



Universitat de les Illes Balears

Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut
Grupo de Metabolismo Energético y Nutrición
Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut
Grupo Multidisciplinar de Oncología Traslacional

**IMPORTANCIA DE LOS RECEPTORES ESTROGÉNICOS EN EL
ESTRÉS OXIDATIVO Y EL CÁNCER. FUNCIÓN, BIOGÉNESIS Y
DINÁMICA MITOCONDRIAL**

Tesis Doctoral para optar al Grado de

**Doctor en Ciencias de la Salud y del Comportamiento
por la *Universitat de les Illes Balears***

Programa de Doctorado de Nutrición Humana y Calidad de los Alimentos
Del *Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut*

Presentada por:

JORGE SASTRE SERRA

Palma, Junio de 2012

Con el beneplácito de los Directores:

Dra. M^a del Pilar Roca Salom

Catedrática de Universidad de
Bioquímica y Biología Molecular

Dr. Jordi Oliver Oliver

Titular de Universidad de
Bioquímica y Biología Molecular

El interesado

Jorge Sastre Serra

**Al siempre presente recuerdo de mi Abuela,
al apoyo de mis padres,
a mi hermana,
a Anto.**

Aprende a enseñar y enseñando aprenderás.

Phil Collins

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE

ABREVIATURAS / ABBREVIATIONS

ADN / DNA	Ácido desoxiribonucleico / <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
ADNmt / mtDNA	ADN mitocondrial / <i>mitochondrial DNA</i>
ADP	Adenosina difosfato / <i>Adenosine diphosphate</i>
AKT	Proteína quinasa B / <i>Protein Kinase B</i>
ARN / RNA	Ácido ribonucleico / <i>Ribonucleic Acid</i>
ARNm / mRNA	ARN mensajero / <i>messenger RNA</i>
ARNr / rRNA	ARN ribosómico / <i>ribosomic RNA</i>
ARNt / tRNA	ARN transferencia / <i>transfer RNA</i>
ATM	Ataxia telangiectasia mutado / <i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosina trifosfato / <i>Adenosine triphosphate</i>
ATPasa	ATP sintasa / <i>ATP synthase</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>
CDI / IDC	Carcinoma Ductal Infiltrante / <i>Invasive Ductal Carcinoma</i>
CLI / ILC	Carcinoma Lobulillar Infiltrante / <i>Invasive Lobulillar Carcinoma</i>
COX	Citocromo C oxidasa / <i>Cytochrome c oxidase</i>
CS	Citrato Sintasa / <i>Citrate Synthase</i>
CHECK2	<i>Checkpoint homolog2</i>
DCFDA	Diclorofluoresceina Diacetato / <i>Dichlorofluorescein diacetate</i>
DRP1	Proteína relacionada con la dinamina / <i>Dynammin-related protein</i>
E2	17β-estradiol
ER	Receptor de estrógenos / <i>Estrogen receptor</i>
ERE	Elemento de respuesta a estrógenos / <i>Estrogen Response Element</i>
FADH ₂	Flavin adenina dinucleótido / <i>Flavin Adenine Dinucleotide</i>
FIS1	Proteína de fisión mitocondrial 1 / <i>Mitochondrial fission 1 protein</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>
MFN1	Mitofusina 1 / <i>Mitofusin 1</i>
MFN2	Mitofusina 2 / <i>Mitofusin 2</i>
MSRE / SERM	Modulador selectivo de los receptores de estrógenos/ <i>Selective Estrogen Receptor Modulator</i>

NADH	Nicotinamida adenine dinucleótido / <i>Nicotinamide adenine nucleotide</i>
NAO	Naranja de acridina / <i>Nonyl Acridine orange</i>
NBS1	Nijmegen breakage síndrome / <i>Nijmegen breakage syndrome</i>
NRF	Factor de respiración nuclear / <i>Nuclear respiratory factor</i>
OPA1	Atrofia Óptica / <i>Optic Atrophy 1</i>
PALB2	Socio y localizador de BRCA2 / <i>Partner and localizer of BRCA2</i>
PCNA	Antígeno Nuclear de Células en Proliferación / <i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PGC1 α	Coactivador de PPAR / <i>PPAR Coactivator</i>
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa / <i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PPAR γ	Receptor proliferación activado por peroxisoma/ <i>Peroxisome proliferator-activated receptor</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>
SOD	Superóxido dismutasa / <i>Superoxide dismutase</i>
SP1	Proteína específica 1 / <i>Specificity Protein 1</i>
TFAM	Factor de transcripción mitocondrial A / <i>Mitochondrial transcription factor A</i>
TFB1M	Dimetiladenosin transferasa / <i>Dimethyladenosine transferase 1</i>
TMRM	Tetrametil rodamina metil éster/ <i>Tetramethyl Rhodamine Methyl Ester</i>
UCP	Proteína desacoplante / <i>Uncoupling Protein</i>



IMPORTANCIA DE LOS RECEPTORES ESTROGÉNICOS EN EL ESTRÉS OXIDATIVO Y EL CÁNCER. FUNCIÓN, BIOGÉNESIS Y DINÁMICA MITOCONDRIAL

Tesis Doctoral, Jorge Sastre Serra,

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 17 β -estradiol (E2) es un factor de riesgo tanto en la iniciación como en la progresión de cánceres hormonodependientes. La acción del E2 puede llevarse a cabo a través de las dos isoformas del receptor de estrógenos (ER α y ER β). El efecto del E2 puede variar según el receptor de estrógenos activado, así como según el tejido y la concentración. El E2 modula el estrés oxidativo afectando, entre otras, a la proliferación celular y por tanto en el proceso tumorigénico.

Los objetivos de la presente tesis fueron, en primer lugar, estudiar la acción de las hormonas sexuales en la modulación del estrés oxidativo en las células cancerosas de mama y próstata, continuando con, el estudio de la importancia del balance de los receptores estrogénicos alfa y beta (ER α y ER β) en la acción del E2 en la función, la biogénesis y la dinámica mitocondrial, así como en el control del estrés oxidativo en líneas de cáncer de mama. Para ello, se estudió: i) el efecto del E2, a concentraciones fisiológicas (1 nM), sobre la producción de radicales libres y el daño oxidativo celular, así como la respuesta antioxidante, en líneas ER+ y ER- (MCF-7 y MDA-MB-231, respectivamente); ii) el efecto dual del E2 sobre el estrés oxidativo según la distinta abundancia y dotación de ER α y ER β en líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7, T47D y MDA-MB-231) y próstata (VCaP, PC3 y Du145); iii) la función, la biogénesis y la dinámica mitocondrial en respuesta al tratamiento con E2 en las líneas de cáncer de mama con diferente ratio ER α /ER β (MCF-7, T47D, MDA-MB-231 y T47D-ER β inducible); y iv) el estrés oxidativo y la respuesta antioxidante en carcinomas ductales infiltrantes mamarios con una ratio ER α /ER β diferente.

Los resultados obtenidos en la presente tesis muestran diferencias en el efecto del tratamiento con E2, dependiendo de la dotación y abundancia de ER α y ER β , en líneas de cáncer de mama y cáncer de próstata, así como en carcinomas ductales infiltrantes de mama. El estrés oxidativo provocado por el E2 en líneas de cáncer de mama y de cáncer de próstata con predominancia de ER α se debe, en parte, a un descenso de la respuesta antioxidante (enzimas y UCPs) y un mal funcionamiento mitocondrial. Disfunción mitocondrial que intenta paliarse mediante el aumento del número de mitocondrias. Sin embargo, las líneas con una predominancia de ER β , mantienen la respuesta antioxidante, a la vez que presentan unas mitocondrias más funcionales. El balance de receptores estrogénicos en carcinomas ductales infiltrantes mamarios afecta a la mitocondria, al estrés oxidativo y a los niveles de los sistemas antioxidantes (enzimas y UCPs). Cuando la ratio ER α /ER β disminuye el aumento de la respuesta antioxidante, aunque no es capaz de contrarrestar la situación de estrés oxidativo y disfunción mitocondrial, favorecería la supervivencia celular.



ESTROGEN RECEPTORS IMPORTANCE IN OXIDATIVE STRESS AND CANCER. MITOCHONDRIAL FUNCTION, BIOGENESIS AND DINAMICS.

Doctoral Thesis, Jorge Sastre Serra,

Biology and Health Sciences, University Institute of Investigation in Health Sciences,
University of Balearic Islands, Palma, Spain.

Abstract

17 β -estradiol (E2) is a risk factor as in initiation as progression of hormonodependent cancers. E2 can acts through two isoforms of estrogen receptor (ER α and ER β). The effect can change if E2 activate ER α or ER β , and also depends on tissue and concentration. E2 modulates oxidative stress, affecting cellular proliferation, giving for this reason a role in tumorigenic process.

The objectives of the current thesis were, first, the study of action of sexual hormones in the modulation of oxidative stress in breast and prostate cancerous cells, and then, the study of the importance of the balance between estrogen receptors alpha and beta (ER α and ER β) in the action of E2 over mitochondrial function, biogenesis and dynamic, as well as, in the control of oxidative stress, in breast cancer cell lines. For this purpose, we studied: i) the effect of E2, at physiological concentrations (1 nM), over free radicals production and oxidative cellular damage, as well as the antioxidant response, in breast cancer cell lines ER $^{+}$ and ER $^{-}$ (MCF-7 and MDA-MB-231, respectively); ii) the E2 dual effect over oxidative stress depending of abundance and endowment of ER α and ER β , in breast (MCF-7, T47D and MDA-MB-231) and prostate (VCaP, PC3 and Du145) cancer cell lines; iii) mitochondrial function, biogenesis and dynamics in response to E2 treatment in breast cancer cell lines with different ER α /ER β ratio (MCF-7, T47D, MDA-MB-231 and T47D-ER β inducible); and iv) oxidative stress and antioxidant response in invasive ductal mammary carcinomas with different ER α /ER β ratio.

The results obtained in the current thesis shown differences in the effect of E2 treatment depending on endowment and abundance of ER α and ER β , in breast and prostate cancer cell lines, as well as, in invasive ductal mammary carcinomas. Oxidative stress caused by E2 in breast and prostate cancer cell lines with predominance of ER α , could be, at least in part, by a decrease in antioxidant response (enzymes and UCPs) and to a wrong mitochondrial function. This mitochondrial dysfunction tries to mitigate it by an increase in number of mitochondria. However, cell lines with predominance in ER β , maintains antioxidant response and have mitochondria more functional. Balance between estrogen receptors in invasive ductal mammary carcinomas affects to mitochondria, oxidative stress and antioxidant systems levels (enzymes and UCPs). If ER α /ER β ratio decreases, the antioxidant response increases, although it is not able to counteract oxidative stress and mitochondrial dysfunction situation, favoring cellular survival.

LISTADO DE PUBLICACIONES / LIST OF PUBLICATIONS

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

- I. Sastre-Serra J, Valle A, Company MM, Garau I, Oliver J, Roca P. Estrogen down-regulates uncoupling proteins and increases oxidative stress in breast cancer. *Free Radic Biol Med* (2010) 48(4):506-12
- II. Miró AM, Sastre-Serra J, Pons DG, Valle A, Roca P, Oliver J. 17 β -Estradiol regulates oxidative stress in prostate cancer cell lines according to ER α /ER β ratio. *J Steroid Biochem Mol Biol* (2011) 123(3-5):133-9
- III. Nadal-Serrano M, Sastre-Serra J, Pons DG, Miró AM, Oliver J, Roca P. The ER α /ER β ratio determines oxidative stress in breast cancer cell lines in response to 17 β -estradiol. *J Cell Biochem* (2012) May 21
- IV. Sastre-Serra J, Nadal-Serrano M, Pons DG, Valle A, Oliver J, Roca P. The effects of 17 β -estradiol on mitochondrial biogenesis and function in breast cancer cell lines are dependent on the ER α /ER β ratio. *Cell Physiol Biochem* (2012) 29(1-2):261-8
- V. Sastre-Serra J, Nadal-Serrano M, Pons DG, Roca P, Oliver J. Mitochondrial dynamics is affected by 17 β -estradiol in the MCF-7 breast cancer cell line. Effects on fusion and fission related genes. Manuscript
- VI. Sastre-Serra J, Nadal-Serrano M, Pons DG, Warner M, Gustafsson JA, Roca P, Oliver J. ER α /ER β ratio affects mitochondrial dynamics in breast cancer cell lines. Importance of Fis1 as key regulator in fission process. Manuscript
- VII. 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 ER α /ER β dependent. The importance of uncoupling proteins and SIRT3. Manuscript

ANEXO / APPENDIX

Además durante la realización de la presente tesis, el doctorando 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:*

- VIII. Valle A, Sastre-Serra J, Roca P, Oliver J. Modulation of white adipose tissue proteome by aging and calorie restriction. *Aging Cell* (2010) 9(5):882-94

- IX. Valle A, Sastre-Serra J, Pol C, Miró AM, Oliver J, Roca P. Proteomic analysis of MCF-7 breast cancer cell line exposed to leptin. *Anal Cell Pathol (Amst)*. (2011) 34(3):147-57

- X. Valle A, Sastre-Serra J, Oliver J, Roca P. Chronic leptin treatment sensitizes MCF-7 breast cancer cells to estrogen. *Cell Physiol Biochem* (2011) 28(5):823-32

- XI. Pons DG, Sastre-Serra J, Nadal-Serrano M, Oliver A, García-Bonafé MM, Bover I, Roca P, Oliver J. Initial activation status of the antioxidant response determines carboplatin-paclitaxel treatment sensitivity in ovarian cancer. *Manuscript*

1. Introducción

1.1. Epidemiología, etiología y clasificación 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 y la primera causa de muerte por cáncer en mujeres de todo el mundo. En la Unión Europea (EU27) se estima que se diagnostican 319.000 nuevos casos cada año, y es la causa de aproximadamente 131.000 muertes anuales, las cuales comprenden el 16.7% de todas las muertes causadas por cáncer en mujeres¹.

Las causas del cáncer de mama no están completamente descifradas, pero la epidemiología de la enfermedad muestra claramente como los factores hormonales juegan un papel clave, la producción de estrógenos aparece como un factor de riesgo potencial en mujeres de todo el mundo ya que estimula la proliferación de las células epiteliales del tejido mamario^{1, 2}. Coincidiendo con esta proliferación, el riesgo de cáncer de mama se incrementa en mujeres con una menarquía temprana, una menopausia tardía y en mujeres obesas postmenopáusicas (situaciones asociadas directamente con unos niveles de estrógenos elevados). En general el riesgo de cáncer de mama disminuye alrededor de un 5% con cada año que se retrasa la menarquía. Posteriormente a la menarquía, la incidencia de cáncer de mama se incrementa más lentamente con el retraso de la menopausia; por eso, una mujer con una menopausia natural a la edad de 45 años tiene la mitad de riesgo de desarrollar este tipo de cáncer que una mujer con una menopausia a la edad de 55 años^{3, 4}.

El embarazo parece tener un efecto dual sobre el riesgo de contraer cáncer de mama⁴. Por un lado, el efecto inmediato es incrementar temporalmente el riesgo justo después del nacimiento, pero por otra parte, el riesgo de padecer cáncer de mama disminuye a largo plazo, siendo el embarazo, en su globalidad, un factor que reduce el riesgo de desarrollar esta enfermedad. Parece ser que el efecto negativo a corto plazo es debido al incremento en los niveles de estradiol en la fase temprana del embarazo. Sin embargo, se ha

observado que mujeres premenopáusicas, que han tenido hijos, presentan, en general, menores niveles de estradiol circulante que mujeres premenopáusicas nulíparas⁵. Así pues, las mujeres que han tenido al menos una vez descendencia tienen aproximadamente un 25% de reducción en el riesgo de cáncer de mama comparado con una mujer nulípara^{5, 6}. Lógicamente, el uso de la terapia de reemplazo hormonal para combatir los síntomas de la menopausia incrementa el riesgo de cáncer de mama; de hecho, el uso de estas terapias estrogénicas durante un periodo de 10 años, incrementa el riesgo de cáncer en un 35%⁴.

La predisposición genética, al igual que la historia familiar, son otros factores que se asocian 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 cáncer de mama. Sin embargo, el riesgo es mucho menor cuando sólo un familiar de segundo orden se ve afectado⁷. Se han 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 CHECK2⁸.

Además, la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC-*International Agency for Research on Cancer*) estima que el 25% de todos los cánceres están asociados con el sobrepeso y la obesidad. Este incremento en el riesgo de cáncer presenta una cierta linealidad con el incremento en el índice de masa corporal, sin tener en cuenta aquellas personas que presentan un índice de masa corporal elevado debido a la actividad física intensa⁹. En la Unión Europea, 13.000 casos de cáncer de mama podrían evitarse cada año si se mantuviera un normopeso¹⁰. Así pues, el riesgo incrementado de desarrollar cáncer de mama en una mujer obesa postmenopáusica podría deberse en parte a los elevados niveles de estrógenos circulantes¹¹. De hecho, durante muchos años, este riesgo incrementado se había relacionado con una alta síntesis de estrógenos mediante la aromatasa en el tejido adiposo y, además, estudios recientes muestran que las hormonas secretadas por este tejido o adipoquinas

tienen la capacidad de inducir proliferación y supervivencia en células tumorales¹¹⁻¹³.

Dentro de los tipos de cáncer de mama que existen, el más común es el carcinoma ductal infiltrante (CDI), siendo alrededor del 80% de todos los cánceres de mama de este tipo histológico. El segundo tipo más común se denomina carcinoma lobulillar infiltrante (CLI), y representa aproximadamente el 10% de todos los casos. El carcinoma tubular de la mama es un subtipo raro de CDI, y cuenta sólo con el 1-2% de todos los casos de cáncer de mama¹⁴.

1.2. Receptores estrogénicos

1.2.1. Estrógenos. Historia y biología

La palabra estrógeno proviene del griego *oistros*, palabra que se refiere a la fase de celo, la fase en la cual las hembras son sexualmente receptivas. En mujeres con ciclos menstruales activos, la producción ovárica diaria de estrógenos está entre 70 y 500 microgramos, siendo el 17 β -estradiol (E2) el más importante. Muchos estudios muestran como esta producción de E2 se incrementa bajo la influencia de las gonadotropinas secretadas por la glándula pituitaria y por la maduración de los folículos ováricos. La producción de estrógenos por las células foliculares induce el crecimiento y desarrollo de los órganos sexuales femeninos y mantiene las características sexuales, además de tener influencia sobre el comportamiento femenino¹⁵.

Los estudios dirigidos por el Dr. Jensen sobre la acción del E2 en el útero, en el año 1972, llevaron a la conclusión de que los efectos biológicos de los estrógenos ocurren a través de la activación del receptor de estrógenos (ER)¹⁶. En el esquema clásico del desarrollo de los órganos reproductores, los estrógenos se consideraron como las “hormonas femeninas”, mientras que la testosterona pasó a ser la “hormona masculina”. En los años 80 se empezaron a

analizar los efectos de los estrógenos en tejidos no considerados como diana de acción para esta hormona, p. ej. en órganos que no están asociados con la reproducción. Fue así como se reconoció la importancia de los estrógenos en la homeostasis del hueso, debido a la observación del incremento de riesgo de osteoporosis en mujeres postmenopáusicas. Sin embargo, no fue hasta que se describió en un artículo en 1994 el caso de un hombre con una mutación en el receptor de estrógenos que presentaba una densidad anormal en el hueso además de una tolerancia a la glucosa alterada, que se pudo confirmar la importancia de los estrógenos en ambos sexos¹⁷.

En 1985, 23 años después del descubrimiento del ER por Jensen, que se identificó al ER como a un miembro de la superfamilia de receptores nucleares¹⁸⁻²⁰. El laboratorio del Dr. Gustafsson, en 1995, descubrió un segundo ER, el receptor de “Jensen” o clásico pasó a llamarse ER α y el nuevo receptor recibió el nombre de ER β ²¹. ER α y ER β presentan diferente patrón de expresión tisular²². De hecho, muchos tejidos denominados previamente como “tejidos insensibles a los estrógenos” fueron caracterizados como positivos para ER β y sensibles a los estrógenos. ER α es el subtipo mayoritario en hígado, ovarios y glándula mamaria, mientras que ER β predomina en la próstata, colon y pulmón, presentando unos niveles elevados de expresión y siendo el ER β el único subtipo presente en las células de la capa granulomatosa del ovario^{23, 24}. A parte de esta diferente localización tisular, otros estudios encontraron diferencias a nivel funcional, concluyendo que los efectos proliferativos de los estrógenos se efectúan a través de ER α y serían opuestos a los efectos mediados a través de ER β ²⁴⁻²⁶.

1.2.2. Estructura de los receptores estrogénicos

ER α y ER β presentan la típica estructura de la superfamilia de receptores nucleares (Figura 1): una región N-terminal muy variable (Dominio A/B, involucrado en las interacciones proteína-proteína con la maquinaria

transcripcional y los cofactores), un dominio de unión al ADN altamente conservado (C), una región bisagra (D), un dominio de unión a ligando (E) y finalmente un dominio C-terminal (F)^{27, 28}.

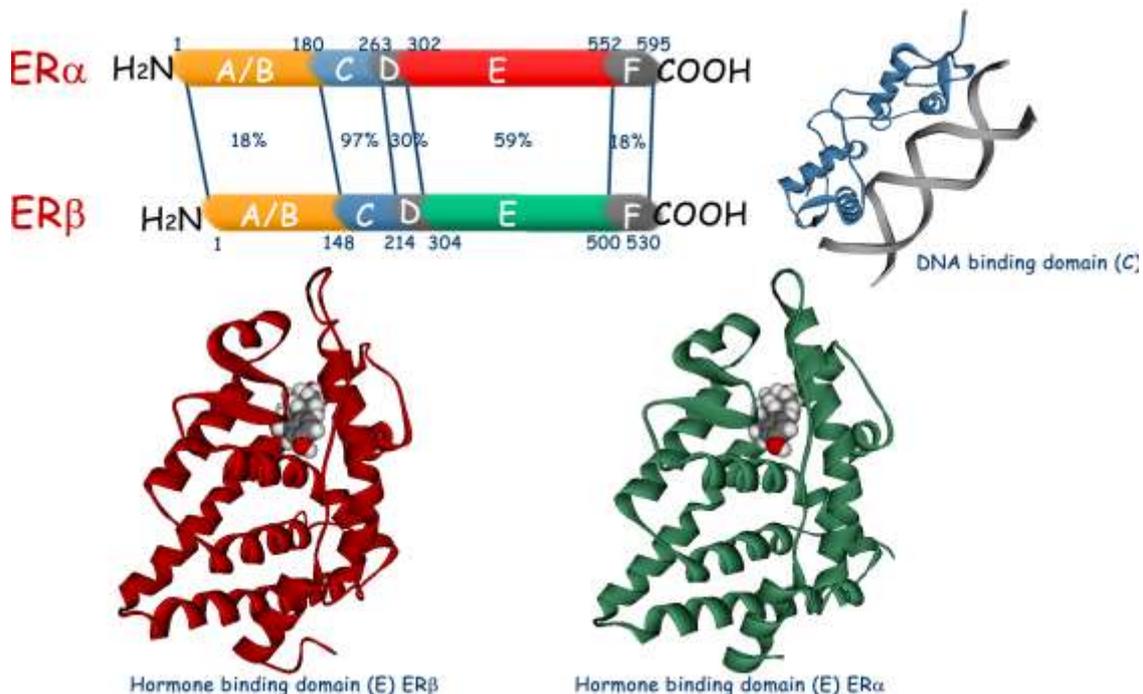


Figura 1. Representación esquemática de los dominios proteicos de los receptores estrogénicos ER α y ER β . Estructura tridimensional del dominio de unión al ADN (C) y de los dominios de unión de la hormona (E).

ER α (595 aa) y ER β (530 aa) están codificados por dos genes diferentes con menos del 18% de homología entre ellos respecto al dominio A/B, aunque presentan una homología del 97% entre sus dominios de unión al ADN, siendo este el más conservado. Este dominio (C) contiene dos dedos de zinc y un motivo corto, llamado P-box, el cual es el responsable de la especificidad del ADN, y está involucrado en la dimerización^{15, 29}. Consecuentemente, ambos receptores ER α y ER β se unen de manera muy similar al ADN, pero es la asociación con diferentes cofactores lo que les permite modular la transcripción génica^{27, 28}. El dominio D posee señales de localización nuclear y podría proveer maleabilidad entre los dominios C y E. El dominio E es propiamente dicho el dominio de unión al ligando, el cual está formado por una hendidura para el

ligando formada por 12 hélices alfa y se conserva en un 60% entre los dos subtipos¹⁵.

1.2.3. Mecanismos de activación de los receptores de estrógenos

Los estrógenos pueden actuar a través de distintos mecanismos y vías para llevar a cabo sus efectos biológicos^{29, 30}. Los estrógenos activan al ER mediante unión ligando-receptor, pero esta unión puede ocurrir de diferentes maneras. La primera ocurre cuando la unión E2-ER tiene lugar en el citoplasma y entonces el complejo hormona-receptor es transportado al núcleo a través del citoesqueleto. La segunda forma tiene el mismo resultado final, pero ocurre cuando la unión del E2 al ER se da directamente en el núcleo. Sea cual sea la forma de unión del E2 al ER al final se consigue la disociación del ER de las chaperonas que lo mantienen en un estado inactivo. Gracias a esta disociación, el ER puede formar heterodímeros o homodímeros y unirse así directamente a los elementos de respuesta a estrógenos (ERE) a través del dominio de unión al ADN así como mediante la asociación con diferentes reguladores génicos^{15, 29}.

Otro mecanismo de acción de los estrógenos es el que incluye a la proteína SP1 en la formación del puente entre el dímero de ER activado y el ERE^{31, 32}. Este mecanismo da lugar a una activación/inhibición indirecta de genes regulados por E2, encontrando muchos autores diferencias en los genes regulados según sea ER α o ER β el receptor unido a SP1 y esta al ERE^{15, 33}.

Además se ha descrito un mecanismo de acción de los estrógenos, mediante un proceso no genómico, involucra la interacción de los ERs activados con proteínas mensajeras secundarias (SM), con efectos rápidos en muchos tejidos, aunque este proceso no está del todo elucidado³⁴. Además, los ERs tienen un mecanismo de activación independiente de ligando en el que están implicadas proteínas quinasas. Estas, fosforilan activando a los ERs, pudiendo

explicar este mecanismo el crecimiento independiente de hormonas, observado en algunos tumores.

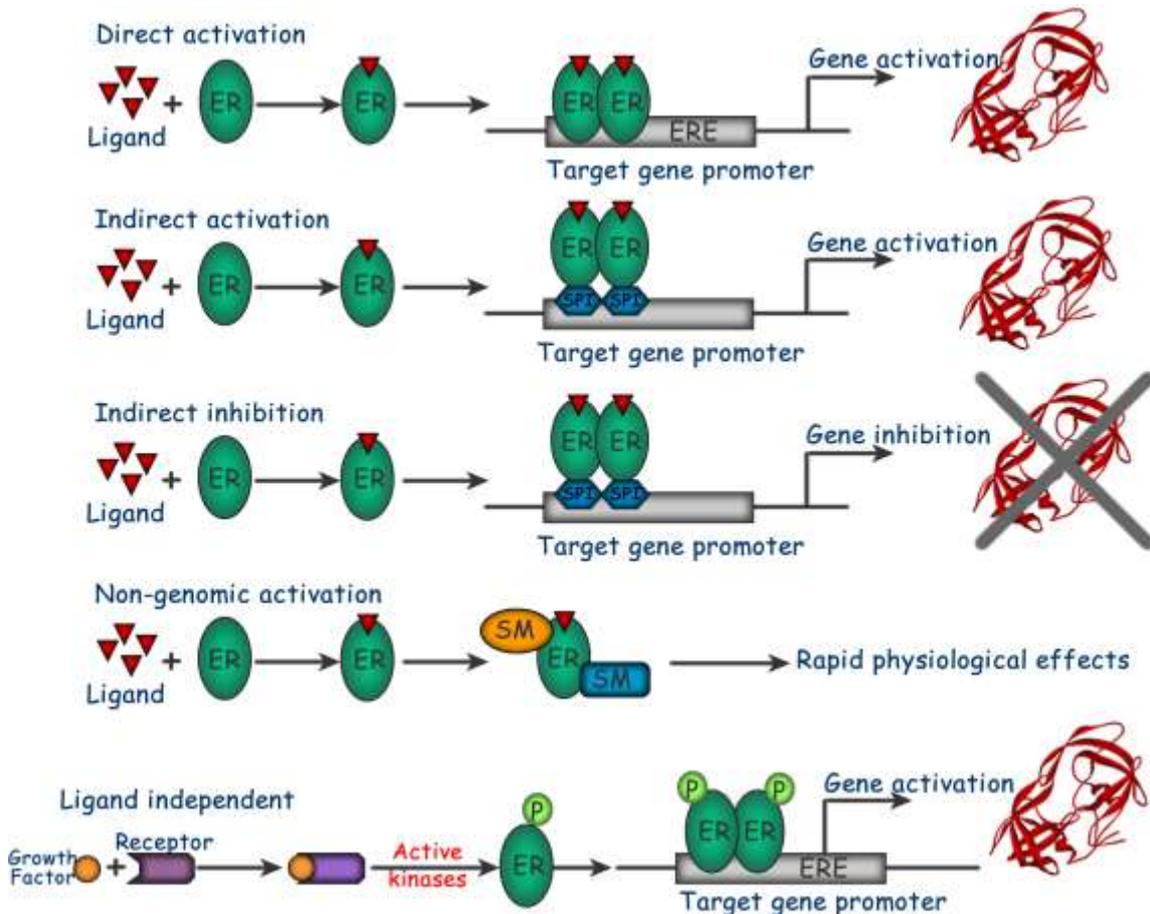


Figura 2. Mecanismos de activación del receptor de estrógenos (ER).

Existen otros factores con una gran importancia en los mecanismos de activación de los ERs y sirven como corre reguladores (cofactores) reclutados por los ERs para activar (coactivador) o para inhibir (correpresor) la actividad transcripcional de los ERs. Estos corre reguladores pueden presentarse en forma de acetilasas/deacetilasas, quinasas/fosfatasas y metilasas/demetilasas, modificando la afinidad de los ERs por los EREs. Hay que poner énfasis en este aspecto, ya que el pool de corre reguladores puede diferir de acuerdo con el tipo de tejido, siendo este hecho la explicación propuesta para entender los efectos diferenciales de tejido de los estrógenos y los moduladores selectivos de los

receptores de estrógenos (MSRE), entre ellos destacan el tamoxifeno (MSRE de primera generación) que posee una actividad agonista en algunos tejidos y antagonista en otros, y el fulvestrant como componente esteroideo que posee acción totalmente antagonista.

Sin embargo, no sólo la existencia de un pool diferente de correguladores según tejido que ayudan a modular los diferentes efectos del E2. La distribución de ER α y ER β no es homogénea entre tejidos, y en los que ambos coexisten, sus efectos parecen ser contrarios. Así, en el útero, la glándula mamaria y el sistema inmune, ER α promueve la proliferación celular mientras que ER β tiene funciones proapoptóticas y promueve la diferenciación celular^{15, 35}.

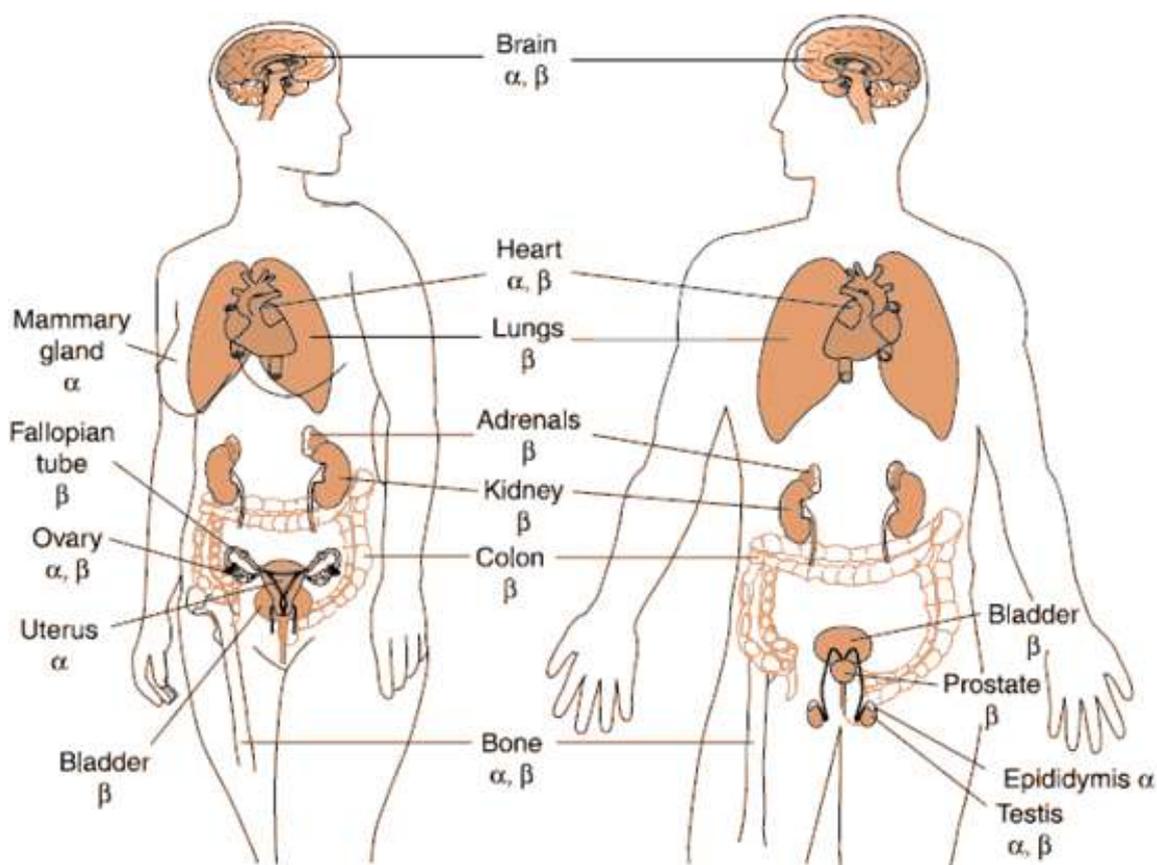


Figura 3. Representación esquemática de la distribución tisular, en ambos sexos, de los receptores de estrógenos (α y β).

1.3. El cáncer de mama y los estrógenos

1.3.1. Glándula mamaria y estrógenos

El desarrollo y la fisiología de la glándula mamaria se encuentran bajo la influencia de los estrógenos, sufriendo cambios importantes durante la vida de la mujer debido a un papel activo de los estrógenos en estos cambios. Durante la pubertad las glándulas sufren un incremento de la división celular y en la vida de una mujer adulta existen ciclos de proliferación/involución de acuerdo al ciclo menstrual³⁶. El papel de los estrógenos en la proliferación del epitelio mamario permanece confuso, debido a que hay autores que han observado como los marcadores de proliferación en las células epiteliales del ducto no colocalizan con el ER α ³⁷.

Durante muchos años se ha creído que los estrógenos inducen la proliferación a través de efectos indirectos, como factores de crecimiento del estroma mamario. Sin embargo, estudios recientes sugieren que cuando el ER α se activa mediante estrógenos hay una rápida pérdida del ER α al principio de la fase G1 del ciclo celular. Este hecho explicaría la no-localización del ER α con los marcadores típicos de proliferación como la ciclina A o el PCNA, típicos de la fase S del ciclo¹⁵.

Las células ductales de la glándula mamaria son un buen ejemplo de células en donde ER α y ER β contrarrestan sus efectos en la proliferación estimulada por estrógenos. Quedando así la respuesta proliferativa del E2 determinada por la ratio ER α /ER β . Las funciones de ER β en la glándula mamaria están relacionadas probablemente con los efectos antiproliferativos así como las funciones pro-diferenciación³⁸. En estudios con la línea celular MCF-7, una línea celular que expresa mayoritariamente ER α frente a ER β , se muestra que el E2 incrementa la proliferación, y cuando ER β es artificialmente introducido dentro de estas células, la proliferación inducida por el E2 es inhibida³⁹.

1.3.2. Inducción del cáncer de mama mediante los estrógenos

Los estrógenos son el principal factor de riesgo para la iniciación y progresión del cáncer de mama, afectando al crecimiento de las células del epitelio mamario, siendo así estas células más susceptibles a cometer errores de replicación en el ADN. Otro punto de vista es que los estrógenos producen especies oxidantes en su metabolismo que pueden formar aductos con el ADN así como generar especies reactivas de oxígeno (ROS) a través de ciclos redox^{40, 41}.

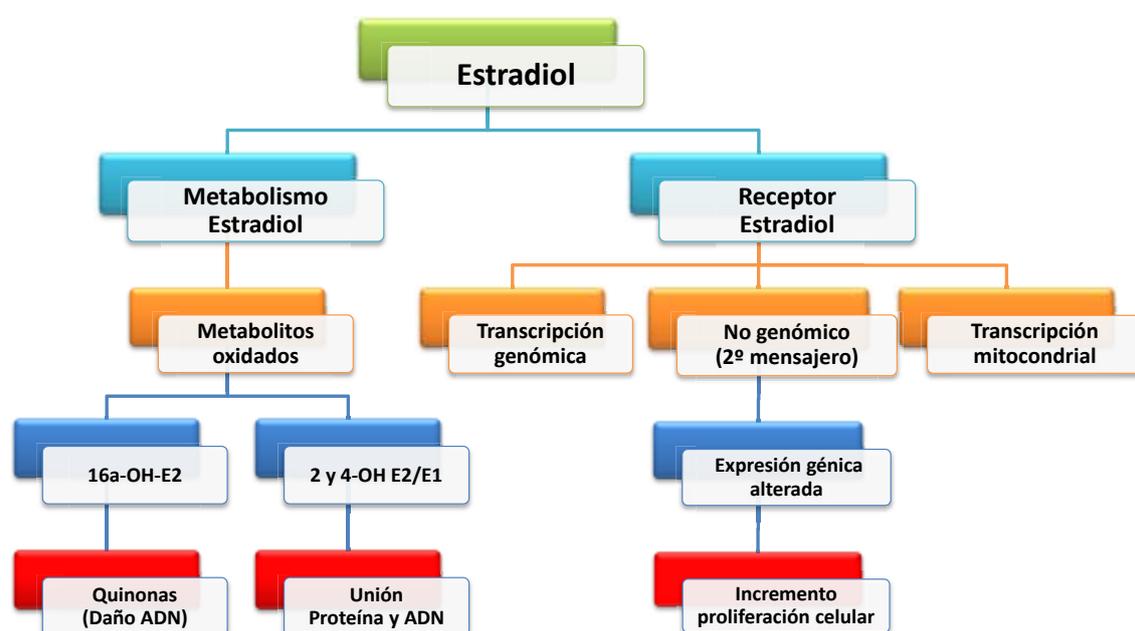


Figura 4. Esquema representativo de las causas de la carcinogénesis provocada por el estradiol. E2: 17β-estradiol. 16α-OH-E2: 16α-hidroxiestradiol. 2-OH-E2: 2-hidroxiestradiol. 4-OH-E2: 4-hidroxiestradiol. 2-OH-E1: 2-hidroxiestróna. 4-OH-E1: 4-hidroxiestróna.

En los últimos años, se han encontrado en el ADN mitocondrial (ADNmt) elementos de respuesta a estrógenos (EREs), sugiriendo así que el efecto carcinogénico de los estrógenos podría estar mediado por la acción de los estrógenos a través del receptor en la mitocondria^{30, 42-46}.

La mayoría de los tumores ER-positivos contienen ambos receptores (ERα y ERβ), aunque algunos tumores solo tengan ERβ y puedan presentar respuestas

y comportamientos clínicos diferentes. En contraste con ER α , hay estudios que sugieren que la expresión de ER β va disminuyendo durante la tumorigenesis de mama⁴⁷⁻⁵⁰. Sin embargo, el mecanismo por el cual ER β disminuye no está del todo esclarecido, pero parece ser que hay cambios epigenéticos que podrían jugar un papel importante⁵¹. Esta regulación a la baja del ER β en cáncer de mama indica sin duda un papel del ER β como supresor tumoral^{14, 52}. La caracterización del papel de ER β en tumores ER α - está poco explorado, pero existen datos que sugieren que el papel de ER β podría diferir dependiendo de si se coexpresa con ER α o se expresa solo^{48, 52, 53}. Clásicamente, los tumores ER α - se han considerado resistentes a tratamientos hormonales ya que obvian el receptor de estrógenos para mediar la respuesta estrogénica. Sin embargo, hay que tener en cuenta que se ha observado que aproximadamente el 50% de este subgrupo expresa ER β ⁵⁴.

Dotación ER	Resultado Clínico
ER α +/ER β +	Correlacionada con ER β + la mayor supervivencia global y libre de enfermedad
ER α +/ER β -	Peor prognosis
ER α -/ER β +	Pronóstico menos favorable, ER β parece correlacionar con la proliferación celular

Tabla 1. Relación entre la respuesta clínica y la ratio ER α /ER β con la respuesta a la terapia endocrina en el cáncer de mama.

Se han publicado varios estudios que muestran que un tumor que coexpresa ER α y ER β tiene mejor prognosis y un buen resultado clínico con terapia adyuvante. Estudios adicionales también han considerado que la adición del ER β al diagnóstico clínico junto al ER α como marcador tumoral sería muy beneficioso^{48, 53-56}. A la inversa, encontramos unos pocos estudios que se han centrado en la expresión de ER β en tumores ER α - y han considerado al ER β como marcador de una mala prognosis y resistencia endocrina^{48, 52-54, 57-59}.

Un incremento de la ratio ER α /ER β en el tejido mamario o prostático tumoral respecto a tejido no tumoral es un factor importante para el desarrollo del fenotipo canceroso^{15, 38, 60-62}. Por el contrario una disminución en esta ratio, debido a un aumento de ER β , es indicativa de una mala prognosis y problemas con el tratamiento con antiestrógenos^{63, 64}. Esta evidencia podría también explicar la diferente acción de los estrógenos y los fitoestrógenos en líneas celulares de cáncer de mama y próstata a través de la variación en los niveles de ER α y de ER β ⁶⁵.

Otra diferencia entre ER α y ER β es la activación por los estrógenos, ya que el E2 estimula ambos receptores, aunque esta estimulación es 10 veces más selectiva por ER α que por ER β ^{66, 67}. Además, varios autores han demostrado que el E2 también regula la expresión de ER α y ER β , causando una disminución en los niveles de ER α y un aumento en los niveles de ER β en líneas celulares de cáncer de mama positivas para ER α como las MCF-7 y las T47D^{63, 64}. En adición a este hecho importante, se sabe que el estrés oxidativo también regula los niveles de ER α y ER β , y de la misma manera, causa una regulación a la baja de ER α y una regulación a la alza de ER β ⁶⁸.

1.4. Estrógenos, mitocondria y estrés oxidativo

1.4.1. Mitocondria

Las mitocondrias son los orgánulos intracelulares responsables del suministro de ATP (generan más del 90% de los requerimientos energéticos de la célula) aunque también son la principal fuente intracelular y diana de las especies reactivas de oxígeno (ROS). La mitocondria asimismo participa en la homeostasis del calcio controlando varios canales iónicos y transportadores, participando también en la biosíntesis del grupo hemo y de los estrógenos. Además, la mitocondria juega un papel muy importante en la regulación de la proliferación celular y la apoptosis³⁰.

El papel principal de las mitocondrias es la generación del ATP a través de un proceso complejo controlado por la degradación de sustrato y el consumo de oxígeno conocido como fosforilación oxidativa⁶⁹. Brevemente, la oxidación de los nutrientes reducidos, como los carbohidratos, lípidos y proteínas, a través del metabolismo celular, ceden electrones a moléculas transportadoras de hidrógeno para dar su forma reducida (NADH y FADH₂). Estos cofactores reducidos donan los electrones a una serie de complejos proteicos de la cadena de transporte electrónico embebidos dentro de la membrana mitocondrial interna. Estos complejos (complejos I, III y IV) usan la energía liberada del transporte de electrones para activar el bombeo de protones a través de la membrana mitocondrial interna, generando así un gradiente electroquímico. El destino final de estos electrones es la reducción del oxígeno molecular en el complejo IV para dar una molécula de agua, mientras que la energía, conservada como gradiente protónico, es usada por la F₀F₁ ATP sintasa (o complejo V) para fosforilar ADP retornando los protones a la matriz mitocondrial⁷⁰.

Aunque la mitocondria tiene genoma propio, la mayoría de las proteínas y enzimas que residen en la membrana mitocondrial son productos de genes nucleares. Las células de mamíferos contienen desde cientos a miles de mitocondrias, y cada mitocondria posee entre 2 y 10 copias de ADNmt⁷¹. El ADNmt consiste en una doble cadena de 16.500 pares de bases que codifica 13 polipéptidos, 22 ARN de transferencia (ARNt) y 2 ARN ribosómicos (ARNr). Los 13 polipéptidos codificados y sintetizados en la mitocondria son 7 subunidades del complejo I NADH deshidrogenasa (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 y ND6), 3 subunidades del complejo IV citocromo c oxidasa (COI, COII y COIII), 2 subunidades del complejo V F₀F₁ATPasa (ATPasa6 y ATPasa8) y el citocromo b⁷². Una región no codificante, conocida como *D-loop* contiene las secuencias reguladoras de la transcripción y la iniciación de la replicación⁷³. El ADNmt

primero se transcribe como un solo y largo transcrito precursor del que derivaran los 13 ARNm, 22 ARNt y 2 ARNr⁷³.

	Complejo I	Complejo II	Complejo III	Complejo IV	Complejo V
ADNmt	7	0	1	3	2
ADNn	39	4	9	10	10

Tabla 2. Subunidades de la cadena respiratoria codificadas por el genoma nuclear y mitocondrial.

El ensamblaje y la funcionalidad de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial en las células de mamíferos requieren de la expresión y la interacción coordinada entre los productos génicos de los genomas mitocondrial y nuclear⁷³. Así, la correcta biogénesis mitocondrial depende de la síntesis coordinada espaciotemporal y la importación de unas 1000 proteínas codificadas por el genoma nuclear, a la mitocondria. Algunas de estas mil proteínas tienen que ensamblarse con proteínas codificadas por el genoma mitocondrial y con las membranas de fosfolípidos recién sintetizadas⁷⁴.

1.4.2. Estrógenos y biogénesis mitocondrial

La transcripción y la replicación del ADNmt están dirigidas por una proteína codificada por el ADN nuclear, el factor de transcripción mitocondrial A (TFAM), el cual se une a una región promotora en las dos cadenas del ADNmt⁷⁴. Además, existen dos proteínas que interactúan con la ARN polimerasa mitocondrial de mamíferos y el TFAM, TFB1M y TFB2M, que ayudan a la transcripción del ADNmt⁷⁵. Los factores de respiración nuclear 1 y 2 (NRF1 y NRF2) juegan un papel importante en la regulación de la función respiratoria mitocondrial, controlando la transcripción de las subunidades de la cadena respiratoria mitocondrial⁷⁶, así como activando la expresión de factores involucrados en la iniciación de la transcripción del genoma mitocondrial, como TFAM y TFB1m y TFB2M⁷⁵.

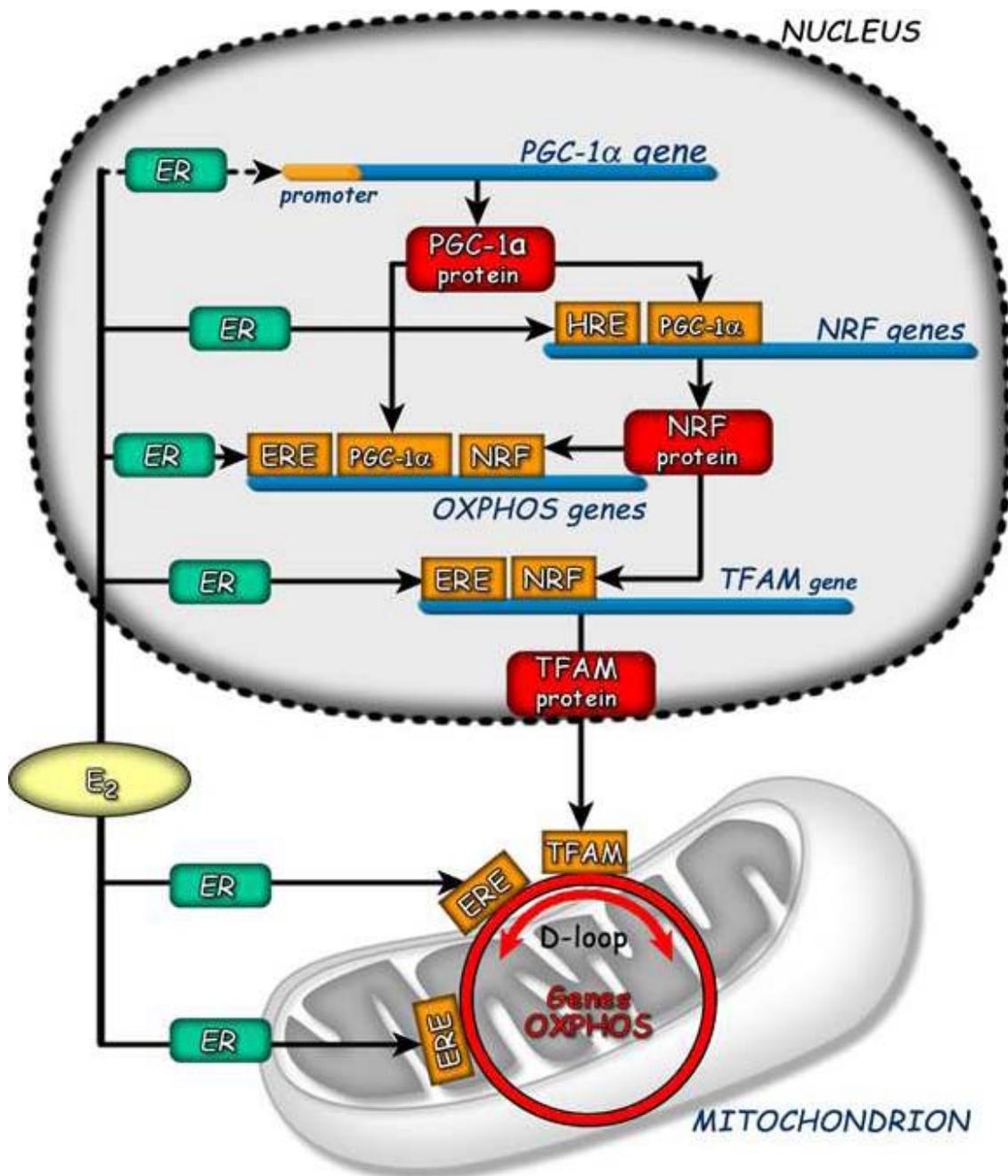


Figura 5. Representación esquemática de la regulación de la biogénesis mitocondrial. Coordinación de la transcripción de los genes nucleares y mitocondriales que codifican para el sistema OXPHOS, mediante el 17β-estradiol (E_2).

El promotor de TFAM contiene regiones que reconocen a NRF1 y/o NRF2, permitiendo así la coordinación entre núcleo y mitocondria durante la

biogénesis mitocondrial. Sin embargo, hay una serie de genes que no parece que sean regulados por los NRFs. Por ejemplo, las proteínas de transporte de ácidos grasos al interior de la mitocondria y los genes que codifican para las enzimas de oxidación de estos ácidos grasos parecen ser regulados por el receptor alfa activado por proliferadores (PPAR α)⁷⁴. El coactivador 1 del receptor gamma activado por proliferadores (PGC1 α) carece de actividad para unirse al ADN pero interactúa con otros factores y coactiva numerosos factores de transcripción incluyendo a los NRFs sobre el promotor del TFAM. La biogénesis y respiración mitocondrial están estimuladas por el PGC1 α a través de una potente inducción de la expresión de NRF1 y NRF2⁷⁷. Además de con los NRFs, el PGC1 α también interactúa con otros factores de transcripción como PPARs, receptor de hormonas tiroideas (THR), de glucocorticoides (GHR) y estrógenos (ER)⁷⁴.

Los estrógenos regulan la biogénesis y función mitocondrial a través de la relación entre núcleo y mitocondria para controlar las señales inducidas por estrógenos involucradas en la proliferación, apoptosis y diferenciación celular⁷⁸. E2 estimula la expresión de TFAM, y posiblemente de TFB1M y TFB2M a través de la activación de NRF1 y NRF2, regulando así la biogénesis mitocondrial. Los dos subtipos de receptores estrogénicos ER α y ER β se han detectado en las mitocondrias de diversas líneas celulares humanas, incluyendo la línea de cáncer de mama MCF-7^{43,44}. Además, se ha encontrado que E2 aumenta significativamente las cantidades de ER α y ER β , de una manera tiempo y dosis dependiente, y que esto se acompaña de un incremento significativo de los niveles de transcritos de los genes codificados por el ADNmt⁴³.

1.4.3. Estrógenos y estrés oxidativo

La producción de ROS mitocondriales se encuentra bajo la influencia de los estrógenos, así como las consecuencias de esta producción en el control que la mitocondria ejerce sobre la proliferación celular y la apoptosis, pudiendo

explicar, al menos en parte, la acción de los estrógenos sobre el desarrollo del cáncer^{30, 42}.

La mitocondria es la principal fuente de producción de ROS en las células de mamíferos. La respiración aeróbica involucra la completa reducción del oxígeno en agua, catalizada por el complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial, pero bajo condiciones fisiológicas normales alrededor de un 1% de los electrones escapan de la cadena respiratoria durante su transferencia, formando un anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el cual a su vez es el precursor de otros ROS^{79, 80}. El superóxido es rápidamente convertido a agua oxigenada (H_2O_2), espontánea o enzimológicamente mediante la superóxido dismutasa (SOD).

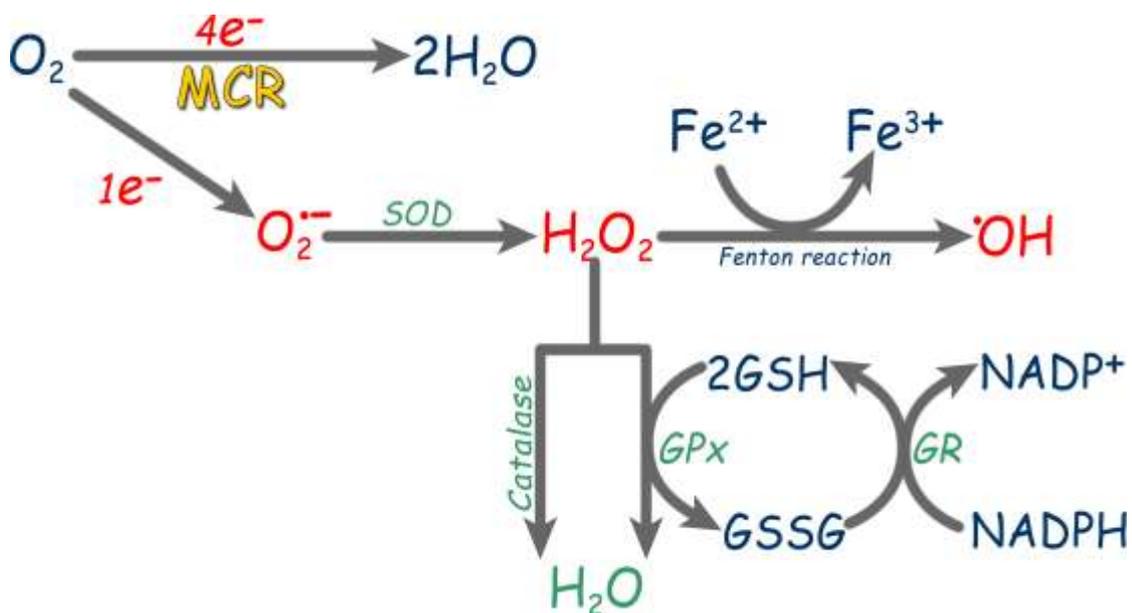


Figura 6. Representación de los mecanismos de detoxificación de las especies radicales de oxígeno (ROS).

El agua oxigenada, aunque no es un radical libre de oxígeno propiamente dicho, puede conducir a la producción, en presencia de hierro ferroso mediante una reacción de Fenton, a una especie altamente reactiva como es el radical hidroxilo ($\cdot OH$). La producción de ROS puede ser significativamente aumentada con un incremento en el potencial de membrana que ocurre con un aumento de

los combustibles (elevada producción de NADH) o con un problema funcional en los complejos I o III de la cadena respiratoria, mientras que la producción de ROS disminuye, lógicamente, cuando la demanda de energía aumenta^{79, 81, 82}.

Las ROS pueden disiparse mediante la acción de diferentes enzimas, como la SOD, la glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión reductasa (GRd). La SOD transforma el $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 , la cual es detoxificada mediante la acción de dos enzimas, catalasa y glutatión peroxidasa dando como rendimiento H_2O . La GPx utiliza glutatión reducido (GSH) como aceptor de electrones para eliminar el H_2O_2 . El GSH es regenerado desde glutatión oxidado (GSSG) mediante la acción de la GRd, que a su vez utiliza el poder reductor del NADPH como equivalente de reducción.

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^{79, 80}.

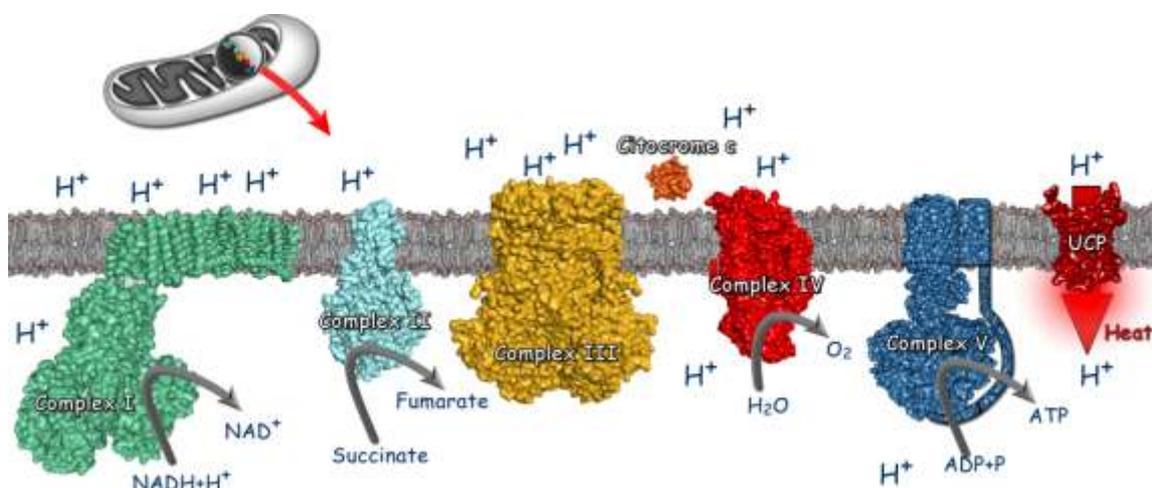


Figura 7. Representación esquemática y estructura tridimensional del sistema de fosforilación oxidativa y la proteína desacoplante (UCP) de la membrana mitocondrial interna.

Otro mecanismo a incluir dentro de los sistemas que protegen contra el daño oxidativo son las proteínas desacoplantes o UCPs^{83, 84}. Las UCPs son una familia de proteínas integrales de la membrana mitocondrial interna que tienen

como función 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^{83, 84}.

Cuando la producción celular de ROS sobrepasa la capacidad de las defensas antioxidantes, los radicales libres pueden escapar y ejercer sus efectos deletéreos. Esta situación se conoce como estrés oxidativo, y se supone que es la responsable de la acumulación de daños celulares durante la vida de un individuo, jugando así un papel en la etiología y en el curso de numerosas patologías y en el proceso de envejecimiento^{82, 83}. Las macromoléculas del interior de la mitocondria son más susceptibles al daño inducido por las ROS debido a su proximidad física. Así pues, el ADNmt, el cual no posee histonas para protegerse y presenta unos sistemas de reparación del ADN bastante limitados, es especialmente vulnerable al daño oxidativo. Hay que tener en cuenta que un daño ejercido por las ROS sobre el ADNmt puede llevar a un aumento en el grado de disfunción mitocondrial, lo que a su vez aumentaría la producción de ROS, llevando a la mitocondria a un círculo vicioso de amplificación de la producción de ROS⁷⁹.

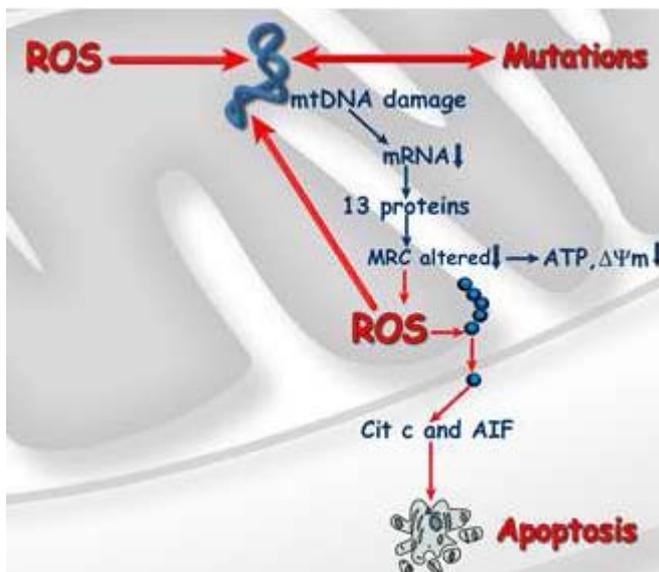


Figura 8. Esquema representativo de la teoría del ciclo vicioso en la producción de radicales libres en la mitocondrias y sus principales repercusiones a nivel celular.

Sin embargo, las ROS no tiene únicamente efectos negativos o dañinos para las moléculas. Debido a la rápida velocidad de producción, corta vida y alta difusión de las ROS, encajan perfectamente dentro de las características de una molécula que ejerce de segundo mensajero. De hecho, aunque las ROS causen daño, se ha postulado que bajos niveles de ROS participan en procesos de señalización celular, inflamación, apoptosis y fagocitosis⁸⁵. Está bien establecido mediante varios estudios que las ROS actúan como segundos mensajeros en vías de transducción de señales, incluyendo las proteínas quinasas activadas por estrés (SAPK) con participantes tales como p38MAPK o la quinasa del extremo N-terminal de c-jun (JNK) o el p53 a través de las vías PI3K/PKB y NF- κ B^{80, 86-89}. Así pues, en este complicado contexto, niveles de ROS bajos estimulan la proliferación celular, mientras que si los niveles son altos se induce la apoptosis. En resumen, muchas vías de señalización celular son sensibles a los niveles de ROS y la respuesta celular final depende de la interpretación que haga la célula, la cual es el resultado del equilibrio entre las señales apoptóticas y las proliferativas o de supervivencia⁸³.

Los estrógenos pueden controlar los niveles celulares de ROS, controlando la biogénesis mitocondrial, la cual está inducida por vías de señalización relacionadas con la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis³⁰. Además, la producción mitocondrial de ROS puede ser regulada por los estrógenos a través de la unión de los ER a los genomas nuclear y mitocondrial^{90, 91}.

1.5. Dinámica mitocondrial

En el pasado las mitocondrias fueron consideradas orgánulos con una morfología estática, pero hoy en día sabemos que la mitocondria está constantemente alterando su morfología⁹², un fenómeno denominado dinámica mitocondrial⁹³. Estas alteraciones involucran la unión (fusión) y la división (fisión) de las mitocondrias preexistentes⁹⁴. Los mecanismos de fusión y fisión son

esenciales para la dinámica mitocondrial, afectando a la biogénesis y actividad de las mitocondrias. Frente a una situación de estrés, el recambio mitocondria, puede acelerarse mediante un proceso autofágico específico llamado mitofagia⁹⁵⁻⁹⁷.

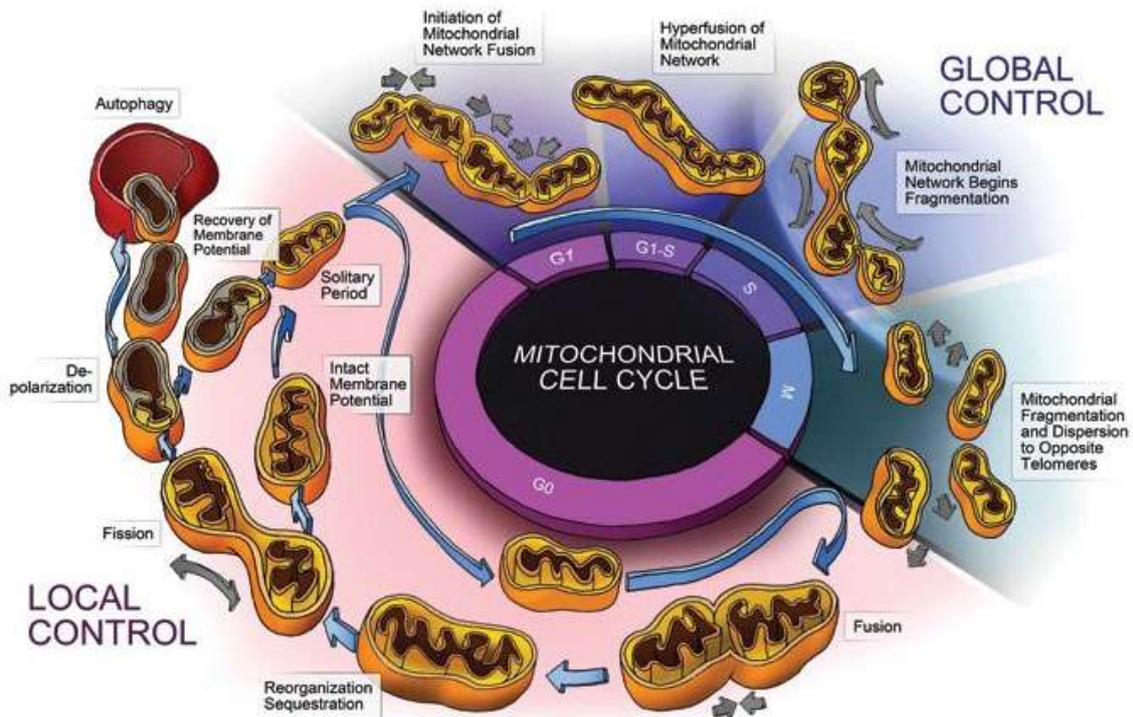


Figura 9. Representación esquemática del ciclo mitocondrial y los principales procesos que lo regulan. Adaptado de Hyde B, *et al.* 2010

Desde un punto de vista fisiológico, la fisión es necesaria para la correcta redistribución del ADNmt durante la división celular⁹⁸ y para el transporte de las mitocondrias a las células hijas durante la mitosis y la meiosis⁹⁹. En contraste, la fusión es un mecanismo por el cual las membranas de las mitocondrias vecinas se fusionan. Este proceso ocurre como medida para recuperar la actividad de las membranas dañadas/despolarizadas y además así se asegura una mezcla apropiada de metabolitos y moléculas de ADNmt^{92, 93, 100}.

Bajo condiciones normales, la fusión y fisión mitocondrial ocurren de forma equilibrada manteniendo una morfología tubular de las mitocondrias relativamente constante¹⁰¹. Sin embargo, una perturbación del balance

fusión/fisión causa deformaciones en la red mitocondrial, deformaciones que se han encontrado en numerosas enfermedades humanas¹⁰²⁻¹⁰⁴.

En el cáncer, una regulación a la alta de la mitofagia puede proveer a las células tumorales de muchas ventajas relacionadas con la supervivencia¹⁰⁴. De hecho se ha mostrado como ratones con una autofagia deficiente son más propensos al desarrollo de tumores, así como más resistentes a los agentes quimioterapéuticos^{105, 106}. De hecho, y desde un punto de vista fisiológico, el aumento de la mitofagia previene a las células cancerosas de una acumulación de mitocondrias disfuncionales¹⁰⁷.

2. Objetivos y Planteamiento Experimental

La presente 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 primero, "Papel del estrés oxidativo en la respuesta de la célula cancerosa al tratamiento antitumoral y su modulación por hormonas sexuales y elementos pro/antioxidantes (PI06-0266)", tenía entre sus objetivos el estudio de la acción de las hormonas sexuales en la modulación del estrés oxidativo en las células cancerosas de mama y próstata. El segundo proyecto, "Importancia de la ratio ER α /ER β 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 alfa y beta (ER α y ER β , respectivamente) en la acción del 17 β -estradiol (E2) en la función mitocondrial y el estrés oxidativo en líneas de cáncer de mama.

Los estrógenos son uno de los principales factores de riesgo del cáncer de mama, tanto en la iniciación como en la progresión^{108, 109}. Aunque existe una fuerte controversia sobre su efecto sobre el estrés oxidativo, mientras que se ha demostrado que los estrógenos actúan como antioxidantes en muchos tejidos¹¹⁰⁻¹¹², en cánceres de tejidos dependientes de estrógenos actúan como oxidantes^{44, 113-119}. En una primera aproximación nos planteamos estudiar los efectos del E2 a concentraciones fisiológicas (1 nM) sobre la producción de ROS, potencial de membrana y daño oxidativo de las principales biomoléculas, así como establecer el papel de las proteínas desacoplantes (UCPs) y las enzimas antioxidantes, en líneas de cáncer de mama ER positivas y ER negativas. Así, se estudió en las líneas de cáncer de mama MCF-7 (ER+) y MDA-MB-231 (ER-) y tumores mamarios (ER+ y ER-), la producción de radicales libres mediante citometría de flujo y microscopia confocal (DCFDA), potencial de membrana por citometría de flujo y microscopia confocal (TMRM), daño oxidativo en proteínas (totales y mitocondriales) y ADN (nuclear y mitocondrial), la activación de vías de señalización sensibles al estrés oxidativo (SAPK), niveles de enzimas

antioxidantes (CAT y Mn-SOD), función mitocondrial (actividad COX y ATPasa) y los niveles y actividad de las UCPs. Los resultados obtenidos así como su interpretación se recogen en el **Manuscrito I**.

Estudios epidemiológicos y experimentales sugieren que los estrógenos tienen efectos cancerígenos y quimiopreventivos en el epitelio prostático^{120, 121}. Los estrógenos actúan a través de dos receptores, el ER α y el ER β , siendo a menudo este último antagonista del primero¹²². Los estrógenos vía ER α estimulan el desarrollo de la próstata, mientras que vía ER β inhiben la proliferación y promueven su diferenciación¹²². Nos planteamos el estudio de los efectos del E2 sobre el estrés oxidativo y la expresión de las UCPs y enzimas antioxidantes en varias líneas celulares de cáncer de próstata con diferente ratio ER α /ER β . Se determinaron los efectos proliferativos del E2 comparándolos con los de la testosterona (T) en las líneas VCaP (con una ratio ER α /ER β elevada), PC3 (ratio ER α /ER β media) y Du145 (sólo ER β). Además, se caracterizó el daño oxidativo en proteínas (contenido en carbonilos) y lípidos (aductos de 4-HNE), así como los niveles, tanto en mRNA como en proteína, de enzimas antioxidantes y UCPs. Igualmente se estudió el potencial de membrana y los niveles de radicales libres por citometría de flujo, así como la producción de radicales libres mediante fluorimetría inhibiendo los receptores estrogénicos con MPP (antagonista de ER α) y R-R'-THC (antagonista de ER β). Los resultados obtenidos y sus conclusiones se muestran en el **Manuscrito II**.

Al observar que los dos subtipos de receptores estrogénicos tenían efectos opuestos sobre el estrés oxidativo en cáncer de próstata, nos planteamos estudiar si ocurría lo mismo en el cáncer de mama. Existen varios estudios que otorgan un papel principal a ER α en el estrés oxidativo inducido por el E2 en la patogénesis del cáncer de mama^{114, 123, 124}. Sin embargo, el papel de ER β no está del todo esclarecido, pudiendo ejercer en algunas ocasiones efectos opuestos a los del ER α ^{38, 122}. Nos propusimos investigar los efectos del E2 sobre los parámetros del estrés oxidativo y el papel de las UCPs en este

proceso en líneas de cáncer de mama con diferente ratio ER α /ER β . Para ello se estudió en las líneas de cáncer de mama MCF-7 (positivas para ER α y ER β , con predominancia de ER α), T47D (positivas para ER α y ER β , con predominancia de ER β) y MDA-MB-231 (ER α negativa y ER β positiva), las actividades de las principales enzimas antioxidantes (CAT, SOD, GPx y GRd), el daño oxidativo en proteínas y lípidos, los niveles de ROS y el potencial de membrana, la proliferación celular y los niveles de mRNA de enzimas antioxidantes y UCPs, así como los niveles de proteínas de las UCPs (UCP2 y UCP5). Los resultados y conclusiones obtenidos se detallan en el **Manuscrito III**.

Los resultados obtenidos del manuscrito III, mostraron que los estrógenos provocan estrés oxidativo en líneas de cáncer de mama en las que predomina ER α debido, en parte, a una disminución de las defensas antioxidantes. No obstante, no se puede descartar que el estrés oxidativo inducido por los estrógenos pueda deberse también al efecto de los estrógenos sobre la función mitocondrial. Se ha descrito que la biogénesis mitocondrial, así como la función mitocondrial, se encuentran bajo la influencia de los estrógenos¹²⁵, controlando la expresión de genes nucleares y mitocondriales^{78, 126, 127}. Por esta razón, nos planteamos analizar si la influencia del E2 sobre la biogénesis y función mitocondrial dependía de la ratio ER α /ER β . Para ello utilizamos las líneas celulares MCF-7 (ratio ER α /ER β elevada) y T47D (ratio ER α /ER β media) en el estudio de la proliferación y 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 la expresión de los principales genes involucrados en la biogénesis mitocondrial (RT-PCR) y los niveles de proteína de algunos marcadores del estatus mitocondrial (TFAM, ATPasa y COXIV). Además se determinaron las actividades enzimáticas más comunes en el análisis de la función mitocondrial Citrato Sintasa (CS), Citocromo C Oxidasa (COX) y ATPasa. Finalmente se observó la morfología de la red mitocondrial (mediante microscopia confocal con

MitotrackerGreen). Los resultados obtenidos y sus conclusiones se muestran en el **Manuscrito IV**.

Recientemente se ha demostrado que las mitocondrias son capaces de alterar continuamente su morfología en respuesta a diversas señales celulares, proceso que se conoce como “dinámica mitocondrial”. Estas alteraciones implican tanto la división (fisión) como la unión de mitocondrias (fusión). Fisión y fusión son dos procesos opuestos que controlan la población mitocondrial en la célula, tanto en número, como en tamaño, forma, función y distribución^{94,97,98,128,129}. Nuestros estudios confirmaron que E2 activaba la biogénesis mitocondrial en todas las líneas celulares estudiadas, no obstante la función mitocondrial sufría cambios dependientes de la dotación estrogénica que presentaban las líneas celulares. Por este motivo nos planteamos estudiar si la dinámica mitocondrial es susceptible de verse modificada por la acción del E2 en función de la abundancia de receptores estrogénicos. Así pues, se estudió en líneas celulares con distinta dotación de receptores estrogénicos (MCF-7, T47D, MDA-MB-231 y en una línea T47D sobreexpresada con ER β y modulable mediante la acción de una tetraciclina) los efectos del E2 a través de ER α y/o ER β sobre la dinámica mitocondrial (niveles de mensajero de mfn1, mfn2, opa1, drp1 y fis1) así como la mitofagia de las mitocondrias dañadas (mediante microscopía confocal con Mitotracker Green y LysoTracker Red). Además se estudiaron los niveles de proteína del sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS), el factor A de transcripción mitocondrial (TFAM) y el coactivador 1 α del PPAR γ (PGC1 α) y las actividades de enzimas mitocondriales (CS, COX y ATPasa), el análisis de la biomasa mitocondrial determinando la cantidad de cardiolipina (NAO) y del DNA mitocondrial (RT-PCR). Los resultados obtenidos así como su interpretación se recogen en los **Manuscritos V y VI**.

Finalmente nos planteamos si los resultados obtenidos en las líneas celulares podrían tener relevancia en la fisiología y evolución de tumores de mama, y su posible aplicación al diagnóstico y el tratamiento de este tipo de

tumores. Así se estudio en carcinomas ductales infiltrantes con diferente ratio ER α /ER β el estrés oxidativo, la mitocondria y las vías de señalización, centrándonos en esos factores que pueden proporcionar nuevos indicios para entender mejor esta enfermedad, como son las UCPs y/o la sirtuina³, proteínas clave en la disfunción mitocondrial y el status de estrés oxidativo. Así pues, previa caracterización histoquímica y anatomopatológica de los tumores, se analizaron los niveles de daño oxidativo y las principales enzimas antioxidantes. Mediante Western blot, se analizaron la activación de vías de señalización por estrés (AKT y SAPK), así como el estado de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, las UCPs (isoformas 2 y 5) y la sirtuina³. Los resultados y conclusiones obtenidos se detallan en el **Manuscrito VII**.

Los trabajos presentados en esta tesis se han llevado a cabo bajo la dirección de la Dra. M^a del Pilar Roca Salom y el Dr. Jordi Oliver Oliver del Grupo Multidisciplinar de Oncología Traslacional. Durante el desarrollo de esta tesis, el doctorando obtuvo una beca predoctoral de personal investigador de la *Conselleria d'Economia, Hisenda i Innovació del Govern de les Illes Balears* (convocatoria de 2008) que ha sido seleccionada en el marco de un programa operativo cofinanciado por el Fondo Social Europeo (FSE). Además, el doctorando obtuvo una ayuda para una estancia de tres meses en el *Center for Nuclear Receptors and Cell Signaling (CNRCS, Houston, Texas, USA)* bajo la dirección del Dr. Jan-Åke Gustafsson en el 2010 de la misma Conselleria. Igualmente, esta tesis ha sido posible gracias a los dos proyectos de investigación PI06-0266 concedido en el 2006 y PS09-01637 concedido en el 2009 financiados por el Gobierno Español. Además se ha contado con la financiación del Ciber Fisiopatología Obesidad y Nutrición (CB06/03), del Instituto de Salud Carlos III. Además al Grupo Multidisciplinar de Oncología Traslacional le han sido otorgadas 6 *Accions especials de Recerca, Desenvolupament Tecnològic i Innovació del Govern de les Illes Balears* otorgadas al grupo de investigación entre los años 2008 y 2012. Para poder

llevar a cabo los experimentos realizados en tumores de mama se ha contado con la ayuda del hospital Son Llàtzer y del servicio de anatomía patológica y del biobanco de tumores del mismo hospital.

3. Resultados y Discusión / Results and Discussion

MANUSCRIPT I

Estrogen down-regulates uncoupling proteins and increases oxidative stress in breast cancer

Sastre-Serra J, Valle A, Company MM, Garau I, Oliver J, Roca P.
Free Radic Biol Med (2010) 48(4):506-12

MANUSCRIPT II

17 β -Estradiol regulates oxidative stress in prostate cancer cell lines according to ERalpha/ERbeta ratio

Miró AM, Sastre-Serra J, Pons DG, Valle A, Roca P, Oliver J.
J Steroid Biochem Mol Biol (2011) 123(3-5):133-9

MANUSCRIPT III

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

Nadal-Serrano M, Sastre-Serra J, Pons DG, Miró AM, Oliver J, Roca P.
J Cell Biochem (2012) May 21

MANUSCRIPT IV

The effects of 17 β -estradiol on mitochondrial biogenesis and function in breast cancer cell lines are dependent on the ER α /ER β ratio

Sastre-Serra J, Nadal-Serrano M, Pons DG, Valle A, Oliver J, Roca P.
Cell Physiol Biochem (2012) 29(1-2):261-8

MANUSCRIPT V

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

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

MANUSCRIPT VI

**ER α /ER β ratio affects mitochondrial dynamics in breast cancer cell lines.
Importance of Fis1 as key regulator in fission process**

Sastre-Serra J, Nadal-Serrano M, Pons DG, Warner M, Gustafsson JA, Roca P, Oliver J

Manuscript

MANUSCRIPT VII

The oxidative stress in breast tumors of postmenopausal women is ER α /ER β dependent. The importance of uncoupling proteins and SIRT3

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

Manuscript

4. Recapitulación

El eje central de esta tesis ha sido el estudio de los efectos del E2 sobre el estrés oxidativo y la biogénesis, la función y la dinámica mitocondrial, en líneas celulares cancerosas con distinto balance de receptores estrogénicos. Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que los efectos del E2 en líneas celulares de cáncer de mama y cáncer de próstata sobre los procesos estudiados son dependientes de la dotación y la ratio de ER α y ER β .

En el cáncer de mama el E2 es uno de los factores de riesgo más importantes^{1,2}. Igualmente en cáncer de próstata se ha observado que el E2 tiene efectos carcinogénicos y quimiopreventivos^{120,121}. El mecanismo por el cual el E2 interviene en el proceso carcinogénico es controvertido. Inicialmente, se describió que el E2 inducía la proliferación celular¹⁵, estudios posteriores señalaron que el E2 actuaría produciendo metabolitos oxidantes (derivados de su metabolismo) que podrían intervenir promoviendo el proceso carcinogénico^{40, 41}. Estos resultados proceden, en su mayoría, de estudios realizados en líneas celulares tratadas con dosis muy superiores a las fisiológicas, y que implican en muchos casos un mecanismo independiente de ER. Estudios más recientes han establecido que el E2, a concentraciones más cercanas a las fisiológicas, y a través de la activación de ER, induciría estrés oxidativo en líneas ER+ y no en líneas ER-¹¹⁵. Los resultados de esta tesis muestran como el tratamiento con E2 a concentraciones fisiológicas (1 nM), donde la producción de metabolitos oxidantes sería mínima, provoca estrés oxidativo en las líneas celulares ER+, debido, en parte, a una disminución de la expresión y de la actividad de los sistemas antioxidantes (enzimas y UCPs), así como a alteraciones funcionales de la mitocondria. Es interesante destacar la presencia de las UCPs en las líneas de cáncer de mama y la acción del E2 disminuyendo su expresión y su actividad. Los resultados obtenidos estarían de acuerdo con el papel reciente que se le ha dado a las UCPs en la iniciación y la progresión del cáncer, así como en la manifestación de la quimioresistencia^{175,}

En la última década, se ha demostrado que el E2 en líneas celulares cancerosas, puede actuar a través de dos receptores, ER α y ER β , la activación de los cuales pueden presentar efectos contrapuestos, mostrando efectos proliferativos cuando se une a ER α y efectos antiproliferativos cuando lo hace a ER β ^{15, 24-26, 35}. En nuestros resultados, en líneas celulares de cáncer de mama y de próstata, el tratamiento con dosis fisiológicas de E2, provocaba efectos diferentes sobre el estrés oxidativo y la respuesta antioxidante dependiendo de la dotación y ratio de ER α y ER β . Así, en las líneas donde predominaba el ER α , E2 establecía estrés oxidativo, en parte, debido a una disminución de la respuesta antioxidante (enzimas y UCPs). Sin embargo, en las líneas con una elevada cantidad de ER β los sistemas antioxidantes incluso llegaban a elevarse evitando, de esta manera, el daño oxidativo celular. Estos datos estarían de acuerdo con los efectos protectores de los estrógenos que se han descrito en trabajos previos realizados en nuestro laboratorio, con ratas en diferentes situaciones fisiológicas (envejecimiento, restricción calórica y obesidad), activando los enzimas antioxidantes y las UCPs en aquellos tejidos en los que predomina la isoforma β del receptor de estrógenos (tejido adiposo marrón, músculo esquelético, páncreas y cerebro)²⁰⁰⁻²⁰⁴. Igualmente estarían de acuerdo con que se haya descrito que el ER β desaparece en las fases iniciales de tumores de mama y próstata, predominando así la isoforma α del receptor^{47-50, 122}.

La respuesta antioxidante insuficiente puede ser una de las causas del establecimiento del estrés oxidativo en la célula, aunque no puede descartarse que alteraciones en la función mitocondrial estén también implicadas en el aumento del estrés oxidativo celular^{79, 188}, ya que la disfunción mitocondrial se encuentra entre los rasgos que caracterizan a la célula cancerosa^{188, 205, 206}. Además, se conoce que los estrógenos regulan la biogénesis mitocondrial coordinando la transcripción de genes nucleares y mitocondriales del sistema OXPHOS⁷⁸. Los resultados encontrados en la presente tesis muestran que el tratamiento con el E2, fuera cual fuera la dotación de receptores estrogénicos,

en las líneas celulares de cáncer de mama inducía la biogénesis mitocondrial. Sin embargo, los efectos del E2 sobre la función mitocondrial dependían de la ratio $ER\alpha/ER\beta$. Las líneas con una elevada ratio tenían una importante disminución de la expresión y la actividad de alguno de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, en especial de la COX, principal modulador de esta vía. Ésta disminución trataría de compensarse aumentando el número de mitocondrias, respuesta descrita en procesos como el envejecimiento donde se estimula la proliferación mitocondrial para paliar los efectos de la pérdida de su función^{200, 207, 208}. Esta disfunción mitocondrial, o bien podría estar provocada por la deficiente respuesta antioxidante que conduciría gradualmente a un aumento de la producción de ROS, dañando así el ADNmt, conduciendo a su vez a una disfunción mitocondrial, provocando de esta manera un círculo vicioso de amplificación de la producción de ROS y daño en la mitocondria⁷⁹. O bien, podría ser consecuencia de la acción de los estrógenos a través del $ER\alpha$ sobre la función mitocondrial. Mientras que en la línea en la que los niveles de $ER\beta$ eran más elevados, y por tanto con una ratio menor, la funcionalidad de la mitocondria se mantenía a pesar de disminuir el número de mitocondrias en respuesta al tratamiento con el E2, lo que explicaría la disminución del estrés oxidativo observado en esta línea.

Por otra parte, las mitocondrias no se sintetizan *de novo*, sino que deben formarse a partir de mitocondrias existentes, proceso altamente regulado por hormonas, entre ellas los estrógenos^{128, 209}. Cuando las mitocondrias están dañadas son eliminadas por autofagia (mitoptosis), de esta manera se evita su mal funcionamiento y los efectos dañinos que causa en la célula el aumento de la producción de ROS¹³². Además, recientemente se ha demostrado que las mitocondrias son capaces de alterar continuamente su morfología en respuesta a diversas señales celulares, proceso que se conoce como “dinámica mitocondrial”. Estas alteraciones implican tanto la división (fisión) como la unión de mitocondrias (fusión). Estos dos procesos opuestos controlan la

población mitocondrial en la célula, tanto en número, como en tamaño, forma, función y distribución^{94, 98, 128}. En esta tesis, al estudiar los efectos del E2 sobre la dinámica mitocondrial, nos encontramos que el tratamiento con E2 tenía efecto, vía activación del ER, sobre la expresión de los genes de fusión y fisión mitocondrial, así como sobre la morfología de la red mitocondrial. Concretamente, en el caso de la línea MCF-7 (con una predominancia de ER α) se observó que el tratamiento con E2 promovía la fusión e inhibía la fisión mitocondrial. Esta respuesta dificultaría la degradación de las mitocondrias, dando lugar a una acumulación de mitocondrias fusionadas, lo que podría explicar el aumento en el número de mitocondrias y la consecuente pérdida de la función que habíamos observado. Los efectos del E2 sobre la dinámica mitocondrial eran dependientes de la dotación y del balance de ER α y ER β . En las líneas donde predomina el ER β , la fusión mitocondrial estaba aumentada, mientras que no había efectos sobre la fisión mitocondrial, además estos resultados se acompañaban de unas mitocondrias que no presentaban cambios ni en su número ni en su función. Este papel protector del ER β sobre las mitocondrias lo pudimos constatar al trabajar con líneas con el ER β inducible (T47D-ER β), donde al sobreexpresar ER β se observaron unas mitocondrias más funcionales con una biogénesis y dinámica mitocondrial dirigidas a mantener el pool de mitocondrias en buen estado.

En su conjunto, los resultados obtenidos en líneas celulares muestran que las líneas con predominancia del ER α (MCF-7 y T47D-ER β off) presentaban una elevada biogénesis mitocondrial pero una merma de función de las mitocondrias, además de un incremento de la expresión de los genes de fusión y una disminución de los de fisión mitocondrial. Las mitocondrias fusionadas son más difíciles de eliminar, por lo tanto una disminución del proceso de fisión provocaría que las mitocondrias dañadas no pudieran eliminarse de manera adecuada, y por tanto haría que estas se fueran acumulando como un pool de mitocondrias no funcionales que generarían elevadas cantidades de ROS, lo que

a su vez dañaría el ADNmt. En esta situación al estar acompañada de una incapacidad de activar adecuadamente los sistemas antioxidantes (enzimas y UCPs), se realimentaría aún más el círculo vicioso de producción de ROS. En contrapartida, en las células que presentan ER β (T47D, MDA-MB-231, T47D-ER β on), el E2 estimularía la biogénesis mitocondrial destinada al recambio de las mitocondrias, y al no tener una caída de los genes de fisión mantendrían una dinámica mitocondrial más activa, teniendo de esta manera una menor dificultad para deshacerse de las mitocondrias dañadas. De esta manera, no se incrementaba la producción de ROS, que conjuntamente con el mantenimiento de la respuesta antioxidante contribuirían a mantener unas mitocondrias en mejor estado.

En tumores de cáncer de mama ductales infiltrantes se observó que a medida que la ratio ER α /ER β disminuía, los tumores presentaban una situación de mayor estrés oxidativo y una menor expresión de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, que comprometería el metabolismo energético y favorecería la producción de ROS, a pesar de tener una mayor respuesta antioxidante (enzimas y UCPs). En esta respuesta también participaría la sirtuina3 que se ha descrito que activa tanto la expresión como la función de los enzimas antioxidantes¹⁸⁵. Estos datos estarían de acuerdo con los estudios que muestran, que tanto en cáncer de mama como de próstata, un incremento de la ratio ER α /ER β respecto al tejido no tumoral es un factor importante para el desarrollo del fenotipo canceroso^{15, 60}. Sin embargo, una disminución en esta ratio, debido a un aumento de ER β , es indicativa de una mala prognosis y problemas en el tratamiento de estos cánceres^{63, 64, 210, 211}. Esta peor prognosis, asociada al aumento de ER β , podría ser debida a la capacidad de activar los sistemas antioxidantes, lo que les permitiría adaptarse mejor al estrés oxidativo, aunque estos sean incapaces de paliarlo por completo²¹⁰. Se ha postulado que en el proceso tumorigénico desde la iniciación hasta la metástasis, las células van adquiriendo unas modificaciones morfofuncionales que les permiten

adaptarse y protegerse de su propio estrés oxidativo, llegando al punto de escapar de él a través del proceso de la metástasis¹⁹⁷.

Así, en su conjunto, los resultados de esta tesis indican que la dotación de los receptores estrogénicos es muy importante en el proceso carcinogénico de los tumores dependientes de estrógenos, como son el de mama y el de próstata, promoviendo un efecto dual dependiendo de la fase de desarrollo del tumor. En las fases iniciales la presencia de ER α favorecería el desarrollo del tumor, aumentando la producción de radicales, y por consiguiente elevando la tasa de mutación y por otro lado, al actuar como segundos mensajeros, favorecerían la proliferación. En cambio, en la progresión del tumor la presencia de ER α podría llevar a la apoptosis debido a los elevados niveles de ROS que se pueden alcanzar. Sin embargo, la presencia de ER β que induce los sistemas de respuesta antioxidantes evitaría la iniciación del tumor, aunque una vez instaurado el proceso tumorigénico, la presencia del ER β permitiría a estas células sobrevivir a una mayor producción de ROS y en última instancia escapar a través de la metástasis. Así pues, a la hora de diseñar terapias para los cánceres hormonodependientes, sería de gran importancia determinar ER β por su valor pronóstico de forma rutinaria, para diseñar tratamientos más personalizados.

Los resultados de esta tesis nos han permitido introducirnos en el estudio de las alteraciones del metabolismo energético de las células tumorales de mama, y la influencia que tienen las hormonas sexuales en la biogénesis, la dinámica y la función mitocondrial, así como en el control del estrés oxidativo. Así, en futuros proyectos, nos planteamos profundizar en las alteraciones del metabolismo energético de la célula tumoral, uno de los grandes rasgos que las diferencia de las células normales, y a partir de este conocimiento, diseñar nuevas estrategias para el tratamiento de la neoplasia de mama. Por ejemplo, establecer si los fitoestrógenos en función de la ratio ER α /ER β pueden utilizarse

como adyuvante en el tratamiento del cáncer de mama; determinar si el bloqueo de las UCPs o sirtuina3 compromete el metabolismo y la capacidad biosintética de la célula y/o la conduce a un nivel de estrés oxidativo límite que la empuje hacia la apoptosis.

5. Conclusiones / Conclusions

CONCLUSIONES

- I. Las proteínas desacoplantes, UCP2 y UCP5, están presentes en niveles apreciable, tanto en carcinomas ductales infiltrantes mamarios y como en líneas celulares de cáncer de mama. En estas últimas responden al tratamiento 17 β -estradiol con cambios en sus niveles y actividad.
- II. El 17 β -estradiol a dosis fisiológicas, en líneas celulares de cáncer de mama ER+, incrementa la producción de ROS, vía receptor de estrógenos, mediante alteraciones funcionales de la mitocondria y la disminución de la expresión de las enzimas antioxidantes y UCPs.
- III. En líneas de cáncer de próstata, el tratamiento con 17 β -estradiol presenta un efecto dual disminuyendo o incrementando el estrés oxidativo de acuerdo a la abundancia del ER β . Parte de estos efectos podrían explicarse por cambios en la expresión de las UCPs y las enzimas antioxidantes.
- IV. La acción del 17 β -estradiol sobre el estrés oxidativo, en las líneas celulares de cáncer de mama, depende de la ratio ER α /ER β . Si esta ratio es elevada, hay una disminución de la expresión y actividad de las enzimas antioxidantes y las UCPs; mientras que, si la ratio es baja no se observan estos cambios o incluso aumentan como en el caso de los niveles de UCP5.
- V. En líneas celulares de cáncer de mama con distinto balance de ER α y ER β , el 17 β -estradiol activa la biogénesis mitocondrial, aunque la función mitocondrial es dependiente de la dotación de receptores estrogénicos y la relación de subtipos. Así, las líneas que presentan una mayor cantidad de ER β tienen unas mitocondrias menos dañadas y más funcionales. Sin embargo, en las células donde predomina ER α , las mitocondrias son menos funcionales,

presentando un incremento en el número de mitocondrias, posiblemente dirigido a contrarrestar esta pérdida de función.

- VI. La dinámica mitocondrial está regulada por el 17β -estradiol, vía receptor de estrógenos, activando los genes de fusión mitocondrial e inhibiéndose la fisión mitocondrial en aquellas líneas celulares con una ratio $ER\alpha/ER\beta$ elevada, traduciéndose en una acumulación de mitocondrias disfuncionales. Sin embargo, en las líneas donde predomina el $ER\beta$, la fusión mitocondrial estaba aumentada, mientras que no había efectos sobre la fisión mitocondrial, además estos resultados se acompañaban de unas mitocondrias que no presentaban cambios ni en su número ni en su función.
- VII. La peor prognosis descrita para carcinomas ductales infiltrantes mamarios con una ratio $ER\alpha/ER\beta$ baja, podría ser debida, en parte, al incremento de los sistemas antioxidantes (enzimas y UCPs), ya que les permitiría adaptarse mejor a una situación de estrés oxidativo, favoreciendo de esta manera su supervivencia.
- VIII. Para un mejor diagnóstico y tratamiento de los cánceres de mama y próstata sería recomendable incluir de manera rutinaria el estudio de la presencia de $ER\beta$ y UCPs debido a su posible valor pronóstico.

CONCLUSIONS

1. Uncoupling proteins UCP2 and UCP5 are present in significant levels both in invasive ductal mammary carcinoma and in breast cancer cell lines. In these cell lines, UCPs respond with changes in their levels and activity in response to 17β -estradiol treatment.
2. ROS production is increased in response to the treatment with 17β -estradiol treatment at physiological doses in breast cancer cell lines through the estrogen receptor. This increase in ROS production occurs by means of mitochondrial alterations and the decrease in expression of antioxidant enzymes and UCPs.
3. In prostate cancer cell lines, 17β -estradiol has a dual effect, decreasing or increasing oxidative stress according to ER β abundance. Part of these effects could be explained by changes in the expression of the UCPs and antioxidant enzymes
4. 17β -estradiol action on oxidative stress in breast cancer cell lines depends on the ER α /ER β ratio. If this ratio is high, there is a decrease in the expression and activity of antioxidant enzymes and UCPs, while if the ratio is low, these changes are not seen or contrastingly can even increase in the levels of UCP5.
5. In breast cancer cell lines with different balance of ER α and ER β , 17β -estradiol activates mitochondrial biogenesis, but mitochondrial function is dependent on the endowment of estrogen receptors and the relationship of subtypes. Thus, the cell lines with greater amount of ER β have less damaged and more functional mitochondria. However in the cell lines where ER α predominates, the mitochondria are less functional, and increase in number, and effect that has the possible aim of counteracting this loss of function.

6. Mitochondrial dynamic is regulated by 17β -estradiol, through estrogen receptor, increasing expression of mitochondrial fusion genes and repressing mitochondrial fission ones, in those cell lines with a high $ER\alpha/ER\beta$ ratio, with resulting accumulation of dysfunctional mitochondria. However, in the lines where predominates $ER\beta$, mitochondrial fusion was increased also, while there were no effects on mitochondrial fission genes expression. Moreover, these results are accompanied by mitochondria that had no changes in their number or their function.
7. The worst prognosis described for invasive ductal mammary carcinoma with a low $ER\alpha/ER\beta$ ratio, could be due, in part, to the increase of antioxidant systems (enzymes and UCPs) that it would allow them to better adapt to a situation of oxidative stress, thus favoring their survival.
8. For a better diagnosis and treatment of breast and prostate cancers, would be advisable to include, in the clinical routinely, the study of the presence of $ER\beta$, UCPs and Sirt3, due to its possible prognostic value.

6. Bibliografía / Bibliography

1. Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 2007;18(3): 581-92.
2. Ekblom A, Hsieh CC, Lipworth L, Adami HQ, Trichopoulos D. Intrauterine environment and breast cancer risk in women: a population-based study. *J Natl Cancer Inst* 1997;89(1): 71-6.
3. Kelsey JL, Gammon MD, John EM. Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev* 1993;15(1): 36-47.
4. Key TJ, Verkasalo PK, Banks E. Epidemiology of breast cancer. *Lancet Oncol* 2001;2(3): 133-40.
5. Ewertz M, Duffy SW, Adami HO, et al. Age at first birth, parity and risk of breast cancer: a meta-analysis of 8 studies from the Nordic countries. *Int J Cancer* 1990;46(4): 597-603.
6. Layde PM, Webster LA, Baughman AL, Wingo PA, Rubin GL, Ory HW. The independent associations of parity, age at first full term pregnancy, and duration of breastfeeding with the risk of breast cancer. Cancer and Steroid Hormone Study Group. *J Clin Epidemiol* 1989;42(10): 963-73.
7. Pharoah PD, Day NE, Duffy S, Easton DF, Ponder BA. Family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer* 1997;71(5): 800-9.
8. Walsh T, King MC. Ten genes for inherited breast cancer. *Cancer Cell* 2007;11(2): 103-5.
9. McTiernan A. Behavioral risk factors in breast cancer: can risk be modified? *Oncologist* 2003;8(4): 326-34.
10. Devenish RJ, Hall RM, Linnane AW, Lukins HB. Biogenesis of mitochondria. 52. Deletions in petite strains occurring in the mitochondrial gene for the 21 S ribosomal RNA, that affect the properties of mitochondrial recombination. *Mol Gen Genet* 1979;174(3): 297-305.
11. Lahmann PH, Hoffmann K, Allen N, et al. Body size and breast cancer risk: findings from the European Prospective Investigation into Cancer And Nutrition (EPIC). *Int J Cancer* 2004;111(5): 762-71.
12. Catalano S, Marsico S, Giordano C, et al. Leptin enhances, via AP-1, expression of aromatase in the MCF-7 cell line. *J Biol Chem* 2003;278(31): 28668-76.
13. Garofalo C, Surmacz E. Leptin and cancer. *J Cell Physiol* 2006;207(1): 12-22.
14. Novelli F, Milella M, Melucci E, 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 Res* 2008;10(5): R74.
15. Morani A, Warner M, Gustafsson JA. Biological functions and clinical implications of

oestrogen receptors alfa and beta in epithelial tissues. *J Intern Med* 2008;264(2): 128-42.

16. Jensen EV, Jacobson HI, Smith S, Jungblut PW, De Sombre ER. The use of estrogen antagonists in hormone receptor studies. *Gynecol Invest* 1972;3(1): 108-23.

17. Smith EP, Boyd J, Frank GR, et al. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N Engl J Med* 1994;331(16): 1056-61.

18. Greene GL, Nolan C, Engler JP, Jensen EV. Monoclonal antibodies to human estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77(9): 5115-9.

19. Walter P, Green S, Greene G, et al. Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82(23): 7889-93.

20. Green S, Walter P, Greene G, et al. Cloning of the human oestrogen receptor cDNA. *J Steroid Biochem* 1986;24(1): 77-83.

21. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(12): 5925-30.

22. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 1997;138(3): 863-70.

23. Gustafsson JA. Estrogen receptor beta--a new dimension in estrogen mechanism of action. *J Endocrinol* 1999;163(3): 379-83.

24. Pearce ST, Jordan VC. The biological role of estrogen receptors alpha and beta in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004;50(1): 3-22.

25. Chang EC, Charn TH, Park SH, et al. Estrogen Receptors alpha and beta as determinants of gene expression: influence of ligand, dose, and chromatin binding. *Mol Endocrinol* 2008;22(5): 1032-43.

26. Jensen EV, Jacobson HI, Walf AA, Frye CA. Estrogen action: a historic perspective on the implications of considering alternative approaches. *Physiol Behav* 2010;99(2): 151-62.

27. Kumar V, Green S, Stack G, Berry M, Jin JR, Chambon P. Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* 1987;51(6): 941-51.

28. Giguere V, Hollenberg SM, Rosenfeld MG, Evans RM. Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* 1986;46(5): 645-52.

29. Nilsson S, Makela S, Treuter E, et al. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* 2001;81(4): 1535-65.

30. Gonzalez DH, Bonnard G, Grienenberger JM. A gene involved in the biogenesis of c-type

cytochromes is co-transcribed with a ribosomal protein gene in wheat mitochondria [corrected]. *Curr Genet* 1993;24(3): 248-55.

31. Kushner PJ, Agard DA, Greene GL, et al. Estrogen receptor pathways to AP-1. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000;74(5): 311-7.

32. Saville B, Wormke M, Wang F, et al. Ligand-, cell-, and estrogen receptor subtype (alpha/beta)-dependent activation at GC-rich (Sp1) promoter elements. *J Biol Chem* 2000;275(8): 5379-87.

33. Sidhu RS, Tauro P. Biogenesis of mitochondria in yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Part I-- Nuclear control of mitochondria biogenesis. *Indian J Exp Biol* 1979;17(1): 19-23.

34. Heldring N, Pike A, Andersson S, et al. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev* 2007;87(3): 905-31.

35. Drummond AE, Fuller PJ. The importance of ERbeta signalling in the ovary. *J Endocrinol* 2010;205(1): 15-23.

36. Russo J, Ao X, Grill C, Russo IH. Pattern of distribution of cells positive for estrogen receptor alpha and progesterone receptor in relation to proliferating cells in the mammary gland. *Breast Cancer Res Treat* 1999;53(3): 217-27.

37. Saji S, Jensen EV, Nilsson S, Rylander T, Warner M, Gustafsson JA. Estrogen receptors alpha and beta in the rodent mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(1): 337-42.

38. Strom A, Hartman J, Foster JS, Kietz S, Wimalasena J, Gustafsson JA. Estrogen receptor beta inhibits 17beta-estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(6): 1566-71.

39. Zhu JH, Ye QN, Song ST, et al. [Effects of exogenous ER beta expression on the cell growth properties of MCF-7 breast cancer cell line]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2006;28(2): 103-6.

40. Russo J, Hasan Lareef M, Balogh G, Guo S, Russo IH. Estrogen and its metabolites are carcinogenic agents in human breast epithelial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003;87(1): 1-25.

41. Yager JD, Davidson NE. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N Engl J Med* 2006;354(3): 270-82.

42. Sogil B, Gellissen G, Wiesner RJ. Biogenesis of giant mitochondria during insect flight muscle development in the locust, *Locusta migratoria* (L.). Transcription, translation and copy number of mitochondrial DNA. *Eur J Biochem* 2000;267(1): 11-7.

43. Chen JQ, Delannoy M, Cooke C, Yager JD. Mitochondrial localization of ERalpha and ERbeta in human MCF7 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004;286(6): E1011-22.

44. Pedram A, Razandi M, Wallace DC, Levin ER. Functional estrogen receptors in the mitochondria of breast cancer cells. *Mol Biol Cell* 2006;17(5): 2125-37.
45. Usmanova N, Tomilin N, Zhivotovsky B, Kropotov A. Transcription factor GABP/NRF-2 controlling biogenesis of mitochondria regulates basal expression of peroxiredoxin V but the mitochondrial function of peroxiredoxin V is dispensable in the dog. *Biochimie* 2011;93(2): 306-13.
46. Amutha B, Gordon DM, Dancis A, Pain D. Chapter 14 Nucleotide-dependent iron-sulfur cluster biogenesis of endogenous and imported apoproteins in isolated intact mitochondria. *Methods Enzymol* 2009;456: 247-66.
47. Bardin A, Boulle N, Lazennec G, Vignon F, Pujol P. Loss of ERbeta expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression. *Endocr Relat Cancer* 2004;11(3): 537-51.
48. Hartman J, Strom A, Gustafsson JA. Estrogen receptor beta in breast cancer--diagnostic and therapeutic implications. *Steroids* 2009;74(8): 635-41.
49. Roger P, Sahla ME, Makela S, Gustafsson JA, Baldet P, Rochefort H. Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors. *Cancer Res* 2001;61(6): 2537-41.
50. Skliris GP, Munot K, Bell SM, et al. Reduced expression of oestrogen receptor beta in invasive breast cancer and its re-expression using DNA methyl transferase inhibitors in a cell line model. *J Pathol* 2003;201(2): 213-20.
51. Zhao C, Lam EW, Sunter A, et al. Expression of estrogen receptor beta isoforms in normal breast epithelial cells and breast cancer: regulation by methylation. *Oncogene* 2003;22(48): 7600-6.
52. Fox EM, Davis RJ, Shupnik MA. ERbeta in breast cancer--onlooker, passive player, or active protector? *Steroids* 2008;73(11): 1039-51.
53. Skliris GP, Leygue E, Watson PH, Murphy LC. Estrogen receptor alpha negative breast cancer patients: estrogen receptor beta as a therapeutic target. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008;109(1-2): 1-10.
54. Skliris GP, Leygue E, Curtis-Snell L, Watson PH, Murphy LC. Expression of oestrogen receptor-beta in oestrogen receptor-alpha negative human breast tumours. *Br J Cancer* 2006;95(5): 616-26.
55. Gruvberger-Saal SK, Bendahl PO, Saal LH, et al. Estrogen receptor beta expression is associated with tamoxifen response in ERalpha-negative breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007;13(7): 1987-94.
56. Murphy LC, Watson PH. Is oestrogen receptor-beta a predictor of endocrine therapy responsiveness in human breast cancer? *Endocr Relat Cancer* 2006;13(2): 327-34.

57. Leygue E, Dotzlaw H, Watson PH, Murphy LC. Altered estrogen receptor alpha and beta messenger RNA expression during human breast tumorigenesis. *Cancer Res* 1998;58(15): 3197-201.
58. Speirs V, Malone C, Walton DS, Kerin MJ, Atkin SL. Increased expression of estrogen receptor beta mRNA in tamoxifen-resistant breast cancer patients. *Cancer Res* 1999;59(21): 5421-4.
59. O'Neill PA, Davies MP, Shaaban AM, et al. Wild-type oestrogen receptor beta (ERbeta1) mRNA and protein expression in Tamoxifen-treated post-menopausal breast cancers. *Br J Cancer* 2004;91(9): 1694-702.
60. Stossi F, Barnett DH, Frasor J, Komm B, Lyttle CR, Katzenellenbogen BS. Transcriptional profiling of estrogen-regulated gene expression via estrogen receptor (ER) alpha or ERbeta in human osteosarcoma cells: distinct and common target genes for these receptors. *Endocrinology* 2004;145(7): 3473-86.
61. Adam AC, Bornhovd C, Prokisch H, Neupert W, Hell K. The Nfs1 interacting protein Isd11 has an essential role in Fe/S cluster biogenesis in mitochondria. *EMBO J* 2006;25(1): 174-83.
62. Garcia-Roves P, Huss JM, Han DH, et al. Raising plasma fatty acid concentration induces increased biogenesis of mitochondria in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(25): 10709-13.
63. Power KA, Thompson LU. Ligand-induced regulation of ERalpha and ERbeta is indicative of human breast cancer cell proliferation. *Breast Cancer Res Treat* 2003;81(3): 209-21.
64. Lee YR, Park J, Yu HN, Kim JS, Youn HJ, Jung SH. Up-regulation of PI3K/Akt signaling by 17beta-estradiol through activation of estrogen receptor-alpha, but not estrogen receptor-beta, and stimulates cell growth in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;336(4): 1221-6.
65. Sotoca AM, Ratman D, van der Saag P, et al. Phytoestrogen-mediated inhibition of proliferation of the human T47D breast cancer cells depends on the ERalpha/ERbeta ratio. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008;112(4-5): 171-8.
66. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, et al. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 1998;139(10): 4252-63.
67. Quaedackers ME, Van Den Brink CE, Wissink S, et al. 4-hydroxytamoxifen trans-represses nuclear factor-kappa B activity in human osteoblastic U2-OS cells through estrogen receptor (ER)alpha, and not through ER beta. *Endocrinology* 2001;142(3): 1156-66.
68. Tamir S, Izrael S, Vaya J. The effect of oxidative stress on ERalpha and ERbeta expression. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002;81(4-5): 327-32.

69. Korb H, Neupert W. Biogenesis of cytochrome c in *Neurospora crassa*. Synthesis of apocytochrome c, transfer to mitochondria and conversion to Holocytochrome c. *Eur J Biochem* 1978;91(2): 609-20.
70. Devenish RJ, English KJ, Hall RM, Linnase AW, Lukins HB. Biogenesis of mitochondria 49 identification and mapping of a new mitochondrial locus (*tsr1*) which maps within polar region of yeast mitochondrial genome. *Mol Gen Genet* 1978;161(3): 251-9.
71. Amutha B, Gordon DM, Gu Y, Lyver ER, Dancis A, Pain D. GTP is required for iron-sulfur cluster biogenesis in mitochondria. *J Biol Chem* 2008;283(3): 1362-71.
72. Molina-Navarro MM, Casas C, Piedrafita L, Belli G, Herrero E. Prokaryotic and eukaryotic monothiol glutaredoxins are able to perform the functions of Grx5 in the biogenesis of Fe/S clusters in yeast mitochondria. *FEBS Lett* 2006;580(9): 2273-80.
73. Menassa R, El-Rouby N, Brown GG. An open reading frame for a protein involved in cytochrome c biogenesis is split into two parts in *Brassica* mitochondria. *Curr Genet* 1997;31(1): 70-9.
74. Klingenspor M, Ivemeyer M, Wiesinger H, Haas K, Heldmaier G, Wiesner RJ. Biogenesis of thermogenic mitochondria in brown adipose tissue of Djungarian hamsters during cold adaptation. *Biochem J* 1996;316 (Pt 2): 607-13.
75. Addya S, Anandatheerthavarada HK, Biswas G, Bhagwat SV, Mullick J, Avadhani NG. Targeting of NH₂-terminal-processed microsomal protein to mitochondria: a novel pathway for the biogenesis of hepatic mitochondrial P450MT₂. *J Cell Biol* 1997;139(3): 589-99.
76. Schuster W. The highly edited orf206 in *Oenothera* mitochondria may encode a component of a heme transporter involved in cytochrome c biogenesis. *Plant Mol Biol* 1994;25(1): 33-42.
77. Giege P, Grienemberger JM, Bonnard G. Cytochrome c biogenesis in mitochondria. *Mitochondrion* 2008;8(1): 61-73.
78. Felty Q, Roy D. Estrogen, mitochondria, and growth of cancer and non-cancer cells. *J Carcinog* 2005;4(1): 1.
79. Fariss MW, Chan CB, Patel M, Van Houten B, Orrenius S. Role of mitochondria in toxic oxidative stress. *Mol Interv* 2005;5(2): 94-111.
80. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 2009;417(1): 1-13.
81. Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* 2003;278(38): 36027-31.
82. Lenaz G. The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology. *IUBMB Life* 2001;52(3-5): 159-64.

-
83. Addison R, McCormick DB. Biogenesis of flavoprotein and cytochrome components in hepatic mitochondria from riboflavin-deficient rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1978;81(1): 133-8.
84. Echtay KS. Mitochondrial uncoupling proteins--what is their physiological role? *Free Radic Biol Med* 2007;43(10): 1351-71.
85. Obbink DJ, Spithill TW, Maxwell RJ, Linnane AW. Biogenesis of mitochondria 48: mikamycin resistance in *Saccharomyces cerevisiae*--a mitochondrial mutation conferring resistance to an antimycin A-like contaminant in mikamycin. *Mol Gen Genet* 1977;151(2): 127-36.
86. Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem* 2001;11(4): 173-86.
87. Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* 2002;192(1): 1-15.
88. Sanders LM, Henderson CE, Hong MY, et al. An increase in reactive oxygen species by dietary fish oil coupled with the attenuation of antioxidant defenses by dietary pectin enhances rat colonocyte apoptosis. *J Nutr* 2004;134(12): 3233-8.
89. Harkness TA, Nargang FE, van der Klei I, Neupert W, Lill R. A crucial role of the mitochondrial protein import receptor MOM19 for the biogenesis of mitochondria. *J Cell Biol* 1994;124(5): 637-48.
90. Vic P, Vignon F, Derocq D, Rochefort H. Effect of estradiol on the ultrastructure of the MCF7 human breast cancer cells in culture. *Cancer Res* 1982;42(2): 667-73.
91. Tam CC, Wong YC. Ultrastructural study of the effects of 17 beta-oestradiol on the lateral prostate and seminal vesicle of the castrated guinea pig. *Acta Anat (Basel)* 1991;141(1): 51-62.
92. Rambold AS, Kostecky B, Lippincott-Schwartz J. Together we are stronger: fusion protects mitochondria from autophagosomal degradation. *Autophagy* 2011;7(12): 1568-9.
93. Nakada K, Inoue K, Hayashi J. Interaction theory of mammalian mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288(4): 743-6.
94. Zungu M, Schisler J, Willis MS. All the little pieces. -Regulation of mitochondrial fusion and fission by ubiquitin and small ubiquitin-like modifier and their potential relevance in the heart. *Circ J* 2011;75(11): 2513-21.
95. Dengjel J, Kristensen AR, Andersen JS. Ordered bulk degradation via autophagy. *Autophagy* 2008;4(8): 1057-9.
96. Lemasters JJ. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation Res* 2005;8(1): 3-

5.

97. Zorzano A, Liesa M, Sebastian D, Segales J, Palacin M. Mitochondrial fusion proteins: dual regulators of morphology and metabolism. *Semin Cell Dev Biol* 2010;21(6): 566-74.

98. Ong SB, Hausenloy DJ. Mitochondrial morphology and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 2010;88(1): 16-29.

99. Hales KG. The machinery of mitochondrial fusion, division, and distribution, and emerging connections to apoptosis. *Mitochondrion* 2004;4(4): 285-308.

100. Twig G, Hyde B, Shrihai OS. Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: the bioenergetic view. *Biochim Biophys Acta* 2008;1777(9): 1092-7.

101. Huang P, Galloway CA, Yoon Y. Control of mitochondrial morphology through differential interactions of mitochondrial fusion and fission proteins. *PLoS One* 2011;6(5): e20655.

102. Bossy-Wetzel E, Barsoum MJ, Godzik A, Schwarzenbacher R, Lipton SA. Mitochondrial fission in apoptosis, neurodegeneration and aging. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15(6): 706-16.

103. Chen H, Chan DC. Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. *Hum Mol Genet* 2005;14 Spec No. 2: R283-9.

104. Liesa M, Palacin M, Zorzano A. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol Rev* 2009;89(3): 799-845.

105. Takamura A, Komatsu M, Hara T, et al. Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev* 2011;25(8): 795-800.

106. Liang XH, Jackson S, Seaman M, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 1999;402(6762): 672-6.

107. Guo JY, Chen HY, Mathew R, et al. Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes Dev* 2011;25(5): 460-70.

108. Clemons M, Goss P. Estrogen and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 2001;344(4): 276-85.

109. Yager JD, Liehr JG. Molecular mechanisms of estrogen carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1996;36: 203-32.

110. Irwin RW, Yao J, Hamilton RT, Cadenas E, Brinton RD, Nilsen J. Progesterone and estrogen regulate oxidative metabolism in brain mitochondria. *Endocrinology* 2008;149(6): 3167-75.

111. Song JY, Kim MJ, Jo HH, et al. Antioxidant effect of estrogen on bovine aortic endothelial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2009;117(1-3): 74-80.

112. Borrás C, Gambini J, Lopez-Grueso R, Pallardo FV, Vina J. Direct antioxidant and protective effect of estradiol on isolated mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 2009.
113. Borrás C, Gambini J, Gomez-Cabrera MC, et al. 17beta-oestradiol up-regulates longevity-related, antioxidant enzyme expression via the ERK1 and ERK2[MAPK]/NFkappaB cascade. *Aging Cell* 2005;4(3): 113-8.
114. Roy D, Cai Q, Felty Q, Narayan S. Estrogen-induced generation of reactive oxygen and nitrogen species, gene damage, and estrogen-dependent cancers. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2007;10(4): 235-57.
115. Mobley JA, Brueggemeier RW. Estrogen receptor-mediated regulation of oxidative stress and DNA damage in breast cancer. *Carcinogenesis* 2004;25(1): 3-9.
116. Felty Q, Singh KP, Roy D. Estrogen-induced G1/S transition of G0-arrested estrogen-dependent breast cancer cells is regulated by mitochondrial oxidant signaling. *Oncogene* 2005;24(31): 4883-93.
117. Pelicano H, Carney D, Huang P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updat* 2004;7(2): 97-110.
118. Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004;44: 239-67.
119. Liehr JG, Roy D. Free radical generation by redox cycling of estrogens. *Free Radic Biol Med* 1990;8(4): 415-23.
120. Chang WY, Prins GS. Estrogen receptor-beta: implications for the prostate gland. *Prostate* 1999;40(2): 115-24.
121. Steiner MS, Raghov S, Neubauer BL. Selective estrogen receptor modulators for the chemoprevention of prostate cancer. *Urology* 2001;57(4 Suppl 1): 68-72.
122. Warner M, Gustafsson JA. The role of estrogen receptor beta (ERbeta) in malignant diseases--a new potential target for antiproliferative drugs in prevention and treatment of cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;396(1): 63-6.
123. Okoh V, Deoraj A, Roy D. Estrogen-induced reactive oxygen species-mediated signalings contribute to breast cancer. *Biochim Biophys Acta* 2011;1815(1): 115-33.
124. Mense SM, Remotti F, Bhan A, et al. Estrogen-induced breast cancer: alterations in breast morphology and oxidative stress as a function of estrogen exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008;232(1): 78-85.
125. Chen JQ, Yager JD, Russo J. Regulation of mitochondrial respiratory chain structure and function by estrogens/estrogen receptors and potential physiological/pathophysiological implications. *Biochim Biophys Acta* 2005;1746(1): 1-17.

126. Felty Q, Xiong WC, Sun D, et al. Estrogen-induced mitochondrial reactive oxygen species as signal-transducing messengers. *Biochemistry* 2005;44(18): 6900-9.
127. Parkash J, Felty Q, Roy D. Estrogen exerts a spatial and temporal influence on reactive oxygen species generation that precedes calcium uptake in high-capacity mitochondria: implications for rapid nongenomic signaling of cell growth. *Biochemistry* 2006;45(9): 2872-81.
128. Okamoto K, Kondo-Okamoto N. Mitochondria and autophagy: Critical interplay between the two homeostats. *Biochim Biophys Acta* 2011.
129. Zorzano A, Sebastian D, Segales J, Palacin M. The molecular machinery of mitochondrial fusion and fission: An opportunity for drug discovery? *Curr Opin Drug Discov Devel* 2009;12(5): 597-606.
130. Horimoto M, Resnick MB, Konkin TA, Routhier J, Wands JR, Baffy G. Expression of uncoupling protein-2 in human colon cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10(18 Pt 1): 6203-7.
131. Valle A, Oliver J, Roca P. Role of Uncoupling Proteins in Cancer. *Cancers* 2, 2010.
132. Santandreu FM, Roca P, Oliver J. Uncoupling protein-2 knockdown mediates the cytotoxic effects of cisplatin. *Free Radic Biol Med* 2010;49(4): 658-66.
133. Guevara R, Santandreu FM, Valle A, Gianotti M, Oliver J, Roca P. Sex-dependent differences in aged rat brain mitochondrial function and oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2009;46(2): 169-75.
134. Guevara R, Gianotti M, Oliver J, Roca P. Age and sex-related changes in rat brain mitochondrial oxidative status. *Exp Gerontol* 2011;46(11): 923-8.
135. Nadal-Casellas A, Proenza AM, Gianotti M, Llad I. Brown adipose tissue redox status in response to dietary-induced obesity-associated oxidative stress in male and female rats. *Stress* 2011;14(2): 174-84.
136. Gomez-Perez Y, Gianotti M, Llado I, Proenza AM. Sex-dependent effects of high-fat-diet feeding on rat pancreas oxidative stress. *Pancreas* 2011;40(5): 682-8.
137. Gomez-Perez Y, Amengual-Cladera E, Catala-Niell A, et al. Gender dimorphism in high-fat-diet-induced insulin resistance in skeletal muscle of aged rats. *Cell Physiol Biochem* 2008;22(5-6): 539-48.
138. Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria as targets for cancer chemotherapy. *Semin Cancer Biol* 2009;19(1): 57-66.
139. Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria in cancer cells: what is so special about them? *Trends Cell Biol* 2008;18(4): 165-73.

140. Guevara R, Gianotti M, Roca P, Oliver J. Age and sex-related changes in rat brain mitochondrial function. *Cell Physiol Biochem* 2011;27(3-4): 201-6.
141. Valle A, Guevara R, Garcia-Palmer FJ, Roca P, Oliver J. Caloric restriction retards the age-related decline in mitochondrial function of brown adipose tissue. *Rejuvenation Res* 2008;11(3): 597-604.
142. Valle A, Oliver J, Roca P. Role of Uncoupling Proteins in Cancer. *Cancers* 2010;2(2).
143. Grandemange S, Herzig S, Martinou JC. Mitochondrial dynamics and cancer. *Semin Cancer Biol* 2009;19(1): 50-6.
144. Park SH, Ozden O, Jiang H, et al. Sirt3, Mitochondrial ROS, Ageing, and Carcinogenesis. *Int J Mol Sci* 2011;12(9): 6226-39.
145. Chaiswing L, Bourdeau-Heller JM, Zhong W, Oberley TD. Characterization of redox state of two human prostate carcinoma cell lines with different degrees of aggressiveness. *Free Radic Biol Med* 2007;43(2): 202-15.
146. Yeh S, Chen M, Ni J, et al. Functions of Estrogen Receptor in Prostate and Prostate Cancer. *Prostate Cancer: Basic Mechanisms and Therapeutic Approaches.*: World Scientific Publishing, 2005:293-313.
147. Pani G, Galeotti T, Chiarugi P. Metastasis: cancer cell's escape from oxidative stress. *Cancer Metastasis Rev* 2010;29(2): 351-78.

7. Anexo / Appendix

MANUSCRIPT VIII

Modulation of white adipose tissue proteome by aging and calorie restriction

Valle A, Sastre-Serra J, Roca P, Oliver J
Aging Cell (2010) 9 (5):882-94

MANUSCRIPT IX

Proteomic analysis of MCF-7 breast cancer cell line exposed to leptin

Valle A, Sastre-Serra J, Pol C, Miró AM, Oliver J, Roca P.
Anal Cell Pathol (Amst). (2011) 34(3):147-57

MANUSCRIPT X

Chronic leptin treatment sensitizes MCF-7 breast cancer cells to estrogen

Valle A, Sastre-Serra J, Oliver J, Roca P.
Cell Physiol Biochem (2011) 28(5):823-32

MANUSCRIPT XI

Initial activation status of the antioxidant response determines the sensitivity to treatment with carboplatin-paclitaxel in ovarian cancer

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

Manuscript