



**UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS**

*Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut*

Grupo Metabolismo Energético y Nutrición

*Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut*

Grupo Multidisciplinar de Oncología Traslacional

# ***Efectos de los Estrógenos, la Genisteína y la Leptina sobre el Estrés Oxidativo en el Cáncer de Mama. Importancia de la UCP2***

Tesis Doctoral para optar al Grado de

**Doctora por la *Universitat de les Illes Balears***

Programa de Doctorado Interuniversitario en Nutrición Humana

*Del Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut*

Presentada por:

**MERCEDES NADAL SERRANO**

Palma, Junio 2014



Con el beneplácito de los Directores

**Dra. M<sup>a</sup> del Pilar Roca Salom**  
Catedrática de Universidad de  
Bioquímica y Biología Molecular

**Dr. Jordi Oliver Oliver**  
Titular de Universidad de  
Bioquímica y Biología Molecular

La interesada

**Mercedes Nadal Serrano**



**A mis padres**



*Tot està per fer i tot és possible.*

**Miquel Martí i Pol**





## AGRADECIMIENTOS

Se acaba una etapa de mi vida. Una etapa llena de ilusión, esfuerzo y ganas de aprender, de momentos de risas, complicidad y alguna lágrima, de convicciones pero no sin instantes de duda. En los momentos de flaqueza, a los que parecía no ser capaz de enfrentarme, ahí estabais vosotros, mis directores de tesis y el resto de profesores del grupo, mis compañeros y amigos, mi amigas -las de siempre-, y mi familia -la mejor del mundo-. Esto es parte de cada uno de vosotros, gracias.

En primer lugar quiero dar las gracias a mis directores de tesis, la Dra. Pilar Roca y el Dr. Jordi Oliver, por vuestro apoyo y dedicación, por guiarme en este duro camino, y por todo lo que me habéis enseñado. Gracias Pilar por confiar en mí desde el primer día, y por enseñarme a que primero hay que confiar en uno mismo. Has sido un ejemplo en todo momento. Gracias Jordi por todos los consejos, por tu comprensión, *i per donar-me la darrera empenta en aquest viatge inoblidable*. Soy consciente de que sin vuestro esfuerzo no lo habría conseguido.

No puedo olvidarme de los demás profesores del grupo, me habéis hecho sentir tan querida. A Adamo Valle, gracias por demostrarme siempre tu apoyo, y por, tal vez sin ser consciente, hacer que sueñe en seguir en un mundo tan difícil como es la investigación, gracias por creer en mí. A Magdalena Gianotti, por tu sabiduría y bondad *-gràcies per tenir sempre temps per cadascun de nosaltres, per donar-me la força que a vegades perdem, per l'abraçada en el moment just-*. A Francisco J. García-Palmer, por los grandes momentos que nos das, por tu perenne sonrisa, *i perquè malgrat no em perdonis mai haver fet un altre màster, som bioquímica de tot cor :))*. Saber que siempre puedes contar con alguien, y va a darte lo mejor de sí, es lo que me ocurre con Ana Proenza y Bel Lladò, gracias.

*Thanks to Dr Massimo Donadelli for giving me the opportunity to work in his group and for his support during my stay at University of Verona*. Gracias por hacerme sentir como en casa, por todo el tiempo dedicado, por todo el cariño recibido. *And thanks to my colleagues and friends in Verona (Mariangela, Laura, Tizi, Alessio, "Maestro", Rossella, Ilaria, Giulia, Elisa, Marco)*. *Claudia, it has been a pleasure working with you*. Gracias por tu cariño, y por darme lo mejor de mis tres meses en Verona, tu amistad. Y a Laura Vitale porque sé que todo saldrá bien y pronto volverás a ser la de siempre, la sonrisa de Italia.

Agradecer al Dr. José Carlos García-Borrón y la Dra. Celia Jiménez-Cervantes por acogerme en su laboratorio de la Universidad de Murcia y poder contar con su apoyo ante

cualquier duda. Gracias a las compañeras Cecilia, Ana Belén y Marta por enseñarme tanto en tan poco tiempo. Y a Ana Tapia por tu sonrisa y amistad.

Un enorme gracias a mis compañeros de laboratorio. Por las risas y los momentos de complicidad, por las palabras de apoyo y el sentimiento de amistad, por demostrarme que la ciencia es también compañerismo. No concibo la investigación con el esfuerzo de uno solo, porque para poder publicar, pedir proyectos, discutir datos o valorar nuevas hipótesis es necesario el trabajo en equipo. Y creo que hemos sido y sois un gran equipo. A Miquelot - *millor dit Doctor Martorell-, perquè sempre has estat per donar-me una mà (a jo o al meu portàtil ^^)*. A Miquelet, *perquè sempre veus la part positiva de les coses i ets capaç de contagiar-ho*. A Beleta, *ets un 10 de nina i sa meva debilitat, gràcies per fer fàcil allò difícil*. A Marco, simplemente por ser como eres, por demostrarnos que, a pesar de las adversidades, debemos luchar por nuestros ideales, gracias por tu apoyo incondicional. A Gabriela -*en un sospir Dra. Capllonch ;))*-, *per tot el que hem compartit, i deixar-me conèixer un poquet el gran cor que tens*. No puedo olvidarme de quienes me acogieron cuando llegué (Miki, Cati, Toñi y Emi), de Antònia porque no se puede ser mejor persona, *i d'en Pere per tenir sempre una paraula de suport*. Gracias a todos, y especialmente a mis compañeros de poyata. Todo el trabajo que en esta tesis está reflejado (y el que no) no habría sido posible sin Maria del Mar, Dani y Jordi -estoy segura que en la historia "en doscientos años ^^" no ha habido otro grupo igual-, *mil gràcies. Gràcies Maria del Mar per deixar-me formar part de les teves inquietuds, confiar amb jo i ajudar-me tant i tant. No ho oblidis "Quan tot s'enlaira toca els somnis de puntetes", sempre podràs contar amb jo*. A Dani, (nuestro Dani) porque has sido una parte fundamental durante estos cuatro años, y sin ti no sé si muchas cosas habrían sido posible. Gracias por el gran esfuerzo de este último mes, *vals un món, i la teva amistat és un dels millor regals*. A quien me ha enseñado casi todo lo que sé dentro del labo, la persona que, sin conocerme, ya me escribió un mail de enhorabuena, dándome todo su apoyo, al recibir la beca predoctoral. Cuánto dice ese gesto de las personas, cuánto tengo que agradecerle Jordi Sastre Serra. Hace casi un año que dejaste la investigación (los recortes en I+D han hecho que sea prácticamente imposible tener oportunidades, sólo espero que este país reaccione porque sin ciencia no hay futuro) pero nunca has dejado de preocuparte por sus compañeros. *Gràcies per tot el que has fet per jo, per transmetre'm la teva passió per la ciència, per aconsellar-me i donar-me sempre el teu suport, per ser el meu mestre i un gran amic*.

A mis otros compis, Miriam, Ricardo, Carlos, Mar y *sa meva Marga*, mis amigos de zoología. Gracias por hacerme sentir parte de vosotros. *Marga només dir-te, una vegada més,*

*que ets part imprescindible de sa meva vida, i que sigui on sigui la vida et donarà tot el que et mereixes. Ets un tresoret, no ho oblidis mai.*

Durante estos años nada habría sido lo mismo sin mis grandes amigas, Noemi y Maria Antònia, porque basta una mirada para entendernos. Hemos pasado momentos de cambios, pero a vuestro lado los malos han sido menos malos y los buenos simplemente los mejores. Gracias por hacer de mí "mi mejor versión", por ser mi gran apoyo, por enseñarme que siempre hay que *Follow your Bliss*. Y también recordar a mi gran Alicia, la amistad que no entiende de distancias, reencontrarnos tras años y poder sentir la misma complicidad.

A mi familia. A mis padres que tanto han luchado y luchan por sus hijos, gracias por confiar en mí, por enseñarme el valor de las cosas, por estar siempre a mi lado. A mis hermanos, a los que adoro. Bernat eres mi ejemplo, Maria de Lluç la niña de mis ojos, no se puede querer más de lo que os quiero. No puedo olvidarme de mi tita (y madrina) porque siempre ha creído en mí, de mi primo Juan por lo orgullosa que estoy de ti, así como del resto de mi familia, para mí la mejor. Pero si alguien merece una mención aparte, esa persona es mi abuelita. Docenas de veces he intentado explicarle que hacía en el laboratorio y, a pesar de no saber muy bien que era, siempre acaba diciéndome lo mismo: "¡Pero qué lista que es mi hija!", lo qué no sabe es que soy yo la que está orgullosa de tenerla a ella.

Recuerdo que una vez leí que hay momentos en la vida en los que una serie de piezas inesperadas hacen clic, algo desvía el sendero marcado y nos abre puertas a escenarios que pensábamos imposibles. Adri has sido mi pieza inesperada, y sin la que ya no podría vivir. Gracias por decirme siempre que al final todo saldría bien y, que si no era así, es porque aún no era el final. Gracias por dar sentido a cada paso que doy. No olvides todo lo que eres para mí, *Tota la meva vida es lliga a tu, com en la nit les flames a la fosca (Bartomeu Rosselló-Pòrcel)*.

Mil gracias a todos,

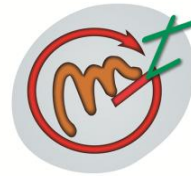
Mercedes

Este trabajo ha sido posible gracias a los proyectos de investigación financiados por el Fondo de Investigaciones Sanitarias (PS09-01637 y PI12-01827) del Gobierno Español, y por ayudas de la Comunidad Autónoma de las Islas Baleares cofinanciadas con fondos FEDER (AAEE007/2012). Además se ha contado con la financiación del Centro de Investigaciones Biomédicas en Red de Fisiopatología de la obesidad y la nutrición (Ciberobn, CB06/03) del Instituto de Salud Carlos III.

Invertim en el seu futur



Unió Europea  
Fons Social Europeu



**Govern de les Illes Balears**  
Conselleria d'Educació, Cultura i Universitats  
Direcció General d'Ordenació,  
Innovació i Formació Professional

**ciberobn**  
Centro de Investigación Biomédica en Red  
Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición



**isc**  
Instituto  
de Salud  
Carlos III



**UNIÓN EUROPEA**  
*"Una manera de hacer Europa"*

# ÍNDICE / CONTENTS

ABREVIATURAS / ABBREVIATIONS.....	I
RESUMEN / RESUM / ABSTRACT.....	III
LISTADO DE PUBLICACIONES / LIST OF PUBLICATIONS .....	VI
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Epidemiología y etiología del cáncer de mama.....	3
1.2. Receptores estrogénicos: estructura y mecanismos de acción .....	5
1.2.1. Estructura de los receptores estrogénicos .....	6
1.2.2. Mecanismos de acción de los receptores estrogénicos .....	7
1.3. Cáncer de mama. Papel de los estrógenos y los fitoestrógenos.....	9
1.3.1. Estrógenos .....	9
1.3.2. Fitoestrógenos .....	10
1.4. Mitocondria y estrés oxidativo.....	12
1.4.1. Mitocondria .....	12
1.4.2. Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) .....	14
1.4.3. Patologías asociadas a los ROS .....	16
1.4.4. Cáncer de mama y ROS.....	16
1.5. Papel de las sirtuinas en el cáncer.....	18
1.5.1. SIRT1 .....	19
1.5.2. SIRT3 .....	20
1.6. Papel de la UCP2 en el cáncer .....	21
1.7. Cáncer de mama. Leptina y obesidad .....	24
1.7.1. La leptina.....	24
1.7.2. La leptina en el cáncer de mama .....	25
2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL.....	27
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN / RESULTS AND DISCUSSION .....	35
Manuscript I. The ER $\alpha$ /ER $\beta$ ratio determines oxidative stress in breast cancer cell lines in response to 17 $\beta$ -estradiol .....	37
Manuscript II. Genistein modulates oxidative stress in breast cancer cell lines according to ER $\alpha$ /ER $\beta$ ratio: Effects on mitochondrial functionality, sirtuins, uncoupling protein 2 and antioxidant enzymes .....	47
Manuscript III. The oxidative stress in breast tumors of postmenopausal women is ER $\alpha$ /ER $\beta$ ratio dependent .....	57
Manuscript IV. Chronic-leptin attenuates cisplatin cytotoxicity in MCF-7 breast cancer cell line .....	67
Manuscript V. UCP2 knockdown/inhibition sensitizes MCF-7 breast cancer cells to cell death increasing oxidative stress .....	95

Manuscript VI. Mutant p53 inhibits UCP2 triggering ROS increase in pancreatic adenocarcinoma cell lines .....	123
4. RECAPITULACIÓN.....	155
5. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS.....	165
6. BIBLIOGRAFÍA /BIBLIOGRAPHY .....	171
7. ANEXO / APPENDIX.....	185
Manuscript VII. The effects of 17 $\beta$ -estradiol on mitochondrial biogenesis and function in breast cancer cell lines are dependent on the ER $\alpha$ /ER $\beta$ ratio .....	187
Manuscript VIII. Mitochondrial dynamics is affected by 17 $\beta$ -estradiol in the MCF-7 breast cancer cell line. Effects on fusion and fission related genes.....	197
Manuscript IX. Initial activation status of the antioxidant response determines sensitivity to carboplatin/paclitaxel treatment of ovarian cancer .....	205
Manuscript X. The over-expression of ERbeta modifies estradiol effects on mitochondrial dynamics in breast cancer cell line .....	213
Manuscript XI. Genistein modulates proliferation and mitochondrial functionality in breast cancer cells depending on ERalpha/ERbeta ratio .....	223
Manuscript XII. Phytoestrogens and mitochondrial biogenesis in breast cancer. Influence of estrogen receptors ratio .....	235

## ABREVIATURAS / ABBREVIATIONS

$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial / Mitochondrial membrane potential
ADN / DNA	Ácido desoxirribonucleico / <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
ADN mt / mtDNA	ADN mitocondrial / <i>Mitochondrial DNA</i>
ADP	Adenosina difosfato / <i>Adenosine diphosphate</i>
AKT	Proteína quinasa B / <i>Protein Kinase B</i>
AF-1	Función activadora 1 / <i>Activation Function 1</i>
ARN / RNA	Ácido ribonucleico / <i>Ribonucleic Acid</i>
ARNm / mRNA	ARN mensajero / <i>Messenger RNA</i>
ARNr / rRNA	ARN ribosómico / <i>Ribosomal RNA</i>
ARNt / tRNA	ARN de transferencia / <i>Transfer RNA</i>
ATM	Gen ataxia telangiectasia mutado / <i>Ataxia telangiectasia mutated gene</i>
ATP	Adenosina trifosfato / <i>Adenosine triphosphate</i>
BRCA1	Gen cáncer de mama 1 / <i>Breast cancer 1 gene</i>
BRCA2	Gen cáncer de mama 2 / <i>Breast cancer 2 gene</i>
BRIP1	Proteína 1 interactúa con BRCA1 / <i>BRCA1-interacting protein 1</i>
CAT	Catalasa / <i>Catalase</i>
COX	Citocromo c oxidasa / <i>Cytochrome c oxidase</i>
CS	Citrato Sintasa / <i>Citrate Synthase</i>
CHECK2	Punto de control del ciclo celular quinasa 2 / <i>Checkpoint homolog2</i>
DBC1	Eliminado en mama cáncer-1 / <i>Deleted in breast cancer-1</i>
DCFDA	Diclorofluoresceína diacetato / <i>Dichlorofluorescein diacetate</i>
E1	Estrona / <i>Estrone</i>
E2	17 $\beta$ -estradiol
E3	Estriol
ER	Receptor de estrógenos / <i>Estrogen receptor</i>
ERE	Elemento de respuesta a estrógenos / <i>Estrogen Response Element</i>
ERK	Quinasa regulada extracelularmente / <i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FADH <sub>2</sub>	Flavin adenina dinucleótido / <i>Flavin Adenine Dinucleotide</i>
FoxO1	<i>Forkhead box O1</i>
GPx	Glutación Peroxidasa / <i>Glutathione Peroxidase</i>
GRd	Glutación Reductasa / <i>Glutathione Reductase</i>
GSH	Glutación reducido / <i>Reduced Glutathione</i>
GSSG	Glutación oxidado / <i>Oxidized Glutathione</i>
HIC1	Hipermetilado en Cáncer-1 / <i>Hypermethylated in cancer 1</i>
4-HNE	<i>4-hydroxy-2-nonenal</i>
Hsp90	Proteína de choque térmico 90 / <i>Heat shock protein 90</i>
JAK2	<i>Janus kinase</i>
MRC	Cadena respiratoria mitocondrial / <i>Mitochondrial respiratory chain</i>
mutp53	p53 mutado / <i>Mutant p53</i>
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido / <i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato / <i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NAO	Naranja de acridina / <i>Nonyl Acridine orange</i>
NRF	Factor de respiración nuclear / <i>Nuclear respiratory factor</i>
PALB2	Socio y localizador de BRCA2 / <i>Partner and localizer of BRCA2</i>
PGC1 $\alpha$	Coactivador 1 $\alpha$ de PPAR $\gamma$ / <i>PPAR<math>\gamma</math> Coactivator 1<math>\alpha</math></i>

PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa / <i>Phosphatidylinositol 3 kinase</i>
PPAR $\gamma$	Receptor activado por proliferadores peroxisomales gamma/ <i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
Prx	Peroxirredoxina / <i>Peroxiredoxin</i>
PTEN	Homólogo de fosfatasa y tensina/ <i>Phosphatase and tensin homolog</i>
ROS	Especies reactivas de oxígeno / <i>Reactive Oxygen Species</i>
SAPK	Proteína quinasa activada por estrés/ <i>Stress-activated protein kinase</i>
SERM	Modulador selectivo de los receptores de estrógenos/ <i>Selective Estrogen Receptor Modulator</i>
SESN	Sestrina / <i>Sestrin</i>
siRNA	ARN pequeño de interferencia / <i>small interfering RNA</i>
SIRT	Sirtuina / <i>Sirtuin</i>
SOD	Superóxido dismutasa / <i>Superoxide dismutase</i>
SP-1	Proteína específica 1 / <i>Specificity Protein 1</i>
STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3 / <i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
TFAM	Factor de transcripción mitocondrial A / <i>Mitochondrial transcription factor A</i>
TMRM	Tetrametil rodamina metil éster / <i>Tetramethyl Rhodamine Methyl Ester</i>
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$ / <i>Tumor necrosis factor alpha</i>
Trx	Tiorredoxina / <i>Thioredoxin</i>
TrxR	Tiorredoxina reductasa / <i>Thioredoxin reductase</i>
UCP	Proteína desacoplante / <i>Uncoupling protein</i>
wt p53	p53 salvaje / <i>wild-type p53</i>





## ***Efectos de los Estrógenos, la Genisteína y la Leptina sobre el Estrés Oxidativo en el Cáncer de Mama. Importancia de la UCP2***

Tesis doctoral, Mercedes Nadal Serrano,

Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut, Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut, Universitat de les Illes Balears, Palma, España.

### **Resumen**

El estrés oxidativo es un desequilibrio entre la producción de radicales libres y los sistemas antioxidantes encargados de su neutralización. El resultado de este desequilibrio es la acumulación de daños en diversas estructuras celulares incluyendo el DNA. El cáncer se acompaña de un mayor estrés oxidativo a nivel celular, por este motivo, muchos de los tratamientos terapéuticos van dirigidos a aumentar los niveles citotóxicos de ROS, conduciendo a la célula tumoral a la apoptosis. Sin embargo, durante la tumorigénesis las células van adquiriendo una serie de características que permiten mantener la homeostasis de los ROS y desarrollar resistencia a los tratamientos antineoplásicos.

El cáncer de mama es un tipo de neoplasia en la que el factor endocrino juega un papel relevante tanto en la etiología como en la evolución de la enfermedad. En esta tesis nos planteamos como objetivo estudiar los efectos del  $17\beta$ -estradiol (E2), la genisteína y la leptina, como factores hormonales, sobre la modulación del estrés oxidativo en la carcinogénesis de mama. E2 es uno de los principales factores de riesgo en la iniciación y progresión de la enfermedad; la genisteína es uno de los fitoestrógenos de mayor actividad estrogénica y, por su parte, la leptina también ha mostrado efectos potenciadores sobre el cáncer de mama, considerándose a nivel epidemiológico como un posible enlace entre obesidad y cáncer. Para alcanzar estos objetivos se estudió: i) el efecto dual de E2 y genisteína sobre el estrés oxidativo en función de la dotación de ER $\alpha$  y ER $\beta$  en líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7 y T47D), y el estrés oxidativo en muestras de carcinomas ductales infiltrantes en función de la ratio de receptores estrogénicos; ii) la influencia de la leptina crónica sobre el estrés oxidativo y su respuesta al fármaco antineoplásico cisplatino en la línea celular MCF-7; y iii) la importancia de la UCP2 en la regulación del estrés oxidativo endógeno e inducido en las células MCF-7, así como, en líneas celulares de cáncer de páncreas con p53 mutado.

Los resultados indican que E2 induce estrés oxidativo de forma dependiente de la dotación de ER $\alpha$ /ER $\beta$ . Así, el aumento del estrés oxidativo, debido en parte a un descenso de los sistemas antioxidantes, está mediado por ER $\alpha$ . En cambio, la activación de ER $\beta$  por la genisteína implica un menor estrés oxidativo y una mejor función mitocondrial, promovido por una respuesta antioxidante. En consonancia con el estudio *in vitro*, los carcinomas mamarios con una menor ratio ER $\alpha$ /ER $\beta$  también mostraron una mayor respuesta detoxificante, favoreciendo la supervivencia celular. Por su parte, la leptina parece disminuir el nivel de estrés oxidativo basal, lo que podría jugar un papel en la adquisición de resistencia a los tratamientos anticancerígenos. El desacoplamiento mitocondrial mediado por UCP2 protege a la célula cancerosa del daño oxidativo, lo que posiblemente podría conferir citoprotección a través de la adquisición de quimioresistencia. En células de cáncer de páncreas, p53 mutado induce la producción de ROS debido a una disminución de UCP2, contribuyendo al crecimiento celular. En conclusión, los resultados de la presente tesis sugieren que tanto ER $\beta$  como UCP2 podrían ser biomarcadores interesantes para conseguir una mejor caracterización del tumor en relación a su nivel de estrés oxidativo y la posible respuesta al tratamiento.



## ***Efectes dels Estrògens, la Genisteïna i la Leptina sobre l'Estrès Oxidatiu en el Càncer de Mama. Importància de la UCP2***

Tesi doctoral, Mercedes Nadal Serrano,

Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut, Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut, Universitat de les Illes Balears, Palma, Espanya.

### **Resum**

L'estrès oxidatiu és un desequilibri entre la producció de radicals lliures i els sistemes antioxidants encarregats de la seva neutralització. El resultat d'aquest desequilibri és l'acumulació de danys a diverses estructures cel·lulars incloent el DNA. El càncer va acompanyat d'un major estrès oxidatiu a nivell cel·lular, per aquest motiu, molts dels tractaments terapèutics van dirigits a augmentar els nivells citotòxics de ROS, conduint a la cèl·lula tumoral a la apoptosi. No obstant això, durant la tumorigènesi les cèl·lules van adquirint una sèrie de característiques que permeten mantenir l'homeòstasi dels ROS i desenvolupar resistència als tractaments antineoplàstics.

El càncer de mama és un tipus de neoplàsia en la qual el factor endocrí juga un paper rellevant tant en la etiologia como en l'evolució de la malaltia. En aquesta tesi ens vàrem plantejar com a objectius estudiar els efectes del 17 $\beta$ -estradiol (E2), la genisteïna i la leptina, com a factors hormonals, sobre la modulació de l'estrès oxidatiu en la carcinogènesi de mama. E2 és un dels principals factors de risc en la iniciació i progressió de la malaltia, la genisteïna és un dels fitoestrògens de major activitat estrogènica i, per la seva part, la leptina també ha mostrat efectes potenciadors sobre el càncer de mama, considerant-se a nivell epidemiològic un possible enllaç entre obesitat i càncer. Per a assolir aquests objectius es va estudiar: i) l'efecte dual de E2 i genisteïna sobre l'estrès oxidatiu en funció de la dotació de ER $\alpha$  i ER $\beta$  en línies cel·lulars de càncer de mama (MCF-7 i T47D), i l'estrès oxidatiu a mostres de carcinomes ductals infiltrants en funció de la ràtio de receptors estrogènics; ii) la influència de la leptina crònica sobre l'estrès oxidatiu i la seva resposta al fàrmac antineoplàstic cisplatí en la línia cel·lular MCF-7; i iii) la importància de la UCP2 en la regulació de l'estrès oxidatiu endogen i induït en les cèl·lules MCF-7, així como, en línies cel·lulars de càncer de pàncrees amb p53 mutat.

Els resultats indiquen que E2 indueix estrès oxidatiu de forma depenent de la dotació de ER $\alpha$ /ER $\beta$ . Així, l'augment de l'estrès oxidatiu, causat en part per un descens dels sistemes antioxidants, està mediat per ER $\alpha$ . En canvi, l'activació de ER $\beta$  per la genisteïna implica un menor estrès oxidatiu i una millor funció mitocondrial, promogut per una resposta antioxidant. En consonància amb l'estudi *in vitro*, els carcinomes mamaris amb una menor ràtio ER $\alpha$ /ER $\beta$  també varen mostrar una major resposta detoxificant, afavorint la supervivència cel·lular. Per la seva part, la leptina sembla disminuir el nivell d'estrès oxidatiu basal, la qual cosa podria jugar un paper en l'adquisició de resistència als tractaments anticancerígens. El desacoblament mitocondrial mediat per UCP2 protegeix a la cèl·lula cancerosa del dany oxidatiu, fet que possiblement podria conferir citoprotecció a través de l'adquisició de quimioresistència. En cèl·lules de càncer de pàncrees, p53 mutat indueix la producció de ROS a causa d'una disminució de UCP2, contribuint al creixement cel·lular. En conclusió, els resultats de la present tesi suggereixen que tant ER $\beta$  com UCP2 podrien ser biomarcadors interessants per a aconseguir una millor caracterització del tumor en relació al seu nivell d'estrès oxidatiu i la possible resposta al tractament.



***The effects of estrogens, genistein and leptin on oxidative stress in breast cancer. The significance of UCP2***

Doctoral Thesis, Mercedes Nadal Serrano,

Department of Fundamental Biology and Health Sciences, University of Balearic Islands, Palma, Spain.

**Abstract**

Oxidative stress is an imbalance between free radical production and the antioxidant systems responsible for counteracting them. The result of this imbalance is accumulation of damage in several cellular structures, including DNA. Cancer is associated with increased oxidative stress, therefore, many therapeutic treatments are targeted to raise cytotoxic ROS levels, which would lead to tumor cell apoptosis. However, during tumorigenesis, cells acquire several features that maintain ROS homeostasis and develop resistance to anticancer treatments.

Breast cancer is a type of neoplasia in which the endocrine factor plays an important role in etiology and disease progress. In the present thesis we set out to study the effects of hormonal factors: 17 $\beta$ -estradiol (E2), genistein and leptin, on oxidative stress modulation in breast carcinogenesis. E2 is one of the main risk factors for breast cancer initiation and progression; genistein is one of the phytoestrogens with greater estrogenic activity and, while, leptin has also shown enhancing effects on breast cancer, epidemiologically it is also considered to be a possible link between obesity and cancer. The aim of this work was to study: i) the dual effect of E2 and genistein on oxidative stress depending on the ER $\alpha$  and ER $\beta$  ratio in breast cancer cell lines (MCF-7 and T47D), and oxidative stress in invasive ductal carcinoma samples depending on estrogen receptor ratio; ii) the influence of chronic leptin on oxidative stress and response to anticancer drug cisplatin in MCF-7 cell line; iii) the significance of UCP2 in the regulation of endogenous and induced oxidative stress in MCF-7 cells as well as in mutant p53 pancreatic cancer cell lines.

Results indicate that E2 induces oxidative stress in a ER $\alpha$ /ER $\beta$  ratio-dependent manner. Thus, the increase in oxidative stress, due to in part to a decrease in antioxidant systems, is mediated by ER $\alpha$ . In contrast, ER $\beta$  activation by genistein involves a lower oxidative stress and better mitochondrial function, which is promoted by an antioxidant response. In agreement with the *in vitro* study, breast tumors with a lower ER $\alpha$ /ER $\beta$  ratio showed a higher detoxifying response, which also improved cellular survival. In turn, leptin appears to decrease the basal level of oxidative stress, which could play a role in the acquisition of resistance to anticancer treatments. UCP2-mediated mitochondrial uncoupling protects the cancer cell from oxidative damage, which may possibly confer cytoprotection through chemoresistance acquisition. In pancreatic cancer cells, p53 mutant induces ROS production due to a decrease in UCP2, contributing to cell growth. In conclusion, the results of this thesis suggest that both ER $\beta$  and UCP2 may be interesting biomarkers for a better characterization of the tumor in relation to its level of oxidative stress and possible treatment response.

## LISTADO DE PUBLICACIONES / LIST OF PUBLICATIONS

Esta tesis se basa en las siguientes publicaciones / *This thesis is based on the following papers:*

- I. Nadal-Serrano M, Sastre-Serra J, Pons DG, Miró AM, Oliver J, Roca P. **The ERalpha/ERbeta ratio determines oxidative stress in breast cancer cell lines in response to 17beta-estradiol.** J Cell Biochem. 2012 Oct; 113 (10): 3178-85
- II. Nadal-Serrano M, Pons DG, Sastre-Serra J, Blanquer-Rosselló M del M, Roca P, Oliver J. **Genistein modulates oxidative stress in breast cancer cell lines according to ERα/ERβ ratio: effects on mitochondrial functionality, sirtuins, uncoupling protein 2 and antioxidant enzymes.** Int J Biochem Cell Biol. 2013 Sep;45 (9):2045-51
- III. Sastre-Serra J, Nadal-Serrano M, Pons DG, Valle A, García-Bonafé MM, Oliver J, Roca P **The oxidative stress in breast tumors of postmenopausal women is ERα/ERβ ratio dependent.** Free Radic Biol Med. 2013 Mar 14; 61C: 11-17
- IV. **Chronic-leptin attenuates cisplatin cytotoxicity in MCF-7 breast cancer cell line.** Manuscript
- V. **UCP2 knockdown/inhibition sensitizes MCF-7 breast cancer cells to cell death increasing oxidative stress.** Manuscript
- VI. **Mutant p53 inhibits UCP2 triggering ROS increase in pancreatic adenocarcinoma cell lines.** Manuscript

## **ANEXO / APPENDIX**

Además durante la realización de la presente tesis, la doctoranda ha colaborado en la realización de otros estudios relacionados con el proyecto de tesis, que han dado lugar a las publicaciones que se presentan en el anexo / *Furthermore, during this thesis, the PhD student has also been involved in complementary projects that have led to the publication of the manuscripts presented in the appendix:*

- VII. Sastre-Serra J, Nadal-Serrano M, Pons DG, Valle A, Oliver J, Roca P. **The effects of 17 $\beta$ -estradiol on mitochondrial biogenesis and function in breast cancer cell lines are dependent on the ER $\alpha$ /ER $\beta$  ratio.** Cell Physiol Biochem. 2012; 29 (1-2): 261-8
- VIII. Sastre-Serra J, Nadal-Serrano M, Pons DG, Roca P, Oliver J. **Mitochondrial dynamics is affected by 17 $\beta$ -estradiol in the MCF-7 breast cancer cell line. Effects on fusion and fission related genes.** Int J Biochem Cell Biol. 2012 Nov; 44 (11): 1901-5
- IX. Pons DG, Sastre-Serra J, Nadal-Serrano M, Oliver A, García-Bonafé M, Bover I, Roca P, Oliver J. **Initial activation status of the antioxidant response determines sensitivity carboplatin-paclitaxel treatment of ovarian cancer.** Anticancer Res. 2012 Nov;32 (11): 4723-8
- X. Sastre-Serra J, Nadal-Serrano M, Pons DG, Roca P, Oliver J. **The over-expression of ERbeta modifies estradiol effects on mitochondrial dynamics in breast cancer cell line.** Int J Biochem Cell Biol. 2013 Jul; 45 (7): 1509-15
- XI. Pons DG, Nadal-Serrano M, Blanquer-Rossello MM, Sastre-Serra J, Oliver J, Roca P. **Genistein modulates proliferation and mitochondrial functionality in breast cancer cells depending on ERalpha/ERbetaratio.** J Cell Biochem. 2014 May;115 (5):949-58
- XII. Roca P, Sastre-Serra J, Nadal-Serrano M, Pons DG, Blanquer-Rossello MD, Oliver J. **Phytoestrogens and Mitochondrial Biogenesis in Breast Cancer. Influence of Estrogen Receptors Ratio.** Curr Pharm Des. 2014 Mar 5



## **1. Introducción**





Durante la tumorigénesis, la célula debe adquirir secuencialmente determinadas características para convertirse en cancerosa. Debe desarrollar la capacidad de estimular su propio crecimiento, escapar de las señales de los supresores tumorales, resistir a los mecanismos de muerte celular, permitir la inmortalidad replicativa, inducir la angiogénesis y, por último, activar la metástasis celular<sup>1</sup>. Recientes avances en el conocimiento de la biología del cáncer han puesto al descubierto dos nuevas propiedades de la célula tumoral, la capacidad de evadirse el sistema inmune y la de reprogramar el metabolismo energético<sup>2</sup>. Respecto a esta última característica, Otto Warburg ya describió en 1926 la dependencia de la célula cancerosa de la vía glucolítica para la generación de ATP<sup>3</sup>. Sin embargo, existe un cierto debate sobre ésta alteración del metabolismo energético, ya que las mitocondrias, orgánulos responsables de generar más del 90% de los requerimientos energéticos de las células normales, tienen un papel central en la transformación de la célula hacia un fenotipo canceroso<sup>4,5</sup>. Considerando que la mayoría de las células tumorales son resistentes a la apoptosis, no es de extrañar que las mitocondrias de la células cancerosas sean distintas a las de las células normales<sup>6</sup>, sugiriendo que la regulación de la funcionalidad mitocondrial es clave tanto en la iniciación como en el desarrollo del cáncer.

### **1.1. Epidemiología y etiología del cáncer de mama**

El cáncer de mama es una de las enfermedades con mayor incidencia dentro de la población femenina de los países desarrollados, siendo la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres, por detrás del cáncer de pulmón. El último estudio publicado por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (*IARC- International Agency for Research on Cancer*) señala que sólo en un año, el 2012, hubo 14,1 millones de nuevos casos de cáncer en el mundo, y que 1,7 millones de mujeres a nivel mundial fueron diagnosticadas con cáncer de mama. Estos datos implican que, desde el año 2008, la incidencia de cáncer de mama ha aumentado en más del 20%, mientras que la mortalidad lo ha hecho en un 14%. En la actualidad uno de cada cuatro cánceres en mujeres corresponde a cáncer de mama.

En general, la tendencia mundial muestra que en los países en desarrollo que pasan por cambios social-económicos rápidos, el cambio hacia estilos de vida propios a los de los países industrializados conduce a una carga creciente de cánceres asociados con factores de riesgo reproductivos, dietéticos y hormonales.

Los estudios epidemiológicos muestran que los estrógenos son uno de los principales factores de riesgo en la iniciación y progresión del cáncer de mama<sup>7,8</sup> porque estimulan el crecimiento de las células epiteliales del tejido mamario, y esta proliferación incrementa la susceptibilidad a la adquisición de mutaciones en el DNA durante la replicación. Además, numerosos estudios establecen una relación entre el cáncer de mama inducido por estrógenos y el estrés oxidativo<sup>9,10</sup>. Los estrógenos producen metabolitos genotóxicos que pueden formar aductos en el DNA, así como generar radicales libres de oxígeno (ROS- *Reactive Oxygen Species*) a través de ciclos redox<sup>11</sup>. La relación entre las hormonas y el desarrollo del cáncer de mama ha sido reconocida desde hace más de un siglo. En 1896, George Beatson y colaboradores describieron que la extirpación de los ovarios en mujeres premenopáusicas con cáncer de mama avanzado provocaba una importante disminución en el tamaño del tumor y una mejora de la prognosis<sup>12</sup>.

Algunos factores reproductivos modifican los niveles de estrógenos, lo que podría explicar la relación entre dichos factores y el riesgo de cáncer de mama<sup>13</sup>. Así pues, la menarquía temprana, la menopausia tardía, un bajo o nulo número de embarazos, o una edad avanzada durante el primer embarazo son situaciones asociadas directamente con unos mayores niveles de estrógenos y, por tanto, con un mayor riesgo de padecer cáncer de mama<sup>7,13</sup>. Por otra parte, la IARC estima que el 25% de todos los cánceres están asociados con el sobrepeso y la obesidad<sup>14</sup>, y que existe una linealidad de la incidencia de cáncer con el incremento del índice de masa corporal. Después de la menopausia el tejido adiposo es la principal fuente de estrógenos<sup>15</sup> así pues, existe un riesgo incrementado de desarrollar cáncer de mama en una mujer obesa postmenopáusica debido en parte a los elevados niveles de estrógenos circulantes<sup>16</sup>. Durante muchos años, este riesgo incrementado se ha relacionado con la aromatización de los andrógenos en el tejido adiposo, elevando así

los niveles de estrógenos<sup>17</sup>, pero estudios recientes también muestran que las hormonas secretadas por este tejido, las adipoquinas, parecen ser moléculas clave que relacionan obesidad y cáncer<sup>18,19</sup>, siendo la leptina una de las adipoquinas más importantes<sup>20</sup>.

La historia familiar, es otro de los factores que se asocia con el riesgo de cáncer de mama. Las mujeres con un familiar de primer orden con cáncer de mama presentan alrededor del doble de riesgo de desarrollar la enfermedad. Sin embargo, el riesgo es mucho menor cuando sólo un familiar de segundo orden se ve afectado<sup>21</sup>. Otro factor de riesgo es la predisposición genética, habiéndose identificado muchas mutaciones en la línea germinal que predisponen al desarrollo del cáncer de mama: BRCA1, BRCA2, P53, PTEN, ATM, NBS1, RAD50, BRIP1, PALB2 y CHECK2<sup>22</sup>.

## **1.2. Receptores estrogénicos: estructura y mecanismos de acción**

Los estrógenos pertenecen a la familia de hormonas esteroideas las cuales ejercen una gran variedad de efectos sobre el crecimiento, desarrollo y diferenciación de diferentes tejidos. La acción reguladora primaria de los estrógenos está restringida principalmente a los órganos reproductivos; sin embargo, pueden regular otros procesos en tejidos como el hueso, hígado, sistema cardiovascular y cerebro<sup>23,24</sup>.

En las mujeres hay tres tipos de estrógenos naturales, la estrona (E1), el estriol (E3) y el estradiol (17 $\beta$ -estradiol o E2), siendo el E2 el estrógeno predominante en la circulación durante los años reproductivos de la mujer y el que presenta una mayor actividad estrogénica.

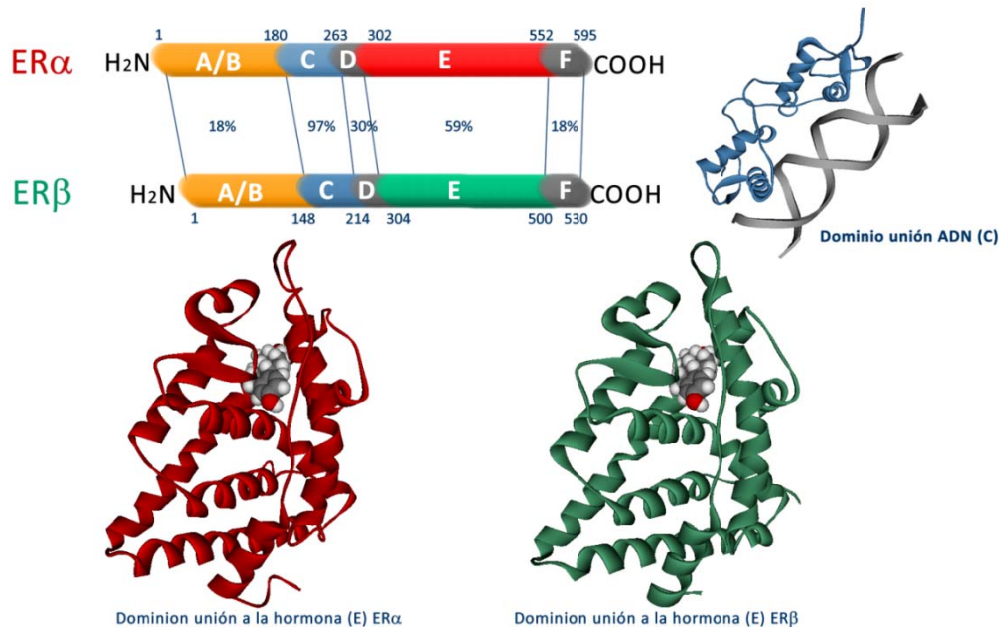
La acción del E2 está mediada a través de su unión a dos subtipos de receptores estrogénicos (ER). Gracias a los estudios dirigidos por el Dr. Jensen se describió el primer ER, lo que supuso la apertura de un nuevo campo de acción de la hormona<sup>25</sup>. Hasta hace unos años se pensaba que todos los efectos debidos a estrógenos eran mediados por un solo ER, sin embargo, en 1996, fue descubierto un nuevo receptor

que comparte gran homología con el ER conocido, por lo que se decidió denominar ER $\beta$ <sup>26</sup> al recientemente descubierto y ER $\alpha$  al previamente conocido.

### 1.2.1. Estructura de los receptores estrogénicos

ER $\alpha$  y ER $\beta$  pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares de tipo I, también conocidos como receptores esteroideos<sup>27,28</sup>. Ambos receptores contienen 6 dominios funcionales, denominados de la letra A a la F. La región A/B, la menos conservada, está localizada en la región N-terminal. Este dominio contiene una función de activación de la transcripción genética (*Activation Function 1* o AF-1) y varios sitios de fosforilación que son importantes en el proceso de activación de la proteína especialmente en los procesos donde el receptor es activado en ausencia de hormona. Adyacente se encuentra la región de unión al DNA o dominio C, altamente conservado. Este dominio contiene dos dedos de zinc y un motivo corto, llamado P-box, que le confieren al receptor la capacidad de dimerizar y unirse a una secuencia específica del DNA. Entre el dominio C y el dominio E/F, se encuentra la región D o región bisagra, la cual no ha sido aún bien caracterizada, pero se sabe que participa en la unión de la chaperona HSP90 al receptor mientras se encuentra en estado inactivo. Finalmente, en el extremo C-terminal se localiza la región E/F o dominio de unión a ligando. Esta región a pesar de estar conservada entre los diferentes receptores esteroideos es altamente específica para su hormona<sup>27,29</sup> (Figura 1).

Los genes de ambos receptores son codificados por 8 exones y se localizan en diferentes cromosomas, confirmando que cada receptor es el producto de genes independientes. Hay una gran homología en los dominios de unión al DNA y al ligando, 96% y 58% respectivamente. Consecuentemente, ambos receptores ER $\alpha$  y ER $\beta$  se unen de manera muy similar al DNA, pero es la asociación con diferentes cofactores lo que modula la transcripción génica<sup>30</sup>.



**Figura 1.** Representación de los dominios proteicos de los receptores estrogénicos ERα y ERβ. Estructura tridimensional del dominio de unión al DNA (C) y de los dominios de unión a la hormona (E).

### 1.2.2. Mecanismos de acción de los receptores estrogénicos

La teoría clásica de acción de las hormonas esteroideas establece que el ER es activado por el ligando E2 en el citoplasma<sup>31</sup>. El complejo ligando-receptor entra al núcleo donde homo o heterodimeriza, tras su disociación de la chaperona HSP90, y se une a los elementos de respuesta a estrógeno (EREs) presentes en los promotores de genes diana, actuando como un factor de transcripción (Figura 2). Este modo de acción ha sido denominado genómico. Ambos subtipos de receptores unidos a su ligando también pueden activar o inhibir promotores que no presentan EREs mediante su unión a factores de transcripción, como SP-1 o AP-1, los cuales presentan los sitios de unión al DNA<sup>32</sup>. De hecho, algunos estudios indican que el complejo ERα/SP-1 juega un papel importante en la activación transcripcional de múltiples genes reguladores de crecimiento en células de cáncer de mama<sup>33</sup>.

Además de los efectos transcripcionales de los estrógenos, se ha descrito un modo de acción no genómico<sup>31</sup>. Es un proceso rápido, que ocurre en unos pocos segundos o minutos, ya que no requiere de los procesos de transcripción y síntesis de nuevas proteínas. Este mecanismo todavía no ha sido completamente dilucidado, y no

está claro si ER $\alpha$  está o no implicado, o si puede estar mediado por un receptor localizado en la membrana (GPR30)<sup>34</sup>. Se ha propuesto que el complejo receptor-E2 podría estar activado con proteínas mensajeras secundarias (SM), quinasas y fosfatasa, afectando a los flujos de iones a través de membranas, y esto conduciría a una rápida repuesta fisiológica sin afectar a la regulación génica<sup>35</sup>. Finalmente, los ERs tienen un mecanismo de activación independiente de ligando, en el que varias proteínas quinasas, implicadas en las vías de señalización de factores de crecimiento, fosforilan el ER activándolo, pudiendo explicar este mecanismo el crecimiento independiente de hormonas<sup>36</sup>.

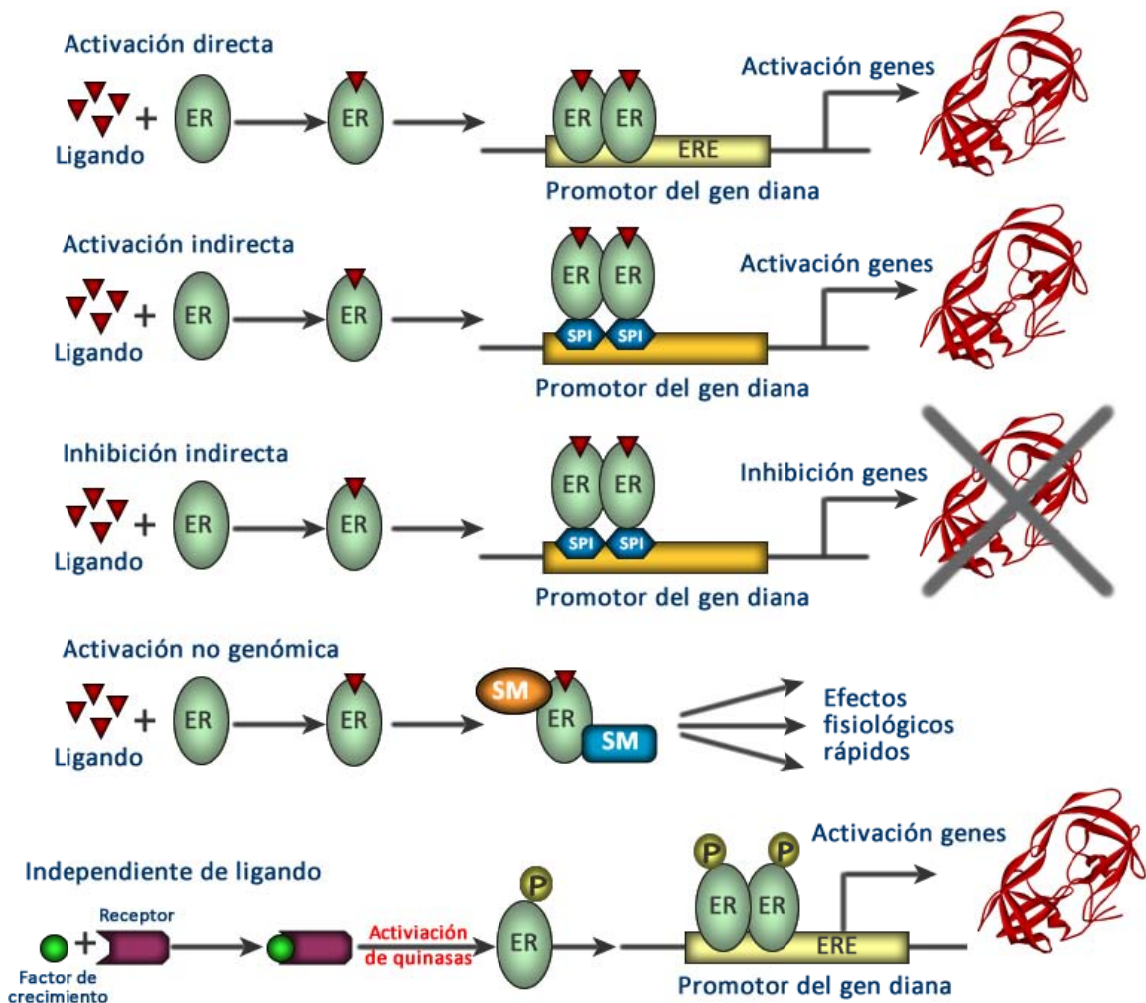


Figura 2. Mecanismos de acción de los receptores estrogénicos.

### 1.3. Cáncer de mama. Papel de los estrógenos y los fitoestrógenos

#### 1.3.1. Estrógenos

Los estrógenos juegan un papel central en la fisiología de los procesos reproductivos, especialmente en el desarrollo de la glándula mamaria durante la pubertad<sup>37</sup>, donde la proliferación celular es indispensable para su crecimiento y desarrollo normal. Además, el epitelio mamario de mujeres sexualmente maduras sufre ciclos de proliferación / involución regulados hormonalmente de acuerdo al ciclo menstrual. La proliferación inducida por los estrógenos incrementa la susceptibilidad a la acumulación de mutaciones y, por tanto, a la tumorigénesis<sup>38</sup>. Por este motivo, la exposición a los estrógenos a lo largo de la vida es un factor de riesgo de cáncer de mama. No obstante, recientes estudios sugieren que la respuesta proliferativa estimulada por estrógenos está determinada por la ratio ER $\alpha$ /ER $\beta$ <sup>39-41</sup>. Los efectos de ER $\alpha$  están relacionados con procesos proliferativos, mientras que los de ER $\beta$  se relacionan con procesos antiproliferativos y de diferenciación<sup>42,43</sup>. Además, estudios *in vitro* indican que cuando ambos receptores forman un heterodímero, el ER $\beta$  disminuye la sensibilidad de E2 por el ER $\alpha$ , actuando como un regulador fisiológico de los efectos proliferativos de ER $\alpha$ <sup>40,44</sup>.

Aproximadamente el 60 % de los tumores de mama son clasificados como ER-positivos y la mayoría de estos tipos de tumores presentan ambos receptores estrogénicos. Se ha visto que la valoración de ER $\beta$  junto con el ER $\alpha$  tiene una mejor prognosis para la respuesta endocrina que el ER $\alpha$  solo, ya que ER $\beta$  sensibiliza las células cancerosas a los efectos de agentes terapéuticos antiestrogénicos<sup>45,46</sup>. En esta línea, evidencias clínicas han indicado que la pérdida de la expresión de ER $\beta$  está asociada a una peor prognosis y resistencia a la terapia endocrina<sup>47-49</sup>. De hecho, los estudios sugieren que la expresión de ER $\beta$  va disminuyendo durante la carcinogénesis<sup>50</sup>, y aunque el mecanismo no está completamente esclarecido, parece ser que cambios epigenéticos podrían estar implicados<sup>51</sup>. No obstante, la presencia de ER $\beta$  en estadios más avanzados del cáncer también podría implicar una peor evolución del tumor, debido a la capacidad de las células cancerosas a adaptarse a unas condiciones de mayor estrés oxidativo.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, el mecanismo de acción de los estrógenos podría depender del estatus de receptores estrogénicos. Además, el creciente interés por entender la distinta acción biológica de los estrógenos en el cáncer de mama, podría deberse a la variación entre los niveles de ER $\alpha$  y ER $\beta$ <sup>52</sup>.

### 1.3.2. Fitoestrógenos

Los fitoestrógenos son una clase de compuestos de origen vegetal que se caracterizan por una estructura similar a la del E2, y que clásicamente han sido definidos como posibles moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (SERMs)<sup>53</sup>. Sus propiedades beneficiosas para la salud han sido descritas en diferentes tipos de cáncer, como el de mama, próstata o colon<sup>54-57</sup>; la osteoporosis<sup>58,59</sup>, enfermedades cardiovasculares<sup>60</sup>, el sistema inmune y la respuesta inflamatoria, así como en la reproducción y fertilidad<sup>57</sup>.

El interés inicial de los fitoestrógenos como potenciales agentes terapéuticos en el cáncer de mama se atribuyó a la baja incidencia de la enfermedad en los países asiáticos<sup>61,62</sup>, donde los productos naturales que contienen soja, fuente rica de fitoestrógenos<sup>63</sup>, son un importante componente de la dieta. Se ha propuesto que el efecto protector podría estar relacionado con la exposición temprana a los fitoestrógenos<sup>64</sup>. Por otra parte, la posibilidad de que la soja pudiera ejercer las mismas hipotéticas ventajas de los estrógenos en la osteoporosis, las enfermedades cardiovasculares o aliviando los síntomas del climaterio, han llevado a que la soja sea vista como una posible alternativa a la convencional terapia de reemplazo hormonal<sup>65,66</sup>. No obstante, existe una creciente preocupación respecto a su papel en el cáncer de mama, debido a las propiedades estrogénicas que presentan, y cuyos efectos podrían ser perjudiciales para pacientes con cáncer de mama sensible a estrógenos<sup>67,68</sup>.

La genisteína es el fitoestrógeno predominante en los productos de soja<sup>56</sup>, y pertenece al grupo de las isoflavonas. En 1960, Folman y Pope<sup>69</sup> fueron los primeros en establecer la relativa afinidad de las isoflavonas por el receptor estrogénico, y años posteriores Kuiper *et al.* describieron que la genisteína se une a ER $\beta$  con mucha más



afinidad que a ER $\alpha$ <sup>70,71</sup>. En cambio, cabe destacar que la afinidad de E2 por ER $\alpha$  es mayor que por ER $\beta$ <sup>71</sup>. La preferencial unión de la genisteína por ER $\beta$  podría tener implicaciones relacionadas con el riesgo de cáncer de mama, ya que numerosos estudios sugieren que ER $\beta$  activado por ciertos ligandos inhibe el crecimiento de células cancerosa de mama, así como los efectos proliferativos que induce E2 sobre ER $\alpha$ <sup>39,40,44</sup>. Por tanto, la distinta dotación de receptores estrogénicos en las líneas celulares de cáncer de mama podría explicar los distintos comportamientos.

Pero la diferencia de afinidad, la genisteína tiene 30 veces más afinidad por ER $\beta$  comparado con ER $\alpha$ <sup>72</sup>, es poco probable que pueda explicar completamente que las isoflavonas sean 1.000 veces más potentes en la activación de la actividad transcripcional con ER $\beta$  en comparación con ER $\alpha$ . Algunos estudios muestran que la divergente acción transcripcional de los estrógenos y las isoflavonas puede resultar de las diferencias en su capacidad para reclutar co-reguladores<sup>73,74</sup>. Se trata de proteínas co-activadoras o co-represoras que modifican la afinidad de los ERs por los EREs<sup>30</sup>.

Las propiedades anticancerosas de la genisteína son: actividad antiinflamatoria<sup>75</sup>, inducción de la apoptosis y diferenciación, inhibición de la progresión del ciclo celular, angiogénesis y metástasis<sup>76,77</sup>; además de ser un conocido antioxidante<sup>78</sup>. Su principal mecanismo de acción está mediado por su capacidad para interactuar directamente con los receptores estrogénicos<sup>53,79</sup>, aunque también está implicada en mecanismos mediados no hormonalmente que contribuirían a su actividad biológica<sup>80,81</sup>. Por otra parte, recientes estudios han sugerido que la genisteína puede mejorar la capacidad anticancerosa del tamoxifeno, un antagonista de los estrógenos, en tumores resistentes o insensibles al tratamiento<sup>82,83</sup>.

En general, los estudios epidemiológicos no han sido concluyentes, y la relación entre la genisteína, y los fitoestrógenos en general, y la prevención del cáncer de mama es muy compleja y permanece incierta<sup>84,85</sup>. En contra de los efectos beneficiosos descritos por varios estudios<sup>54,55,81</sup>, algunos trabajos muestran que esta isoflavona podría estimular el crecimiento de tumores sensibles a estrógenos<sup>86</sup>. Parece ser que muchos fitoestrógenos podrían tener un efecto bifásico sobre la proliferación, estimulando el crecimiento a bajas concentraciones (0.1-10  $\mu$ M) y suprimiéndolo a

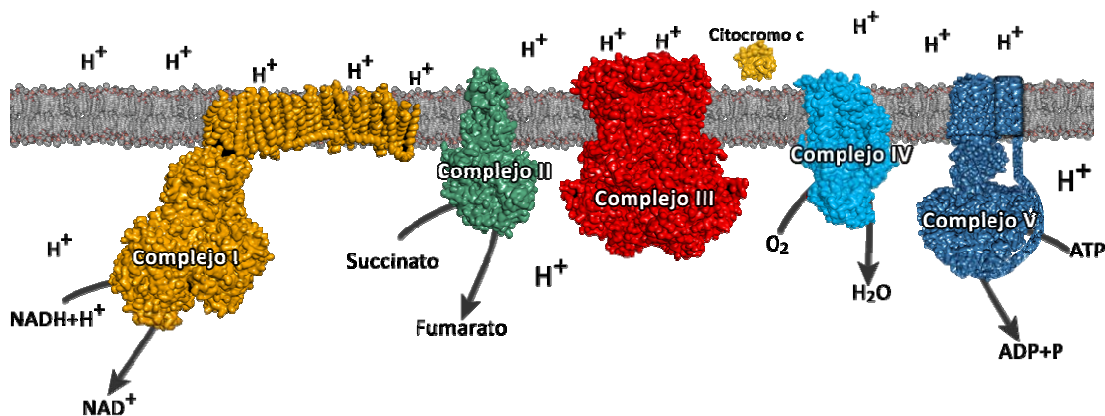
altas concentraciones (a partir de 10  $\mu\text{M}$ )<sup>84,87</sup>. Se ha visto que la acción proliferativa de la genisteína puede ser inhibida por agentes antiestrogénicos, demostrando que es un mecanismo mediado por ER, mientras que no se ha descrito en la inhibición del crecimiento celular inducido por altas concentraciones de la isoflavona, sugiriendo un efecto citotóxico de la genisteína<sup>88</sup>. De acuerdo con estos estudios, evidencias en nuestro grupo de investigación muestran una regulación del crecimiento celular dosis dependiente en línea celular de cáncer de mama MCF-7, que presenta una elevada ratio ER $\alpha$ /ER $\beta$ <sup>89,90</sup>. En cambio, en la línea celular T47D, que presenta una mayor predominancia de ER $\beta$ , se observó una inhibición de la proliferación a bajas concentraciones, y efectos citotóxicos a altas. Por tanto, al igual que en el caso de los estrógenos, ER $\alpha$  parece mediar los efectos proliferativos, sugiriendo que la distinta dotación de receptores estrogénicos en las líneas celulares de cáncer de mama podrían explicar los distintos comportamientos.

## **1.4. Mitocondria y estrés oxidativo**

### **1.4.1. Mitocondria**

En las células normales, las mitocondrias son responsables del 90% de los requerimientos de energía de la célula en forma de ATP, mediante un proceso conocido como fosforilación oxidativa<sup>91-93</sup>. En la mitocondria tienen lugar las etapas finales del metabolismo oxidativo de los nutrientes, que rinden equivalentes de reducción en forma de NADH y FADH<sub>2</sub>. Estos equivalentes ceden sus electrones a los complejos de la cadena respiratoria, ubicados en la membrana mitocondrial interna. Los electrones fluyen a través de los centros de oxido-reducción de los distintos complejos a favor de su potencial redox, siendo el oxígeno molecular el aceptor final de estos electrones. La energía liberada en la transferencia de electrones entre los centros redox es acoplada al bombeo activo de protones desde la matriz al espacio intermembrana. De esta forma se genera un gradiente de protones a través de la membrana que conserva la energía liberada durante la respiración. Los protones retornan a la matriz a través de la ATP sintasa que acopla la energía liberada a la

síntesis de ATP (Figura 3). De esta forma, los niveles de ADP, y por tanto, la demanda energética, controlan el funcionamiento de la cadena respiratoria.



**Figura 3.** Representación esquemática y estructura tridimensional de la cadena respiratoria mitocondrial.

Sin embargo, la función de las mitocondrias no es simplemente satisfacer la demanda energética de la célula, sino que también participan en la biosíntesis de precursores anabólicos, la activación de los programas de apoptosis o la regulación de la homeostasis del calcio intracelular, entre otros procesos<sup>92,93</sup>. Asimismo, son la principal fuente de especies reactivas de oxígeno (ROS), subproductos tóxicos del metabolismo oxidativo altamente dañinos para la mitocondria y la célula en general<sup>94,95</sup>. Los ROS son detoxificados por diferentes mecanismos enzimáticos y no enzimáticos, y entre los mecanismos que previenen la producción de ROS se encuentran las proteínas desacoplantes o UCPs, que permiten aliviar la saturación de la cadena de transporte electrónico con la consiguiente disminución en la producción de ROS<sup>96</sup>. Los ROS están involucrados en múltiples procesos tanto fisiológicos, actuando como moléculas de señalización, como patológicos<sup>97</sup>, especialmente cuando su producción sobrepasa la capacidad antioxidante de la célula, estableciéndose de esta manera el estrés oxidativo. El estrés oxidativo es en parte el responsable de la acumulación de daño celular durante la vida, por este motivo juega un importante papel en la etiología y desarrollo de numerosas patologías, así como en la edad<sup>98,99</sup>.

Desde el punto de vista de su biogénesis, las mitocondrias requieren la contribución y coordinación de dos genomas separados físicamente, el genoma

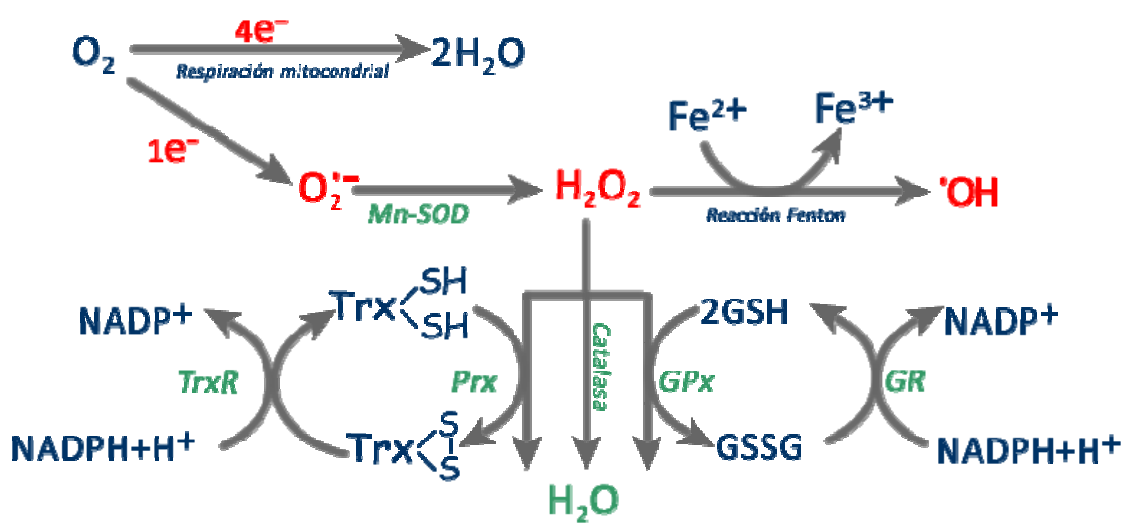
nuclear y el mitocondrial. La mayoría de proteínas mitocondriales son codificadas por el genoma nuclear, normalmente sintetizadas como precursores que deben ser importados y procesados dentro de la mitocondria. El genoma mitocondrial codifica para 2 rRNAs, 22 tRNAs y 13 proteínas que participan en el proceso de fosforilación oxidativa<sup>100</sup>. La transcripción y traducción de las 13 proteínas está bajo la regulación de varias moléculas, entre ellas los estrógenos. Recientes estudios sugieren que las mitocondrias son importantes dianas para la acción de E2 y los ERs<sup>92,101</sup>.

Muchos de los procesos mitocondriales como el metabolismo energético, la apoptosis o la señalización por calcio están alterados en las células cancerosas, llevando a un fenotipo caracterizado por un elevado estrés oxidativo<sup>102</sup>. Los efectos de los ROS sobre la proliferación, angiogénesis, invasión celular y metabolismo energético han identificado claramente al estrés oxidativo como un mecanismo de supervivencia e invasión de la célula tumoral<sup>103,104</sup>.

#### **1.4.2. Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)**

Bajo condiciones fisiológicas, alrededor de un 2% de los electrones se escapan de la cadena respiratoria mitocondrial (MRC) durante su transferencia, reduciendo el O<sub>2</sub> a anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) y conduciendo a la cascada de formación ROS<sup>105</sup>. La producción de ROS puede estar significativamente aumentada con un incremento en el potencial de membrana que ocurre por un aumento de los combustibles (elevada producción de NADH) o por un problema funcional en los complejos I y/o III de la cadena respiratoria<sup>95,106,107</sup>. El O<sub>2</sub><sup>•-</sup> es rápidamente convertido a peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) de forma espontánea, o enzimológicamente mediante la superóxido dismutasa (SOD). Existen varias vías que implican la conversión directa de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O: mediante la acción de la catalasa, la glutatión peroxidasa (GPx) o peroxirredoxina III (Prx). La GPx utiliza glutatión reducido (GSH) como aceptor de electrones para eliminar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El GSH es regenerado desde glutatión oxidado (GSSG) mediante la acción de la glutatión reductasa (GRd), que a su vez utiliza el poder reductor del NADPH como equivalente de reducción. Además, se ha descrito otra familia de oxido-reductasas con un mecanismo idéntico a la de la GRd, es la tioredoxina reductasa (TrxR). Se caracterizan por presentar un residuo esencial de selenocisteína -Cys-SeCys-, además del tradicional

centro activo -Cys-Val-Asn-Val-Gly-Cys-, característico de la GRd. En el sistema de la tiorredoxina (Trx), la selenoenzima TrxR oxida al NADPH y reduce a la forma oxidada de la Trx. La Prx utiliza la Trx reducida como aceptor de electrones para eliminar el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que a su vez oxida la Trx convirtiéndola en sustrato de la TrxR. Sin embargo, cuando estas enzimas no pueden convertir rápidamente el  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$ , a pesar que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  es un agente con una capacidad oxidativa mucho menor que el  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , el  $\text{H}_2\text{O}_2$  en presencia de metales de transición puede dar lugar a una especie altamente reactiva como es el radical hidroxilo ( $\text{}^{\bullet}\text{OH}$ ), mediante la reacción de Fenton (Figura 4).



**Figura 4.** Mecanismos enzimáticos de detoxificación de las especies radicales de oxígeno.

Existen también antioxidantes no enzimáticos, como las vitaminas C y E que proveen dianas alternativas a la reactividad de las ROS, evitando así los efectos deletéreos de las ROS sobre los componentes celulares<sup>94,95</sup>.

La generación de ROS por la mitocondria depende exponencialmente del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). La máxima producción de ROS está asociada a situaciones en que el  $\Delta\Psi_m$  es elevado y, por tanto, se produce un enlentecimiento del flujo electrónico a través de la cadena respiratoria, lo que favorece las reducciones incompletas del oxígeno, y la consiguiente formación de ROS. También se puede deber a un problema funcional en los complejos I y/o III de la MRC, máximos productores de ROS en la mitocondria<sup>106,107</sup>.

### **1.4.3. Patologías asociadas a los ROS**

Aunque tradicionalmente se consideró a los ROS como inductores de la muerte celular programada o apoptosis, actualmente se sabe que también pueden jugar un importante papel como mensajeros secundarios, iniciando vías de señalización encaminadas a la supervivencia celular<sup>97</sup>. Sin embargo, la desregulación de los niveles de ROS mitocondriales están asociados a procesos patológicos. En aquellas patologías mitocondriales causadas por alteraciones en el material genético mitocondrial, una excesiva producción de ROS y un descenso en los niveles de ATP, pueden dar lugar a alteraciones en la función mitocondrial<sup>100</sup>. Una afectación de la fosforilación oxidativa puede conllevar un aumento en la producción de ROS, y por tanto, suponer un fenómeno de retroalimentación positiva hacia una situación de estrés oxidativo.

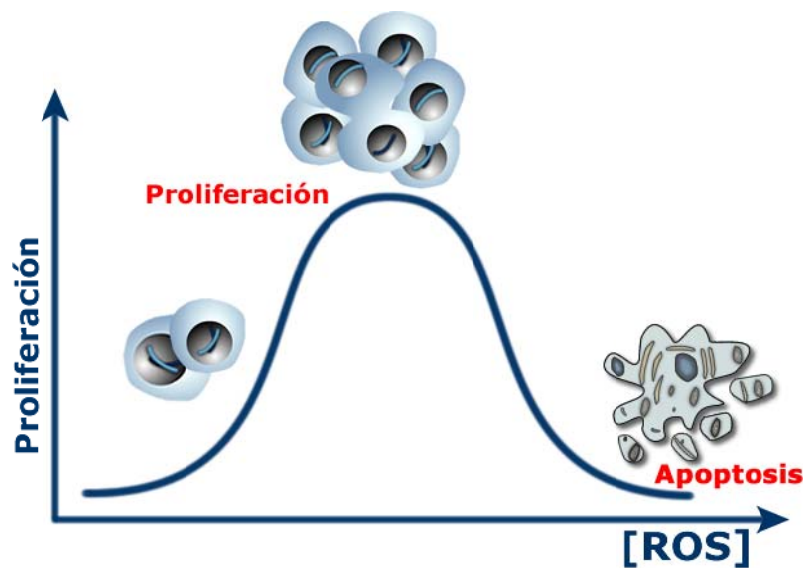
El estrés oxidativo es un fenómeno común en las enfermedades neurodegenerativas<sup>108,109</sup>. También está implicado en el origen de la aterosclerosis y las alteraciones cardiovasculares resultantes<sup>110</sup>. De igual forma, la capacidad de los ROS de provocar alteraciones en el material genético ha significado su implicación en el origen y/o evolución de la carcinogénesis<sup>111,112</sup>.

### **1.4.4. Cáncer de mama y ROS**

La producción de ROS mitocondriales se encuentra bajo la influencia de los estrógenos. Las consecuencias de la mayor producción de ROS sobre la proliferación y apoptosis mediada por la mitocondria podría explicar en parte la acción de E2/ER sobre el desarrollo del cáncer<sup>101,113</sup>.

Además, en las últimas décadas, numerosos estudios han detectado los ERs, ER $\alpha$  y ER $\beta$ , en la mitocondria, así como EREs en el mtDNA, incluyendo la línea celular de cáncer de mama MCF-7<sup>114</sup>. La presencia de ambos subtipos de receptores ha sugerido que podrían jugar un papel central en la regulación de la biogénesis y función de la MRC. Los efectos de E2/ERs sobre la expresión de las proteínas de la MRC están asociados con sus efectos sobre las actividades de MRC, reflejado por el incremento de la producción de superóxido, el consumo de O<sub>2</sub>, y los niveles intracelulares de ATP.

Bajos niveles de ROS mitocondriales actúan como moléculas señales que regulan la proliferación celular mediante la activación de genes relacionados con el crecimiento, mientras que altos niveles de ROS están relacionados con daño oxidativo en el mtDNA y proteína mitocondriales, así como en moléculas biológicas en general<sup>95,101,102,113</sup> (Figura 5). Es importante destacar que el mtDNA es altamente susceptible al daño oxidativo porque no está asociado a histonas protectoras, está continuamente expuesto a altos niveles de ROS y los sistemas de reparación del mtDNA son limitados<sup>95</sup>.



**Figura 5.** Esquema representativo de los efectos de los niveles de ROS sobre la proliferación celular y la apoptosis.

Durante años se ha observado que las células cancerosas exhiben niveles elevados de ROS debido a alteraciones metabólicas. La mayoría de células tumorales presentan bajos niveles de enzimas antioxidantes, contribuyendo a que las células tumorales sean más vulnerables al estrés oxidativo. Sin embargo, recientes estudios han revelado el incremento de sistemas antioxidantes en tumores de estadios más avanzados, probablemente como consecuencia de una presión selectiva hacia la adaptación al estrés. La adaptación podría ser crucial no sólo para la invasión de las células cancerosas, sino también para el desarrollo de resistencia a fármacos anticancerosos<sup>103,111,112</sup>.

## 1.5. Papel de las sirtuinas en el cáncer

Las células eucariotas han desarrollado un sistema de respuesta al estrés oxidativo, genotóxico y metabólico centrado en cromatina y mitocondria. Se trata de las sirtuinas, una familia de proteínas con actividad histona desacetilasa dependiente de NAD<sup>+</sup> (HDACs) y ADP ribosil transferasa<sup>115</sup>. La capacidad de las sirtuinas para detectar los cambios de energía en la célula se debe a los requerimientos de NAD<sup>+</sup> como cofactor enzimático. Las sirtuinas juegan un papel esencial en las vías de señalización que regulan la longevidad, a través de la activación de diversas respuestas que aseguren la estabilidad genómica, el mantenimiento de la homeostasis metabólica, la supervivencia en condiciones de estrés, y el desarrollo y diferenciación celular<sup>116</sup>. En mamíferos se han descrito siete sirtuinas (SIRT1-7) con diferente localización subcelular; SIRT1, SIRT6 y SIRT7 son nucleares, SIRT2 es principalmente citoplasmática y SIRT3, SIRT4 y SIRT5 están localizadas en la mitocondria.

Ya hace más de una década que se describió a SIRT1 en mamíferos a partir de su elevada homología de secuencia con SIR2 (*silence information regulator 2*) de *Saccharomyces cerevisiae*<sup>116</sup>. Es la sirtuina mejor estudiada y ha sido relacionada con la regulación del metabolismo glucídico y lipídico durante la restricción calórica y el ayuno<sup>117</sup>. Se han descrito multitud de funciones e interacciones con otras proteínas, incluyendo FOXO, p53, NF-κB o PGC1α, que indican su función en el metabolismo energético, la supervivencia celular y los procesos inflamatorios<sup>118</sup>.

Múltiples evidencias establecen que el cáncer es una enfermedad con las características patológicas de la edad. Consecuentemente ha sido inevitable estudiar la relación entre sirtuinas y carcinogénesis. La preocupación creciente sobre el complejo papel de las sirtuinas en el cáncer se debe a su doble rol en la carcinogénesis, inhibiendo o promoviendo el tumor dependiendo del contexto celular y molecular. SIRT1 y SIRT3 han sido las isoformas que han recibido más atención en el estudio del cáncer.



### 1.5.1. SIRT1

SIRT1 está implicada en coordinar la integridad genómica y una adecuada adaptación metabólica<sup>115,116,119</sup>. Fallos en estos mecanismos pueden claramente conducir a la tumorigénesis, por ese motivo existe un gran interés en establecer su papel en el cáncer.

Las primeras evidencias de la relación entre SIRT1 y tumorigénesis fueron descritas en dos estudios que demostraron la capacidad de SIRT1 para desacetilar e inactivar p53, promoviendo la proliferación en presencia de daño en el DNA y la supervivencia de la célula tumoral bajo condiciones de estrés<sup>120,121</sup>, sugiriendo que la inhibición de SIRT1 podría ser beneficiosa en el tratamiento del cáncer. La sobreexpresión de SIRT1 ha sido descrita en diversos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de colon<sup>122</sup>, próstata<sup>123</sup>, de ovarios<sup>124</sup> y de mama<sup>125</sup>.

La expresión de SIRT1 en cáncer de mama está significativamente asociada a una peor prognosis<sup>125</sup>. Existen varios estudios que muestran los efectos de esta enzima sobre el desarrollo de la enfermedad. Se ha visto que dos supresores tumorales, HIC1 (*hypermethylated in cancer 1*) y DBC1 (*deleted in breast cancer 1*), regulan negativamente a SIRT1<sup>126,127</sup>. Parece ser que la inactivación de HIC1 y DBC1 promueve la desacetilación de p53 y permite a las células sobrevivir al estrés genotóxico, un efecto que depende de SIRT1<sup>127,128</sup>. También se ha descrito que SIRT1 regula positivamente la expresión de la aromatasa, enzima responsable de la biosíntesis de estrógenos<sup>129</sup>, así como su papel en la adquisición de resistencia al tratamiento con tamoxifeno mediante la desacetilación de FoxO1<sup>130</sup>. Además, un estudio *in vivo* ha descrito que un activador de SIRT1, SR1720, promueve la migración y metástasis pulmonar de células de cáncer de mama<sup>131</sup>.

En contraste con estas actividades tumorigénicas, SIRT1 está asociada con la reparación del DNA, siendo este fenómeno un mecanismo de protección<sup>132</sup>. Otro estudio demostró que SIRT1 estimula la muerte celular inducida por TNF $\alpha$ , indicando que SIRT1 puede promover la apoptosis, no sólo suprimirla<sup>133</sup>. Por otra parte, SIRT1 también parece interactuar con c-Myc, disminuyendo la estabilidad de este factor de

transcripción pro-oncogénico. Esta interacción podría prevenir la transformación celular<sup>134</sup>. Siguiendo en esta línea, un estudio dirigido por Wang *et al.* mostró que la expresión de SIRT1 era menor en el cáncer de mama asociado a BRCA1, y que esta menor expresión podría ser la responsable de la transformación maligna de células con BRCA1 mutado<sup>135</sup>.

### 1.5.2. SIRT3

Como se ha comentado anteriormente, la mitocondria juega un papel central en la carcinogénesis a través de la generación de ROS. La disfunción mitocondrial asociada con una alteración del metabolismo oxidativo ha sido observada en células tumorales y parece contribuir a la condición de estrés oxidativo crónico. Estudios recientes sugieren que SIRT3, debido a su localización mitocondrial, tiene un papel clave manteniendo la homeostasis mitocondrial mediante cambios en la acetilación de proteínas diana relacionadas con el metabolismo, así como de enzimas antioxidantes<sup>136,137</sup>.

La actual hipótesis indica que SIRT3 podría inhibir el crecimiento del tumor mediante el control y disminución de los niveles celulares de ROS. Diversos estudios muestran que SIRT3 reduce los ROS mediante la activación por desacetilación de Mn-SOD<sup>138,139</sup>. Pero además, otros estudios recientes indican que los menores niveles de ROS también podrían deberse a la desestabilización de HIF1 (factor inducible por hipoxia) por SIRT3. Este hecho conduce a las células hacia un metabolismo más oxidativo, reprimiendo el efecto Warburg<sup>140,141</sup>. Esta capacidad de SIRT3 de revertir el efecto Warburg ha sido descrita en diversas líneas de cáncer de mama<sup>140</sup>. En consonancia con estos datos, se ha visto que ratones SIRT3<sup>-/-</sup> son más propensos a sufrir cáncer de mama ER positivos<sup>139</sup>.

Sin embargo, al igual que ocurre con SIRT1, existen estudios opuestos que proponen el papel de SIRT3 como promotor tumoral<sup>142</sup>. Se ha descrito una sobreexpresión de la proteína en líneas celulares de cáncer escamoso oral (OSCC) y en muestras de pacientes<sup>143</sup>. Estos autores también han observado que la pérdida de SIRT3 en estas líneas celulares reduce la viabilidad y proliferación celular.

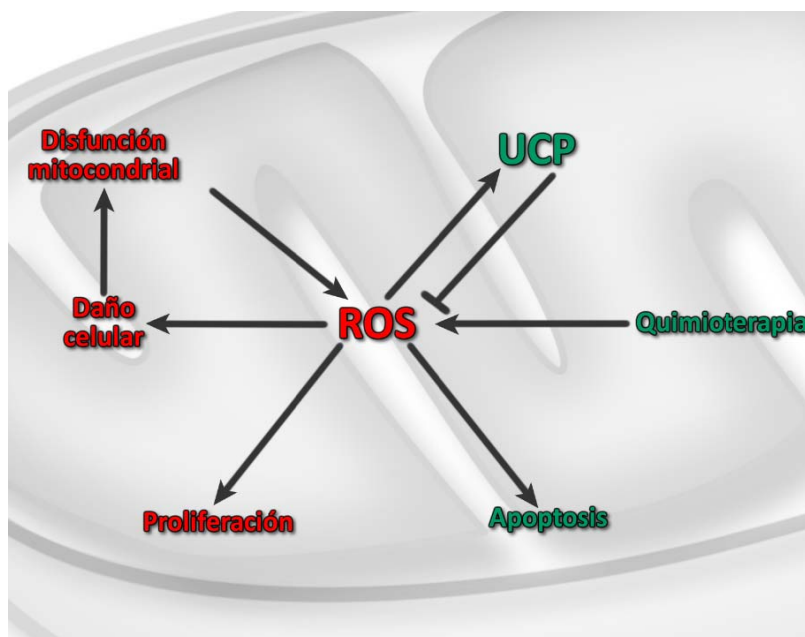
## 1.6. Papel de la UCP2 en el cáncer

El estrés oxidativo juega un papel clave en la iniciación y progresión del cáncer. Las células cancerosas en tumores de estadios avanzados frecuentemente presentan múltiples alteraciones genéticas y un nivel alto de estrés oxidativo, sugiriendo que estas células podrían ser eliminadas mediante agentes farmacológicos que incrementen los niveles de ROS. Sin embargo, la modulación del estado redox representa una de las principales respuestas adaptativas en el cáncer<sup>103,111,144</sup>, y uno de los mecanismos dentro de los sistemas que protegen contra el daño oxidativo son las proteínas desacoplantes o UCPs<sup>96,145</sup>.

Las UCPs pertenecen a la superfamilia de transportadores aniónicos localizados en la membrana mitocondrial interna. Su función biológica es permitir el reingreso de los protones a la matriz mitocondrial, disipando el gradiente protónico y, consecuentemente, disminuir el potencial de membrana y la producción de ROS<sup>145,146</sup>. Hasta el momento, se han descrito cinco isoformas de UCPs con distribución tisular específica<sup>96</sup>. Con la excepción de la función bien establecida de UCP1 en la termogénesis<sup>147</sup>, las funciones biológicas del resto de UCPs no están aún esclarecidas. Se ha propuesto que las UCPs están relacionadas con la adaptación del metabolismo energético a cambios nutricionales, como la inanición<sup>148</sup>, pero también se ha descrito un papel en condiciones patológicas, como la diabetes, la obesidad<sup>149,150</sup> y, más recientemente, el cáncer<sup>96,145,146,151</sup>. En el cáncer, la isoforma UCP2 es la que ha recibido más atención, ya que ha sido relacionada con su expresión durante la tumorigénesis y la resistencia quimioterapéutica<sup>152,153</sup>.

Derdak *et al.* encontraron que ratones UCP2 knockouts tenían una mayor predisposición para desarrollar tumores en el colon proximal<sup>154</sup>, fue la primera evidencia *in vivo* de la relación entre UCPs y cáncer, mientras que otro estudio revelaba que la sobreexpresión de UCP2 está asociada con la metástasis de colon<sup>155</sup>. Estudios posteriores sugieren que esta proteína también está implicada en la tumorigénesis de mama. Sayeed *et al.* demostraron una importante correlación entre UCP2 y el grado del tumor en cánceres de mama primarios<sup>153</sup>.

Teniendo en cuenta que las UCPs son reguladores negativos de la producción de ROS, una de las predecibles consecuencias de la función de estas proteínas sería prevenir el cáncer. En el caso de células no tumorales, el desacoplo podría ser un mecanismo protector. Sin embargo, generalmente está aceptado que, durante la tumorigénesis, la UCP2 está inhibida para aumentar el estrés oxidativo, mientras que está activada o sobreexpresada en los posteriores estadios del desarrollo del cáncer. Esta sobreexpresión determina la quimioresistencia y agresividad del tumor, ya que protege a las células cancerosas de la apoptosis a través de la regulación negativa de los ROS mitocondriales<sup>10,151,152,156,157</sup> (Figura 6). Además, se ha visto que la UCP2 actúa como un sensor del estrés oxidativo mitocondrial y es activada por ROS. Particularmente, algunos estudios han demostrado que el *proton leak* mediado por UCP2 es activado por el superóxido mitocondrial y los productos derivados de la peroxidación lipídica, como el 4-HNE<sup>158,159</sup>. Este hecho podría explicar porque la actividad de UCP2 no puede ser detectada sin un cierto nivel de estrés oxidativo.



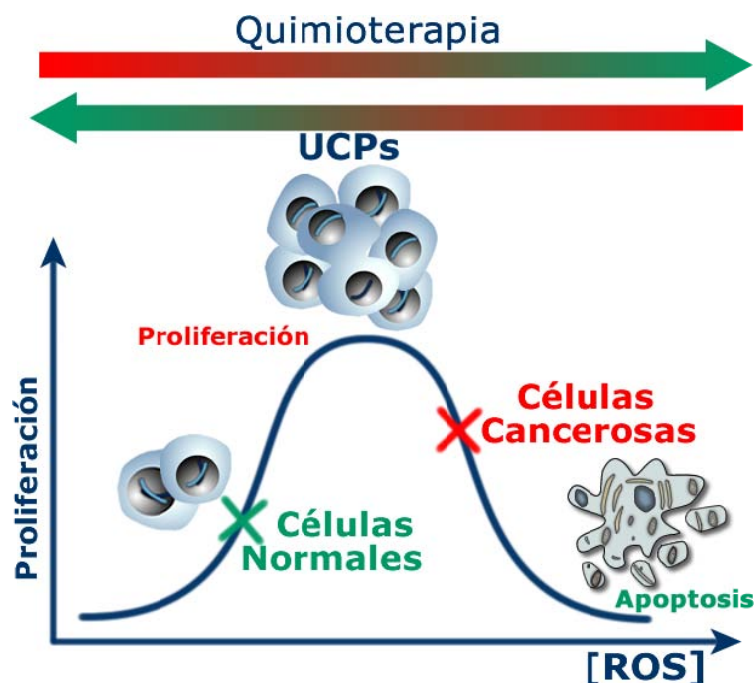
**Figura 6.** Papel de la UCP en el control de la proliferación celular y la apoptosis mediada por los ROS.

Por otra parte y desde un punto de vista fisiológico, la modulación hormonal de las UCPs podría ser también un factor implicado en la carcinogénesis inducida por hormonas, más concretamente se ha sugerido que las UCPs podrían ser clave en la carcinogénesis de mama inducida por estrógenos<sup>10</sup>. La pérdida de desacoplo

mitocondrial contribuiría a la proliferación celular inducida por E2 gracias a una mayor eficiencia de síntesis de ATP obtenido mediante la fosforilación oxidativa, así como a un incremento de los niveles de ROS que actuarían como señales mitogénicas. Esta hipótesis podría contribuir en parte a explicar porque la exposición a E2 a lo largo de la vida es uno de los principales factores de riesgo de cáncer de mama.

La célula cancerosa tiene una elevada demanda de ATP para poder proliferar. Por la capacidad de las UCPs para desacoplar la síntesis de ATP de la respiración celular, y por el hecho que la UCP2 está sobreexpresada en células quimioresistentes, se ha especulado con la existencia de una relación entre UCPs y efecto Warburg<sup>160</sup>.

Finalmente, estudios con inhibidores químicos específicos, como el genipin, o siRNAs de UCP2 confirman que la transformación celular está suprimida, sugiriendo que la UCP2 actúa como promotor tumoral. Pero lo que aún es más llamativo es que la inhibición de UCP2 sensibiliza a las células cancerosas al tratamiento quimioterapéutico, evidencias que apuntan a la UCP2 como posible diana de nuevos tratamiento contra el cáncer<sup>151,161</sup> (Figura 7).



**Figura 7.** La sobreexpresión de la proteína desacoplante UCP2 determina la quimioresistencia, protegiendo a las células cancerosas de la apoptosis a través de la regulación negativa de los ROS.

## 1.7. Cáncer de mama. Leptina y obesidad

Un gran número de estudios epidemiológicos indican que el sobrepeso (BMI 25-30kg/m<sup>2</sup>) y la obesidad (BMI > 30kg/m<sup>2</sup>) incrementan el riesgo de cáncer de mama en mujeres postmenopáusicas, y son dos factores asociados con tumores más agresivos y de peor pronóstico<sup>162-164</sup>. El mecanismo molecular subyacente a la relación entre obesidad y cáncer aún no está dilucidado. No obstante, el incremento de la tasa de producción local de estrógenos y el aumento de sus niveles circulantes parecen ser un punto de unión entre obesidad y cáncer. Durante muchos años, los estudios han encontrado que la fuente de la elevada producción de estrógenos está en la aromatización de los andrógenos a estrógenos<sup>165</sup>. Esta reacción se produce en el tejido adiposo mediante la enzima citocromo P450 19 A1 (CYP19A1, también conocida como aromatasa).

Sin embargo, con el reconocimiento del tejido adiposo como órgano endocrino activo, y el hallazgo de que la obesidad incrementa el riesgo tanto de cánceres de mama ER-positivos como ER-negativos, las moléculas derivadas del tejido adiposo, las adipoquinas, han sido propuestas como moléculas clave en la relación obesidad y cáncer de mama<sup>18,19</sup>.

Actualmente más de 50 adipoquinas diferentes han sido identificadas como reguladoras del metabolismo energético, pero también con diversas funciones patológicas<sup>166</sup>. Entre ellas, la leptina ha sido propuesta como la adipoquina que juega el papel más importante en el cáncer de mama.

### 1.7.1. La leptina

La leptina es una hormona de 167 aminoácidos (16 kDa), producto del gen de la obesidad (*ob*), principalmente sintetizada por los adipocitos y, en menor extensión por otros tejidos como el estómago, la placenta, el músculo, las células inmunitarias y la glándula mamaria<sup>167,168</sup>. La concentración de leptina en sangre se incrementa con el índice de masa corporal, actuando como señal para regular la homeostasis energética mediante la supresión de la ingesta y el incremento del gasto energético actuando

directamente sobre el hipotálamo. Por tanto, la leptina es considerada un marcador clave del estado nutricional y del metabolismo energético<sup>168,169</sup>. Además de sus actividades a nivel del sistema nervioso central, se ha descrito la influencia de la leptina sobre la respuesta inmune, angiogénesis, hematopoyesis y reproducción<sup>168,170,171</sup>.

Esta hormona ejerce su acción fisiológica principalmente a través del receptor de la leptina, producto del gen de la diabetes (*db*). En tejidos humanos han sido identificadas seis isoformas del receptor (a-f). No obstante, la isoforma larga del receptor (ObR<sub>b</sub>) es la única que presenta la máxima capacidad de señalización<sup>172</sup>.

### 1.7.2. La leptina en el cáncer de mama

La leptina tiene un importante papel en el desarrollo de la glándula mamaria<sup>173</sup>, pero también en la tumorigénesis<sup>19,170,174</sup>. Estudios iniciales en ratones deficientes en leptina *Lep<sup>ob/ob</sup>* o en su receptor *Lepr<sup>db/db</sup>* mostraron una importante disfunción del desarrollo de la glándula mamaria, así como un menor desarrollo de tumores mamaros<sup>175,176</sup>. En concordancia con estos estudios, trabajos *in vitro* también han mostrado que el tratamiento con leptina (25-100 ng/ml) estimula la proliferación en las líneas de cáncer de mama ER-positivas (MCF-7, T47D), ER-negativas (MDA-MB-231, SKBR3), así como en la línea epitelial de mama no transformada HBL100<sup>177,178</sup>. Aunque en las células HBL100, la leptina no estimuló el crecimiento independiente de anclaje.

La leptina, como citoquina, activa diversas vías de señalización que están fuertemente relacionadas con la proliferación celular y la supervivencia, incluyendo JAK2/STAT3, Ras/ERK1/2, PI3K/AKT/GSK3<sup>172,174</sup>.

Como se ha comentado anteriormente, los estrógenos son un factor de riesgo en el inicio y desarrollo del cáncer de mama<sup>38</sup>, y se ha propuesto que parte de la acción de la leptina sobre la carcinogénesis está mediada por la interacción entre su vía de activación y la cascada de señalización por estrógenos<sup>177,179</sup>. Diversos estudios demuestran que ER $\alpha$  y el receptor de la leptina se co-expresan en líneas de cáncer de mama<sup>178,180</sup> y en muestras tumorales<sup>181</sup>. Además, se ha visto que el E2 induce la expresión de la leptina y del receptor de la leptina en la línea de cáncer de mama MCF-

7<sup>182</sup>. Y en estudios con pacientes de cáncer de mama, se ha observado que los niveles séricos de leptina estaban positivamente correlacionados con el incremento de la expresión de ER<sup>183</sup>, así como con el tamaño del tumor<sup>181</sup>.

Parece ser que la leptina podría estimular el crecimiento del tumor mediante la amplificación la señalización estrogénica activando la transactivación de ER<sup>179</sup>. Pero, además, se ha visto que esta adipoquina incrementa la expresión génica de la aromatasa<sup>184</sup>.

Un estudio realizado en la línea celular neuronal (SH-SY5Y) reveló que la leptina podía tener un efecto protector contra el estrés oxidativo inducido por un citotóxico<sup>185</sup>. A pesar de las anteriores evidencias que relaciona el cáncer de mama y la leptina, son muy pocos los trabajos sobre los efectos de la leptina sobre el estrés oxidativo, situación que caracteriza a las células tumorales.



## **2. Objetivos y planteamiento experimental**



Esta tesis se enmarca dentro de los objetivos de dos proyectos desarrollados en el Grupo Multidisciplinar de Oncología Traslacional del *Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut* (IUNICS) de la *Universitat de les Illes Balears* (UIB). El primer proyecto, “Importancia de la ratio ER $\alpha$ /ER $\beta$  en la función mitocondrial y el estrés oxidativo en el cáncer de mama. Influencia de la leptina (PS09-01637)”, tiene entre sus objetivos el estudio de la importancia de la ratio de los receptores estrogénicos, ER $\alpha$  y ER $\beta$ , en la acción del 17 $\beta$ -estradiol sobre la función mitocondrial y el estrés oxidativo en líneas celulares de cáncer de mama, así como determinar el efecto modulador de la leptina sobre la dotación ER $\alpha$  y ER $\beta$ . La finalidad del segundo proyecto, “Metabolismo energético de la célula tumoral: una posible diana en el tratamiento del cáncer de mama (PI12-01827)”, es continuar con las investigaciones iniciadas profundizando en los cambios del metabolismo energético y mitocondrial por la acción de la leptina, el 17 $\beta$ -estradiol y los fitoestrógenos en líneas celulares y tumores de mama. Asimismo, otro de los objetivos planteados es determinar si el bloqueo de las UCPs compromete la capacidad biosintética de la célula y/o la conduce a un nivel de estrés, con la finalidad de investigar nuevas estrategias terapéuticas con el denominador común de atacar al cáncer desde su particular metabolismo.

Los estrógenos son uno de los principales factores de riesgo en el desarrollo y progresión de cánceres hormonodependientes, como es el cáncer de mama<sup>186,187</sup>. Estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación habían demostrado que el 17 $\beta$ -estradiol (E2) a concentraciones fisiológicas, 1 nM, incrementaba el estrés oxidativo en una línea de cáncer de mama ER-positiva, MCF-7<sup>10</sup>. No obstante, cabe destacar la existencia de dos isoformas del receptor de estrógenos, ER $\alpha$  y ER $\beta$ <sup>26</sup>. Diversos estudios otorgan a ER $\alpha$  un papel principal en la carcinogénesis de mama inducida por E2<sup>188,189</sup> y, a pesar de que el papel de ER $\beta$  no está del todo esclarecido, varias evidencias indican que podría ejercer efectos opuestos a los de ER $\alpha$ <sup>40,44</sup>, evitando la actividad proliferativa de los estrógenos. Por tanto, la acción de E2 podría ser consecuencia del balance entre los dos receptores<sup>42,43</sup>. Un estudio realizado en líneas celulares de cáncer de próstata mostró que los dos subtipos de receptores estrogénicos tenían efectos opuestos sobre el estrés oxidativo inducido por E2<sup>190</sup>. A partir de los estudios mencionados, nos planteamos estudiar los efectos de E2 sobre el

estrés oxidativo en líneas de cáncer de mama con distinta dotación de receptores estrogénicos, así como analizar si la carcinogénesis inducida por E2 podía ser modulada por las proteínas desacoplantes. Para ello analizamos la producción de ROS y el potencial de membrana por citometría de flujo, los niveles de expresión génica y actividad de las principales enzimas antioxidantes (CAT, SOD, GPx y GRd). También se determinó el daño oxidativo en proteínas y lípidos, la proliferación celular y los niveles de mRNA y proteína de las UCPs (UCP2 y UCP5). Todas estas determinaciones se llevaron a cabo en tres líneas de cáncer de mama: MCF-7, ER $\alpha$  y ER $\beta$  positivas, con predominancia de ER $\alpha$ ; T47D, ER $\alpha$  y ER $\beta$  positivas, con predominancia de ER $\beta$ ; y MDA-MB-231, ER $\alpha$  negativa y ER $\beta$  positiva. Los resultados y conclusiones obtenidos se detallan en el **Manuscrito I**.

Estudios epidemiológicos demuestran la baja incidencia del cáncer de mama en los países asiáticos, habiéndose relacionado con el consumo de dietas ricas en fitoestrógenos como la genisteína<sup>61,62</sup>. Sin embargo, existe una creciente preocupación respecto al papel de los fitoestrógenos en esta neoplasia debido a las propiedades estrogénicas que presentan, y cuyos efectos podrían ser perjudiciales para pacientes con cáncer de mama sensible a estrógenos<sup>67,68</sup>. A diferencia del E2, la genisteína se une preferencialmente a ER $\beta$ <sup>70,71</sup>, este hecho junto con las diferencias observadas sobre el estrés oxidativo en respuesta al E2 según la dotación de receptores estrogénicos, hizo plantearnos si el efecto de la genisteína también podría depender de la ratio ER $\alpha$ /ER $\beta$ . En este trabajo se estudió el estrés oxidativo y la funcionalidad mitocondrial. Para alcanzar estos objetivos se utilizaron las líneas celulares MCF-7 (ratio ER $\alpha$ / ER $\beta$  alta) y T47D (ratio ER $\alpha$ / ER $\beta$  baja) en el estudio de la proliferación y la diferenciación mitocondrial, mediante el análisis de la biomasa mitocondrial determinando la cantidad de cardiolipina (*10-n-nonyl-acridine orange* NAO) y del DNA mitocondrial (RT-PCR), así como en el análisis de los niveles de ROS, potencial de membrana y daño oxidativo. Además se determinaron la expresión de los principales genes involucrados en la respuesta al estrés oxidativo y la biogénesis y la función mitocondrial, así como los niveles de ER $\alpha$  y ER $\beta$  (RT-PCR). Finalmente, se analizaron los niveles de proteína del sistema OXPHOS y proteínas relacionadas con el estrés oxidativo (CuZn-SOD, Mn-SOD y

CAT) y la función mitocondrial (UCP2, SIRT1 y SIRT3) (Western blot). Los resultados y conclusiones obtenidos a partir de este estudio se presentan en el **Manuscrito II**.

De forma complementaria al estudio de investigación básica sobre la importancia de la dotación de receptores estrogénicos en la carcinogénesis inducida por estrógenos, nos planteamos si los resultados obtenidos en las líneas celulares podrían tener relevancia en la fisiología y evolución de tumores de mama, y la posible aplicación de ER $\beta$  como biomarcador para conseguir una mejor caracterización del tumor en relación a su nivel de estrés oxidativo y la posible respuesta al tratamiento. Para ello, mediante previa caracterización histoquímica y anatomopatológica, se clasificaron carcinomas ductales infiltrantes de mujeres postmenopáusicas en tres grupos dependiendo de si la ratio ER $\alpha$ /ER $\beta$  era alta, media o baja. Para el estudio del estrés oxidativo y la mitocondria se analizaron los niveles de daño oxidativo y las principales enzimas antioxidantes, así como la activación de vías de señalización por estrés (AKT y SAPK) y el estado del sistema OXPHOS. Por último, nos centramos en factores que pueden proporcionar nuevos indicios para entender mejor el cáncer, determinando los niveles de las UCPs (isoformas 2 y 5) y SIRT3. Los resultados y conclusiones obtenidos se detallan en el **Manuscrito III**.

Un importante porcentaje (25%) de los cánceres están asociados con el sobrepeso y la obesidad<sup>14</sup>. Este riesgo incrementado se ha relacionado durante muchos años con la aromatización de los andrógenos en el tejido adiposo, conduciendo a elevados niveles de estrógenos<sup>17</sup>. No obstante, las adipoquinas secretadas por este tejido parecen ser claves en la relación entre obesidad y cáncer<sup>191,192</sup>. Estudios previos mostraron los efectos de la exposición a la adipoquina leptina sobre la señalización de los estrógenos y la proliferación<sup>177</sup>. Considerando la sensibilidad del cáncer de mama a la leptina, y la importancia de la regulación del estrés oxidativo endógeno o inducido por un tratamiento en la evolución del tumor, nos propusimos estudiar si esta adipoquina estaría implicada en la modulación del estrés oxidativo en la línea de cáncer de mama MCF-7. Para ello, analizamos la proliferación celular, la producción de ROS, el daño oxidativo en proteínas y lípidos, los niveles del sistema OXPHOS, así como los de las principales enzimas antioxidantes

(Mn-SOD, CuZn-SOD, PRX III y CAT), la UCP2 y SIRT1. Por otra parte, y teniendo en cuenta que los niveles aumentados de leptina están asociados a una peor prognosis<sup>177,193</sup>, nos planteamos examinar la influencia de la leptina en la respuesta al tratamiento antitumoral cisplatino, así como a agentes que inducen estrés oxidativo (ter-butilo hidroperóxido y genipin), mediante el análisis del crecimiento celular y la producción de ROS. Los resultados, así como su interpretación, se hallan recogidos en el **Manuscrito IV**.

Los resultados obtenidos de los manuscritos anteriores muestran una regulación de la proteína desacoplante UCP2, sugiriendo su importancia durante la tumorigénesis de mama. El desacoplamiento mitocondrial es uno de los principales mecanismos en la regulación del estrés oxidativo, previniendo la formación de ROS<sup>96,145,146</sup>. Su mecanismo de acción ha llevado a que muchos autores sugieran un papel dual de la UCP2 en el cáncer, actuando como un mecanismo protector en las células normales, mientras que su sobreexpresión en las células cancerosas implicaría una mayor supervivencia celular, así como, la adquisición de resistencia a la quimioterapia<sup>152,194</sup>. La sobreexpresión de UCP2 en la progresión del cáncer parece ser resultado de un proceso de selección, ya que en la iniciación del tumor esta proteína podría estar reprimida para incrementar el estrés oxidativo<sup>152,156</sup>. Por tanto, nuevas estrategias terapéuticas basadas en el tratamiento combinado de los fármacos convencionales junto con moduladores del estado redox de las células, como la UCP2, podrían incrementar el estrés oxidativo y superar la resistencia intrínseca de la célula tumoral a la apoptosis. Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos planteamos analizar si a través de la inhibición de la UCP2 podíamos comprometer la capacidad biosintética de la célula y conducirla a un mayor nivel de estrés, e incrementar los efectos citotóxicos de algunos tratamientos dirigidos contra el cáncer como el cisplatino. Para cubrir estos objetivos, la UCP2 fue inhibida químicamente con genipin o mediante un siRNA de UCP2 en la línea celular MCF-7. Analizamos los efectos de la inhibición sobre la proliferación, la producción de ROS y el daño oxidativo en lípidos y proteínas. Para conocer la implicación de la UCP2 en la mediación de la toxicidad oxidativa del cisplatino, se realizaron ensayos de crecimiento celular y producción de ROS, así como

de supervivencia celular mediante un análisis de clonogenicidad. Los resultados obtenidos y sus conclusiones se muestran en el **Manuscrito V**.

Para la realización de los experimentos descritos en este último manuscrito, la doctoranda realizó una estancia de investigación de tres meses en el *Dipartimento di Scienze della Vita e della Riproduzione, Sezione di Chimica Biologica* de la *Università degli Studi di Verona* (Italia), bajo la supervisión del Dr. Massimo Donadelli. Durante esta estancia la doctoranda también estudió la posible relación entre p53 mutado y la regulación de UCP2 sobre líneas celulares de cáncer de páncreas (PaCa3, Panc1 y ASPC-1). Las mutaciones de p53 afectan a más del 50% de los cánceres humanos, incluyendo el cáncer de páncreas<sup>195</sup>. Las células con p53 mutado adquieren nuevas actividades oncogénicas que no están relacionadas con p53 salvaje<sup>196-198</sup>, y pueden contribuir activamente a la progresión del tumor y al aumento de la resistencia a tratamientos anti-cancerígenos. Para alcanzar el objetivo propuesto, estudiar la regulación de UCP2 por p53 mutado, se realizó el silenciamiento y la sobreexpresión de p53 mutado (concretamente la mutación R273H, al ser una de las mutaciones más prevalentes en el cáncer) en las células tumorales Pan1 y ASPC1, respectivamente. También se trabajó con la línea tumoral PaCa3 para estudiar, junto con p53 mutado, el efecto de p53 salvaje sobre la modulación de UCP2. Asimismo, las células Panc1 también fueron tratadas con la molécula RITA (*reactivation of p53 and induction of tumor cell apoptosis*) para restablecer la conformación de p53 salvaje a partir de la forma mutada. En estas condiciones se determinaron la expresión de UCP2, la producción de ROS, el crecimiento celular, así como los niveles de SESN1 y SESN2. También se llevó a cabo la inhibición conjunta de p53 mutado y UCP2, ésta última mediante un siRNA de UCP2 o genipin, y se determinaron los niveles de ROS. Por último, se examinó el efecto de la gemcitabina (fármaco antitumoral) sobre la apoptosis en células con p53 mutado silenciado o sobreexpresado, así como, sobre los niveles de proteína de la forma fosforilada y total de p53. Los resultados de este proyecto y su interpretación se detallan en el **Manuscrito VI**.

El trabajo presentado en esta tesis se ha llevado a cabo bajo la dirección de la Dra. Pilar Roca Salom y el Dr. Jordi Oliver Oliver del Grupo Multidisciplinar de

Oncología Traslacional. Durante el desarrollo de esta tesis, la doctoranda ha disfrutado de una beca predoctoral de personal investigador concedida por la *Conselleria d'Educació, Cultura i Universitats del Govern de les Illes Balears*, tras ser seleccionada en el marco de un programa operativo cofinanciado por el Fondo Social Europeo. De igual forma, este trabajo ha sido posible gracias a los proyectos de investigación financiados por el Fondo de Investigaciones Sanitarias, PS09-01637 concedido en el 2009 y PI12-01827 concedido en el 2012, del Gobierno Español, así como por ayudas de la Comunidad Autónoma de las Islas Baleares cofinanciadas con fondos FEDER (AAEE007/2012). Además se ha contado con la financiación del Centro de Investigaciones Biomédicas en Red de Fisiopatología de la obesidad y la nutrición (Ciberobn, CB06/03) del Instituto de Salud Carlos III. Asimismo, la doctorando obtuvo una ayuda para una estancia predoctoral en Verona (Italia) otorgada por la *European Molecular Biology Organization* (EMBO). Finalmente, para poder llevar a cabo los experimentos realizados en tumores de mama se ha contado con la ayuda del servicio de anatomía patológica y del biobanco de tumores del hospital *Son Llàtzer* (Palma de Mallorca).



### **3. Resultados y discusión / *Results and discussion***



## **Manuscript I**

*Nadal-Serrano M, Sastre-Serra J, Pons DG, Miró AM, Oliver J, Roca P.*

**The ERalpha/ERbeta ratio determines oxidative stress in breast cancer cell lines  
in response to 17beta-estradiol**

J Cell Biochem. 2012 Oct;113(10):3178-85

## **Manuscript II**

*Nadal-Serrano M, Pons DG, Sastre-Serra J, Blanquer-Rosselló MM, Roca P, Oliver J.*

**Genistein modulates oxidative stress in breast cancer cell lines according to ER $\alpha$ /ER $\beta$  ratio: effects on mitochondrial functionality, sirtuins, uncoupling protein 2 and antioxidant enzymes**

Int J Biochem Cell Biol. 2013 Sep;45(9):2045-51

### **Manuscript III**

*Sastre-Serra J, Nadal-Serrano M, Pons DG, Valle A, Garau I, García-Bonafé M, Oliver J, Roca P.*

**The oxidative stress in breast tumors of postmenopausal women is ER $\alpha$ /ER $\beta$  ratio dependent**

Free Radic Biol Med. 2013 Mar 14;61C:11-17

## **Manuscript IV**

**Chronic-leptin attenuates cisplatin cytotoxicity in MCF-7 breast cancer cell line**

*Manuscript*



## **4. Recapitulación**





La presente tesis se centra en el estudio del estrés oxidativo y la importancia de su regulación en el desarrollo del cáncer de mama, así como en la respuesta a terapias anti-cancerígenas. El cáncer de mama es un tumor que con frecuencia muestra hormonodependencia<sup>13,38,186</sup>, por este motivo profundizamos en el efecto de la dotación de receptores estrogénicos sobre el estrés oxidativo y la función mitocondrial. Además, estudiamos la posible relación entre la leptina y el estrés oxidativo en el cáncer de mama, ya que la leptina es un factor mitogénico necesario para el desarrollo de la glándula mamaria, pero que también parece estar implicado en la tumorigénesis<sup>175,176,178</sup>. Finalmente, se ha investigado la modulación de la UCP2 en el cáncer al observar que el desacoplamiento mitocondrial es uno de los principales mecanismo en la regulación del estrés oxidativo<sup>96,145</sup>.

El estrés oxidativo está causado por una alteración en el balance entre la producción de ROS y la capacidad detoxificante de los sistemas biológicos. El resultado de este desequilibrio es la acumulación de daño oxidativo en las principales biomoléculas, característica asociada a la edad y a procesos patológicos como el cáncer<sup>111,112</sup>. La mitocondria es la principal fuente de ROS, de manera que una disfunción mitocondrial puede conducir a una mayor producción de radicales, mientras que esta producción disminuye cuando hay una mejor funcionalidad, así como una mayor demanda energética<sup>95,98,106</sup>. El estado redox de la célula normal difiere del de la célula tumoral, exhibiendo ésta últimos elevados niveles de ROS y daño oxidativo. Los ROS pueden desencadenar respuestas celulares que van desde la proliferación a la apoptosis<sup>199</sup> y, en las células cancerosas, este papel dual puede variar según el estadio del tumor. De forma general, parece ser que en la iniciación del tumor, los ROS, como causantes de daños en el DNA, permiten la aparición de mutaciones que pueden derivar en la activación de pro-oncogenes o la pérdida de supresores tumorales, confiriendo a la célula la capacidad de proliferar de forma descontrolada<sup>112,200</sup>. La elevada producción de ROS, además, permite a las células tener una mayor tasa de mutación lo que puede facilitar la adquisición de características de mayor malignidad como la angiogénesis, invasividad y capacidad metastásica. Sin embargo, una excesiva producción de ROS puede disparar en las células tumorales la apoptosis. Por este motivo, muchos de los tratamientos terapéuticos van dirigidos a aumentar los niveles

perjudiciales de ROS, conduciendo a la célula tumoral así a la muerte programada. No obstante, parece ser que a medida que el tumor progresa, en las células se seleccionará positivamente la adquisición de características que le permitan mantener la homeostasis de los ROS, evitando así alcanzar el umbral necesario para activar la apoptosis, y desarrollando por tanto resistencia a los fármacos que median su acción incrementando la producción de ROS<sup>103,156</sup>.

En el cáncer de mama se han descrito dos receptores estrogénicos, ER $\alpha$  y ER $\beta$ , cuya activación puede presentar efectos contrapuestos. ER $\alpha$  juega un importante papel proliferativo, incrementando la progresión del tumor, mientras que ER $\beta$  parece estar implicado en la diferenciación celular<sup>40,44,45</sup>. En esta tesis nos propusimos, en primer lugar, estudiar si la distinta dotación de receptores estrogénicos en líneas celulares y en tumores de cáncer de mama podía regular la respuesta al estrés oxidativo, contribuyendo a la patogénesis de la enfermedad.

Para la activación y señalización vía ER $\alpha$  o ER $\beta$ , y poder estudiar sus efectos sobre el estrés oxidativo y la mitocondria, trabajamos con dos de sus ligandos naturales, el 17- $\beta$  estradiol (E2) y la genisteína. E2 es uno de los principales factores de riesgo en la iniciación y progresión del cáncer de mama<sup>7,8,11</sup>, y diversos estudios han descrito que la producción de ROS mitocondriales se encuentran bajo la influencia de los estrógenos<sup>188,201</sup>. Es importante destacar que E2 presenta una mayor afinidad por ER $\alpha$ <sup>70,71</sup>, mientras que la genisteína por ER $\beta$ <sup>70,71</sup>. Por tanto, la respuesta celular a ambos ligandos podría depender de la predominancia de la isoforma del receptor. Los resultados de la presente tesis muestran que las células tumorales con la ratio ER $\alpha$ /ER $\beta$  elevada, MCF-7, presentaban mayores niveles de ROS tras el tratamiento con E2, así como un incremento en la proliferación celular mediada por ROS. El mayor estrés oxidativo estaba determinado, en parte, no sólo por la mayor producción de ROS, sino también por la menor respuesta antioxidante. Además de una bajada en la actividad de los principales enzimas detoxificantes, observamos una importante caída de la UCP2. La UCP2 previene la generación de superóxido, la principal causa de daño oxidativo celular<sup>158</sup>, a través de un aumento del flujo protónico hacia la matriz mitocondrial, lo que conduce a una disminución del potencial de membrana y un flujo de los electrones más eficiente a través de la cadena respiratoria<sup>202,203</sup>. Por tanto, una

disminución en la actividad UCP2 implica un aumento del potencial de membrana y, consecuentemente, unos mayores niveles de ROS, conduciendo a un mayor daño oxidativo, tal y como observamos en la línea MCF-7 con mayor predominancia de ER $\alpha$ . En cambio, cuando estudiamos una línea celular, T47D, que presenta una menor ratio ER $\alpha$ /ER $\beta$  observamos el perfil opuesto. Las células, a través de la activación de ER $\beta$  por la genisteína, mostraron un menor estrés oxidativo debido a una mayor activación de los sistemas antioxidantes, tanto enzimas como UCPs.

La genisteína se considera un agente preventivo del cáncer de mama, habiéndose relacionado la baja incidencia de la enfermedad con el consumo de dietas ricas en vegetales que contienen altas concentraciones de este fitoestrógeno en los países asiáticos<sup>54,57</sup>. Sin embargo, existe una creciente preocupación respecto al papel de los fitoestrógenos en esta neoplasia debido a las propiedades estrogénicas que presentan, y cuyos efectos podrían ser perjudiciales para pacientes con cáncer de mama sensible a estrógenos<sup>67,68</sup>. En este sentido, hemos investigado si la mayor afinidad de la genisteína por ER $\beta$ <sup>70</sup> podría tener implicaciones en el riesgo de cáncer de mama. Los estudios presentados en esta tesis indican que ER $\beta$  activado por genisteína inhibía el crecimiento de las células cancerosas T47D, las cuales presentaban un menor estrés oxidativo. Estas observaciones estarían de acuerdo con trabajos que han descrito que ER $\beta$  desaparece en las fases iniciales del tumor, predominando la isoforma  $\alpha$  del receptor, favoreciendo el crecimiento tumoral<sup>50,204</sup>. Respecto a la señalización vía ER $\beta$ /E2, las células cancerosas T47D también mostraron menores niveles de ROS, a pesar de que la respuesta antioxidante no fue tan pronunciada como tras el tratamiento con genisteína. La divergente acción de E2 y la genisteína puede resultar, en parte, de la mayor activación de ER $\beta$  por la genisteína, al tener mayor afinidad por este receptor, y de la regulación positiva sobre ER $\beta$ . La genisteína incrementó los niveles de ER $\beta$ , lo que amplificaría los efectos de esta isoflavona.

A parte del desacoplamiento, otro de los factores que pueden contribuir a un menor estrés oxidativo es la correcta funcionalidad de la mitocondria. La desregulación del metabolismo energético se encuentra entre los rasgos que caracterizan a la célula cancerosa, por ello el control sobre la biogénesis y el recambio mitocondrial es crítico

para el mantenimiento de la generación de energía y la prevención del estrés oxidativo endógeno<sup>2,205</sup>. Nuestros estudios demostraron que la línea celular T47D con una menor ratio ER $\alpha$ /ER $\beta$  también presentaba mitocondrias más diferenciadas y funcionales tras el tratamiento con genisteína. En concordancia con estos resultados, estudios en nuestro grupo de investigación han demostrado que en la línea celular T47D, la biogénesis y dinámica mitocondrial estaban dirigidas a mantener un *pool* de mitocondrias más funcionales<sup>206-208</sup>, que junto con la respuesta antioxidante descrita en la presente tesis, contribuirían a una disminución del estrés oxidativo. En contrapartida, los estudios citados demostraban que la línea MCF-7 con predominancia de ER $\alpha$  se caracterizaba por la acumulación de mitocondrias dañadas tras el tratamiento con E2, conduciendo a un aumento de los niveles de ROS<sup>206-208</sup>.

Una de las proteínas clave en el control e inducción de la biogénesis mitocondrial es la proteína SIRT1<sup>209</sup>. SIRT1 está implicada en la respuesta metabólica al estrés y a la falta de energía, estando relacionada en los mecanismos de respuesta que permitan una mayor supervivencia celular o longevidad del organismo<sup>116</sup>. Existe una fuerte controversia en cuanto al papel de las sirtuinas en el cáncer, hay estudios que proponen que SIRT1 actuaría como un supresor tumoral<sup>122,210</sup>, mientras que otros la definen como un promotor<sup>130,131</sup>. No obstante, parece ser que, en general, la expresión de SIRT1 en cáncer de mama está asociada a una peor prognosis<sup>125</sup>, porque permitiría a la célula tumoral sobrevivir al estrés genotóxico. Nuestros resultados muestran que la línea tumoral que presentaba un menor estrés oxidativo, las células T47D con mayor predominancia de ER $\beta$ , tenían un aumento en los niveles de SIRT1 tras el tratamiento con genisteína. Estos datos sugieren que SIRT1 podría ser uno de los mediadores que permitiría explicar por qué esta línea celular está bajo unos menores niveles de estrés y sus mitocondrias son más funcionales.

Para poder corroborar la relevancia de los resultados encontrados en líneas celulares, estudiamos en tumores de cáncer de mama ductales infiltrantes el efecto de la ratio de receptores estrogénicos sobre el estrés oxidativo. Los resultados descritos muestran que los tumores con mayor predominancia de ER $\beta$ , a pesar de estar en una situación de mayor estrés oxidativo y presentar una menor expresión del sistema OXPHOS, que favorecería la producción de ROS, tenían una mayor respuesta

antioxidante (enzimas y UCPs). A esta respuesta también podría contribuir el aumento de la proteína SIRT3, proteína clave en el mantenimiento de la homeostasis mitocondrial mediante cambios en la acetilación de proteínas diana relacionadas con el metabolismo, así como de enzimas antioxidantes<sup>137,138,211</sup>. Los datos obtenidos en esta tesis estarían de acuerdo con la peor prognosis asociada a ER $\beta$ , debido a la capacidad del tumor para adaptarse al estrés oxidativo mediante la activación de sistemas antioxidantes. De hecho, se ha postulado que durante la carcinogénesis las células van adquiriendo diversas modificaciones que les confieren la capacidad de protegerse de su propio estrés y del estrés generado por el crecimiento y densidad de la masa tumoral. Estas modificaciones van desde el desarrollo de la angiogénesis hasta la capacidad de escapar del entorno hostil y oxidante del propio tumor mediante el proceso de metástasis<sup>103</sup>

En los últimos años se ha descrito el papel de la leptina como posible enlace entre obesidad y cáncer<sup>212</sup>. La leptina es una hormona sintetizada principalmente por el tejido adiposo, cuyos niveles séricos aumentan con el índice de masa corporal. Tiene un importante papel en el desarrollo de la glándula mamaria, pero también en la tumorigénesis<sup>175,178</sup>. Esta citoquina activa diversas vías de señalización fuertemente relacionadas con la proliferación y supervivencia celular<sup>177,213</sup>. En la presente tesis comprobamos que la exposición a leptina en la línea celular de cáncer de mama MCF-7, además de ser un importante factor mitogénico, mitigaba el estrés oxidativo y, en consecuencia el daño oxidativo. Las células con leptina presentaban una disminución de la producción de ROS, así como del daño en lípidos y proteínas. La UCP2 también estaba disminuida, posiblemente debido a que es una proteína que se activa en una situación de estrés<sup>158</sup>. Estos datos sugieren que la leptina podría prevenir la aparición de estrés oxidativo en las células cancerosas MCF-7 por un mecanismo independiente a la UCP2. Asimismo, el requerimiento energético para hacer frente a las demandas de crecimiento y proliferación de estas células podría explicar, en parte, por qué no presentaban una mayor producción de ROS. Los niveles aumentados de leptina están asociados a una peor prognosis en pacientes con cáncer de mama<sup>214</sup>. En nuestro trabajo comprobamos que cuando se inducía estrés con un agente oxidante o eran tratadas con el agente antineoplásico cisplatino, las células con leptina eran más

resistentes. Estas observaciones indican que la leptina podría beneficiar a las células cancerosas, protegiéndolas del estrés oxidativo. De acuerdo con estos resultados, observamos que la leptina incrementaba los niveles de expresión de SIRT1, proteína que, como se ha explicado anteriormente, es un regulador clave en la respuesta adaptativa contra el estrés oxidativo y la mejora de la eficiencia energética<sup>121,215</sup>. Por tanto, los mayores niveles de SIRT1 contribuirían a la adaptación de las células con leptina a situaciones de estrés energético. En otras palabras, la leptina parece disminuir los niveles de estrés oxidativo basales, lo que podría jugar un papel en la adquisición de resistencia a los tratamientos anti-cancerígenos.

Durante el desarrollo de esta tesis, todos nuestros trabajos apuntaban al papel de la UCP2 durante la tumorigénesis, previniendo la formación de ROS y actuando como un sistema de defensa antioxidante mitocondrial. Pero también observamos su expresión como respuesta adaptativa en situación de estrés. Parece ser que durante la iniciación del cáncer, la UCP2 está inhibida, lo que provoca un incremento del estrés oxidativo e induce la transformación celular, mientras que está sobreexpresada en las siguientes etapas del tumor, protegiendo a la célula cancerosa de la apoptosis<sup>152,156,194</sup>. Por este motivo, y junto a estudios que sugieren que su expresión también podría contribuir a la selección de las células cancerosas con resistencia quimioterapéutica<sup>151,156</sup>, decidimos profundizar en su estudio para conocer si podía ser una diana clave en el tratamiento del cáncer de mama. La inhibición de la actividad de la UCP2 (mediante genipin) o de su expresión (a través de un siRNA de UCP2) mostró un aumento de los niveles de ROS, consiguiendo alcanzar el umbral citotóxico que conducía a una disminución de la proliferación celular. Estas observaciones iban acompañadas de mayores niveles de daño oxidativo. Así estos resultados, indican que el desacoplamiento de la mitocondria podría ser una ventaja para las células tumorales al protegerlas del daño oxidativo. En cuanto a la interferencia que puede suponer la UCP2 en la efectividad citotóxica del agente antitumoral cisplatino, nuestros datos revelaron que la *downregulation* de UCP2 aumentaba la sensibilidad al tratamiento, disminuyendo la supervivencia celular. Por tanto, nuestro estudio sugiere que esta proteína confiere citoprotección a las células cancerosas de mama, y su modulación es relevante en el control del estrés oxidativo.

Por último, gracias a una estancia de tres meses en el laboratorio del Dr. Donadelli (*Università degli Studi di Verona, Verona, Italia*), pudimos analizar el efecto de p53 mutado sobre la regulación de UCP2 en células de cáncer de páncreas (Panc1, Paca3 y ASPC-1). Las mutaciones en p53 afectan a más del 50% de los cánceres humanos<sup>216</sup>, incluyendo el cáncer de páncreas<sup>195</sup>. Diversos autores han demostrado que p53 mutado regula genes diana a través de su interacción con factores de transcripción<sup>217,218</sup>, inhibiendo proteínas con actividad antitumoral, como p63 y p73, y dotando a la célula de nuevas actividades oncogénicas<sup>198</sup>. En otras palabras, p53 mutado no sólo representa la pérdida de p53 como supresor tumoral, sino también la adquisición de nuevas propiedades que favorecen la transformación de la célula. Los resultados de un estudio dirigido por Derdak *et al.* sugerían que p53 era una posible diana sensible al estado redox de UCP2<sup>156</sup>. Sin embargo, no existen trabajos que relacionen p53 mutado con UCP2. Los resultados obtenidos de este manuscrito mostraron por primera vez que p53 mutado inducía la producción de ROS mediada por una disminución de la actividad de UCP2. Ello promovía claramente el crecimiento celular y la supervivencia. Además, se observó una importante disminución de la apoptosis en las células con p53 mutado tras el tratamiento con el antitumoral gemcitabina. El mecanismo por el cual p53 mutado podría regular UCP2 no ha podido ser esclarecido, pero estos datos indicarían que UCP2 podría ser un gen diana de p53 mutado.

En conjunto, los resultados obtenidos a lo largo de esta tesis muestran como factores con actividad hormonal como E2, la genisteína, y la leptina afectan al estrés oxidativo del tumor y como, en el caso de E2 y la genisteína este efecto viene determinado por dotación de receptores estrogénicos. Estos resultados sugieren que el estrés oxidativo es un mediador en los efectos de estas señales sobre el tumor, y que por tanto, puede ser un punto de control clave tanto en los procesos que conducen al crecimiento como a la inducción de la muerte celular. En este sentido, nuestros trabajos apoyan que el estudio en mayor profundidad de ER $\beta$  puede ser interesante para conseguir una mejor caracterización del tumor en relación a su estrés oxidativo y un mejor pronóstico en la evaluación de la eficacia del tratamiento. Por otra parte, los resultados reflejan también que la UCP2, como regulador clave del



estrés oxidativo basal, puede jugar un papel importante en la adquisición de resistencia a los tratamientos antitumorales. Más investigaciones serían necesarias para determinar si UCP2 podría utilizarse como diana terapéutica a fin de disminuir la tolerancia de las células tumorales al estrés oxidativo inducido por fármacos convencionales.

## **5. Conclusiones / *Conclusions***



## CONCLUSIONES

- I. El tratamiento con 17 $\beta$ -estradiol, a dosis fisiológicas (1 nM), en la línea celular MCF-7 (con una ratio ER $\alpha$ /ER $\beta$  elevada) induce proliferación celular y estrés oxidativo. Estos efectos pueden atribuirse, en parte, a una menor actividad de los enzimas antioxidantes, así como una disminución en los niveles de la UCP2. En la línea T47D (con una ratio ER $\alpha$ /ER $\beta$  baja) no se observan estos cambios, e incluso hay una disminución de la producción de ROS tras el tratamiento. Por tanto, la acción del 17 $\beta$ -estradiol sobre el estrés oxidativo es dependiente de la ratio de receptores estrogénicos.
  
- II. El tratamiento con genisteína (1  $\mu$ M, concentración en sangre de una mujer consumidora habitual de soja) en la línea celular T47D, que presenta una predominancia de ER $\beta$ , disminuye el estrés oxidativo, en parte, por una mejora de la función mitocondrial y la activación de los sistemas antioxidantes. A pesar de que la genisteína induce la expresión de ER $\beta$  tanto en las células T47D como en las MCF-7, no se aprecian los efectos beneficiosos de esta isoflavona sobre las células cancerosas MCF-7.
  
- III. La peor evolución de los carcinomas ductales infiltrantes mamarios con una ratio ER $\alpha$ /ER $\beta$  baja podría ser atribuida, en parte, a los mayores niveles de sistemas antioxidantes, UCPs y enzimas, que presentan, y que les permitirían adaptarse mejor a las situaciones de estrés oxidativo, incrementando de esta manera la supervivencia celular.
  
- IV. La mayor resistencia de la línea celular de cáncer de mama MCF-7 tratada con leptina frente a la toxicidad oxidativa del cisplatino podría venir determinada, en parte, por los efectos de esta adipoquina sobre el estrés oxidativo. Concretamente, los menores niveles de ROS y daño oxidativo, y el aumento del crecimiento celular tras la exposición a la leptina, contribuirían a explicar que la hiperleptinemia esté asociada a una peor prognosis en pacientes con cáncer de mama.

- V. La genisteína y la leptina inducen la expresión de SIRT1, proteína implicada en la respuesta metabólica al estrés y en los mecanismos de respuesta que permiten una mejora de la función mitocondrial, contribuyendo a la supervivencia celular.
  
- VI. El desacoplamiento mitocondrial por UCP2 proporciona un mecanismo de protección a la célula cancerosa frente al estrés oxidativo. Así, la *downregulation* de esta proteína sensibiliza a la célula tumoral al tratamiento con el citotóxico cisplatino, indicando el papel de la UCP2 en la adquisición de resistencia a los tratamientos antineoplásicos.
  
- VII. P53 mutado en líneas celulares de cáncer de páncreas induce la producción de ROS mediada, en parte, por una disminución de la actividad de UCP2, promoviendo el crecimiento celular y la supervivencia.
  
- VIII. ER $\beta$  y UCP2 podrían ser biomarcadores interesantes para conseguir una mejor caracterización de los tumores de mama en relación a su nivel de estrés oxidativo y la posible respuesta al tratamiento.

## CONCLUSIONS

1. 17 $\beta$ -estradiol treatment, at physiological dose (1 nM), in the MCF-7 cell line (with a high ER $\alpha$ /ER $\beta$  ratio) induces cell proliferation and oxidative stress. These effects may be attributed, in part, to lower antioxidant enzyme activities as well as a decrease in UCP2 protein levels. The T47D cell line (with a low ER $\alpha$ /ER $\beta$  ratio) does not show these changes, and there is a decrease in ROS production after treatment. Therefore, the effects of 17 $\beta$ -estradiol on oxidative stress are dependent on the estrogen receptors ratio.
2. Genistein treatment (1 $\mu$ M, the blood level of a woman that is a regular consumer of soya bean products) in the T47D cell line, which has a predominance of ER $\beta$ , decreases oxidative stress, in part, by an improved mitochondrial function and activation of the antioxidant systems. Although genistein induces ER $\beta$  expression in both T47D and MCF-7 cells, the beneficial effects of this isoflavone are not observed in MCF-7 cancer cells.
3. The poor prognosis of invasive ductal mammary carcinoma with a low ER $\alpha$ /ER $\beta$  ratio may be attributed, in part, to the higher levels of antioxidant systems, UCP2 and enzymes, and that would allow the cell to better adapt to oxidative stress situations, thus increasing cell survival.
4. The greater resistance of leptin treated MCF-7 breast cancer cells against oxidative toxicity of cisplatin may be determined, in part, by the effects of this adipokine on oxidative stress. Specifically, lower ROS levels and oxidative damage, and the increase in cell growth after leptin exposure, may explain why hyperleptinemia has been associated with a poorer prognosis in patients with breast cancer.
5. Genistein and leptin induce SIRT1 expression, a protein involved in the metabolic response to stress and in the response mechanisms that allow an improvement of mitochondrial function, which contribute to cell survival.

6. UCP2-mediated mitochondrial uncoupling provides a protective mechanism to cancer cells against oxidative stress. Thus, downregulation of this protein sensitizes tumor cells to treatment with cytotoxic cisplatin, indicating the role of UCP2 in the acquisition of resistance to cancer therapies.
  
7. Mutant p53 in pancreatic cancer cell lines induces ROS production, and this is done in part, by a decrease in UCP2 activity, which promotes cell growth and survival.
  
8. ER $\beta$  and UCP2 may be interesting biomarkers to better characterize the breast tumor in relation to its level of oxidative stress and possible treatment response.

## **6. Bibliografía / *Bibliography***





- 1 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70 (2000).
- 2 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013 (2011).
- 3 Warburg, O. On the origin of cancer cells. *Science* **123**, 309-314 (1956).
- 4 Funes, J. M. *et al.* Transformation of human mesenchymal stem cells increases their dependency on oxidative phosphorylation for energy production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 6223-6228, doi:10.1073/pnas.0700690104 (2007).
- 5 Weinberg, F. *et al.* Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 8788-8793, doi:10.1073/pnas.1003428107 (2010).
- 6 Gogvadze, V., Zhivotovsky, B. & Orrenius, S. The Warburg effect and mitochondrial stability in cancer cells. *Molecular aspects of medicine* **31**, 60-74, doi:10.1016/j.mam.2009.12.004 (2010).
- 7 Key, T. J., Verkasalo, P. K. & Banks, E. Epidemiology of breast cancer. *The lancet oncology* **2**, 133-140, doi:10.1016/S1470-2045(00)00254-0 (2001).
- 8 Samavat, H. & Kurzer, M. S. Estrogen metabolism and breast cancer. *Cancer letters*, doi:10.1016/j.canlet.2014.04.018 (2014).
- 9 Mahalingaiah, P. K. & Singh, K. P. Chronic oxidative stress increases growth and tumorigenic potential of MCF-7 breast cancer cells. *PloS one* **9**, e87371, doi:10.1371/journal.pone.0087371 (2014).
- 10 Sastre-Serra, J. *et al.* Estrogen down-regulates uncoupling proteins and increases oxidative stress in breast cancer. *Free radical biology & medicine* **48**, 506-512, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.11.025 (2010).
- 11 Yue, W. *et al.* Genotoxic metabolites of estradiol in breast: potential mechanism of estradiol induced carcinogenesis. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **86**, 477-486 (2003).
- 12 Beatson, G. T. On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment with illustrative cases. *Lancet* **2**, 104-107 (1896).
- 13 Anderson, K. N., Schwab, R. B. & Martinez, M. E. Reproductive risk factors and breast cancer subtypes: a review of the literature. *Breast cancer research and treatment* **144**, 1-10, doi:10.1007/s10549-014-2852-7 (2014).
- 14 Campbell, K. L. & McTiernan, A. Exercise and biomarkers for cancer prevention studies. *The Journal of nutrition* **137**, 161S-169S (2007).
- 15 Cleary, M. P. & Grossmann, M. E. Minireview: Obesity and breast cancer: the estrogen connection. *Endocrinology* **150**, 2537-2542, doi:10.1210/en.2009-0070 (2009).
- 16 Lahmann, P. H. *et al.* Body size and breast cancer risk: findings from the European Prospective Investigation into Cancer And Nutrition (EPIC). *International journal of cancer. Journal international du cancer* **111**, 762-771, doi:10.1002/ijc.20315 (2004).
- 17 Goodwin, P. J. Obesity and endocrine therapy: host factors and breast cancer outcome. *Breast* **22 Suppl 2**, S44-47, doi:10.1016/j.breast.2013.07.008 (2013).
- 18 Paz-Filho, G., Lim, E. L., Wong, M. L. & Licinio, J. Associations between adipokines and obesity-related cancer. *Frontiers in bioscience* **16**, 1634-1650 (2011).
- 19 Newman, G. & Gonzalez-Perez, R. R. Leptin-cytokine crosstalk in breast cancer. *Molecular and cellular endocrinology* **382**, 570-582, doi:10.1016/j.mce.2013.03.025 (2014).
- 20 Saxena, N. K. & Sharma, D. Multifaceted leptin network: the molecular connection between obesity and breast cancer. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* **18**, 309-320, doi:10.1007/s10911-013-9308-2 (2013).

- 21 Pharoah, P. D., Day, N. E., Duffy, S., Easton, D. F. & Ponder, B. A. Family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *International journal of cancer. Journal internationale du cancer* **71**, 800-809 (1997).
- 22 Walsh, T. & King, M. C. Ten genes for inherited breast cancer. *Cancer cell* **11**, 103-105, doi:10.1016/j.ccr.2007.01.010 (2007).
- 23 Guevara, R. *et al.* Sex-dependent differences in aged rat brain mitochondrial function and oxidative stress. *Free radical biology & medicine* **46**, 169-175, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.09.035 (2009).
- 24 Valle, A., Guevara, R., Garcia-Palmer, F. J., Roca, P. & Oliver, J. Caloric restriction retards the age-related decline in mitochondrial function of brown adipose tissue. *Rejuvenation research* **11**, 597-604, doi:10.1089/rej.2007.0626 (2008).
- 25 Jensen, E. V. Mechanism of estrogen action in relation to carcinogenesis. *Proceedings. Canadian Cancer Conference* **6**, 143-165 (1966).
- 26 Kuiper, G. G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S. & Gustafsson, J. A. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 5925-5930 (1996).
- 27 Kumar, V. *et al.* Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* **51**, 941-951 (1987).
- 28 McEwan, I. J. Nuclear receptors: one big family. *Methods in molecular biology* **505**, 3-18, doi:10.1007/978-1-60327-575-0\_1 (2009).
- 29 Bain, D. L., Heneghan, A. F., Connaghan-Jones, K. D. & Miura, M. T. Nuclear receptor structure: implications for function. *Annual review of physiology* **69**, 201-220, doi:10.1146/annurev.physiol.69.031905.160308 (2007).
- 30 Jin, L. & Li, Y. Structural and functional insights into nuclear receptor signaling. *Advanced drug delivery reviews* **62**, 1218-1226, doi:10.1016/j.addr.2010.08.007 (2010).
- 31 Acconcia, F. & Kumar, R. Signaling regulation of genomic and nongenomic functions of estrogen receptors. *Cancer letters* **238**, 1-14, doi:10.1016/j.canlet.2005.06.018 (2006).
- 32 Paech, K. *et al.* Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science* **277**, 1508-1510 (1997).
- 33 Safe, S. Transcriptional activation of genes by 17 beta-estradiol through estrogen receptor-Sp1 interactions. *Vitamins and hormones* **62**, 231-252 (2001).
- 34 Chevalier, N. *et al.* GPR30, the non-classical membrane G protein related estrogen receptor, is overexpressed in human seminoma and promotes seminoma cell proliferation. *PLoS one* **7**, e34672, doi:10.1371/journal.pone.0034672 (2012).
- 35 Heldring, N. *et al.* Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiological reviews* **87**, 905-931, doi:10.1152/physrev.00026.2006 (2007).
- 36 Weigel, N. L. & Zhang, Y. Ligand-independent activation of steroid hormone receptors. *Journal of molecular medicine* **76**, 469-479 (1998).
- 37 Russo, J., Ao, X., Grill, C. & Russo, I. H. Pattern of distribution of cells positive for estrogen receptor alpha and progesterone receptor in relation to proliferating cells in the mammary gland. *Breast cancer research and treatment* **53**, 217-227 (1999).
- 38 Yager, J. D. & Davidson, N. E. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *The New England journal of medicine* **354**, 270-282, doi:10.1056/NEJMra050776 (2006).
- 39 Paruthiyil, S. *et al.* Estrogen receptor beta inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest. *Cancer research* **64**, 423-428 (2004).
- 40 Strom, A. *et al.* Estrogen receptor beta inhibits 17beta-estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 1566-1571, doi:10.1073/pnas.0308319100 (2004).

- 41 Sugiyama, N., Barros, R. P., Warner, M. & Gustafsson, J. A. ERbeta: recent understanding of estrogen signaling. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **21**, 545-552, doi:10.1016/j.tem.2010.05.001 (2010).
- 42 Helguero, L. A., Faulds, M. H., Gustafsson, J. A. & Haldosen, L. A. Estrogen receptors alfa (ERalpha) and beta (ERbeta) differentially regulate proliferation and apoptosis of the normal murine mammary epithelial cell line HC11. *Oncogene* **24**, 6605-6616, doi:10.1038/sj.onc.1208807 (2005).
- 43 Liu, M. M. *et al.* Opposing action of estrogen receptors alpha and beta on cyclin D1 gene expression. *The Journal of biological chemistry* **277**, 24353-24360, doi:10.1074/jbc.M201829200 (2002).
- 44 Warner, M. & Gustafsson, J. A. The role of estrogen receptor beta (ERbeta) in malignant diseases--a new potential target for antiproliferative drugs in prevention and treatment of cancer. *Biochemical and biophysical research communications* **396**, 63-66, doi:10.1016/j.bbrc.2010.02.144 (2010).
- 45 Wu, X. *et al.* Estrogen receptor-beta sensitizes breast cancer cells to the anti-estrogenic actions of endoxifen. *Breast cancer research : BCR* **13**, R27, doi:10.1186/bcr2844 (2011).
- 46 Murphy, L. C. & Watson, P. H. Is oestrogen receptor-beta a predictor of endocrine therapy responsiveness in human breast cancer? *Endocrine-related cancer* **13**, 327-334, doi:10.1677/erc.1.01141 (2006).
- 47 Leung, Y. K., Lee, M. T., Lam, H. M., Tarapore, P. & Ho, S. M. Estrogen receptor-beta and breast cancer: translating biology into clinical practice. *Steroids* **77**, 727-737, doi:10.1016/j.steroids.2012.03.008 (2012).
- 48 Novelli, F. *et al.* A divergent role for estrogen receptor-beta in node-positive and node-negative breast cancer classified according to molecular subtypes: an observational prospective study. *Breast cancer research : BCR* **10**, R74, doi:10.1186/bcr2139 (2008).
- 49 Fox, E. M., Davis, R. J. & Shupnik, M. A. ERbeta in breast cancer--onlooker, passive player, or active protector? *Steroids* **73**, 1039-1051, doi:10.1016/j.steroids.2008.04.006 (2008).
- 50 Bardin, A., Boulle, N., Lazennec, G., Vignon, F. & Pujol, P. Loss of ERbeta expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression. *Endocrine-related cancer* **11**, 537-551 (2004).
- 51 Zhao, C. *et al.* Expression of estrogen receptor beta isoforms in normal breast epithelial cells and breast cancer: regulation by methylation. *Oncogene* **22**, 7600-7606, doi:10.1038/sj.onc.1207100 (2003).
- 52 Sotoca, A. M. *et al.* Phytoestrogen-mediated inhibition of proliferation of the human T47D breast cancer cells depends on the ERalpha/ERbeta ratio. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **112**, 171-178, doi:10.1016/j.jsbmb.2008.10.002 (2008).
- 53 Kostelac, D., Rechkemmer, G. & Briviba, K. Phytoestrogens modulate binding response of estrogen receptors alpha and beta to the estrogen response element. *Journal of agricultural and food chemistry* **51**, 7632-7635, doi:10.1021/jf034427b (2003).
- 54 Adlercreutz, H. Phytoestrogens and breast cancer. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **83**, 113-118 (2002).
- 55 Kang, X., Zhang, Q., Wang, S., Huang, X. & Jin, S. Effect of soy isoflavones on breast cancer recurrence and death for patients receiving adjuvant endocrine therapy. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* **182**, 1857-1862, doi:10.1503/cmaj.091298 (2010).
- 56 Shu, X. O. *et al.* Soy food intake and breast cancer survival. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **302**, 2437-2443, doi:10.1001/jama.2009.1783 (2009).

- 57 Adlercreutz, H. Epidemiology of phytoestrogens. *Bailliere's clinical endocrinology and metabolism* **12**, 605-623 (1998).
- 58 Cotter, A. & Cashman, K. D. Genistein appears to prevent early postmenopausal bone loss as effectively as hormone replacement therapy. *Nutrition reviews* **61**, 346-351 (2003).
- 59 Marini, H. *et al.* Effects of the phytoestrogen genistein on bone metabolism in osteopenic postmenopausal women: a randomized trial. *Annals of internal medicine* **146**, 839-847 (2007).
- 60 Erdman, J. W., Jr. AHA Science Advisory: Soy protein and cardiovascular disease: A statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the AHA. *Circulation* **102**, 2555-2559 (2000).
- 61 Wu, A. H., Yu, M. C., Tseng, C. C. & Pike, M. C. Epidemiology of soy exposures and breast cancer risk. *British journal of cancer* **98**, 9-14, doi:10.1038/sj.bjc.6604145 (2008).
- 62 Adlercreutz, H. Western diet and Western diseases: some hormonal and biochemical mechanisms and associations. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. Supplementum* **201**, 3-23 (1990).
- 63 Murphy, P. A. *et al.* Isoflavones in retail and institutional soy foods. *Journal of agricultural and food chemistry* **47**, 2697-2704 (1999).
- 64 Messina, M. & Hilakivi-Clarke, L. Early intake appears to be the key to the proposed protective effects of soy intake against breast cancer. *Nutrition and cancer* **61**, 792-798, doi:10.1080/01635580903285015 (2009).
- 65 Lagari, V. S. & Levis, S. Phytoestrogens for menopausal bone loss and climacteric symptoms. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **139**, 294-301, doi:10.1016/j.jsbmb.2012.12.002 (2014).
- 66 Newton, K. M. & Grady, D. Soy isoflavones for prevention of menopausal bone loss and vasomotor symptoms: comment on "Soy isoflavones in the prevention of menopausal bone loss and menopausal symptoms". *Archives of internal medicine* **171**, 1369-1370, doi:10.1001/archinternmed.2011.331 (2011).
- 67 Messina, M. & Wu, A. H. Perspectives on the soy-breast cancer relation. *The American journal of clinical nutrition* **89**, 1673S-1679S, doi:10.3945/ajcn.2009.26736V (2009).
- 68 Helferich, W. G., Andrade, J. E. & Hoagland, M. S. Phytoestrogens and breast cancer: a complex story. *Inflammopharmacology* **16**, 219-226, doi:10.1007/s10787-008-8020-0 (2008).
- 69 Folman, Y. & Pope, G. S. The interaction in the immature mouse of potent oestrogens with coumestrol, genistein and other utero-vaginitrophic compounds of low potency. *The Journal of endocrinology* **34**, 215-225 (1966).
- 70 Kuiper, G. G. *et al.* Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* **139**, 4252-4263, doi:10.1210/endo.139.10.6216 (1998).
- 71 Kuiper, G. G. *et al.* Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* **138**, 863-870, doi:10.1210/endo.138.3.4979 (1997).
- 72 Barkhem, T. *et al.* Differential response of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta to partial estrogen agonists/antagonists. *Molecular pharmacology* **54**, 105-112 (1998).
- 73 Klinge, C. M. Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids* **65**, 227-251 (2000).
- 74 McKenna, N. J., Lanz, R. B. & O'Malley, B. W. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocrine reviews* **20**, 321-344, doi:10.1210/edrv.20.3.0366 (1999).

- 75 Middleton, E., Jr., Kandaswami, C. & Theoharides, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* **52**, 673-751 (2000).
- 76 Messina, M. J. & Loprinzi, C. L. Soy for breast cancer survivors: a critical review of the literature. *The Journal of nutrition* **131**, 3095S-3108S (2001).
- 77 Shon, Y. H., Park, S. D. & Nam, K. S. Effective chemopreventive activity of genistein against human breast cancer cells. *Journal of biochemistry and molecular biology* **39**, 448-451 (2006).
- 78 Ruiz-Larrea, M. B. *et al.* Antioxidant activity of phytoestrogenic isoflavones. *Free radical research* **26**, 63-70 (1997).
- 79 McCarty, M. F. Isoflavones made simple - genistein's agonist activity for the beta-type estrogen receptor mediates their health benefits. *Medical hypotheses* **66**, 1093-1114, doi:10.1016/j.mehy.2004.11.046 (2006).
- 80 Kim, H., Peterson, T. G. & Barnes, S. Mechanisms of action of the soy isoflavone genistein: emerging role for its effects via transforming growth factor beta signaling pathways. *The American journal of clinical nutrition* **68**, 1418S-1425S (1998).
- 81 Constantinou, A. & Huberman, E. Genistein as an inducer of tumor cell differentiation: possible mechanisms of action. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine* **208**, 109-115 (1995).
- 82 Li, Y. *et al.* Epigenetic reactivation of estrogen receptor-alpha (ERalpha) by genistein enhances hormonal therapy sensitivity in ERalpha-negative breast cancer. *Molecular cancer* **12**, 9, doi:10.1186/1476-4598-12-9 (2013).
- 83 Mai, Z., Blackburn, G. L. & Zhou, J. R. Genistein sensitizes inhibitory effect of tamoxifen on the growth of estrogen receptor-positive and HER2-overexpressing human breast cancer cells. *Molecular carcinogenesis* **46**, 534-542, doi:10.1002/mc.20300 (2007).
- 84 Mense, S. M., Hei, T. K., Ganju, R. K. & Bhat, H. K. Phytoestrogens and breast cancer prevention: possible mechanisms of action. *Environmental health perspectives* **116**, 426-433, doi:10.1289/ehp.10538 (2008).
- 85 Messina, M., McCaskill-Stevens, W. & Lampe, J. W. Addressing the soy and breast cancer relationship: review, commentary, and workshop proceedings. *Journal of the National Cancer Institute* **98**, 1275-1284, doi:10.1093/jnci/djj356 (2006).
- 86 Hsieh, C. Y., Santell, R. C., Haslam, S. Z. & Helferich, W. G. Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cells in vitro and in vivo. *Cancer research* **58**, 3833-3838 (1998).
- 87 El Touny, L. H. & Banerjee, P. P. Identification of a biphasic role for genistein in the regulation of prostate cancer growth and metastasis. *Cancer research* **69**, 3695-3703, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2958 (2009).
- 88 Maggolini, M. *et al.* Estrogen receptor alpha mediates the proliferative but not the cytotoxic dose-dependent effects of two major phytoestrogens on human breast cancer cells. *Molecular pharmacology* **60**, 595-602 (2001).
- 89 Roca, P. *et al.* Phytoestrogens and Mitochondrial Biogenesis in Breast Cancer. Influence of Estrogen Receptors Ratio. *Current pharmaceutical design* (2014).
- 90 Pons, D. G. *et al.* Genistein modulates proliferation and mitochondrial functionality in breast cancer cells depending on ERalpha/ERbeta ratio. *Journal of cellular biochemistry* **115**, 949-958, doi:10.1002/jcb.24737 (2014).
- 91 Attardi, G. & Schatz, G. Biogenesis of mitochondria. *Annual review of cell biology* **4**, 289-333, doi:10.1146/annurev.cb.04.110188.001445 (1988).
- 92 Chen, J. Q., Brown, T. R. & Yager, J. D. Mechanisms of hormone carcinogenesis: evolution of views, role of mitochondria. *Advances in experimental medicine and biology* **630**, 1-18 (2008).
- 93 Green, D. R. & Reed, J. C. Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**, 1309-1312 (1998).

- 94 Murphy, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical journal* **417**, 1-13, doi:10.1042/BJ20081386 (2009).
- 95 Fariss, M. W., Chan, C. B., Patel, M., Van Houten, B. & Orrenius, S. Role of mitochondria in toxic oxidative stress. *Molecular interventions* **5**, 94-111, doi:10.1124/mi.5.2.7 (2005).
- 96 Eghtay, K. S. Mitochondrial uncoupling proteins--what is their physiological role? *Free radical biology & medicine* **43**, 1351-1371, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.08.011 (2007).
- 97 Sena, L. A. & Chandel, N. S. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Molecular cell* **48**, 158-167, doi:10.1016/j.molcel.2012.09.025 (2012).
- 98 Chistiakov, D. A., Sobenin, I. A., Revin, V. V., Orekhov, A. N. & Bobryshev, Y. V. Mitochondrial Aging and Age-Related Dysfunction of Mitochondria. *BioMed research international* **2014**, 238463, doi:10.1155/2014/238463 (2014).
- 99 Waris, G. & Ahsan, H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *Journal of carcinogenesis* **5**, 14, doi:10.1186/1477-3163-5-14 (2006).
- 100 Wallace, D. C. Diseases of the mitochondrial DNA. *Annual review of biochemistry* **61**, 1175-1212, doi:10.1146/annurev.bi.61.070192.005523 (1992).
- 101 Felty, Q. & Roy, D. Estrogen, mitochondria, and growth of cancer and non-cancer cells. *Journal of carcinogenesis* **4**, 1, doi:10.1186/1477-3163-4-1 (2005).
- 102 Cairns, R. A., Harris, I. S. & Mak, T. W. Regulation of cancer cell metabolism. *Nature reviews. Cancer* **11**, 85-95, doi:10.1038/nrc2981 (2011).
- 103 Pani, G., Galeotti, T. & Chiarugi, P. Metastasis: cancer cell's escape from oxidative stress. *Cancer metastasis reviews* **29**, 351-378, doi:10.1007/s10555-010-9225-4 (2010).
- 104 Gogvadze, V., Orrenius, S. & Zhivotovsky, B. Mitochondria as targets for cancer chemotherapy. *Seminars in cancer biology* **19**, 57-66, doi:10.1016/j.semcancer.2008.11.007 (2009).
- 105 Chance, B., Sies, H. & Boveris, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological reviews* **59**, 527-605 (1979).
- 106 Chen, Q., Vazquez, E. J., Moghaddas, S., Hoppel, C. L. & Lesnefsky, E. J. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *The Journal of biological chemistry* **278**, 36027-36031, doi:10.1074/jbc.M304854200 (2003).
- 107 Hirst, J., King, M. S. & Pryde, K. R. The production of reactive oxygen species by complex I. *Biochemical Society transactions* **36**, 976-980, doi:10.1042/BST0360976 (2008).
- 108 Sultana, R. *et al.* Increased protein and lipid oxidative damage in mitochondria isolated from lymphocytes from patients with Alzheimer's disease: insights into the role of oxidative stress in Alzheimer's disease and initial investigations into a potential biomarker for this dementing disorder. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* **24**, 77-84, doi:10.3233/JAD-2011-101425 (2011).
- 109 Warita, H., Hayashi, T., Murakami, T., Manabe, Y. & Abe, K. Oxidative damage to mitochondrial DNA in spinal motoneurons of transgenic ALS mice. *Brain research. Molecular brain research* **89**, 147-152 (2001).
- 110 Stocker, R. & Kearney, J. F., Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiological reviews* **84**, 1381-1478, doi:10.1152/physrev.00047.2003 (2004).
- 111 Schumacker, P. T. Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword. *Cancer cell* **10**, 175-176, doi:10.1016/j.ccr.2006.08.015 (2006).
- 112 Sainz, R. M., Lombo, F. & Mayo, J. C. Radical decisions in cancer: redox control of cell growth and death. *Cancers* **4**, 442-474, doi:10.3390/cancers4020442 (2012).
- 113 Felty, Q., Singh, K. P. & Roy, D. Estrogen-induced G1/S transition of G0-arrested estrogen-dependent breast cancer cells is regulated by mitochondrial oxidant signaling. *Oncogene* **24**, 4883-4893, doi:10.1038/sj.onc.1208667 (2005).

- 114 Chen, J. Q., Eshete, M., Alworth, W. L. & Yager, J. D. Binding of MCF-7 cell  
mitochondrial proteins and recombinant human estrogen receptors alpha and beta to  
human mitochondrial DNA estrogen response elements. *Journal of cellular  
biochemistry* **93**, 358-373, doi:10.1002/jcb.20178 (2004).
- 115 McGuinness, D., McGuinness, D. H., McCaul, J. A. & Shiels, P. G. Sirtuins, bioageing,  
and cancer. *Journal of aging research* **2011**, 235754, doi:10.4061/2011/235754 (2011).
- 116 Dali-Youcef, N. *et al.* Sirtuins: the 'magnificent seven', function, metabolism and  
longevity. *Annals of medicine* **39**, 335-345, doi:10.1080/07853890701408194 (2007).
- 117 Guarente, L. Calorie restriction and SIR2 genes--towards a mechanism. *Mechanisms of  
ageing and development* **126**, 923-928, doi:10.1016/j.mad.2005.03.013 (2005).
- 118 Haigis, M. C. & Sinclair, D. A. Mammalian sirtuins: biological insights and disease  
relevance. *Annual review of pathology* **5**, 253-295,  
doi:10.1146/annurev.pathol.4.110807.092250 (2010).
- 119 Martinez-Pastor, B. & Mostoslavsky, R. Sirtuins, metabolism, and cancer. *Frontiers in  
pharmacology* **3**, 22, doi:10.3389/fphar.2012.00022 (2012).
- 120 Vaziri, H. *et al.* hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* **107**,  
149-159 (2001).
- 121 Luo, J. *et al.* Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress.  
*Cell* **107**, 137-148 (2001).
- 122 Kabra, N. *et al.* SirT1 is an inhibitor of proliferation and tumor formation in colon  
cancer. *The Journal of biological chemistry* **284**, 18210-18217,  
doi:10.1074/jbc.M109.000034 (2009).
- 123 Huffman, D. M. *et al.* SIRT1 is significantly elevated in mouse and human prostate  
cancer. *Cancer research* **67**, 6612-6618, doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0085 (2007).
- 124 Jang, K. Y. *et al.* Expression and prognostic significance of SIRT1 in ovarian epithelial  
tumors. *Pathology* **41**, 366-371, doi:10.1080/00313020902884451 (2009).
- 125 Wu, M. *et al.* Expression of SIRT1 is associated with lymph node metastasis and poor  
prognosis in both operable triple-negative and non-triple-negative breast cancer.  
*Medical oncology* **29**, 3240-3249, doi:10.1007/s12032-012-0260-6 (2012).
- 126 Kim, J. E., Chen, J. & Lou, Z. DBC1 is a negative regulator of SIRT1. *Nature* **451**, 583-586,  
doi:10.1038/nature06500 (2008).
- 127 Chen, W. Y. *et al.* Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-  
dependent DNA-damage responses. *Cell* **123**, 437-448, doi:10.1016/j.cell.2005.08.011  
(2005).
- 128 Zhao, W. *et al.* Negative regulation of the deacetylase SIRT1 by DBC1. *Nature* **451**, 587-  
590, doi:10.1038/nature06515 (2008).
- 129 Holloway, K. R. *et al.* SIRT1 positively regulates breast cancer associated human  
aromatase (CYP19A1) expression. *Molecular endocrinology* **27**, 480-490,  
doi:10.1210/me.2012-1347 (2013).
- 130 Choi, H. K. *et al.* SIRT1-mediated FoxO1 deacetylation is essential for multidrug  
resistance-associated protein 2 expression in tamoxifen-resistant breast cancer cells.  
*Molecular pharmacology* **10**, 2517-2527, doi:10.1021/mp400287p (2013).
- 131 Suzuki, K. *et al.* SIRT1 activator, promotes tumor cell migration, and lung  
metastasis of breast cancer in mice. *Oncology reports* **27**, 1726-1732,  
doi:10.3892/or.2012.1750 (2012).
- 132 Brunet, A. *et al.* Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the  
SIRT1 deacetylase. *Science* **303**, 2011-2015, doi:10.1126/science.1094637 (2004).
- 133 Yeung, F. *et al.* Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by  
the SIRT1 deacetylase. *The EMBO journal* **23**, 2369-2380,  
doi:10.1038/sj.emboj.7600244 (2004).



- 134 Yuan, J., Minter-Dykhouse, K. & Lou, Z. A c-Myc-SIRT1 feedback loop regulates cell growth and transformation. *The Journal of cell biology* **185**, 203-211, doi:10.1083/jcb.200809167 (2009).
- 135 Wang, R. H. *et al.* Interplay among BRCA1, SIRT1, and Survivin during BRCA1-associated tumorigenesis. *Molecular cell* **32**, 11-20, doi:10.1016/j.molcel.2008.09.011 (2008).
- 136 Haigis, M. C., Deng, C. X., Finley, L. W., Kim, H. S. & Gius, D. SIRT3 is a mitochondrial tumor suppressor: a scientific tale that connects aberrant cellular ROS, the Warburg effect, and carcinogenesis. *Cancer research* **72**, 2468-2472, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3633 (2012).
- 137 Park, S. H. *et al.* Sirt3, Mitochondrial ROS, Ageing, and Carcinogenesis. *International journal of molecular sciences* **12**, 6226-6239, doi:10.3390/ijms12096226 (2011).
- 138 Qiu, X., Brown, K., Hirschey, M. D., Verdin, E. & Chen, D. Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation. *Cell metabolism* **12**, 662-667, doi:10.1016/j.cmet.2010.11.015 (2010).
- 139 Kim, H. S. *et al.* SIRT3 is a mitochondria-localized tumor suppressor required for maintenance of mitochondrial integrity and metabolism during stress. *Cancer cell* **17**, 41-52, doi:10.1016/j.ccr.2009.11.023 (2010).
- 140 Finley, L. W. *et al.* SIRT3 opposes reprogramming of cancer cell metabolism through HIF1alpha destabilization. *Cancer cell* **19**, 416-428, doi:10.1016/j.ccr.2011.02.014 (2011).
- 141 Bell, E. L., Emerling, B. M., Ricoult, S. J. & Guarente, L. Sirt3 suppresses hypoxia inducible factor 1alpha and tumor growth by inhibiting mitochondrial ROS production. *Oncogene* **30**, 2986-2996, doi:10.1038/onc.2011.37 (2011).
- 142 Alhazzazi, T. Y., Kamarajan, P., Verdin, E. & Kapila, Y. L. SIRT3 and cancer: tumor promoter or suppressor? *Biochimica et biophysica acta* **1816**, 80-88, doi:10.1016/j.bbcan.2011.04.004 (2011).
- 143 Alhazzazi, T. Y. *et al.* Sirtuin-3 (SIRT3), a novel potential therapeutic target for oral cancer. *Cancer* **117**, 1670-1678, doi:10.1002/cncr.25676 (2011).
- 144 Trachootham, D., Alexandre, J. & Huang, P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nature reviews. Drug discovery* **8**, 579-591, doi:10.1038/nrd2803 (2009).
- 145 Baffy, G., Derdak, Z. & Robson, S. C. Mitochondrial recoupling: a novel therapeutic strategy for cancer? *British journal of cancer* **105**, 469-474, doi:10.1038/bjc.2011.245 (2011).
- 146 Valle, A., Oliver, J. & Roca, P. Role of uncoupling proteins in cancer. *Cancers* **2**, 567-591, doi:10.3390/cancers2020567 (2010).
- 147 Nicholls, D. G. & Locke, R. M. Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiological reviews* **64**, 1-64 (1984).
- 148 Wolf, G. The uncoupling proteins UCP2 and UCP3 in skeletal muscle. *Nutrition reviews* **59**, 56-57 (2001).
- 149 Jia, J. J. *et al.* The polymorphisms of UCP1 genes associated with fat metabolism, obesity and diabetes. *Molecular biology reports* **37**, 1513-1522, doi:10.1007/s11033-009-9550-2 (2010).
- 150 Zhang, C. Y. *et al.* Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes. *Cell* **105**, 745-755 (2001).
- 151 Dalla Pozza, E. *et al.* Role of mitochondrial uncoupling protein 2 in cancer cell resistance to gemcitabine. *Biochimica et biophysica acta* **1823**, 1856-1863, doi:10.1016/j.bbamcr.2012.06.007 (2012).
- 152 Robbins, D. & Zhao, Y. New Aspects of Mitochondrial Uncoupling Proteins (UCPs) and Their Roles in Tumorigenesis. *International journal of molecular sciences* **12**, 5285-5293, doi:10.3390/ijms12085285 (2011).

- 153 Sayeed, A. *et al.* Negative regulation of UCP2 by TGFbeta signaling characterizes low and intermediate-grade primary breast cancer. *Cell death & disease* **1**, e53, doi:10.1038/cddis.2010.30 (2010).
- 154 Derdak, Z. *et al.* Enhanced colon tumor induction in uncoupling protein-2 deficient mice is associated with NF-kappaB activation and oxidative stress. *Carcinogenesis* **27**, 956-961, doi:10.1093/carcin/bgi335 (2006).
- 155 Kuai, X. Y., Ji, Z. Y. & Zhang, H. J. Mitochondrial uncoupling protein 2 expression in colon cancer and its clinical significance. *World journal of gastroenterology : WJG* **16**, 5773-5778 (2010).
- 156 Derdak, Z. *et al.* The mitochondrial uncoupling protein-2 promotes chemoresistance in cancer cells. *Cancer research* **68**, 2813-2819, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0053 (2008).
- 157 Dando, I. *et al.* UCP2 inhibition triggers ROS-dependent nuclear translocation of GAPDH and autophagic cell death in pancreatic adenocarcinoma cells. *Biochimica et biophysica acta* **1833**, 672-679, doi:10.1016/j.bbamcr.2012.10.028 (2013).
- 158 Brand, M. D. *et al.* Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free radical biology & medicine* **37**, 755-767, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.05.034 (2004).
- 159 Echtay, K. S. *et al.* Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* **415**, 96-99, doi:10.1038/415096a (2002).
- 160 Samudio, I., Fiegl, M. & Andreeff, M. Mitochondrial uncoupling and the Warburg effect: molecular basis for the reprogramming of cancer cell metabolism. *Cancer research* **69**, 2163-2166, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3722 (2009).
- 161 Mailloux, R. J., Adjeitey, C. N. & Harper, M. E. Genipin-induced inhibition of uncoupling protein-2 sensitizes drug-resistant cancer cells to cytotoxic agents. *PLoS one* **5**, e13289, doi:10.1371/journal.pone.0013289 (2010).
- 162 Michels, K. B., Terry, K. L. & Willett, W. C. Longitudinal study on the role of body size in premenopausal breast cancer. *Archives of internal medicine* **166**, 2395-2402, doi:10.1001/archinte.166.21.2395 (2006).
- 163 Calle, E. E. & Thun, M. J. Obesity and cancer. *Oncogene* **23**, 6365-6378, doi:10.1038/sj.onc.1207751 (2004).
- 164 Cleary, M. P. & Maihle, N. J. The role of body mass index in the relative risk of developing premenopausal versus postmenopausal breast cancer. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine* **216**, 28-43 (1997).
- 165 Toniolo, P. G. *et al.* A prospective study of endogenous estrogens and breast cancer in postmenopausal women. *Journal of the National Cancer Institute* **87**, 190-197 (1995).
- 166 MacDougald, O. A. & Burant, C. F. The rapidly expanding family of adipokines. *Cell metabolism* **6**, 159-161, doi:10.1016/j.cmet.2007.08.010 (2007).
- 167 Bjorbaek, C. & Kahn, B. B. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent progress in hormone research* **59**, 305-331 (2004).
- 168 Ahima, R. S. & Flier, J. S. Leptin. *Annual review of physiology* **62**, 413-437, doi:10.1146/annurev.physiol.62.1.413 (2000).
- 169 Cohen, M. M., Jr. Role of leptin in regulating appetite, neuroendocrine function, and bone remodeling. *American journal of medical genetics. Part A* **140**, 515-524, doi:10.1002/ajmg.a.31099 (2006).
- 170 Grossmann, M. E. & Cleary, M. P. The balance between leptin and adiponectin in the control of carcinogenesis - focus on mammary tumorigenesis. *Biochimie* **94**, 2164-2171, doi:10.1016/j.biochi.2012.06.013 (2012).
- 171 Fantuzzi, G. & Faggioni, R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *Journal of leukocyte biology* **68**, 437-446 (2000).

- 172 Sweeney, G. Leptin signalling. *Cellular signalling* **14**, 655-663 (2002).
- 173 Neville, M. C., McFadden, T. B. & Forsyth, I. Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* **7**, 49-66 (2002).
- 174 Cirillo, D., Rachiglio, A. M., la Montagna, R., Giordano, A. & Normanno, N. Leptin signaling in breast cancer: an overview. *Journal of cellular biochemistry* **105**, 956-964, doi:10.1002/jcb.21911 (2008).
- 175 Cleary, M. P. *et al.* Leptin receptor-deficient MMTV-TGF-alpha/Lepr(db)Lepr(db) female mice do not develop oncogene-induced mammary tumors. *Experimental biology and medicine* **229**, 182-193 (2004).
- 176 Cleary, M. P. *et al.* Genetically obese MMTV-TGF-alpha/Lep(ob)Lep(ob) female mice do not develop mammary tumors. *Breast cancer research and treatment* **77**, 205-215 (2003).
- 177 Valle, A., Sastre-Serra, J., Oliver, J. & Roca, P. Chronic leptin treatment sensitizes MCF-7 breast cancer cells to estrogen. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* **28**, 823-832, doi:10.1159/000335796 (2011).
- 178 Hu, X., Juneja, S. C., Maihle, N. J. & Cleary, M. P. Leptin--a growth factor in normal and malignant breast cells and for normal mammary gland development. *Journal of the National Cancer Institute* **94**, 1704-1711 (2002).
- 179 Catalano, S. *et al.* Leptin induces, via ERK1/ERK2 signal, functional activation of estrogen receptor alpha in MCF-7 cells. *The Journal of biological chemistry* **279**, 19908-19915, doi:10.1074/jbc.M313191200 (2004).
- 180 Dieudonne, M. N. *et al.* Leptin mediates a proliferative response in human MCF7 breast cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications* **293**, 622-628, doi:10.1016/S0006-291X(02)00205-X (2002).
- 181 Jarde, T. *et al.* Leptin and leptin receptor involvement in cancer development: a study on human primary breast carcinoma. *Oncology reports* **19**, 905-911 (2008).
- 182 Garofalo, C. *et al.* Increased expression of leptin and the leptin receptor as a marker of breast cancer progression: possible role of obesity-related stimuli. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **12**, 1447-1453, doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-1913 (2006).
- 183 Tessitore, L. *et al.* Adipocyte expression and circulating levels of leptin increase in both gynaecological and breast cancer patients. *International journal of oncology* **24**, 1529-1535 (2004).
- 184 Catalano, S. *et al.* Leptin enhances, via AP-1, expression of aromatase in the MCF-7 cell line. *The Journal of biological chemistry* **278**, 28668-28676, doi:10.1074/jbc.M301695200 (2003).
- 185 Ho, P. W. *et al.* Mitochondrial uncoupling protein-2 (UCP2) mediates leptin protection against MPP+ toxicity in neuronal cells. *Neurotoxicity research* **17**, 332-343, doi:10.1007/s12640-009-9109-y (2010).
- 186 Clemons, M. & Goss, P. Estrogen and the risk of breast cancer. *The New England journal of medicine* **344**, 276-285, doi:10.1056/NEJM200101253440407 (2001).
- 187 Yager, J. D. & Liehr, J. G. Molecular mechanisms of estrogen carcinogenesis. *Annual review of pharmacology and toxicology* **36**, 203-232, doi:10.1146/annurev.pa.36.040196.001223 (1996).
- 188 Okoh, V., Deoraj, A. & Roy, D. Estrogen-induced reactive oxygen species-mediated signalings contribute to breast cancer. *Biochimica et biophysica acta* **1815**, 115-133, doi:10.1016/j.bbcan.2010.10.005 (2011).
- 189 Roy, D., Cai, Q., Felty, Q. & Narayan, S. Estrogen-induced generation of reactive oxygen and nitrogen species, gene damage, and estrogen-dependent cancers. *Journal of*

- toxicology and environmental health. Part B, Critical reviews* **10**, 235-257, doi:10.1080/15287390600974924 (2007).
- 190 Miro, A. M. *et al.* 17beta-Estradiol regulates oxidative stress in prostate cancer cell lines according to ERalpha/ERbeta ratio. *J Steroid Biochem Mol Biol* **123**, 133-139, doi:10.1016/j.jsbmb.2010.12.004 (2011).
- 191 Vansaun, M. N. Molecular pathways: adiponectin and leptin signaling in cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **19**, 1926-1932, doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0930 (2013).
- 192 Maccio, A. & Madeddu, C. Obesity, inflammation, and postmenopausal breast cancer: therapeutic implications. *TheScientificWorldJournal* **11**, 2020-2036, doi:10.1100/2011/806787 (2011).
- 193 Chen, X. *et al.* Leptin attenuates the anti-estrogen effect of tamoxifen in breast cancer. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* **67**, 22-30, doi:10.1016/j.biopha.2012.10.001 (2013).
- 194 Harper, M. E. *et al.* Characterization of a novel metabolic strategy used by drug-resistant tumor cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **16**, 1550-1557, doi:10.1096/fj.02-0541com (2002).
- 195 Moore, P. S., Beghelli, S., Zamboni, G. & Scarpa, A. Genetic abnormalities in pancreatic cancer. *Molecular cancer* **2**, 7 (2003).
- 196 Fiorini, C. *et al.* Autophagy induced by p53-reactivating molecules protects pancreatic cancer cells from apoptosis. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* **18**, 337-346, doi:10.1007/s10495-012-0790-6 (2013).
- 197 Oren, M. & Rotter, V. Mutant p53 gain-of-function in cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2**, a001107, doi:10.1101/cshperspect.a001107 (2010).
- 198 Strano, S. *et al.* Mutant p53: an oncogenic transcription factor. *Oncogene* **26**, 2212-2219, doi:10.1038/sj.onc.1210296 (2007).
- 199 Martindale, J. L. & Holbrook, N. J. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *Journal of cellular physiology* **192**, 1-15, doi:10.1002/jcp.10119 (2002).
- 200 Hussain, S. P., Hofseth, L. J. & Harris, C. C. Radical causes of cancer. *Nature reviews. Cancer* **3**, 276-285, doi:10.1038/nrc1046 (2003).
- 201 Chang, M. Dual roles of estrogen metabolism in mammary carcinogenesis. *BMB reports* **44**, 423-434, doi:10.5483/BMBRep.2011.44.7.423 (2011).
- 202 Mattiasson, G. & Sullivan, P. G. The emerging functions of UCP2 in health, disease, and therapeutics. *Antioxidants & redox signaling* **8**, 1-38, doi:10.1089/ars.2006.8.1 (2006).
- 203 Turrens, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology* **552**, 335-344, doi:10.1113/jphysiol.2003.049478 (2003).
- 204 Hartman, J., Strom, A. & Gustafsson, J. A. Estrogen receptor beta in breast cancer--diagnostic and therapeutic implications. *Steroids* **74**, 635-641, doi:10.1016/j.steroids.2009.02.005 (2009).
- 205 Fogg, V. C., Lanning, N. J. & Mackeigan, J. P. Mitochondria in cancer: at the crossroads of life and death. *Chinese journal of cancer* **30**, 526-539, doi:10.5732/cjc.011.10018 (2011).
- 206 Sastre-Serra, J., Nadal-Serrano, M., Pons, D. G., Roca, P. & Oliver, J. The over-expression of ERbeta modifies estradiol effects on mitochondrial dynamics in breast cancer cell line. *The international journal of biochemistry & cell biology* **45**, 1509-1515, doi:10.1016/j.biocel.2013.04.007 (2013).
- 207 Sastre-Serra, J., Nadal-Serrano, M., Pons, D. G., Roca, P. & Oliver, J. Mitochondrial dynamics is affected by 17beta-estradiol in the MCF-7 breast cancer cell line. Effects on fusion and fission related genes. *The international journal of biochemistry & cell biology* **44**, 1901-1905, doi:10.1016/j.biocel.2012.07.012 (2012).

- 208 Sastre-Serra, J. *et al.* The effects of 17beta-estradiol on mitochondrial biogenesis and function in breast cancer cell lines are dependent on the ERalpha/ERbeta ratio. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* **29**, 261-268, doi:10.1159/000337607 (2012).
- 209 Lagouge, M. *et al.* Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* **127**, 1109-1122, doi:10.1016/j.cell.2006.11.013 (2006).
- 210 Wang, R. H. *et al.* Impaired DNA damage response, genome instability, and tumorigenesis in SIRT1 mutant mice. *Cancer cell* **14**, 312-323, doi:10.1016/j.ccr.2008.09.001 (2008).
- 211 Giralt, A. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha controls transcription of the Sirt3 gene, an essential component of the thermogenic brown adipocyte phenotype. *The Journal of biological chemistry* **286**, 16958-16966, doi:10.1074/jbc.M110.202390 (2011).
- 212 Brown, K. A. & Simpson, E. R. Obesity and breast cancer: progress to understanding the relationship. *Cancer research* **70**, 4-7, doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2257 (2010).
- 213 Yang, R. & Barouch, L. A. Leptin signaling and obesity: cardiovascular consequences. *Circulation research* **101**, 545-559, doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.156596 (2007).
- 214 Miyoshi, Y. *et al.* High expression of leptin receptor mRNA in breast cancer tissue predicts poor prognosis for patients with high, but not low, serum leptin levels. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **118**, 1414-1419, doi:10.1002/ijc.21543 (2006).
- 215 Canto, C. & Auwerx, J. Targeting sirtuin 1 to improve metabolism: all you need is NAD(+)? *Pharmacological reviews* **64**, 166-187, doi:10.1124/pr.110.003905 (2012).
- 216 Vousden, K. H. & Lu, X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nature reviews. Cancer* **2**, 594-604, doi:10.1038/nrc864 (2002).
- 217 Irwin, M. S. *et al.* Chemosensitivity linked to p73 function. *Cancer cell* **3**, 403-410 (2003).
- 218 Strano, S. *et al.* Physical interaction with human tumor-derived p53 mutants inhibits p63 activities. *The Journal of biological chemistry* **277**, 18817-18826, doi:10.1074/jbc.M201405200 (2002).

## **7. Anexo / Appendix**



## **Manuscript VII**

*Sastre-Serra J, Nadal-Serrano M, Pons DG, Valle A, Oliver J, Roca P.*

**The effects of 17 $\beta$ -estradiol on mitochondrial biogenesis and function in breast cancer cell lines are dependent on the ER $\alpha$ /ER $\beta$  ratio**

Cell Physiol Biochem. 2012;29(1-2):261-8



## **Manuscript VIII**

*Sastre-Serra J, Nadal-Serrano M, Pons DG, Roca P, Oliver J.*

**Mitochondrial dynamics is affected by 17 $\beta$ -estradiol in the MCF-7 breast cancer cell line. Effects on fusion and fission related genes**

Int J Biochem Cell Biol. 2012 Nov;44(11):1901-5

## **Manuscript IX**

*Pons DG, Sastre-Serra J, Nadal-Serrano M, Oliver A, García-Bonafé M, Bover I, Roca P, Oliver J.*

**Initial activation status of the antioxidant response determines sensitivity to carboplatin/paclitaxel treatment of ovarian cancer**

Anticancer Res. 2012 Nov;32(11):4723-8

## **Manuscript X**

*Sastre-Serra J, Nadal-Serrano M, Pons DG, Roca P, Oliver J.*

**The over-expression of ERbeta modifies estradiol effects on mitochondrial dynamics in breast cancer cell line**

Int J Biochem Cell Biol. 2013 Jul;45(7):1509-15

## **Manuscript XI**

*Pons DG, Nadal-Serrano M, Blanquer-Rossello MM, Sastre-Serra J, Oliver J, Roca P.*

**Genistein modulates proliferation and mitochondrial functionality in breast cancer cells depending on ERalpha/ERbeta ratio**

J Cell Biochem. 2014 May;115(5):949-58

## **Manuscript XII**

*Roca P, Sastre-Serra J, Nadal-Serrano M, Pons DG, Blanquer-Rossello MD, Oliver J.*

**Phytoestrogens and Mitochondrial Biogenesis in Breast Cancer. Influence of Estrogen Receptors Ratio**

Curr Pharm Des. 2014 Mar 5



*Aquel que tiene un porqué para vivir  
se puede enfrentar a todos los cómo.*

**Friedrich Nietzsche**

