig. 6 A, la sobreexpresión de AMPK redujo el contenido de lípidos en las células HepG2SF1 y Huh7SF1. Para corroborar este resultado, se utilizó el compuesto A-769662, que es un activador sintético de AMPK. En concordancia con los resultados anteriores, la activación farmacológica de AMPK por A-769662 indujo una disminución en el nivel de lípidos neutros (Fig. 6 A). La disminución de los lípidos intracelulares en las células transfectadas con AMPK y en las células tratadas con A-769662 también se pudo observar por microscopía de fluorescencia (Fig. 6 B).

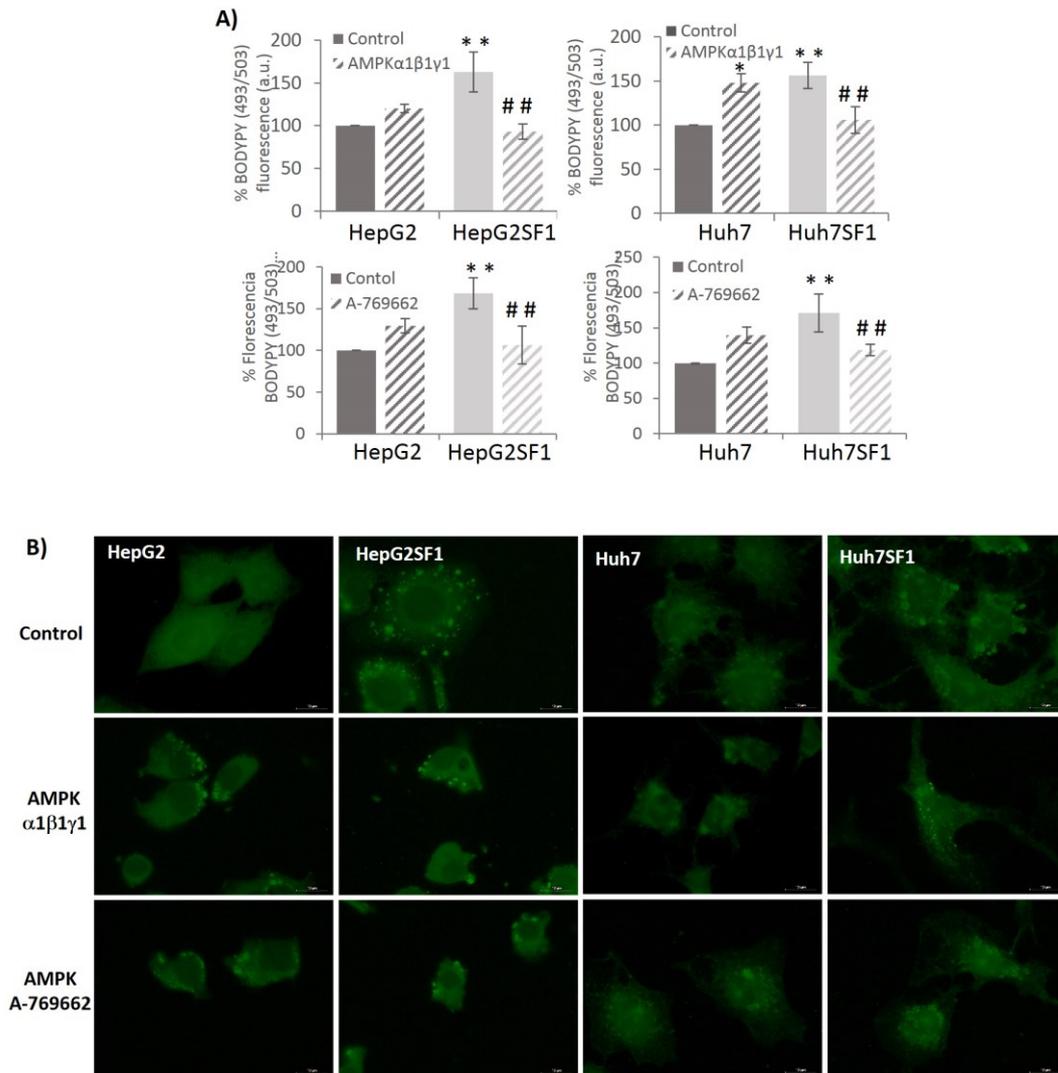


Figura 6. La transfección celular con AMPK o activación de AMPK con A769622, disminuye el contenido de lípidos neutros intracelulares en células HepG2SF1 y Huh7SF1. A, Cuantificación del contenido de lípidos neutros intracelulares en células parentales (HepG2 y Huh7) y resistentes HepG2SF1 y Huh7SF1 transfectadas con AMPK $\alpha 1\beta 1\gamma 1$ o tratadas con el activador AMPK A-769662 (100 μ M) durante 1 hora, determinado los valores por citometría de flujo. Los datos presentan niveles de fluorescencia de las células incubadas durante 30 minutos con la sonda BODYPY 493/503 5 ng / ml (media \pm DE de 4 experimentos). * P < 0.005 diferencia significativa entre células resistentes y parentales por ANOVA bidireccional y prueba de comparaciones múltiples de Tukey, #P < 0.005 diferencia significativa entre células AMPK transfectadas o tratadas y no transfectadas o no tratadas. B, Localización de lípidos neutros intracelulares con sonda BODYPY 493/503 por microscopía de fluorescencia.

Para terminar, decidimos estudiar si la transfección o activación de AMPK producía cambios en la resistencia a sorafenib. Para ello las líneas resistentes a sorafenib HepG2SF1 y Huh7SF1 fueron trasfretadas con un plásmido de AMPK o tratadas con el activador farmacológico A-79662 y después con distintas concentraciones de sorafenib. Pasadas 24 horas observamos una re-sensibilización al fármaco en las líneas resistentes a sorafenib tanto al aumentar AMPK como al activarla (Figura 7).

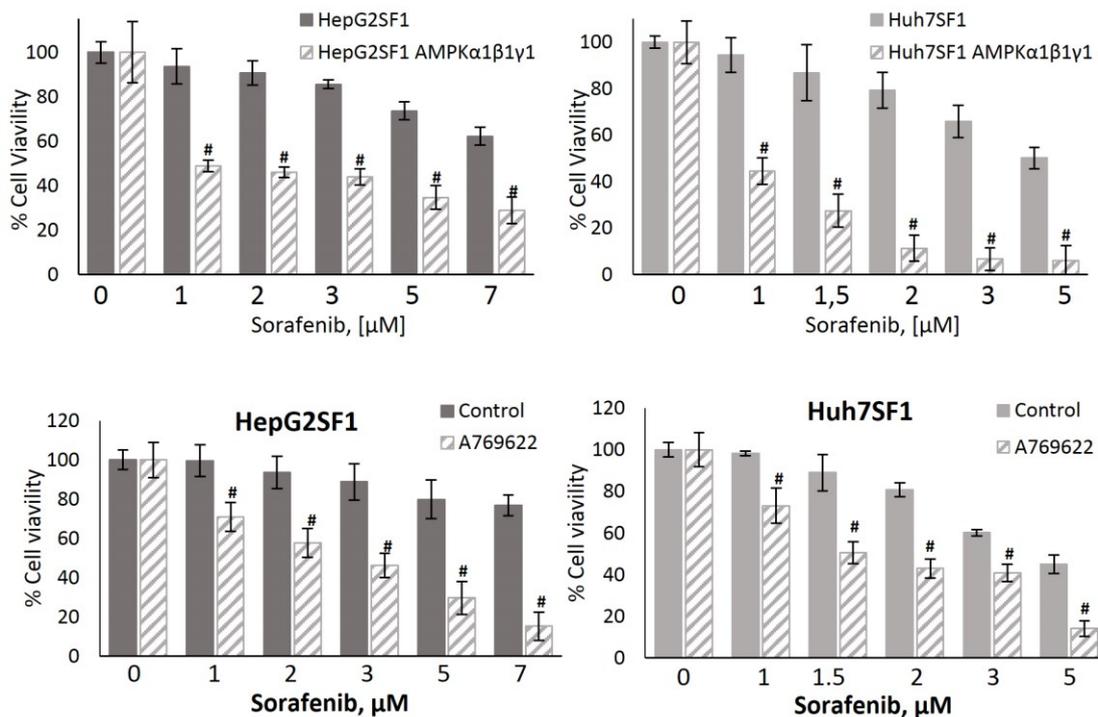


Figura 7. El aumento de AMPK restaura la sensibilidad a sorafenib en las células HCC resistente a SF. A, Efecto de la expresión transitoria de AMPK α 1 β 1 γ 1 sobre la viabilidad celular en células HepG2 SF1 y Huh7 SF1 tratadas con concentraciones crecientes de sorafenib. Las células fueron tratadas con sorafenib a las concentraciones indicadas durante 24 h. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo MTT y se expresa como el porcentaje del control (tratamiento con DMSO). Los experimentos se realizaron por triplicado y se llevaron a cabo tres veces en ocasiones separadas. Los datos son la media \pm DE). # P < 0.005 diferencia significativa entre las células transfectadas y no transfectadas por AMPK.

Conclusiones

Las células resistentes a sorafenib HepG2SF1 y Huh7SF1 presentan un aumento de lípidos neutros intracelulares que se produce por varios factores entre los que se encuentran un aumento en la expresión de enzimas relacionadas con la síntesis de novo de ácidos grasos (ACLY, FASN y ACC) y la captación de ácidos grasos del entorno extracelular, al aumentar la expresión del transportador CD36. Además, se produce una disminución de los factores de transcripción relacionados con la β -oxidación (PGC1 α y PPAR γ) y una disminución de los niveles y activación del sensor metabólico AMPK.

La sobreexpresión o activación de AMPK en células resistentes a sorafenib (HepG2SF1 y Huh7SF1), produce una disminución de las enzimas implicadas en la síntesis de novo de ácidos grasos y la expresión del transportador de ácidos grasos. Por otro lado, al transfectar o activar AMPK aumentan los niveles de los factores de transcripción implicados en la β -oxidación, lo que produce una disminución de los lípidos neutros en las células resistentes a sorafenib.

Estos resultados indican que la alta acumulación de lípidos está relacionada con la baja expresión de AMPK, la cual puede reducir el contenido de lípidos y regular la expresión de enzimas y factores de transcripción relacionados con el metabolismo lipídico.

Por último, en este trabajo se observó que la expresión o activación de AMPK en las líneas resistentes a sorafenib resensibilizó las células al fármaco, lo que nos indica que AMPK y el metabolismo está implicado en la resistencia a sorafenib.

Agradecimientos

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

Bibliografía

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015; 65(2):87-108.
2. Bruix J, Boix L, Sala M, Llovet JM. Focus on hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell.* 2004; 5(3):215-9.
3. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med.* 2008; 359(4):378-90.
4. Cheng AL, Kang YK, Chen Z, Tsao CJ, Qin S, Kim JS, et al. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol.* 2009; 10(1):25-34.
5. Han P, Li H, Jiang X, Zhai B, Tan G, Zhao D, et al. Dual inhibition of Akt and c-Met as a second-line therapy following acquired resistance to sorafenib in hepatocellular carcinoma cells. *Mol Oncol.* 2017; 11(3):320-34.
6. Zhai B, Hu F, Jiang X, Xu J, Zhao D, Liu B, et al. Inhibition of Akt reverses the acquired resistance to sorafenib by switching protective autophagy to autophagic cell death in hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer Ther.* 2014; 13(6):1589-98.
7. Korshunov DA, Kondakova IV, Shashova EE (2019) Modern perspective on metabolic reprogramming in malignant neoplasms. *Biochemistry* 84(10):1129–1142.
8. Koundouros N, Poulogiannis G (2019) Reprogramming of fatty acid metabolism in cancer. *Br J Cancer.* <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0650-z>
9. Saponaro, C., Gaggini, M., Carli, F. and Gastaldelli, A. 2015. The subtle balance between lipolysis and lipogenesis: A critical point in metabolic homeostasis. *Nutrients.* 7 (11):9453–9474.
10. Liu, X., Liang, Y., Song, R., Yang, G., Han, J., Lan, Y., Pan, S., Zhu, M., Liu, Y., Wang, Y., Meng, F., Cui, Y., Wang, J., Zhang, B., Xuan, C., Lu, Z., Zheng, T. and Liu, L. 2018. Long non-coding RNA NEAT1-modulated abnormal lipolysis via ATGL drives hepatocellular carcinoma proliferation. *Molecular Cancer.* 17:90.
11. O'Neill LA, Hardie DG. Metabolism of inflammation limited by AMPK and pseudo-starvation. *Nature.* 2013; 493(7432):346-55.
12. Hardie DG, Lin SC. AMP-activated protein kinase - not just an energy sensor *F1000Res.* 2017; 6:1724.
13. Rodrigue-Way A, Caron V, Bilodeau S, Keil S, Hassan M, Lévy E, et al. Scavenger receptor CD36 mediates inhibition of cholesterol synthesis via activation of the PPAR γ /PGC-1 α pathway and Insig1/2 expression in hepatocytes. *FASEB J.* 2014; 28(4):1910-23.
14. Mihaylova MM, Shaw RJ. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol.* 2011; 13(9):1016-23.
15. Ross FA, MacKintosh C, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: a cellular energy sensor that comes in 12 flavours. *FEBS J.* 2016; 283(16):2987-3001.