



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultad de Ciencias

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Efecto de la inhibición de la UCP2 sobre el estrés oxidativo inducido por citotóxicos en líneas de cáncer de mama MCF-7.

M^a Antònia Llopis Grimalt

Grado de Bioquímica

Año académico 2014-15

DNI del alumno: 43234624-Y

Trabajo tutelado por Jordi Oliver Oliver.
Departamento de Biología Fundamental y Ciencias de la Salud.

NO

Se autoriza a la Universidad a incluir mi Trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con finalidades exclusivamente académicas y de investigación.

Palabras clave del trabajo:

Cáncer de mama, estrés oxidativo, UCP2, autofagia, tamoxifeno, cisplatino, paclitaxel.



ÍNDICE.

ÍNDICE.....	3
ABSTRACT.....	4
RESUMEN.....	4
ABREVIACIONES.....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1. Cáncer de mama.....	6
1.1.2. Los estrógenos en el cáncer de mama.....	7
1.2. Papel del estrés oxidativo en el cáncer.....	7
1.3. Papel de la UCP2 en el cáncer.....	8
1.4. Tratamientos.....	11
2. OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL.....	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
3.1. Reactivos.....	15
3.2. Cultivos celulares.....	15
3.3. Transfección y tratamientos.....	15
3.4. Extracción de proteína.....	16
3.5. <i>Western Blot</i>	16
3.6. Viabilidad celular.....	16
3.7. Producción de H ₂ O ₂ (Producción ROS).....	17
4. RESULTADOS.....	19
5. DISCUSIÓN.....	25
CONCLUSIONES.....	28
REFERENCIAS.....	29



ABSTRACT.

Oxidative stress may play an important role in the pathogenesis of some diseases, including cancer and the modulation of oxidative stress in cancer cells may be important in the study of the resistance to anticancer therapies. Uncoupling protein 2 (UCP2) modulates the generation of ROS and it may play a dual role in cancer, conferring resistance to chemotherapy and a higher survival of cancer cells. The aim of the study was to test whether the inhibition of UCP2 expression increases oxidative stress and could affect the sensibility of breast cancer cells to cisplatin (CDDP), paclitaxel (PTX) or tamoxifen (TAM) treatment. For this purpose, cell viability, ROS production, mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$), autophagy, UCP2 and OXPHOS proteins levels were studied in MCF-7 cancer cells treated with CDDP, PTX or TAM, in combination or without a UCP2 knockdown (siRNA). UCP2 inhibition and cytotoxic treatments produced a decrease in cell viability and an increase in ROS production, $\Delta\Psi_m$ and autophagy. It has to be considered that the CDDP treatment decreased UCP2 levels, so the effects observed in the co-treatment CDDP+siRNA were not as great as those observed with the other co-treatments. In conclusion, UCP2 could be a therapeutic target in breast cancer.

RESUMEN.

El estrés oxidativo juega un papel importante en la patogénesis de diversas enfermedades, entre las que se incluye el cáncer. En el estudio de los mecanismos de quimiorresistencia es importante considerar la modulación del estrés oxidativo en las células tumorales. La proteína desacoplante 2 (UCP2) modula la producción de ROS y juega un papel importante en el cáncer, participando en la quimiorresistencia y confiriendo una mayor supervivencia a las células. En este estudio se ha analizado como afecta la inhibición de la UCP2 a la producción de ROS y si puede afectar a la sensibilidad a los tratamientos con cisplatino (CDDP), paclitaxel (PTX) o tamoxifeno (TAM). Para este propósito, se estudió la viabilidad celular, la producción de ROS, el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), la autofagia y los niveles proteicos de la UCP2 y de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, en células MCF-7 tratadas con CDDP, PTX o TAM, en combinación o no con una inhibición de la UCP2 (siRNA). La inhibición de la UCP2 y los tratamientos citotóxicos produjeron una



disminución de la viabilidad celular, acompañada de un aumento de la producción de ROS, del $\Delta\psi_m$ y de la autofagia. Es importante tener en cuenta que según se ha observado, el tratamiento con CDDP produce una disminución de los niveles proteicos de UCP2, de manera que los efectos observados en el tratamiento conjunto CDDP+siRNA no son tan acusados como los observados con los otros tratamientos conjuntos. En conclusión, la UCP2 podría ser una diana terapéutica para la mejora del tratamiento del cáncer de mama.

ABREVIACIONES.

- **UCP2:** proteína desacoplante 2.
- **$\Delta\psi_m$:** potencial de membrana mitocondrial.
- **ROS:** radicales libres de oxígeno.
- **OXPHOS:** complejos de la cadena respiratoria mitocondrial.
- **CDDP:** cisplatino.
- **PTX:** paclitaxel.
- **TAM:** tamoxifeno.
- **TMRM:** *Tetramethylrhodamine methyl ester.*
- **MDC:** *Monodansylcadaverine.*



1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Cáncer de mama.

El cáncer de mama representa el segundo tumor maligno más frecuente en el mundo, y el más frecuente entre las mujeres, tanto en los países desarrollados como en los que se encuentran en vías de desarrollo. En el 2012 se diagnosticaron aproximadamente 1.65 millones de nuevos casos de cáncer de mama, representando un 12% de todos los diagnósticos de cáncer y un 25% de todos los diagnósticos de cáncer en mujeres. En España se diagnostican unos 26.000 casos al año, representando un 30% de todos los casos de cáncer en mujeres (1–3).

El cáncer de mama es considerado la quinta causa de muerte asociada al cáncer en el mundo, ocupando el primer lugar en regiones en vías de desarrollo, 14,3% de las muertes, y el segundo en regiones más desarrolladas tras el cáncer de pulmón, 15,4% de las muertes (1–3).

▲ Estimated Breast Cancer Incidence Worldwide in 2012

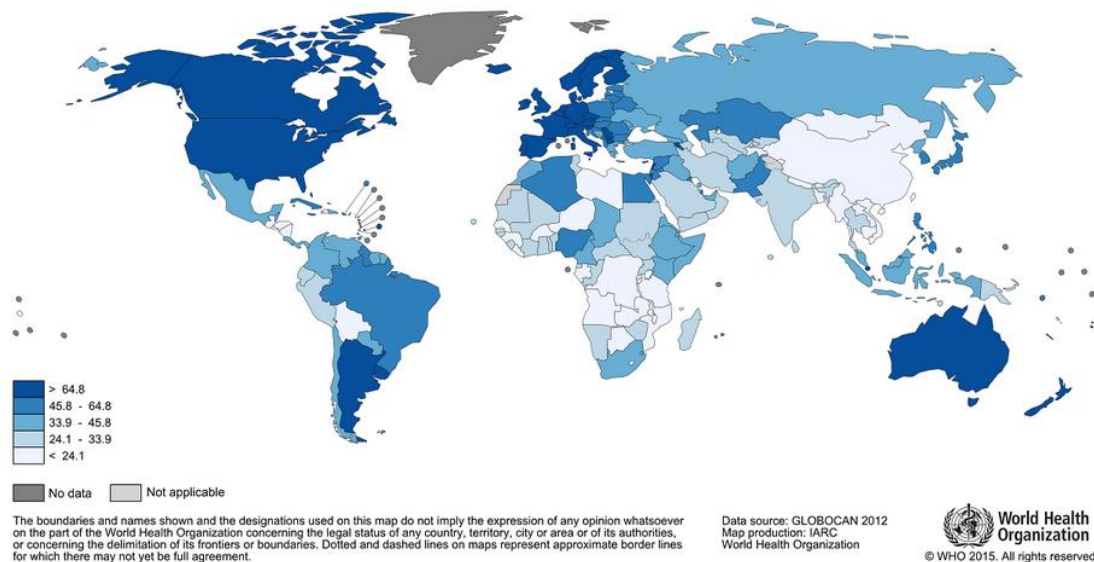


Figura 1.1. Incidencia del cáncer de mama alrededor del mundo en el 2012 (2).



▲ Estimated Breast Cancer Mortality Worldwide in 2012

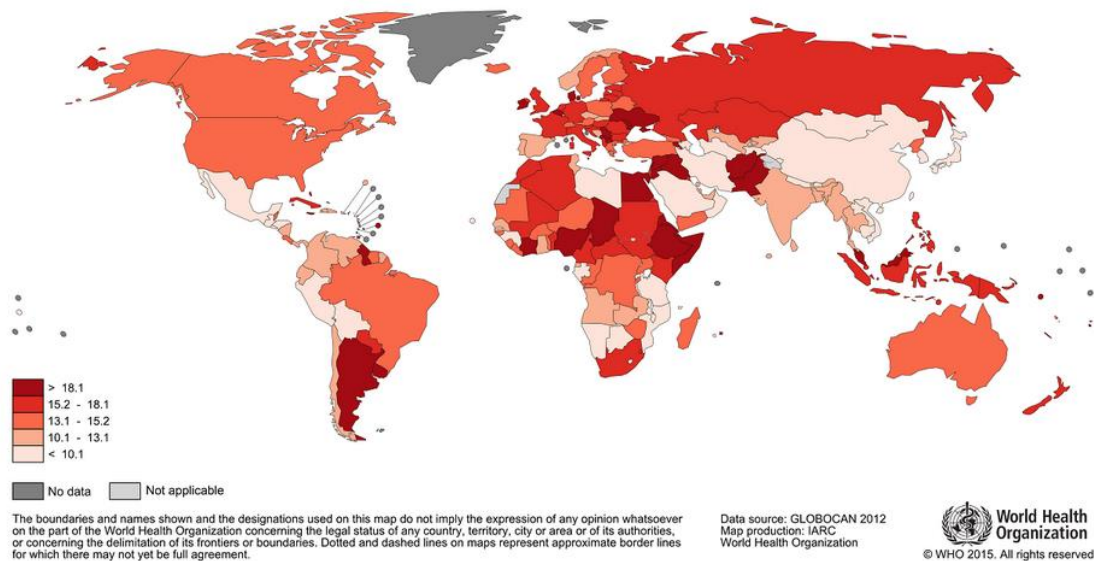


Figura 1.2. Mortalidad del cáncer de mama alrededor del mundo en el año 2012 (2).

1.1.2. Los estrógenos en el cáncer de mama.

Los estrógenos constituyen un importante factor de riesgo en el cáncer de mama, tanto en su desarrollo como en su progresión. En los tejidos dependientes de estrógenos, como es el caso de la mama, se ha visto que presentan un efecto prooxidante. Se ha sugerido que el estrés oxidativo inducido por los estrógenos puede estar relacionado con una disminución de la actividad de diversos enzimas antioxidantes y que esta disminución vendría modulada por el receptor de estrógenos (4).

1.2. Papel del estrés oxidativo en el cáncer.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) derivan del metabolismo del oxígeno molecular. Estas moléculas incluyen el anión superóxido (O_2^-), el oxígeno singlete, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^\cdot). El estrés oxidativo se produce cuando el balance entre la producción de ROS y su eliminación mediante los sistemas antioxidantes se rompe, ya sea debido a un exceso de producción, a una falta de sistemas antioxidantes o bien a ambos procesos a la vez. Un exceso de ROS provoca daños en el ADN, en las proteínas y en los lípidos, lo que puede jugar un papel crítico en la carcinogénesis. Además, los ROS pueden actuar como moléculas de señalización intracelular y jugar un papel importante en la progresión del cáncer afectando a la supervivencia celular (5,6).



Algunos carcinógenos pueden ejercer su función mediante la generación de ROS en su metabolismo. Las especies reactivas de oxígeno influyen procesos celulares tales como la proliferación, la apoptosis o la senescencia los cuales están implicados en el desarrollo de esta patología (5). Se ha asociado un estado más oxidativo a las células que se encuentran en un estado proliferativo asociado a modificaciones transcripcionales y post-transcripcionales de proteínas implicadas en el control del ciclo celular. Además, se cree que los mecanismos antioxidantes de las células tumorales también se encuentran elevados (6).

Las células cancerígenas han desarrollado mecanismos de protección contra el estrés oxidativo, adaptando sus sistemas antioxidantes y regulando positivamente las moléculas que favorecen su supervivencia. Los ROS contribuyen al inicio del cáncer al activar vías de señalización pro-tumorigénicas. Pueden modificar la acción de determinadas proteínas mediante la oxidación de puentes disulfuro, por ejemplo en las proteínas pertenecientes a la superfamilia de las Tyr-fosfatasas. Algunas de las proteínas que se ven afectadas por los ROS son el supresor tumoral PTEN que al ser oxidado se produce su inactivación, o la activación de las ERKs mediada por la inhibición de las MAP quinasas fosfatasas. La inhibición del supresor tumoral PTEN produce una activación de la vía de señalización PI3K/Akt, la cual se encuentra fuertemente activada en las células tumorales. Además, la activación de esta vía a su vez produce un aumento de la formación de ROS mediante la inhibición de los factores de transcripción FOXOs, los cuales modulan la expresión de antioxidantes como la SOD2 o la catalasa (7).

1.3. Papel de la UCP2 en el cáncer.

Las proteínas desacoplantes (UPCs) son una familia de proteínas que se encuentran en la membrana mitocondrial interna y que se encargan de la reincorporación de protones en la matriz mitocondrial, disipando de este modo el gradiente protónico. Como consecuencia de esto disminuye el potencial de membrana y la producción de especies reactivas de oxígeno (8). La proteína desacoplante-2 (UCP2), identificada más recientemente que la UCP1, es la que presenta una localización más ubicua y se encuentra presente en tejidos como el tejido adiposo, músculo, corazón, riñón, tracto digestivo, cerebro, bazo y timo (9,10).

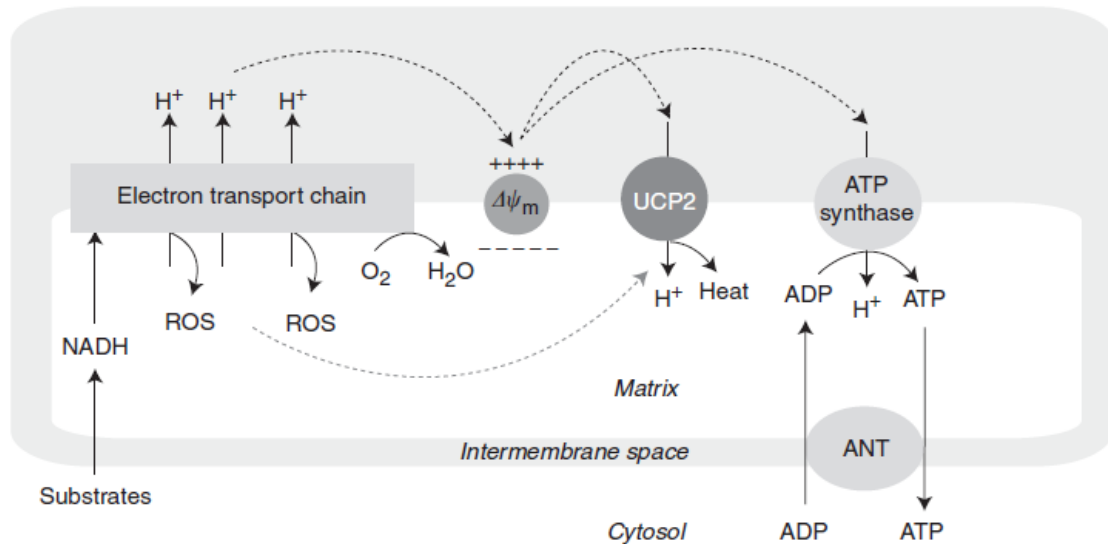


Figura 1.3. Fosforilación oxidativa y desacoplamiento mitocondrial (10).

Debido a la gran homología que presenta la UCP2 con la UCP1 (59%), y a la distribución en diversos tejidos, en un primer momento se pensó que la UCP2 ejercía una función termogénica y que se encontraba involucrada en la regulación del metabolismo energético y del peso corporal (8). No obstante se ha visto que ratones *knockout* para la UCP2 son capaces de mantener su temperatura corporal en entornos fríos, de manera que actualmente se piensa que esta proteína no se encuentra implicada en la termogénesis adaptativa (11–13). En lugar de eso, la UCP2 se ha asociado a la disminución de la producción de radicales libres, fenómeno muy relevante en diversos procesos fisiológicos y patológicos como la obesidad, enfermedades neurodegenerativas o el cáncer (12,13).

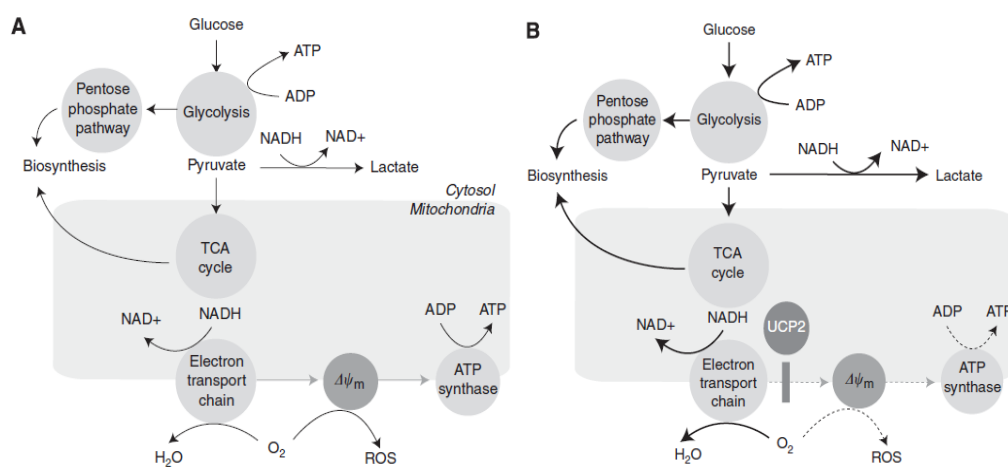


Figura 1.4. A) Vías anabólicas y catabólicas que desembocan en el Ciclo de Krebs (TCA) en una célula sana. **B)** Vías anabólicas y catabólicas que desembocan en el Ciclo de Krebs (TCA) en una célula cancerosa (10).



Como se puede observar en la **Figura 1.4** las vías anabólicas y catabólicas presentan su intersección en el ciclo de Krebs (o ciclo de los ácidos tricarboxílicos, TCA) y el balance depende del potencial redox. Según el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) y la disponibilidad de ADP se acoplará todo este proceso a la síntesis de ATP mediante la ATP sintasa. En cambio, en células cancerosas, se disipa el potencial protónico mediante la UCP2, lo que disminuye el $\Delta\psi_m$. Además, en estas condiciones la producción de ATP mediante otras vías como la glicólisis aumenta, como se indica en la **figura 1.4 B** mediante líneas más oscuras (10).

Se ha visto que la disipación de protones producida por la UCP2 no se detecta si no hay un cierto estrés oxidativo. Esta actividad de la UCP2 se activa gracias al superóxido y los productos derivados de la peroxidación lipídica como el *4-hydroxynonenal* (12,14).

El superóxido se produce cuando el oxígeno molecular es reducido por electrones que abandonan la cadena respiratoria en estadios tempranos. Además, este proceso se produce en mayor medida en condiciones de un mayor potencial de membrana mitocondrial debido al mayor paso de electrones y la mayor vida media que presentan los intermediarios de la cadena respiratoria. Debido a esto, una disminución del potencial de membrana produce una disminución de la producción de superóxido, y se ha visto que en las células eucariotas la prevención de la formación de ROS es más eficiente que la eliminación de radicales libres ya formados. La UCP2 al disipar el gradiente protónico disminuye la producción de ROS (12).

Debido a esta disminución de la producción de ROS asociada a la UCP2 se ha analizado la expresión de esta proteína en células cancerosas. En diversos estudios se ha podido observar una expresión de esta proteína incrementada en líneas celulares de cáncer hepatocelular y cáncer de colon. Como la expresión de la UCP2 se produce en respuesta al ROS y a los productos de la peroxidación lipídica, unos niveles elevados de estas moléculas podrían provocar la elevación de la UCP2 observada en diversas líneas celulares tumorales (12,15).

Otros estudios han demostrado además, que el incremento de expresión de la UCP2 podría contribuir a la selección de las células que presentan unas capacidades de adaptación mayores. En líneas celulares derivadas de melanoma y leucemia, y que son resistentes al tratamiento, se ha observado un menor potencial de membrana mitocondrial y una mayor expresión de UCP2, lo que podría indicar que la UCP2 se encuentre relacionada con la



resistencia a la quimioterapia. Todo esto junto a otros estudios nos dan evidencias de que la UCP2 actúa positivamente sobre la supervivencia celular y el crecimiento de las células tumorales (12,16).

Sayed *et al.* demostró que había una asociación entre la UCP2 y el grado del tumor en el cáncer de mama (17). Estos resultados se vieron reforzados por el estudio de Won *et al.* en el cual se demostró que la UCP2 se encuentra significativamente relacionada con el grado histológico y el recuento mitótico en el carcinoma ductal invasivo de la mama (18). Se ha visto que existe un dimorfismo sexual en la expresión de la UCP2 y que los estrógenos pueden modular la expresión de estas proteínas (4).

1.4. Tratamientos.

Diversos agentes utilizados en el tratamiento del cáncer promueven un incremento de la producción de ROS, ya sea directamente o por inhibición de los sistemas antioxidantes (7). El cisplatino (CDDP), el paclitaxel (PTX) y el tamoxifeno (TAM) son agentes utilizados en el tratamiento del cáncer de mama, entre otros, que en sus efectos presentan una elevación de la producción de ROS.

Uno de los agentes más efectivos y utilizados para el tratamiento de diversos tipos de cáncer es el CDDP. Esta molécula presenta una elevada reactividad y su mecanismo de acción se basa en la formación de aductos con el ADN nuclear, dañándolo e impidiendo la replicación y transcripción. Además de esto, induce una gran producción de estrés oxidativo ya que se acumula en el interior de las mitocondrias estableciendo también interacciones con el ADN mitocondrial y diversas proteínas (19,20). En otros estudios se ha podido observar que el CDDP inhibe la respiración mitocondrial en células de cáncer de colon, reduciendo la capacidad de síntesis de ATP (21).

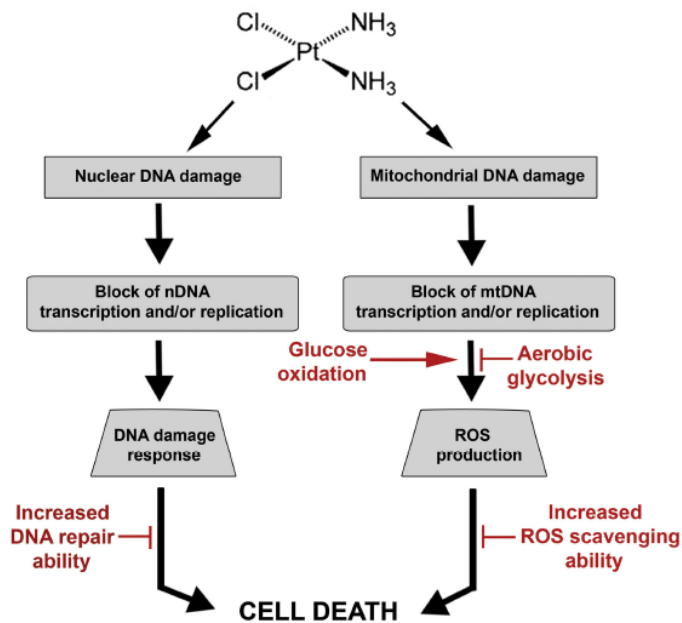


Figura 1.5. Efectos tóxicos del CDDP. El cisplatino provoca daños en el ADN mitocondrial y nuclear. Produce además, una disminución de la síntesis de proteínas mitocondriales y un incremento en la producción de ROS. Todo esto resultará en la muerte celular (19).

Otro agente quimioterapéutico ampliamente utilizado es el PXT. Este fármaco presenta un mecanismo de acción dirigido a la estabilización de los microtúbulos. El efecto primario que produce en las células es la estabilización anormal de la dinámica de los microtúbulos, lo que lleva a que no se pueda realizar con normalidad la mitosis. También se alteran otras funciones celulares relacionadas con los microtúbulos como la señalización intracelular o el transporte de orgánulos (22). Además, se ha propuesto un modo de acción del PTX en células de melanoma que consiste en una regulación a la baja de la UCP2. Esto se produciría a través de la activación de las vías de señalización de las MAP quinasas y produciría una elevada generación de ROS (23). Otras acciones descritas son, además de la activación de las MAP quinasas, la activación de Raf-1, Tyr- quinasas y la regulación de proteínas de la familia de Bcl-2, lo que lleva a la regulación de vías de señalización como ERK/Akt y a la producción de ROS (24).

El TAM es un antiestrógeno ampliamente utilizado desde 1973 como adyuvante en el tratamiento del cáncer de mama sensible a estrógenos. También se utiliza como agente quimiopreventivo en mujeres que presentan un elevado riesgo de padecer cáncer de mama (25,26). Los efectos anticancerígenos del TAM se han relacionado con sus efectos antiestrogénicos, ya que se une al receptor de estrógenos (ER) provocando una inhibición competitiva, lo que lleva a la muerte celular por apoptosis (25). Además, en estudios recientes se ha visto que el TAM puede inducir la apoptosis de manera no dependiente de estrógenos, estimulando la formación de ROS (26). Además de la producción de ROS, se ha



relacionado la apoptosis provocada por el TAM con la activación de determinadas proteínas como ERK, JNK, el factor transformante β y miembros de la familia Bcl-2 (24). No obstante, se ha visto que aumenta el riesgo de padecer cáncer de endometrio debido a que provoca daños en el ADN (25).



2. OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL.

El objetivo del trabajo ha consistido en analizar cómo afecta la inhibición de la UCP2 mediante un siRNA específico a la producción de radicales libres de oxígeno producida por los distintos tratamientos citotóxicos utilizados (CDDP, PTX y TAM), así como a la viabilidad celular y a la función mitocondrial.

En estudios anteriores se ha visto que las proteínas UCPs juegan un papel muy importante en el desarrollo del cáncer y en la sensibilidad a la quimioterapia mediante el control que ejercen sobre la producción de ROS. Por esta razón, estas proteínas podrían ser una diana terapéutica para la mejora del tratamiento ya que una inhibición mediante un inhibidor específico produciría un incremento de la producción de ROS y en consecuencia, de la muerte celular (27).

La línea celular MCF-7 se sometió a una transfección con un siRNA específico para la UCP2, y tras 24 horas se le aplicaron los distintos tratamientos (CDDP, PTX y TAM) o bien el DMSO en el grupo control. Tras 48 horas de tratamiento se realizaron las siguientes determinaciones:

1. Análisis de la viabilidad celular mediante el cristal violeta y la formación de vacuolas autofágicas mediante *Monodansylcadaverine* (MDC).
2. Análisis de la producción de ROS, a través del análisis de la producción de H₂O₂ mediante *Amplex Red* y el análisis del potencial de membrana mitocondrial mediante *TMRM*.
3. Niveles de UCP2 mediante *Western Blot* para comprobar cómo afectan los tratamientos a los niveles de esta proteína y si se ha producido correctamente la inhibición mediante el siRNA.
4. Análisis de la función mitocondrial mediante los niveles de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial (OXPHOS): complejo I o NADH deshidrogenasa, complejo II o succinato deshidrogenasa, complejo III o CoQ- citocromo c reductasa, complejo IV o citocromo c oxidasa (COX) y complejo V o ATP sintasa/ ATPasa utilizando la técnica de *Western Blot*.



3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Reactivos.

El medio *Dulbecco's Modified Eagle's medium* (DMEM) pertenece a la casa comercial GIBCO (Paisley, UK). Los tratamientos cisplatino (*cis-diamminedichloroplatinum II* o CDDP), tamoxifeno (*trans-2-[4-(1,2-Diphenyl-1-butenyl)phenoxy]-N,N-dimethylethylamine* o TAM) y paclitaxel (*Taxus brevifolia* o PTX) fueron comprados en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Los reactivos de rutina se obtuvieron de Sigma-Aldrich, Roche (Barcelona, España), Panreac (Barcelona, España) y Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA).

3.2. Cultivos celulares.

La línea celular humana de cáncer de mama MCF-7 fue obtenida de *American Type Culture Collection* (ATCC; Manassas, VA, USA). El medio utilizado para el cultivo celular fue DMEM suplementado con un 10% (v/v) de suero bovino fetal (FBS) y un 1% (v/v) de antibióticos (penicilina y estreptomina). Las células se mantuvieron en una atmosfera humidificada con un 5% de CO₂ a 37°C y se sembraron en placas de manera que se encontraran en confluencia para realizar las distintas determinaciones.

3.3. Transfección y tratamientos.

Para la realización de la transfección las células se sembraron en placas p6 o p96 según cual fuera la determinación posterior. Tras 24 horas, a un 60% de confluencia, fueron transfectadas durante 6 horas con un ARN de interferencia (siRNA) específico para la UCP2 adquirido en Santa Cruz Biotechnology (UCP2 siRNA (h): sc-42682) o bien tratadas con el vehículo utilizado para la transfección, Lipofectamida 2000 *reagent* (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), utilizado según el protocolo del fabricante. Tras la transfección los complejos fueron eliminados y se sustituyeron por medio de crecimiento. Tras 24 horas las células fueron expuestas a un 0.1% DMSO (grupo control), 10 µM CDDP, 10 µM TAM o 10 nM PTX durante 48 horas. Estas concentraciones durante 48 horas ocasionaban la muerte del 50% de la población celular.



3.4. Extracción de proteína.

Para la extracción de proteína se sembraron 350000 células/pocillo en una placa p6. Tras 24 horas, al encontrarse a una confluencia del 60%, se realizó la transfección con un siRNA específico para la proteína UCP2 en la mitad de las células mientras que la otra mitad fueron tratadas con el vehículo (lipofectamina). Pasadas 24 horas más se aplicaron los tratamientos (cisplatino, tamoxifeno o paclitaxel) o DMSO en el caso del grupo control. Tras 48 horas de tratamiento se recogieron las células en 200 μ L de tampón RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% Deoxicolato de sodio, 1% Triton X-100, 1mM EDTA, 1mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 , 10 μ M leupeptina y 10 μ M pepstatina; 1 mM PMSF se añadió al final) mediante un raspador (*scraper*) y se sonicó la solución resultante. La sonicación se realizó en tres ciclos al 40% de 7 segundos cada uno. A continuación se centrifugó a 14000g, 4°C durante 5 min. Se recogió el sobrenadante y se cuantificó la proteína mediante un kit BCA, *bicinchoninic acid protein assay kit* (Pierce, Bonn, Germany).

3.5. Western Blot.

Para la realización del *Western Blot* SDS-PAGE se cargaron 20 μ g de proteína de cada lisado celular en un gel preparado al 10% de poliacrilamida. La electroforesis se realizó a 100V y una vez separadas las proteínas se realizó la transferencia a una membrana de nitrocelulosa a 100V durante 90 minutos. A esta membrana se le realizó un bloqueo mediante una solución al 5% de leche desnatada en polvo en TBS-Tween (20 mM de Tris-HCl, 0,13 mM de NaCl y 0,05% de Tween 20). Los anticuerpos primarios utilizados fueron: OXPHOS (MitoSciences, OR, USA) y UCP2 y tubulina (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Los anticuerpos secundarios fueron preparados con un 2% de leche en polvo y se reveló con ECL. Las bandas se visualizaron con el reactivo *Immun-Star® Western C® Kit* (Bio-rad) y la señal quimioluminiscente se capturó con un densitómetro *Chemidoc XRS* (Bio-rad) y se analizó mediante el software *Quantity One* (Bio-rad).

3.6. Viabilidad celular.

Para el análisis de la viabilidad celular se sembraron 15000 células MCF-7 por pocillo en una placa p96 y tras 24 horas, al encontrarse a una confluencia del 60%, la mitad de las células



fueron sometidas a la inhibición de la UCP2 mediante un siRNA mientras que la otra mitad fue sometida al vehículo (lipofectamida). Pasadas 24 horas, se aplicaron los tratamientos (cisplatino, paclitaxel o tamoxifeno) o bien DMSO en el grupo control. Tras 48 horas de tratamiento, se añadió cristal violeta al 0.5% (p/v) en ácido acético al 30% (v/v) durante 10 min. Después del lavado con agua destilada, se añadieron 100 μ l de metanol y se midió la absorbancia a 595 nm mediante el espectofotómetro *PowerWave XS Microplate Spectrophotometer* (BioTek Instruments, Inc.).

3.7. Producción de H₂O₂ (Producción ROS).

Para el análisis de la producción de H₂O₂ se utilizó el reactivo *Amplex Red Hydrogen Peroxid/Peroxidase* de Molecular Probes. Se sembraron 15000 células MCF-7 por pocillo en una placa de 96 pocillos y tras 24 horas, al encontrarse a una confluencia del 60%, la mitad de las células fueron sometidas a la inhibición de la UCP2 mediante un siRNA mientras que la otra mitad fue sometida al vehículo (lipofectamida). Pasadas 24 horas, se aplicaron los tratamientos (cisplatino, paclitaxel o tamoxifeno) o bien DMSO en el grupo control. Tras 48 horas de tratamiento, se añadió una cantidad de 50 μ M del reactivo y 0,1 U/mL de peroxidasa de rábano en tampón Krebs Ringer (145 mM NaCl, 4.86 mM KCl, 0.54 CaCl₂, 1.22 mM MgSO₄, 5.5 mM glucosa, 5.7 mM Fosfato de sodio a pH 7.4). La fluorescencia se midió mediante un fluorímetro FLx800 *microplate fluorescent reader* (Bio-Tek Winooski, Vermont, USA), a unas longitudes de onda de excitación y emisión de 571 y 585 nm respectivamente. Se detectó la pendiente durante 1 hora y los resultados se normalizaron por el número de células viables determinado mediante el cristal violeta.

3.8. Potencial de membrana mitocondrial.

El potencial de membrana mitocondrial se midió fluorimétricamente utilizando el *Tetramethylrhodamine methyl ester* (TMRM). Se sembraron 15000 células MCF-7 por pocillo en una placa de 96 pocillos y tras 24 horas, al encontrarse a una confluencia del 60%, la mitad de las células fueron sometidas a la inhibición de la UCP2 mediante un siRNA mientras que la otra mitad fue sometida al vehículo (lipofectamina). Pasadas 24 horas, se aplicaron los tratamientos (cisplatino, paclitaxel o tamoxifeno) o bien DMSO en el grupo control. Tras 48 horas de tratamiento, se añadió el reactivo en una concentración 100 nM y se dejó incubar



durante 15 minutos. Tras esta incubación se eliminó el reactivo y se incubó durante 10 minutos con medio fresco, el cual fue después eliminado y se añadió PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM). La fluorescencia se midió mediante un fluorímetro Flx800 *microplate fluorescent reader* (Bio-Tek Winooski, Vermont, USA), a unas longitudes de onda de excitación y emisión de 552 y 576 nm respectivamente. Los resultados se normalizaron por el número de células viables determinado mediante el cristal violeta.

3.9. Formación de vacuolas autofágicas.

La formación de vacuolas autofágicas se midió fluorimétricamente utilizando el *Monodansylcadaverine* (MDC). Se sembraron 15000 células MCF-7 por pocillo en una placa de 96 pocillos y tras 24 horas, al encontrarse a una confluencia del 60%, la mitad de las células fueron sometidas a la inhibición de la UCP2 mediante un siRNA mientras que la otra mitad fue sometida al vehículo (lipofectamina). Pasadas 24 horas, se aplicaron los tratamientos (cisplatino, paclitaxel o tamoxifeno) o bien DMSO en el grupo control. Tras 48 horas de tratamiento, se añadió el reactivo en una concentración 50 μ M y se dejó incubar durante 15 minutos. Tras esta incubación se eliminó el reactivo y se incubó durante 10 minutos con medio fresco, el cual fue después eliminado y se añadió PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM). La fluorescencia se midió mediante un fluorímetro Flx800 *microplate fluorescent reader* (Bio-Tek Winooski, Vermont, USA), a unas longitudes de onda de excitación y emisión de 340 y 535 nm respectivamente. Los resultados se normalizaron por el número de células viables determinado mediante el cristal violeta.

3.10. Análisis estadístico.

Para la realización de todos los análisis estadísticos se utilizó el programa *Statistical Program for the Social Sciences software for Windows* (SPSS, versión 21.0; SPSS Inc, Chicago, IL). Los datos se han expresado como las medias \pm error estándar de la media (SEM). Los efectos de la inhibición de la UCP2 y del tratamiento con cisplatino, paclitaxel o tamoxifeno se analizaron mediante un análisis ANOVA y cuando los resultados mostraban efectos interactivos significativos, se realizó un análisis *post hoc* mediante t-Student para buscar las diferencias significativas entre los grupos experimentales. Las diferencias significativas se consideran cuando $p < 0.05$.



4. RESULTADOS.

A continuación se presentan los resultados obtenidos de las diversas determinaciones realizadas después de los distintos tratamientos (cisplatino, tamoxifeno y paclitaxel) y la inhibición de la UCP2 mediante un siRNA específico (inhibición de un 20% de la cantidad de proteína). En todos los gráficos se representa la media y los correspondientes errores (SEM). Los resultados obtenidos para las células control y que no presentan la inhibición por el siRNA se han tomado como referencia, siendo considerados el 100%. El resto de resultados se han representado como % respecto a éste.

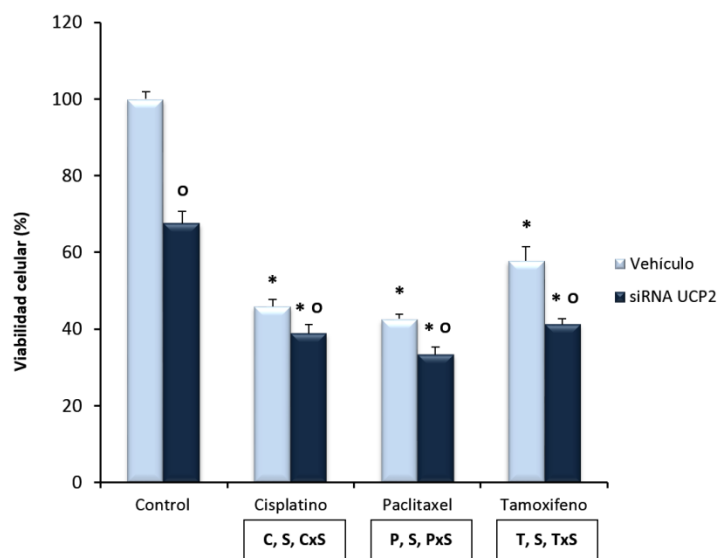


Figura 4.1. Representación gráfica de la viabilidad celular en respuesta a los tratamientos con cisplatino, paclitaxel y tamoxifeno, y a la inhibición de la UCP2 en la línea MCF-7. ANOVA ($p < 0.05$): C indica efecto tratamiento Cisplatino, P efecto Paclitaxel, T efecto Tamoxifeno, S efecto de siRNA de UCP2, CxS efecto interactivo Cisplatino y siRNA, PxS efecto interactivo Paclitaxel y siRNA y TxS efecto interactivo Tamoxifeno y siRNA.

Análisis post hoc (*t*-student, $p < 0.05$): (*) indica las diferencias significativas estadísticamente entre tratado con Cisplatino, Paclitaxel o Tamoxifeno versus control; (o) las diferencias entre tratado con siRNA de UCP2 versus vehículo.

En la **figura 4.1** se representa la viabilidad celular medida mediante cristal violeta en la línea MCF-7 sin tratar con el siRNA, azul claro, y tratada con el siRNA para la UCP2, azul oscuro. Se observó que los tres tratamientos provocaron tanto en las células que presentaban una inhibición de la UCP2 como en las que no una disminución significativa de la viabilidad. Además, se observó como el siRNA provocó una disminución significativa de la viabilidad celular en las células sometidas a los tres tratamientos, especialmente en TAM.

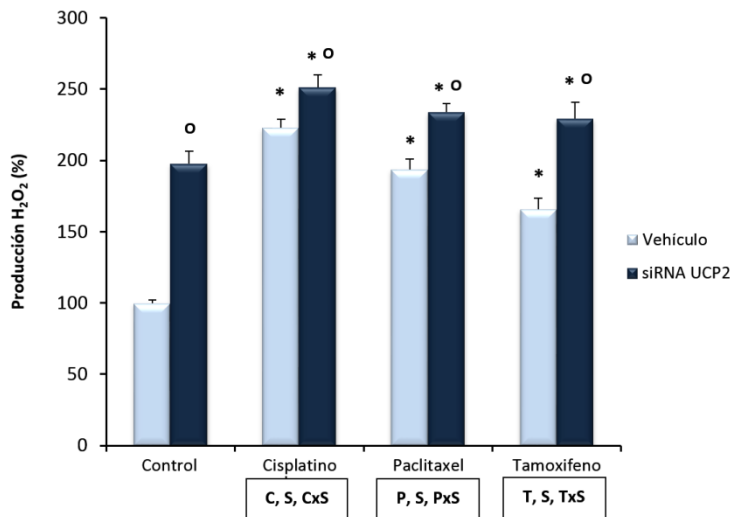
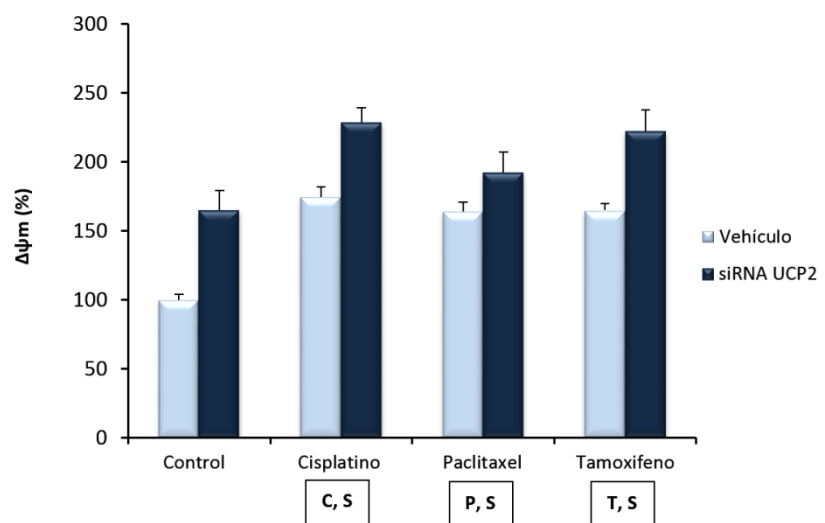


Figura 4.2. Representación gráfica de la producción de H_2O_2 en respuesta a los tratamientos con cisplatino, paclitaxel y tamoxifeno, y a la inhibición de la UCP2 en la línea MCF-7. ANOVA ($p < 0.05$): C indica efecto tratamiento Cisplatino, P efecto Paclitaxel, T efecto Tamoxifeno, S efecto de siRNA de UCP2, CxS efecto interactivo

Cisplatino y siRNA, PxS efecto interactivo Paclitaxel y siRNA y TxS efecto interactivo Tamoxifeno y siRNA. Análisis post hoc (t-student, $p < 0.05$): (*) indica las diferencias significativas estadísticamente entre tratado con Cisplatino, Paclitaxel o Tamoxifeno versus control; (o) las diferencias entre tratado con siRNA de UCP2 versus vehículo.

En la **figura 4.2** se representa la producción de H_2O_2 medida mediante *Amplex Red*. Se observó como en las células sometidas a un tratamiento con cisplatino, paclitaxel o tamoxifeno, tanto las que presentaban la UCP2 inhibida como las que no, se produjo un aumento significativo de la producción de H_2O_2 . Del mismo modo, en las células sometidas a un mismo tratamiento, la inhibición de la UPC2 produjo un aumento significativo de la producción de peróxido de hidrógeno.

Figura 4.3. Representación gráfica del potencial de membrana mitocondrial en respuesta a los tratamientos con cisplatino, paclitaxel y tamoxifeno, y a la inhibición de la UCP2 en la línea MCF-7. ANOVA ($p < 0.05$): C indica efecto tratamiento Cisplatino, P efecto Paclitaxel, T efecto Tamoxifeno, S efecto de siRNA de UCP2.





Se observó como en las células sometidas a un tratamiento con cisplatino, paclitaxel o tamoxifeno, tanto las que presentaban la UCP2 inhibida como las que no, se produjo un aumento del potencial de membrana mitocondrial, medido mediante TMRM (**figura 4.3**). Del mismo modo, se observó como las células que presentaban la UCP2 inhibida presentaron un potencial de membrana mitocondrial más elevado que las que no, especialmente en las células tratadas con TAM.

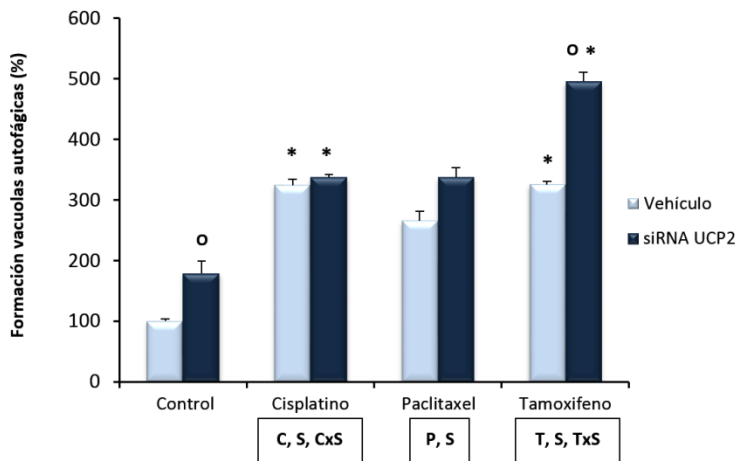
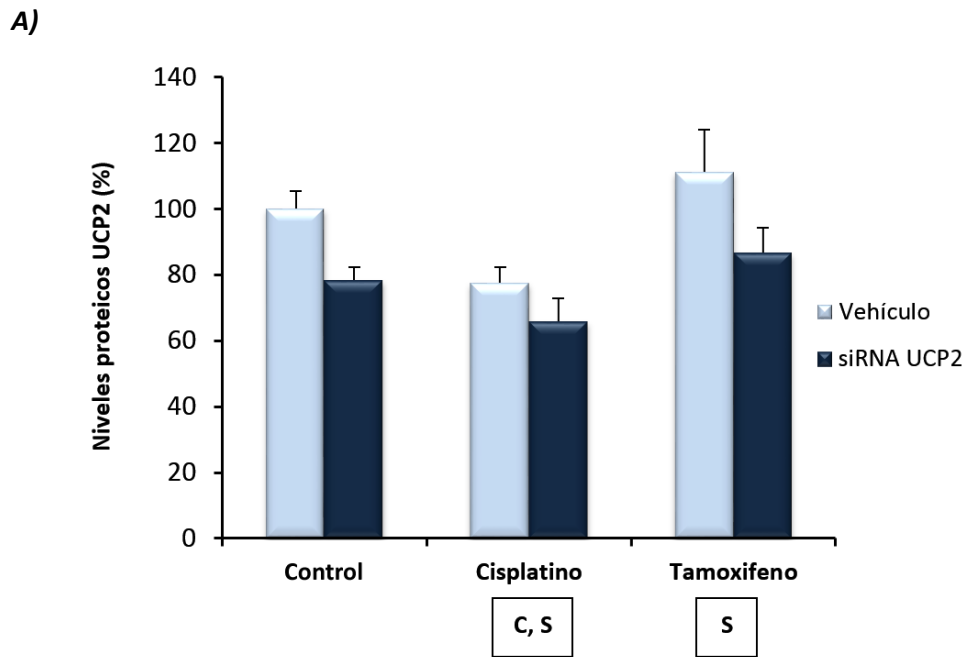


Figura 4.4. Representación gráfica de la formación de vacuolas autofágicas en respuesta a los tratamientos con cisplatino, paclitaxel y tamoxifeno, y a la inhibición de la UCP2 en la línea MCF-7. ANOVA ($p < 0.05$): C indica efecto tratamiento Cisplatino, P efecto Paclitaxel, T efecto Tamoxifeno, S efecto de siRNA de UCP2, CxS efecto interactivo Cisplatino y siRNA y TxS efecto interactivo Tamoxifeno y siRNA. Análisis post hoc (t-student, $p < 0.05$): (*) indica las diferencias significativas estadísticamente entre tratado con Cisplatino, Paclitaxel o Tamoxifeno versus control; (o) las diferencias entre tratado con siRNA de UCP2 versus vehículo.

Tamoxifeno, S efecto de siRNA de UCP2, CxS efecto interactivo Cisplatino y siRNA y TxS efecto interactivo Tamoxifeno y siRNA. Análisis post hoc (t-student, $p < 0.05$): (*) indica las diferencias significativas estadísticamente entre tratado con Cisplatino, Paclitaxel o Tamoxifeno versus control; (o) las diferencias entre tratado con siRNA de UCP2 versus vehículo.

En la **figura 4.4** se representa la formación de vacuolas autofágicas medidas mediante MDC. Se observó como en las células tratadas con cisplatino y tamoxifeno se produjo un aumento significativo de la formación de vacuolas autofágicas, tanto en las que presentaban la UCP2 inhibida como en las que no. En el caso de las células tratadas con tamoxifeno y que presentaban la UCP2 inhibida, el aumento fue mucho más pronunciado y además hay diferencias significativas respecto a las tratadas con el mismo fármaco pero que no presentaban la UCP2 inhibida. En el caso de las células tratadas con paclitaxel se produjo un aumento respecto a las tratadas con el vehículo, tanto las que presentaban la UCP2 inhibida como las que no, sin que la pauta sea estadísticamente significativa.



B)

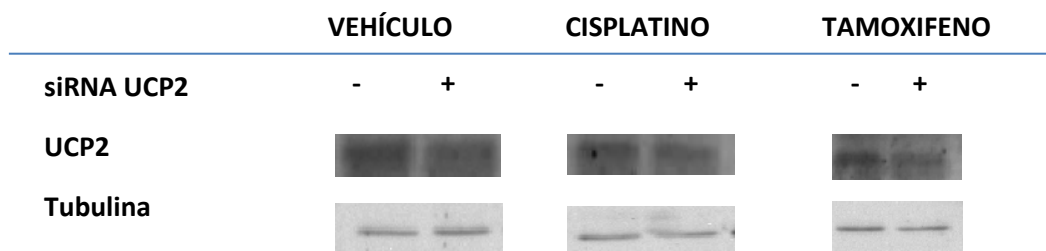


Figura 4.5. **A)** Representación gráfica de los niveles de la proteína UCP2 en respuesta a los tratamientos con cisplatino y tamoxifeno, y a la inhibición de la UCP2 en la línea MCF-7. ANOVA ($p < 0.05$): C indica efecto tratamiento Cisplatino, S efecto de SiRNA de UCP2. **B)** Imagen correspondiente al Western Blot de la UCP2 de las células sometidas a los distintos tratamientos y a la inhibición de dicha proteína, la tubulina se ha utilizado como housekeeping.

En la **figura 4.5** se representan los niveles de UCP2 medidos mediante *Western Blot*. Se observó como las células tratadas con cisplatino presentaron unos niveles de UCP2 menores que las sometidas al vehículo. Además, se observó que las células que presentaban la UCP2 inhibida presentaron unos niveles menores de esta proteína.

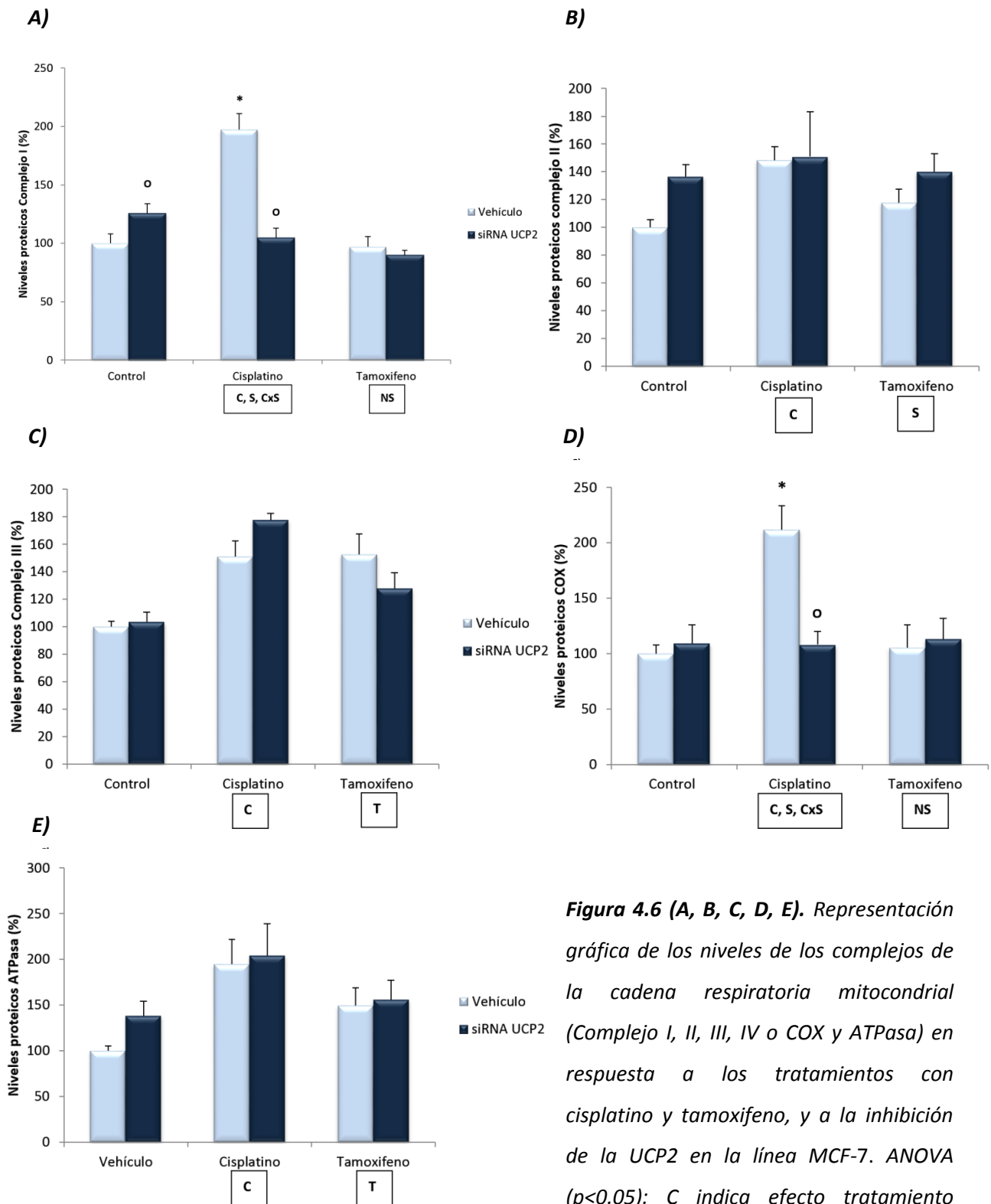


Figura 4.6 (A, B, C, D, E). Representación gráfica de los niveles de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial (Complejo I, II, III, IV o COX y ATPasa) en respuesta a los tratamientos con cisplatino y tamoxifeno, y a la inhibición de la UCP2 en la línea MCF-7. ANOVA ($p < 0.05$): C indica efecto tratamiento Cisplatino, T efecto tratamiento Tamoxifeno, S efecto de SiRNA de UCP2, CxS efecto interactivo Cisplatino y siRNA y NS ausencia de efecto. Análisis post hoc (t-student, $p < 0.05$): (*) indica las diferencias significativas estadísticamente entre tratado con Cisplatino, Paclitaxel o Tamoxifeno versus control; (o) las diferencias entre tratado con siRNA de UCP2 versus vehículo.

Cisplatino, T efecto tratamiento Tamoxifeno, S efecto de SiRNA de UCP2, CxS efecto interactivo Cisplatino y siRNA y NS ausencia de efecto. Análisis post hoc (t-student, $p < 0.05$): (*) indica las diferencias significativas estadísticamente entre tratado con Cisplatino, Paclitaxel o Tamoxifeno versus control; (o) las diferencias entre tratado con siRNA de UCP2 versus vehículo.



En la **figura 4.6** se representan los niveles de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial medidos mediante *Western Blot*. En el caso del Complejo I y la COX (Complejo IV o citocromo c oxidasa) se observó un comportamiento similar, en los grupos tratados con cisplatino se observó un aumento significativo de los niveles proteicos respecto al grupo tratado con el vehículo en el caso en el que no presentaban la UCP2 inhibida. Además, se observó una disminución significativa de estos niveles entre las que presentaban la UCP2 inhibida y las que no. Respecto al resto de complejos, se observó como de manera general el tratamiento con citotóxicos produjo un aumento de los niveles proteicos.

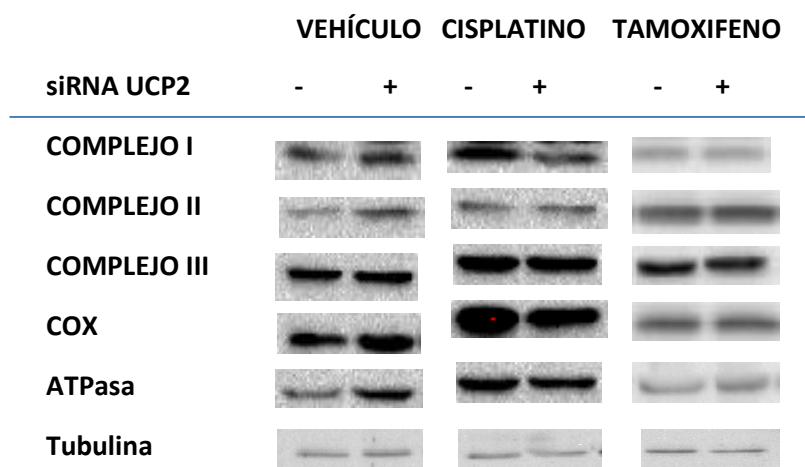


Figura 4.7. Imágenes correspondientes al *Western Blot* de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial de las células sometidas a los distintos tratamientos y a la inhibición de la UCP2 mediante un siRNA, la tubulina se ha utilizado como house-keeping.



5. DISCUSIÓN.

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede observar como la inhibición de la UCP2 mediante un siRNA específico produce una marcada disminución de la viabilidad celular. Además, al someter a las células a los distintos tratamientos (CDDP, PTX y TAM) y a la inhibición de la UCP2 la disminución de la viabilidad celular es mayor que en las células sometidas únicamente a los tratamientos. A su vez, la inhibición de la UCP2 induce un aumento de la producción de H_2O_2 de manera bastante paralela a la disminución de la viabilidad celular. Esto podría indicar que la inhibición de esta proteína aumenta la muerte celular debido a una mayor producción de ROS. Estos resultados concuerdan con la función descrita para esta proteína, ya que se ha visto que al disipar el gradiente protónico, se produce una disminución del $\Delta\psi_m$ y disminuye la producción de radicales libres en la mitocondria (28).

También se puede observar según los resultados como aumenta el $\Delta\psi_m$ en respuesta a los tratamientos (cisplatino, paclitaxel y tamoxifeno) y como la inhibición de la UCP2 amplifica el efecto producido por los tratamientos sobre este parámetro. Estos resultados concuerdan con la mayor producción de ROS, ya que al inhibirse esta proteína la producción de estas moléculas aumenta, y al no disiparse el gradiente protónico, el $\Delta\psi_m$ aumenta. Todo esto concuerda con las observaciones realizadas en tumores de colon en los que se ha relacionado una sobreexpresión de la UCP2 con un menor $\Delta\psi_m$ y con una menor susceptibilidad a sufrir daño oxidativo (16).

El aumento de la producción de ROS es un mecanismo ampliamente utilizado y promovido por diversos agentes quimioterapéuticos y como se ha comentado anteriormente en este trabajo, los tres tratamientos citotóxicos utilizados, CDDP, PTX y TAM, aunque presentan mecanismos de acción diferentes, tienen en común el hecho de aumentar la producción de ROS (7,24). Este hecho se encuentra reflejado en los resultados y al inhibirse la proteína UCP2 este efecto se ve amplificado, aumentando así el resultado producido por los tratamientos sobre la producción de ROS. Al medirse la efectividad de la inhibición de la UCP2 mediante *Western Blot*, se pudo observar como en todos los casos la expresión de esta proteína se encontraba reducida. No obstante, se debe tener en cuenta que el tratamiento con CDDP produce una disminución de la expresión de esta proteína, hecho que puede



explicar que en las células tratadas con este agente los efectos que produce la inhibición de la UCP2 no sean tan marcados como en las sometidas a los otros tratamientos. Esta disminución de la UCP2 como efecto del tratamiento con CDDP se ha podido observar en otros estudios con células de cáncer de colon (21).

La autofagia consiste en un proceso de degradación mediado por lisosomas en el cual se eliminan constituyentes celulares dañados o no esenciales. En este proceso se forman vesículas de doble membrana, los autofagosomas, las cuales se fusionarán con los lisosomas para formar los autolisosomas, facilitando así la degradación del material englobado mediante las hidrolasas lisosomales (29,30). Este proceso presenta la función fisiológica de mantener el balance entre la biogénesis de los orgánulos celulares y la síntesis proteica y su degradación, pero también se ha descrito que funciona como un mediador importante de la señalización de los ROS y el daño proteico (30). De este modo, una autofagia persistente y a un nivel muy elevado provoca la muerte celular, conocida como muerte celular programada-2 (proceso diferente a la apoptosis o muerte celular programada-1) (29).

Se puede observar como con la inhibición de la UCP2 aumenta la formación de vacuolas autofágicas. Los tres tratamientos provocan en sí un aumento de este proceso, pero en el caso del TAM, este aumento se ve muy amplificado con la inhibición de la UCP2. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en estudios anteriores en los que se ha visto que la inhibición de la UCP2 promueve una translocación dependiente de ROS del enzima gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) hacia el núcleo, lo que promueve la formación de autofagosomas y la expresión del marcador de autofagia LC3-II (30). Además, en otros estudios se ha observado como el tratamiento de la línea celular MCF-7 con TAM provoca un aumento de la muerte celular por autofagia (31).

En el análisis de la función mitocondrial, se puede observar como los tratamientos producen de manera general un aumento de los niveles de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial. Esto podría consistir en un mecanismo de adaptación celular a los elevados niveles de ROS producidos por los tratamientos, ya que mediante un aumento de la biogénesis mitocondrial se podría intentar compensar el daño producido por los ROS en las mitocondrias. En otros estudios se ha visto que el tratamiento con CDDP produce una marcada disminución de la actividad de la COX pero que al contrario, los niveles proteicos se mantienen (32). No obstante, la inhibición de la UCP2 produce una disminución marcada de



los niveles de los complejos I y IV (COX) en las células tratadas con CDDP, lo que podría ser debido a una desregulación del proceso debido a la gran cantidad de ROS generada. Esta disminución podría estar también relacionada con el marcado aumento de la autofagia que se observa con la inhibición de la UCP2 ya que una eliminación de las mitocondrias dañadas debido al marcado incremento de los ROS podría verse reflejado en una disminución de los niveles proteicos de estos complejos. No obstante, en otros estudios se ha observado que determinadas líneas celulares de cáncer de mama presentan unos niveles proteicos de todos los complejos que constituyen la cadena respiratoria mitocondrial reducidos, en comparación con las células sanas (33).

Por tanto, la inhibición de la UCP2 produce un aumento de la muerte celular por autofagia, especialmente en combinación con el tratamiento con TAM, debido a la gran elevación en los niveles de ROS que produce, hecho que se refleja en los valores del $\Delta\psi_m$ y la viabilidad celular. Además, los citotóxicos utilizados ya producen mediante su propio mecanismo de acción una elevación de los niveles de ROS, por lo que al inhibir la proteína UCP2 este fenómeno se ve aún más amplificado, mejorando la acción de estos tratamientos. Mediante la combinación de la inhibición de la UCP2 y los tratamientos con CDDP y TAM también se produce una disminución de la función mitocondrial, que podría estar ligada al aumento de la autofagia.

De este trabajo se puede extraer, por tanto, la gran importancia de la UCP2 como posible diana terapéutica en el cáncer de mama, así como la necesidad de realizar más investigaciones en el campo clínico para determinar en muestras de pacientes cómo influyen los niveles de esta proteína en el tratamiento o el pronóstico del cáncer.



CONCLUSIONES.

1. La inhibición de la UCP2 podría incrementar la muerte celular debido al incremento que produce en la producción de ROS, especialmente la muerte mediante autofagia. Este efecto es especialmente notable cuando se combina la inhibición de la UCP2 con el tratamiento con TAM.
2. La inhibición de la UCP2 combinada con el tratamiento mediante CDDP, PXT y TAM produce una amplificación del efecto producido por estos citotóxicos, especialmente de la producción de ROS.
3. El tratamiento con CDDP provoca una disminución de los niveles proteicos de UCP2, lo que podría ser la causa del incremento que produce en la producción de ROS.
4. La UCP2 podría constituir una diana terapéutica en el cáncer de mama en combinación con distintos agentes citotóxicos, y especialmente, en combinación con el antiestrógeno TAM.



REFERENCIAS.

1. Asociación Española contra el cáncer. aecc. [visitado 2015 May 16]. Disponible en: <https://www.aecc.es/SobreElCancer/CancerPorLocalizacion/CancerMama/Paginas/incidencia.aspx>
2. International Agency for Research on Cancer. Fact Sheets by Cancer. [visitado 2015 May 16]. Disponible en: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx
3. International WCRF. Breast cancer statistics | World Cancer Research Fund International [Internet]. [visitado 2015 May 16]. Available from: <http://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/data-specific-cancers/breast-cancer-statistics>
4. 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*. Elsevier Inc.; 2010;48(4):506–12.
5. Waris G, Ahsan H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J Carcinog* . 2006;5:14.
6. Sainz RM, Lombo F, Mayo JC. Radical decisions in cancer: redox control of cell growth and death. *Cancers (Basel)*. 2012;4(2):442–74.
7. Nogueira V, Hay N. Molecular pathways: reactive oxygen species homeostasis in cancer cells and implications for cancer therapy. *Clin Cancer Res [Internet]*. 2013;19(16):4309–14.
8. Valle A, Oliver J, Roca P. Role of uncoupling proteins in cancer. *Cancers (Basel)* . 2010;2(2):567–91.
9. Fleury C, Neverova M, Collins S, Raimbault S, Champigny O, Levi-Meyrueis C, et al. Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet* . 1997 Mar;15(3):269–72.
10. Baffy G, Derdak Z, Robson SC. Mitochondrial recoupling: a novel therapeutic strategy for cancer? *Br J Cancer* . 2011;105(4):469–74.
11. Walder K, Norman RA, Hanson RL, Schrauwen P, Neverova M, Jenkinson CP, et al. Association between uncoupling protein polymorphisms (UCP2-UCP3) and energy metabolism/obesity in Pima indians. *Hum Mol Genet* . 1998 Sep ;7(9):1431–5.
12. Baffy G. Uncoupling protein-2 and cancer. *Mitochondrion* . 2010;10(3):243–52.
13. Nübel T, Ricquier D. Respiration under control of uncoupling proteins: Clinical perspective. *Horm Res* . 2006 Jan ;65(6):300–10.



14. Echtay KS, Roussel D, St-Pierre J, Jekabsons MB, Cadenas S, Stuart JA, et al. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* . 2002 Jan 3 ;415(6867):96–9.
15. 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 Sep 15 ;10(18 Pt 1):6203–7.
16. Harper ME, Antoniou A, Villalobos-Menuey E, Russo A, Trauger R, Vendemelio M, et al. Characterization of a novel metabolic strategy used by drug-resistant tumor cells. *FASEB J*. 2002;16(12):1550–7.
17. Sayeed A, Meng Z, Luciani G, Chen LC, Bennington JL, Dairkee SH. Negative regulation of UCP2 by TGFbeta signaling characterizes low and intermediate-grade primary breast cancer. *Cell Death Dis*. 2010;1:e53.
18. Won KY, Kim GY, Kim YW, Lim S-J, Song JY. Uncoupling Protein 2 (UCP2) and p53 Expression in Invasive Ductal Carcinoma of Breast. *Korean J Pathol*. 2010;44(6):565.
19. Marullo R, Werner E, Degtyareva N, Moore B, Altavilla G, Ramalingam SS, et al. Cisplatin induces a mitochondrial-ROS response that contributes to cytotoxicity depending on mitochondrial redox status and bioenergetic functions. *PLoS One* . 2013;8(11):e81162.
20. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* . 2007;7(8):573–84.
21. 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.
22. Pons DG, Sastre-Serra J, Nadal-Serrano M, Oliver A, Garcia-Bonafe M, Bover I, et al. Initial activation status of the antioxidant response determines sensitivity to carboplatin/paclitaxel treatment of ovarian cancer. *Anticancer Res*. 2012;32(11):4723–8.
23. Selimovic D, Hassan M, Haikel Y, Hengge UR. Taxol-induced mitochondrial stress in melanoma cells is mediated by activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 pathways via uncoupling protein 2. *Cell Signal*. 2008;20(2):311–22.
24. Zhang Z, Teruya K, Yoshida T, Eto H, Shirahata S. Fucoidan extract enhances the anti-cancer activity of chemotherapeutic agents in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cells. *Mar Drugs*. 2013;11(1):81–98.
25. Yaacob NS, Nengsih A, Norazmi MN. Tualang honey promotes apoptotic cell death induced by tamoxifen in breast cancer cell lines. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:989841.



26. Lee YH, Kang BS, Bae YS. Premature senescence in human breast cancer and colon cancer cells by tamoxifen-mediated reactive oxygen species generation. *Life Sci* . 2014;97(2):116–22.
27. Sastre-Serra J, Nadal-Serrano M, Pons DG, Valle A, Garau I, García-Bonafé M, et al. The oxidative stress in breast tumors of postmenopausal women is ER α /ER β ratio dependent. *Free Radic Biol Med*. Elsevier; 2013;61:11–7.
28. Derdak Z, Mark NM, Beldi G, Robson SC, Wands JR, Baffy G. The mitochondrial uncoupling protein-2 promotes chemoresistance in cancer cells. *Cancer Res*. 2008;68(8):2813–9.
29. Cook KL, Shajahan AN, Clarke R. Autophagy and endocrine resistance in breast cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2011;11(8):1283–94.
30. Dando I, Fiorini C, Pozza ED, Padroni C, Costanzo C, Palmieri M, et al. UCP2 inhibition triggers ROS-dependent nuclear translocation of GAPDH and autophagic cell death in pancreatic adenocarcinoma cells. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. Elsevier B.V.; 2013;1833(3):672–9.
31. Bursch W, Ellinger A, Kienzl H, Torok L, Pandey S, Sikorska M, et al. Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy. *Carcinogenesis*. 1996;17(8):1595–607.
32. Zsengeller ZK, Ellezian L, Brown D, Horvath B, Mukhopadhyay P, Kalyanaraman B, et al. Cisplatin Nephrotoxicity Involves Mitochondrial Injury with Impaired Tubular Mitochondrial Enzyme Activity. *J Histochem Cytochem* [Internet]. 2012;
33. Putignani L, Raffa S, Pescosolido R, Aimati L, Signore F, Torrisi MR, et al. Alteration of expression levels of the oxidative phosphorylation system (OXPHOS) in breast cancer cell mitochondria. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;110(3):439–52.