



Universidad Nacional del Sur

TESIS DE DOCTOR EN BIOQUÍMICA

**17 β -ESTRADIOL PROMUEVE
LA SOBREVIVENCIA DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO:
MITOCONDRIA COMO BLANCO ESTROGÉNICO,
ACCIÓN ANTIAPOPTÓTICA Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN
INTRACELULAR**

ANABELA BELÉN LA COLLA

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2015


DIRECTORA DE TESIS

DRA. ANDREA VASCONSUELO

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Bioquímica de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur y del Laboratorio de Química Biológica del Instituto de Ciencias Biológicas y Biomédicas del Sur (INBIOSUR), dependiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), durante el período comprendido entre el 30 de agosto de 2011 y el 9 de noviembre de 2015, bajo la dirección de la Dra. Andrea Vasconsuelo (INBIOSUR-CONICET).

Bioq. Anabela Belén La Colla

	<p>UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR Secretaría General de Posgrado y Educación Continua</p> <p>La presente tesis ha sido aprobada el / /, mereciendo la calificación de(.....)</p>
---	--

A mi mamá....

Agradecimientos

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a las siguientes instituciones y personas:

A la Universidad Nacional del Sur y el Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, por ofrecerme una educación de grado y brindarme un lugar y los recursos necesarios para desarrollar mi formación académica de postgrado.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgarme una beca de postgrado que posibilitó el desarrollo de este trabajo de tesis.

A la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC) por otorgarme una beca para alumnos avanzados que permitió que diera mis primeros pasos en investigación.

A mi directora de tesis, la Dra. Andrea Vasconsuelo por su confianza, acompañamiento, apoyo y aliento en todo momento para la realización de esta tesis, por cuidarme siempre, y por su picardía y alegría que hicieron que esta etapa estuviese colmada de lindos momentos compartidos.

A la Dra. Lorena Milanesi por su bondad sin esperar nada a cambio desde un primer momento, sus consejos y su alegría.

A la Dra. Lucía Pronsato con quien hemos compartido estos 5 años como becarias, por su ayuda en todo momento, por sus mates de todas las mañanas y por la vida compartida en muchas de nuestras charlas.

A la Lic. Valeria Gili por nuestras charlas “filosóficas” y por nuestro estímulo mutuo para terminar la tesis.

A la Dra. Ana Carolina Ronda por su ayuda en la primera etapa de la tesis.

A la Dra. María Inés Prat y al Dr. Marcelo Gálvez por haber confiado en mí para que diera mis primeros pasos en investigación, y porque me aconsejaron y acompañaron siempre en lo académico y personal.

A las Bqcas. Adriana Martínez, Ileana Lencinas y Andrea Bianchimano por hacer que siempre terminara mis días de docencia con una sonrisa.

A mi familia porque cada uno de ellos, desde su lugar, me dió las fuerzas para seguir adelante, acompañándome y sosteniéndome siempre.

A Nico porque siempre me apoyó para que terminara la tesis, por cuidarme y por tu paciencia en los momentos difíciles.

Resumen

El 17 β -estradiol, una hormona clásicamente asociada a funciones reproductivas, ha adquirido trascendencia por sus efectos en varios tejidos no asociados a la reproducción. Asimismo, se ha propuesto que el 17 β -estradiol contribuiría a la supervivencia celular en varios tejidos. En músculo esquelético ha sido descripta la presencia de receptores de estrógenos (ER) aunque el mecanismo molecular activado por la hormona y el rol fisiológico de la misma en este tejido no han sido totalmente dilucidados. En este laboratorio, utilizando la línea celular de músculo esquelético murino C2C12 se demostró que, sumado a la localización citosólica-nuclear, los ER se encuentran en mitocondria y fracción microsomal.

En esta tesis, se investigó el rol del 17 β -estradiol sobre las cascadas de señalización que se activan durante la apoptosis en mioblastos esqueléticos, caracterizando los mecanismos moleculares involucrados y enfatizando sobre la modulación de funciones mitocondriales.

Los estudios realizados sugieren que la inducción de apoptosis con H₂O₂ en células C2C12 activa diferentes vías de señalización que incluyen la fosforilación temprana de PKD, y posteriormente las de JNK, PKC δ , PKC θ , p53 y p66Shc, efectos que son revertidos con el pretratamiento con 17 β -estradiol. En particular, PKC δ actúa *upstream* JNK que, a su vez, conduce a la fosforilación y translocación mitocondrial de p66Shc en respuesta al H₂O₂. Este efecto también es contrarrestado por 17 β -estradiol, resultando en la protección del potencial de membrana mitocondrial y la prevención de la apertura prolongada del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial. Esta acción protectora del 17 β -estradiol sobre la fisiología mitocondrial también incluye la inhibición de la translocación de Bax hacia mitocondria.

Asimismo, se observó que uno de los sucesos en el inicio de la apoptosis disparados por H₂O₂ es el aumento en la formación de estructuras tipo-TNT (*tunneling nanotubes*) entre las células para promover la transferencia de mitocondrias sanas desde las células no estresadas a las estresadas, mientras que el pretratamiento con la hormona disminuye su formación, efecto

probablemente relacionado con la reducción en la proporción de células estresadas que necesitarían revertir la disfunción mitocondrial. Estas mitocondrias disfuncionales producen mayor cantidad de especies reactivas del oxígeno y cuando sus niveles aumentan, las enzimas antioxidantes son fundamentales para contrarrestar sus efectos negativos. En esta tesis se observó que la disminución de la capacidad antioxidante inducida por H_2O_2 es revertida por el pretratamiento con 17β -estradiol mediante la regulación de las actividades enzimáticas y/o expresión proteica de MnSOD, GPx y CAT a través de ERs.

Por otra parte, se evidenció la regulación de FoxOs por 17β -estradiol que induciría la inhibición de la transcripción de genes proapoptóticos, y además que el inductor de apoptosis regula negativamente a nivel transcripcional a Bcl-2, y positivamente a p66Shc, PUMA y PERP, acciones que son revertidas por 17β -estradiol. Por otro lado, la regulación transcripcional de MDM2 por el H_2O_2 , que involucra a ERK, se relacionaría con la actividad de p53 y FoxO3a inactivo.

Esta tesis aporta conocimientos básicos sobre los mecanismos moleculares activados por 17β -estradiol frente a la apoptosis inducida por H_2O_2 en células musculares esqueléticas que resultan en supervivencia celular.

Abstract

17 β -estradiol, a hormone typically associated with reproductive functions, has gained significance for its effects on several tissues not associated with reproduction. Furthermore, it has been proposed that 17 β -estradiol contributes to cell survival in various tissues. In skeletal muscle it has been described the presence of estrogen receptors (ER) but the molecular mechanism activated by the hormone and its physiological role over this tissue have not been fully elucidated. In this laboratory, using the murine skeletal muscle cell line C2C12 it was shown that, in addition to the cytosolic-nuclear localization, the ER was found in mitochondria and microsomal fraction.

In this thesis, it was investigated the role of 17 β -estradiol on the signaling cascades that are activated during apoptosis in skeletal myoblasts, characterizing the molecular mechanisms involved and emphasizing on modulation of mitochondrial functions.

The studies suggest that induction of apoptosis with H₂O₂ in C2C12 cells activates different signaling pathways including early phosphorylation of PKD, and then the phosphorylation of JNK, PKC δ , PKC θ , p53 and p66Shc, effects that are reversed by pretreatment with 17 β -estradiol. In particular, PKC δ acts upstream JNK which, in turn, leads to phosphorylation and mitochondrial translocation of p66Shc in response to H₂O₂. This effect is counteracted by 17 β -estradiol, resulting in the protection of mitochondrial membrane potential and prevention of sustained opening of the mitochondrial permeability transition pore. This protective effect of 17 β -estradiol on mitochondrial physiology also includes the inhibition of Bax translocation to mitochondria.

It was also observed that one of the events in the beginning of apoptosis triggered by H₂O₂ is an augmented formation of TNT-like structures (tunneling nanotubes) between cells that promotes the transfer of healthy mitochondria from unstressed to stressed cells, whereas pretreatment with the hormone decreases its formation, effects that would probably be related to the reduction in the proportion of stressed cells that needs to reverse mitochondrial dysfunction. Since dysfunctional mitochondria produce more reactive oxygen species, when their

levels are increased, antioxidant enzymes are essential to counteract their negative effects. In this thesis, it was observed that the decrease in H₂O₂-induced antioxidant capacity is reversed by pretreatment with 17β-estradiol by regulating enzyme activities and/or protein expression of MnSOD, GPx and CAT via ERs.

Additionally, it was observed that the regulation of FoxOs mediated by 17β-estradiol would be related to the inhibition of transcription of proapoptotic genes, and moreover that the apoptotic inductor negatively regulates the transcriptional level of Bcl-2, and positively the transcriptional levels of p66Shc, PUMA and PERP. These actions are reversed by pretreatment with 17β-estradiol. Also, it was suggested that the transcriptional regulation of MDM2 by H₂O₂ involved ERK and that it could be related to p53 activity and inactive FoxO3a.

This thesis provides basic information on the 17β-estradiol-activated mechanisms against H₂O₂-induced apoptosis in skeletal muscle cells resulting in cell survival molecular mechanisms.

Certifico que fueron incluidos los cambios y correcciones sugeridas por los jurados.

Dra. Andrea Vasconsuelo

Indice

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. EL 17 β -ESTRADIOL	2
1.1.1. Descubrimiento de las hormonas: el caso de los estrógenos	2
1.1.2. Biosíntesis del 17 β -estradiol	3
1.1.3. Regulación de la biosíntesis del 17 β -estradiol y metabolismo	4
1.1.4. Funciones biológicas del 17 β -estradiol	5
1.1.5. Mecanismos de acción del 17 β -estradiol	6
1.1.5.1. Receptores de estrógenos	6
1.1.5.2. Acción nuclear y extra nuclear del 17 β -estradiol	10
1.1.6. Relación entre 17 β -estradiol y músculo esquelético	11
1.2. ESTRÉS OXIDATIVO	11
1.2.1. Especies reactivas del oxígeno (ROS)	12
1.2.2. Sistemas antioxidantes	13
1.2.2.1. Superóxido dismutasa (SOD)	14
1.2.2.2. Catalasa (CAT)	15
1.2.2.3. Glutación peroxidasa (GPx)	15
1.3. MUERTE CELULAR	16
1.3.1. Apoptosis	17
1.3.1.1. Caspasas	18
1.3.1.2. Proteínas de la familia Bcl-2	20
1.3.1.3. Mecanismo intrínseco: rol de la mitocondria	23
1.3.1.3.1. Poro de permeabilidad transitoria mitocondrial	24
1.3.1.4. Mecanismo extrínseco	26
1.3.1.5. Integración de la vía extrínseca e intrínseca	27
1.3.1.6. Comunicación intercelular: estructuras <i>tunneling nanotubes</i>	30
1.4. SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR ACTIVADA POR EL 17 β -ESTRADIOL EN MÚSCULO ESQUELÉTICO	32
1.4.1. Familias proteína quinasa C (PKC) y proteína quinasa D (PKD)	32
1.4.2. Quinasas c-Jun N-terminal (JNK)	36
1.4.3. p53 y p66Shc	38
1.4.4. Miembros de la clase O de la familia <i>Forkhead</i> (FoXOs)	42
1.5. ESTRÉS OXIDATIVO, ENVEJECIMIENTO Y SARCOPENIA	44
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	47
HIPÓTESIS	48
OBJETIVO GENERAL	49
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
III. METODOLOGÍA	51
3.1. MODELO EXPERIMENTAL	52
3.2. MATERIALES	52

3.3. MÉTODOS	55
3.3.1. Cultivo celular	55
3.3.2. Tratamientos.....	55
3.3.3. Cuantificación de proteínas totales.....	58
3.3.4. Fraccionamiento subcelular	58
3.3.5. Electroforesis en gel de poliacrilamida, electrotransferencia e inmunodetección (<i>Western blotting</i>)	59
3.3.6. Inmunocitoquímica.....	60
3.3.7. Determinación de la actividad PKC.....	61
3.3.8. Determinación de la actividad Catalasa (CAT)	62
3.3.9. Determinación de la actividad Manganese Superóxido Dismutasa (MnSOD).....	63
3.3.10. Determinación de la actividad Glutathión Peroxidasa (GPx)	64
3.3.11. Determinación de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) por microscopía de fluorescencia	65
3.3.12. Determinación de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) por citometría de flujo	66
3.3.13. Evaluación de la apertura del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (MPTP)	67
3.3.14. Ensayo de TUNEL (<i>Tdt-mediated dUTP Nick-End Labeling</i>).....	69
3.3.15. Observación de estructuras celulares tipo- <i>tunneling nanotubes</i> (TNT) por microscopía óptica.....	69
3.3.16. Observación de estructuras celulares tipo- <i>tunneling nanotubes</i> (TNT) por microscopía de fluorescencia	70
3.3.17. Evaluación de la función de estructuras celulares tipo- <i>tunneling nanotubes</i> (TNT) por microscopía de fluorescencia	70
3.3.18. Cuantificación de ARN y ADN	71
3.3.19. Extracción de ARN total.....	72
3.3.20. Reacción de retrotranscripción	72
3.3.21. Ensayo de RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR)	72
3.3.22. Análisis estadístico	74
IV. RESULTADOS	75
CAPÍTULO 1: ROL DEL 17β-ESTRADIOL EN EL MECANISMO MOLECULAR SUBYACENTE A LA APOPTOSIS INDUCIDA POR H₂O₂	77
1.1. Participación de las familias PKC y PKD	77
1.2. Participación de la quinasa JNK	86
1.3. Participación de p53 y p66Shc	88
1.4. Participación de miembros de la clase O de la familia <i>Forkhead</i>	96
1.5. Interacciones entre las vías de señalización intracelular activadas en la apoptosis y reguladas por E ₂	103

CAPÍTULO 2: EFECTOS DEL 17B-ESTRADIOL SOBRE FUNCIONES MITOCONDRIALES Y ENZIMAS ANTIOXIDANTES EN LA APOPTOSIS INDUCIDA POR H₂O₂.....	111
2.1. El 17β-estradiol previene la apertura del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial	112
2.2. El 17β-estradiol previene la pérdida del potencial de membrana mitocondrial (Δψm)	116
2.3. El 17β-estradiol inhibe la translocación de la proteína Bax hacia la mitocondria	120
2.4. El 17β-estradiol modula la actividad y expresión de la enzima manganeso superóxido dismutasa (MnSOD)	124
2.5. El 17β-estradiol modula la actividad de la enzima catalasa (CAT)	126
2.6. El 17β-estradiol modula la actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPx)	128
2.7. El 17β-estradiol disminuye la formación de estructuras celulares tipo- <i>tunneling nanotubes</i> (TNT)	130
2.8. Las estructuras celulares tipo-TNT intervienen en el tráfico de mitocondrias	133
CAPÍTULO 3: REGULACIÓN GÉNICA MEDIADA POR EL 17B-ESTRADIOL FRENTE A LA APOPTOSIS INDUCIDA POR H₂O₂	141
3.1. Bcl-2.....	141
3.2. Bim.....	142
3.3. Puma	144
3.4. Noxa	145
3.5. MDM-2	146
3.6. PERP	147
V. DISCUSIÓN	149
VI. CONCLUSIONES	172
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	176
VIII. TRABAJOS GENERADOS EN ESTA TESIS	218

Abreviaturas

$\Delta\Psi_m$: Potencial de membrana mitocondrial
AIF: *Apoptosis inducing factor*
ADN: Acido desoxi-ribonucleico
ADNc: Acido desoxi-ribonucleico copia
ANOVA: *Analysis of variance*
ANT: *Adenine nucleotide translocator*
ARNm: Acido ribonucleico mensajero
APAF-1: *Apoptotic protease activating factor-1*
BAD: *Bcl-2-associated death promoter*
BAK: *Bcl-2 antagonist killer 1*
BAX: *Bcl-2-associated x protein*
BCL-2: *B-cell lymphoma 2*
BCL-XL: *Bcl-2-related gene, long isoform*
BH: *Bcl-2 homology*
BID: *Bcl-2 interacting domain death agonist*
BIK: *Bcl-2-interacting killer*
BIM: *Bcl-2-interacting mediator of cell death*
BIR: *Baculoviral IAP repeat*
BMF: *Bcl-2 modifying factor*
BOK: *Bcl-2-related ovarian killer*
BSA: *Bovine serum albumin*
CAT: Catalasa
CARD: *Caspase recruitment domain*
COX-IV: Citocromo c oxidasa subunidad 4
DAG: 1,2-diacilglicerol
DBD: *DNA-binding domain*
DD: *Death domain*
DIABLO: *Direct IAP-binding protein*
DISC: *Death-inducing signaling complex*
DMEM: *Dulbecco's modified Eagle medium*
DR: *Death receptor*

DTT: *Dithiothreitol*

E₂: 17β-estradiol

ER: *Estrogen receptor*

ERE: *Estrogen response element*

ERK: *Extracellular signal-regulated kinase*

FADD: *Fas-associated death domain*

FOXO: *Forkhead box O*

FSH: *Follicle-stimulating hormone*

GAPDH: *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*

GnRH: *Gonadotropin-releasing hormone*

GR: Glutati3n reductasa

GPR30: *G protein-coupled receptor 30*

GPx: Glutati3n peroxidasa

GSH: Glutati3n

GSSG: Glutati3n oxidado

H₂O₂: Per3xido de hidr3xgeno

HSP: *Heat shock protein*

IAP: *Inhibitor of apoptosis protein*

IMS: *Intermembrane mitochondrial space*

JC-1: 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3-3'-tetraetilben-zimidazolilcarbocianina iodado

JNK: *c-Jun NH₂-terminal kinase*

LBD: *Ligand binding domain*

LH: *Luteinizing hormone*

MAPK: *Mitogen activated protein kinase*

MAP2K: *Mitogen-activated protein kinase kinase*

MAP3K: *Mitogen-activated protein kinase kinase kinase*

MCL-1: *Myeloid cell leukemia-1*

MDM-2: *Murine double minute 2*

MMI: Membrana mitocondrial interna

MME: Membrana mitocondrial externa

MnSOD: Manganeso super3xido dismutasa

MPP: 1,3-bis (4-hidroxi-fenil)-4-metil-5-[4-(2-piperidiniletoxi)fenol]-1 Hpyrazoledi clorhidrato

MPTP: *Mitochondrial permeability transition pore*

NCCD: *Nomenclature Committee on Cell Death*

Na₂VO₄: Ortovanadato de sodio

NaF: Fluoruro de sodio

p66Shc: *66 kDa proto-oncogene Src homologous-collagen homologue*

PBS: *Phosphate buffer saline*

PBS-T: *Phosphate buffer saline supplemented with 0,1 % tween*

PCR: *Polymerase chain reaction*

PERP: *p53 apoptosis effector related to PMP-22*

PI3K: *Phosphatidylinositol-3OH kinase*

PKC: *Protein kinase C*

PKD: *Protein kinase D*

PLAD: *Pre-ligand binding assembly domain*

PMA: *Phorbol 12-Myristate 13-acetate*

PMSF: *Phenylmethylsulphonyl fluoride*

PUMA: *p53 up-regulated modulator of apoptosis*

PVDF: *Polyvinylidene fluoride*

PS: *Phosphatidylserine*

qPCR: *Quantitative polymerase chain reaction*

ROOH: Hidropéroxido orgánico

ROS: *Reactive oxygen species*

RT-qPCR: *Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*

SDS-PAGE: *Sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis*

Ser: Serina

SFB: Suero fetal bovino

SOD: Superóxido dismutasa

t-BID: *Truncated Bcl-2 interacting domain death agonist*

TGF-β: *Transforming growth factor-β*

Thr: Treonina

TMRM: *Tetramethylrhodamine methyl ester*

TNF: *Tumor necrosis factor*

TNT: *Tunneling nanotube*

TRADD: *Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein*

TRAF: *Tumor necrosis factor receptor associated factor*

TRAIL: *Tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand*

TUNEL: *TdT-mediated dUTP nick end-labeling*

UA: *Unidades arbitrarias*

VDAC: *Voltage-dependent anion-selective channel*

Y: *Tirosina*

Introducción

1.1. El 17 β -estradiol

1.1.1. Descubrimiento de las hormonas: el caso de los estrógenos

En el año 1900 Emil Knauer demostró, mediante experimentos de trasplantes ováricos en conejillos de Indias, que estos órganos eran capaces de liberar una “secreción” al torrente sanguíneo. Antes de esta observación, incluso, ya se había descubierto que la ovariectomía conducía a atrofia uterina y pérdida de las funciones sexuales. Knauer llegó a esta conclusión luego de evidenciar que los trasplantes de tejidos ováricos denervados eran exitosos, y puesto que sólo recibían irrigación proveniente de la nueva vasculatura, dedujo que estos órganos debían secretar alguna “sustancia” a la circulación que tuviese efectos en el útero y en otros órganos distantes (Knauer, 1900). Quedó así establecida la naturaleza hormonal del control ovárico en el sistema reproductor femenino. Al mismo tiempo, estos experimentos fueron verificados y ampliados por otros investigadores (Marshall y Jolly, 1905; Halban, 1900).

Décadas más tarde, Allen y Doisy (Allen y Doisy, 1923) reportaron una metodología para el aislamiento de una “hormona ovárica” procedente de extractos ováricos de cerdo, describiendo algunas de sus propiedades físicas y químicas así como también su localización en otros tejidos. Esta hormona era, además, capaz de prevenir los cambios asociados a ovariectomías observados en ratas y ratones. En el año 1925, Loewe informó la existencia de una hormona sexual femenina en la sangre de diferentes especies (Loewe, 1925). Un año más tarde, Loewe y Lange observaron la presencia de una hormona sexual femenina en la orina de mujeres y que su concentración urinaria cambiaba durante el ciclo menstrual (Loewe y Lange, 1926). Por otra parte, Aschheim y Zondek, en 1927, descubrieron que la orina de las mujeres embarazadas poseía actividad estrogénica (Aschheim y Zondek, 1927). Este hallazgo contribuyó al aislamiento de los principios activos estrogénicos en forma cristalina. Entre 1930 y 1931, se aisló a la estrona (Veler et al., 1930) y al estriol (Thayer et al., 1931). Finalmente,

en 1936, Doisy en colaboración con MacCorquodale y Thayer cristalizaron al 17β -estradiol (E_2), el más potente de los tres estrógenos (MacCorquodale et al., 1936).

1.1.2. Biosíntesis del 17β -estradiol

La hormona E_2 es el estrógeno natural más potente en humanos y otros vertebrados. Pertenece al grupo de hormonas esteroideas de 18 átomos de carbono y su estructura consta de un núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno que contiene un anillo fenólico A y un grupo β -hidroxilo en la posición 17 del anillo D (Figura I1). Se ha evidenciado que la presencia de dicho anillo fenólico es una característica fundamental en la estructura de este esteroide ya que interviene en la unión selectiva y de alta afinidad a los receptores estrogénicos (Wawrzak et al., 1988).

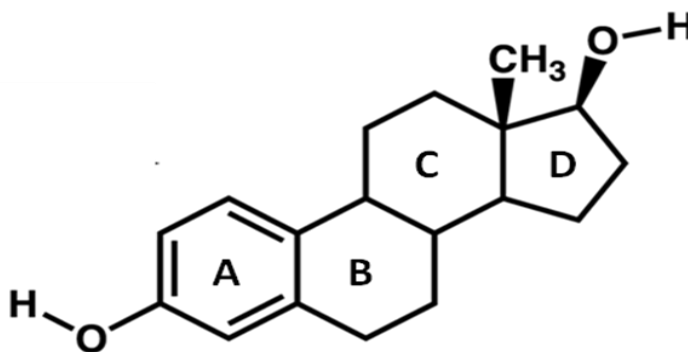


Figura I1. Estructura química del 17β -estradiol.

La biosíntesis del E_2 , al igual que la de otras hormonas esteroideas, requiere la presencia de colesterol. Este precursor es movilizado a la membrana mitocondrial interna, donde es metabolizado a pregnenolona por la acción de una enzima desmolasa (*P450 side chain cleavage: P450scc*), que escinde la cadena lateral del colesterol. La pregnenolona así formada puede seguir la vía Δ -5 o la Δ -4, para llegar a la obtención del intermediario clave que es la androstenediona. Este puede ser convertido a testosterona, que a su vez, por acción de la enzima aromatasa puede derivar en E_2 , o bien resultar en estrona como consecuencia de

la acción de la aromatasa, que posteriormente podrá convertirse en E_2 por acción de la enzima 17- β -hidroxilasa (Figura I2).

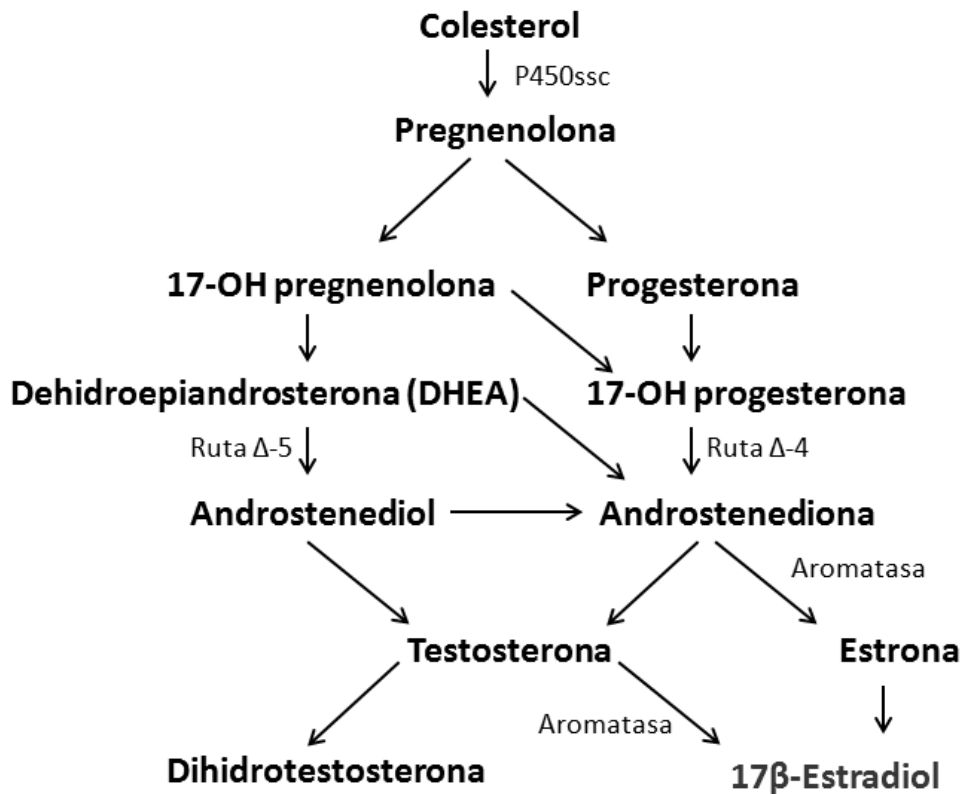


Figura I2. Biosíntesis del 17 β -estradiol.

1.1.3. Regulación de la biosíntesis del 17 β -estradiol y metabolismo

En mujeres premenopáusicas con función ovárica conservada, los ovarios constituyen la principal fuente de estrógenos circulantes y su biosíntesis se encuentra regulada por el eje hipotálamo-hipófisis. En respuesta a diversas señales neuroendocrinas, el hipotálamo secretará la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) a la circulación hipotálamo-hipofisaria, que en la hipófisis será capaz de estimular la síntesis y liberación de las gonadotropinas, hormona folículo-estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH), a la circulación general. Estas gonadotropinas, a su vez, estimularán la síntesis y secreción de esteroides en el ovario. Aunque durante la menopausia y en los hombres aún no se han

dilucidado los factores que regulan la producción de estrógenos, la síntesis extra-ovárica de estos esteroides a partir de los andrógenos cobra importancia. De hecho, existe evidencia que demuestra que diferentes órganos a los que clásicamente se los consideraba tejidos blanco de los estrógenos han mostrado también ser sitios de esteroidogénesis local, ya sea a partir de pro-hormonas circulantes (George et al., 1991; Pradhan et al., 2008; Schlinger y Arnold, 1991) o de la síntesis *de novo* a partir de colesterol (Bennett et al., 2012; Cheng et al., 2010; Locke et al., 2008; Mellon y Deschepper, 1993).

La eliminación de estrógenos sucede luego de su transformación a metabolitos estrogénicamente inactivos en el hígado, que son finalmente excretados en la orina y/o las heces.

1.1.4. Funciones biológicas del 17 β -estradiol

El E₂ es una hormona que interviene en la regulación del crecimiento, diferenciación y normal funcionamiento de una gran variedad de tejidos, entre los que se incluye no sólo a aquellos asociados a la reproducción, sino también al sistema cardiovascular, hueso, sistema nervioso central y músculo, entre otros. De hecho, se ha reportado que esta hormona ejerce un efecto protector sobre varios de estos tejidos. Experimentos mediante delección génica del receptor de estrógenos revelaron su importancia en el desarrollo y funcionamiento de los órganos sexuales (Couse y Korach, 1999; Krege et al., 1998). Ensayos *in vivo* e *in vitro* en mamíferos han sugerido que el E₂ tiene una acción importante en la preservación del hueso (Srivastava et al., 2001) y de la integridad de la vasculatura sanguínea (Mendelsohn y Karas, 1999), al mismo tiempo que contribuye al normal funcionamiento del cerebro (McEwen, 1999) y a la modulación del sistema inmune (Wilder, 1998). Se ha reportado, además, que el estrógeno es un factor de supervivencia y crecimiento para células de cáncer de mama (Razandi et al., 2000).

1.1.5. Mecanismos de acción del 17 β -estradiol

Jensen y Jacobsen, basándose en la unión específica del E₂ en el útero, fueron los primeros en postular que el rol que esta hormona ejercía sobre cada uno de sus tejidos blanco se encontraba en estricta relación con la presencia de sus receptores específicos (Jensen y Jabobsen, 1962).

En el año 1986, dos grupos de investigación reportaron la clonación del receptor de estrógenos (ER) (Green et al., 1986; Greene et al., 1986). Recién diez años más tarde se clonó al segundo receptor de estrógenos, el ER β , de una librería de ADNc de próstata de rata (Kuiper et al., 1996). Así, al primer ER descubierto se lo llamó ER α . Desde entonces, el ER β fue clonado en distintas especies (Enmark et al., 1997; Tchoudakova et al., 1999; Tremblay et al., 1997) así como también se han identificado diversas variantes obtenidas por *splicing* alternativo de ambos receptores (Leygue et al., 1998; Maruyama et al., 1998; Moore et al., 1998; Petersen et al., 1998).

1.1.5.1. Receptores de estrógenos

Los estrógenos ejercen sus funciones a través de sus receptores específicos. A pesar de la amplia gama de vías de señalización que activan los estrógenos, sólo se ha establecido fehacientemente la existencia de tres receptores que median todos los efectos de los estrógenos. El primero que se descubrió y el más detalladamente estudiado fue el ER α , luego siguieron el ER β y, posteriormente, el *G protein-coupled estrogen receptor* (GPR30) (Tabla I1).

Los receptores de estrógenos α y β pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares de hormonas tiroideas/esteroideas y comparten una estructura común. Están compuestos por tres dominios funcionales independientes pero que interactúan entre sí: el dominio N-terminal o dominio A/B, el dominio C o dominio de unión al ADN (DBD) y el dominio E/F o dominio de unión al ligando (LBD), y una región bisagra D (Figura I3). El dominio N-terminal contiene una región necesaria para la activación independiente de ligando (AF-1),

involucrada en las interacciones proteína-proteína y en la activación de la transcripción génica. Si bien los dos receptores nucleares presentan un alto porcentaje de homología en sus dominios de unión al ADN y de unión al ligando, generalmente difieren en su región N-terminal (Enmark et al., 1997). Estas variaciones podrían explicar las distintas respuestas a varios ligandos. El dominio DBD contiene dos estructuras C₄ dedos de zinc que cumplen un importante rol en la dimerización y en la unión del receptor a secuencias de ADN específicas (Beato, 1989; Hard y Gustaffson, 1993; Schwabe et al., 1993). Como se mencionó anteriormente, este dominio es prácticamente idéntico en ambos receptores, en particular en la secuencia crítica para el reconocimiento del ADN *target* (Vanacker et al., 1999). Por ello, ambos ER son capaces de unirse a varios elementos de respuesta a estrógenos (EREs) con similar especificidad y afinidad. El dominio C-terminal, que contiene a su vez al dominio de activación AF-2, interviene en la unión del ligando, la dimerización del receptor, la translocación nuclear y la transactivación de la expresión de genes *target* (Evans, 1988). Ambos receptores presentan un alto grado de conservación entre los mamíferos (Parker, 1995; Tremblay et al., 1997). Se ha reportado que el ER α tiene por lo menos tres, y el ER β cinco isoformas obtenidas por *splicing* alternativo de su ARNm, pudiendo las variantes de cada uno de los ER influir de manera diferente en la respuesta celular desencadenada. Además, las concentraciones de estos ER en una célula determinada están directamente relacionadas con la respuesta diferencial a diversos ligandos (Discutido en Vrtačnik et al., 2014).

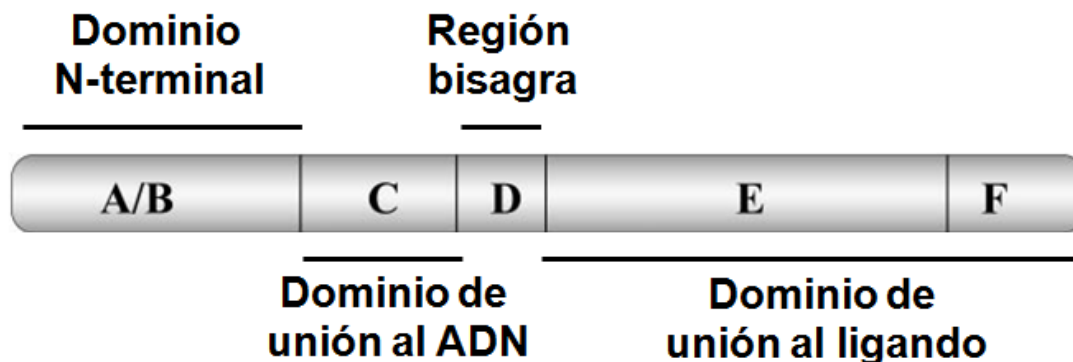


Figura I3. Estructura de los receptores de estrógenos α y β .

Los ERs α y β presentan una estructura común formada por tres dominios: dominio N-terminal, dominio de unión al ADN y dominio de unión al ligando, y una región bisagra central.

Si bien tradicionalmente se sostenía que los ER eran receptores exclusivamente nucleares, actualmente está fehacientemente establecido que existen en la membrana plasmática de varios tipos celulares así como también en mitocondria y en otras organelas citosólicas (Chen et al., 2004a; Chen et al., 2004b; Evans et al., 1991; Kelly y Levin, 2001; Lieberherr et al., 1993; Monje et al., 2001; Parikh et al., 1980; Watson et al., 1995; Yang et al., 2004). En la línea celular C2C12 de músculo esquelético se han encontrado ER asociados a mitocondria y fracción microsomal, además de los de localización citosólica-nuclear (Milanesi et al., 2008; Milanesi et al., 2009). Los receptores de localización extra-nuclear presentan la misma estructura que los clásicos nucleares. De hecho, se identificaron a los ER α y β de 67 y 54 KDa, respectivamente, en las caveolas y membrana plasmática de células endoteliales, utilizando anticuerpos contra los ER nucleares clásicos (Chambliss et al., 2002). Su localización fuera del núcleo se explica por la unión al ácido palmítico de un residuo cisteína interno que promueve la asociación del receptor con caveolina-1, que actúa como una proteína transportadora relocalizando a este complejo ER-caveolina-1 en las caveolas de la membrana plasmática (Acconcia et al., 2005; Razandi et al., 2002).

El tercer receptor de estrógenos reportado, el GPR30, es un receptor de membrana no relacionado estructuralmente ni genéticamente con los ERs ya descritos. Se lo ha asociado a efectos rápidos de los estrógenos, y se expresa y funciona en forma independiente de los ERs. En contraposición a los ERs clásicos, la afinidad del GPR30 por el E₂ es considerablemente baja (Discutido en Vrtačnik et al., 2014).

Característica del receptor	ERα	ERβ	GPR30
Superfamilia	Superfamilia de receptores nucleares de hormonas tiroideas/esteroideas		Superfamilia de receptores acoplados a proteínas G
Estructura	Dominio de unión al ADN, dominio de unión al ligando, dominio N-terminal		7 regiones α -hélice transmembrana, 4 segmentos extracelulares y 4 segmentos citosólicos
Región cromosómica	6q25.1	14q23.2	7p22.3
Número de isoformas	3	5	1
Tamaño	595 aa	530 aa	375 aa

Tabla 11. Características diferenciales de los receptores de estrógenos. (Adaptado de Vrtačnik et al., 2014).

1.1.5.2. Acción nuclear y extra nuclear del 17 β -estradiol

El mecanismo clásico de acción del E₂ involucra a los ER de localización nuclear. La unión de la hormona a estos receptores, induce su dimerización y su posterior unión a elementos de respuesta a estrógenos (EREs) específicos localizados en los promotores de los genes blanco (Anderson et al., 2001), para así estimular o reprimir su transcripción. Esta unión induce un cambio conformacional en el dominio C-terminal del ER, que permite que proteínas coactivadoras o corepresoras sean reclutadas (Rosenfeld y Glass, 2001). Sin embargo, los ERs pueden regular la expresión génica por otros mecanismos. Estos receptores pueden modular la función de otros factores de transcripción, a través de interacciones proteína-proteína en el núcleo, sin la necesidad de unirse directamente a los EREs de los genes blanco en el ADN (Gottlicher et al., 1998). Ejemplos de factores de transcripción que intervienen en este mecanismo son: la proteína estimuladora-1 (SP-1), la proteína activadora-1 (AP-1), el factor nuclear κ B (NF- κ B) y cJun (Gottsch et al., 2009).

Los estrógenos también ejercen acciones rápidas derivadas de la activación de varias cascadas de señalización en las que intervienen proteínas quinasas (Losel y Wehling, 2003) y receptores de origen extra nuclear. Se observaron incrementos rápidos en la actividad adenilil ciclasa inducidos por E₂ en enterocitos de rata (Picotto et al., 1996), células uterinas y mamarias MCF-7 (Aronica et al., 1994). Fue demostrada, también, la activación de MAPKs por E₂ (Endoh et al., 1997). Si bien tradicionalmente se nombraba a las acciones derivadas de la activación de ERs nucleares como genómicas y a aquellas derivadas de los ERs de localización extra nuclear como no genómicas, existen evidencias que prueban que efectos rápidos (anteriormente clasificados como “no genómicos”) pueden influir en la expresión génica mediante la activación de vías de señalización que, eventualmente, actúan sobre factores de transcripción. Por otra parte, se ha evidenciado que la activación de ERs puede modular la localización y la función de ciertos factores de transcripción. Por ejemplo, en cardiomiocitos, se ha reportado

que las vías de señalización activadas por ERs previenen la fosforilación del factor de transcripción SMAD necesaria para su tráfico al núcleo, inducida por el TGF- β (Pedram et al., 2010).

1.1.6. Relación entre 17 β -estradiol y músculo esquelético

En secciones anteriores se describió que en músculo esquelético se ha demostrado la presencia de receptores para E₂. Sin embargo, el mecanismo molecular que activa el E₂ y su rol fisiológico en este tejido, no han sido totalmente esclarecidos.

El E₂ ejerce diversos efectos sobre el músculo esquelético (Baltgalvis et al., 2010; Colson et al., 2015; Velders et al., 2012). Por ejemplo, es relevante el rol que ejerce el E₂ modulando la actividad de la miosina, proteína clave en la contractilidad muscular (Moran et al., 2007). Asimismo, la relación entre el músculo esquelético y el E₂ también se evidencia en aquellas patologías degenerativas de la masa muscular, tales como la sarcopenia que se presentan en mujeres menopáusicas. Estas patologías se han relacionado a los bajos niveles de estradiol presentes durante dicho período de la vida (Dionne et al., 1999). En concordancia, terapias de reemplazo hormonal promueven el crecimiento y la recuperación del tejido muscular (Dionne et al., 2000). En ratas ovariectomizadas, la administración del estrógeno conduce a la recuperación de la fisiología muscular (Kadi et al., 2002; Warren et al., 1996). Así también, otros estudios indican que esta hormona es importante para la recuperación de la masa muscular en casos de atrofia de las fibras musculares (McClung et al., 2006; Sitnick et al., 2006). Además, se ha evidenciado que la administración de esta hormona en mujeres postmenopáusicas aumenta la fuerza muscular (Greising et al., 2009).

1.2. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre las sustancias oxidantes y antioxidantes, como consecuencia del aumento de las sustancias oxidantes, de la disminución de las sustancias antioxidantes o de la conjunción de

ambos factores. Asimismo, se utiliza esta denominación para referirse a las alteraciones producidas por las especies reactivas del oxígeno (ROS).

1.2.1. Especies reactivas del oxígeno (ROS)

Las ROS derivan del oxígeno y en general son radicales libres (RL), es decir, especies químicas que contienen uno o más electrones desapareados en su capa de valencia, lo que lleva a que sean especies altamente reactivas. Se caracterizan, además, por su gran poder oxidante y su vida media muy corta. Algunas ROS no pueden clasificarse como RL, pero comparten con estas especies su alta capacidad pro-oxidante y, a su vez, son capaces de generar RL en su metabolismo (Tabla I2).

Especie reactiva del oxígeno	Símbolo
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
Radical superóxido	$\cdot O_2^-$
Radical hidroperóxido	$\cdot HO_2$
Radical peróxido	$\cdot ROO$
Radical hidroxilo	$\cdot OH$
Radical alcohoxilo	$\cdot RO$

Tabla I2. Principales especies reactivas del oxígeno.

Aunque algunas ROS cumplen un rol fisiológico, pueden también generar reacciones de oxidación no deseadas. A concentraciones pequeñas, actúan como mensajeros intracelulares, capaces de desencadenar cascadas de señalización que conducen a la activación de enzimas y de factores de transcripción, alterando finalmente la expresión génica y mediando respuestas celulares de adaptación o

de muerte celular. Es decir que niveles moderados de ROS pueden promover la proliferación y supervivencia celular, mientras que un aumento exagerado de estas especies puede conducir a la muerte celular. En condiciones fisiológicas normales, existe un equilibrio entre la generación y la eliminación de las ROS debido a la presencia de sistemas antioxidantes que son suficientes para evitar los daños derivados de estas especies. Sin embargo, cuando esta homeostasis se altera, las defensas antioxidantes son insuficientes frente a un incremento de las ROS, resultando en estrés oxidativo que puede conducir a la muerte celular y/o al desarrollo de diferentes patologías. De hecho, las ROS han sido involucradas en los mecanismos fisiopatológicos de enfermedades cardiovasculares (Byers y Bowman, 1993), neurodegenerativas (Marshall et al., 1999), diabetes (Takada, 1982), y cáncer (Liou y Storz, 2010) como así también en el proceso de envejecimiento (Pacifici y Davies, 1991, revisado en Vasconsuelo et al., 2013).

1.2.2. Sistemas antioxidantes

Para contrarrestar los daños derivados de la acción de las ROS, las células cuentan con varios mecanismos de defensa antioxidantes (Diplock, 1994; Fridovich, 1989; Gutteridge y Stocks, 1981; Halliwell, 1996; Sies, 1993). Halliwell definió como antioxidante a cualquier sustancia que, presente en bajas concentraciones en comparación con el sustrato oxidable, previene o retarda significativamente la oxidación del sustrato, donde el término “sustrato oxidable” se refiere a hidratos de carbono, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Halliwell, 1990; Halliwell y Gutteridge, 1989).

Los diversos agentes antioxidantes pueden ejercer su función protectora mediante la inhibición de la generación de ROS, directamente atacando a las ROS luego de su producción o convirtiendo a las ROS en especies menos reactivas.

En particular, las enzimas antioxidantes son antioxidantes endógenos que actúan sobre las ROS ya generadas convirtiéndolas en moléculas menos nocivas

para el organismo. Dentro de este grupo de enzimas antioxidantes, las más estudiadas son la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa.

1.2.2.1. Superóxido dismutasa (SOD)

Esta enzima constituye la principal defensa en respuesta al estrés oxidativo derivado de la acción del anión superóxido y de las especies reactivas derivadas de éste (Fridovich, 1997). La SOD cataliza la transformación del radical superóxido en peróxido de hidrógeno (Figura I4).



Figura I4. Acción de la SOD.

Las enzimas superóxido dismutasas son metaloenzimas que catalizan la dismutación del anión superóxido, conduciendo a la formación de oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno.

Si bien este radical es inestable en medio acuoso, por lo que es capaz de dismutar espontáneamente para generar H_2O_2 y O_2 , la tasa de dismutación enzimática es 10^4 veces superior a la no enzimática. Esto explica la importancia de la presencia de esta enzima para contrarrestar los efectos de esta ROS.

Se han descrito en mamíferos tres isoformas de esta enzima: SOD1, SOD2 y SOD3 (Fridovich, 1975). Todas ellas son metaloproteínas que se diferencian en su grupo prostético metálico. Mientras que SOD1 y SOD3 contienen cobre y zinc (CuZnSOD), la SOD2 presenta manganeso (MnSOD).

La SOD1 se encuentra en núcleo y citosol, reportándose altas concentraciones en testículos, cerebro e hígado (Marklund, 1980). La SOD3 es secretada al espacio extracelular en corazón, pulmones, riñón y placenta, como así también es detectable en plasma (Marklund, 1982; Oury et al., 1996; Sandstrom et al., 1992). La SOD2, por su parte, se encuentra en la matriz mitocondrial (Kinnula et al., 1995; Weisiger y Fridovich, 1973). La presencia de la

SOD2 en este compartimento es de suma importancia, debido a que se producen niveles sustanciales de anión superóxido como consecuencia del normal funcionamiento de la cadena transportadora de electrones en la mitocondria. De hecho, 1-2% del total de electrones que pasan a través de esta cadena transportadora son desviados a la producción de ión superóxido (Boveris y Chance, 1977).

1.2.2.2. Catalasa (CAT)

Esta enzima cataliza la detoxificación del peróxido de hidrógeno, liberando agua y oxígeno (Figura I5).



Figura I5. Acción de la CAT.

La enzima catalasa cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno, generando moléculas no perjudiciales como lo son el agua y el oxígeno molecular.

Inicialmente fue hallada en peroxisomas (Tolbert y Essner, 1981), pero más tarde también fue encontrada en citosol y mitocondrias (Rodríguez et al., 2000).

El peróxido de hidrógeno producido por acción de la enzima SOD, así como también el proveniente de otras reacciones metabólicas, es transformado en moléculas no perjudiciales por la acción de la catalasa.

1.2.2.3. Glutatión peroxidasa (GPx)

La enzima glutatión peroxidasa (GPx) cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno y peróxidos lipídicos (ROOH) en moléculas menos reactivas (Figura I6). Para ejercer su función requiere la presencia del glutatión reducido (GSH) como dador de equivalentes reductores.



Figura I6. Acción de la GPx.

Las enzimas glutatión peroxidadas actúan sobre el peróxido de hidrógeno o peróxidos lipídicos, en presencia de glutatión reducido, liberando agua y el glutatión en su estado oxidado (GSSG).

Existen dos tipos de GPx, una de ellas es dependiente de selenio (Se) y la otra es no selenio dependiente. La GPx Se-dependiente es una proteína con cuatro átomos de Se que actúa sobre el peróxido de hidrógeno y sobre peróxidos orgánicos. Por otra parte, la no dependiente de Se (GPx Se-independiente) solo ejerce su acción sobre peróxidos orgánicos (Ketterer, 1986).

1.3. Muerte celular

La muerte celular es un proceso fundamental en la homeostasis de cualquier organismo. Durante décadas, su estudio fue enfocado dicotómicamente, comparando a la apoptosis y a la necrosis, dado que eran los dos tipos de muerte celular mejor conocidos. Sin embargo, en los últimos años con el advenimiento de tecnologías más sofisticadas, se han reportado otras formas adicionales de muerte celular al mismo tiempo que se han identificado nuevas y complejas vías moleculares que intervienen en estos procesos.

Desde las primeras descripciones de los mecanismos de muerte celular programada que se remontan a mediados de la década de 1960 (Kerr, 1965; Lockshin y Williams, 1964; Lockshin y Williams, 1965), se han realizado varios intentos para clasificar a las diversas formas de muerte celular. Uno de los primeros intentos por clasificar los fenotipos de muerte celular, basado en el análisis morfológico de modelos del desarrollo, fue hecho por Schweichel y Merker, quienes identificaron 3 tipos de muerte celular (Schweichel y Merker, 1973). En los años subsiguientes, si bien se profundizaron los estudios de las vías moleculares que intervienen y regulan la muerte celular, al mismo tiempo que se

desarrollaron ensayos bioquímicos de rutina para monitorear estos fenómenos, la comunidad científica no ha adoptado aún una clasificación sistemática de la muerte celular basada en criterios bioquímicos. Es por ello que se creó el Comité de Nomenclatura de la muerte celular (NCCD) con la misión de proveer a la comunidad científica de una nomenclatura no rígida basada en la descripción de las diferentes modalidades de muerte celular existentes, de modo de facilitar la comunicación entre los mismos y, en última instancia, de contribuir a acelerar el ritmo del descubrimiento en este campo. El NCCD propuso una nueva clasificación de muerte celular regulada en el año 2012 basada en criterios funcionales y bioquímicos, que incluye a las siguientes modalidades: anoikis, muerte celular autofágica, apoptosis intrínseca dependiente de caspasas, apoptosis intrínseca independiente de caspasas, apoptosis extrínseca, cornificación, entosis, catástrofe mitótica, necroptosis, netosis, piroptosis y paraptosis (Revisado en Galluzzi et al., 2012).

1.3.1. Apoptosis

El término apoptosis (a-po-toe-sis) fue usado por primera vez por Kerr, Wyllie y Currie en 1972 para describir una forma morfológicamente distinta de muerte celular, aunque algunos componentes de este proceso ya habían sido descritos varios años antes (Kerr et al., 1972; discutido en Kerr, 2002). El conocimiento de los mecanismos involucrados en este tipo de muerte en células de mamíferos fue derivado de la investigación del desarrollo del nematodo *Caenorhabditis elegans* (Horvitz, 1999). En este organismo, 1090 células somáticas son generadas en la formación del gusano adulto, de las cuales 131 sufren apoptosis en puntos particulares durante el desarrollo.

La apoptosis se produce normalmente durante el desarrollo, el envejecimiento y también como un mecanismo homeostático para el mantenimiento de la población celular en diferentes tejidos. Este proceso puede también presentarse como un mecanismo de defensa, tal como sucede cuando las células son dañadas durante el desarrollo de alguna enfermedad o por agentes

nocivos, para así eliminarlas (Norbury y Hickson, 2001). En efecto, existen numerosos estímulos intracelulares y extracelulares que pueden desencadenar la apoptosis, tales como daño al ADN, estrés oxidativo, aumento del calcio intracelular, entre otros. Si bien estímulos, fisiológicos o patológicos, pueden producir apoptosis, el comportamiento de cada tipo celular en respuesta a un determinado agente apoptótico es particular, pudiendo un mismo agente producir muerte celular en una clase de célula y no afectar de la misma forma a otra.

En el inicio, la apoptosis se caracteriza por disminución del volumen celular y picnosis como resultado de la condensación de la cromatina, características que son evidenciables por microscopía de campo claro (Kerr et al., 1972). Esta disminución en el tamaño celular lleva a la observación de un citoplasma denso, repleto de las organelas intracelulares. En un estadio posterior, se observa el “*blebbing*” (ampollamiento) de la membrana plasmática seguido por cariorrexis y separación de fragmentos celulares en la forma de cuerpos apoptóticos. Estos se encuentran formados por citoplasma repleto de organelas que mantienen su integridad, pudiendo presentar o no un fragmento nuclear, contenido en una membrana plasmática intacta. Finalmente, estos cuerpos serán fagocitados por macrófagos, células parenquimatosas u otras, y degradados en los fagolisosomas. Este proceso no se acompaña de reacción inflamatoria debido a que: las células apoptóticas no liberan su contenido celular en el tejido intersticial circundante, el proceso de fagocitosis de los cuerpos apoptóticos es muy rápido y las células fagocíticas no liberan citoquinas pro-inflamatorias (Kurosaka et al., 2003; Savill y Fadok, 2000).

1.3.1.1. Caspasas

La apoptosis es un proceso complejo y coordinado que involucra una cascada de eventos moleculares dependiente de energía. En este proceso intervienen un grupo de cisteína proteasas conocidas como caspasas. Estas proteínas se sintetizan en su forma inactiva como zimógenos o pro-caspasas, y una vez activadas, son capaces de activar a otras caspasas, amplificando el

proceso apoptótico. Incluso algunas pro-caspasas pueden agregarse y así autoactivarse.

Las caspasas se caracterizan por su capacidad de clivar proteínas en residuos de ácido aspártico, aunque cada caspasa en particular tiene diferente especificidad mediante el reconocimiento de aminoácidos vecinos y de una configuración espacial determinada (Chang y Yang, 2000). Se han identificado diferentes miembros en esta familia, que se han categorizado como caspasas iniciadoras (caspasas 2, 8, 9 y 10), caspasas efectoras (caspasas 3, 6, y 7) y caspasas inflamatorias (caspasas 1, 4, 5, 11, 12). Recientemente, se han identificado a las caspasas 15, 16, 17 y 18. Las caspasas 11 y 13 de origen murino y bovino, respectivamente, son los homólogos en estas especies de la caspasa 4. La caspasa 14 se expresa en la epidermis y tiene un rol primario en la cornificación, por lo que no cumpliría un rol en la cascada apoptótica (Crawford y Wells, 2011; Shalini et al., 2014).

Estas proteínas son claves en la transducción y ejecución de la señal apoptótica. Debido a que la activación de las mismas es un proceso irreversible, con alto poder destructivo, este se encuentra estrictamente regulado. Para prevenir respuestas indeseadas, las células cuentan con diferentes estrategias para la regulación de la activación de caspasas. Existen inhibidores naturales de la apoptosis (IAPs) que se caracterizan por presentar de uno a tres dominios BIR (*baculoviral IAP repeat*) en el extremo N-terminal, necesarios para su función anti-apoptótica. Algunos de ellos cuentan, además, con un dominio RING (*really interesting new gene*) en el extremo C-terminal. La inhibición de la actividad de las caspasas puede derivar de la unión de los dominios BIR de los IAPs a los sitios activos de las caspasas, o bien mediante la promoción de la degradación de las caspasas activas o del secuestro de las caspasas evitando su interacción con sus sustratos (Tenev et al., 2005).

1.3.1.2. Proteínas de la familia Bcl-2

Los miembros de la familia Bcl-2 (B cell CLL/lymphoma-2) fueron originalmente caracterizados por su rol en la regulación del proceso apoptótico. Todos sus integrantes presentan dominios con homología Bcl-2 (BH) que pertenecen a segmentos de α -hélices. De acuerdo a la presencia de estos dominios, esta familia se subdivide en dos subfamilias que incluyen a proteínas apoptóticas y a proteínas antiapoptóticas.

Los miembros antiapoptóticos de esta familia constan de cuatro dominios con homología Bcl-2 (BH1-4) (Figura I7) y generalmente se los encuentra en la membrana mitocondrial externa, aunque pueden hallarse también en el citosol o asociados a membranas del retículo endoplásmico (RE). Ejercen su efecto antiapoptótico inhibiendo la acción de las proteínas proapoptóticas de esta familia. Se incluyen dentro de este grupo a las siguientes proteínas: Bcl-2, Bcl-xL (*Bcl-2-related gene, long isoform*), Bcl-w, Mcl-1 (*myeloid cell leukemia-1*) y A1 (*Bcl-2-related gene A1*).

Los miembros proapoptóticos de esta familia se subdividen, a su vez, en las proteínas efectoras y las proteínas solo-BH3 (Figura I7). Dentro del primer grupo se incluyen BAK (*Bcl-2 antagonist killer 1*), BAX (*Bcl-2-associated x protein*) y BOK (*Bcl-2-related ovarian killer*). Estas constan de 4 dominios con homología Bcl-2 (BH1-4), aunque originalmente habían sido descriptos solo 3 dominios en ellas (Kvansakul et al., 2008). Las proteínas solo-BH3, a su vez, se subdividen basándose en su habilidad de interactuar con los miembros antiapoptóticos de esta familia, o con los antiapoptóticos y los efectores. Aquellos miembros solo-BH3 que se unen solo a las proteínas antiapoptóticas se conocen como “sensibilizadores o derepresores” e incluyen a BAD (*Bcl-2 antagonist of cell death*), BIK, BMF, Puma, HRK y Noxa. Mientras que BID (*Bcl-2 interacting domain death agonist*) y BIM (*Bcl-2-interacting mediator of cell death*) interactúan tanto con los miembros antiapoptóticos como con los efectores y se conocen como “activadores directos”.

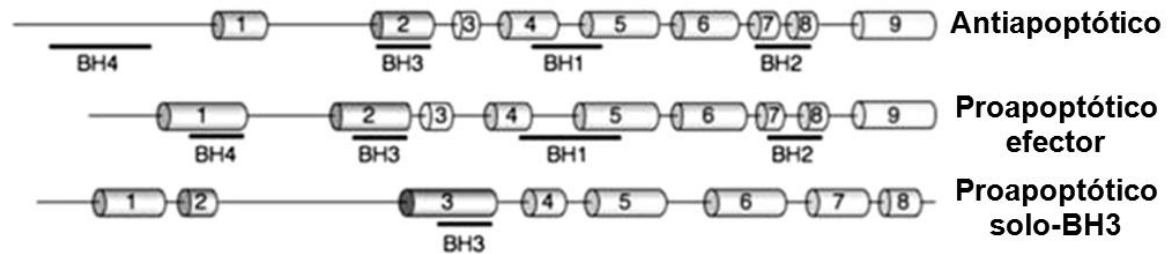


Figura 17. Familia Bcl-2.

Las proteínas de la familia Bcl-2 presentan dominios con homología Bcl-2 (BH). Se muestra una representación de los distintos miembros de la familia (antiapoptóticos, proapoptóticos efectores y proapoptóticos solo-BH3) indicando sus dominios BH 1-4 (Adaptado de Chipuk et al., 2010).

La mayoría de las células presentan una variedad de proteínas de la familia Bcl-2 proapoptóticas y antiapoptóticas. El modelo propuesto originalmente sostenía que el destino final de una célula, sobrevivir o morir por apoptosis, estaba determinado por la relación existente entre los niveles de expresión de ambos grupos de proteínas (Korsmeyer, 1992). Si primaba la expresión de proteínas antiapoptóticas, la célula sobreviviría, mientras que si lo hacía el grupo de proteínas proapoptóticas, la célula moriría. Sin embargo, con el advenimiento de las proteínas solo-BH3, este modelo inicial debió ser revisado, puesto que la intervención de estas proteínas en la activación de Bax/Bak, un evento esencial en la vía mitocondrial apoptótica, se ha reportado ampliamente (Chipuk y Green, 2008). Es por ello que se han postulado varios mecanismos. Uno de los modelos propone que las proteínas activadoras solo-BH3, Bim y Bid, activarían directamente a Bax y Bak. Para ello, las proteínas sensibilizadoras, tales como Puma y Noxa, actuarían desplazando a las proteínas activadoras de los miembros antiapoptóticos de la familia y uniéndose ellas, permitiendo así que los activadores se puedan unir a Bax y Bak (Figura 18A). Otro mecanismo sugerido postula que las proteínas solo-BH3 liberarían a Bax o Bak constitutivamente activos, uniéndose no a ellas sino a las proteínas antiapoptóticas que las retienen, y de esta manera, Bax y Bak estarían libres para ejercer su efecto apoptótico (Figura 18B). El tercer modelo propuesto sostiene que las proteínas derepresoras competirían con las proteínas activadoras solo-BH3 para su unión a los miembros antiapoptóticos, de

forma tal de liberar a las activadoras para la activación de Bax/Bak (Figura 18C) (Revisado en Chipuk et al., 2010). En los modelos citados, se pone de manifiesto la capacidad de los miembros de esta familia de formar dímeros. Como ya se describió anteriormente, los miembros antiapoptóticos pueden impedir la acción de los proapoptóticos, secuestrándolos, o bien, los miembros proapoptóticos pueden inhibir la acción de las proteínas antiapoptóticas, al formar dímeros con ellas (Revisado en Chipuk et al., 2010).

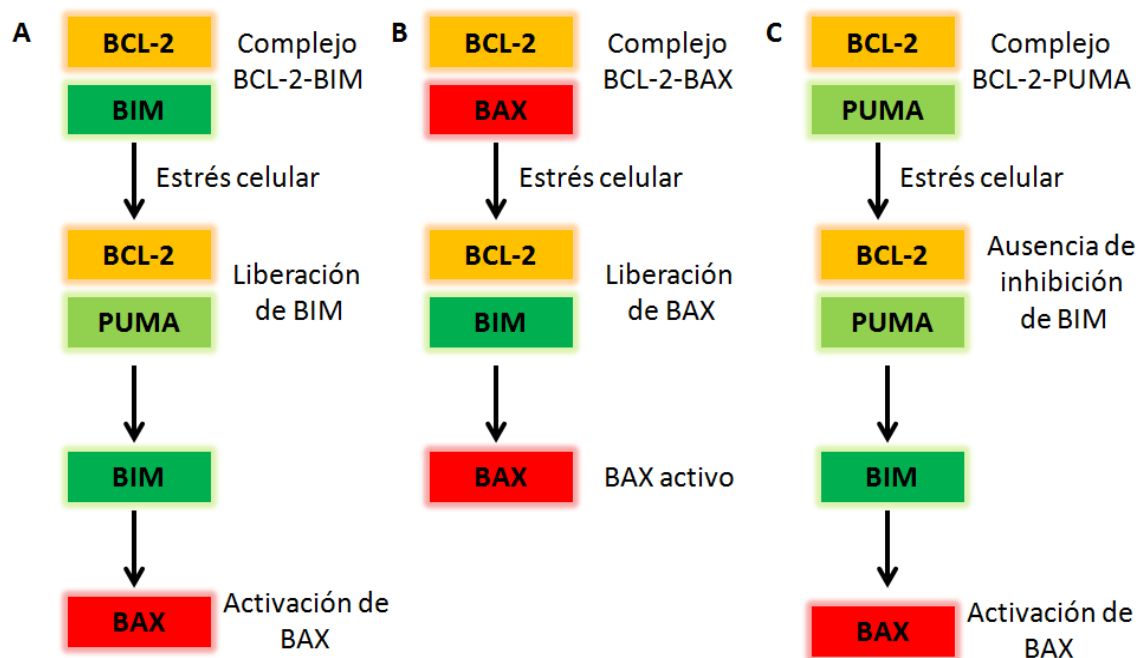


Figura 18. Principales mecanismos propuestos de regulación de la vía apoptótica mitocondrial mediada por proteínas de la familia Bcl-2.

(A) Las proteínas activadoras solo-BH3 son secuestradas por proteínas antiapoptóticas. Luego del estrés celular, el miembro solo-BH3 activador es liberado de este complejo, por competencia con un miembro derepresor, que se une a la proteína antiapoptótica. De esta manera, la proteína activadora es liberada y puede activar a Bax/Bak. **(B)** Las proteínas antiapoptóticas se unen a miembros apoptóticos (Bax/Bak) constitutivamente activos, inhibiéndolos. Ante un estrés celular, las proteínas solo-BH3 interactúan con los miembros antiapoptóticos, liberando a Bax/Bak activo. **(C)** Las proteínas derepresoras compiten con las activadoras solo-BH3 para unirse a los miembros antiapoptóticos, de manera de liberar a las proteínas activadoras y que estas puedan activar a Bax/Bak.

Por otra parte, mientras que algunos miembros proapoptóticos de esta familia se conoce que son residentes mitocondriales, tal como sucede con Bak, otros residen generalmente en el citosol y frente a un estímulo apoptótico, translocan a la mitocondria (Revisado en Chipuk et al., 2010).

Diferentes estímulos apoptóticos conducen a la activación de distintos miembros solo-BH3 e, incluso, los mecanismos por los que estas proteínas son activadas difieren para cada uno de sus miembros. Por ejemplo, Noxa y Puma son sólo regulados transcripcionalmente, y la regulación de BAD es por su estado de fosforilación (Revisado en Puthalakath y Strasser, 2002).

1.3.1.3. Mecanismo intrínseco: rol de la mitocondria

En respuesta a diversos estímulos apoptóticos intracelulares, como el daño al ADN, el estrés oxidativo y el incremento en los niveles de calcio citosólicos, entre otros, se activa la vía intrínseca de la apoptosis (Figura I10). Si bien existe heterogeneidad en las cascadas de señalización disparadas por estos estímulos, la mitocondria se comporta como un regulador central en este proceso. Generalmente, al mismo tiempo que se activan cascadas proapoptóticas, también lo hacen mecanismos antiapoptóticos en un intento de proteger a las células frente a la injuria. En este escenario, señales pro y antiapoptóticas convergen a nivel mitocondrial. El evento clave representado por el aumento en la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial sucede sólo cuando las señales proapoptóticas predominan sobre las antiapoptóticas. Este evento conduce a la liberación de factores proapoptóticos, tales como citocromo c, Smac DIABLO, el factor inductor de apoptosis (AIF) y la endonucleasa G desde la mitocondria al citosol. En este compartimento, el citocromo c interactúa con Apaf-1 (Liu et al., 1996), que presenta tres dominios funcionales: el dominio N-terminal CARD (dominio de reclutamiento de caspasas), el dominio de unión a nucleótidos y de oligomerización (NOD), y el dominio C-terminal regulatorio (Zou et al., 1997). Este último dominio es el que mantiene a Apaf-1 en un estado autoinhibitorio. Cuando el citocromo c se une a esta región, Apaf-1 es activado, lo que se pone en

evidencia por la oligomerización de siete complejos Apaf-1/citocromo c que forman un heptámero, conocido como apoptosoma (Zou et al., 1999). Este complejo recluta a la pro-caspasa 9, que se une mediante su dominio CARD del extremo N-terminal e interacciona con el anillo central del apoptosoma (Acehan et al., 2002), lo que promueve su activación. El complejo entonces formado se comporta como una holoenzima que cliva a las caspasas efectoras 3 y 7 (Rodríguez y Lazebnik, 1999). Por otra parte, AIF y la endonucleasa G translocan al núcleo, donde intervienen en la fragmentación del ADN independiente de caspasas.

1.3.1.3.1. Poro de permeabilidad transitoria mitocondrial

El citocromo c se encuentra en el espacio intermembrana mitocondrial (IMS) o débilmente unido a la superficie de la membrana mitocondrial interna (MMI). La liberación de esta proteína al citosol es un evento clave en la vía intrínseca, a partir del cual irreversiblemente una célula sufrirá apoptosis (Kumarswamy y Chadna, 2009; Liu et al., 1996; Reed, 1997). Diversos modelos han sido propuestos para explicar este suceso, entre los que se destacan la pérdida de integridad y/o un incremento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa (MME) (Crompton, 1999; Green y Kroemer, 2004). Sin embargo, los mecanismos que derivan en esta aumentada permeabilidad mitocondrial no se encuentran totalmente establecidos. Se ha propuesto que miembros de la familia Bcl-2 pueden estar involucrados en este proceso (Antignani y Youle, 2006). Además, se ha sugerido la participación del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (MPTP) (Armstrong, 2006).

El MPTP es un complejo multiproteico cuya composición aún se encuentra en debate. Originalmente, se había descrito que estaba compuesto por la ciclofilina D, el translocador de nucleótidos de adenina (ANT) localizado en la membrana mitocondrial interna y el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) presente en la membrana mitocondrial externa (Kroemer et al., 1998; Crompton, 1999). Posteriores estudios sugirieron que la hexoquinasa-II (HK-II) también formaría parte de este complejo. Sin embargo, experimentos con ratones *knock*

out para VDAC y ANT revelaron que estas proteínas no serían fundamentales para la actividad de este poro (Javadov y Kuznetsov, 2013), sumando más incertidumbre al establecimiento de sus componentes.

En condiciones fisiológicas normales, la MMI es prácticamente impermeable a todos los iones, incluso a los protones. Esto permite que los complejos I-IV de la cadena transportadora de electrones puedan formar el gradiente de protones necesario para la fosforilación oxidativa (Mitchell y Moyle, 1965 a, b). La diferencia de cargas que resulta de la generación de un gradiente electroquímico a través de la MMI es la base del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$). Finalmente, el gradiente de protones es utilizado por el complejo V de la cadena respiratoria para la síntesis de ATP mediado por la ATP sintasa. Es por ello que el mantenimiento de un adecuado potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) es esencial para la supervivencia celular. Sin embargo, en respuesta a condiciones de estrés, el MPTP puede abrirse, permitiendo el pasaje de solutos de hasta 1500 Da (Halestrap et al., 2002). Esta apertura resulta en la disrupción de la MMI y el “*swelling*” de la matriz mitocondrial (Figura I11). Dado que la MMI tiene un área de superficie mayor que la que presenta la MME, el “*swelling*” del contenido mitocondrial resulta en la ruptura de la MME y, en consecuencia, se produce la liberación de componentes mitocondriales tales como el citocromo c. En condiciones fisiológicas normales, se han reportado aperturas transientes del MPTP, acompañadas de cambios reversibles en el $\Delta\psi_m$ (Kroemer et al., 1998). Sin embargo, la apertura sostenida de este poro en el tiempo, asociada a la pérdida del $\Delta\psi_m$ de manera irreversible, se ha relacionado a muerte celular (Marchetti et al., 1996). Se ha reportado, también, que miembros de la familia Bcl-2 podrían regular al MPTP (Reed y Kroemer, 1998).

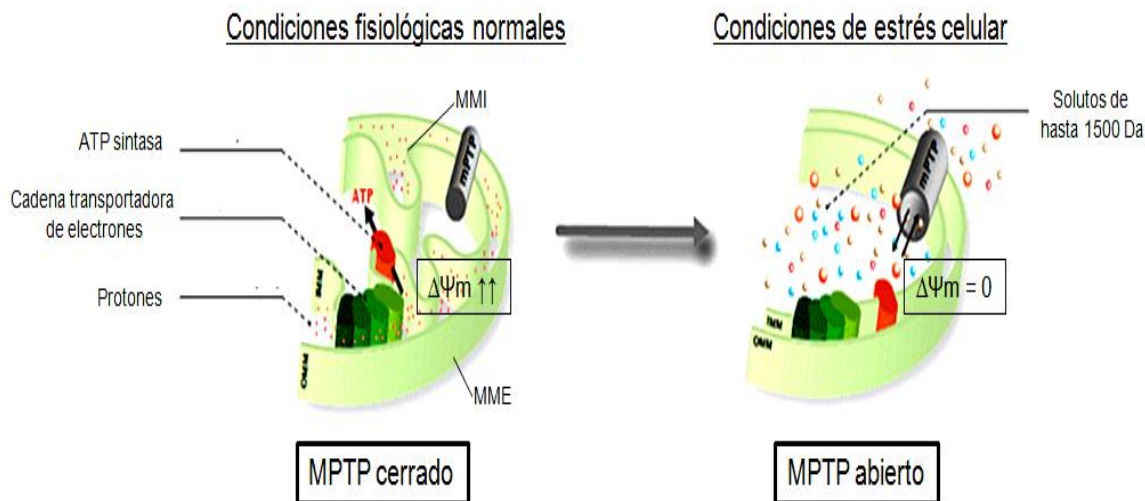


Figura I9. Poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (MPTP)

En condiciones fisiológicas normales, la cadena transportadora de electrones genera el gradiente de protones necesario para la síntesis de ATP, que se acompaña de un potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) elevado y del MPTP en un estado cerrado. Sin embargo, ante situaciones de estrés celular, el MPTP se abre, permitiendo el pasaje de solutos y la pérdida del $\Delta\Psi_m$, resultando en la disrupción de la MMI y el “*swelling*” de la matriz mitocondrial.

1.3.1.4. Mecanismo extrínseco

En respuesta a diversos estímulos apoptóticos extracelulares sentidos por receptores específicos de muerte, se activa la vía extrínseca de la apoptosis (Figura I10). Estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) y se caracterizan por la presencia de un dominio extracelular rico en residuos cisteína, una porción transmembrana y una porción citoplasmática que contiene una secuencia aminoacídica conocida como dominio de muerte (DD), esencial para la inducción de apoptosis (Ashkenazi y Dixit, 1998; Nagata, 1997). Esta vía se inicia por la unión de ligandos de muerte, tales como Fas/CD95 ligando (FasL/CD95L), factor de necrosis tumoral α (TNF α), ligando inductor de apoptosis relacionado al TNF (TRAIL), Apo3L y Apo2L, a distintos receptores de muerte (Fas/CD95, receptor I de TNF α (TNFR1), receptores de TRAIL I y II (TRAILR I y II), DR3 y DR4/DR5, respectivamente) (Ashkenazi y Dixit, 1998; Wajant, 2002).

Uno de los receptores mejor caracterizados es Fas. En ausencia de FasL, las subunidades de Fas espontáneamente se ensamblan en la membrana plasmática formando trímeros, gracias a la presencia de su dominio de ensamblaje (PLAD). Esta capacidad, independiente del ligando, de formar complejos en la membrana plasmática, se ha reportado también para TRAILR (Chan et al., 2000; Clancy et al., 2005; Siegel et al., 2000). La unión de FasL estabiliza a los trímeros de Fas al mismo tiempo que induce un cambio conformacional que permite que sus dominios DD recluten proteínas adaptadoras FADD (proteínas asociadas a Fas con un dominio de muerte), además de proteínas celulares inhibitoras de la apoptosis (cIAPs), c-FLIP y a la pro-caspasa 8 (o 10). Esta plataforma de activación conformada o complejo de iniciación de la señal de muerte, DISC (*death-inducing signaling complex*), es la encargada de activar a la pro-caspasa 8 (o 10). Si bien los cIAPs y c-FLIP presentan funciones antiapoptóticas, cuando las señales de muerte prevalecen, la caspasa 8 es activada y de esta forma, puede activar a la caspasa 9 y conducir a la muerte celular. En particular, el TNFRI necesita, además, de proteínas adaptadoras TRADD (proteínas asociadas a TNFR con un dominio de muerte) para reclutar a las proteínas FADD y a la pro-caspasa 8. Así también este receptor recluta otras proteínas que no se localizan en el complejo DISC, tales como TRAF2 y TRAF5 (factores asociados al TNFR 2 y 5), que se ha demostrado no siempre intervienen en el proceso apoptótico (Au y Yeh, 2007). Esto muestra que no necesariamente la activación de un receptor de muerte implica la transducción de una señal letal.

1.3.1.5. Integración de las vías extrínseca e intrínseca

Inicialmente, las vías extrínseca e intrínseca se consideraban independientes. Sin embargo, actualmente está bien establecido que existe un *crosstalk* entre ambas vías mediado por la proteína solo-BH3, Bid (Li et al., 1998) (Figura I10). Luego del reconocimiento de la importancia de la mitocondria en la apoptosis, se sugirió que todas las vías de activación de este proceso podrían depender de esta organela (Kroemer et al., 1997; Marchetti et al., 1996). Fue así

como se diferenciaron dos grupos de células (células tipo I y células tipo II) en función de su capacidad de llevar a cabo la apoptosis por la vía extrínseca sin necesitar de la mitocondria. Las células conocidas como tipo I (por ejemplo: timocitos, linfocitos T) son capaces de activar a la caspasa 8 en la plataforma DISC, seguido de la activación de la caspasa 3, sin intervención mitocondrial. Mientras que otros tipos celulares, conocidos como células tipo II (por ejemplo: hepatocitos, células pancreáticas β) dependen de la mitocondria para la completa ejecución de la apoptosis (Scaffidi et al., 1998). Estas diferencias se deberían a que las células tipo I formarían niveles elevados del complejo DISC necesario para la activación de la caspasa 8, mientras que los niveles generados en las células tipo II no serían suficientes para la obtención de una alta concentración de caspasa 8 activa. Por ello, las células tipo II necesitan mecanismos adicionales que amplifiquen la señal apoptótica y en este sentido, la caspasa 8 es capaz de clivar a BID, formándose t-BID (*truncated BID*) (Barnhart et al., 2003; Scaffidi et al., 1998). Este fragmento generado por la activación de la vía extrínseca, se dirigiría a mitocondria para activar a la vía intrínseca y asegurar la completa ejecución de la apoptosis. Se ha evidenciado que Bid interviene en la cascada de señalización activada corriente abajo Fas y TNFR1, comportándose como el nexo entre las dos vías apoptóticas (Gross et al., 1999). Sin embargo, en los últimos años, se ha reportado que la caspasa 8 luego de su clivaje en el complejo DISC, se dirigiría a la mitocondria e interaccionaría con el lípido cardiolipina (CL) en sitios de contacto existentes entre la MMI y la MME (Gonzalvez et al., 2008). Esto conduciría a la completa activación de la caspasa 8 y a su oligomerización, y finalmente, a la formación del fragmento t-Bid.

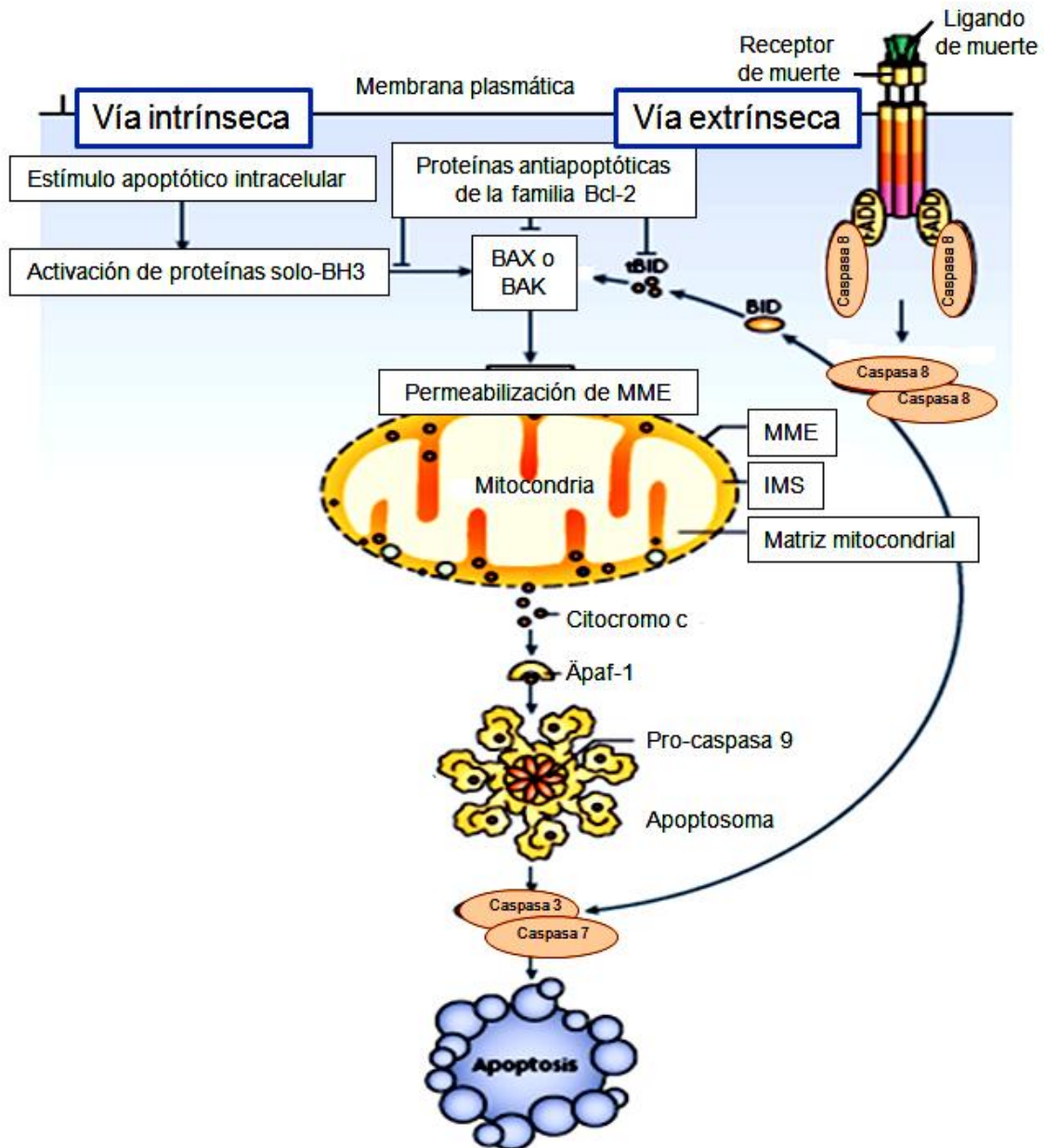


Figura I10. Vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis.

En respuesta a un estímulo apoptótico intracelular, se inicia la vía intrínseca de la apoptosis. La activación de proteínas pertenecientes a la familia Bcl-2, conduce a la activación de Bax/Bak y a la permeabilización de la MME, efectos que pueden ser prevenidos por las proteínas antiapoptóticas de esta familia. La liberación de varias proteínas del IMS promueve la activación de caspasas. En particular, el citocromo c se une a Apaf-1, formando una estructura conocida como apoptosoma, que recluta y activa a la pro-caspasa 9. Esta caspasa cliva y activa a la caspasa 9. Esta caspasa cliva y activa a las caspasas 3 y 7, induciendo la apoptosis. La vía extrínseca de la apoptosis se inicia luego de la unión de ligandos de muerte a sus correspondientes receptores

de muerte. Esto induce el reclutamiento de moléculas adaptadoras tales como FADD y, luego, de la caspasa 8, que resulta en la dimerización y activación de esta enzima. De esta forma, la caspasa 8 cliva y activa a las caspasas 3 y 7, induciendo la apoptosis. El *crosstalk* entre las vías intrínseca y extrínseca ocurre a través del clivaje de la caspasa 8 y la activación de BID. Su producto, tBID, es necesario en algunos tipos celulares para la completa ejecución de la apoptosis (Adaptado de Tait y Green, 2010).

1.3.1.6. Comunicación intercelular: estructuras *tunneling nanotubes*

La comunicación entre células es un proceso vital en todos los organismos durante el desarrollo, la reparación celular y la supervivencia, que se ha conservado a lo largo de la evolución (Gurke et al., 2008). Es por ello que un gran número de genes y sus consecuentes productos han sido implicados en las diferentes vías de comunicación intercelular, y su desregulación puede conducir al establecimiento de condiciones patológicas.

Hasta el momento, se han descrito diversos mecanismos que permiten el intercambio de información entre células. En el año 2004, se descubrió un nuevo principio para la comunicación célula a célula basado en la formación *de novo* de canales denominados *tunneling nanotubes* (TNT). Estos canales, descritos inicialmente en la línea celular PC12 de feocromocitoma de rata, permitían la transferencia directa de diversos componentes entre estas células (Rustom et al., 2004). Posteriormente, numerosos estudios reportaron la presencia de canales tipo-TNT en otros tipos celulares *in vitro* e *in vivo*, de origen humano y murino (Freund et al., 2006; Koyanagi et al., 2005; Onfelt et al., 2004; Onfelt et al., 2006; Watkins et al., 2005; Zhu et al., 2005). Actualmente, está bien establecido que la formación de estos nanotubos puede ocurrir por diferentes mecanismos dependiendo del tipo celular involucrado (Gurke et al., 2008).

Los TNT son canales que permiten la comunicación entre los citoplasmas de células distantes, admitiendo el intercambio de moléculas de la superficie celular (Gerdes y Carvalho, 2008), partículas virales (Sowinski et al., 2008) así como también contenido citoplasmático, incluyendo organelas tales como las mitocondrias (Koyanagi et al., 2005) (Figura I11). Sin embargo, el transporte en

estas conexiones de pequeñas moléculas tal como la calceína, está impedido, demostrando que los TNT intervienen en un mecanismo selectivo de transferencia citoplasmática (Davis y Sowinski, 2008). Estos canales están compuestos por F-actina, aunque, en algunos tipos celulares, se ha evidenciado la existencia de TNT de distinta composición (Onfelt et al., 2006). Así también, se ha reportado que los TNT son estructuras dinámicas y transitorias capaces de formarse en cuestión de minutos, persistiendo hasta varias horas, que presentan diámetros muy pequeños (50-200 nm) y cuyas longitudes pueden ser varias veces superior a las de sus diámetros (Rustom et al., 2004). Si bien hasta el momento no se ha realizado un análisis sistemático de los TNT establecidos entre diferentes tipos celulares, los estudios reportados parecen indicar que la naturaleza y el grado de intercambio molecular, así como el diámetro, la longitud y la arquitectura de estos canales, varían con el tipo celular involucrado (Gerdes y Carvalho, 2008; Gurke et al., 2008).

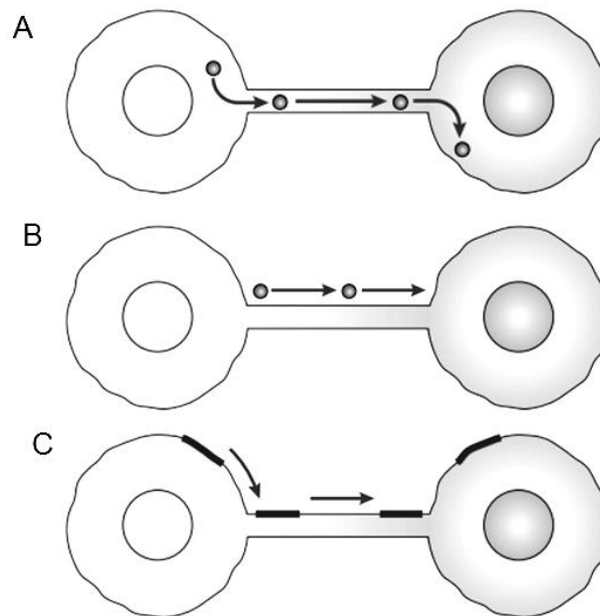


Figura I11. Comunicación intercelular vía TNT.

Los TNT son canales cuyos diámetros son del orden de los nanómetros, formados por F-actina que comunican y permiten interactuar a células que se encuentran distantes entre sí. A través de ellos, se transfieren múltiples señales desde organelos intracelulares tales como las mitocondrias (A) o partículas virales (B),

hasta componentes de la superficie celular (C) (Adaptado de Davis y Sowinski, 2008).

Bajo condiciones de estrés celular, tales como las que desencadenan el proceso de apoptosis, las células son influenciadas por redes de comunicación intercelular, que pueden modular su destino celular. Se ha sugerido que los TNT podrían mediar la transferencia de moléculas reguladoras de la apoptosis entre células apoptóticas y células sanas, alterando el destino de las células receptoras. De hecho, se ha reportado que estos canales son capaces de propagar la señal apoptótica de Fas ligando entre linfocitos T para inducir su muerte celular (Arkwright et al., 2010). Así también, los TNT han sido propuestos como intervinientes en el rescate de cardiomioblastos o células endoteliales estresadas mediado por células madres mesenquimales a través de la transferencia de mitocondrias sanas (Cselenyak et al., 2010; Liu et al., 2014). Además, se ha evidenciado que en los inicios del proceso apoptótico, las células PC12 estresadas son capaces de formar un tipo particular de TNT para interaccionar con las células sanas, diferente al que presentarían en condiciones fisiológicas normales (Wang y Gerdes, 2015). Este TNT es utilizado para la transferencia de mitocondrias, proceso en el que en algunos tipos celulares se observó la participación de la Rho-GTPasa, Miro-1 (Ahmad et al., 2014).

1.4. Señalización intracelular activada por el 17 β -estradiol en músculo esquelético

1.4.1. Familias proteína quinasa C y proteína quinasa D

La proteína quinasa C (PKC) comprende una gran familia de quinasas de residuos serina/treonina que puede ser activada en respuesta a diversos estímulos y que está involucrada en una multitud de procesos fisiológicos. La enzima regula actividades celulares tales como la proliferación, diferenciación, supervivencia y contracción muscular, entre otros (Nishizuka, 1992; Nishizuka, 1995; Toker, 1998).

Las enzimas PKC son monómeros de 80 kDa que tienen un dominio regulatorio en el extremo amino terminal y un dominio catalítico en el extremo carboxilo terminal. Ambos extremos se encuentran separados por una región bisagra, que es lábil al clivaje proteolítico cuando la enzima se activa (Newton, 1995). El polipéptido está compuesto por cuatro regiones constantes y cinco regiones variables intercaladas (Figura I12).

Se conocen al menos diez isoenzimas de PKC que se agrupan en tres subgrupos basándose en diferencias estructurales a nivel del dominio regulatorio de la enzima. Cada subclase de la familia tiene una dependencia específica a diferentes cofactores, de acuerdo a la composición de dicho dominio regulatorio (Mellor y Parker, 1998; Newton, 2001):

- PKC clásicas o convencionales (cPKC): son activadas por DAG (diacilglicerol) y Ca^{++} y pueden ser *down-reguladas* por exposición prolongada a altas dosis de ésteres de forbol. En este grupo se encuentran las isoformas α , β I, β II y γ .
- PKC noveles (nPKC): su activación es independiente de Ca^{++} , pero son sensibles a ésteres de forbol, por lo que pueden ser *down-reguladas* por exposición prolongada a altas dosis de ésteres de forbol. Son las isoformas δ , ϵ , η y θ .
- PKC atípicas (aPKC): requieren para su activación fosfatidilserina, siendo independientes de calcio y no reactivas a ésteres de forbol. Este grupo incluye las isoformas ζ y λ .

Los dominios críticos para la unión de estos activadores se encuentran en la porción regularoria N-terminal: el dominio C1 que une DAG y el dominio C2 que une Ca^{++} (Figura I12). Estos dominios también intervienen en la translocación de las PKCs a membranas via DAG y fosfolípidos aniónicos (Newton, 2003). El dominio regulatorio N-terminal contiene, además, sitios de anclaje para proteínas que podrían conducir a la PKC activada a otros sitios de localización subcelulares. Por otra parte, el dominio C-terminal de las PKCs se encuentra altamente

conservado entre las diferentes isoformas y la fosforilación en esta porción es necesaria para la generación de una quinasa madura que puede, entonces, ser reclutada a membranas.

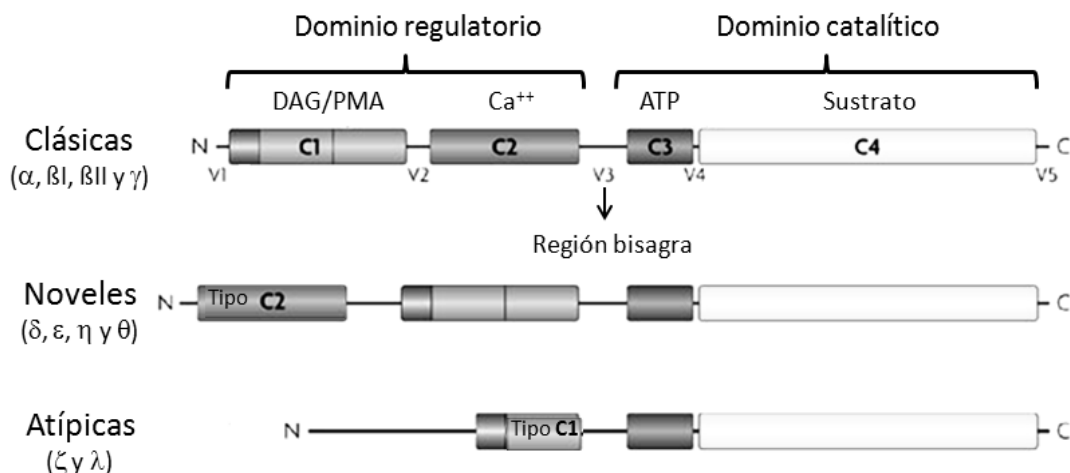


Figura I12. Estructura de las PKCs.

Las PKCs presentan un dominio regulador en el extremo N-terminal y un dominio catalítico en el extremo C-terminal, unidos por la región bisagra (V3). Asimismo, estas quinasas están formadas por cuatro regiones constantes (C1-4) y cinco regiones variables (V1-5). La región C1 presenta el sitio de unión al DAG/PMA, mientras que en la región C2 se encuentra el sitio de unión al Ca^{++} . Las regiones C3 y C4 del dominio catalítico constituyen los sitios de unión del ATP y del sustrato, respectivamente. El sitio Tipo C2 de las PKCs noveles no une Ca^{++} , mientras que el sitio Tipo C1 de las PKCs atípicas no une DAG/PMA (Adaptado de Mackay y Twelves, 2007).

En respuesta a diversos estímulos, se activa la fosfatidilinositol fosfolipasa C (PI-PLC), que resulta en la generación de DAG y en un incremento del Ca^{++} intracelular. Cuando la PKC todavía se encuentra en una conformación inactiva, el sitio de unión al sustrato se encuentra ocupado por el dominio pseudosustrato. La generación de DAG y Ca^{++} aumenta la afinidad de estas PKCs por las membranas, resultando en la liberación del pseudosustrato del sitio de unión al sustrato y en la activación de la quinasa. En particular, la fosforilación en residuos tirosina en algunas PKCs, tal como sucede en la PKC δ , se ha evidenciado en respuesta a varios estímulos apoptóticos tales como UV, H_2O_2 y *etoposide* (Blass et al., 2002;

Konishi et al., 2001). Estas quinasas activadas pueden conducir a la fosforilación directa de proteínas apoptóticas o a la regulación de la transcripción de genes pro o antiapoptóticos. De hecho, las isoformas de esta familia ejercen funciones distintas de acuerdo al tipo celular y al estímulo que condujo a su activación, lo que implica que la respuesta celular final es el resultado de la interacción de las PKCs con otras vías de señalización dentro de la célula. Así, se ha demostrado que algunas isoformas de PKC promueven la apoptosis, mientras que otras son antiapoptóticas (Dempsey et al., 2000).

La familia de proteínas quinasas D (PKD) está íntimamente relacionada con las PKCs. Originalmente se las había identificado como nuevos miembros en la familia PKC debido a que comparten la misma estructura molecular de un dominio N-terminal regulatorio y un dominio C-terminal catalítico, además de la presencia de un motivo tándem C1a/C1b en el extremo N-terminal (Johannes et al., 1994). Sin embargo, una diferencia estructural importante radica en la presencia de un dominio PH (*pleckstrin homology*) en el extremo N-terminal de las PKDs, que se cree estaría involucrado en una función autoinhibitoria (Iglesias y Rozengurt, 1998) (Figura I13). Esta familia está formada por tres miembros: PKD 1, 2 y 3, que son homólogos en estructura y que se comportan como serina/treonina quinasas (Rozengurt et al., 2005). Actualmente, las PKDs se clasifican como miembros de la familia de quinasas Cam calcio/calmodulina independientes (Fu y Rubin, 2011).

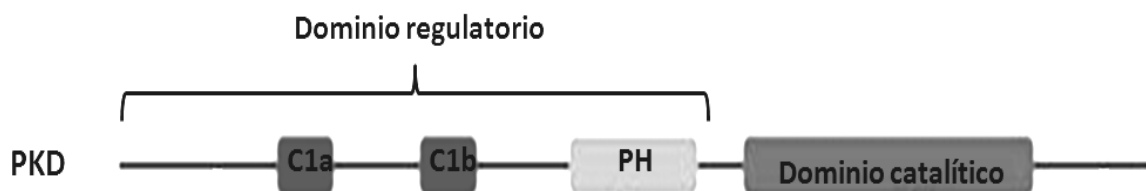


Figura I13. Estructura general de las PKDs.

Las enzimas de la familia PKD presentan un dominio regulatorio N-terminal y un dominio catalítico C-terminal. La característica distintiva de estas enzimas la confiere la presencia del dominio PH en el dominio regulatorio.

PKD 1 es el miembro mejor estudiado de esta familia. Fue la primer isoforma de la familia PKD en ser identificada. Inicialmente, esta quinasa era reconocida como una PKC y se la llamaba PKC μ . Es una enzima activada por estrés que participa en varios procesos fisiológicos tales como el crecimiento celular, la apoptosis, la adhesión celular y la angiogénesis. Se cree que su activación estaría determinada por la transfosforilación en los residuos Ser⁷⁴⁴/Ser⁷⁴⁸. Como consecuencia, el residuo Ser⁹¹⁶ en el extremo C-terminal sería autofosforilado. Los dos eventos son considerados marcadores de activación de esta PKD (Revisado en Steinberg, 2012).

Se ha evidenciado que el estrés oxidativo induce la activación de PKD, promoviendo su rol apoptótico. En algunos tipos celulares, este evento es mediado por PKCs noveles (Rozengurt, 2011). En contraposición, se ha reportado que PKD puede comportarse como un sensor del estrés oxidativo, activarse y ejercer un efecto antiapoptótico en varios tipos celulares (Singh y Czaja, 2007; Song et al., 2006; Song et al., 2009; Stortz, 2007).

1.4.2. Quinasas c-Jun N-terminal

Las quinasas c-Jun amino-terminal (JNKs, también conocidas como proteínas quinasas activadas por estrés (SAPKs)) fosforilan residuos serina o treonina y forman parte de la familia de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK). Existen tres genes que codifican para las isoformas JNK 1, 2 y 3, que generan un total de diez variantes de *splicing* de 46 y 54 kDa (Davis, 2000). Mientras que JNK 1 y 2 se expresan de manera ubicua en el organismo, la expresión de JNK 3 se encuentra restringida al cerebro, aunque niveles disminuídos de su ARNm se han encontrado en testículo (Coffey, 2014).

Estas quinasas se han involucrado en múltiples procesos fisiológicos tales como diferenciación, proliferación celular, supervivencia y muerte. Se activan por una serie de eventos de fosforilación en respuesta a diversos estímulos. MKK4 y MKK7 son las dos quinasas MAP2K que directamente fosforilan a JNK en los

residuos treonina 183 (Thr¹⁸³) y tirosina 185 (Tyr¹⁸⁵) presentes en un motivo conservado Thr-Pro-Tyr del *loop* de activación (Davis, 2000). MKK4 y MKK7 son activados por una fosforilación dual en residuos tirosina y treonina mediada por MAP3Ks. Luego de su activación por las MAP2Ks, JNK es capaz de fosforilar y activar múltiples proteínas nucleares y extranucleares, entre las que se incluyen al factor de transcripción proteína activadora-1 (AP-1) formado por dimerización de proteínas Jun (c-Jun, JunB, JunD) con las proteínas Fos (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2), ATF-2, c-Myc, p53, Elk1, NFAT, así como también proteínas reguladoras de la muerte celular como los miembros de la familia Bcl-2, entre otros (Bogoyevitch y Kobe, 2006).

Tal como se mencionó al inicio de esta sección, las quinasas JNK pueden intervenir en la inducción de apoptosis, pero también han sido implicadas en la promoción de la supervivencia celular y la proliferación (Hess et al., 2002; Yu et al., 2004). Estos roles opuestos asignados a JNK se explican por el hecho de que estas quinasas activan a un gran número de sustratos lo que, a su vez, se encuentra en estricta relación con el estímulo recibido, el tipo celular involucrado y el período post-estímulo que se evalúe (Lin, 2003). En este sentido, se ha evidenciado que la activación de JNK en forma transiente conduce a la supervivencia celular, mientras que su activación de manera sostenida en el tiempo resulta en apoptosis (Ventura et al., 2006), avalando la idea de que la duración del estímulo es un determinante fundamental en la respuesta celular observada. Respecto a su rol apoptótico, existen evidencias que sostienen que JNK intervendría en la vía intrínseca de la apoptosis mediante la regulación positiva de genes proapoptóticos transactivando diferentes factores de transcripción o directamente modulando la actividad de proteínas pro y antiapoptóticas mediante eventos de fosforilación (Essers et al., 2004; Lei et al., 2002; Lei y Davis, 2003).

1.4.3. p53 y p66Shc

La proteína p53 pertenece a una familia de factores de transcripción a la que al menos pertenecen dos miembros más: p73 y p63. Si bien los tres presentan una homología importante en sus secuencias primarias, existen divergencias en sus extremos C-terminales y difieren en el número de exones, funciones, regulación y distribución en los tejidos.

La proteína p53 actúa como un sensor del estrés celular (Giaccia y Kastan, 1998). En su forma activa se encuentra como un tetrámero compuesto por cuatro subunidades idénticas. Cada monómero presenta 393 aminoácidos y comprende varios dominios: un dominio de transactivación en el extremo N-terminal, una región rica en prolinas, un dominio central de unión al ADN (dominio DBD), un dominio de tetramerización y un dominio regulatorio en el extremo C-terminal (Figura I14).

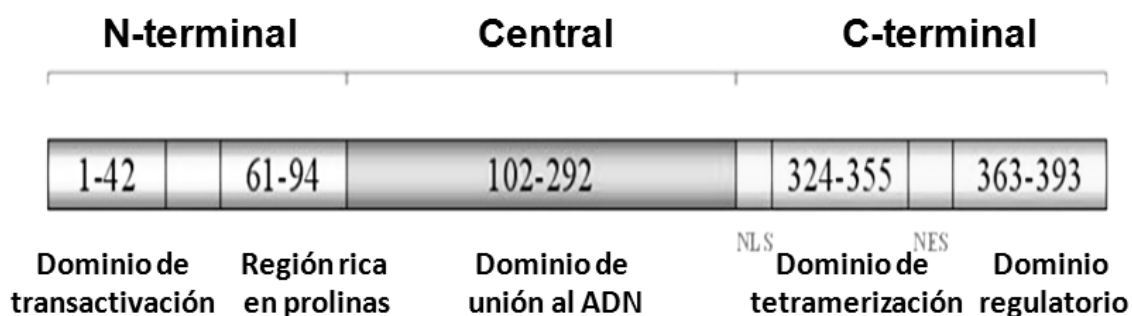


Figura I14. Estructura de p53.

Cada subunidad de p53 se encuentra conformada por un dominio de transactivación N-terminal, una región rica en prolinas, un dominio central de unión al ADN, y en el extremo C-terminal presenta un dominio de tetramerización y un dominio regulatorio (Adaptado de Bai y Zhu, 2006).

En condiciones fisiológicas, p53 se encuentra en su forma inactiva en una baja concentración en el interior celular. En respuesta a situaciones de estrés, p53 es activada, lo que conduce a una disminución en su degradación y a una rápida acumulación en la célula. Los niveles proteicos de p53 se encuentran controlados por la ubiquitin ligasa MDM2 (*murine double minute 2*), capaz de unirse a p53 para

su degradación y así inhibir su actividad transcripcional. Ante el estrés celular, disminuyen las interacciones entre ambas proteínas, reduciendo consecuentemente su ubiquitinización y degradación, lo que induce un aumento en su nivel de expresión proteico. Al mismo tiempo, el gen que codifica para MDM2 se encuentra bajo control transcripcional de p53, pudiendo ser regulado en respuesta al estrés celular. Sin embargo, para que p53 funcione apropiadamente, las modificaciones post-traduccionales son importantes para su activación, entre las que se destacan la fosforilación y la acetilación. Por ejemplo, se ha reportado que el tratamiento de cardiomiocitos neonatales con peróxido de hidrógeno resulta en apoptosis, que se correlaciona con un aumento en la fosforilación de p53 en el residuo serina 15 (Ser¹⁵) (Long et al., 2007). Estas modificaciones de p53 contribuyen a su estabilidad proteica y translocación nuclear para interactuar con secuencias específicas en sus genes blanco. De este modo, la proteína p53 puede actuar como factor de transcripción. Se ha reportado que esta proteína es capaz de regular positivamente o reprimir la transcripción de una gran variedad de proteínas involucradas en la apoptosis. En efecto, puede regular la expresión de Apaf-1, p66Shc (Bai y Zhu, 2006) y varios miembros de la familia de proteínas Bcl-2, entre los que se incluyen a Bcl-2 (Haldar et al., 1994; Miyashita et al., 1994), PUMA (Nakano et al., 2001), Noxa y Bax (Thornborrow y Manfredi, 2001). Además, otros genes *target* potenciales de p53 son KILLER/DR5, PERP (*p53 apoptosis effector related to PMP-22*) y Fas (Attardi et al., 2000; Revisado en El-Deiry, 1998). En algunas ocasiones el rol de p53 sobre la transcripción de ciertos genes es contradictorio. Así, la expresión de MnSOD es regulada positiva y negativamente por p53 (Dhar et al., 2010). Es posible que dependiendo del nivel de estrés, p53 actúe de manera diferente, activando a la MnSOD como una respuesta adaptativa ante niveles moderados de estrés, y reprimiendo su transcripción, cuando los niveles de estrés son elevados, conduciendo a la apoptosis.

Así también, se ha reportado que en ciertos tipos celulares, p53 puede ejercer funciones independientes de la transcripción génica, reflejando la

capacidad de presentar distintas respuestas según el contexto celular (Attardi et al., 1996; Caelles et al., 1994; Haupt et al., 1995; Sabbatini et al., 1995; Wagner et al., 1994; Yonish-Rouach, 1996). En este sentido, p53 puede actuar directa o indirectamente en la mitocondria, afectando el potencial de membrana mitocondrial (Li et al., 1999).

La familia Shc está formada por cuatro miembros: ShcA, ShcB, ShcC y ShcD, de los cuales ShcA es el mejor caracterizado. Este miembro, conocido como Shc, expresa tres isoformas que tienen pesos moleculares de 66, 52 y 46 kDa y se denominan p66Shc, p52Shc y p46Shc, respectivamente. P66Shc presenta la típica organización de los miembros de esta familia de proteínas adaptadoras: un dominio N-terminal de unión a fosfotirosina (PTB), un dominio central con homología colágeno 1 (CH1) y un dominio C-terminal con homología Src (SH2). Además, p52Shc y p66Shc presentan un dominio adicional N-terminal de unión al citocromo c (CB), y sólo p66Shc cuenta con un dominio con homología colágeno 2 (CH2). Mientras que p46Shc y p52Shc participan en la regulación de la proliferación, p66Shc interviene en la apoptosis (Luzi et al., 2000). Experimentos con modelos animales *knock out* para p66Shc demostraron que los dominios CH2 y CB son los responsables del rol de p66Shc en la apoptosis.

Como se mencionó, la proteína p66Shc es un gen blanco de p53 indispensable para la inducción de apoptosis asociada al estrés oxidativo. Se ha evidenciado que las modificaciones post-traduccionales de esta proteína contribuyen a su función proapoptótica (Migliaccio et al., 1999). En este sentido, la fosforilación de p66Shc en el residuo Ser³⁶ del dominio CH2 se ha relacionado con la apoptosis inducida por peróxido de hidrógeno o radiación UV (Migliaccio et al., 1999) y se ha involucrado en este evento a diversas quinasas, entre las que se incluyen a JNK, ERK y PKC β dependiendo del estímulo apoptótico (Hu et al., 2005; Le et al., 2001; Pinton et al., 2007; Smith et al., 2005). En su estado fosforilado p66Shc puede interactuar con la proteína 14-3-3, la tirosina fosfatasa PTP-PEST y la prolisomerasa Pin-1 (Faisal et al., 2002; Foschi et al., 2001;

Pinton et al., 2007). Se cree que la isomerización de p66Shc mediada por Pin-1 tendría significancia en la regulación de su transporte a la mitocondria y en la activación de la vía intrínseca de la apoptosis (Revisado en Galimov, 2010). Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de estudios que asignan una función proapoptótica a p66Shc, algunas investigaciones sugieren que esta proteína puede presentar efectos antiapoptóticos (Sansone et al., 2007).

Los mecanismos que puede implementar p66Shc para incrementar los niveles de ROS y ejercer un efecto proapoptótico son: la activación de NADPH oxidasas de membrana, la regulación negativa de la expresión de enzimas antioxidantes y directamente la generación de ROS en la mitocondria. Por ejemplo, se ha reportado la reducción en la expresión de las enzimas GPx y MnSOD (Wu et al., 2006) asociada a la regulación negativa de FoxOs mediada por p66Shc (Smith et al., 2005). Sin embargo, estos resultados están en desacuerdo con los obtenidos por otros grupos que sostienen que p66Shc no afecta los niveles de enzimas antioxidantes (Francia et al., 2004; Giorgio et al., 2005; Orsini et al., 2004). Por otra parte, estudios de localización subcelular de p66Shc muestran que un alto porcentaje se encuentra en la mitocondria (Orsini et al., 2004). Otros reportan que solo un 10% del p66Shc celular se encuentra en esta organela (Nemoto et al., 2006). Estas diferencias descritas estarían relacionadas con los distintos estímulos inductores de la apoptosis intervinientes en cada uno de los estudios y los distintos tipos celulares. El mecanismo que interviene en el transporte de esta proteína a la mitocondria no está aún totalmente esclarecido. Se ha demostrado que p66Shc podría asociarse en esta organela con complejos proteicos compuestos por la proteína de shock térmico 70 (HSP70) y las subunidades TIM y TOM de la maquinaria de importación mitocondrial que mediarían el transporte hacia esta organela (Orsini et al., 2006). Por otro lado, p66Shc al translocar a la mitocondria podría regular al MPTP, induciendo su apertura sostenida en el tiempo para promover la apoptosis (Almeida et al., 2010).

1.4.4. Miembros de la clase O de la familia *Forkhead*

La subfamilia *Forkhead box O* (FoxO) de factores de transcripción se encuentra conservada desde *Caenorhabditis elegans* hasta los mamíferos, donde se han encontrado cuatro miembros: FoxO1 (FKHR), FoxO3 (FKHRL1), FoxO4 (AFX) y FoxO6. Todos los FoxOs actúan como potentes activadores a nivel transcripcional mediante su unión a motivos consenso conservados TTGTTTAC (Furuyama et al., 2000; Xuan y Zhang, 2005) presentes en los promotores de sus genes blanco.

Su principal función es actuar como reguladores de la homeostasis, particularmente en respuesta a situaciones de estrés. Es así como se los ha involucrado en la reparación celular, la detoxificación de ROS y la apoptosis, entre otras (Brunet et al., 1999; Dijkers et al., 2000; Kops et al., 2002; Lee et al., 2003; Mammucari et al., 2007; Medema et al., 2000; Murphy et al., 2003; Nemoto y Finkel, 2002; Tran et al., 2002; Zhao et al., 2007). Debido a que las funciones que ejercen son muy diversas y en ciertas ocasiones son antagónicas, es probable que la actividad de estos factores de transcripción sea regulada diferencialmente en los distintos tejidos en respuesta a diferentes tipos o intensidades de los estímulos. Posiblemente, entonces, bajo condiciones leves de estrés, los FoxOs activen genes de resistencia al estrés, mientras que al aumentar la intensidad del estímulo, estos activen genes proapoptóticos. Además, estos factores podrían regular diferentes genes en distintos tipos celulares, por ejemplo, causando apoptosis en algunas células y promoviendo la supervivencia en otras.

En respuesta a una gran variedad de estímulos, entre los que se incluye al estrés oxidativo, los FoxOs pueden sufrir cambios en su nivel de expresión proteico, su localización subcelular, su unión al ADN y su actividad transcripcional. Además, estos factores de transcripción pueden sufrir modificaciones post-traduccionales tales como fosforilación, metilación, acetilación y ubiquitinización (Eijkelenboom y Burgering, 2013).

Aunque, como se describió anteriormente, los FoxOs pueden ser regulados de diversas maneras en respuesta a estímulos externos, un mecanismo muy importante lo constituye el cambio en su localización subcelular. Los miembros de esta familia son regulados negativamente por la vía de señalización PI3K/Akt. La fosforilación de estos factores mediada por Akt induce el secuestro de los FoxOs en el citosol, previniendo que estos factores puedan activar a sus genes blanco (Biggs et al., 1999; Brunet et al., 1999). En particular, la fosforilación del FoxO3a en los sitios treonina 32 (Thr³²) y serina 253 (Ser²⁵³) crea sitios de unión para la proteína 14-3-3 (Brunet et al., 1999; Obsilova et al., 2005; Rinner et al., 2007). 14-3-3 al unirse al FoxO en el núcleo probablemente induzca un cambio conformacional que resulta en la exposición de una secuencia de exportación nuclear y así permite que este factor sea exportado al citosol (Brunet et al., 2002). Al mismo tiempo, 14-3-3 previene la relocalización del FoxO en el núcleo y su unión al ADN para regular la expresión génica (Obsilova et al., 2005). Los cambios en la localización subcelular hasta aquí descritos indican que existe un *pool* de FoxOs fosforilados e inactivos en el citosol, a la espera de ser activados. Las proteínas fosfatasas responsables de la defosforilación de estos factores no han sido totalmente caracterizadas. Así también, se ha evidenciado que en respuesta al estrés oxidativo, se induce la relocalización de los FoxOs en el núcleo (Brunet et al., 2004; Frescas et al., 2005; Kitamura et al., 2005). La necesidad de responder rápidamente a una injuria por estrés oxidativo explicaría la posibilidad de los FoxOs de ingresar en el núcleo, aún en su estado fosforilado, sobrepasando el requerimiento de su defosforilación (Calnan y Brunet, 2008). Así también, se ha evidenciado que ERK y la ubiquitina ligasa MDM2 pueden regular en forma conjunta a FoxO3a (Yang et al., 2008). Inicialmente, se estableció que ERK regulaba a MDM2 a nivel transcripcional (Ries et al., 2000) y, posteriormente, que esta MAPK mediante la fosforilación de FoxO3a afectaba la actividad de MDM2. Esta modificación post-traducciona que sufre FoxO3a induce su asociación con MDM2 (Yang et al., 2008). Se ha postulado que la modificación del factor FoxO3a mediada por ERK provocaría un cambio conformacional que dejaría al descubierto

sitios de reconocimiento de MDM2. Otros han hipotetizado que FoxO3a expresaría constitutivamente señales para promover su ubiquitinización, pero la fosforilación mediada por ERK sería necesaria para que FoxO3a y MDM2 se aproximen para su asociación en un complejo. En consecuencia, este cambio induciría un aumento en la degradación de FoxO3a, impidiendo que pueda ejercer su acción. En contraste con la actividad inhibitoria de estas quinasas, la acción de JNK sobre FoxO3a es controvertida. Si bien se han sugerido potenciales sitios de fosforilación mediada por JNK en el extremo C-terminal de FoxO3a, que resultarían en la pérdida de la regulación negativa de Akt, inducirían su localización nuclear y aumentarían su actividad transcripcional, hasta el momento no han sido totalmente reconocidos tales sitios en esta proteína (Sunters et al., 2006). Asimismo, algunos estudios han evidenciado que JNK, actuando de manera indirecta, induce la fosforilación de 14-3-3 y la subsiguiente liberación de este factor, para su importación nuclear (Sunayama et al., 2005), mientras que otros han reportado que JNK indirectamente a través de p66Shc, estimula la fosforilación de FoxO3a (Chahdi y Sorokin, 2008; Guo et al., 2009; Nemoto y Finkel, 2002). Por otro lado, se ha reportado que FoxO4 puede ser fosforilado en los residuos Thr⁴⁵¹ y Thr⁴⁴⁷ por JNK, induciendo su relocalización desde el citosol al interior nuclear (Essers et al., 2004; Oh et al., 2005).

En contraposición a los cambios en la localización subcelular que son rápidamente reversibles, los asociados a la expresión proteica son más permanentes, por lo que tendrían un impacto más profundo en las funciones de los FoxOs.

1.5. Estrés oxidativo, envejecimiento y sarcopenia

Actualmente, se encuentra bien establecido que el estrés oxidativo cumple un rol muy importante en el proceso de envejecimiento, y especialmente en aquellos tejidos en los que la generación de ROS es más pronunciada, como sucede en el músculo esquelético.

La principal función de este tejido es producir la fuerza necesaria para la generación del movimiento del cuerpo. Debido a que la fuerza muscular depende de la masa muscular esquelética, esta última representa un determinante fundamental para un adecuado funcionamiento de este tejido. Aún en personas de edad avanzada sanas, se observa una disminución progresiva en la masa muscular, que conduce a una pérdida de la fuerza muscular y, finalmente, a una funcionalidad disminuída. La pérdida de la masa y función muscular que se presenta durante el envejecimiento se conoce como sarcopenia. Este término fue utilizado por primera vez por Rosenberg (1989) en un intento de asignarle mayor importancia clínica a la disminución progresiva del tejido muscular en el envejecimiento, no asociado a ninguna enfermedad específica, para así poder diferenciarla de la caquexia y/o la pérdida de masa muscular que se presenta en distintas patologías.

Está aceptado que la sarcopenia es una entidad compleja y multifactorial. Los mecanismos moleculares que subyacen a este proceso observado en la vejez no se han dilucidado totalmente, sin embargo se han propuesto varias hipótesis. Una de ellas sostiene que la acumulación de ROS podría contribuir al establecimiento de esta entidad en la edad avanzada. Además, se ha evidenciado que la apoptosis se incrementa significativamente en el músculo con la edad, pudiendo contribuir al establecimiento de la sarcopenia (Dirks y Leeuwenburgh, 2005; Marzetti y Leeuwenburgh, 2006). Se ha sugerido que la disminución en el número de células satélites contribuiría a la pérdida de masa muscular observada en este período de la vida (Jejurikar y Kuzon, 2003). En efecto, estas células satélites son esenciales para el normal crecimiento, reparación y regeneración de las fibras musculares adultas ya diferenciadas, conformando la única fuente de generación de nuevo músculo en el organismo en respuesta a la injuria. De importancia, uno de los mecanismos implicados en la disminución del número de células satélites durante la vejez, es la apoptosis (Jejurikar et al., 2006).

Si bien se ha establecido que la disminución del nivel de E_2 que se presenta durante el envejecimiento se encuentra en estrecha relación con el desarrollo de la sarcopenia, aún no se han esclarecido totalmente los mecanismos moleculares activados por la hormona que promueven la supervivencia celular en las células satélites del músculo esquelético.

Hipótesis y objetivos

Hipótesis

En los últimos años se ha descrito el rol del E₂ en varios tejidos no asociados a la reproducción (Aguirre y Baudry, 2009; Kulkarni, 2009) como consecuencia del hallazgo de receptores de la hormona en los mismos. Además, se ha sugerido un potencial efecto protector de la hormona en muchos de estos tejidos.

Si bien ha sido descrita la presencia de receptores para E₂ en músculo esquelético, en sus dos subtipos: α y β , el mecanismo molecular activado por la hormona y el rol fisiológico de la misma en este tejido no han sido totalmente dilucidados.

En este laboratorio, utilizando la línea celular de músculo esquelético murino C2C12 se demostró que, sumado a la localización citosólica-nuclear, los ER se encuentran asociados a mitocondria y fracción microsomal (Milanesi et al., 2008). El hecho de que la mitocondria tenga un papel central en la apoptosis condujo a imaginar un rol regulatorio de la hormona sobre dicho proceso. La apoptosis es un proceso activo en el músculo esquelético normal durante el ejercicio intenso, la denervación muscular, y en patologías como la distrofia muscular. Estas patologías suelen relacionarse con acumulación de mitocondrias defectuosas (Wanagat et al., 2001) o con disminución de la capacidad oxidativa del músculo esquelético por disfunción mitocondrial (Discutido en Vasconsuelo et al., 2013). Asimismo, varias patologías observadas durante el envejecimiento se asocian a disfunción mitocondrial (Wallace, 2005). Estas evidencias, sumado al rol protector que se ha demostrado de la hormona sobre la mitocondria (Borrás et al., 2010), avalan que un desbalance hormonal, como ocurre en la vejez, desregularía la apoptosis. Estos conceptos son de importancia como base de estudios para revelar el mecanismo molecular de la sarcopenia y de otras miopatías asociadas a desbalance hormonal (Kamel et al., 2002).

Hasta el presente, no existe información de los mecanismos moleculares que subyacen en las miopatías asociadas a desregulación de la apoptosis y niveles hormonales. Por ello, de acuerdo a estos antecedentes, se planteó en esta tesis que el E₂ ejercería un rol protector resultando en supervivencia celular frente a las cascadas activadas por el agente inductor de apoptosis H₂O₂, en células de músculo esquelético, focalizando en la protección de las funciones mitocondriales.

Objetivo general

Investigar el rol del E₂ sobre las cascadas de señalización activadas por el agente inductor de apoptosis H₂O₂ en células musculares esqueléticas, caracterizando los mecanismos moleculares involucrados y enfatizando en el rol del esteroide en la modulación de funciones mitocondriales.

Objetivos específicos

Utilizando a la línea celular de músculo esquelético murino C2C12 y como agente inductor de apoptosis al H₂O₂, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar la respuesta mitocondrial a la hormona E₂, estudiando la función del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (MPTP) y el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).
- Evaluar el efecto del E₂ sobre las enzimas antioxidantes: manganeso superóxido dismutasa (MnSOD), glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT).
- Evaluar el rol de p66Shc, p53 y miembros de la familia de los factores de transcripción *Forkhead box class O* (FoxOs) en la apoptosis inducida por H₂O₂ y su regulación por E₂.

- Evaluar el rol de las Jun N-terminal quinasas (JNKs) y de distintas isoformas de PKC en la apoptosis inducida por H_2O_2 y su regulación por E_2 .
- Evaluar la modulación de la expresión génica mediada por E_2 de componentes de las cascadas apoptóticas activadas.

Metodología

3.1. Modelo experimental

El sistema experimental utilizado para el desarrollo de esta tesis fue la línea celular C2C12 obtenida de la *American Type Culture Collection* (Manassas, VA). Estas células son mioblastos murinos que derivan de células satélites, son un subclon de los mioblastos C2 y su comportamiento se corresponde con el del linaje progenitor (Burattini et al., 2004; Yaffe y Saxel, 1977). Las células C2C12 en estado proliferativo son equivalentes a las células satélites que rodean a las fibras musculares y son reservorio de células indiferenciadas, que intervienen en la regeneración del tejido muscular (Yoshida et al., 1998). Estas células expuestas al agente apoptótico H₂O₂ presentan un fenotipo comparable al del envejecimiento muscular, siendo entonces una herramienta útil para estudiar los mecanismos moleculares que intervienen en las miopatías asociadas al envejecimiento tal como la sarcopenia (Discutido en La Colla et al., 2015). Así también, estas células expresan receptores estrogénicos (ER) en localizaciones clásicas (citosol-núcleo) y no clásicas (mitocondria-fracción microsomal) (Milanesi et al., 2008). Por lo expuesto, la línea celular C2C12 constituye un adecuado modelo experimental para cumplir con los objetivos planteados en el presente trabajo.

3.2. Materiales

Los reactivos utilizados se detallan en la siguiente tabla:

Reactivo	Empresa proveedora
<i>Full-Range Rainbow Molecular Weight marker</i>	Amersham (UK)
<i>Superoxide Dismutase Assay Kit II</i> Inhibidor LY294002	Calbiochem (San Diego, CA, USA)
<i>Glutathione Peroxidase Assay Kit</i>	Cayman Chemical (Ann Arbor, MI)
Quelerritina	Alomone (Jerusalem, Israel)
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems Inc., CA, USA

<i>JC-1 mitochondrial transmembrane potential detection kit</i>	Becton-Dickinson Biosciences (San Jose, CA, USA)
<i>KAPA SYBR FAST qPCR Kit Master Mix Universal</i>	Biosystems (Boston, Massachusetts, USA)
Inhibidor SP600125	Cell Signalling Technology (Beverly, MA, USA)
<i>MitoTracker Red (MitoTracker Red CMXRos)</i> Calceína acetoximetiléster Tetrametilrodamina metil éster <i>Mitotracker Green</i>	Molecular Probes (Eugene, OR, USA)
<i>Western Lightning Plus-ECL Enhanced Chemiluminescence Substrate</i>	Perkin-Elmer, Inc (Waltham, MA, USA)
<i>Pep Tag "non-radioactive PKC assay kit</i> Ester de forbol 12-miristato 13-acetato	Promega Corporation (Madison, USA)
<i>High Pure RNA Isolation Kit</i>	Roche (Mannheim, Germany)
17 β -estradiol <i>Fulvestrant</i> (ICI 182780) Inhibidor PD98059 MPP	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)

Tabla M1. Reactivos utilizados.

Los anticuerpos utilizados se detallan en la siguiente tabla:

Anticuerpo	Empresa proveedora
Anticuerpo anti-COX IV	Cell Signalling Technology (Beverly, MA, USA)
Anticuerpo anti-VDAC	Cell Signalling Technology (Beverly, MA, USA)
Anticuerpo anti-SOD2	Santa Cruz Biotechnology, Inc (California, USA)
Anticuerpo anti-β-tubulina	Thermo Fisher Scientific, Inc. (Rockford, IL, USA)
Anticuerpo anti-Bax	Thermo Fisher Scientific, Inc. (Rockford, IL, USA)

Anticuerpo anti-p-PKCδ Y³¹¹	Cell Signalling Technology (Beverly, MA, USA)
Anticuerpo anti-PKCδ	Cell Signalling Technology (Beverly, MA, USA)
Anticuerpo anti-p-JNK	Santa Cruz Biotechnology, Inc (California, USA)
Anticuerpo anti-JNK	Santa Cruz Biotechnology, Inc (California, USA)
Anticuerpo anti-p-p66Shc Ser³⁶	Abcam (Cambridge, MA, USA)
Anticuerpo anti-p-p53 Ser¹⁵	Cell Signalling Technology (Beverly, MA, USA)
Anticuerpo anti-p-PKD/PKCμ Ser⁹¹⁶	Cell Signalling Technology (Beverly, MA, USA)
Anticuerpo anti-PKD/PKCμ	Cell Signalling Technology (Beverly, MA, USA)
Anticuerpo anti-p-PKC α/β Thr^{638/641}	Cell Signalling Technology (Beverly, MA, USA)
Anticuerpo anti-p-PKC θ	Cell Signalling Technology (Beverly, MA, USA)
Anticuerpo anti-p-FoxO3a Ser²⁵³	Cell Signalling Technology (Beverly, MA, USA)
Anticuerpo anti-p-FoxO4 Thr^{447/451}	Abcam (Cambridge, MA, USA)
Anticuerpo anti-p-Akt Ser⁴⁷³	Cell Signalling Technology (Beverly, MA, USA)
Anticuerpo anti-Akt	Cell Signalling Technology (Beverly, MA, USA)
Anticuerpo anti-GPx3	Santa Cruz Biotechnology, Inc (California, USA)
Anticuerpo anti-lamin B	Santa Cruz Biotechnology, Inc (California, USA)
Anticuerpo anti-actina	Santa Cruz Biotechnology, Inc (California, USA)

Anticuerpo anti-conejo conjugado al fluoróforo Alexa Fluor 488	Molecular Probes (Eugene, OR, USA)
Anticuerpo anti-ratón conjugado al fluoróforo Cy2	Molecular Probes (Eugene, OR, USA)
Anticuerpo anti-conejo acoplado a HRP	Santa Cruz Biotechnology, Inc (California, USA)
Anticuerpo anti-ratón acoplado a HRP	Santa Cruz Biotechnology, Inc (California, USA)

Tabla M2. Anticuerpos utilizados.

3.3. Métodos

3.3.1. Cultivo celular

Las células pertenecientes a la línea celular C2C12 de músculo esquelético murino se cultivaron en frascos de poliestireno de 75 cm² con medio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) sin rojo fenol, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado (30 min, 56°C), 2% de antibióticos (penicilina, estreptomicina) y 1% de antimicótico (nistatina) a 37°C, bajo atmósfera humidificada de 95% aire/5% CO₂. La ausencia del indicador rojo fenol en el medio de cultivo se debe a su comprobada actividad estrogénica (Welshons et al., 1988). Para su adecuado crecimiento, el recambio con medio fresco con SFB se realizó cada 48 hs.

Para la realización de los experimentos, se emplearon células en cultivo en placas de Petri con un 70-80 % (120000 cells/cm²) o 50 % de confluencia, según los requerimientos de cada ensayo. Para los ensayos de inmunocitoquímica, las células se cultivaron sobre cubreobjetos de vidrio, bajo las mismas condiciones descritas previamente.

3.3.2. Tratamientos

Antes de iniciar los experimentos, las células fueron incubadas en medio DMEM sin SFB durante 30 minutos. La ausencia de suero conduce a la sincronización celular en un estado basal, evitando que se activen vías

proliferativas como consecuencia de la acción de factores estimulantes, ajenos al tratamiento, que puedan enmascarar o interfieran en los efectos específicos del tratamiento adicionado.

Luego de este período, las células fueron expuestas a los siguientes tratamientos, que se realizaron con medio DMEM sin SFB, según lo especificado en cada experimento:

Condición	Abreviatura	Descripción
Control	C	Tratamiento con el vehículo de la hormona: isopropanol (0,001%) o con DMEM sin suero, según corresponda
17β-estradiol	E ₂	Incubación con 17β-estradiol (10 ⁻⁸ M) durante el tiempo especificado en cada ensayo
Peróxido de hidrógeno	H ₂ O ₂	Incubación con peróxido de hidrógeno (0,5 mM) durante el tiempo especificado en cada ensayo
17β-estradiol + peróxido de hidrógeno	E ₂ + H ₂ O ₂	Tratamiento con 17β-estradiol (10 ⁻⁸ M, 1h) antes del agregado de peróxido de hidrógeno (0,5 mM)
17β-estradiol + MPP	E ₂ + MPP	Tratamiento con MPP (100 nM, 1h) antes del agregado de 17β-estradiol (10 ⁻⁸ M) durante el tiempo especificado en cada ensayo
17β-estradiol + peróxido de hidrógeno +	E ₂ + H ₂ O ₂ + F	Tratamiento con Fulvestrant (1 μM, 1h) antes de la adición de 17β-estradiol (10 ⁻⁸ M), seguido por la incubación con

Fulvestrant		peróxido de hidrógeno (0,5 mM)
17β-estradiol + peróxido de hidrógeno + MPP	$E_2 + H_2O_2 +$ MPP	Tratamiento con MPP (100 nM, 1h) antes de la adición de 17β-estradiol (10^{-8} M), seguido por la incubación con peróxido de hidrógeno (0,5 mM)
Inhibidor SP 600125 + peróxido de hidrógeno	SP+ H_2O_2	Tratamiento con el inhibidor SP600125 (10 μM, 1h) antes de la incubación con peróxido de hidrógeno (0,5 mM)
Quelerritrina + peróxido de hidrógeno	Q + H_2O_2	Tratamiento con el inhibidor quelerritrina (2 μM, 1h) antes de la incubación con peróxido de hidrógeno (0,5 mM)
Éster de forbol 12- miristato 13-acetato + peróxido de hidrógeno	PMA 48hs + H_2O_2	Tratamiento con éster de forbol 12-miristato 13-acetato (10 μM, 48h) previo a la adición de peróxido de hidrógeno (0,5 mM)
Éster de forbol 12- miristato 13-acetato	PMA	Tratamiento con éster de forbol 12-miristato 13-acetato (1 μM, 1h)
Inhibidor LY294002 + peróxido de hidrógeno	LY + H_2O_2	Tratamiento con el inhibidor LY294002 (25 μM, 1h) antes de la incubación con peróxido de hidrógeno (0,5 mM)
Inhibidor PD 98059 + peróxido de hidrógeno	PD + H_2O_2	Tratamiento con el inhibidor PD98059 (10 μM, 1h) antes de la incubación con peróxido de hidrógeno (0,5 mM)

Tabla M3. Tratamientos realizados.

3.3.3. Cuantificación de proteínas totales

La determinación de proteínas se realizó de acuerdo a la metodología establecida por Bradford (1976). Esta técnica se basa en la unión del colorante *Comassie Brilliant Blue G-250* a las proteínas, lo que conduce a un cambio en el máximo de absorción del colorante desde 465 nm a 595 nm y es este aumento en la absorción a 595 nm el que es monitoreado.

El reactivo utilizado para la cuantificación proteica se compone de *Comassie Brilliant Blue G-250* 0,01%, etanol 4,7% y ácido fosfórico 8,5%. Al inicio, se preparó una curva de calibrado empleando como proteína patrón a la seroalbúmina bovina (BSA) (1mg/ml), graficando $A_{595\text{ nm}}$ vs μg de proteína en cada estándar. La concentración proteica en las muestras incógnitas se calculó extrapolando la absorbancia obtenida a 595 nm en la curva estándar. Para ello, alícuotas por duplicado de las muestras se incubaron durante 5 minutos en presencia de 2,5 mL del reactivo de Bradford. Para las lecturas se utilizó un espectrofotómetro *Thermo Spectronic*.

3.3.4. Fraccionamiento subcelular

Luego de los correspondientes tratamientos, las células cultivadas en placas de Petri fueron removidas manualmente y homogeneizadas con homogeneizador de vidrio a 4 °C con *buffer TES* compuesto por Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), sacarosa 250 mM, EDTA 1 mM y conteniendo DTT 2 mM, inhibidores de proteasas: PMSF 2 mM, leupeptina 42 μM y aprotinina 15 μM , e inhibidores de fosfatasas Na_2VO_4 0,1 mM y NaF 1 mM. Las fracciones subcelulares se aislaron por centrifugación diferencial a 4°C en una centrifuga (*Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed centrifuge*). La primera centrifugación se realizó a 100 xg durante 5 minutos para sedimentar y eliminar los restos celulares. Luego, se obtuvo el pellet nuclear por centrifugación a 800 xg durante 20 min (fracción enriquecida en núcleos (N)). El sobrenadante fue centrifugado a 10.000 xg durante 30 min para sedimentar las mitocondrias (fracción enriquecida en mitocondrias (MIT)). El

sobrenadante postmitocondrial se centrifugó a 120.000 xg durante 90 min para aislar el citosol (fracción soluble) y los microsomas (fracción particulada). Los pellets obtenidos fueron resuspendidos en el mismo *buffer* TES utilizado inicialmente. Se realizaron, asimismo, lavados de cada una de las fracciones obtenidas con dicho *buffer* para aumentar la pureza de las mismas. La pureza de las mismas se constató mediante SDS-PAGE con marcadores específicos de cada fracción, utilizándose anti-laminina B para determinar la presencia de núcleos y anti-citocromo C oxidasa IV o anti-VDAC para determinar la presencia de mitocondrias.

3.3.5. Electroforesis en gel de poliacrilamida, electrotransferencia e inmunodetección (*Western blotting*)

Luego de los diferentes tratamientos, las células cultivadas en placas de Petri fueron removidas manualmente y homogeneizadas con homogenizador de vidrio a 4 °C con un *buffer* de lisis compuesto por Tris-HCl (pH 7,4) 100 mM, EDTA 2 mM, Tritón X-100 2 % y conteniendo DTT 2 mM, inhibidores de proteasas: PMSF 2 mM, leupeptina 42 µM y aprotinina 15 µM, e inhibidores de fosfatasas: Na₂VO₄ 0,1 mM y NaF 1 mM. Las muestras homogeneizadas (25-30 µg) se mezclaron con *buffer* de muestra (Tris-HCl 125 mM pH 6,8, SDS 4 %, β-mercaptoetanol 10 %, glicerol 20 %, azul de bromofenol 20 µg/ml) y se calentaron a 100°C durante 5 min. Luego, estas se separaron por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida discontinuos (gel de apilamiento: 4%; gel de separación: 10-12%) según Laemmli (1970). La corrida se efectuó a un voltaje constante de 100 V, empleando *buffer* de corrida (Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glicina 195 mM, SDS 0,1%). Junto con las muestras, se utilizó un marcador de peso molecular coloreado para determinar la migración relativa de las proteínas desconocidas. Una vez terminada la separación electroforética, las muestras fueron transferidas a membranas de Immobilon P (PVDF: polivinil-difluoruro; Millipore 0,45 µm) durante 2h a un amperaje constante de 200 mA en presencia de *buffer* Towbin de transferencia (Tris 0,25 M pH 8,3, glicina 0,192 M, metanol 20%) (Towbin et al.,

1979). Luego, las membranas se incubaron con la solución de bloqueo durante 60 min a temperatura ambiente, en agitación (*buffer* PBS-T: Tris 50 mM pH 7,4, NaCl 200 mM, Tween 20 0,1% v/v, con leche en polvo descremada 5%). Posteriormente, se realizaron lavados con PBS-T e incubaron durante toda la noche a 4°C con anticuerpos dirigidos contra diferentes proteínas, preparados en *buffer* PBS-T conteniendo BSA 1%. Luego, las membranas se lavaron nuevamente con PBS-T y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa de rábano durante 1 h a temperatura ambiente, en agitación. Finalmente, las membranas se lavaron con PBS-T y fueron reveladas con un reactivo quimioluminiscente *Western Lightning Plus-ECL Enhanced Chemiluminescence Substrate* (Perkin Elmer) para luego ser expuestas a films Kodak X-OMAT. La cuantificación de las bandas obtenidas se efectuó mediante la utilización del programa *ImageJ*.

Cuando fue necesario, las membranas fueron oportunamente reutilizadas. Para ello, estas se lavaron con *buffer stripping* (Tris-HCl pH 6,7 62,5 mM, SDS 2%, β -mercaptoetanol 50 mM) durante 30 min a 55°C, en agitación constante. A continuación, se efectuaron lavados con *buffer* PBS-T 1% (Tris 50 mM pH 7,4, NaCl 200 mM, Tween 20 1% v/v). De esta forma, las membranas pudieron ser nuevamente bloqueadas y utilizadas para la incubación con los anticuerpos primarios correspondientes.

3.3.6. Inmunocitoquímica

Las células cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio contenidos en placas de Petri recibieron los distintos tratamientos, y fueron incubadas con el colorante mitocondrial *MitoTracker Red* (1 μ M, 30 min, 37°C, protegido de la luz), cuando correspondiese. Este compuesto es un colorante catiónico lipofílico fluorescente. El potencial negativo de la mitocondria permite que el colorante ingrese en la organela y una vez en el interior mitocondrial, este forma uniones covalentes estables con las proteínas mitocondriales, marcando específicamente a la organela. Se utilizó un *buffer* PBS (pH 7,4), compuesto por NaCl 8 g/l, KCl 0,2 g/l,

KH_2PO_4 0,24 g/l y Na_2HPO_4 1,44 g/l, para efectuar los correspondientes lavados, y metanol puro (20 min, -20°C) para la fijación y permeabilización celular. Luego, se realizaron nuevamente lavados con el *buffer* PBS para eliminar restos de metanol. Los sitios de ligado no específicos fueron bloqueados incubando los portaobjetos con *buffer* PBS conteniendo BSA 5% durante 60 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se incubaron con los anticuerpos primarios apropiados durante toda la noche (4°C). Luego de los correspondientes lavados con *buffer* PBS, se procedió a la incubación con los anticuerpos secundarios conjugados a fluoróforos. Finalmente, los preparados fueron analizados bajo un microscopio de fluorescencia convencional acoplado a una cámara digital (NIKON Eclipse Ti-S, objetivos: 20x, 40x y 60x) y/o un microscopio confocal (Leica TCS SP2 AOBS, objetivo: 63x). La especificidad de cada una de las tinciones fue demostrada mediante la realización de controles en los que no se observó fluorescencia cuando los anticuerpos secundarios fueron adicionados en ausencia de los correspondientes anticuerpos primarios. Como mínimo, 10 campos por condición de tres experimentos independientes fueron examinados.

3.3.7. Determinación de la actividad PKC

La actividad PKC se determinó utilizando el kit no radioactivo *PepTag Assay* (Promega), siguiendo las especificaciones del fabricante. Brevemente, en este ensayo se utiliza como sustrato un péptido altamente específico para la PKC, que se encuentra conjugado con una molécula fluorescente que le imparte un color rosa brillante. La fosforilación de este sustrato mediada por PKC altera la carga neta del mismo desde +1 a -1. Esto permite diferenciar las versiones fosforiladas y no fosforiladas del péptido bajo la acción de un campo eléctrico, ya que las especies fosforiladas migran al polo positivo, mientras que las no fosforiladas lo hacen al polo negativo. Luego de los diferentes tratamientos, las células fueron lavadas con *buffer* PBS (pH 7,4) y homogeneizadas con un *buffer* de extracción compuesto por Tris-HCl 25 mM, EDTA 0,5 mM, EGTA 0,5 mM, Tritón X-100 0,05 % v/v, β -mercaptoetanol 10 mM y los inhibidores: leupeptina 1 $\mu\text{g/ml}$, aprotinina 1

$\mu\text{g/ml}$ y PMSF 150 mM. Los lisados proteicos obtenidos se centrifugaron durante 5 min a 14000xg a 4°C, descartándose los *pellets* y guardando los sobrenadantes. La mezcla de reacción estuvo compuesta por 5 μl del *buffer* de reacción 5x (Hepes 100 mM pH 7,4, CaCl_2 6,5 mM, DTT 5 mM, MgCl_2 50 mM, ATP 5 mM), 5 μl del sustrato C1 (0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 5 μl de la solución activadora 5x previamente sonicada (Fosfatidilserina (PS), 1mg/ml) y 1 μl de la solución protectora del péptido. Esta mezcla fue atemperada en baño de agua a 30°C durante 2 minutos y luego se le agregaron 10 μl del sobrenadante celular. La reacción (30 min, 30 °C) se realizó en presencia de activadores específicos de PKC y se detuvo colocando los tubos en un bloque térmico a 95°C durante 10 min. Luego las muestras se sembraron en un gel de agarosa al 1% y se realizó una corrida electroforética con buffer Tris-HCl (pH 8, 50 mM) a 100V durante 15 minutos. Una vez finalizada la electroforesis, el gel fue removido y fotografiado bajo una luz UV.

3.3.8. Determinación de la actividad Catalasa (CAT)

La actividad catalasa se determinó según el método descrito por Aebi (1984) en el que la tasa de disminución del H_2O_2 debida a la acción de esta enzima es monitoreada a una longitud de onda de 240 nm, a 25°C durante 2 minutos (Figura M1).



Figura M1. Determinación de actividad CAT.

La tasa de disminución del sustrato H_2O_2 por acción de la catalasa es monitoreada a 240 nm a temperatura ambiente (25°C).

Luego de los diferentes tratamientos, las células cultivadas en placas de Petri fueron lavadas con *buffer* PBS (3 veces), removidas manualmente y centrifugadas a 200xg durante 5 min, a 4°C. Los *pellets* obtenidos fueron resuspendidos en *buffer* PB (pH 7,8), compuesto por KH_2PO_4 6,80 g/l y K_2HPO_4

8,71 g/l, y sonicados durante 2 min. Las lecturas espectrofotométricas se realizaron en una mezcla de reacción compuesta por el *buffer* PB pH 7,8, H₂O₂ 30 mM y el lisado celular. La tasa de descomposición del H₂O₂ fue seguida mediante el monitoreo de la disminución de la absorbancia a 240 nm durante 2 min. La actividad de esta enzima se expresó como los mmoles de H₂O₂ consumidos por minuto por mg de proteína. La fórmula utilizada fue: $(\Delta A_{240 \text{ nm}} (1 \text{ minuto}) \times V_t) / (V_m \times E \times \text{mg proteína})$, donde V_t y V_m corresponden al volumen total de la reacción y al volumen de la muestra, respectivamente, y E es el coeficiente de extinción del H₂O₂. La cuantificación de proteínas se realizó mediante la técnica de Bradford anteriormente descrita.

3.3.9. Determinación de la actividad Manganese Superóxido Dismutasa (MnSOD)

La actividad manganeso superóxido dismutasa se determinó utilizando el kit comercial *Superoxide Dismutase Assay Kit II*, siguiendo las especificaciones del fabricante. Brevemente, este kit utiliza la sal de tetrazolio para la detección de los radicales superóxido generados por la xantina oxidasa (XO) y la hipoxantina (Figura M2). Las células, luego de los distintos tratamientos, fueron lisadas y homogeneizadas con un *buffer* HEPES 20 mM compuesto por EGTA 1 mM, manitol 210 mM y sacarosa 70 mM. Mediante centrifugación diferencial se obtuvieron las fracciones mitocondriales, siguiendo el protocolo anteriormente descrito, que fueron resuspendidas en este mismo *buffer* a 4°C. La mezcla de reacción, compuesta por el pellet mitocondrial y la sal de tetrazolio, fue incubada a temperatura ambiente durante 20 minutos y la lectura espectrofotométrica se efectuó a 450 nm utilizando un lector de placas. Una unidad de SOD se definió como la cantidad de enzima necesaria para conseguir dismutar un 50% del radical superóxido.

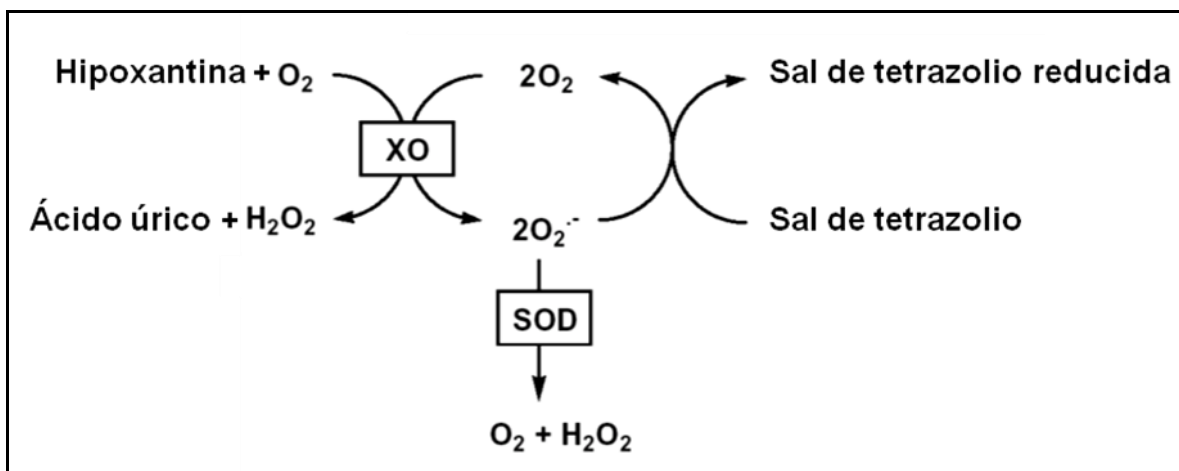


Figura M2. Determinación de la actividad SOD.

Los radicales superóxido generados por la acción de la enzima xantina oxidasa (XO) sobre la hipoxantina son, a su vez, utilizados para la reducción de la sal de tetrazolio. La presencia de actividad SOD reduce la tasa de obtención de la sal de tetrazolio reducida que es monitoreada a 450 nm a temperatura ambiente (25°C).

3.3.10. Determinación de la actividad Glutación Peroxidasa (GPx)

La actividad de la enzima glutatión peroxidasa se determinó utilizando el *kit* comercial *Glutathione Peroxidase Assay Kit* siguiendo las especificaciones del fabricante. Brevemente, en este kit se determina la actividad de esta enzima en forma indirecta al acoplar su reacción a la de la enzima glutatión reductasa (GR). El glutatión oxidado (GSSG), producido luego de la reducción del hidroperóxido por la glutatión peroxidasa (GPx), es reciclado a su forma reducida por la enzima GR y la presencia de NADPH. La oxidación de este compuesto a NADP⁺ está acompañada por una disminución de la absorbancia a 340 nm (Figura M3). Entonces, en aquellas condiciones que la actividad de la GPx es el paso limitante, la tasa de disminución en la $A_{340\text{ nm}}$ es directamente proporcional a la actividad de la GPx en la muestra.

Las células, luego de los diferentes tratamientos, fueron colectadas manualmente y centrifugadas a 1000xg durante 10 min a 4°C. Posteriormente, los pellets obtenidos fueron homogeneizados con un *buffer* compuesto por Tris-HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 5 mM, DTT 1mM a 4°C, y nuevamente, centrifugados a

10000xg durante 15 min a 4°C. Estos pellets fueron utilizados para el ensayo. La mezcla de reacción estaba compuesta por el *buffer* del ensayo (Tris-HCl 50 mM pH 7,6, EDTA 5 mM), el co-sustrato (NADPH, GR y glutatión (GSH)) y el pellet celular. La reacción se inició por el agregado del hidroperóxido de cumeno (ROOH). Las lecturas espectrofotométricas se realizaron a 340 nm durante 5 min. Una unidad de GPx se definió como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 nmol de NADPH a NADP⁺ por minuto a 25°C. La fórmula utilizada fue: $(\Delta A_{340 \text{ nm}} (1 \text{ minuto}) \times Vt) / (Vm \times E \times \text{mg proteína})$, donde Vt y Vm corresponden al volumen total de la reacción y al volumen de la muestra, respectivamente, y E es el coeficiente de extinción del NADPH. La cuantificación de proteínas se realizó mediante la técnica de Bradford anteriormente descrita.

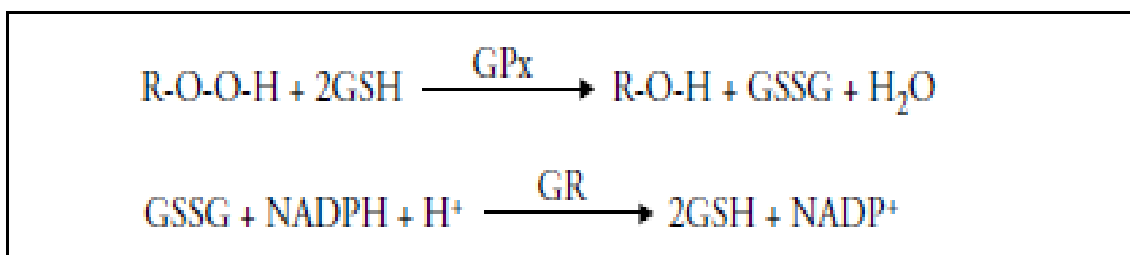


Figura M3. Determinación de la actividad GPx.

El glutatión (GSH) es oxidado por la glutatión peroxidasa al mismo tiempo que es reducido el peróxido (ROOH). Luego, el glutatión oxidado (GSSG) es reciclado a su forma reducida por la enzima GR y la presencia de NADPH. La oxidación de este compuesto a NADP⁺ se acompaña de una disminución en la absorbancia a 340 nm.

3.3.11. Determinación de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) por microscopía de fluorescencia

El estado del potencial de membrana mitocondrial se evaluó por microscopía de fluorescencia mediante la utilización del colorante catiónico tetrametilrodamina metil éster (TMRM). Esta sonda fluorescente se incorpora en las mitocondrias cuyo potencial de membrana se encuentra conservado. Sin embargo, cuando esta organela sufre la pérdida de su potencial de membrana, se observa una disminución de la fluorescencia roja que es proporcional al grado de depolarización.

Las células fueron tratadas con el colorante TMRM (20 nM, 30 min, 37°C, en oscuridad) preparado en DMEM sin SFB y luego recibieron los tratamientos correspondientes. Se analizaron un total de 500 células por condición experimental para la determinación de la intensidad de fluorescencia del TMRM (en %) utilizando un microscopio de fluorescencia acoplado a una cámara digital (NIKON Eclipse Ti-S). La cuantificación se realizó mediante el programa *ImageJ*. Los resultados se expresaron como % de intensidad de fluorescencia del TMRM, respecto al control.

3.3.12. Determinación de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) por citometría de flujo

El estado del potencial de membrana mitocondrial se determinó mediante el empleo del *JC-1 mitochondrial transmembrane potential detection kit*, cuyo colorante catiónico es el 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3-3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina iodado (JC-1). Este fluoresce diferencialmente en células apoptóticas y en células sanas. En células cuyas mitocondrias están intactas, el colorante forma agregados dentro de la organela, que fluorescen color rojo (detectable en canal FL-2 del citómetro de flujo) así como también permanece sin agregar en el citosol, fluoresciendo color verde (detectable en canal FL-1 del citómetro de flujo). En células apoptóticas, debido a que las mitocondrias han perdido su potencial de membrana, son incapaces de mantener el colorante agregado en su matriz, por lo que el mismo permanece como monómero en el citosol, disminuyendo la fluorescencia roja y prevaleciendo la fluorescencia verde (Reers et al., 1994).

Luego de los tratamientos, las células cultivadas en placas de Petri fueron despegadas utilizando tripsina. Esta suspensión de células fue incubada con el colorante JC-1 durante 15 min a 37°C, en oscuridad. Se realizaron lavados con medio DMEM sin SFB y se centrifugaron a 500xg durante 3 min. El sobrenadante se descartó y los pellets se resuspendieron en el *buffer* de ensayo provisto en el *kit*. Un total de 10000 eventos de cada condición fueron estudiados en un

citómetro de flujo *FACS Calibur* (*Becton–Dickinson, Franklin Lakes, NJ*) a una longitud de onda de 488 nm, utilizando para el análisis el programa *Cellquest Pro* (*Becton–Dickinson*).

3.3.13. Evaluación de la apertura del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (MPTP)

La apertura del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial se evaluó mediante la utilización del método de la calceína acetoximetil éster/ CoCl_2 (Petronilli et al., 1999). La calceína acetoximetil éster (calceína-AM) es un colorante fluorescente en su forma éster, que puede difundir libremente a través de la membrana al interior celular. Una vez que la sonda ingresa a la célula, el grupo acetometoxi es removido por las esterasas intracelulares quedando el fluoróforo atrapado dentro de ésta. De este modo, al incubar durante un tiempo establecido a las células con la calceína, se permite la entrada del fluoróforo y, posteriormente, al remover con los lavados a la sonda restante que no ingresó en la célula, se contará con una cantidad constante de calceína dentro de la misma, quedando retenida tanto en el citosol como en las mitocondrias. El agregado de CoCl_2 provee los iones Co^{2+} que al ingresar en el citosol y en el núcleo, evitan la emisión de la fluorescencia de la calceína en estos compartimentos, ya que “apagan” la fluorescencia de la calceína. Sin embargo, estos iones son incapaces de atravesar la membrana mitocondrial, de modo que la fluorescencia de la calceína que se detecte corresponderá a la calceína acumulada en las mitocondrias sanas. Es por ello, que la apertura del MPTP puede ponerse en evidencia por la visualización de una disminución/pérdida de la fluorescencia proveniente de la calceína contenida en esta organela que es “apagada” por los iones Co^{2+} presentes, que bajo estas condiciones pueden ingresar a la mitocondria (Figura M4).

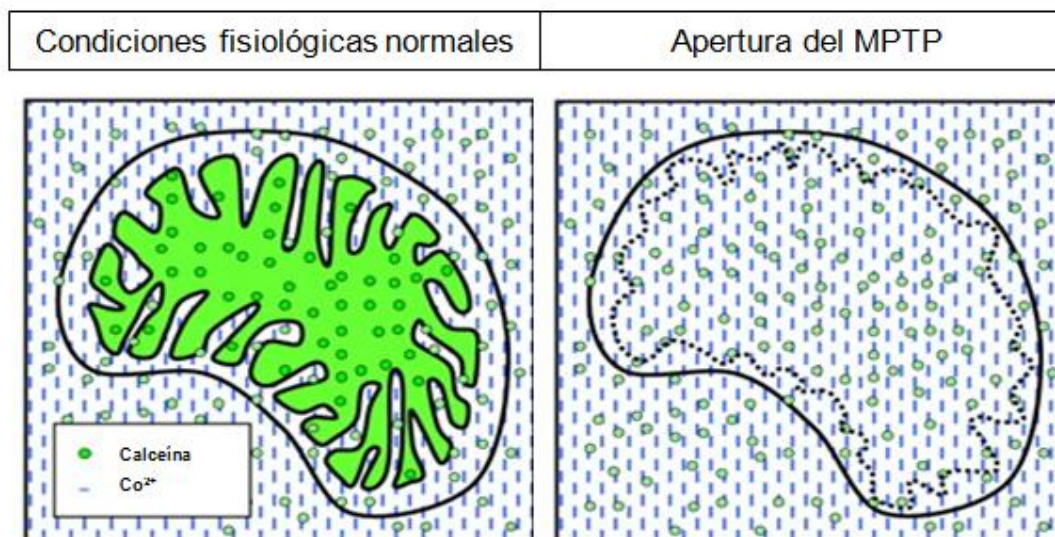


Figura M4. Método de la calceína-AM/CoCl₂.

En condiciones fisiológicas normales, el agregado de calceína junto con iones Co²⁺ permite la detección de fluorescencia proveniente de las mitocondrias, debido a que estos iones son incapaces de ingresar en el interior mitocondrial para así “apagar” su fluorescencia. La apertura del MPTP se pone de manifiesto por la pérdida de la fluorescencia de la calceína que es “apagada” por los iones Co²⁺ (Adaptado de Kroemer et al., 2007).

En este ensayo, las células fueron incubadas inicialmente con la calceína-AM (1mM, 30 min, a 37°C) y luego se les adicionó CoCl₂ (1mM). Posteriormente, se efectuaron lavados con medio DMEM sin SFB y se realizaron los tratamientos correspondientes. Finalmente, las células fueron visualizadas utilizando un microscopio de fluorescencia (NIKON Eclipse Ti-S) acoplado a una cámara digital, cuantificando la fluorescencia mediante el programa *ImageJ*, o analizadas por citometría de flujo. En este último caso, las células fueron tripsinizadas, para luego ser centrifugadas a 500 xg durante 3 min. Los sobrenadantes se descartaron y los pellets se resuspendieron en *buffer FACS flow*. Un total de 10000 eventos de cada condición fueron estudiados en un citómetro de flujo *FACS Calibur* a una longitud de onda de 488 nm.

3.3.14. Ensayo de TUNEL (*Tdt-mediated dUTP Nick-End Labeling*)

Esta metodología permite la detección y cuantificación de células apoptóticas. Debido a que la degradación del ADN es una característica de la apoptosis, se han desarrollado diferentes métodos que permiten analizar individualmente cada célula, en busca de este suceso. Un método clásico es el del marcaje del ADN de hebra sencilla utilizando una transferasa terminal, generalmente una desoxinucleotidil transferasa terminal recombinante (rTdT), que adiciona nucleótidos (dUTP) marcados en los extremos 3' libres o expuestos del ADN fragmentado, formando colas poliméricas. Dichos nucleótidos pueden estar marcados de diversas formas, aunque en general se utiliza una marcación fluorescente. Luego, esta marcación es detectada con el método que corresponda.

Los ensayos de TUNEL se realizaron mediante la utilización del kit *Dead End Fluorometric TUNEL System*, siguiendo las especificaciones del fabricante. Luego de los tratamientos, las células fueron fijadas con paraformaldehído 4% preparado en PBS, pH 7,4, lavadas con PBS y permeabilizadas con Tritón X-100 0,2% en PBS. Posteriormente, fueron marcadas con la solución de incubación rTdT provista por el *kit* durante 60 min, a 37°C, en oscuridad. Al finalizar este período, se lavaron las muestras con PBS y se observaron utilizando un microscopio de fluorescencia acoplado a una cámara digital (NIKON Eclipse Ti-S). Las imágenes fueron analizadas mediante el programa *ImageJ*, obteniéndose el porcentaje de células apoptóticas en cada condición experimental.

3.3.15. Observación de estructuras celulares tipo-tunneling nanotubes (TNT) por microscopía óptica

Las células recibieron los diferentes tratamientos y luego fueron analizadas para la observación de estructuras compatibles con nanotubos utilizando un microscopio óptico acoplado a una cámara digital (NIKON Eclipse Ti-S). Los resultados se expresaron como % de células que presentan estas estructuras,

respecto al control. Para cada condición experimental, se analizaron un total de 100 células de tres experimentos independientes. Objetivo 60X.

3.3.16. Observación de estructuras celulares tipo-tunneling nanotubes (TNT) por microscopía de fluorescencia

Las células recibieron los tratamientos correspondientes y, luego, fueron incubadas con *Mitotracker Red* (1 μ M, 30 min, 37°C, protegido de la luz). Posteriormente, fueron analizadas bajo un microscopio de fluorescencia convencional acoplado a una cámara digital (NIKON Eclipse Ti-S, objetivo 60X).

En otra serie de experimentos destinados a evaluar el intercambio de organelas entre células, las células en una placa de Petri fueron incubadas con *Mitotracker Red* (1 μ M, 30 min, 37°C, protegido de la luz) y las células de otra placa fueron marcadas con *Mitotracker Green* (100 nM, 30 min, 37°C, protegido de la luz). Luego, las dos poblaciones celulares fueron tratadas con tripsina (0,025%), removidas manualmente y mezcladas en una sola placa en relación 1:1, para cada condición experimental. Posteriormente, se dejaron en cultivo por 4h y recibieron los diferentes tratamientos. Los cultivos fueron analizados bajo un microscopio de fluorescencia convencional acoplado a una cámara digital (NIKON Eclipse Ti-S, objetivo 60X).

3.3.17. Evaluación de la función de estructuras celulares tipo-tunneling nanotubes (TNT) por microscopía de fluorescencia

Luego de recibir los distintos tratamientos, un grupo de células fue incubado con el colorante nuclear DAPI (300 nM, 20 min) y otro grupo de células fue tratado con el colorante mitocondrial *Mitotracker Red* (1 μ M, 30 min). Al mismo tiempo, otros dos grupos de células no recibieron ningún tratamiento, uno de ellos fue incubado con el colorante mitocondrial *Mitotracker Red* (1 μ M, 30 min) y el segundo con el colorante nuclear DAPI (300 nM, 20 min). Luego, para cada condición experimental a ensayar, las dos poblaciones celulares (tratadas y no tratadas) fueron removidas manualmente y mezcladas en una sola placa en

relación 1:1 (las tratadas y marcadas con DAPI se cocultivaron con las no tratadas marcadas con *Mitotracker Red* (Figura M5A); y las tratadas y marcadas con *Mitotracker Red* se cocultivaron con las no tratadas marcadas con DAPI (Figura M5B). Posteriormente, se dejaron en cultivo por 4h, se fijaron con metanol puro (20 min, -20°C) y fueron analizadas bajo un microscopio de fluorescencia convencional acoplado a una cámara digital (NIKON Eclipse Ti-S, objetivo 20X). Los resultados se expresaron como el porcentaje de células que presentan ambas marcaciones (fluorescencias roja y azul), respecto al control.

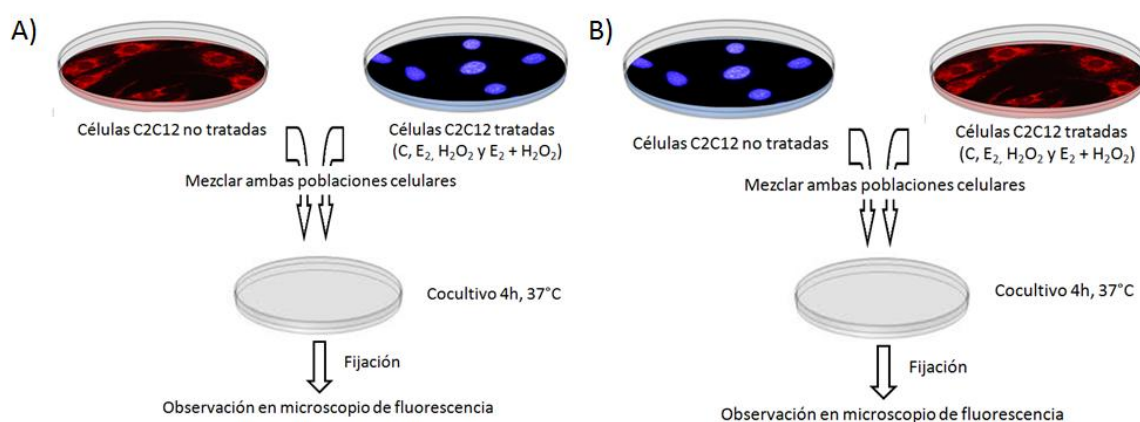


Figura M5. Metodología para la evaluación de la función de estructuras tipo-TNT.

3.3.18. Cuantificación de ARN y ADN

La concentración de ácidos nucleicos se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm por espectrofotometría. Para evaluar la presencia de contaminantes, se calculó el cociente $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$, que proporciona una estimación del grado de pureza de los ácidos nucleicos, considerándose al ADN y ARN puros cuando presentan valores entre 1,8 y 2,0. Para calcular la concentración final de ADNc o ARN en cada muestra, se realizaron diluciones 1/100 de cada una de ellas con agua bidestilada de grado PCR y se utilizaron como factores de conversión para ARN: 40 µg/ml y para ADN simple hebra: 33 µg/ml.

3.3.19. Extracción de ARN total

Luego de los correspondientes tratamientos, se extrajo el ARN total de células cultivadas en placas de Petri mediante la utilización del *High Pure RNA Isolation kit*. Las células fueron lavadas con *buffer* PBS, resuspendidas en este mismo tampón y tratadas, luego con *buffer* lisis (Guanidina-HCl 4,5 M, Tris-HCl 50 mM, Tritón X-100 30 % (p/v), pH 6,6, 25°C). Lo recolectado fue transferido a un filtro insertado en un tubo colector provisto por el *kit* y centrifugado a 8000 *xg* por 15 seg. Luego de este paso, se descartó el líquido inferior del tubo colector y se incubó con la DNAasa, preparada en su correspondiente *buffer*, durante 15 min, a 25°C. Posteriormente, se realizó un lavado con el *Wash buffer I* (Guanidina-HCl 5 M, Tris-HCl 20 mM, pH 6,6, 25°C) a 8000 *xg* durante 15 seg y 2 lavados con el *Wash buffer II* (NaCl 20 mM, Tris-HCl 2 mM, pH 7,5, 25°C) a 8000 *xg* durante 15 seg y 2 min, respectivamente. Finalmente, el RNA fue eluído con el *buffer* de elución (Agua bidestilada de grado PCR), cuantificado y guardado a -80°C hasta su utilización.

3.3.20. Reacción de retrotranscripción

La retrotranscripción se realizó utilizando el *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*. El ARN (2 µg) fue adicionado a una mezcla de reacción conteniendo el *buffer*, los dNTPs (100 nM), los *random primers* y la enzima *MultiScribe™ Reverse Transcriptase* (50 U/µl) provistos por el *kit*. Las condiciones de la transcripción reversa fueron: 25°C durante 10 min, 37°C durante 120 min, 85°C durante 5 min, para luego descender la temperatura hasta 4°C, utilizando un termociclador *Eppendorf Mastercycler Personal 5332*. El ADNc obtenido fue cuantificado y guardado a -20°C hasta su utilización.

3.3.21. Ensayo de RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR)

La RT-qPCR fue realizada utilizando el *KAPA SYBR FAST qPCR Kit*. Inicialmente, se preparó la mezcla de reacción compuesta por la *Master Mix (2X) Universal*, el colorante *ROX Low* y agua bidestilada de grado PCR, a la que luego

se adicionaron los correspondientes *primers forward y reverse* (200 nM). Para el ensayo se utilizaron placas de 96 pocillos (*MicroAmp Fast 96-Well Reaction Plate*) a las que, finalmente, se agregó la muestra de ADNc (20 ng). Las lecturas se realizaron en un equipo *ABI Prism7500 Real-Time PCR System*. Las condiciones de la qPCR fueron:

Paso	Temperatura	Duración	Ciclos
Activación de la enzima	95°C	3 min	-
Desnaturalización	95°C	3 seg	40
Annealing/Extensión	60°C	30 seg	

Tabla M4. Condiciones de reacción de la qPCR.

Los *primers* empleados para la amplificación de los ADNc murinos fueron los siguientes (en sentido 5'-3'):

	<i>Forward primer</i>	<i>Reverse Primer</i>
GAPDH	CGTCCCGTAGACAAAATGGT	TTGATGGCAACAATCTCCAC
Bcl-2	GCGTCAACAGGGAGATGTCA	TTCCACAAAGGCATCCCAGC
Puma	TACGAGCGGCGGAGACAAG	GTGTAGGCACCTAGTTGGGC
PERP	ACCACATCCAGACATCGTCG	CTCGTCCCCATGCGTACTCC
Noxa	GTCGGAACGCGCCAGTGAACCC	TCCTTCCTGGAGGTCCCTTCTTGC
Bim	AATGTCTGACTCTGACTCTCGGAC	TCTCCGCAGGCTGCAATTGTCTAC
p66Shc	ACTACCCTGTGTTCTTCTTTC	TCGGTGGATTCTGAGATACTGT
MDM2	GCCTGGATCAGGATTCAGTTTCTG	GTGACCCGATAGACCTCATCATCC

Tabla M5. *Primers* utilizados.

La especificidad de los productos de reacción así como la ausencia de dímeros de *primers* se confirmaron mediante el análisis de las correspondientes curvas de *melting*. GAPDH fue utilizado como gen endógeno para la

normalización. Se realizó una cuantificación relativa de la expresión génica mediante la utilización del método comparativo ΔCt (Giulietti et al., 2001; Livak y Schmittgen, 2001), donde el valor ΔCt es el Ct de la muestra normalizado con el gen endógeno, de acuerdo al siguiente cálculo: ΔCT (muestra) = CT (gen incógnita) - CT (gen endógeno). La expresión del ARNm de los genes incógnita se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula: $2^{-\Delta CT}$.

3.3.22. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como promedio de no menos de tres experimentos independientes, con su correspondiente desvío estándar. Las diferencias significativas entre las distintas condiciones experimentales ($p < 0,05$) se analizaron utilizando *one-way ANOVA*, seguido de una prueba *post hoc* de comparación múltiple (Tukey, 1953).

Resultados

Capítulo 1

Rol del 17β -estradiol

en el mecanismo molecular subyacente

a la apoptosis inducida por H_2O_2

Capítulo 1: Rol del 17β -estradiol en el mecanismo molecular subyacente a la apoptosis inducida por peróxido de hidrógeno

1.1. Participación de las familias PKC y PKD

En la Introducción de este trabajo de tesis se presentaron las generalidades de la familia de quinasas de residuos serina/treonina: proteína quinasa C (PKC). Tal como se mencionó, éstas pueden ser activadas por diversos estímulos y están involucradas en una multitud de procesos fisiológicos. Las enzimas regulan actividades celulares tales como la proliferación, diferenciación, supervivencia y contracción muscular, entre otros (Nishizuka, 1992; Nishizuka, 1995; Toker, 1998). Estudios más recientes evidenciaron que cada miembro de la familia PKC puede intervenir tanto en vías de supervivencia como de muerte celular (Revisado en Gonzalez-Guerrico et al., 2005). La familia de proteínas quinasas D (PKD) está íntimamente relacionada con las PKCs.

Con el fin de evaluar el rol de los miembros de esta familia en las cascadas activadas por el H_2O_2 , en primer lugar, las células se incubaron con el agente apoptótico durante diferentes períodos de tiempo (5 min, 15 min, 30 min, 1h, 3h y 4h, según cada experimento). Luego para investigar si la hormona regulaba las vías involucradas, se realizaron los mismos tratamientos con H_2O_2 previa incubación con la hormona E_2 , según se describe en Métodos.

1.1.1. PKC δ

Como se mencionó en la Introducción, la quinasa PKC δ ha sido asociada a apoptosis (Blass et al., 2002; Reyland, 2007). Se ha evidenciado, además, que en respuesta al estrés oxidativo esta isoforma es capaz de sufrir fosforilación en residuos tirosina, lo que conduce a su activación (Konishi et al., 2001). De hecho, la fosforilación en estos residuos es un mecanismo regulatorio específico de PKC δ , ausente en las otras isoformas de esta familia.

Inicialmente, se evaluó la activación de esta isoforma inducida por el agente apoptótico, evento puesto en evidencia por la fosforilación en el residuo tirosina 311 (Y^{311}). Se observó que el H_2O_2 indujo la activación de PKC δ a la hora de tratamiento, efecto que se mantuvo hasta las 3h de incubación para luego disminuir (Figura R1). Cuando se estudió si la hormona era capaz de modular esta activación, se observó que el pretratamiento con E_2 antes de la incubación con H_2O_2 ($E_2 + H_2O_2$) disminuyó la fosforilación de esta PKC (en un 181,44 % respecto a la condición H_2O_2). La presencia de fulvestrant (1 μM) antes del tratamiento con E_2 preservó la fosforilación en esta quinasa inducida por el H_2O_2 (Figura R2).

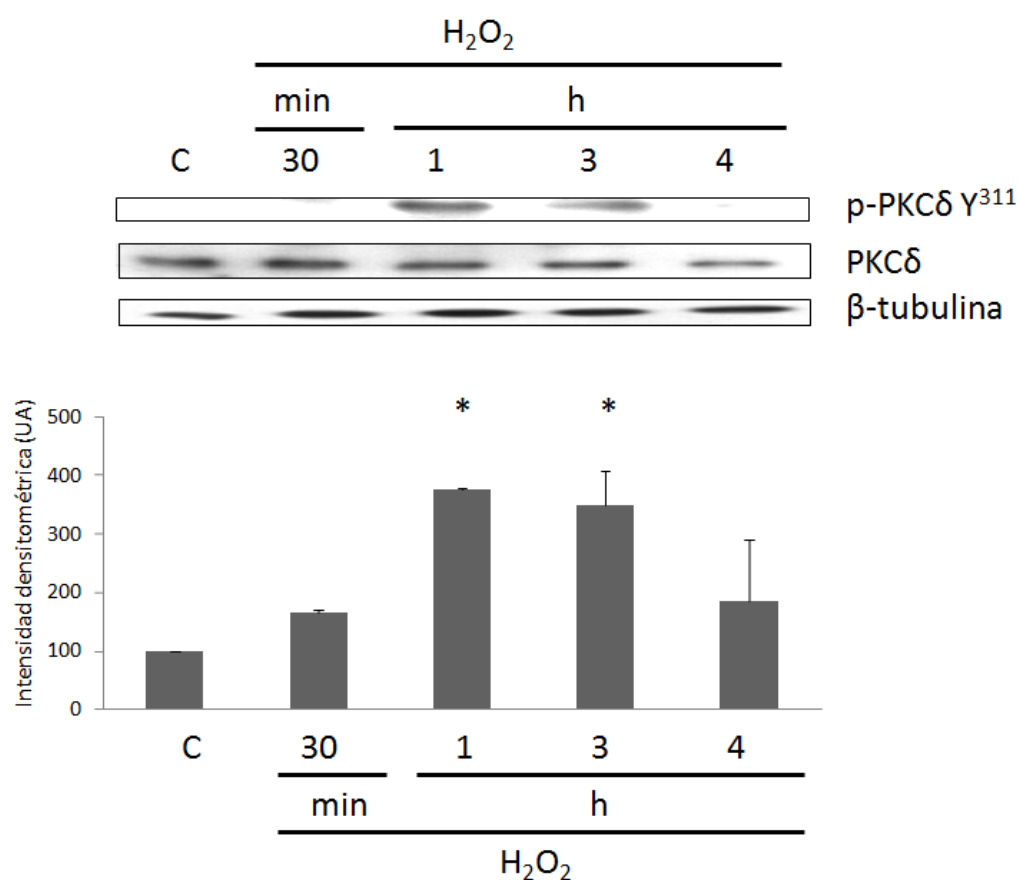


Figura R1. El H_2O_2 induce la activación de PKC δ en células C2C12. Las células fueron incubadas con medio sin suero en presencia o ausencia (C) de H_2O_2 (0,5 mM) durante los períodos de tiempo indicados (30 min, 1h, 3h y 4h). Los lisados proteicos obtenidos se utilizaron en ensayos de *Western blotting* para el análisis de p-PKC δ Y³¹¹ y PKC δ . La proteína β -tubulina fue utilizada como control de siembra (Panel superior). Cuantificación de los resultados. Los datos

representan el promedio \pm SD de tres determinaciones independientes realizadas. * p <0.05 respecto a la condición control (Panel inferior).

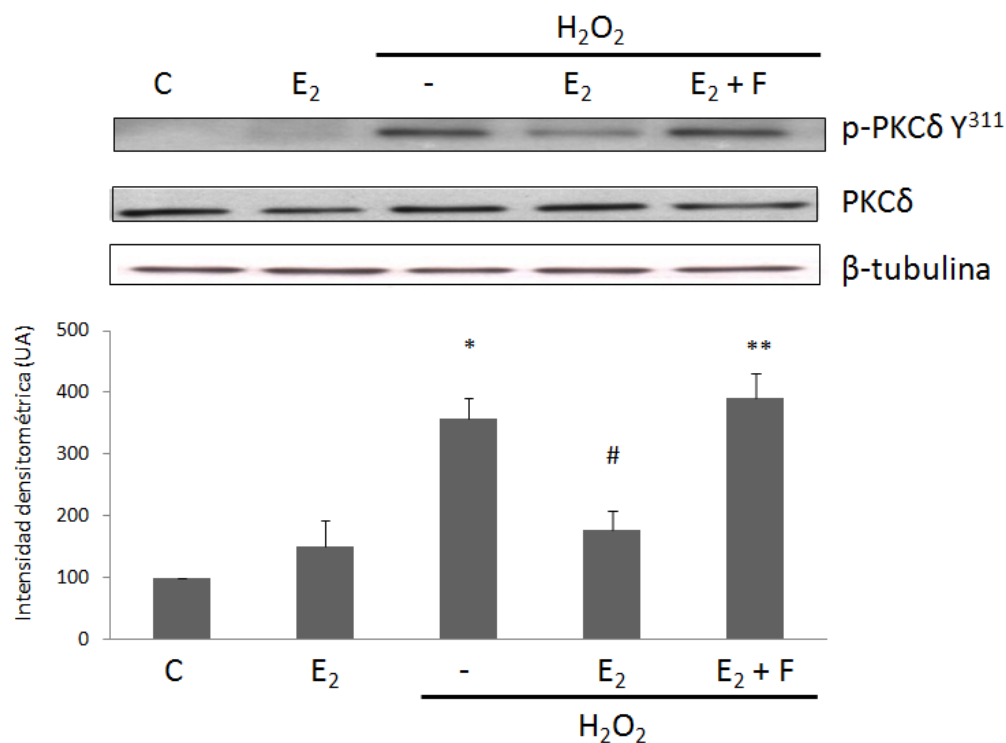


Figura R2. El 17β-estradiol inhibe la activación de PKCδ inducida por el H₂O₂ en células C2C12. Las células fueron tratadas durante 1h con la hormona 10⁻⁸ M (E₂), fulvestrant y E₂ (E₂ + F) o vehículo de la hormona (C) antes del agregado de H₂O₂ (0,5 mM, 1h). Los lisados proteicos obtenidos fueron utilizados en ensayos de *Western blotting* para el análisis de p-PKCδ Y³¹¹ y PKCδ. La proteína β-tubulina fue utilizada como control de siembra (Panel superior). Cuantificación de los resultados. Los datos representan el promedio \pm SD de tres determinaciones independientes realizadas. * p <0.05 respecto a la condición control. # p <0.05 respecto a la condición H₂O₂. ** p <0.05 respecto a la condición E₂ + H₂O₂ (Panel inferior).

1.1.2. PKCθ

De la misma manera que se estudió a la isoforma δ, para evaluar el efecto del agente apoptótico sobre la activación de PKCθ, las células fueron incubadas con H₂O₂ durante diferentes períodos de tiempo (15 min, 30 min, 1h, 3h y 4h). Se observó que PKCθ se fosforila/activa de manera significativa a partir de las 3h de incubación con H₂O₂ (964,9%) y que este efecto permanece hasta las 4h (927,2%) (Figura R3).

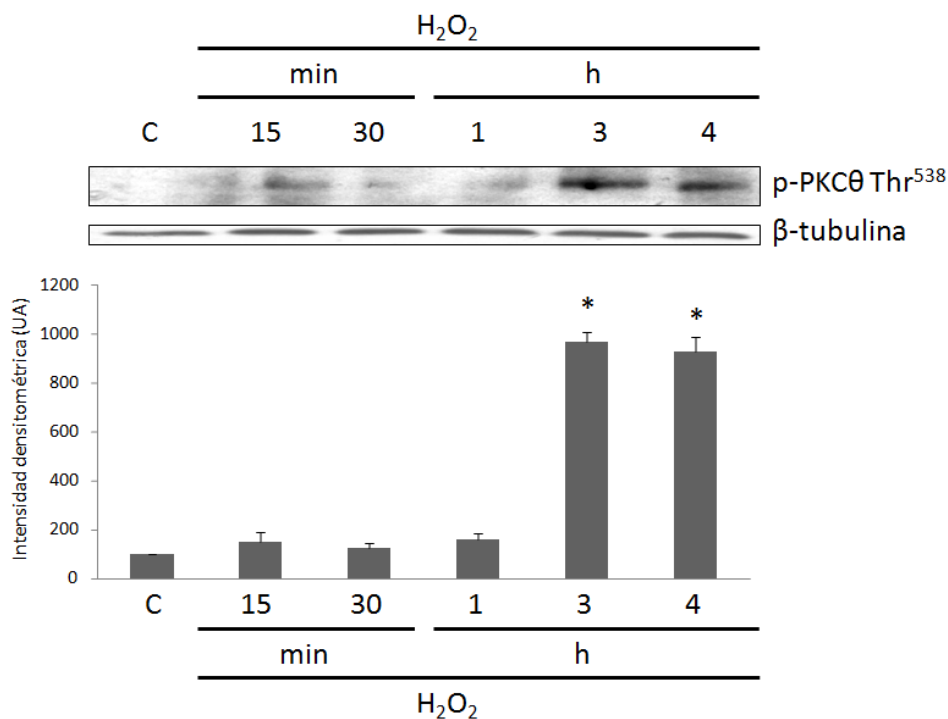


Figura R3. El H₂O₂ induce la activación de PKCθ en células C2C12. Las células fueron incubadas con medio sin suero en presencia o ausencia (C) de H₂O₂ (0,5 mM) durante diferentes períodos de tiempo (15 min, 30 min, 1h, 3h y 4h). Los lisados proteicos obtenidos fueron utilizados en ensayos de *Western blotting*. La proteína β-tubulina fue utilizada como control de siembra (Panel superior). Cuantificación de los resultados. Los datos representan el promedio +/- SD de tres determinaciones independientes realizadas. *p < 0.05 respecto a la condición control (Panel inferior).

Cuando se estudió si la hormona era capaz de modular esta activación, se observó que el agregado de E₂ antes de la incubación con H₂O₂ durante 3h y 4h (E₂ + H₂O₂) disminuyó la fosforilación de esta PKC (en 500,2 % y 918,4 % respecto a la condición H₂O₂ correspondiente) (Figura R4).

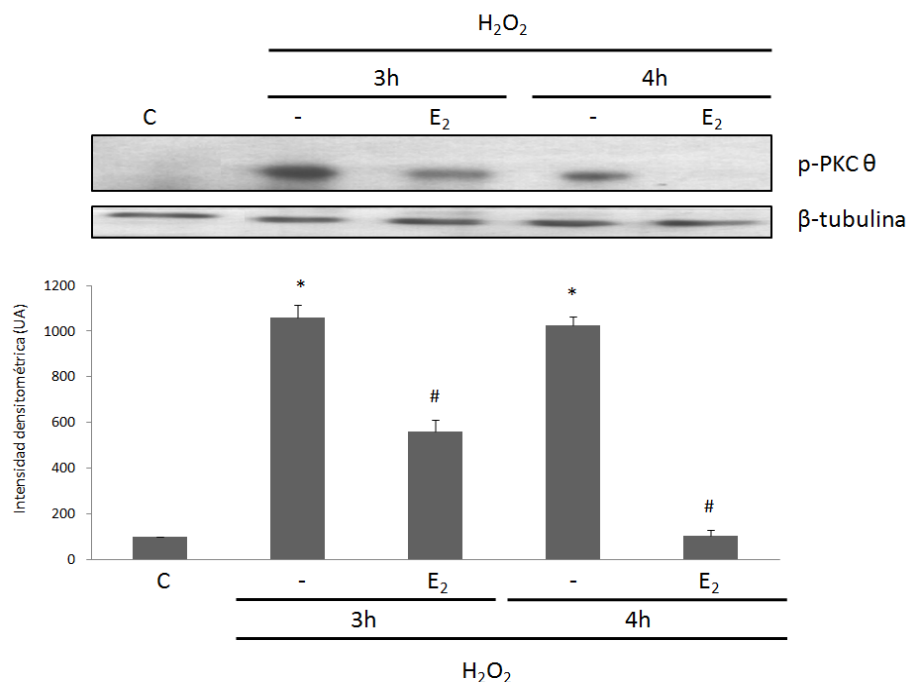


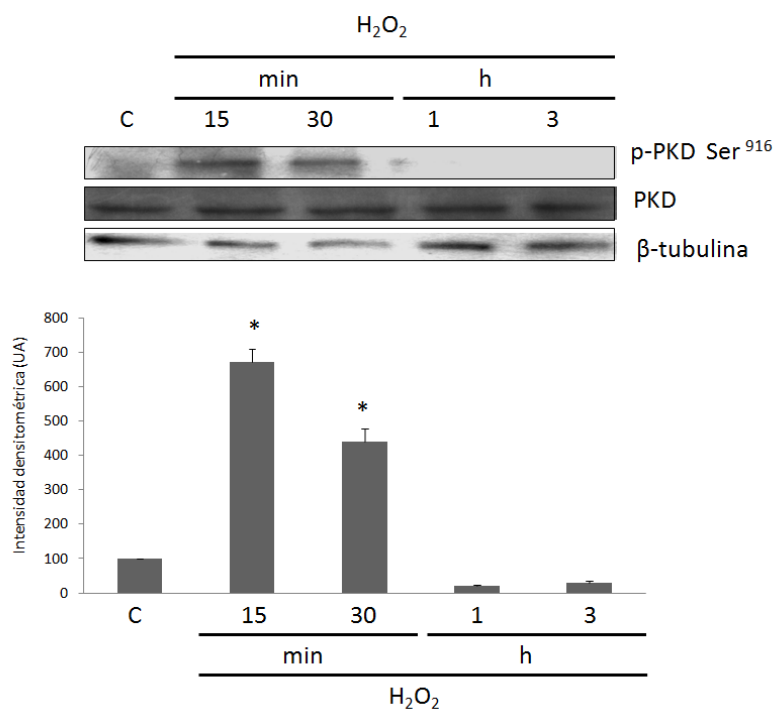
Figura R4. El 17β-estradiol disminuye la activación de PKCθ inducida por el H₂O₂ en células C2C12. Las células fueron pretratadas durante 1h con la hormona E₂ (10⁻⁸M) o vehículo de la hormona (C) antes del agregado de H₂O₂ (0,5 mM) durante los períodos de tiempo indicados. Los lisados proteicos obtenidos fueron utilizados en ensayos de *Western blotting* para el análisis de p-PKCθ. La proteína β-tubulina fue utilizada como control de siembra (Panel superior). Cuantificación de los resultados. Los datos representan el promedio +/- SD de tres determinaciones independientes realizadas. *p < 0.05 respecto a la condición control. #p < 0.05 respecto a la condición H₂O₂ correspondiente (Panel inferior).

1.1.3. PKD

Como se mencionó en la Introducción, se ha evidenciado que el estrés oxidativo puede inducir la activación de PKD y además, en algunos tipos celulares, este evento es mediado por algunas isoformas de PKCs (Rozengurt, 2011). En base a estas evidencias, se decidió evaluar la activación de esta quinasa en respuesta al agente apoptótico. Se cree que su activación estaría determinada por la fosforilación en los residuos Ser⁷⁴⁴/Ser⁷⁴⁸. Como consecuencia, el residuo Ser⁹¹⁶ en el extremo C-terminal sería autofosforilado. Estos dos eventos son considerados marcadores de activación de esta PKD (Revisado en Steinberg, 2012). Los resultados aquí presentados indican que la fosforilación en el residuo

serina 916 (Ser⁹¹⁶) es evidenciable a los 15 y 30 min de tratamiento con H₂O₂. Este efecto no se mantuvo en períodos de tiempo más avanzados del proceso apoptótico (1h y 3h). Estos resultados fueron corroborados por ensayos de inmunocitoquímica en los que se observa un aumento en la intensidad de fluorescencia debida a p-PKD Ser⁹¹⁶ (fluorescencia verde) en los mismos períodos de tiempo ya evidenciados (Figura R5).

A)



B)

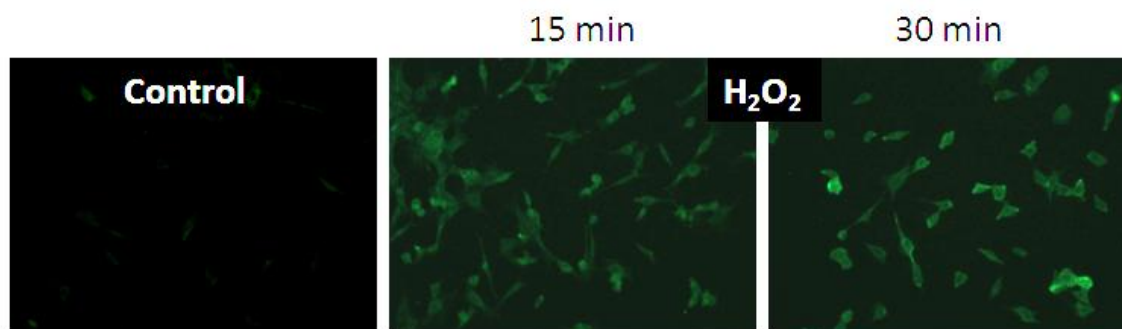


Figura R5. El H₂O₂ induce la activación de PKD en células C2C12. Las células fueron incubadas con medio sin suero en presencia o ausencia (C) de H₂O₂ (0,5

mM) durante diferentes períodos de tiempo (15 min, 30 min, 1h y 3h). **A)** Los lisados proteicos obtenidos fueron utilizados en ensayos de *Western blotting* para el análisis de p-PKD Ser⁹¹⁶ y PKD. La proteína β -tubulina fue utilizada como control de siembra (Panel superior). Cuantificación de los resultados. Los datos representan el promedio \pm SD de tres determinaciones independientes realizadas. * $p < 0.05$ respecto a la condición control (Panel inferior). **B)** Las células fueron utilizadas en ensayos de inmunocitoquímica, usando un anticuerpo que reconoce la forma fosforilada de PKD en Ser⁹¹⁶ (anti-p-PKD Ser⁹¹⁶) seguido de la incubación con un anticuerpo secundario conjugado a fluorocromo (fluorescencia verde). Objetivo 20X. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes realizados.

Luego se estudió si la hormona era capaz de revertir la activación de esta enzima. En efecto, se observó que la preincubación con el E₂ disminuyó significativamente los niveles de fosforilación/activación de la enzima, en los períodos de tiempo en los que el agente apoptótico inducía su activación (Figura R6). Se utilizó PMA como control positivo, debido a que se conoce que este éster de forbol es capaz de activar a la PKD.

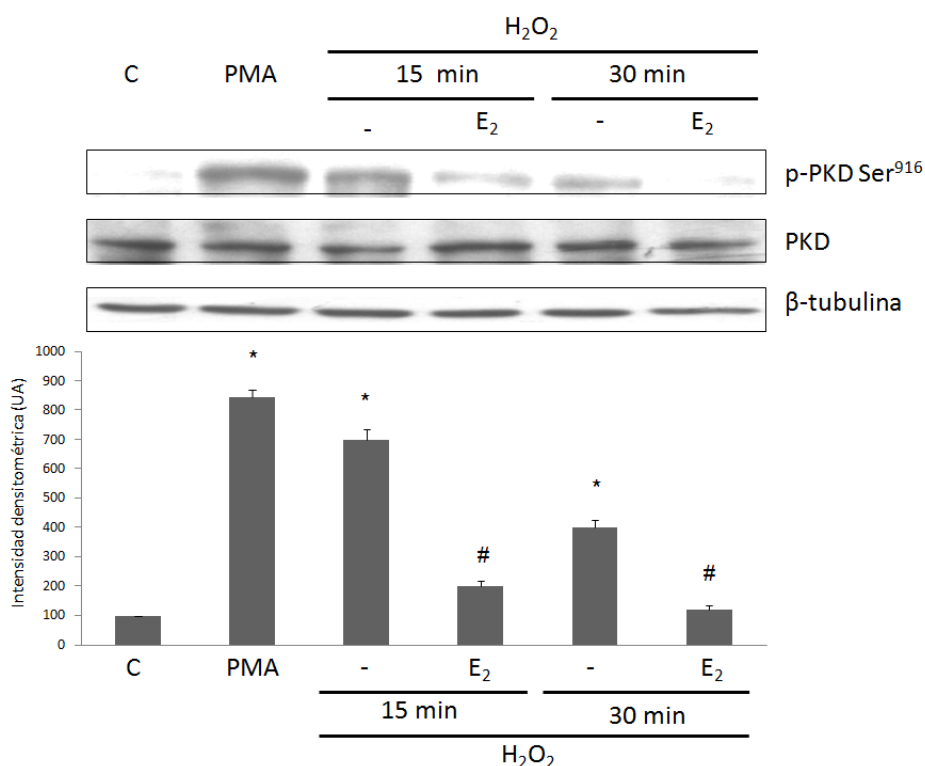


Figura R6. El 17 β -estradiol inhibe la activación de PKD inducida por el H₂O₂ en células C2C12. Las células fueron incubadas con el vehículo de la hormona (C), PMA (1 μ M, 1h), H₂O₂ (0,5 mM) durante 15 y 30 min, o E₂ (10⁻⁸ M, 1h) antes

del agregado de H_2O_2 (0,5 mM) durante los períodos de tiempo indicados. Los lisados proteicos obtenidos fueron utilizados en ensayos de *Western blotting* para el análisis de p-PKD Ser⁹¹⁶ y PKD. La proteína β -tubulina fue utilizada como control de siembra (Panel superior). Cuantificación de los resultados. Los datos representan el promedio \pm SD de tres determinaciones independientes realizadas. * $p < 0.05$ respecto a la condición control. # $p < 0.05$ respecto a la condición H_2O_2 correspondiente (Panel inferior).

1.1.4. PKC α/β II

Para evaluar el efecto del agente apoptótico sobre la activación de las isoformas clásicas PKC α/β II, las células fueron incubadas con H_2O_2 durante diferentes períodos de tiempo (5 min, 15 min, 30 min, 1h y 3h), no observándose cambios significativos en su nivel de fosforilación respecto a la condición control (Figura R7).

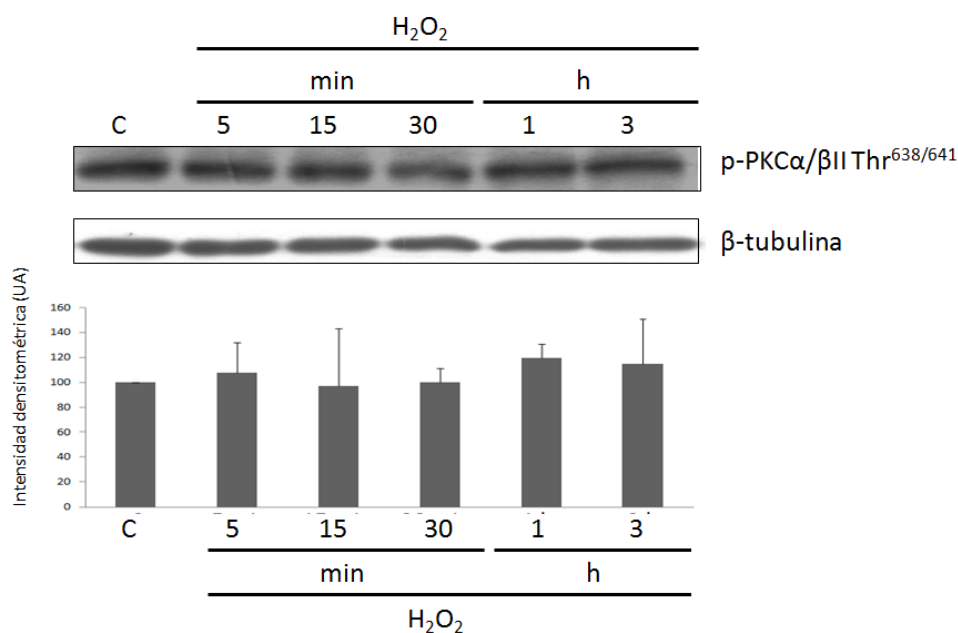


Figura R7. El H_2O_2 no induce la activación de PKC α/β II en células C2C12. Las células fueron incubadas con medio sin suero en presencia o ausencia (C) de H_2O_2 (0,5 mM) durante diferentes períodos de tiempo (5 min, 15 min, 30 min, 1h y 3h). Los lisados proteicos obtenidos fueron usados en ensayos de *Western blotting*. La proteína β -tubulina fue utilizada como control de siembra (Panel superior) Cuantificación de los resultados. Los datos representan el promedio \pm SD de tres determinaciones independientes realizadas (Panel inferior).

Del mismo modo, tampoco se evidenciaron cambios significativos en su activación, al incubar a las células durante diferentes períodos de tiempo con la hormona E₂ (Figura R8).

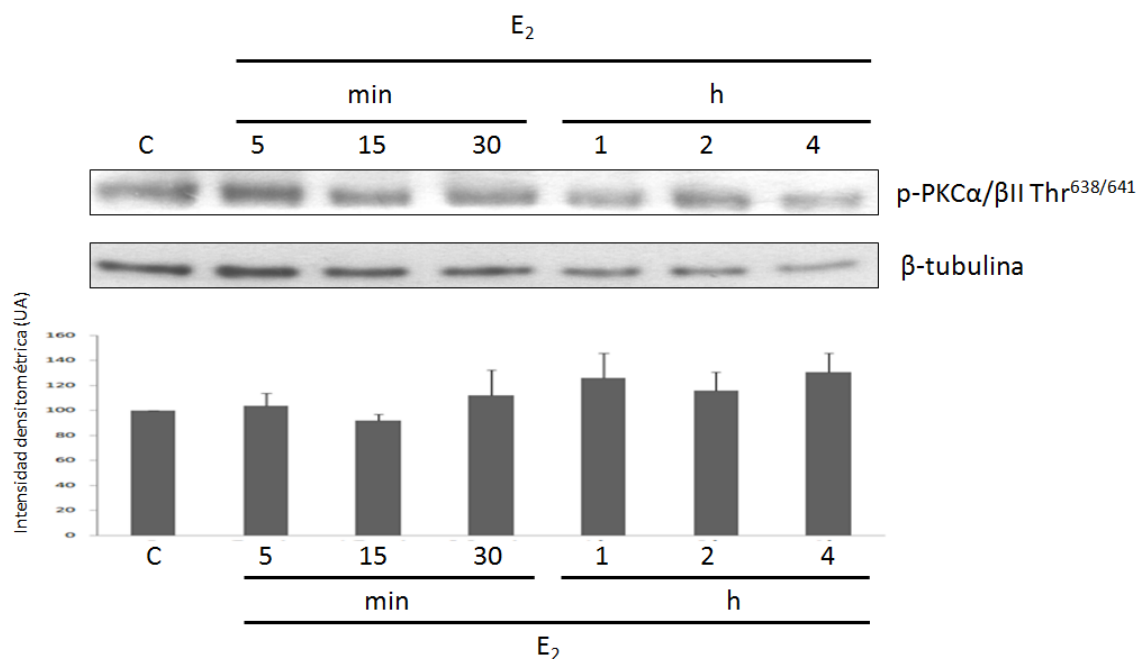


Figura R8. El 17β-estradiol no induce la activación de PKCα/βII en células C2C12. Las células fueron incubadas con el vehículo de la hormona (C) o E₂ (10⁻⁸ M) durante diferentes períodos de tiempo (5 min, 15 min, 30 min, 1h, 2h y 4h). Los lisados proteicos obtenidos fueron utilizados en ensayos de *Western blotting*. La proteína β-tubulina fue usada como control de siembra (Panel superior). Cuantificación de los resultados. Los datos representan el promedio +/- SD de tres determinaciones independientes realizadas (Panel inferior).

En concordancia con estos resultados, al evaluar la actividad de estas isoformas de la familia PKC mediante la observación de la fosforilación de un péptido específico (P-L-S-R-T-L-S-V-A-A-K), se evidenció que este no es fosforilado en ninguna de las condiciones experimentales ensayadas (Figura R9). Esto demuestra que no es afectada la actividad de estas PKCs bajo estas condiciones experimentales.

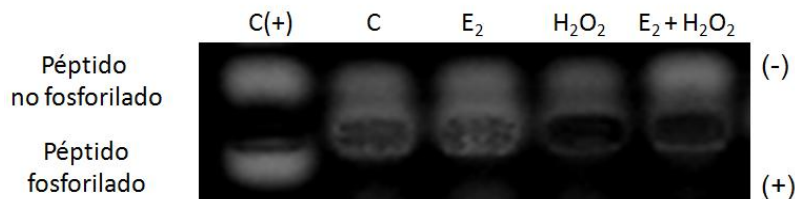


Figura R9. El 17 β -estradiol y el H₂O₂ no regulan la actividad de PKC α / β II en células C2C12. Las células fueron incubadas con el vehículo de la hormona (C), E₂ (10⁻⁸ M, 1h), H₂O₂ (0,5 mM, 1h) o E₂ (10⁻⁸ M, 1h) antes del agregado de H₂O₂ (0,5 mM, 1h). Los lisados proteicos obtenidos se centrifugaron, y los sobrenadantes fueron utilizados para la determinación de la actividad PKC con el kit no radioactivo *PepTag Assay* (Metodología). C(+) corresponde a un control positivo incluido en el kit. Esta imagen es representativa de tres experiencias independientes realizadas.

1.2. Participación de la quinasa JNK

Como se mencionó en la Introducción, JNK es clásicamente definida como una quinasa de estrés celular. Tal como se procedió con las quinasas anteriores, se evaluó si la quinasa JNK era activada por el agente apoptótico, evidenciándose que el H₂O₂ indujo su fosforilación/activación luego de 1h de incubación, efecto que persistió hasta las 4h de tratamiento (Figuras R10).

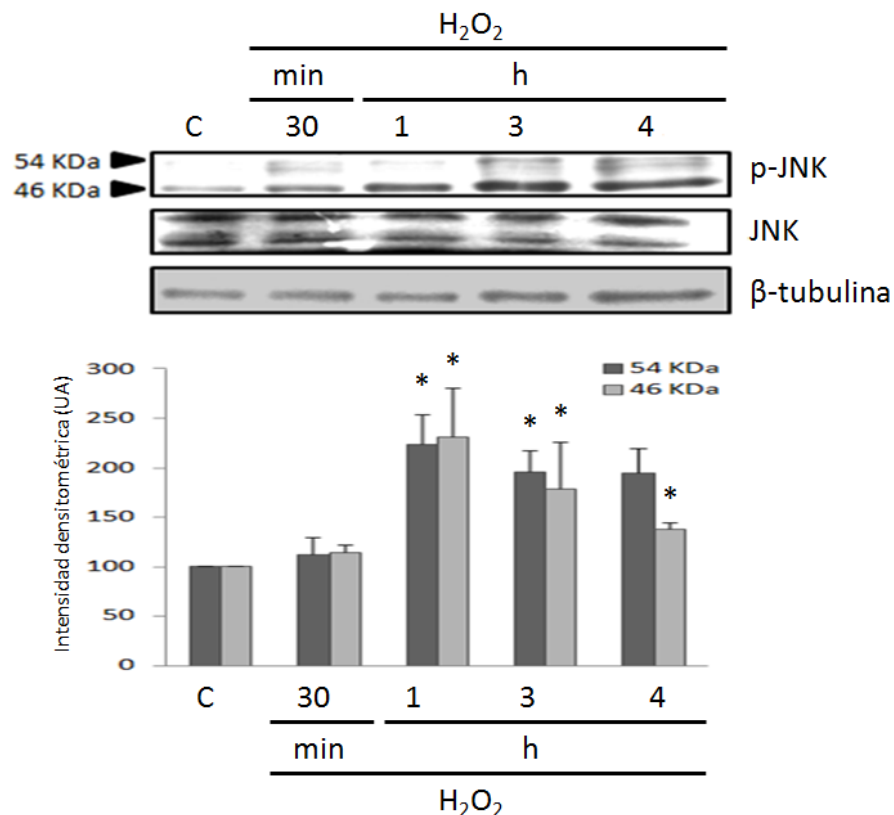


Figura R10. El H₂O₂ induce la activación de JNK en células C2C12. Las células fueron incubadas con medio sin suero en presencia o ausencia (C) de H₂O₂ (0,5 mM) durante diferentes períodos de tiempo (30 min, 1h, 3h y 4h). Los lisados proteicos obtenidos fueron utilizados en ensayos de *Western blotting* para el análisis de p-JNK y JNK. La proteína β -tubulina fue usada como control de siembra (Panel superior). Cuantificación de los resultados. Los datos representan el promedio +/- SD de tres determinaciones independientes realizadas. *p < 0.05 respecto a la condición control (Panel inferior).

Al explorar el efecto de la hormona sobre la activación de JNK, se observó que el E₂ era capaz de revertir parcialmente su fosforilación, conduciendo a su inactivación. Cuando las células fueron tratadas con el antagonista del ER, fulvestrant, antes del agregado de E₂, la fosforilación de JNK inducida por el H₂O₂ se mantuvo, demostrando que el efecto inhibitorio de la hormona sobre la activación de JNK, es mediado por los ERs (Figuras R11).

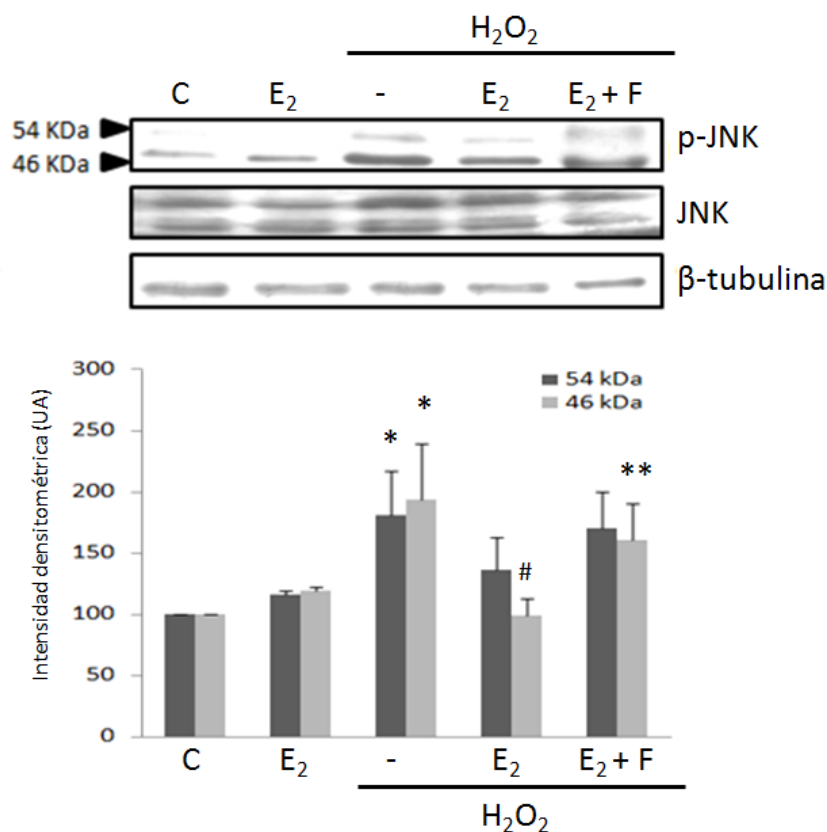


Figura R11. El 17β-estradiol previene parcialmente la activación de JNK en células C2C12. Las células fueron incubadas en presencia o ausencia de H₂O₂ (0,5 mM, 1h) luego del pretratamiento durante 1h con la hormona 10⁻⁸ M (E₂), la hormona 10⁻⁸ M junto con el antagonista fulvestrant 1 μM (E₂ + F) o el vehículo (C). Los lisados proteicos obtenidos fueron utilizados en ensayos de *Western Blotting* para el análisis de p-JNK y JNK. La proteína β-tubulina fue utilizada como control de siembra (Panel superior) Cuantificación de los resultados. Los datos representan el promedio +/- SD de tres determinaciones independientes. *p<0.05 respecto a la condición control. #p<0.05 respecto a la condición H₂O₂. **p<0.05 respecto a la condición E₂ + H₂O₂ (Panel inferior).

1.3. Participación de p53 y p66Shc

La proteína p53 actúa como un sensor del estrés celular (Giaccia y Kastan, 1998). En respuesta a situaciones adversas, p53 es activada, lo que se pone de manifiesto por su fosforilación en el residuo serina 15 (Ser¹⁵) y su posterior translocación nuclear para regular múltiples genes blanco. Para evaluar la respuesta de p53 al estrés oxidativo en células C2C12, éstas fueron incubadas

con H_2O_2 durante diferentes períodos de tiempo (15 min, 30 min, 1h y 3h), y luego sometidas a fraccionamiento subcelular para obtener las fracciones nucleares, que finalmente fueron utilizadas en ensayos de *Western blotting*. Así, se evidenció que el H_2O_2 induce su activación/ fosforilación en Ser¹⁵ a la hora de tratamiento, efecto que se mantiene hasta las 3h de incubación (Figura R12).

Para evaluar si la hormona podía contrarrestar esta respuesta al agente apoptótico, las células se preincubaron con E_2 antes de la inducción de apoptosis durante los períodos de tiempo 1h y 3h, ya que en estos tiempos se había observado la activación de p53. Esta preincubación impidió la fosforilación de p53, revelando que la hormona es capaz de regular la activación de p53 y, en consecuencia, su translocación nuclear, impidiendo así que ejerza su acción como factor de transcripción. Al mismo tiempo, la preincubación con E_2 antes de la inducción de apoptosis durante los períodos de tiempo 15 min y 30 min no produjo cambios en la fosforilación de p53 respecto a la condición de H_2O_2 correspondiente (Figura R12).

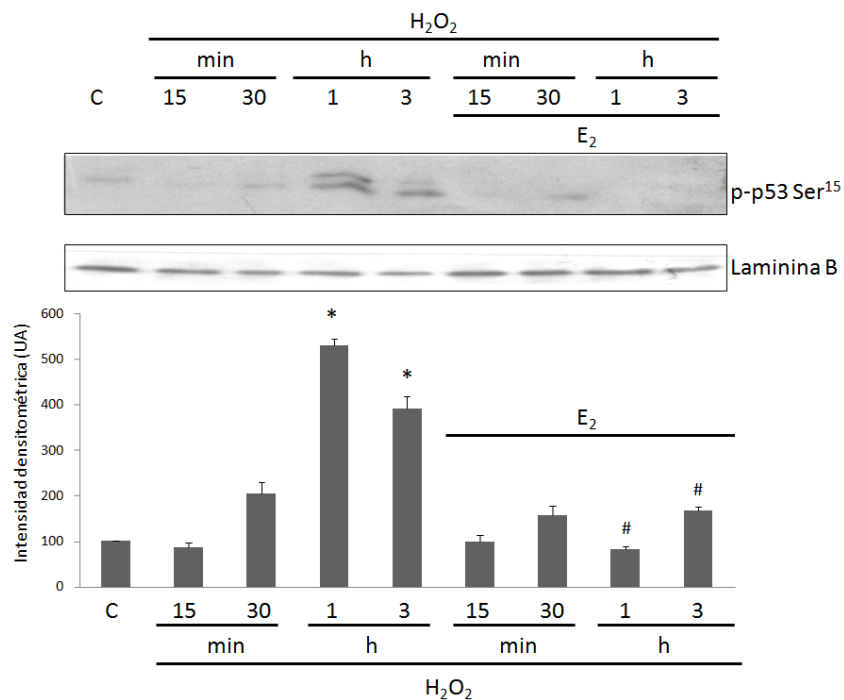


Figura R12. El 17β -estradiol inhibe la fosforilación de p53 inducidos por el H_2O_2 en células C2C12. Las células fueron incubadas durante 1h con medio sin

suero conteniendo la hormona 10^{-8} M (E_2) o el vehículo (C) antes del tratamiento con H_2O_2 (0,5 mM) durante los períodos de tiempo indicados. Los lisados proteicos adquiridos fueron utilizados para la obtención de las correspondientes fracciones nucleares mediante centrifugación diferencial y empleados en ensayos de *Western Blotting* para el análisis de la fosforilación de p53. La proteína laminina B fue utilizada como marcador nuclear (Panel superior). Cuantificación de los resultados. Los datos representan el promedio \pm SD de tres determinaciones independientes. * $p < 0.05$ respecto a la condición control. # $p < 0.05$ respecto a la condición H_2O_2 correspondiente (Panel inferior).

Uno de los genes blanco de p53 es la proteína de la familia Shc, p66Shc. La expresión de esta proteína y su fosforilación en el residuo serina 36 (Ser³⁶) se han relacionado con estrés oxidativo y muerte celular (Migliaccio et al., 1999; Pellegrini y Baldari, 2009). Inicialmente, se evaluó el efecto del agente apoptótico sobre los niveles de ARNm de p66Shc mediante la realización de ensayos de RT-qPCR. Para ello, al igual que en los experimentos anteriores, las células C2C12 fueron incubadas con H_2O_2 durante diferentes períodos de tiempo (30 min, 1h, 3h y 4h). Se encontró que los niveles de ARNm de p66Shc eran regulados positivamente por el agente apoptótico, observándose un aumento de hasta 22,47 veces superior respecto al control (1h) (Figura R13). Cuando se estudió la fosforilación en el residuo Ser³⁶ de esta proteína en respuesta al H_2O_2 , evento generalmente asociado a su cambio en la localización, se observó que esto sucedía a la hora de tratamiento y se mantenía hasta las 3h de incubación con el agente inductor de apoptosis (Figura R14).

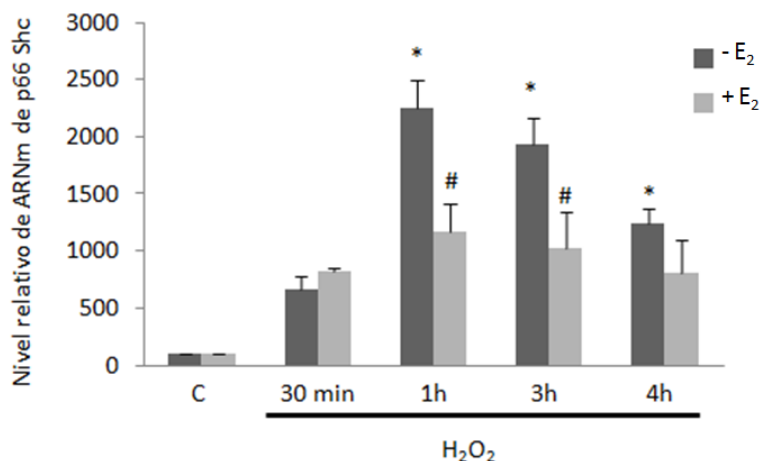


Figura R13. El 17β-estradiol disminuye los niveles de ARNm de p66Shc inducidos por el H₂O₂ en células C2C12. Las células fueron incubadas con medio sin suero conteniendo la hormona 10⁻⁸ M (E₂) o el vehículo de la hormona, (C) por 1h antes del tratamiento con H₂O₂ (0,5 mM) durante los períodos de tiempo indicados. Las muestras obtenidas fueron utilizadas en ensayos de RT-qPCR para evaluar los niveles de ARNm de p66Shc. GAPDH fue usado como gen endógeno para la normalización. El método comparativo ΔCt fue utilizado para la cuantificación relativa de la expresión génica. Los resultados obtenidos representan el promedio +/- SD de tres determinaciones independientes realizadas de muestras de ADNc ensayadas por duplicado. *p<0.05 respecto a la condición control. #p<0.05 respecto a la condición H₂O₂ correspondiente.

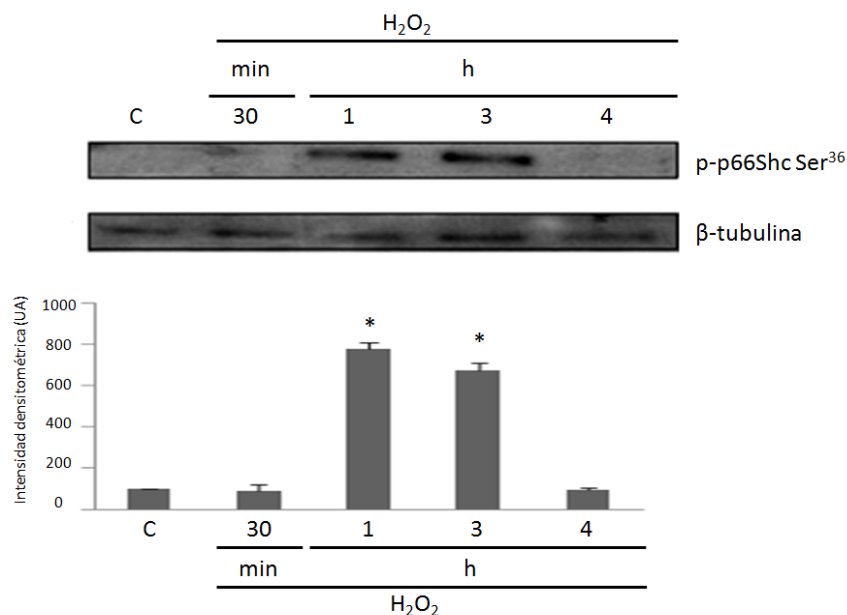


Figura R14. El H₂O₂ induce la fosforilación de p66Shc en células C2C12. Las células fueron incubadas con medio sin suero en presencia o ausencia (C) de

H₂O₂ (0,5 mM) durante diferentes períodos de tiempo (30 min, 1h, 3h y 4h). (Panel superior) Los lisados proteicos obtenidos fueron utilizados en ensayos de *Western blotting* para el análisis de p-p66Shc. La proteína β-tubulina fue usada como control de siembra. (Panel inferior) Cuantificación de los resultados. Los datos representan el promedio +/- SD de tres determinaciones independientes realizadas. *p <0.05 respecto a la condición control.

Al investigar el rol de E₂ sobre p66Shc, se observó que la preincubación con la hormona podía revertir el cambio inducido por el agente apoptótico sobre los niveles de ARNm de p66Shc, conduciendo a su disminución a partir de la hora de tratamiento con la hormona y manteniéndose en esos niveles en los siguientes períodos de tiempo (Figura R13). En los ensayos de *Western blotting*, se observó que la preincubación con la hormona redujo el nivel de fosforilación de p66Shc (Figura R15). Estos resultados, en conjunto, sugieren que tanto el aumento de los niveles de ARNm como la fosforilación de p66Shc en respuesta al H₂O₂ son importantes para el proceso de muerte celular y que la hormona protege a estas células de la apoptosis previniendo estos efectos.

Para investigar si esta proteína adaptadora sufría un cambio en su localización intracelular como consecuencia de su fosforilación en las células C2C12, éstas fueron tratadas con el inductor de apoptosis H₂O₂ (1h). Luego, se obtuvieron las fracciones mitocondriales y citosólicas mediante centrifugación diferencial. Ensayos de *Western blotting* demostraron que, bajo condiciones apoptóticas, la cantidad de p66Shc que se encuentra en mitocondrias es mayor que la observada en el citosol, poniendo de manifiesto que, en efecto, p66Shc transloca a mitocondria en la apoptosis inducida por H₂O₂ en células C2C12 (Figura R16). Cuando se evaluó si E₂ podía prevenir esta translocación, se observó que la preincubación con la hormona antes del agregado del inductor de apoptosis disminuyó la migración de p66Shc a mitocondria. Para corroborar estos resultados se evaluaron las mismas condiciones experimentales mediante ensayos de inmunocitoquímica usando un anticuerpo dirigido contra p-p66Shc (fluorescencia verde) y el colorante catiónico *Mitotracker Red* (fluorescencia roja). En concordancia con las observaciones que surgieron de los ensayos de *Western*

blotting, el tratamiento con H_2O_2 (1h) induce la fosforilación y translocación de p66Shc a mitocondria, puesto en evidencia por un aumento en la intensidad de fluorescencia verde respecto al control, que no presenta fluorescencia, y por la fluorescencia amarilla en mitocondrias originada por la superposición de fluorescencias (verde: p66Shc y roja: mitocondrias). Sin embargo, en presencia de la hormona (E_2 (1h) + H_2O_2 (1h)), se visualiza una tenue fluorescencia verde dispersa en el citosol, demostrando la inhibición de la translocación de p-p66Shc a mitocondria. La adición de fulvestrant (1h) previo a la incubación con E_2 y H_2O_2 resultó nuevamente en la superposición de fluorescencias, dando a las células una coloración amarilla, sugiriendo que el efecto protector de la hormona es mediado por ER (Figura R17).

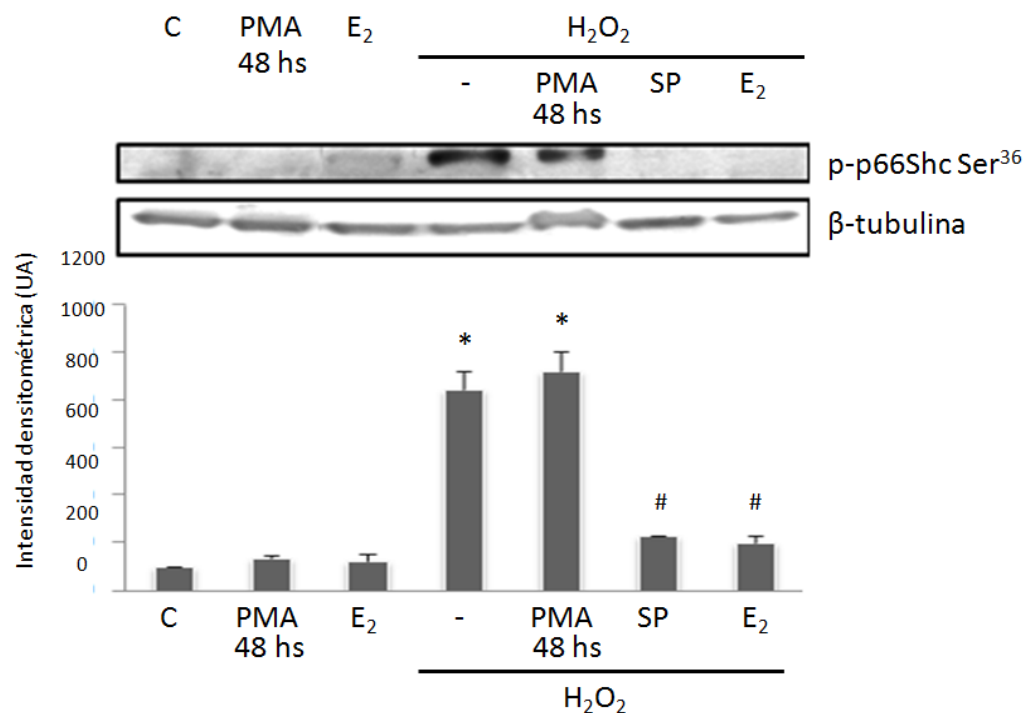


Figura R15. El 17β -estradiol inhibe la activación de p66Shc inducida por el H_2O_2 a través de JNK e independientemente de PKC en células C2C12. Las células fueron incubadas en presencia o ausencia de H_2O_2 (0,5 mM, 1h) luego de 1h de pretratamiento con la hormona 10^{-8} M (E_2), SP600125 10 μ M (SP) o el vehículo (C), o de 48 hs de pretratamiento con PMA 10 μ M. Los lisados proteicos obtenidos fueron utilizados en ensayos de *Western blotting* para el análisis de p-

p66Shc. La proteína β -tubulina fue usada como control de siembra (Panel superior). Cuantificación de los resultados. Los datos representan el promedio \pm SD de tres determinaciones independientes realizadas. * $p < 0.05$ respecto a la condición control. # $p < 0.05$ respecto a la condición H_2O_2 (Panel inferior).

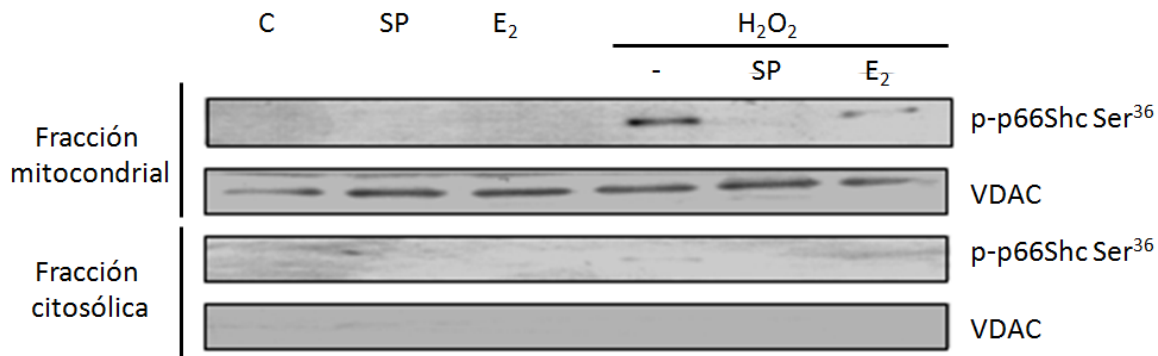


Figura R16. El 17 β -estradiol inhibe la translocación mitocondrial de p66Shc inducida por el H_2O_2 a través de JNK en células C2C12. Las células fueron incubadas en presencia o ausencia de H_2O_2 (0,5 mM, 1h), luego de 1h de pretratamiento con la hormona 10^{-8} M (E_2), SP600125 10μ M (SP) o el vehículo (C). Los lisados proteicos adquiridos fueron utilizados para la obtención de las fracciones mitocondriales y citosólicas mediante centrifugación diferencial y, luego, usados en ensayos de *Western blotting* para el análisis de p-p66Shc Ser³⁶. Se muestra un *blot* representativo de tres experimentos independientes realizados. Como marcador mitocondrial, se empleó un anticuerpo dirigido contra la proteína VDAC.

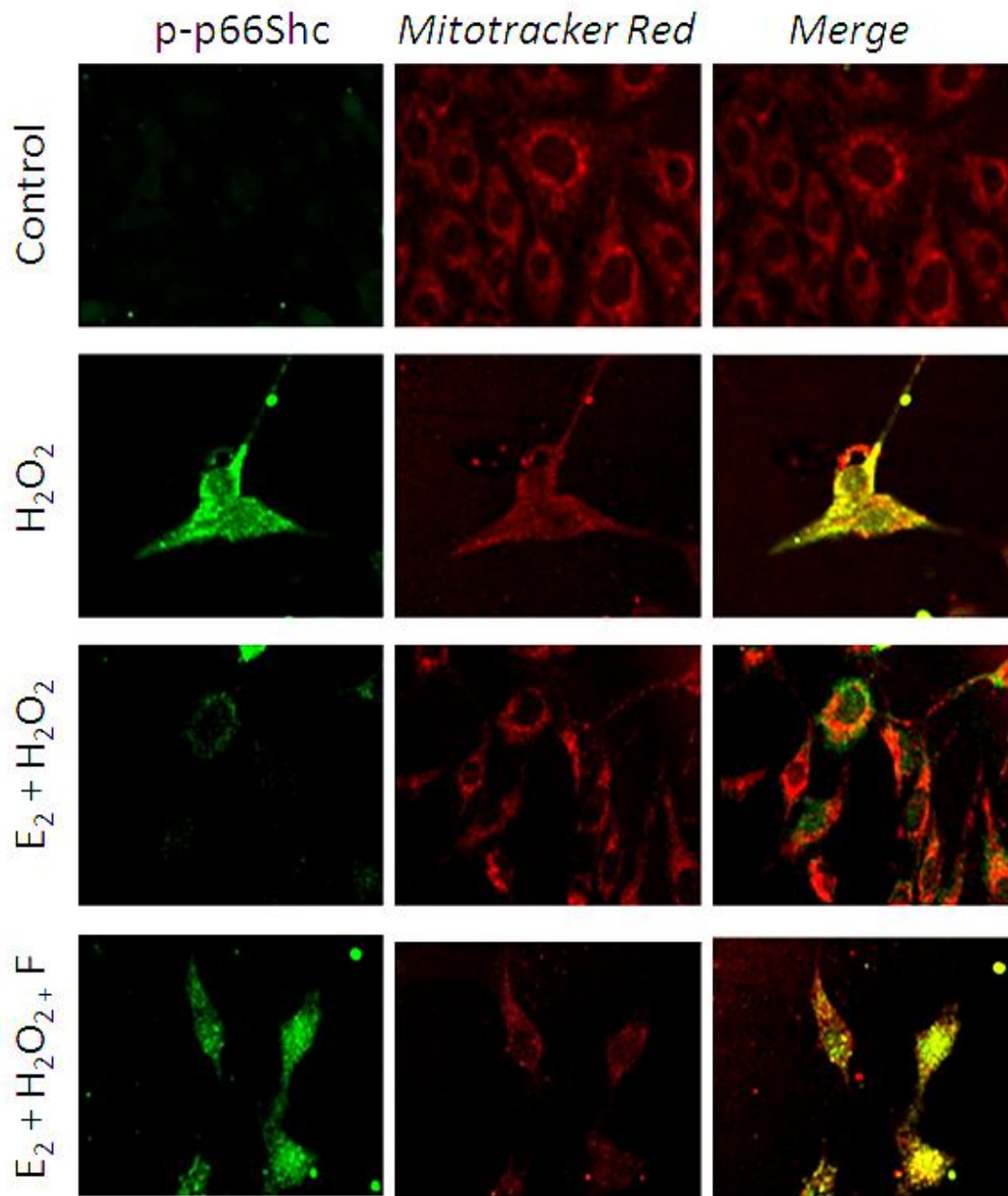


Figura R17. El 17 β -estradiol a través del ER inhibe la translocación mitocondrial de p66Shc inducida por el H₂O₂ en células C2C12. Las células fueron incubadas con el vehículo de la hormona (C), E₂ (10⁻⁸ M, 1h), H₂O₂ (0,5 mM, 1h), E₂ antes del agregado de H₂O₂ (0,5 mM, 1h), o F (1 μ M, 1h) junto con E₂ antes de la adición de H₂O₂ (0,5 mM, 1h). Luego del tratamiento con *Mitotracker Red* (fluorescencia roja) y anticuerpo anti-p-p66Shc seguido de la incubación con un anticuerpo secundario conjugado a fluorocromo (fluorescencia verde), se

obtuvieron imágenes por microscopía de fluorescencia. Las imágenes son representativas de tres determinaciones independientes realizadas. Objetivo 60X.

1.4. Participación de miembros de la clase O de la familia *Forkhead* (FoxOs)

En la Introducción de este trabajo de tesis se describió a la subfamilia *Forkhead box O* (FoxO) de factores de transcripción como reguladores de la homeostasis, particularmente en respuesta a situaciones de estrés. Es así como se los ha involucrado en la reparación celular, la detoxificación de ROS y la apoptosis. En respuesta al estrés oxidativo, los FoxOs pueden sufrir cambios en su localización subcelular, además de fosforilaciones en diferentes residuos, dependiendo del tipo celular involucrado así como también del tipo e intensidad del estímulo.

Para estudiar el efecto del agente apoptótico sobre el factor de transcripción FoxO3a en las células C2C12, las mismas fueron expuestas durante diferentes períodos de tiempo (30 min, 1h y 3h) al H₂O₂. Mediante ensayos de *Western blotting* se evidenció que el H₂O₂ conduce a la fosforilación en el residuo Ser²⁵³ de FoxO3a a los 30 min y 1h de tratamiento, indicando que bajo estas condiciones este factor se encuentra inhibido (344,97 +/- 20,9% y 450,2 +/- 12,4%, respectivamente) (Figura R18). Dado que algunos miembros de esta familia pueden ser regulados negativamente por la vía de señalización PI3K/Akt, se evaluó si esta vía modulaba la acción del H₂O₂ en este sistema experimental. La preincubación con el inhibidor de PI3K, LY294002 (1h) inhibió la fosforilación de FoxO3a mediada por el agente apoptótico, sugiriendo que la vía PI3K-Akt es la que regula negativamente (mediante su fosforilación) a FoxO3a en células C2C12. En concordancia, se observó que Akt se encuentra fosforilado/activo en los mismos períodos de tiempo que FoxO3a en respuesta al H₂O₂ (Figura R18). Así también, en fracciones citosólicas obtenidas por centrifugación diferencial, se observó que FoxO3a fosforilado se encuentra sólo en las células en condiciones basales (Control), mientras que está ausente cuando las células son expuestas al H₂O₂. En la fracción nuclear, se visualiza FoxO3a fosforilado a los 30 min y 1h de

tratamiento con H_2O_2 , evidenciando que una fracción de este factor translocaría al núcleo en su estado fosforilado para poder, así, regular la expresión génica, y luego sería defosforilado en esta localización (Figura R19). Estas observaciones fueron corroboradas por ensayos de inmunocitoquímica, en los que se evidenció que la fluorescencia derivada de p-FoxO3a en condiciones basales (Control) se visualiza distribuida homogéneamente en citosol, mientras que el tratamiento con el agente apoptótico (H_2O_2 : 30 min y 1h) conduce al cambio en su localización desde el citosol hasta el núcleo (Figura R19).

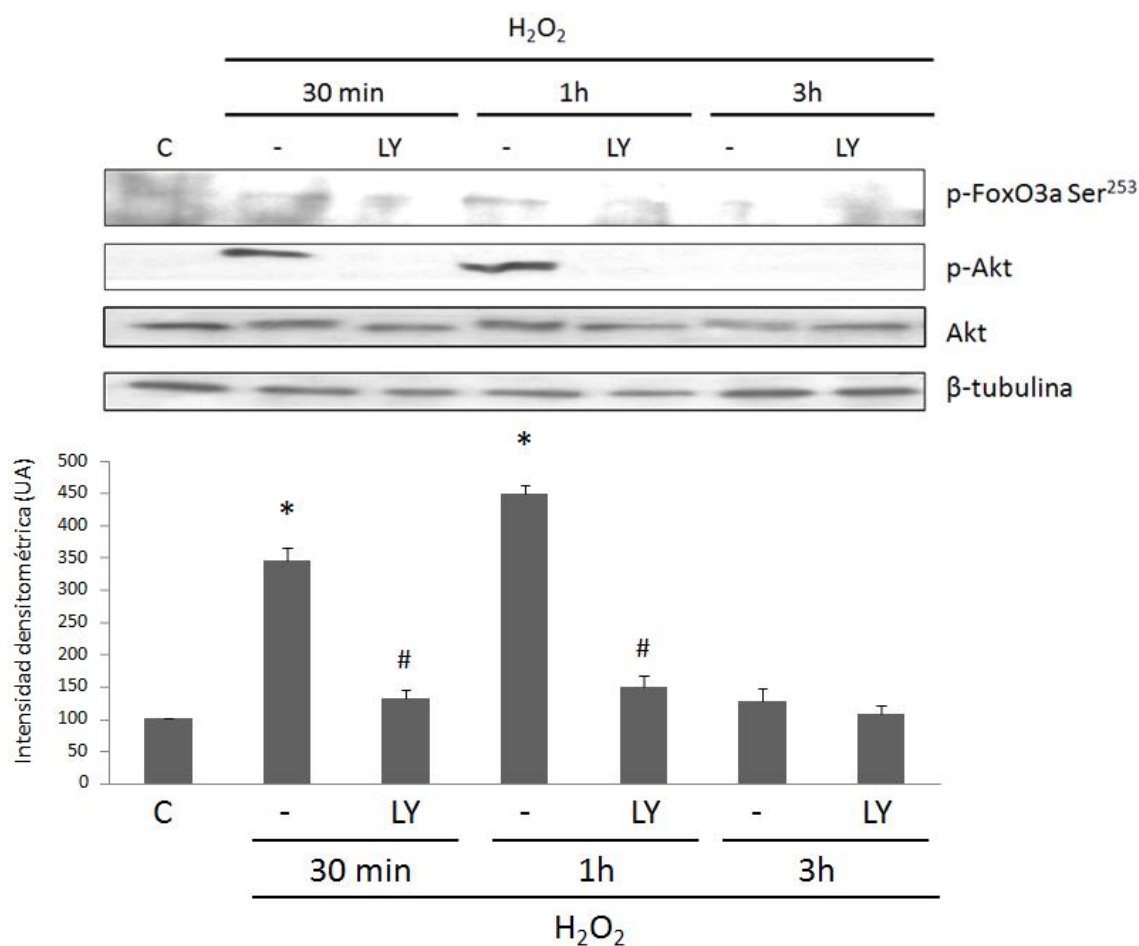
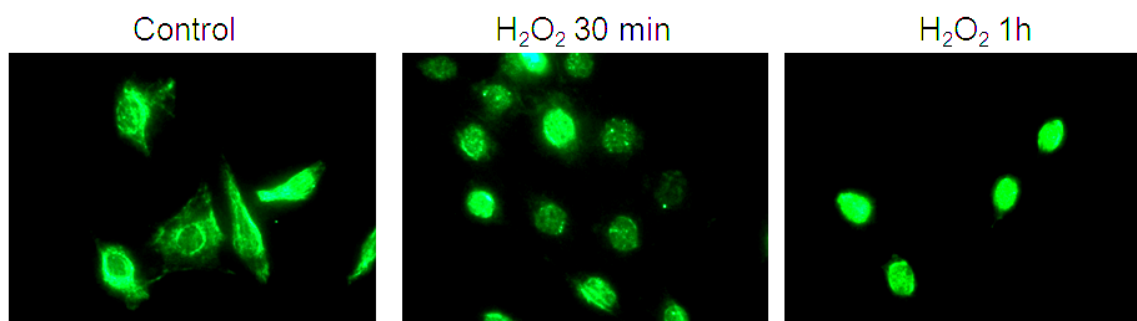


Figura R18. El H_2O_2 a través de Akt induce la fosforilación de FoxO3a en períodos tempranos de la apoptosis en células C2C12. Las células fueron incubadas con medio sin suero en presencia o ausencia (C) de H_2O_2 (0,5 mM) durante diferentes períodos de tiempo (30 min, 1h y 3h) luego de 1h de pretratamiento con LY294002 25 μ M o el vehículo. Los lisados proteicos obtenidos fueron utilizados en ensayos de *Western blotting* para el análisis de p-FoxO3a Ser²⁵³, p-Akt y Akt. La proteína β -tubulina fue usada como control de siembra

(Panel superior). Cuantificación de los resultados para p-FoxO3a. Los datos representan el promedio \pm SD de tres determinaciones independientes realizadas. * $p < 0.05$ respecto a la condición control. # $p < 0.05$ respecto a la condición H_2O_2 correspondiente (Panel inferior).

A)



B)

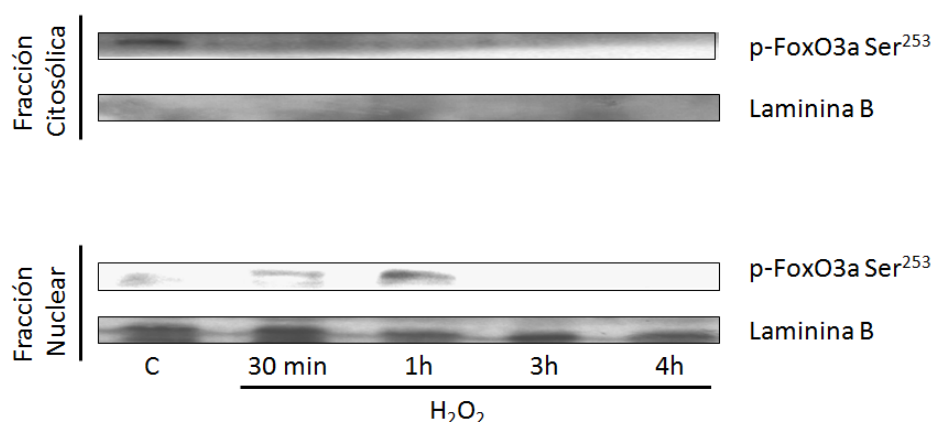


Figura R19. El H_2O_2 induce la translocación de FoxO3a desde el citosol hasta el núcleo en células C2C12. Las células fueron incubadas con medio sin suero en presencia o ausencia (C) de H_2O_2 (0,5 mM) durante diferentes períodos de tiempo. **A)** Luego, fueron tratadas con anticuerpo anti-p-FoxO3a Ser²⁵³, seguido de la incubación con un anticuerpo secundario conjugado a fluorocromo (fluorescencia verde) y se obtuvieron imágenes por microscopía de fluorescencia. Las imágenes son representativas de tres determinaciones independientes realizadas. Objetivo 60X. **B)** Los lisados proteicos adquiridos fueron utilizados para la obtención de las correspondientes fracciones nucleares y citosólicas mediante centrifugación diferencial y, posteriormente, usados en ensayos de *Western blotting* para el análisis de p-FoxO3a Ser²⁵³. La proteína laminina B fue utilizada como marcador nuclear. Los resultados son representativos de tres determinaciones independientes.

Debido a que miembros de esta familia pueden ser regulados por la quinasa JNK, y como ya se había evidenciado que la misma se activaba en células C2C12 en respuesta al estímulo apoptótico a partir de la hora de tratamiento, se estudió si esta quinasa modulaba la acción del agente apoptótico sobre FoxO3a. Se evidenció que la preincubación con SP600125 antes del agregado de H₂O₂ no indujo cambios significativos en la fosforilación de FoxO3a a los 30 min de incubación, mientras que condujo a la inhibición de la fosforilación de FoxO3a a la hora de incubación. Al evaluar si JNK ejercía esta acción actuando sobre Akt, se evidenció que Akt se mantiene fosforilado aún en presencia del inhibidor de JNK (Figura R20). Estos datos sugieren que la vía PI3K-Akt y JNK actuarían sobre FoxO3a de manera independiente y en diferentes períodos del proceso apoptótico.

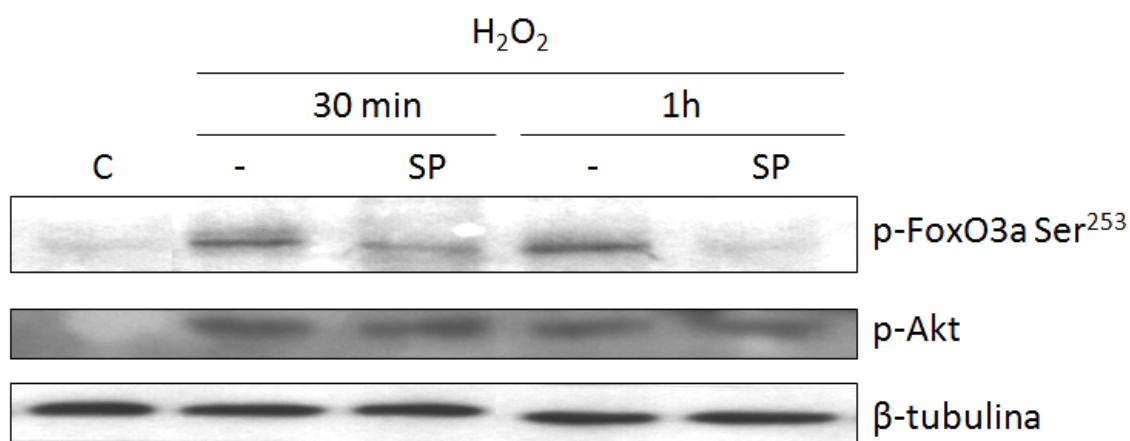


Figura R20. JNK modula la fosforilación de FoxO3a mediada por H₂O₂, independientemente de Akt en células C2C12. Las células fueron incubadas con medio sin suero en presencia o ausencia (C) de H₂O₂ (0,5 mM, 1h) luego del pretratamiento durante 1h con SP600125 10 μM (SP) o el vehículo. Los lisados proteicos obtenidos fueron utilizados en ensayos de *Western blotting* para el análisis de p-FoxO3a Ser²⁵³ y p-Akt. La proteína β-tubulina fue usada como control de siembra. Las imágenes son representativas de tres determinaciones independientes realizadas.

Para evaluar si la hormona ejercía algún efecto sobre el cambio observado en FoxO3a en respuesta al agente apoptótico, las células se preincubaron con E₂ antes de la inducción de apoptosis durante los períodos de tiempo de 30 min y 1h, debido a que en estos se había observado la fosforilación de este factor. Esta

preincubación no indujo cambios significativos en el nivel de fosforilación de este factor, revelando que la hormona mantiene a FoxO3a fosforilado/inactivo. Al mismo tiempo, se observó que Akt se encontraba fosforilado/activo en el tratamiento conjunto de la hormona y el agente apoptótico (Figura R21).

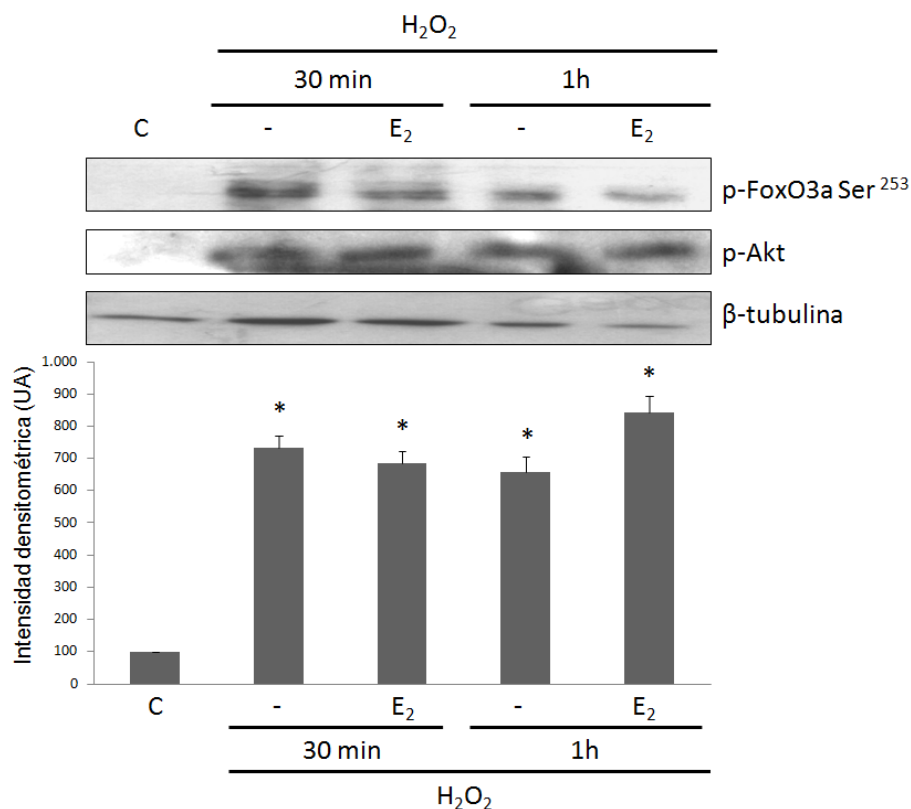
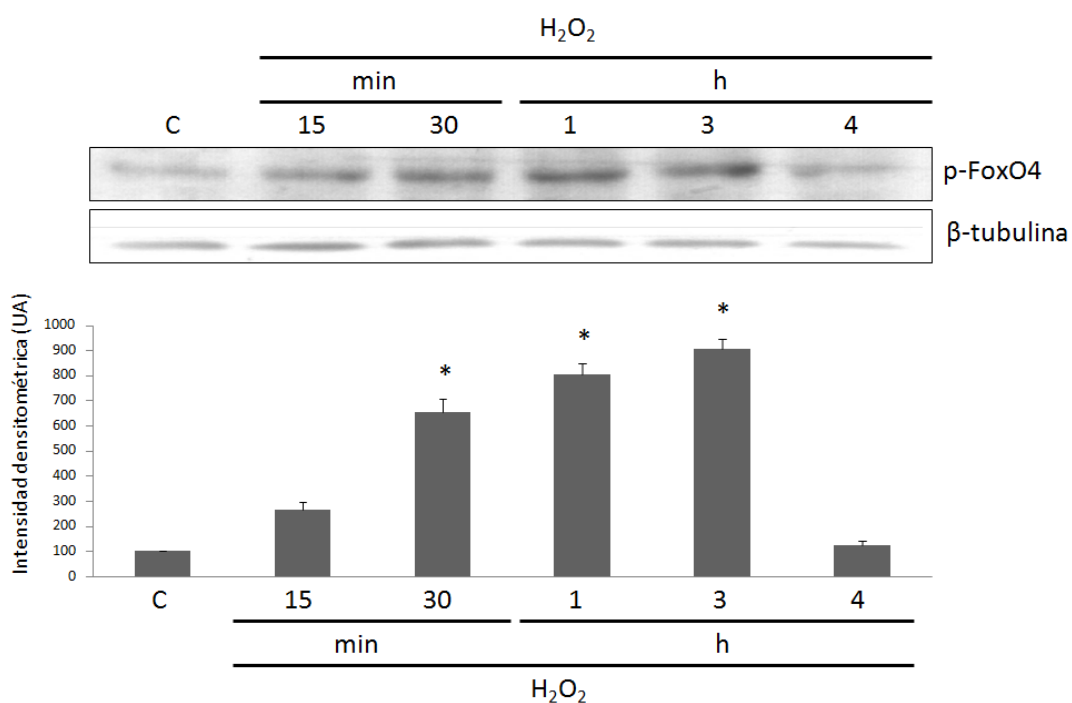


Figura R21. El 17β-estradiol mantiene la fosforilación de FoxO3a en células C2C12. Las células fueron incubadas con medio sin suero en presencia o ausencia (C) de H₂O₂ (0,5 mM) durante los períodos de tiempo indicados luego del pretratamiento con la hormona 10⁻⁸ M (E₂) o el vehículo. Los lisados proteicos adquiridos fueron utilizados para la realización de *Western blotting* y el análisis de p-FoxO3a Ser²⁵³. La proteína β-tubulina fue usada como control de siembra (Panel superior). Cuantificación de los resultados. Los datos representan el promedio +/- SD de tres determinaciones independientes realizadas. *p < 0.05 respecto a la condición control (Panel inferior).

Para estudiar el efecto del agente apoptótico sobre el factor de transcripción FoxO4 en las células C2C12, estas fueron expuestas durante diferentes períodos de tiempo (30 min, 1h y 3h) al H₂O₂. Se observó que el agente apoptótico induce la fosforilación (activación) en Thr⁴⁴⁷/Thr⁴⁵¹ de FoxO4 a los 30 min de incubación,

efecto que se mantiene hasta las 3h. Este resultado fue corroborado por ensayos de inmunocitoquímica en los que se evidenció un aumento en la intensidad de fluorescencia derivada de p-FoxO4 bajo condiciones apoptóticas (H_2O_2 , 1h) comparado con el control. Así también, se observó en este ensayo que la localización de FoxO4 fosforilado es nuclear (Figura R22).

A)



B)

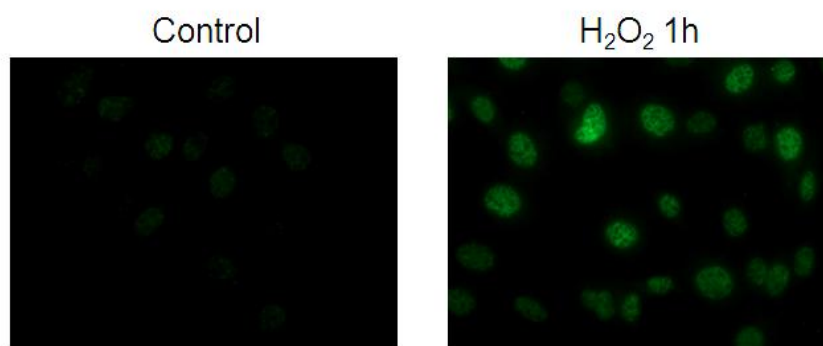


Figura R22. El H_2O_2 induce la fosforilación de FoxO4 en células C2C12. Las células fueron incubadas con medio sin suero en presencia o ausencia (C) de

H₂O₂ (0,5 mM) durante diferentes períodos de tiempo (15 min, 30 min, 1h, 3h y 4h). **A)** Los lisados proteicos obtenidos fueron utilizados en ensayos de *Western blotting* para el análisis de p-FoxO4. La proteína β -tubulina fue usada como control de siembra (Panel superior). Cuantificación de los resultados. Los datos representan el promedio \pm SD de tres determinaciones independientes realizadas. * $p < 0.05$ respecto a la condición control (Panel inferior). **B)** Imágenes representativas de tres determinaciones independientes realizadas, obtenidas luego del agregado de anticuerpo anti-p-FoxO4, seguido de la incubación con un anticuerpo secundario conjugado a fluorocromo (fluorescencia verde) por microscopía de fluorescencia. Objetivo 60X.

Para evaluar si JNK modulaba la acción del H₂O₂ sobre FoxO4, se realizó la preincubación con el inhibidor de JNK, SP600125 (1h) antes del agregado del agente apoptótico. Se observó que el agregado del inhibidor disminuyó la fosforilación de FoxO4 mediada por el agente apoptótico (1h), sugiriendo que esta quinasa regula a FoxO4 en células C2C12 (Figura R23).

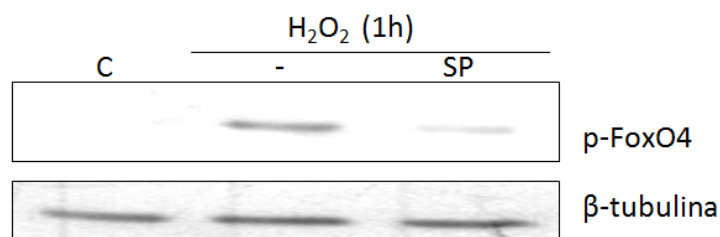


Figura R23. JNK interviene en la fosforilación de FoxO4 mediada por H₂O₂ en células C2C12. Las células fueron incubadas con medio sin suero en presencia o ausencia (C) de H₂O₂ (0,5 mM, 1h) luego del tratamiento durante 1h con SP600125 10 μ M (SP). Los lisados proteicos obtenidos fueron utilizados en ensayos de *Western blotting* para el análisis de p-FoxO4. La proteína β -tubulina fue usada como control de siembra. Las imágenes son representativas de tres determinaciones independientes realizadas.

Para explorar el rol de la hormona sobre el cambio observado en p-FoxO4 en respuesta al agente apoptótico, las células se preincubaron con E₂ antes de la inducción de apoptosis durante los períodos de tiempo de 1h y 3h, en los que se había observado la fosforilación de FoxO4. Esta preincubación indujo cambios en el nivel de fosforilación de este factor de transcripción sólo a las 3h de tratamiento, revelando que la hormona inhibe la fosforilación de FoxO4 en períodos más avanzados del proceso apoptótico (Figura R24).

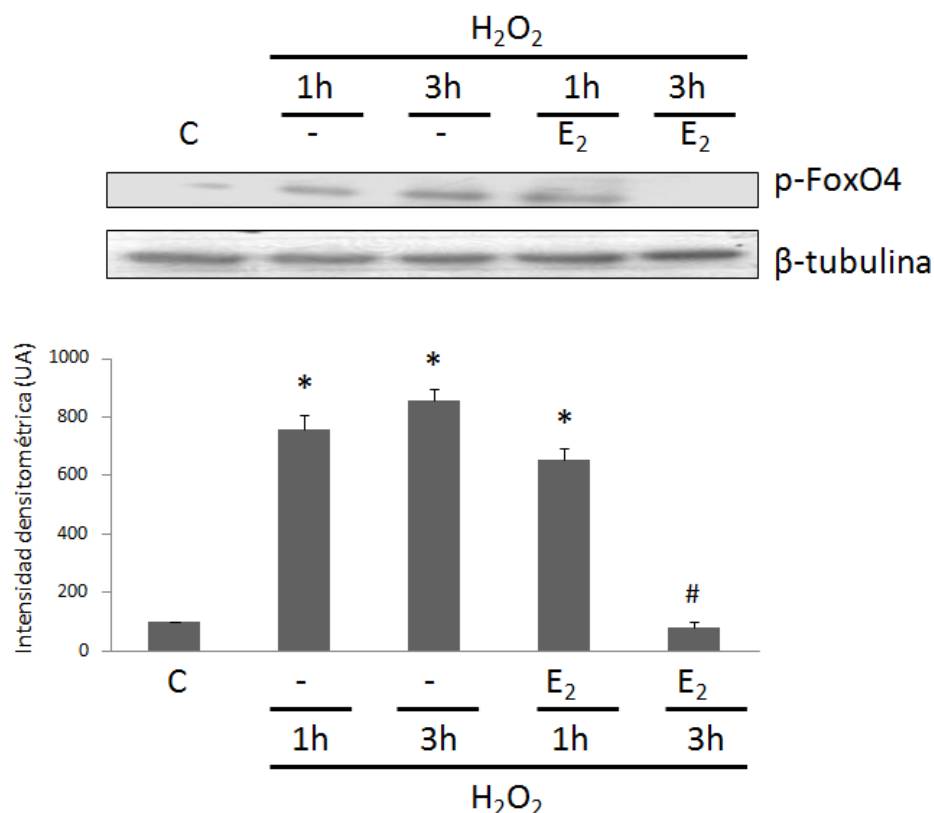


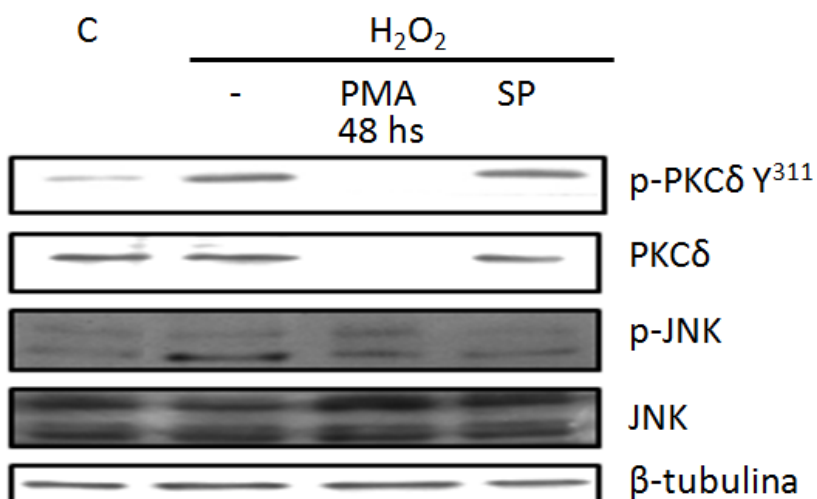
Figura R24. El 17 β -estradiol modula la fosforilación de FoxO4 en células C2C12. Las células fueron incubadas con medio sin suero en presencia o ausencia (C) de H₂O₂ (0,5 mM) durante los períodos de tiempo indicados luego del pretratamiento con la hormona 10⁻⁸ M (E₂) o el vehículo. Los lisados proteicos adquiridos fueron utilizados para la realización de *Western blotting* y el análisis de p-FoxO4. La proteína β -tubulina fue usada como control de siembra (Panel superior). Cuantificación de los resultados. Los datos representan el promedio \pm SD de tres determinaciones independientes realizadas. * $p < 0.05$ respecto a la condición control. # $p < 0.05$ respecto a la condición H₂O₂ correspondiente (Panel inferior).

1.5. Interacciones entre las vías de señalización intracelular activadas en la apoptosis y reguladas por E₂

Los datos obtenidos en este capítulo del presente trabajo de tesis sugieren que tanto PKC δ como JNK son activadas en respuesta al tratamiento con H₂O₂. Para profundizar en el mecanismo de acción de estas quinasas, se investigó si PKC δ y JNK podrían funcionar en conjunto mediando los efectos disparados por el

H₂O₂ en células C2C12. Para ello, la PKC fue *downregulada* mediante el tratamiento con una concentración alta de PMA (10 μM) por un período prolongado de tiempo (48 hs) (Rodríguez-Pena y Rozengurt, 1984; Takuwa et al., 1988). Luego de la *downregulación* de PKCδ, las células fueron expuestas al agente apoptótico, y posteriormente se evaluó la fosforilación/activación de JNK. Como se observa en la figura R25, el PMA bajo estas condiciones redujo la fosforilación de JNK inducida por H₂O₂. Por el contrario, cuando las células musculares fueron tratadas con el inhibidor de JNK y luego utilizadas para ensayar la fosforilación de PKCδ inducida por H₂O₂, no se observaron cambios. Estos resultados sugieren que PKCδ actúa corriente arriba de JNK en la apoptosis inducida por H₂O₂.

A)



B)

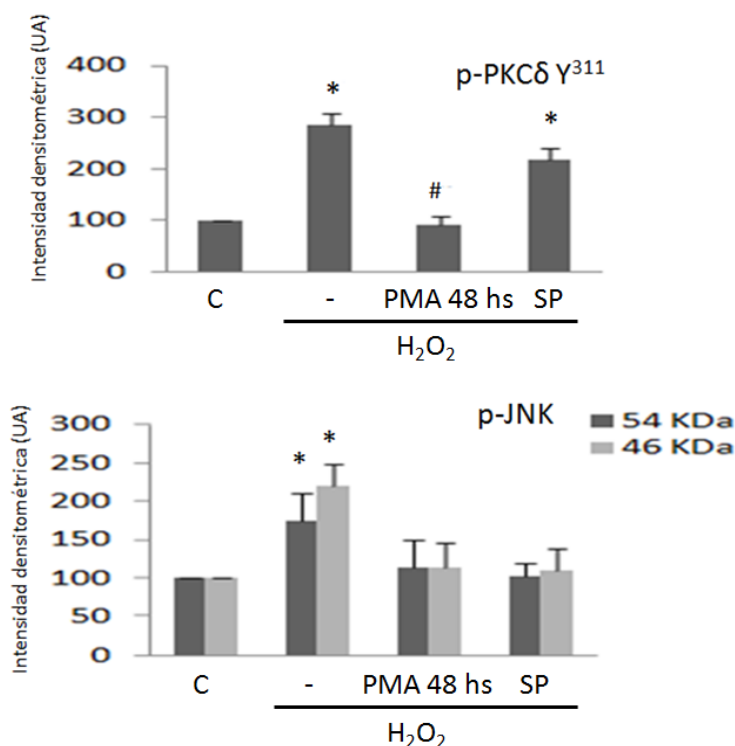
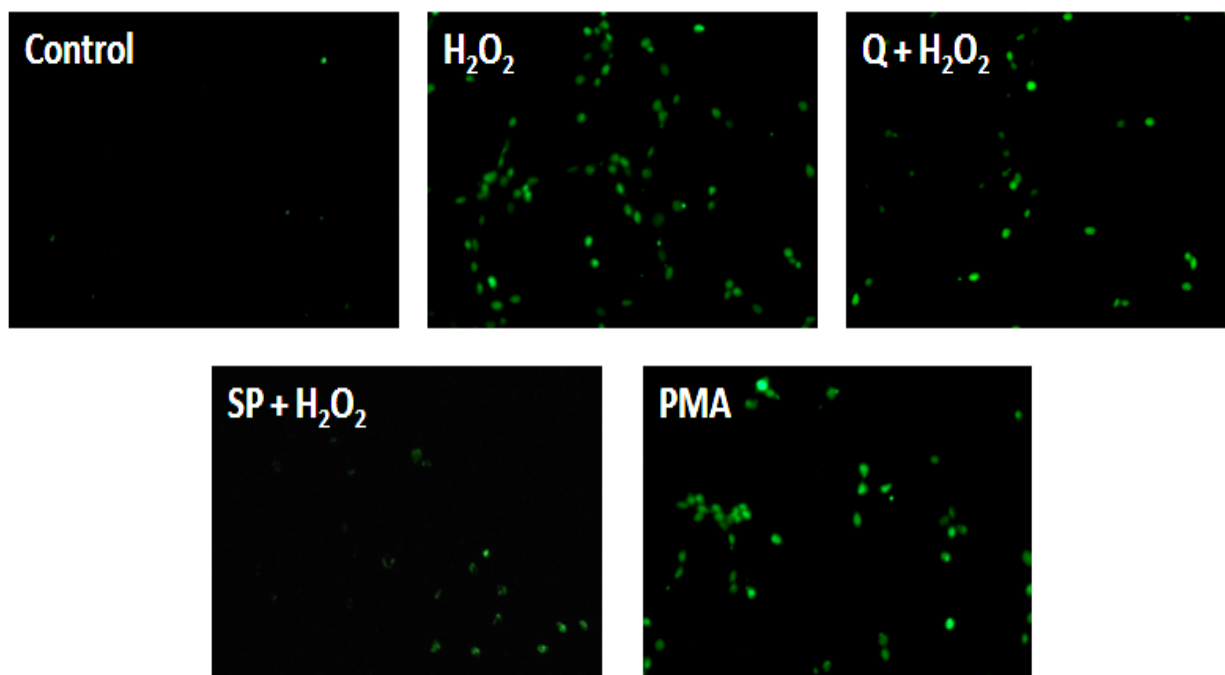


Figura R25. PKCδ actúa *upstream* JNK en la cascada apoptótica inducida por H₂O₂ en células C2C12. Las células fueron incubadas con medio sin suero en presencia o ausencia de H₂O₂ (0,5 mM, 1h) luego de 1h de pretratamiento con SP600125 10 μM (SP), el vehículo o 48 hs de pretratamiento con PMA 10 μM. **A)** Los lisados proteicos fueron utilizados en ensayos de *Western blotting* para el análisis de p-PKCδ, PKCδ, p-JNK y JNK. La proteína β-tubulina fue usada como control de siembra. **B)** Cuantificación de los resultados. Los datos representan el promedio +/- SD de tres determinaciones independientes realizadas. *p <0.05 respecto a la condición control. #p <0.05 respecto a la condición H₂O₂.

Debido a que la participación de PKCδ y JNK en el proceso de apoptosis depende del tipo celular, de la naturaleza del estímulo apoptótico, de la duración de su activación y de la actividad de otras vías de señalización intracelulares, se investigó si efectivamente la activación de ambas quinasas afectaba la capacidad de las células C2C12 de desencadenar la muerte por apoptosis. Para ello, las células fueron expuestas al agente apoptótico (1h) en presencia o ausencia del inhibidor de PKC queleritrina o del inhibidor de JNK. Se observó mediante ensayos de TUNEL que, como se esperaba, el agregado de H₂O₂ induce un gran aumento

en la fragmentación del ADN (74,01% +/- 12,09 de células TUNEL positivas sobre el control). Sin embargo, el pretratamiento con cualquiera de los inhibidores conduce a una disminución de la fragmentación del ADN causada por el H₂O₂ (Q + H₂O₂: de 88,05% a 46,3%; SP + H₂O₂: de 88,05% a 46,9%) (Figura R26). Además, dado que se conoce que el DAG activa a las PKCs (Nishizuka, 1992) y que la acción del DAG, a su vez, puede ser mimetizada por ésteres de forbol, tales como el PMA (Hannun, 1986; Newton, 1997), las células fueron incubadas con PMA (1 μM, 1h). Se evidenció que el PMA incrementa el porcentaje de células TUNEL positivas (69,01% sobre el control) en similar magnitud que el tratamiento con H₂O₂ (Figura R26). Estos resultados sugieren que ambas quinasas se encuentran involucradas en la apoptosis en respuesta al estímulo del H₂O₂ en mioblastos esqueléticos.

A)



B)

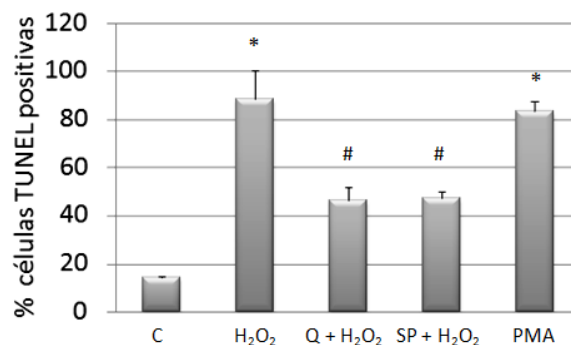
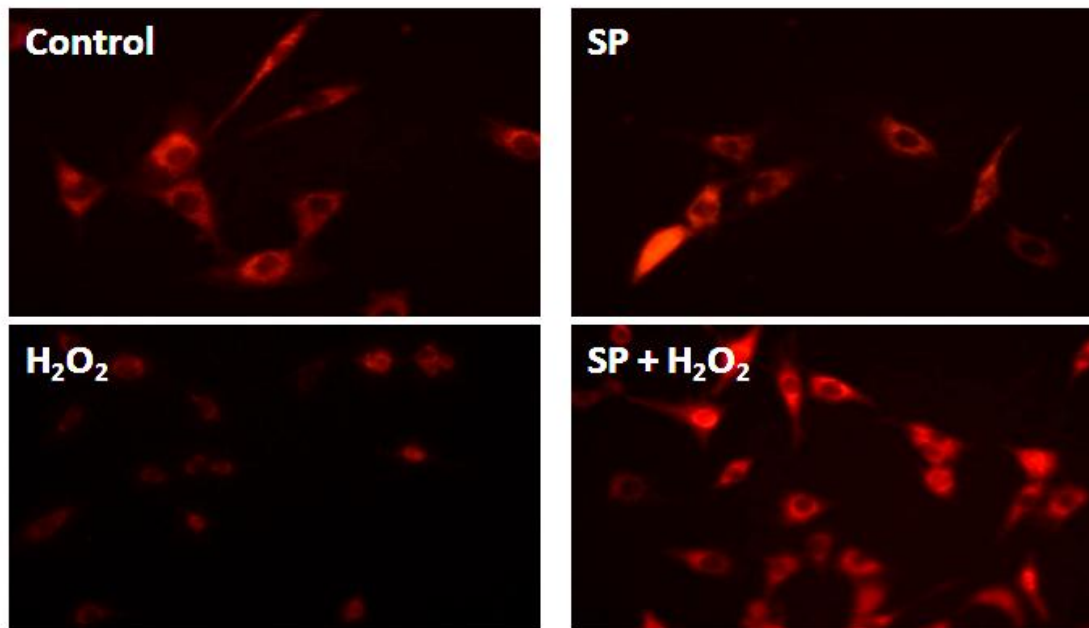


Figura R26. El H₂O₂ induce apoptosis a través de PKC δ y JNK en células C2C12. Las células fueron incubadas con medio sin suero en presencia o ausencia (C) de H₂O₂ (0,5 mM) luego del pretratamiento durante 1h con queleritrina 2 μ M (Q) o SP600125 10 μ M (SP), o tratadas por 1h con PMA 1 μ M. La inducción de apoptosis se determinó mediante ensayos de TUNEL. **A)** Imágenes representativas de cada condición ensayada. Objetivo 20X. **B)** Cuantificación de los resultados, que se expresaron como el porcentaje (%) de células TUNEL positivas. Los datos representan el promedio \pm SD de tres determinaciones independientes realizadas. *p < 0.05 respecto a la condición control; # p < 0.05 respecto a la condición H₂O₂,

Con la intención de encontrar una relación entre la conexión recién descrita entre ambas quinasas y p66Shc, las células fueron incubadas con el inhibidor de JNK antes de la adición del agente apoptótico, y luego ensayadas para la visualización de p-p66Shc. Los resultados obtenidos por *Western blotting* avalan el hecho de que JNK se encuentra involucrada en la fosforilación de p66Shc. Sin embargo, cuando la PKC δ fue inhibida, la fosforilación de p66Shc no sufrió cambios significativos (Figura R15). Posteriormente, se evaluó si JNK, además de fosforilar a p66Shc, contribuía para su translocación a mitocondria ya evidenciada. Para ello, las células fueron tratadas con el inhibidor de JNK antes de la incubación con el agente apoptótico, seguido de fraccionamiento subcelular para obtener las fracciones mitocondrial y citosólica. Mediante ensayos de *Western blotting* se observó que la activación de JNK es fundamental para la translocación de p66Shc a la mitocondria (Figura R16).

Teniendo en cuenta que la hormona inhibió la translocación de p66Shc a la mitocondria, mediada por JNK, se evaluó la posible relación entre el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) y p66Shc, para determinar si el efecto protector de la hormona sobre el $\Delta\psi_m$ involucraba a p66Shc. Para ello, las células fueron tratadas con TMRM (20 nM, 30 min, 37°C) y luego fueron incubadas con SP600125, antes de la adición del agente apoptótico (1h). El potencial de membrana mitocondrial fue estimado analizando los niveles de fluorescencia del TMRM por microscopía de fluorescencia, expresándolos como % de intensidad de fluorescencia del TMRM respecto al control. Se observó que el inductor de apoptosis conduce a una disminución en el porcentaje de intensidad de fluorescencia del TMRM, indicativo de pérdida del $\Delta\psi_m$, que fue restablecido por el pretratamiento con SP600125, el inhibidor de JNK, corroborado por un aumento en el % de intensidad de fluorescencia del TMRM (de 36,54 +/- 9,6% (H_2O_2) a 151,39 +/- 3,1%) (Figura R27). Este resultado sugiere que JNK al estar involucrada en la pérdida del $\Delta\psi_m$ también podría estar modulando un evento relacionado: la apertura sostenida en el tiempo del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (MPTP), ya que la translocación mitocondrial de p66Shc requiere la activación de JNK y la fosforilación de p66Shc se ha relacionado con la apertura prolongada del MPTP. Estos resultados sugieren que p66Shc, activada por JNK, modularía la apertura del MPTP en respuesta al H_2O_2 en células musculares esqueléticas.

A)



B)

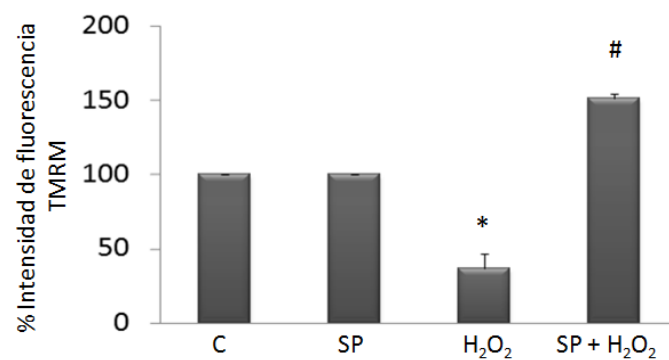


Figura R27. El H₂O₂ produce la pérdida del $\Delta\psi_m$ a través de JNK en células C2C12. Las células tratadas con TMRM (20 nM, 30 min, 37°C) fueron incubadas con medio sin suero en presencia o ausencia (C) de H₂O₂ (0,5 mM, 1h) luego del pretratamiento durante 1h con SP600125 10 μ M (SP + H₂O₂) o vehículo. **A)** Imágenes representativas de cada condición ensayada. Objetivo 20x. **B)** Cuantificación de los resultados, que se expresaron como el porcentaje (%) de intensidad de fluorescencia proveniente del TMRM. Los datos representan el promedio \pm SD de tres determinaciones independientes realizadas. *p < 0.05 respecto a la condición control; # p < 0.05 respecto a la condición H₂O₂.

Capítulo 2

Efectos del 17β -estradiol
sobre funciones mitocondriales
y enzimas antioxidantes
en la apoptosis inducida por H_2O_2

Capítulo 2: Efectos del 17 β -estradiol sobre funciones mitocondriales y enzimas antioxidantes en la apoptosis inducida por peróxido de hidrógeno

Como ya se mencionó, sumado a su localización citosólica-nuclear, los ER también han sido encontrados en mitocondrias de células de músculo esquelético (Milanesi et al., 2008). Debido al papel central que cumple dicha organela en la apoptosis, es posible que la hormona E₂ presente, entonces, un rol regulatorio sobre dicho proceso, afectando diferentes funciones mitocondriales. En concierto con esta posibilidad, se ha observado que la hormona es capaz de modular la actividad de enzimas antioxidantes, algunas de ellas de localización mitocondrial (Stirone et al., 2005).

Para estudiar el efecto protector, a nivel mitocondrial, mediado por el E₂ frente a la apoptosis, se decidieron evaluar parámetros afectados durante el proceso apoptótico, tales como: la función del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (MPTP), la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y su relación con la proteína proapoptótica Bax. Además, se evaluó el efecto de la hormona en la modulación de diferentes enzimas antioxidantes: manganeso superóxido dismutasa (MnSOD), glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT).

Finalmente, debido a que se ha evidenciado que un tipo particular de comunicación intercelular que involucra estructuras de membrana conocidas como TNTs, que generalmente se presenta ante condiciones de estrés celular (Wang y Gerdes, 2015), puede mediar la transferencia de mitocondrias, se decidió estudiar la existencia/formación de estas estructuras, el rol de las mismas y sus efectos sobre el destino celular final en este sistema experimental, en respuesta a la inducción de apoptosis con H₂O₂ y su regulación por E₂.

2.1. El 17 β -estradiol previene la apertura del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial

Como se detalló en la Introducción de esta tesis, la liberación de citocromo c es un evento esencial a partir del cual irreversiblemente sucederá la apoptosis. Este suceso requiere de la pérdida de integridad y/o del incremento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa. Si bien distintos mecanismos han sido propuestos para explicar este evento, aún no se han establecido claramente las bases moleculares del mismo. Tanto miembros de la familia Bcl-2 como el MPTP se han postulado como posibles intervinientes en este suceso (Revisado en Adams, 2003; Revisado en Gulbins et al., 2003).

Para evaluar si el E₂ era capaz de modular la apertura del MPTP se utilizó la técnica de la calceína-AM con el agregado de CoCl₂ (Petronilli et al., 1999). Con este fin, las células cargadas con calceína-AM/CoCl₂ fueron incubadas durante diferentes períodos de tiempo (30 min, 1h, 3h y 4h) con H₂O₂ (0,5 mM). Mediante citometría de flujo se demostró que la apertura del MPTP es evidenciable a partir de los 30 min de tratamiento con H₂O₂ y continúa hasta las 4h de tratamiento, momento en el que el descenso del porcentaje de células que presentan fluorescencia verde, indicativo de apertura sostenida del MPTP, es del 61% (Control vs H₂O₂ 4h) (Figura R28).

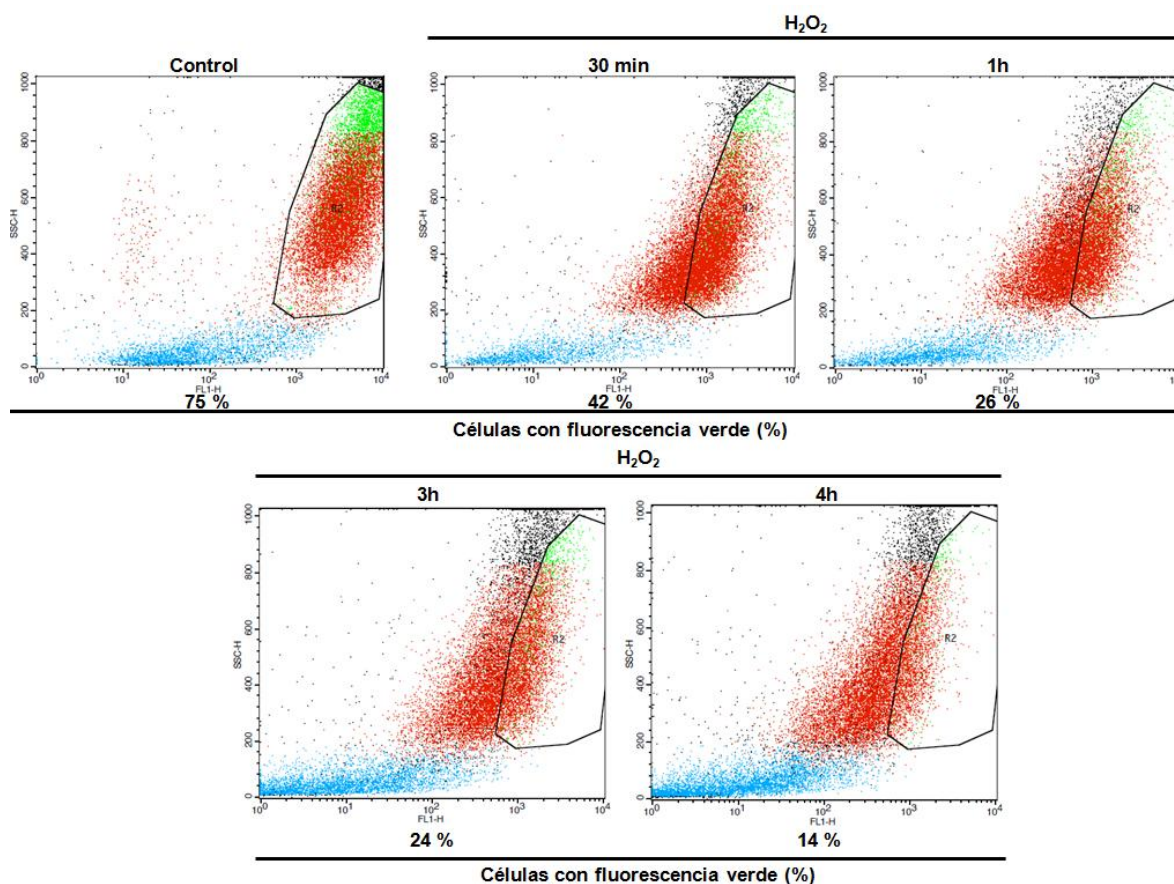
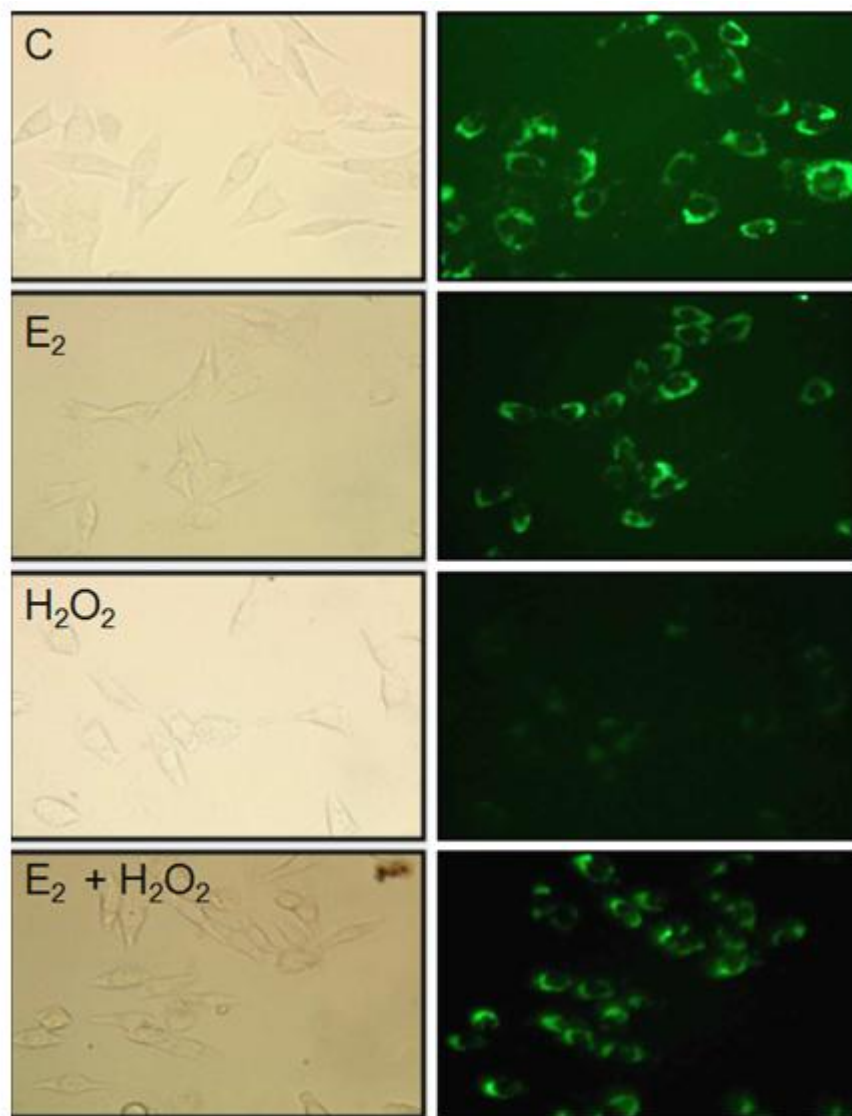


Figura R28. El H₂O₂ induce la apertura sostenida del MPTP en células C2C12. Las células tratadas con calceína-AM/CoCl₂ fueron incubadas con H₂O₂ (0,5 mM) durante los períodos de tiempo indicados (30 min, 1h, 3h y 4h) y, luego, analizadas por citometría de flujo (10000 eventos/condición). Los datos (%) representan el promedio de tres determinaciones independientes. FL-1: canal en el que se detecta fluorescencia verde.

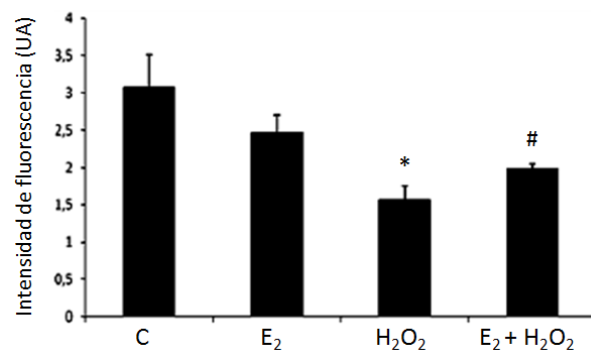
Luego, las células fueron tratadas con calceína-AM/CoCl₂ e incubadas con el vehículo de la hormona isopropanol (C), la hormona (E₂), el agente apoptótico (H₂O₂ 4h) o E₂ antes de la inducción de apoptosis con H₂O₂ (E₂ + H₂O₂). Por microscopía de fluorescencia se observó que el tratamiento con H₂O₂ conduce a una disminución significativa de la intensidad de fluorescencia, poniendo de manifiesto la apertura sostenida del MPTP. El pretratamiento con el E₂ revirtió este efecto inducido por el agente apoptótico, mostrando un rol protector de la hormona sobre la apertura de este poro (Figura R29 A-B).

Estos datos se confirmaron por citometría de flujo. El tratamiento con H_2O_2 llevó a una reducción en la calceína mitocondrial, evidenciado por una disminución de la señal en FL-1 (fluorescencia verde), comparado con el control ($87,5 \pm 12,6$ vs $28 \pm 10,2$ % células con fluorescencia verde, respectivamente). Sin embargo, cuando las células fueron pretratadas con E_2 y luego se las indujo a apoptosis, el porcentaje de células con fluorescencia verde no presentó diferencias significativas con el control ($79 \pm 17\%$ vs $87,5 \pm 12,6\%$) (Figura R29 C).

A)



B)



C)

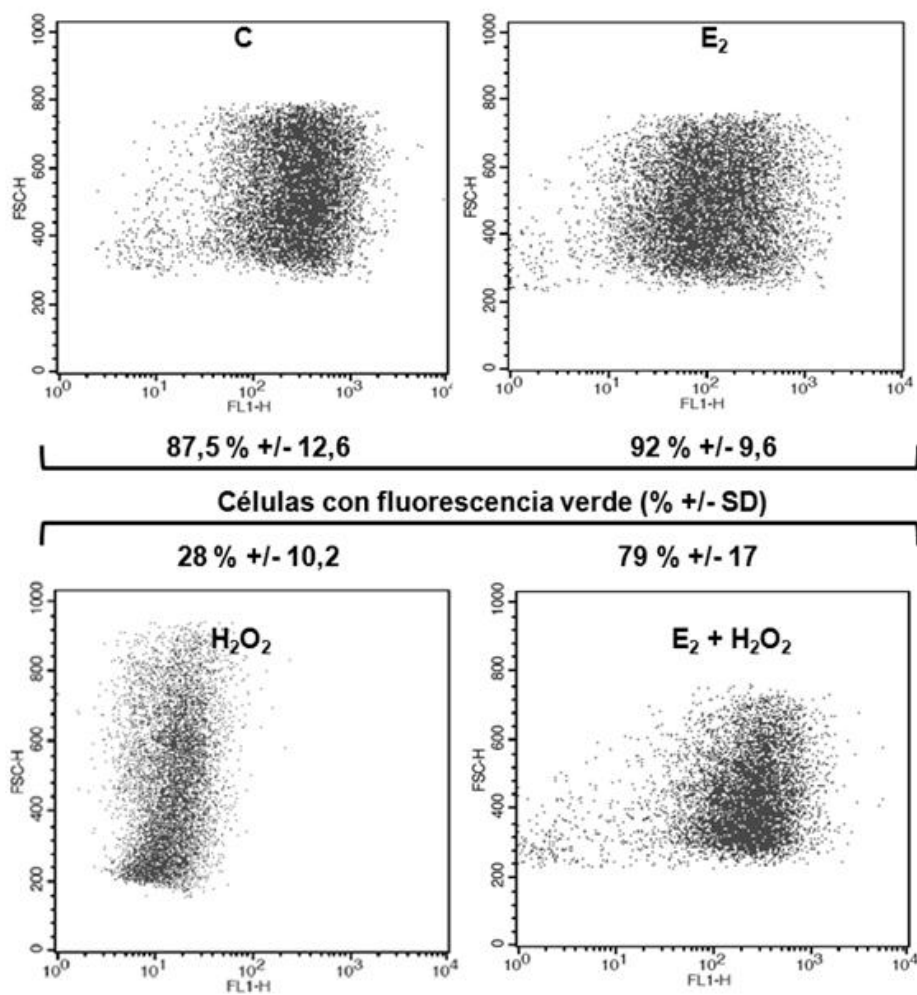


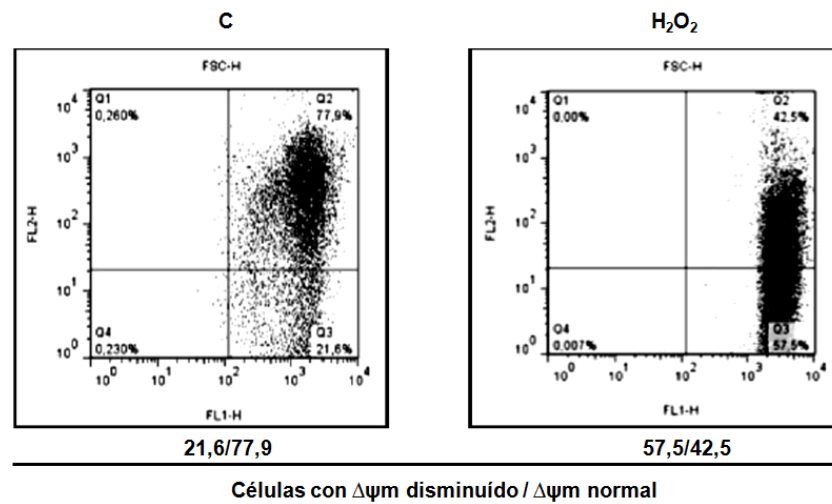
Figura R29. El 17β -estradiol previene la apertura del MPTP inducida por el H_2O_2 en células C2C12. Las células tratadas con calceína-AM/ $CoCl_2$ fueron

incubadas con el vehículo de la hormona, E_2 (10^{-8} M, 1h), H_2O_2 (0,5 mM, 4h) o E_2 (10^{-8} M, 1h) antes de la inducción de apoptosis con H_2O_2 (0,5 mM, 4h). **A)** Imágenes representativas del análisis de la apertura del MPTP mediante microscopía de fluorescencia. **B)** Cuantificación de la fluorescencia proveniente de la calceína mitocondrial (microscopía de fluorescencia). **C)** Imágenes representativas del análisis de la apertura del MPTP mediante citometría de flujo (10000 eventos/condición). El tratamiento con H_2O_2 induce una disminución significativa de la fluorescencia derivada de la calceína mitocondrial, mientras que el pretratamiento con E_2 conduce a la recuperación de la señal fluorescente mitocondrial. La cuantificación de la fluorescencia fue realizada utilizando el programa *ImageJ* 1.46. Los datos (% o unidades arbitrarias) representan el promedio \pm SD de tres determinaciones independientes realizadas. FL-1: canal en el que se detecta fluorescencia verde. * $p < 0.05$ respecto a la condición control; # $p < 0.05$ respecto a la condición H_2O_2 .

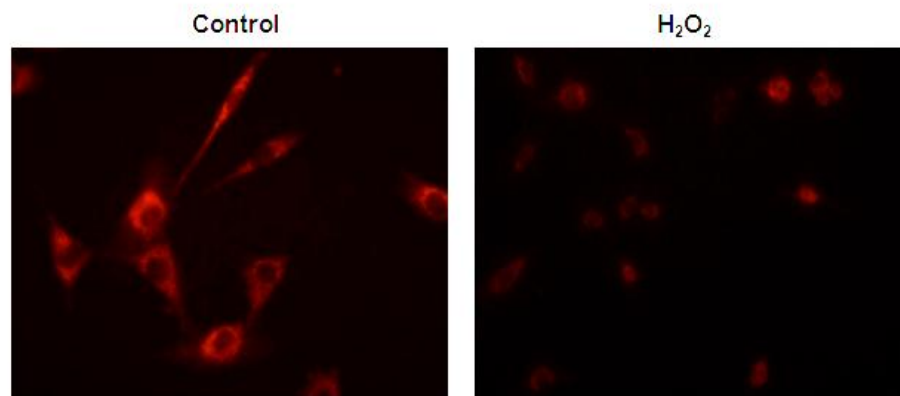
2.2. El 17 β -estradiol previene la pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

En la Introducción se describió que la apertura del MPTP puede asociarse a la pérdida del $\Delta\psi_m$ (Marchetti et al., 1996), por ello se evaluó si esta asociación se presentaba en este sistema experimental. La relación entre los mencionados eventos se analizó empleando el colorante catiónico JC-1 y citometría de flujo (Metodología). Las células C2C12 fueron incubadas con el colorante catiónico y luego fueron tratadas con H_2O_2 durante 4h. La Figura R30A muestra una pronunciada pérdida del $\Delta\psi_m$ a las 4h de tratamiento con H_2O_2 (21,6% vs 57,5%). Estos resultados fueron confirmados mediante la utilización del colorante TMRM y el posterior análisis por microscopía de fluorescencia. Como se describió en Metodología, el TMRM se incorpora en las mitocondrias con potencial de membrana conservado. Las células vivas fueron tratadas con el colorante catiónico TMRM (20 nM, 30 min, 37°C), para luego recibir el tratamiento con H_2O_2 durante 4h. Los resultados de este ensayo (Figura R30B-C) fueron comparables a los obtenidos por citometría de flujo.

A)



B)



C)

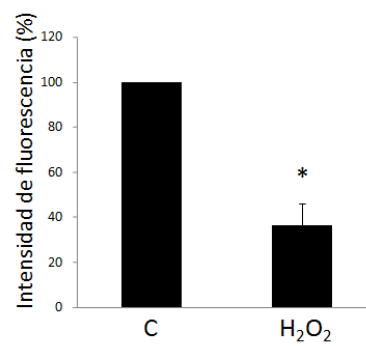
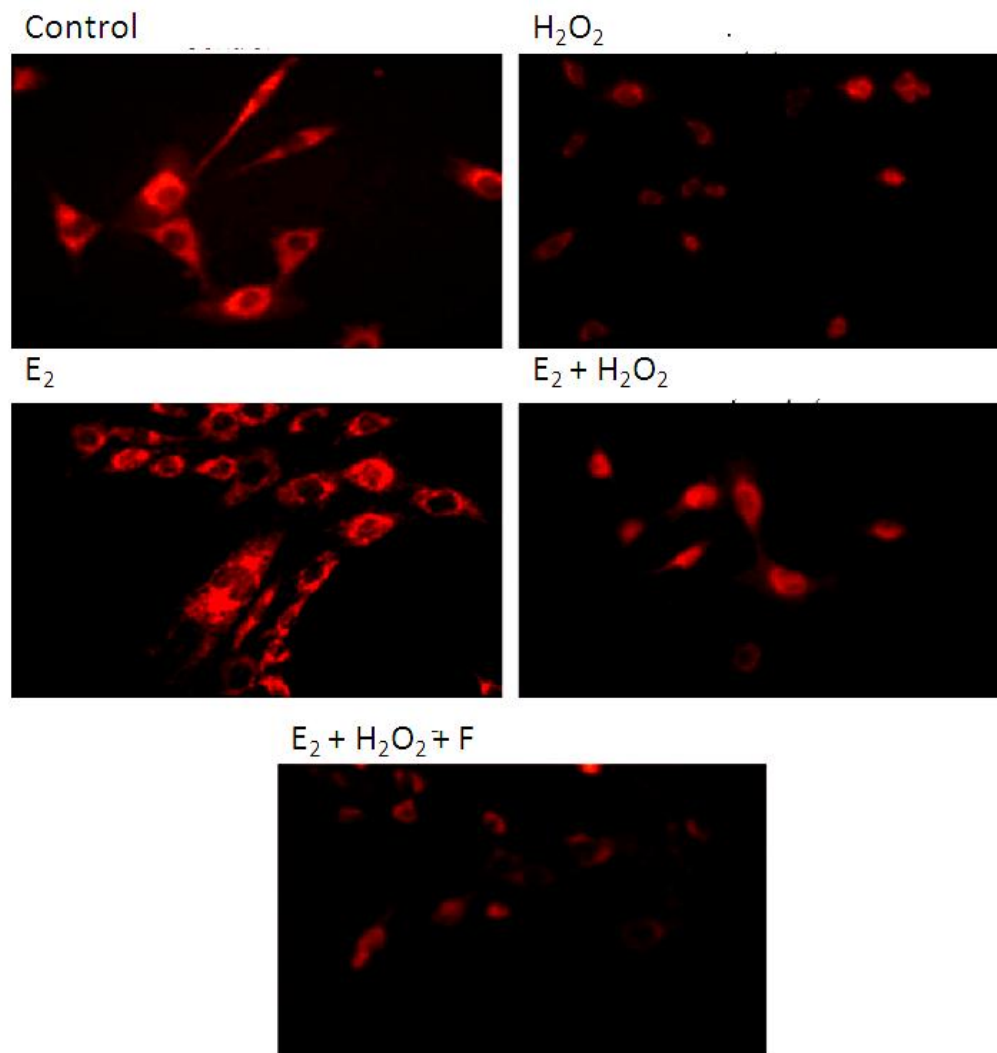


Figura R30. El H_2O_2 induce la pérdida del potencial de membrana mitocondrial en células C2C12. Las células tratadas con el colorante JC-1 o

con TMRM fueron incubadas con H₂O₂ (0,5 mM, 4h) y luego analizadas mediante citometría de flujo (10000 eventos/condición) y microscopía de fluorescencia, respectivamente. **A)** Imágenes representativas del análisis de la pérdida del $\Delta\psi_m$ por citometría de flujo. **B)** Imágenes representativas del análisis de la pérdida del $\Delta\psi_m$ por microscopía de fluorescencia. **C)** Cuantificación de la fluorescencia proveniente del TMRM (microscopía de fluorescencia). La cuantificación de la fluorescencia fue realizada utilizando el programa *ImageJ* 1.46. FL-1: canal en el que se detecta fluorescencia verde. FL-2: canal en el que se detecta fluorescencia roja. Los datos (%) representan el promedio +/- SD de tres determinaciones independientes realizadas. *p<0.05 respecto a la condición control.

A continuación, se estudió si la hormona podía revertir la pérdida del $\Delta\psi_m$ inducida por el agente apoptótico. Para ello, las células vivas fueron tratadas con el colorante catiónico TMRM (20 nM, 30 min, 37°C), para luego recibir los distintos tratamientos: el vehículo de la hormona (C), E₂, H₂O₂, E₂ antes de la adición de H₂O₂ (E₂ + H₂O₂), o fulvestrant y E₂ antes de la incubación con H₂O₂ (E₂ + H₂O₂ + F). Posteriormente, se analizaron por microscopía de fluorescencia. La pérdida del $\Delta\psi_m$ fue estimada cuantificando la intensidad de fluorescencia en cada condición, mediante la utilización del programa de análisis de imágenes *ImageJ*. Los resultados se expresaron como porcentaje de intensidad de fluorescencia respecto al control. Se observó que el H₂O₂ condujo a una disminución en el % de intensidad de fluorescencia del TMRM del 63,5% mientras que el pretratamiento con la hormona restauró la intensidad de fluorescencia a niveles similares a los del control, demostrando que el E₂ es capaz de prevenir la pérdida del $\Delta\psi_m$. La incubación con el inhibidor fulvestrant y E₂ previo a la inducción de apoptosis arrojó una disminución de la intensidad de fluorescencia del TMRM similar a la de la condición H₂O₂ (42,56% vs 36,54%, respectivamente) sugiriendo que los ER están involucrados en esta respuesta (Figura R31).

A)



B)

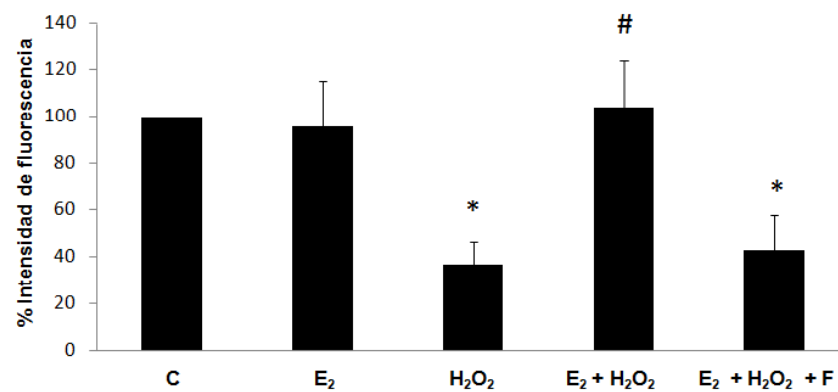


Figura R31. El 17 β -estradiol previene la pérdida del $\Delta\psi_m$ inducida por el H₂O₂ en células C2C12. Las células tratadas con el colorante TMRM fueron incubadas

con el vehículo de la hormona, E₂ (10⁻⁸ M, 1h), H₂O₂ (0,5 mM, 4h), E₂ (10⁻⁸ M, 1h) antes de la inducción de apoptosis con H₂O₂ (0,5 mM, 4h), o fulvestrant (1 μM, 1h) y E₂ (10⁻⁸ M, 1h) antes de la inducción de apoptosis con H₂O₂ (0,5 mM, 4h), como se describió en Metodología, y luego analizadas mediante microscopía de fluorescencia. **A)** Imágenes representativas del análisis de la pérdida del Δψ_m por microscopía de fluorescencia. **C)** Cuantificación de la fluorescencia proveniente del TMRM. La cuantificación de la fluorescencia fue realizada utilizando el programa *ImageJ* 1.46. Los datos (%) representan el promedio +/- SD de tres determinaciones independientes realizadas. *p <0.05 respecto a la condición control. #p <0.05 respecto a la condición H₂O₂.

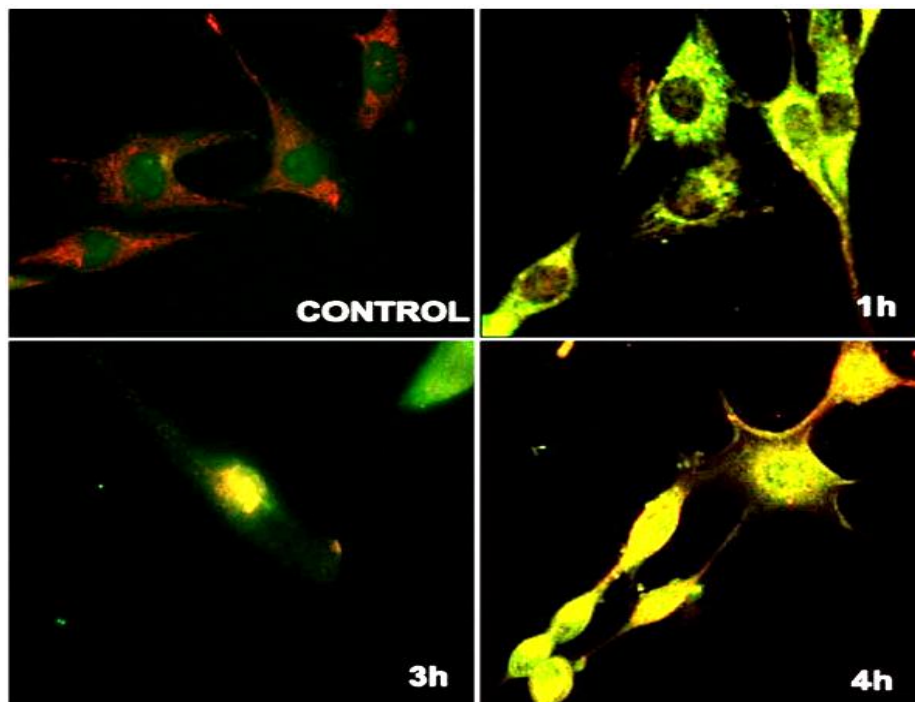
2.3. El 17β-estradiol inhibe la translocación de la proteína Bax hacia la mitocondria

En condiciones normales, la proteína de la familia Bcl-2, Bax, se encuentra en su forma monomérica en el citosol o débilmente unida a la membrana mitocondrial externa. Luego de la inducción apoptótica, se ha evidenciado que esta proteína proapoptótica es capaz de cambiar su localización e insertarse en la membrana mitocondrial.

Con el fin de correlacionar los resultados descritos anteriormente con la participación de Bax, las células fueron incubadas con H₂O₂ durante diferentes períodos de tiempo (1h, 3h y 4h). En ensayos de inmunocitoquímica utilizando un anticuerpo específico dirigido contra Bax (fluorescencia verde) y el colorante *Mitotracker Red* (fluorescencia roja) como marcador mitocondrial, se observó que el H₂O₂ conduce a la translocación de Bax desde el citosol a las mitocondrias (fluorescencia amarilla, por superposición de las fluorescencias verde y roja), que es evidenciable luego de 3h de la adición del agente apoptótico. La condición control mostró fluorescencia verde, homogéneamente dispersa en el citoplasma, indicando la presencia de Bax en este compartimento. Además, los resultados obtenidos muestran que la translocación observada de esta proteína proapoptótica se da de manera tiempo-dependiente. Asimismo, para corroborar estos resultados, se realizaron fraccionamientos subcelulares de células expuestas a las mismas condiciones experimentales y se obtuvieron las fracciones enriquecidas en citosol y mitocondrias por centrifugación diferencial. Estas fracciones fueron utilizadas en

ensayos de *Western blotting*, empleando anticuerpos específicos dirigidos contra Bax y citocromo c oxidasa-IV, este último utilizado como marcador de fracción mitocondrial (Figura R32).

A)



B)

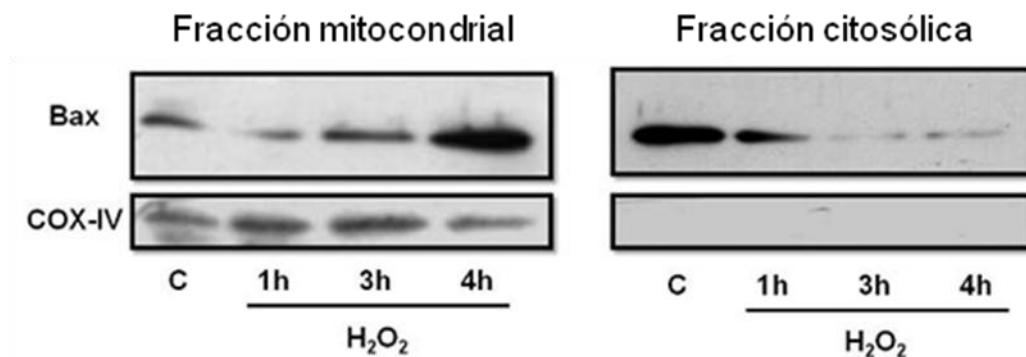
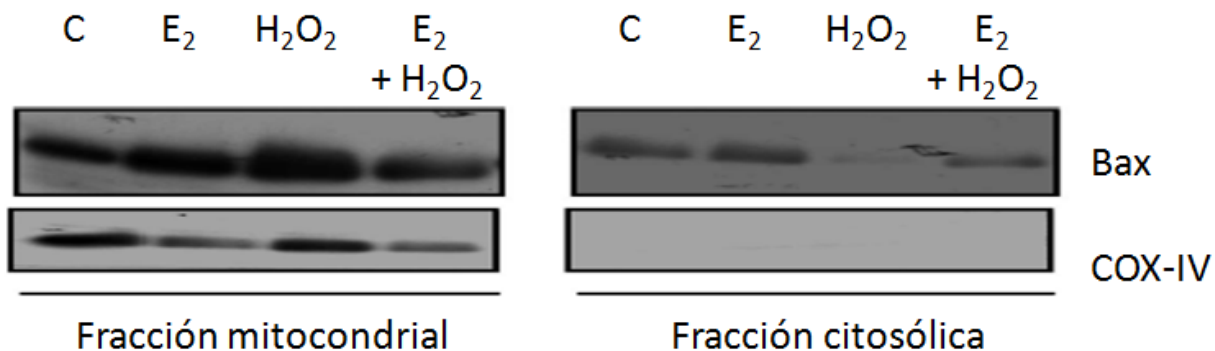


Figura R32. El H₂O₂ promueve la translocación de Bax a mitocondrias en células C2C12. Las células fueron incubadas con H₂O₂ (0,5 mM) por diferentes períodos de tiempo (1h, 3h y 4h). **A)** Imágenes representativas obtenidas luego del tratamiento con *Mitotracker Red* (fluorescencia roja) y anticuerpo anti-Bax seguido de la incubación con un anticuerpo secundario conjugado a fluorocromo (fluorescencia verde). En la condición control, Bax se visualiza homogéneamente

distribuida en el citosol mientras que el tratamiento con H_2O_2 induce la translocación de esta proteína proapoptótica hacia la mitocondria (fluorescencia amarilla). **B)** Los lisados proteicos adquiridos fueron empleados para la obtención de las fracciones mitocondriales y citosólicas mediante centrifugación diferencial con las que, luego, se realizaron ensayos de *Western blotting* usando anticuerpo específico anti-Bax. Como marcador mitocondrial se empleó un anticuerpo dirigido contra la proteína COX-IV. Las imágenes son representativas de tres determinaciones independientes realizadas.

Para evaluar si la hormona esteroidea era capaz de ejercer un efecto protector frente al agente apoptótico, inhibiendo la translocación de Bax evidenciada, las células fueron incubadas con el colorante *Mitotracker Red* (fluorescencia roja) y tratadas con el vehículo de la hormona (C), E_2 , H_2O_2 (4h) o E_2 antes de la inducción de apoptosis ($E_2 + H_2O_2$). Se realizaron ensayos de inmunocitoquímica y se observó que en presencia de la hormona no se produjo la translocación de Bax a mitocondria inducida por el H_2O_2 , demostrada por la visualización de fluorescencia verde difusamente distribuida en el citosol similar a la de la condición control. Estos resultados también fueron corroborados realizando ensayos de *Western blotting* con fracciones enriquecidas en citosol y mitocondrias obtenidas por centrifugación diferencial de células expuestas a las mismas condiciones experimentales empleando anticuerpos específicos dirigidos contra Bax y contra citocromo c oxidasa-IV (COX IV) utilizado como marcador de fracción mitocondrial (Figura R33).

A)



B)

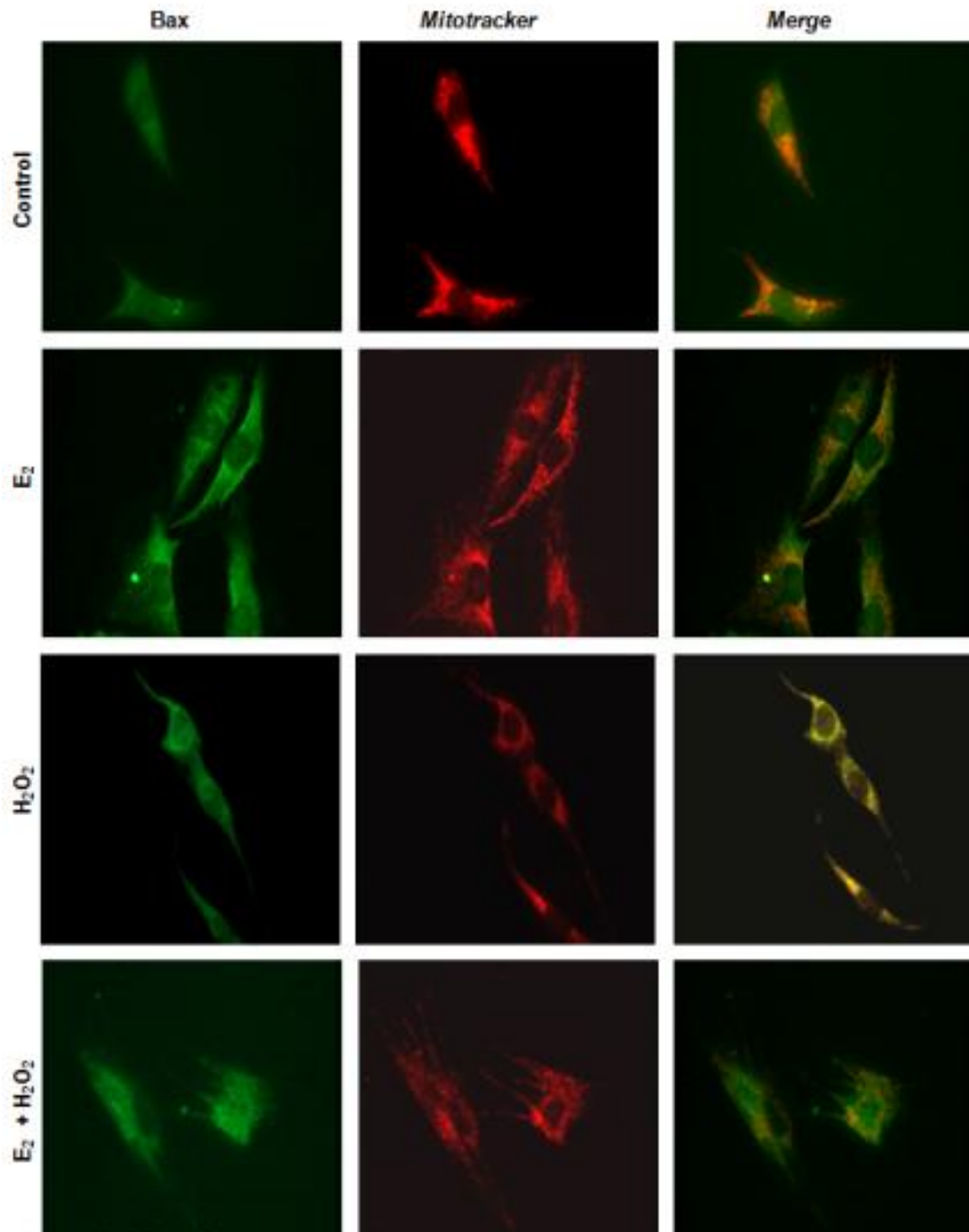


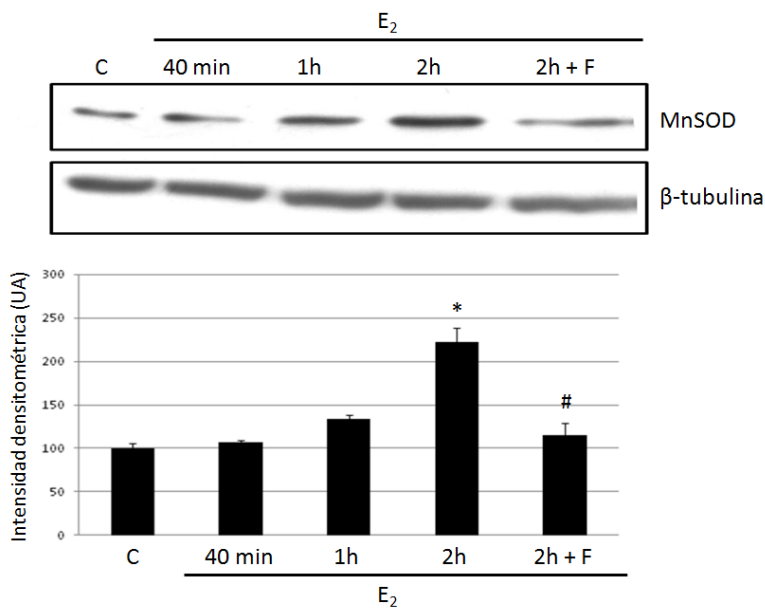
Figura R33. El 17 β -estradiol impide la translocación de Bax inducida por el H₂O₂ en células C2C12. Las células fueron incubadas con el vehículo de la

hormona (Control), E₂ (10⁻⁸ M), H₂O₂ (0,5 mM) o E₂ antes del agregado de H₂O₂. **A)** Los lisados proteicos adquiridos fueron empleados para la obtención de las fracciones mitocondriales y citosólicas mediante centrifugación diferencial con las que, luego, se realizaron ensayos de *Western blotting* usando un anticuerpo específico anti-Bax. Como marcador mitocondrial se empleó un anticuerpo dirigido contra la proteína COX-IV. **B)** Imágenes representativas obtenidas luego del tratamiento con *Mitotracker Red* (fluorescencia roja) y anticuerpo anti-Bax seguido de la incubación con un anticuerpo secundario conjugado a fluorocromo (fluorescencia verde). Las imágenes son representativas de tres determinaciones independientes realizadas.

2.4. El 17β-estradiol modula la actividad y expresión de la enzima manganeso superóxido dismutasa (MnSOD)

Como fue mencionado al inicio de este capítulo, E₂ es capaz de regular la actividad de enzimas antioxidantes (Stirone et al., 2005). Es por ello que con el objeto de evaluar si la hormona ejercía su efecto antiapoptótico regulando a la enzima antioxidante mitocondrial MnSOD, se analizaron los niveles de expresión proteica por *Western blotting* y la actividad enzimática de la misma mediante un ensayo colorimétrico. Las células fueron incubadas durante diferentes períodos de tiempo con la hormona (40 min, 1h y 2h), observándose un aumento significativo en su expresión proteica a las 2h de tratamiento (122 +/- 6,8% de incremento sobre el control). En presencia del antagonista del receptor de estrógenos, fulvestrant, la hormona fue incapaz de producir este incremento, sugiriendo la participación del ER en dicho efecto (Figura R34A). Asimismo, para evaluar el rol de la hormona sobre la actividad enzimática de la MnSOD, se obtuvieron fracciones enriquecidas en mitocondrias por centrifugación diferencial de células incubadas con E₂ (40 min, 1h y 2h) y se determinó la actividad de la enzima como se describió en Metodología. Se observó un aumento en la actividad de la enzima a la hora y 2h de tratamiento con la hormona (45 +/- 1,7% y 48 +/- 1,1% sobre el control, respectivamente). La incubación con fulvestrant antes del agregado de la hormona previno este aumento (Figura R34 B).

A)



B)

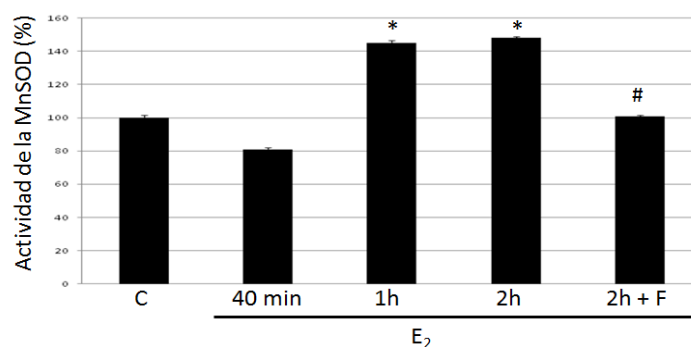


Figura R34. El 17 β -estradiol incrementa la actividad y expresi3n de la enzima MnSOD en c3lulas C2C12. Las c3lulas fueron incubadas con el veh3culo de la hormona (C), E₂ (10⁻⁸M) por diferentes per3odos de tiempo (40 min, 1h, 2h) o fulvestrant (1 μ M, 1h) previo al agregado de E₂ (10⁻⁸M, 2h). **A)** Los lisados proteicos adquiridos fueron empleados en ensayos de *Western blotting* usando un anticuerpo espec3fico anti-MnSOD y un anticuerpo dirigido contra la prote3na β -tubulina como control de siembra (Panel superior). Cuantificaci3n de la expresi3n de MnSOD, utilizando el programa *ImageJ* 1.46 (Panel inferior). **B)** Cuantificaci3n de la actividad enzim3tica de la MnSOD en fracciones mitocondriales. Los datos representan el promedio \pm SD de tres determinaciones independientes realizadas. *p <0.05 respecto a la condici3n control. #p <0.05 respecto a la condici3n E₂ (2h).

Asimismo, se evidenció *por Western blotting* que el H₂O₂ disminuyó la expresión de la MnSOD (61 +/- 4,6% respecto al control) y que el pretratamiento con E₂ previo a la adición del agente apoptótico, revirtió este efecto (Figura R35).

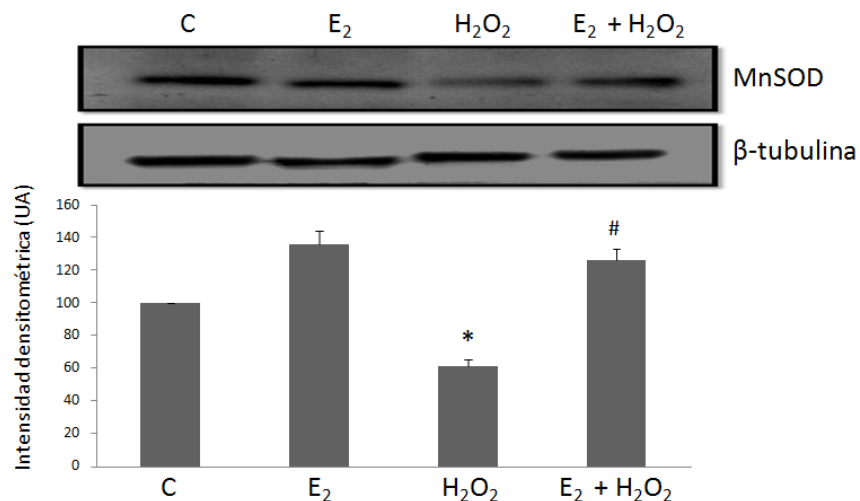


Figura R35. El 17 β -estradiol restituye la expresión de MnSOD en células C2C12 tratadas con H₂O₂. Las células fueron incubadas con el vehículo de la hormona (C), E₂ (10⁻⁸M, 1h), H₂O₂ (0,5 mM, 4h) o E₂ (10⁻⁸M, 1h) previo al agregado de H₂O₂ (0,5 mM, 4h). Los lisados proteicos adquiridos fueron empleados en ensayos de *Western blotting* usando un anticuerpo específico anti-MnSOD y un anticuerpo dirigido contra la proteína β -tubulina como control de siembra. Se muestra su correspondiente cuantificación utilizando el programa *ImageJ* 1.46. Los datos representan el promedio +/- SD de tres determinaciones independientes realizadas. *p <0.05 respecto a la condición control. #p <0.05 respecto a la condición H₂O₂.

2.5. El 17 β -estradiol modula la actividad de la enzima catalasa (CAT)

Como se mencionó en la Introducción, otra enzima que cumple un rol antioxidante importante es la catalasa. Con el fin de evaluar si la hormona regula a esta enzima ejerciendo así su efecto protector, se realizaron ensayos, según se describió en Metodología, para determinar su actividad. Para ello, las células fueron incubadas con el vehículo de la hormona (C) o E₂ durante diferentes períodos de tiempo (15 min, 30 min, 1h y 2h), observándose un aumento significativo de la actividad a partir de los 15 min de tratamiento (199,96 +/- 36,7% sobre el control). Este efecto se mantuvo hasta la condición de 1h para luego

disminuir hasta niveles comparables a los del control a las 2h de tratamiento. La adición del antagonista del receptor de estrógenos (ER) fulvestrant (1 μ M) antes de la incubación con E₂ (15 min, 30 min y 1h) llevó a la disminución de este efecto, sugiriendo la participación de los ER (Figura R36).

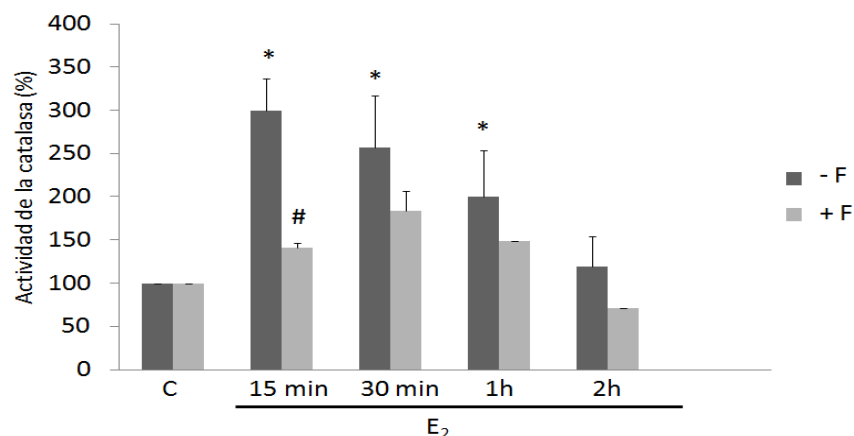


Figura R36. El 17 β -estradiol mediante los ERs modula la actividad de la enzima catalasa en células C2C12. Las células fueron incubadas con el vehículo de la hormona (C), E₂ (10⁻⁸ M) durante diferentes períodos de tiempo (15 min, 30 min, 1h y 2h), o fulvestrant (1 μ M, 1h) previo al tratamiento con E₂ (10⁻⁸ M) durante los mismos períodos y, luego, se determinó la actividad de la catalasa. Los datos representan el promedio \pm SD de tres determinaciones independientes realizadas. *p<0.05 respecto a la condición control. #p<0.05 respecto a la condición E₂ (15 min).

Además, se evidenció que el H₂O₂ disminuyó la actividad de la catalasa a los 15 min, 30 min y 1 h de tratamiento (48,21 \pm 18,85, 55,27 \pm 7,92 y 49,64 \pm 22,73 % respecto al control, respectivamente), mientras que en períodos más avanzados del proceso apoptótico (3h y 4h de H₂O₂) no se observaron diferencias significativas con la condición control. Para evaluar el efecto protector de la hormona, se realizó el pretratamiento de las células C2C12 con E₂ (10⁻⁸ M) por un período de 15 min, que ya se demostró que induce un aumento significativo en la actividad de esta enzima, previo a la adición del agente apoptótico. Se observó que la preincubación con la hormona revirtió el efecto del H₂O₂ sólo en los períodos de 15 min y 30 min de tratamiento con H₂O₂, no así a la hora de tratamiento. Para evaluar la intervención del receptor de estrógenos (ER), las

células fueron tratadas con fulvestrant (1 μM , 1h) o el antagonista del ER α , MPP (100 nM, 1h) junto con E $_2$ (10^{-8} M, 15 min) antes de la inducción de apoptosis. Se evidenció que la presencia del antagonista fulvestrant llevó a la disminución de este efecto, demostrando la participación de los ER. Así también, la presencia del antagonista del ER α condujo a resultados comparables a los obtenidos con fulvestrant, sugiriendo que esta isoforma del receptor es la principal implicada en el efecto protector aquí observado (Figura R37).

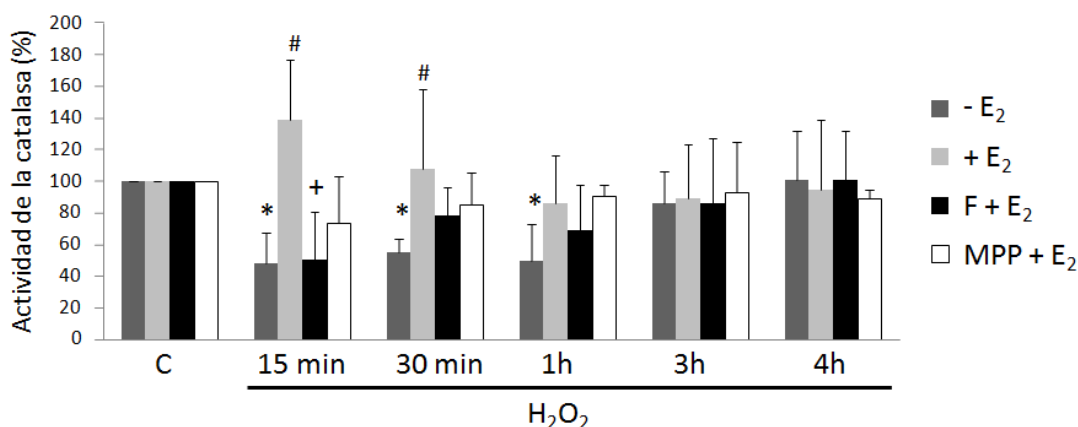


Figura R37. El 17 β -estradiol restablece la actividad de la catalasa en células C2C12 tratadas con H₂O₂ a través del ER α . Las células fueron incubadas con el vehículo de la hormona (C), fulvestrant (1 μM , 1h) o MPP (100 nM, 1h) junto con E₂ (10^{-8} M, 15 min), o E₂ (10^{-8} M, 15 min) previo al agregado de H₂O₂ (0,5 mM) durante los períodos de tiempo indicados y, luego, se determinó la actividad de la catalasa. Los datos representan el promedio \pm SD de tres determinaciones independientes realizadas. * $p < 0.05$ respecto a la condición control. # $p < 0.05$ respecto a la condición H₂O₂ correspondiente. + $p < 0.05$ respecto a la condición E₂ + H₂O₂ correspondiente.

2.6. El 17 β -estradiol modula la actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPx)

Para continuar con el análisis de los componentes celulares que actúan en la regulación de las ROS, interviniendo en el rol antiapoptótico de E₂, se estudió el efecto de la hormona sobre la enzima antioxidante glutatión peroxidasa. Se evaluaron los niveles de expresión proteica por *Western blotting* y los de actividad enzimática. Si bien no se observaron cambios en el nivel de expresión de la

proteína (Figura R38), no sucedió lo mismo al analizar la actividad de esta enzima antioxidante. Las células fueron incubadas con el vehículo de la hormona (C) o E₂ durante diferentes períodos de tiempo (5 min, 30 min y 1h), observándose un aumento significativo de la actividad en todos los tiempos ensayados (120,89 +/- 7,32, 118,86 +/- 15,59 y 92,85 +/- 25,00 % sobre el control). Como se observa en la Figura R39, los ensayos en presencia de fulvestrant, sugieren que este efecto de la hormona es mediado por ERs.

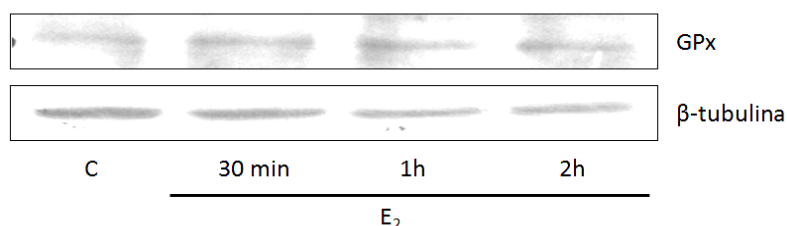


Figura R38. El 17 β -estradiol no afecta la expresión de la enzima glutatión peroxidasa en células C2C12. Las células fueron incubadas con el vehículo de la hormona (C) o E₂ (10⁻⁸ M) durante diferentes períodos de tiempo (30 min, 1h y 2h). Los lisados proteicos adquiridos fueron empleados en ensayos de *Western blotting* usando un anticuerpo específico anti-GPx y un anticuerpo dirigido contra la proteína β -tubulina como control de siembra. El *blot* es representativo de tres determinaciones independientes.

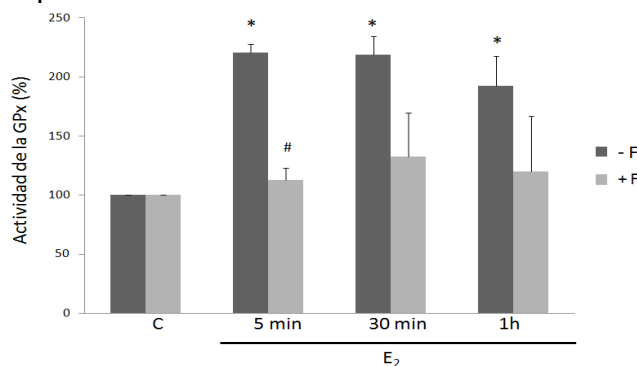


Figura R39. El 17 β -estradiol modula la actividad de la enzima glutatión peroxidasa en células C2C12. Las células fueron incubadas durante 1h en presencia (+ F) o ausencia (- F) de fulvestrant 1 μ M antes del tratamiento con el vehículo de la hormona (C) o la hormona 10⁻⁸ M (E₂) durante diferentes períodos de tiempo (5 min, 30 min y 1h) y, luego, se determinó la actividad de la glutatión peroxidasa. Los datos (%) representan el promedio +/- SD de tres determinaciones independientes realizadas. *p <0.05 respecto a la condición control. #p <0.05 respecto a la condición E₂ correspondiente.

De la misma forma que se procedió con las otras enzimas antioxidantes, se estudió si el H_2O_2 afectaba la actividad de la glutatión peroxidasa. Si bien se observó una disminución de la actividad de esta enzima en todos los períodos de tiempo ensayados (15 min, 30 min, 1h, 3h y 4h) respecto a la condición control, estas diferencias no fueron significativas. En el mismo sentido, aunque se observaron aumentos en la actividad de esta enzima cuando estaba presente la hormona previo a la adición del agente apoptótico, estos cambios no fueron estadísticamente significativos (Figura R40).

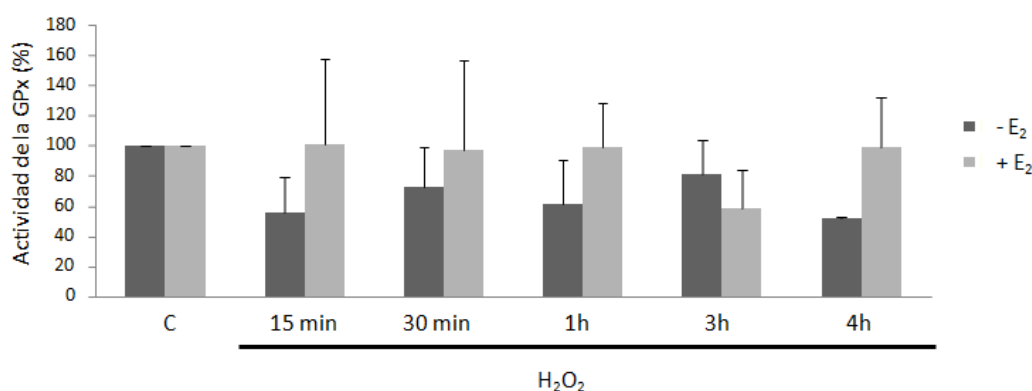


Figura R40. El 17 β -estradiol no modula la actividad de la glutatión peroxidasa en células C2C12 tratadas con H_2O_2 . Las células fueron incubadas durante 30 min en presencia (+ E₂) o ausencia (-E₂) de la hormona 10⁻⁸ M previo al agregado de H_2O_2 (0,5 mM) durante los períodos de tiempo indicados y, luego, se determinó la actividad de la glutatión peroxidasa. Los datos representan el promedio +/- SD de tres determinaciones independientes realizadas.

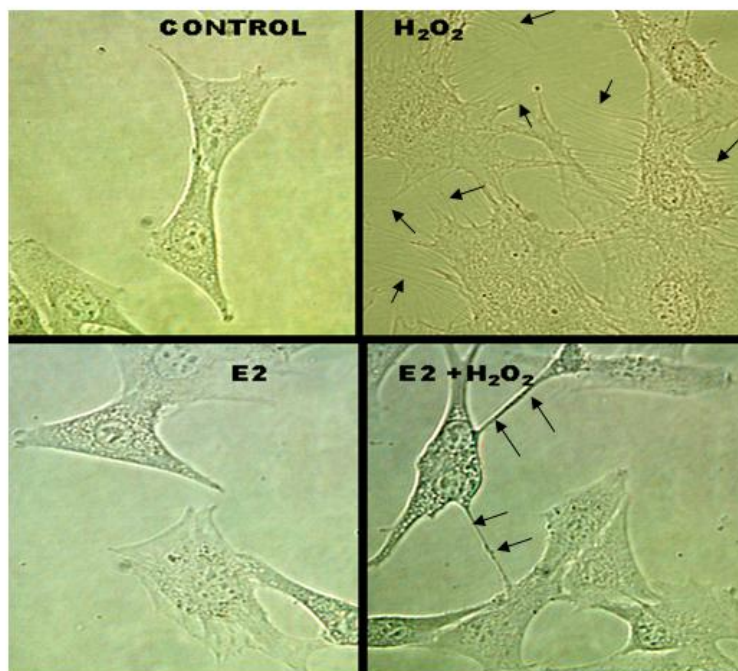
2.7. El 17 β -estradiol disminuye la formación de estructuras celulares tipo-tunneling nanotubes (TNT)

Como se describió en la Introducción de esta tesis, las células bajo condiciones de estrés, son ampliamente influenciadas por redes de comunicación intercelular, que pueden modular su destino celular final. En efecto, durante el proceso apoptótico se ha evidenciado la existencia de un tipo particular de comunicación entre las células en la que intervienen los *tunneling nanotubes* (TNT). Estos canales pueden mediar, por ejemplo, la transferencia de organelas

intracelulares y/o proteínas reguladoras de la apoptosis para alterar el destino de la célula receptora.

En primer lugar, con el fin de evaluar la formación de estructuras compatibles con TNT bajo condiciones apoptóticas, las células C2C12 fueron expuestas al agente apoptótico (H_2O_2 : 0,5 mM, 1h) y analizadas por microscopía óptica de campo claro. Se observó que el agregado del inductor de apoptosis conduce a un aumento significativo en el número de células que emiten estas estructuras (de 7,31% a 59,16%), así como también en el número de proyecciones por célula. Sin embargo, la preincubación con E_2 (10^{-8} M, 1h) antes del agregado de H_2O_2 (0,5 mM, 1h) disminuye significativamente la formación de estos canales tipo-TNT en la población celular (de 59,16 % a 17,36%) y a nivel celular individual (Figura R41).

A)



B)

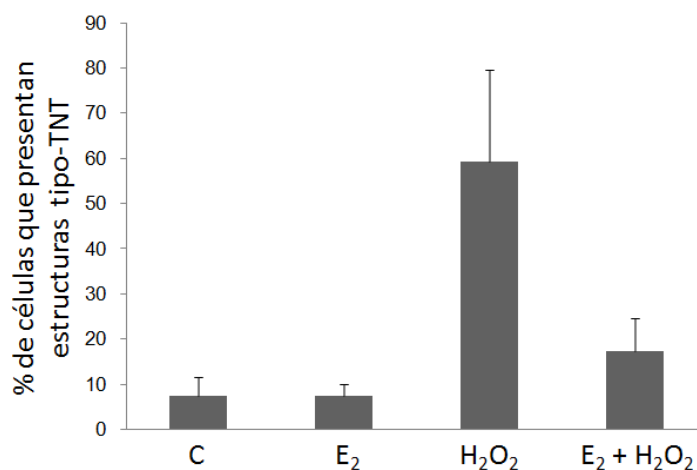


Figura R41. El 17 β -estradiol disminuye la formación de estructuras tipo-TNT en células C2C12. Las células fueron incubadas con el vehículo de la hormona (C), E₂ (10⁻⁸ M, 1h), H₂O₂ (0,5 mM, 1h), o E₂ (10⁻⁸ M, 1h) antes de la adición de H₂O₂ (0,5 mM, 1h). **A)** Imágenes representativas obtenidas por microscopía óptica de campo claro. **B)** Cuantificación del % de células que emiten proyecciones tipo-TNT. En cada condición experimental, se analizaron un total de 100 células. Los datos corresponden a tres determinaciones independientes.

Luego, se estudió la composición de estas estructuras tipo-TNT en las células C2C12. Si bien está descrito que los nanotubos se encuentran conformados por filamentos de actina, otras componentes del citoesqueleto también pueden formar parte de estas estructuras. En efecto, en algunos tipos celulares se ha evidenciado la presencia de microtúbulos en los nanotubos. Con este fin, se realizaron ensayos de inmunocitoquímica en los que las células C2C12, bajo condiciones apoptóticas, fueron tratadas con un anticuerpo específico dirigido contra actina (fluorescencia verde), para poner en evidencia la presencia de filamentos de actina, o con un anticuerpo específico dirigido contra tubulina (fluorescencia verde), para poner de manifiesto la presencia de microtúbulos en las proyecciones celulares tipo-TNT evidenciadas. Se observó fluorescencia derivada no solo de la presencia de actina sino también de tubulina, demostrando que ambos filamentos forman parte de estas estructuras tipo-TNT en las células C2C12 (Figura R42).

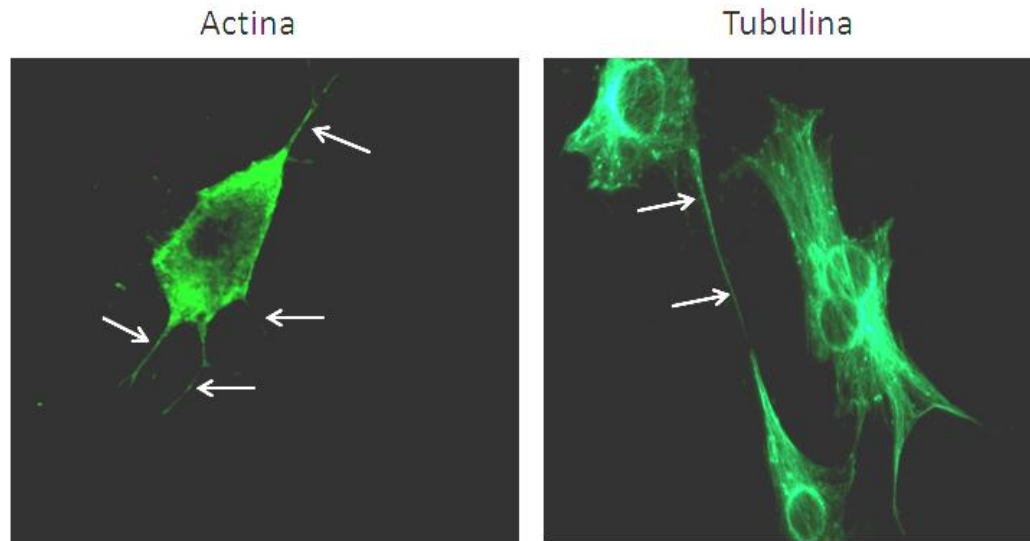


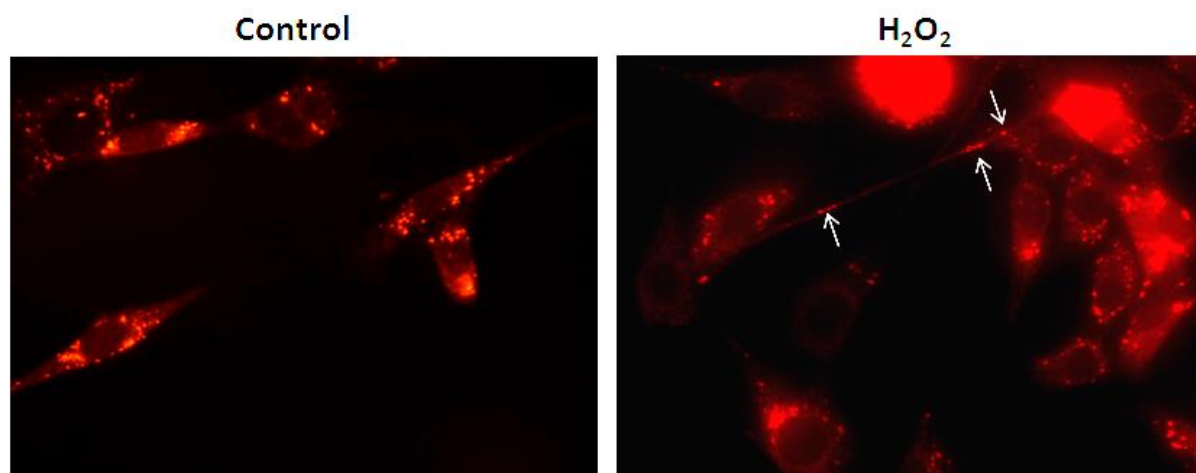
Figura R42. Las proyecciones celulares tipo-TNT están formadas por filamentos de actina y microtúbulos en células C2C12. Las células C2C12 fueron tratadas con H_2O_2 (0,5 mM). Se muestran imágenes representativas obtenidas luego del tratamiento con anticuerpo anti-actina (izquierda) o con anticuerpo anti-tubulina (derecha), cada uno de ellos seguido de la incubación con un anticuerpo secundario conjugado a fluorocromo (fluorescencia verde). Se indican mediante flechas la presencia de estructuras celulares tipo-TNT. Las imágenes son representativas de tres determinaciones independientes. Objetivo 63X

2.8. Las estructuras celulares tipo-TNT intervienen en el tráfico de mitocondrias

Con el fin de investigar el rol de estas estructuras que se forman en condiciones de estrés, se estudió si estas proyecciones celulares podían mediar la transferencia de mitocondrias entre células. Para ello, las células fueron tratadas con medio sin suero (Control) o el inductor de apoptosis, H_2O_2 (0,5 mM, 1h), incubadas con *Mitotracker Red* (1 μ M, 30 min) y analizadas por microscopía de fluorescencia. Mediante la utilización de esta marcación mitocondrial, se observó bajo condiciones apoptóticas la presencia de mitocondrias en estas estructuras, sugiriendo que se encontraban en tránsito desde una célula a otra célula receptora (indicado con flechas) (Figura R43 A). Con el fin de corroborar la transferencia de mitocondrias, se realizó otra experiencia en la que se utilizaron dos cultivos

celulares. Uno de ellos se trató con *Mitotracker Green* (100 nM, 30 min) y a la otra población celular se la incubó con *Mitotracker Red* (1 μ M, 30 min), para diferenciar las mitocondrias provenientes de ambas poblaciones. Luego, para cada condición experimental a ensayar, se preparó una mezcla de ambas poblaciones celulares, marcadas en forma diferencial, en relación 1:1. Las mezclas celulares fueron incubadas con medio sin suero (C) o expuestas al agente apoptótico H_2O_2 (0,5 mM, 1h), y analizadas por microscopía de fluorescencia. Se observó que el inductor de apoptosis promueve el pasaje de mitocondrias a través de las estructuras tipo-TNT, puesto de manifiesto por la presencia de células con doble marcación (fluorescencias verde y roja) debido al pasaje de mitocondrias a través de las estructuras celulares tipo-TNT (Figura R43 B).

A)



B)

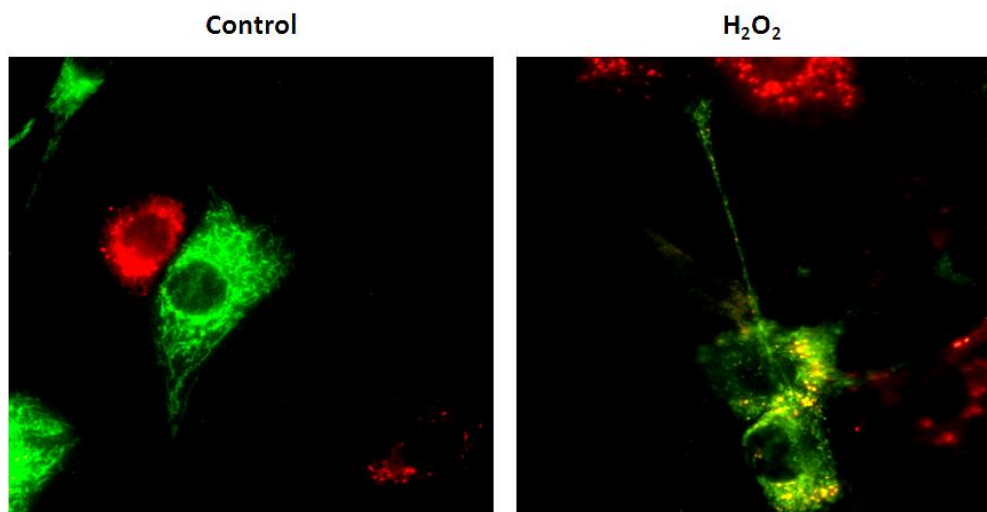
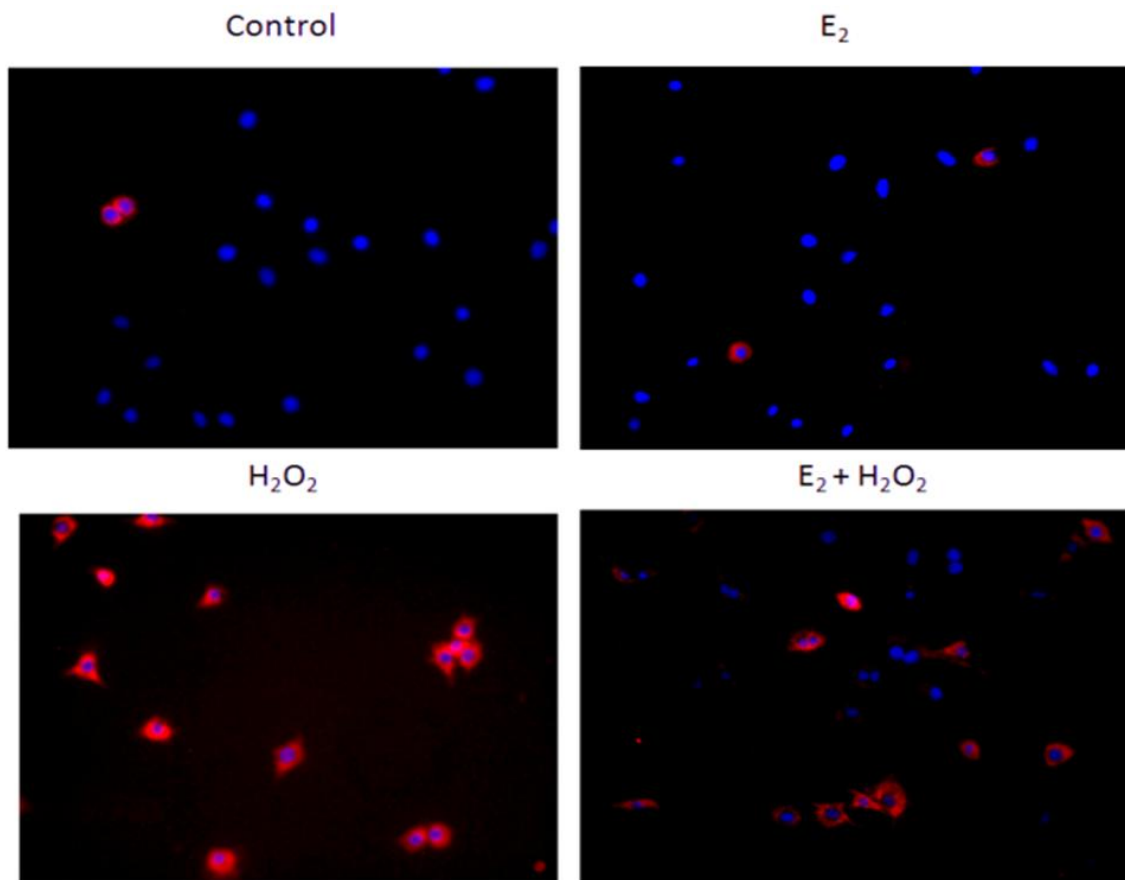


Figura R43. El H_2O_2 promueve el pasaje de mitocondrias a través de las estructuras tipo-TNT en células C2C12. A) Las células recibieron los distintos tratamientos: medio sin suero (Control) o el agente apoptótico, H_2O_2 (0,5 mM, 1h) y, luego, fueron tratadas con *Mitotracker Red* (fluorescencia roja). Las imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia son representativas de tres determinaciones independientes. Objetivo 40X. **B)** Las células tratadas con *Mitotracker Green* (fluorescencia verde) o *Mitotracker Red* (fluorescencia roja) fueron mezcladas en una relación 1:1, y luego recibieron los distintos tratamientos: medio sin suero (Control) o el agente apoptótico, H_2O_2 (0,5 mM, 1h). Se muestran imágenes representativas obtenidas por microscopía de fluorescencia de tres determinaciones independientes. Objetivo 60X.

Teniendo en cuenta los resultados de los experimentos anteriores, en los que el H_2O_2 incrementaba la formación de estas estructuras celulares tipo-TNT, se planteó que estas podían formarse para expandir la señal apoptótica entre las células, o para tomar “componentes” sanos de otras células y así rescatarse del estímulo apoptótico. Con el fin de responder a este interrogante, se decidió evaluar cuál era la función que cumplían estas estructuras de membrana en este modelo experimental. Para ello, se realizaron dos series de experimentos. En el primero de ellos, las células C2C12 fueron incubadas con el vehículo de la hormona (C), E_2 (10^{-8} M, 1h), H_2O_2 (0,5 mM, 1h), o preincubadas con E_2 (10^{-8} M, 1h) antes de la inducción de apoptosis con H_2O_2 (0,5 mM, 1h) ($E_2 + H_2O_2$), y luego fueron tratadas con el colorante nuclear DAPI (300 nM, 20 min). Al mismo tiempo,

otro grupo de células C2C12 no recibió tratamiento alguno y fue incubado con el colorante mitocondrial *Mitotracker Red* (1 μ M, 30 min). Luego, las células en cultivo de cada condición experimental (marcadas con DAPI) se mezclaron con las células no tratadas (marcadas con *Mitotracker Red*) obteniendo, entonces, para cada condición experimental, una población en cultivo formada por células con mitocondrias marcadas rojas (no tratadas) junto con células con núcleos azules (tratadas) y, finalmente, fueron analizadas por microscopía de fluorescencia. En respuesta al tratamiento con H₂O₂, se observó un aumento en el porcentaje (%) de células que presentan ambas marcaciones (fluorescencias roja y azul, 227,11%) respecto al control, revelando que la transferencia de mitocondrias a través de las estructuras tipo-TNT ocurre desde las células no estresadas (no tratadas, fluorescencia derivada de *Mitotracker Red*) hacia las tratadas con el agente apoptótico (estresadas, fluorescencia derivada de DAPI), en un intento de rescatarlas del proceso de apoptosis. Sin embargo, al evaluar el efecto del E₂ en la transferencia de mitocondrias a través de estas estructuras, se observó una disminución en el % de células que presentan en forma simultánea ambas tinciones respecto a la condición H₂O₂ (143,19%), demostrando que el E₂, al disminuir la formación de los nanotubos, también afecta negativamente el pasaje de mitocondrias desde una célula a otra a través de ellos (Figura R44).

A)



B)

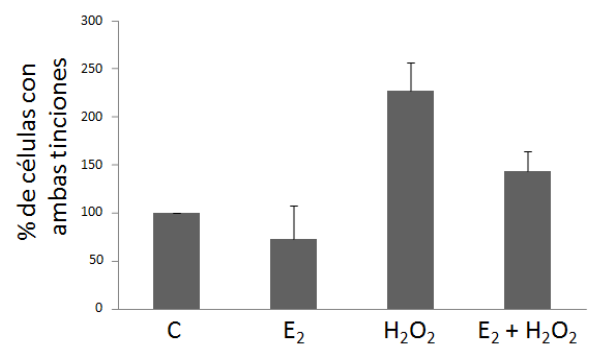


Figura R44. Las estructuras tipo-TNT transportan mitocondrias desde células no estresadas hacia células tratadas con H₂O₂ en células C2C12. Las células fueron tratadas con el vehículo de la hormona (C), E₂ (10⁻⁸ M, 1h), H₂O₂ (0,5 mM, 1h), o E₂ (10⁻⁸ M, 1h) antes de la adición de H₂O₂ (0,5 mM, 1h) (E₂ + H₂O₂) y luego incubadas con DAPI (300 nM, 20 min), o no tratadas e incubadas con *Mitotracker*

Red (1 μM , 30 min). Las mezclas celulares obtenidas se dejaron a 37°C durante 4h y, luego, fueron observadas por microscopía de fluorescencia. **A)** Imágenes representativas de cada condición experimental. **B)** Cuantificación del porcentaje de células que presentan ambas marcaciones (DAPI + *Mitotracker Red*). Las imágenes son representativas de tres determinaciones independientes.

Posteriormente, se realizó un segundo ensayo en el que las células C2C12 incubadas con el vehículo de la hormona (C), E_2 (10^{-8} M, 1h), H_2O_2 (0,5 mM, 1h), o preincubadas con E_2 (10^{-8} M, 1h) antes de la inducción de apoptosis con H_2O_2 (0,5 mM, 1h) ($\text{E}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$) fueron tratadas con el colorante *Mitotracker Red* (1 μM , 30 min). Al mismo tiempo, otro grupo de células C2C12 no recibió ningún tratamiento y fue incubado con el colorante nuclear DAPI (300 nM, 20 min), permaneciendo las mitocondrias de estas células sin marca alguna. Luego, de la misma manera que en el experimento anterior, las células en cultivo de cada condición experimental (teñidas con *Mitotracker*) fueron mezcladas con las células marcadas con DAPI pero no tratadas y, luego, fueron analizadas por microscopía de fluorescencia. En concordancia con los resultados anteriormente presentados, en este experimento no se observaron diferencias significativas en el % de células que presentan ambas marcaciones bajo condiciones apoptóticas (H_2O_2) o en aquellas incubadas previamente con E_2 antes de la inducción de apoptosis, respecto al control (Figura R45).

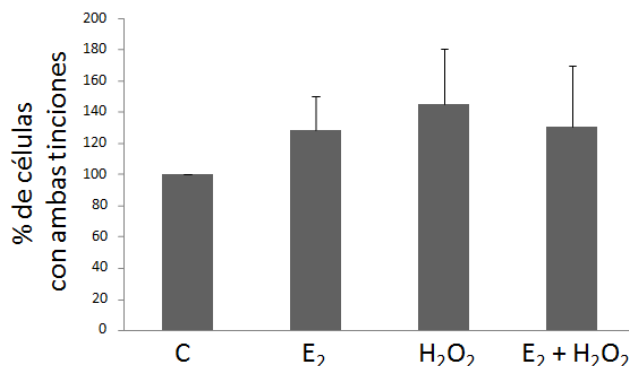


Figura R45. El pasaje de mitocondrias a través de las estructuras tipo-TNT inducido por H₂O₂ no propaga la señal apoptótica en células C2C12. Las células fueron tratadas con el vehículo de la hormona (C), E₂ (10⁻⁸ M, 1h), H₂O₂ (0,5 mM, 1h), o E₂ (10⁻⁸ M, 1h) antes de la adición de H₂O₂ (0,5 mM, 1h) (E₂ + H₂O₂) y luego incubadas con *Mitotracker Red* (1 μM, 30 min), o no tratadas e incubadas con DAPI (300 nM, 20 min). Las mezclas celulares obtenidas se dejaron a 37°C durante 4h y, luego, fueron observadas por microscopía de fluorescencia. Se muestra la cuantificación del porcentaje de células que presentan ambas marcaciones (*Mitotracker Red* + DAPI) de tres determinaciones independientes.

Capítulo 3

Regulación génica

mediada por el 17β -estradiol

frente a la apoptosis

inducida por H_2O_2

Capítulo 3: Regulación génica mediada por el 17β -estradiol frente a la apoptosis inducida por peróxido de hidrógeno

Como fue descrito en la Introducción, la apoptosis se define como una forma de muerte celular genéticamente controlada. La maquinaria básica que interviene en la apoptosis se encuentra presente en todo el mundo animal y la activación de este proceso de muerte está finamente regulada por el balance entre numerosas señales (Bursch, 1992). Uno de los mecanismos encargados de regular la apoptosis lo constituye el control de la maquinaria genética.

Para evaluar si en el efecto protector mediado por el E_2 frente a la apoptosis estaba involucrada la activación o represión transcripcional de diferentes genes tanto apoptóticos como antiapoptóticos, se realizaron ensayos de RT-qPCR. El efecto del agente apoptótico se estudió exponiendo a las células C2C12 al H_2O_2 durante diferentes períodos de tiempo (30 min, 1h, 3h y 4h), de acuerdo a lo descrito en Metodología. Para investigar el efecto de la hormona, las células fueron preincubadas con la misma durante 1h y luego tratadas con H_2O_2 durante los mismos períodos de tiempo. En otra serie de experimentos, para estudiar el efecto de ERK, las células fueron tratadas con el inhibidor específico PD96059 durante 1h y luego incubadas con el inductor de apoptosis (30 min, 1h, 3h y 4h).

3.1. Bcl-2

Se ha reportado ampliamente que la sobreexpresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2, de la familia Bcl-2, conduce a la inhibición de la muerte celular, revirtiendo los cambios clásicos observados durante la apoptosis (Korsmeyer, 1999).

Conforme con esas observaciones, en el presente trabajo de tesis, se demostró que el tratamiento con el agente apoptótico (4h) conduce a una disminución de hasta el 52,12% en el nivel de expresión del ARNm de esta proteína antiapoptótica de manera dependiente del tiempo (Figura R46). La

preincubación con E₂ (1h) antes del agregado de H₂O₂ indujo un aumento de hasta el 66,62% sobre el control (30 min) en el nivel de su ARNm (Figura R46). Estos resultados sugieren que, en el efecto protector de la hormona en células C2C12 frente al estímulo apoptótico, interviene la regulación positiva de Bcl-2 a nivel transcripcional.

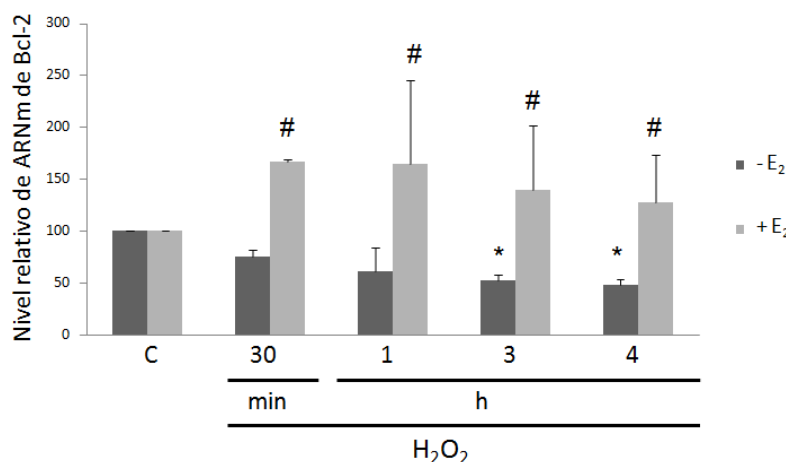


Figura R46. El 17 β -estradiol revierte la disminución del nivel de ARNm de Bcl-2 inducido por el H₂O₂ en células C2C12. Las células fueron tratadas con el vehículo de la hormona (C), H₂O₂ (0,5 mM) durante 30 min, 1h, 3h y 4h, o E₂ (10⁻⁸ M, 1h) antes del agregado de H₂O₂ (0,5 mM) durante los mismos períodos de tiempo. Las muestras obtenidas fueron utilizadas en ensayos de RT-qPCR para evaluar los niveles de ARNm de Bcl-2. GAPDH fue usado como gen endógeno para la normalización. El método comparativo Δ Ct fue utilizado para la cuantificación relativa de la expresión génica. Los resultados obtenidos (%) representan el promedio \pm SD de tres determinaciones independientes realizadas de muestras de ADNc ensayadas por duplicado. *p<0.05 respecto a la condición control. #p<0.05 respecto a la condición H₂O₂ correspondiente.

3.2. Bim

Bim es un miembro proapoptótico de la familia Bcl-2 que pertenece al subgrupo de proteínas solo-BH3. Como otros miembros de este subgrupo, presenta la capacidad de unirse a proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2, aunque el rol que ejerce sobre ellas no está totalmente esclarecido. En efecto, se desconoce cuál es la función que prima ante la interacción entre proteínas

proapoptóticas y antiapoptóticas. Se ha observado que esto dependería de la clase de estímulo y del tipo celular.

Cuando se evaluó el rol del agente apoptótico sobre la actividad transcripcional de Bim, se evidenció que el H_2O_2 conduce al aumento en el nivel de expresión del ARNm de Bim desde los 30 min de tratamiento (99,42% sobre el control), efecto que se mantiene en los períodos de tiempo subsiguientes ensayados, alcanzando el máximo a las 3h de incubación (232,42% sobre el control). Por su parte, al estudiar si el agregado de la hormona previo a la inducción de apoptosis conducía a cambios en los niveles de expresión del ARNm de Bim ya observados, se evidenció que en todos los períodos de tiempo ensayados la hormona induce aumentos en la transcripción del ARNm de Bim superiores a los del agente apoptótico solo (Figura R47).

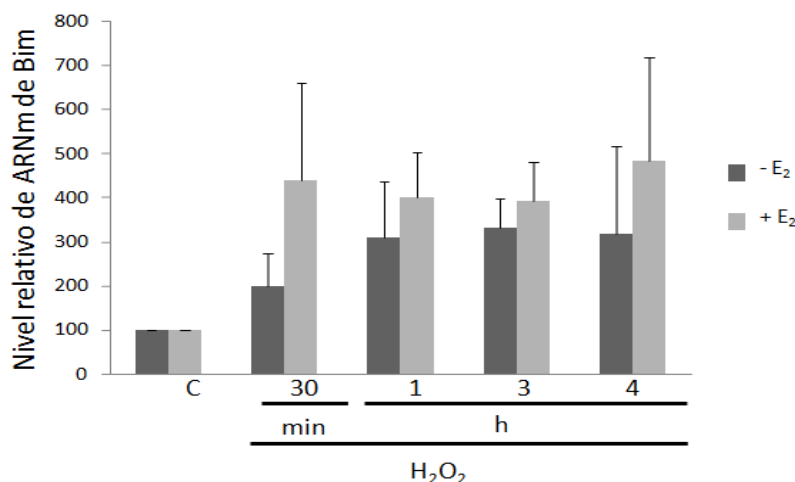


Figura R47. Regulación positiva del nivel de ARNm de Bim mediada por el 17 β -estradiol y el H_2O_2 en células C2C12. Las células fueron tratadas con el vehículo de la hormona (C), H_2O_2 (0,5 mM) durante 30 min, 1h, 3h y 4h, o E_2 (10^{-8} M, 1h) antes del agregado de H_2O_2 (0,5 mM) durante los mismos períodos de tiempo. Las muestras obtenidas fueron utilizadas en ensayos de RT-qPCR para evaluar los niveles de ARNm de Bim. GAPDH fue usado como gen endógeno para la normalización. El método comparativo ΔC_t fue utilizado para la cuantificación relativa de la expresión génica. Los resultados obtenidos (%) representan el promedio \pm SD de tres determinaciones independientes realizadas de muestras de ADNc ensayadas por duplicado.

3.3. Puma

La proteína proapoptótica de la familia Bcl-2, PUMA, se ha involucrado, generalmente, en la apoptosis inducida por estrés y regulada por p53 (Nakano y Vousden, 2001; Yu et al., 2001). Sin embargo, PUMA también es activada por otros factores de transcripción. En efecto, esta proteína de la familia Bcl-2 es capaz de inducir apoptosis, sin la intervención de p53, en respuesta a su activación mediada por FoxO3a (Discutido en Yu y Zhang, 2008). Es por ello que, hasta el momento, la actividad de PUMA parecería que se encuentra exclusivamente controlada a nivel transcripcional (Discutido en Yu y Zhang, 2008).

Cuando se evaluó el efecto del agente apoptótico sobre la expresión de PUMA, se evidenció que el H_2O_2 induce un aumento en su nivel de expresión a partir de los 30 min de tratamiento, alcanzando su máximo a la hora de incubación (682,09% sobre el control) y luego decayendo por encima del control en los períodos de tiempo subsiguientes (3h: 443,03% y 4h: 227,94% sobre el control). El pretratamiento con E_2 antes del agregado de H_2O_2 condujo a una disminución en el nivel de su ARNm, evidenciable desde 1h hasta las 3h de tratamiento, demostrando su efecto antiapoptótico (Figura R48).

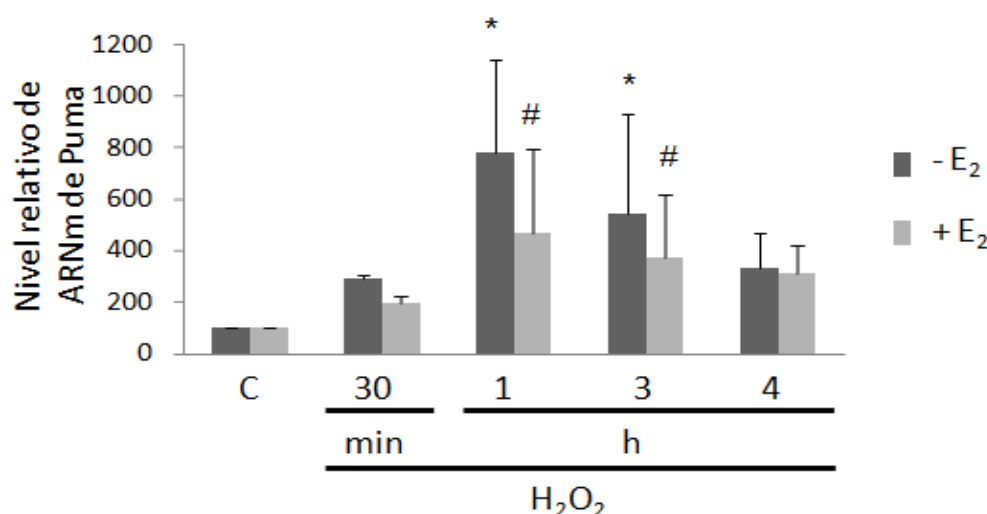


Figura R48. El 17β -estradiol revierte el aumento del nivel de ARNm de Puma inducido por el H_2O_2 en células C2C12. Las células fueron tratadas con el

vehículo de la hormona (C), H₂O₂ (0,5 mM) durante 30 min, 1h, 3h y 4h, o E₂ (10⁻⁸M, 1h) antes del agregado de H₂O₂ (0,5 mM) durante los mismos períodos de tiempo. Las muestras obtenidas fueron utilizadas en ensayos de RT-qPCR para evaluar los niveles de ARNm de Puma. GAPDH fue usado como gen endógeno para la normalización. El método comparativo Δ Ct fue utilizado para la cuantificación relativa de la expresión génica. Los resultados obtenidos (%) representan el promedio \pm SD de tres determinaciones independientes realizadas de muestras de ADNc ensayadas por duplicado. *p<0.05 respecto a la condición control. #p<0.05 respecto a la condición H₂O₂ correspondiente.

3.4. Noxa

La proteína proapoptótica de la familia Bcl-2, Noxa, es conocida por constituir un gen blanco de la actividad transcripcional de p53 en la apoptosis (Oda et al., 2000, Schuler y Green, 2001), aunque también interviene en mecanismos independientes de p53 (Kim et al., 2004; Lallemand et al., 2007; Nikiforov et al., 2007).

Cuando se estudió el efecto del agente apoptótico sobre su nivel de expresión de ARNm, se observó que el H₂O₂ no induce cambios significativos a nivel transcripcional, sugiriendo que esta proteína proapoptótica no intervendría en la apoptosis inducida por H₂O₂ en células C2C12 (Figura R49).

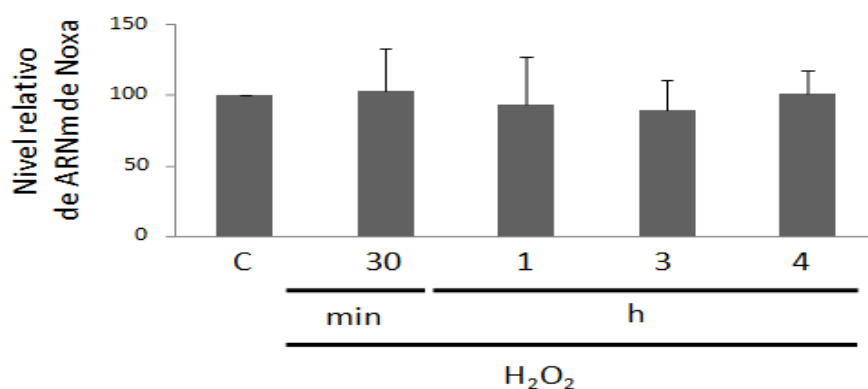


Figura R49. El H₂O₂ no induce cambios en el nivel de ARNm de Noxa en células C2C12. Las células fueron tratadas con el medio sin suero (C), o H₂O₂ (0,5 mM) durante 30 min, 1h, 3h y 4h. Las muestras obtenidas fueron utilizadas en ensayos de RT-qPCR para evaluar los niveles de ARNm de Noxa. GAPDH fue usado como gen endógeno para la normalización. El método comparativo Δ Ct fue utilizado para la cuantificación relativa de la expresión génica. Los resultados

obtenidos (%) representan el promedio +/- SD de tres determinaciones independientes realizadas de muestras de ADNc ensayadas por duplicado.

3.5. MDM-2

La ubiquitina ligasa MDM2 es una proteína importante en la regulación de la abundancia de p53 y, en consecuencia, en la apoptosis dependiente de p53. La expresión inducible de MDM2 se encuentra determinada por el promotor P2 que presenta dos elementos de respuesta a p53. A través de estos, p53 estimula la expresión de la ubiquitina ligasa por un mecanismo autoregulatorio al mismo tiempo que induce su propia degradación (Barak et al., 1994). Sin embargo, P2 presenta elementos de respuesta adicionales que permiten la inducción de MDM2 de una manera independiente de p53 (Ries et al., 2000; Phelps et al., 2003; Truong et al., 2005). En efecto, la quinasa ERK es capaz de favorecer la actividad transcripcional de MDM2 para regular a FoxO3a (Yang et al., 2008).

Al evaluar el efecto del agente apoptótico sobre la expresión del ARNm de MDM2, se observó que el H₂O₂ induce un aumento en el nivel de expresión del ARNm desde los 30 min (171,23% sobre el control) hasta la hora de incubación (331,92% sobre el control). Sin embargo, en los períodos de tiempo posteriores (3h y 4h) de incubación con el inductor de apoptosis, los niveles de ARNm muestran un descenso hasta niveles comparables a los del control. La preincubación con la hormona (1h) antes del agregado del agente apoptótico conduce a un aumento aún superior al inducido por el H₂O₂ solo, que es más evidenciable a las 3 horas de incubación (433,1% sobre el tratamiento con H₂O₂ 3h) (Figura R50).

Debido a que, como se describió en la Introducción, ERK y MDM2 pueden regular de manera conjunta a FoxO3a, para favorecer su degradación, se decidió evaluar la participación de ERK en la respuesta de MDM2 frente al estímulo apoptótico a nivel transcripcional. Con este fin, las células fueron preincubadas con el inhibidor PD98059 (10 µM, 1h) antes del agregado de H₂O₂ durante diferentes períodos de tiempo (30 min, 1h, 3h y 4h). Desde el inicio del tratamiento

hasta la hora de incubación con H_2O_2 , la inhibición de ERK afectó negativamente la inducción de la expresión de MDM2, alcanzando niveles comparables a los del control. Por el contrario, a las 3h y 4h de incubación con el agente apoptótico, la inhibición de ERK afectó positivamente la expresión de MDM2, alcanzando valores similares a los obtenidos en presencia de E_2 (Figura R50).

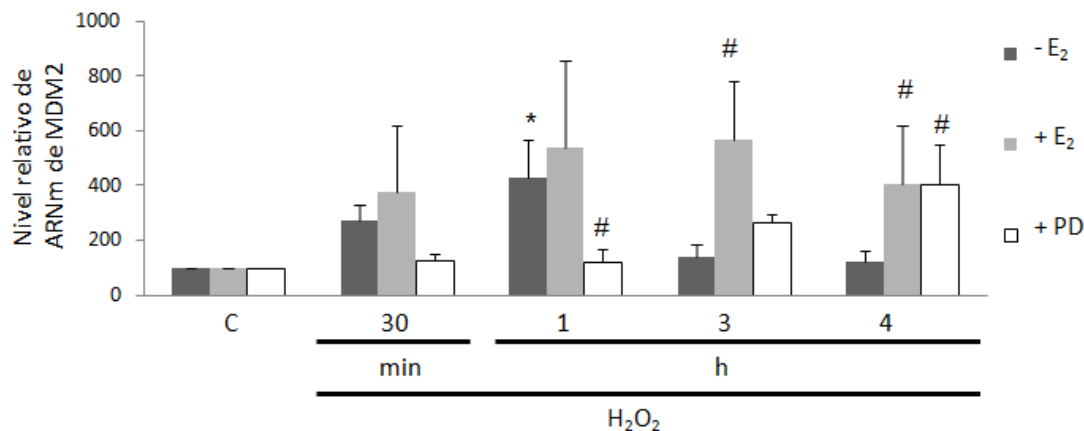


Figura R50. El 17β -estradiol ejerce una respuesta diferencial sobre el nivel de ARNm de MDM2 en respuesta al H_2O_2 en células C2C12. Intervención de ERK. Las células fueron tratadas con el vehículo de la hormona (C), H_2O_2 (0,5 mM) durante 30 min, 1h, 3h y 4h, E_2 (10^{-8} M, 1h) antes del agregado de H_2O_2 (0,5 mM) durante los mismos períodos de tiempo o PD98059 (10 μ M, 1h) antes del agregado de H_2O_2 (0,5 mM). Las muestras obtenidas fueron utilizadas en ensayos de RT-qPCR para evaluar los niveles de ARNm de MDM2. GAPDH fue usado como gen endógeno para la normalización. El método comparativo Δ Ct fue utilizado para la cuantificación relativa de la expresión génica. Los resultados obtenidos (%) representan el promedio \pm SD de tres determinaciones independientes realizadas de muestras de ADNc ensayadas por duplicado. * $p < 0.05$ respecto a la condición control. # $p < 0.05$ respecto a la condición H_2O_2 correspondiente.

3.6. PERP

PERP (*p53 apoptosis effector related to PMP-22*) es un gen blanco de p53 a nivel transcripcional (Attardi et al., 2000). En efecto, p53 puede interactuar con el gen que codifica para PERP en, por lo menos, tres elementos de respuesta durante la apoptosis dependiente de p53 (Reczek et al., 2003). La inducción de

apoptosis asociada a la expresión de PERP se reportó en fibroblastos, timocitos y neuronas (Ihrle et al., 2003).

Al evaluar el efecto del agente apoptótico sobre PERP a nivel génico, se observó que el H_2O_2 induce un aumento en su nivel de expresión a las 3h de tratamiento (255,65% sobre el control), para luego decaer, a las 4h de incubación, hasta un nivel comparable al del control. Estos resultados sugieren que PERP interviene en la apoptosis inducida por H_2O_2 en células C2C12. Para estudiar el rol de la hormona sobre la regulación positiva de este gen mediada por el H_2O_2 , las células fueron preincubadas con E_2 durante 1h y luego expuestas al agente apoptótico, evidenciándose el efecto antiapoptótico de la hormona a partir de las 3h de incubación con H_2O_2 (Figura R51).

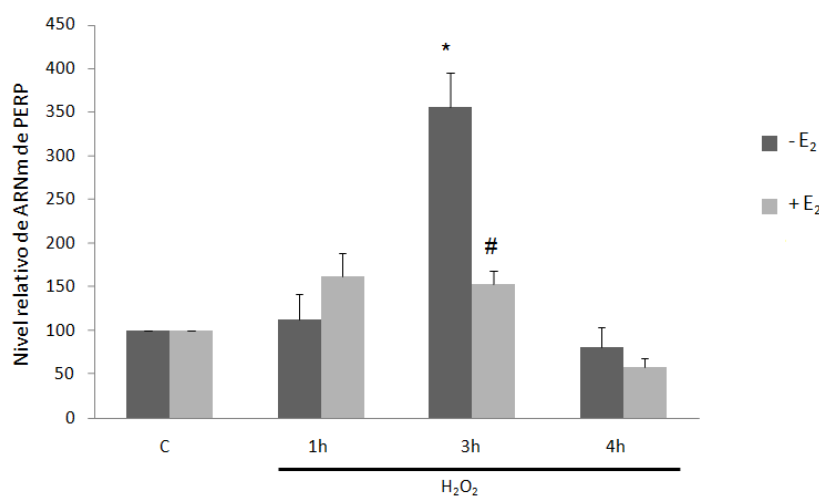


Figura R51. El 17β -estradiol revierte el aumento del nivel de ARNm de PERP inducido por el H_2O_2 en células C2C12. Las células fueron tratadas con el vehículo de la hormona (C), H_2O_2 (0,5 mM) durante 1h, 3h y 4h, o E_2 ($10^{-8}M$, 1h) antes del agregado de H_2O_2 (0,5 mM) durante los mismos períodos de tiempo. Las muestras obtenidas fueron utilizadas en ensayos de RT-qPCR para evaluar los niveles de ARNm de PERP. GAPDH fue usado como gen endógeno para la normalización. El método comparativo ΔCt fue utilizado para la cuantificación relativa de la expresión génica. Los resultados obtenidos (%) representan el promedio \pm SD de tres determinaciones independientes realizadas de muestras de ADNc ensayadas por duplicado. * $p < 0.05$ respecto a la condición control. # $p < 0.05$ respecto a la condición H_2O_2 correspondiente.

Discusión

Los estudios presentados en esta tesis contribuyen a ampliar el conocimiento de los mecanismos moleculares subyacentes al rol protector que ejerce el 17β -estradiol frente a la apoptosis en células de músculo esquelético. Como se describió en la Introducción, en este laboratorio se evidenció una acción antiapoptótica del esteroide en músculo esquelético (Vasconsuelo et al., 2008). Sin embargo, no fueron totalmente dilucidadas las vías de señalización intracelular involucradas en dicho efecto. Los estudios presentados en esta tesis aportan información que contribuye a delinear el mecanismo de acción del inductor de apoptosis y los sitios de regulación en dicho mecanismo que son blanco de la acción hormonal. Para ello, empleando como modelo experimental a la línea celular de mioblastos murinos C2C12 expuestas al inductor de apoptosis H_2O_2 , se investigaron las vías de señalización implicadas en la acción antiapoptótica del E_2 . Los estudios desarrollados en este trabajo de tesis doctoral sugieren que la acción protectora del esteroide requiere la participación de PKC, PKD, JNK, p53, p66Shc y FoxOs para modular funciones mitocondriales, enzimas antioxidantes, así como también miembros de la familia Bcl-2.

El 17β -estradiol es una hormona esteroidea cuyos receptores específicos se han encontrado en varios órganos y tejidos, entre los que se incluye al músculo esquelético de rata y humanos (Lemoine et al., 2003, Wiik et al., 2005). De importancia para este trabajo de tesis, en este laboratorio se demostró la presencia del $ER\alpha$ y $ER\beta$ en la línea celular de músculo esquelético murino C2C12 (Milanesi et al., 2008; Milanesi et al., 2009) y, a través de estos receptores, se vinculó al E_2 con un efecto antiapoptótico en este tejido (Revisado en Boland et al., 2008), revelando algunos de los mecanismos moleculares mediante los cuales la hormona ejerce sus funciones. Como se describió en la Introducción, la activación de diferentes vías de señalización rápidas mediadas por el E_2 pueden regular distintos procesos celulares tales como la diferenciación, la proliferación e incluso la apoptosis (Revisado en Boland et al., 2008). La familia de moléculas de señalización intracelular que son reguladas durante el proceso apoptótico se encuentra en aumento e incluye a diferentes proteínas quinasas (Bokoch, 1998).

En este sentido, se ha demostrado que las PKCs son capaces de actuar sobre múltiples moléculas blanco en respuesta a estímulos apoptóticos, ejerciendo un rol apoptótico o antiapoptótico de acuerdo al tipo celular involucrado y al estímulo presente (Brodie y Blumberg, 2003; Jackson y Foster, 2004). Incluso en el mismo tipo celular, dependiendo del estado fisiológico en el que se encuentre, la PKC puede ejercer diferentes funciones. Esta flexibilidad en la señalización mediada por las PKCs puede deberse a los complejos mecanismos de regulación de estas quinasas (Corbalan-Garcia y Gomez-Fernandez, 2006; Steinberg, 2004).

Sumado al tradicional modo de activación de las PKCs que implica la participación de cofactores lipídicos y el anclaje a proteínas para localizar a la quinasa activa en membranas, se ha identificado otro mecanismo para la activación, en particular, de la novel PKC δ que involucra la fosforilación en residuos tirosina (Revisado en Kikkawa et al., 2002). Se ha reportado que la fosforilación de PKC δ en tirosina 311 (Y³¹¹) conduce a su activación en células musculares lisas vasculares (Nakashima et al., 2008). Esta fosforilación en tirosina es una respuesta temprana a varios estímulos apoptóticos (Konishi et al., 1997). En este trabajo, se reporta que el H₂O₂ induce la fosforilación de PKC δ en el residuo Y³¹¹, ejerciendo un efecto apoptótico, que es prevenido por el agregado de E₂. Además, se demuestra que la inhibición por la hormona es mediada por los ER, que se deduce de los ensayos donde se evaluó la actividad de PKC δ en presencia de Fulvestrant. Estos datos se encuentran en concordancia con anteriores resultados en los que se observa que el efecto protector de esta hormona en mioblastos de músculo esquelético es a través de sus receptores (Vasconsuelo et al., 2008). Aunque los resultados presentados claramente sugieren la intervención de PKC δ en el efecto apoptótico inducido por H₂O₂, no puede desestimarse la participación de otras isoformas de la familia PKC como posibles reguladoras del proceso de apoptosis.

Otra de las PKCs noveles, la isoforma θ , puede sufrir múltiples eventos de autofosforilación y transfosforilación relacionados a la transición hacia un estado

catalíticamente activo, y al reclutamiento a diferentes compartimentos subcelulares (Czerwinski et al., 2005; Liu et al., 2002). En particular, su fosforilación en el residuo treonina 538 (Thr⁵³⁸) constituye un mecanismo de adquisición de competencia catalítica (Sparatore et al., 2003). En esta tesis, se evidencia la activación de esta isoforma en períodos avanzados del proceso apoptótico, mediante la fosforilación del residuo Thr⁵³⁸, que es prevenido por la incubación con E₂. En mamíferos, esta isoforma se expresa solamente en células del sistema inmune y células musculares (Manicassamy et al., 2006; Osada et al., 1992). Si bien en linfocitos T, la forma activa de la PKC θ promueve la vía del NF- κ B en paralelo a la activación de Akt, induciendo un efecto de supervivencia (Manicassamy et al., 2006), en músculo esquelético su efecto es controvertido. En las células C2C12, los estudios aquí realizados sugieren que la activación de esta isoforma estaría relacionada a un efecto apoptótico, puesto que no se ha evidenciado la activación de Akt de manera paralela a la fosforilación de PKC θ presente en períodos avanzados de la apoptosis.

Otra quinasa relacionada con la familia PKC es la PKD. La activación de esta última requiere de la transfosforilación de los residuos serina 744 (Ser⁷⁴⁴) y serina 748 (Ser⁷⁴⁸) que, como consecuencia, conduce a la autofosforilación del residuo serina 916 (Ser⁹¹⁶). Ambos eventos se consideran marcadores de adquisición de quinasas catalíticamente activas (Waldron et al., 1999). En este trabajo, se evidencia que el agente apoptótico induce la activación de PKD, puesta de manifiesto por la fosforilación en Ser⁹¹⁶, en estadíos tempranos del proceso apoptótico. De interés para este estudio, este efecto es revertido por el tratamiento con E₂. Estos resultados sugieren que la activación de esta quinasa interviene en la regulación de funciones inherentes al inicio de la apoptosis y que la hormona también actúa en estadíos tempranos de la apoptosis, regulándola y contrarrestando el efecto proapoptótico resultante de la activación de PKD. En efecto, se ha reportado que esta quinasa interviene en la regulación de la apoptosis relacionada a estrés oxidativo (Endo et al., 2000), promoviendo la muerte celular (Zhang et al., 2015). Asimismo, se ha evidenciado que su

activación puede ser mediada por PKCs noveles (Zhang et al., 2015), aunque otros han identificado que la PKD puede activarse de manera independiente a la actividad PKC (Waldron et al., 2012). Los resultados obtenidos en las células C2C12 sugieren que PKD se activaría de manera independiente a la novel PKC δ , debido a que estas quinasas se encuentran activas en diferentes períodos del proceso apoptótico. Sin embargo, no puede desestimarse que otras PKCs de este subgrupo puedan actuar *upstream* PKD en la cascada apoptótica desencadenada por el H₂O₂.

En general, se ha sugerido que las PKCs clásicas, tales como las isoformas α y β II, promueven la supervivencia celular. En este sentido, se ha reportado que PKC α suprime la apoptosis en células COS (Whelan y Parker, 1998) y favorece la fosforilación y activación de la proteína antiapoptótica Bcl-2 (Ruvolo et al., 1998). Por el contrario, en células LNCaP, la activación de esta isoforma presenta un efecto apoptótico (García-Bermejo et al., 2002). Esto demuestra que estas PKCs pueden presentar comportamientos disímiles dependiendo del tipo celular involucrado. En este estudio, se evidencia que estas isoformas no sufren cambios ni en su fosforilación ni en su actividad en respuesta al agente apoptótico H₂O₂. Asimismo, frente al tratamiento con el agente antiapoptótico E₂, también se evidenció esta falta de respuesta por parte de las PKCs α y β II. Estos resultados sugieren que estas PKCs clásicas no intervienen ni en la inducción de apoptosis ni mediando un efecto protector en células C2C12.

Por otra parte, aunque generalmente se ha establecido que la activación de JNK sostenida en el tiempo se relaciona con la inducción de apoptosis, se ha reportado también que, bajo ciertas condiciones, la activación de esta quinasa de manera transitoria promueve la proliferación (Chen et al., 1998). En concordancia, aquí se observa que el H₂O₂ induce la activación de JNK de manera sostenida en células C2C12. Asimismo, estos estudios señalan que PKC δ y JNK son activadas por el estímulo apoptótico en el mismo período de tiempo, aunque difieren en la duración de sus estados activados. Estas quinasas actúan en forma conjunta para

mediar el efecto apoptótico, siendo la activación de PKC δ un evento necesario para la activación de JNK, como se evidenció con los ensayos donde PKC δ era depletada mediante el tratamiento con altas dosis de PMA por tiempo prolongado (Ahnadi et al., 2000; Wang et al., 2001). El hecho de que la activación de JNK se mantenga aún en estadios más avanzados de la apoptosis hace suponer que esta quinasa, además de mantener y amplificar la señal de muerte, podría regular otras funciones tardías en el proceso apoptótico distintas a las aquí reportadas. En concordancia con los resultados aquí presentados en los que la activación de JNK es afectada por el tratamiento con la hormona en células C2C12, se ha reportado en células de cáncer de mama que el E₂ previene la muerte celular inducida por la radiación UV inhibiendo la actividad de JNK (Razandi et al., 2000). Los datos que surgen de los ensayos de TUNEL son coincidentes con los resultados que sustentan la conexión entre PKC δ y JNK, debido a que se obtienen cantidades comparables de células TUNEL positivas en los tratamientos Queleritina + H₂O₂ y SP600125 + H₂O₂, indicando que ambas quinasas intervienen en la apoptosis inducida por H₂O₂ en células C2C12. Adicionalmente, se encontró que la inhibición de la activación de JNK mediada por la *downregulación* de PKC es más evidente para la isoforma de 46 kDa que para la de 54 kDa. Este efecto diferencial de la PKC δ sobre cada una de las isoformas de JNK puede deberse a una distinta localización de las quinasas o a la interacción con diferentes intermediarios en el proceso apoptótico, siendo la isoforma de JNK de menor peso molecular más susceptible a ser activada por PKC δ .

Otra proteína relacionada al estrés oxidativo es p53. Esta se acumula en el núcleo en su estado fosforilado en los residuos serina 15 (Ser¹⁵), serina 20 (Ser²⁰) y serina 46 (Ser⁴⁶) para así regular positiva o negativamente la actividad transcripcional de genes implicados en el ciclo celular y/o la apoptosis (Dumaz y Meek, 1999; Sionov y Haupt, 1999; Vousden y Lu, 2002). En concordancia, los ensayos realizados aquí indicarían que el H₂O₂ induce la fosforilación/activación de p53 en Ser¹⁵ y que en este estado fosforilado se localiza a nivel nuclear en células C2C12. En concierto con resultados que sostienen que el tratamiento con

la hormona previene la apoptosis mediante la inhibición de la activación de p53 en cardiomiocitos (Liu et al., 2011), en esta tesis se observa que el E₂ inhibe la fosforilación de p53 mediada por el agente apoptótico en células C2C12.

Al igual que p53, p66Shc es una proteína que también está involucrada en la respuesta al estrés oxidativo y cuya expresión varía entre distintos tipos celulares e incluso puede estar ausente (Migliaccio et al., 1997; Pelicci et al., 1992). Se ha demostrado que la expresión y la fosforilación de esta proteína en el residuo serina 36 (Ser³⁶) es importante para ejercer sus funciones ante las situaciones de daño oxidativo presentes en el envejecimiento (Chen et al., 2014; Migliaccio et al., 1999; Trinei et al., 2002). En este trabajo, se demuestra que el nivel del ARNm de p66Shc aumenta en respuesta al agente apoptótico y que el E₂ puede revertir este efecto. En relación con estos efectos a nivel genómico, también se observa la fosforilación de esta proteína en Ser³⁶ frente al estímulo del H₂O₂ y que el pretratamiento con la hormona previene esta fosforilación. Debido a que tanto la proteína p53 como su gen blanco, p66Shc, presentan el mismo patrón de activación en respuesta al agente apoptótico, esto sugiere que, en células C2C12, p66Shc se encuentra bajo el control transcripcional de p53. Así también, se observó un resultado similar al evidenciado en presencia de la hormona, por el agregado del inhibidor de JNK. En efecto, se observó la disminución significativa en la fosforilación de p66Shc inducida por el H₂O₂ cuando las células fueron previamente incubadas con SP600125, sugiriendo que esta proteína Shc es un sustrato de JNK. Además, mediante la depleción de PKC con PMA, se demostró que la fosforilación de p66Shc es independiente de PKC. Entonces, se podría hipotetizar que la isoforma de 54 kDa de JNK es la principalmente involucrada en la activación de p66Shc, ya que ésta fue afectada en menor medida por la depleción de PKC con PMA.

Otro aspecto relevante del mecanismo molecular que se activa en respuesta al agente apoptótico y puede ser regulado por E₂, es el cambio de localización de p66Shc luego de su activación. Se ha evidenciado que esta

proteína presenta una señal de localización mitocondrial que permite su translocación a esta organela (Ventura et al., 2004), sin embargo el mecanismo subyacente no se ha dilucidado totalmente. Los resultados obtenidos aquí señalan que p66Shc cambia su localización desde el citosol hasta el compartimento mitocondrial luego de ser fosforilada, y que el E₂ a través de sus receptores evita esta translocación. El comportamiento que presenta p66Shc frente al tratamiento con el agente apoptótico, así como su respuesta al agregado del esteroide, se encuentra en concordancia con el hecho de que la hormona inhibe la activación de JNK y, consecuentemente, la fosforilación/translocación de p66Shc es suprimida.

Como se mencionó en la Introducción, otras proteínas intervinientes en la respuesta al estrés oxidativo son los miembros de la familia *Forkhead*. Estos pueden sufrir cambios en su localización subcelular, además de fosforilaciones en diferentes residuos, de acuerdo al tipo celular involucrado y a la intensidad/tipo del estímulo, para así ejercer diversas funciones celulares, tales como la regulación de la apoptosis y/o el ciclo celular (Salih y Brunet, 2008).

En esta tesis, se evidencia que FoxO3a se mantiene en su estado fosforilado/inactivo en el inicio de la apoptosis como consecuencia de la regulación negativa de Akt y que la hormona E₂ conserva el nivel de fosforilación/inactivación de FoxO3a. Los ensayos de *Western blotting*, junto con el uso del inhibidor de PI3K, LY294002, sugieren que las células de músculo esquelético intentan defenderse, en el inicio del proceso apoptótico, activando en forma temprana vías de supervivencia, tales como la vía PI3K-Akt, que es capaz de regular a FoxO3a. En consecuencia, la presencia de FoxO3a inactivo en la etapa inicial de la apoptosis evitaría la activación de genes proapoptóticos y, por consiguiente, el progreso de la señal apoptótica que generaría finalmente la muerte celular. De acuerdo con el efecto antiapoptótico del E₂ que se ha observado en este grupo en músculo esquelético, la preincubación con el esteroide conserva esta primera respuesta de defensa de la célula. El hecho de que en condiciones basales FoxO3a se encuentra inactivo en el citosol y que frente al estímulo apoptótico en

la fase inicial de la apoptosis, este factor se visualiza en núcleo, puede deberse a la urgencia celular de responder al estímulo oxidativo, sobrepasando el requerimiento de defosforilación para ingresar en esta organela. Sin embargo, como FoxO3a se encuentra fosforilado/inactivo no podrá regular la expresión génica, debido a que en este estado se encuentra imposibilitada su unión al ADN. Además, esta observación sugiere que se requiere sobrepasar un umbral de FoxO3a a nivel nuclear susceptible de ser defosforilado, para que sea posible la transcripción génica. Solo en períodos más avanzados del proceso apoptótico, FoxO3a no fosforilado/activo a nivel nuclear será capaz de regular la expresión de sus genes blanco.

Es probable que existan otros factores que regulen la actividad de FoxO3a. De interés para este trabajo de tesis, se ha reportado que la quinasa JNK es capaz de modular la translocación nuclear de miembros FoxO en invertebrados (Oh et al., 2005). En efecto, los ensayos en presencia del inhibidor SP600125 sugieren que la fosforilación de FoxO3a a la hora de tratamiento con el agente apoptótico es regulada por JNK en células C2C12. Sin embargo, no se observa ningún efecto a los 30 min de tratamiento, sugiriendo que la fosforilación de FoxO3a inicialmente involucra solo a Akt. Estos resultados se encuentran en concordancia con la activación de JNK mediada por H₂O₂ ya descrita, que es evidenciable a partir de la hora de tratamiento. Al mismo tiempo, estos datos sugieren que JNK y Akt actuarían de manera independiente regulando a FoxO3a en células C2C12. Debido a que no se conocen hasta el momento sitios de fosforilación directos de JNK sobre FoxO3a, se podría hipotetizar que esta quinasa ejercería su rol de manera indirecta. Asimismo, puesto que existen evidencias que han relacionado a p66Shc y FoxO3a (Chahdi y Soroki, 2008; Guo et al., 2009), se podría postular, en concordancia con la fosforilación de p66Shc mediada por JNK ya descrita en esta tesis, que esta sería la vía activada para regular la fosforilación de FoxO3a, de manera independiente a Akt. Debido a que se ha observado en esta tesis que JNK cumple un rol apoptótico, estos datos sugieren que FoxO3a fosforilado por la acción indirecta JNK-p66Shc antagonizaría el efecto

de supervivencia mediado por Akt, al inhibir en este período (1h) la transcripción de genes antioxidantes protectores. En efecto, se ha reportado que p66Shc es capaz de regular negativamente, a través de FoxO3a, la transcripción de las enzimas catalasa y MnSOD, disminuyendo la detoxificación de las ROS (Guo et al., 2009; discutido en Storz, 2011).

Siguiendo los mismos enfoques experimentales, se evidenció que otro de los miembros de la familia *Forkhead*, FoxO4, se encuentra fosforilado/activo a nivel nuclear en respuesta a la inducción de apoptosis, como consecuencia de la regulación positiva mediada por JNK, y que la hormona previene este efecto solo en períodos más avanzados del proceso apoptótico (3h). Estos datos sugieren que la hormona ejerce su acción protectora en células C2C12 mediante la regulación negativa de FoxO4, de manera de prevenir la expresión de genes proapoptóticos.

En conjunto, los resultados hasta aquí evaluados sugieren que, de acuerdo a la duración del estímulo apoptótico, en las células C2C12 prevalecerá la acción de diferentes miembros de la familia *Forkhead* que inducirá la transcripción de distintos genes blanco. En los inicios del proceso apoptótico (30 min), primaría la acción de FoxO3a (fosforilado/inactivo por regulación negativa de Akt) sobre la de FoxO4 y, como consecuencia, se impediría la transcripción de genes proapoptóticos. A medida que se incrementa la duración del estímulo apoptótico (1h), la actividad de FoxO3a no solo es regulada negativamente por Akt (fosforilado/inactivo), sino que también sufre la regulación indirecta mediada por JNK, probablemente a través de p66Shc (fosforilado/inactivo). Se podría pensar que en este período todavía no se ha superado el umbral mínimo para que FoxO3a a nivel nuclear sea capaz de regular la expresión génica y, al mismo tiempo, los datos sugieren que en este período primaría la acción apoptótica de JNK (inhibición de la transcripción de genes antioxidantes) sobre la acción protectora de Akt (inhibición de la transcripción de genes proapoptóticos). Asimismo, en esta etapa, FoxO4 se encuentra activo a nivel nuclear (fosforilado por acción de JNK), lo que conduciría a la expresión de genes proapoptóticos. En

períodos más avanzados del proceso apoptótico (3h y 4h), se pierde la regulación negativa mediada por Akt sobre FoxO3a, al mismo tiempo que FoxO4 sigue en su estado activo, por lo que ambos podrán regular la expresión de sus genes blanco apoptóticos. De este modo, FoxO3a y FoxO4 actuando de manera conjunta conducirían de manera más eficiente hacia la muerte celular.

Los resultados hasta aquí presentados muestran el importante rol del E₂, a través de su receptor, en la inhibición de múltiples vías de señalización intracelular activadas por H₂O₂ que, actuando en concierto, inducen apoptosis en mioblastos esqueléticos C2C12. Asimismo, el descubrimiento de nuevas localizaciones intracelulares de los ERs ha conducido a hipotetizar que el E₂ puede ejercer su efecto protector de manera directa en otros sitios, entre los que se incluye a la mitocondria (Revisado en Vasconsuelo et al., 2011).

Uno de los eventos clave en el curso de la apoptosis lo constituye la liberación de citocromo c de la mitocondria, que formará el apoptosoma, para luego activar a la procaspasa 9 y a caspasas efectoras, amplificando la señal de muerte. Si bien este suceso ha sido motivo de numerosos estudios, el mecanismo molecular exacto que conduce a la liberación del citocromo c y, en consecuencia, irreversiblemente a la apoptosis, no ha sido totalmente esclarecido. De hecho, existe controversia respecto a la maquinaria involucrada en este evento. Se ha postulado que múltiples mecanismos podrían coexistir en una célula y que la activación de uno u otro bajo una determinada condición estaría influenciada por diversos factores, entre los cuales se incluye a la naturaleza del agente apoptótico (Gogvadze et al., 2006).

En trabajos previos en este laboratorio, se reportó un efecto protector del E₂ sobre la integridad mitocondrial evidenciando que la hormona, principalmente a través del ERβ, es capaz de inhibir la liberación del citocromo c en la apoptosis inducida por estrés oxidativo (Vasconsuelo et al., 2008). Con el fin de profundizar estos resultados utilizando el mismo modelo experimental, en este trabajo de tesis se halló que el agente apoptótico induce la apertura del poro de permeabilidad

transitoria mitocondrial (MPTP) de una forma sostenida en el tiempo, evento que conduce a la pérdida del potencial de membrana mitocondrial. Asimismo, los resultados aquí presentados sugieren que ambos sucesos son responsables de la liberación de citocromo c observada, ya que la apertura sostenida del MPTP y la pérdida del potencial de membrana mitocondrial anteceden a este evento. En los últimos años, numerosas investigaciones han demostrado la importancia del MPTP en la fisiología mitocondrial (Kwong y Molkentin, 2015; Ma et al., 2011). Por lo tanto, no es sorprendente que la apertura de este poro se encuentre estrictamente regulada. Así, la participación en dicha regulación de proteínas de la familia Bcl-2, específicamente Bax, fue considerada en los estudios realizados en esta tesis. Las observaciones que surgen de los experimentos aquí presentados sugieren que el H_2O_2 induce la translocación de la proteína proapoptótica Bax a mitocondria. En correspondencia con estas observaciones, en mitocondrias de otros tipos celulares, se ha evidenciado que Bax es capaz de interactuar con las proteínas VDAC y ANT, reguladoras de este poro (Marzo et al., 1998; Narita et al., 1998). Entonces, es probable que Bax pueda intervenir en la modulación del MPTP. Asimismo, se evidenció que la preincubación con E_2 antes de la inducción de apoptosis, previene tanto la translocación de Bax a mitocondria como la apertura prolongada del MPTP. Al mismo tiempo, se observó que la hormona fue capaz de restituir la pérdida del $\Delta\psi_m$ inducida por el agente apoptótico, evento que se encuentra en estrecha relación con la apertura sostenida del MPTP. En concordancia, en presencia del esteroide, la proteína p66Shc no es forforilada ni tampoco transloca a mitocondria, y por lo tanto el $\Delta\psi_m$ se mantiene, indicando que p66Shc debe translocar hacia la organela para alterar la permeabilidad mitocondrial. Si bien varias investigaciones han reportado que el E_2 ejerce efectos beneficiosos sobre las mitocondrias, no se conoce totalmente cuál es el mecanismo molecular que activa la hormona para proteger a esta organela. Los resultados aquí presentados describen algunos de los componentes involucrados en el mecanismo molecular complejo que se activa en presencia del esteroide

para proteger a la mitocondria y que, en consecuencia, conduce a un efecto antiapoptótico.

Las mitocondrias son la principal fuente de ROS, moléculas generadas como resultado del normal funcionamiento de las células que desempeñan papeles fundamentales en la señalización celular. Sin embargo, se sabe que cuando los niveles de ROS son excesivos y sobrepasan la capacidad de detoxificación celular, pueden tener efectos perjudiciales en las células. De hecho, niveles aumentados de ROS pueden provocar la apertura sostenida del MPTP (Petronilli et al., 1994). En este sentido, las enzimas antioxidantes son fundamentales para contrarrestar los efectos negativos de ROS y proteger a las células del daño oxidativo.

En esta tesis, se observa que la hormona E₂ es capaz de regular a las enzimas MnSOD, catalasa y GPx. Se ha sugerido que la enzima MnSOD presenta un papel importante en la supervivencia celular al mismo tiempo que es necesaria para el mantenimiento de la integridad mitocondrial en células expuestas a estrés oxidativo (Oberley, 2004). En concordancia, se observó que la hormona induce un incremento en los niveles de expresión proteica y en la actividad de la enzima mitocondrial MnSOD en células C2C12. La utilización del antagonista fulvestrant, al igual que en experimentos anteriores, pone de manifiesto que este efecto de la hormona es mediado por su ER. Debido a que MnSOD no presenta elementos de respuesta al E₂ (EREs) en su promotor, puede postularse que E₂ regularía a nivel nuclear la transcripción génica de esta enzima antioxidante a través de la intervención de NF-κB, que se sabe presenta motivos de unión en este promotor (Zhou et al., 2001). De esta forma, MnSOD prepararía a la célula para resistir a una señal apoptótica. En efecto, esta enzima antioxidante es codificada a nivel nuclear pero se localiza en mitocondria, donde se encuentra el anión superóxido producido por la cadena transportadora de electrones, al que esta enzima transformará en H₂O₂ y O₂, especies menos nocivas para el organismo. Asimismo, se evidenció que en respuesta al tratamiento con el agente apoptótico, los niveles

de expresión proteica de MnSOD se encuentran disminuidos, conduciendo a la reducción de la capacidad antioxidante en las células C2C12. La incubación con E₂ previo a la inducción de la apoptosis condujo a un aumento en los niveles de expresión de MnSOD, poniendo de manifiesto, una vez más, el efecto protector de esta hormona y demostrando que estas acciones se incluyen dentro de los mecanismos activados por E₂ que contribuyen directamente a la protección mitocondrial. Este efecto beneficioso de la hormona sobre la mitocondria es de suma importancia ya que la organela es el principal sitio blanco de la acción perjudicial de las ROS. No puede descartarse la participación de p53 en estos efectos observados. Este factor de transcripción reprime, mediante la unión a su promotor, la expresión de MnSOD (Pani et al., 2000). En efecto, ya se discutió que p53 es activado por el agente apoptótico y que E₂ previene su fosforilación. Por lo tanto, se podría hipotetizar que p53 sería el encargado de regular negativamente la transcripción de MnSOD en células C2C12.

Así también, otras enzimas antioxidantes como la catalasa y la glutatión peroxidasa pueden actuar para defender a las células frente al estrés oxidativo. Los resultados obtenidos en esta tesis indican que la hormona es capaz de regular positivamente la actividad de la enzima GPx, pero a diferencia de lo que ocurre con la MnSOD, no afecta su expresión proteica. La utilización del antagonista fulvestrant pone de manifiesto que este efecto activado específicamente por la hormona es mediado por su ER. Sin embargo, cuando se evaluó el efecto del agente apoptótico, se observó que este no induce cambios significativos en la actividad de esta enzima antioxidante. Por otra parte, la hormona también fue capaz de regular positivamente la actividad de la enzima catalasa y, en este caso, específicamente a través del ER α . Asimismo, se evidenció que en respuesta al tratamiento con el agente apoptótico, la actividad de la catalasa fue disminuida, reduciéndose la capacidad antioxidante en las células C2C12. La incubación con E₂ antes de la inducción de apoptosis condujo a un aumento en la actividad de la catalasa, revelando que la hormona ejerce su efecto beneficioso en células C2C12 modulando la actividad de esta enzima.

Los resultados obtenidos para las tres enzimas antioxidantes en esta tesis, respecto a su regulación por E₂, concuerdan con datos previos de este laboratorio con los cuales se estableció que el período de preincubación con el esteroide de 1h es el más apropiado para poner de manifiesto el efecto protector de la hormona frente al estímulo apoptótico (Vasconsuelo et al., 2008). De acuerdo con esas condiciones, las tres enzimas estudiadas demostraron aumentos en su actividad luego de una hora de incubación con E₂. En conjunto, estos datos avalan que si bien bajo condiciones apoptóticas disminuye la capacidad antioxidante de las células, E₂ contribuye a revertir este efecto perjudicial mediante la modulación de la actividad y/o expresión de las enzimas antioxidantes MnSOD, catalasa y GPx.

Sin embargo, más allá de la intervención del E₂ y sus ERs en la modulación de funciones mitocondriales y enzimas antioxidantes, clásicamente, a los estrógenos se los ha conocido por sus efectos a nivel nuclear, interviniendo en la regulación de la transcripción génica. Por ello, en este trabajo de tesis, también se consideró y evaluó si el E₂ podía ejercer su rol protector mediante la regulación de diferentes miembros a nivel transcripcional. En este sentido, debido a que la modulación de la expresión de proteínas de la familia Bcl-2 puede suceder por regulación a nivel transcripcional, por modificaciones post-traduccionales o por degradación mediada por el proteosoma (Strasser et al., 2011); un mecanismo activado por el E₂ para ejercer su rol protector podría incluir la regulación de estos miembros a nivel transcripcional, actuando tanto sobre aquellos que promueven la supervivencia celular como sobre los que la antagonizan (Antonsson y Martinou, 2000). Los niveles relativos de proteínas pro y antiapoptóticas reflejan la interrelación de múltiples señales y diferentes vías de señalización en el interior celular. En efecto, la conjunción de los efectos derivados de la regulación positiva de proteínas antiapoptóticas, la regulación negativa de miembros proapoptóticos y de las consecuencias de sus interacciones pueden contribuir a la acción protectora del E₂. Sin embargo, la relación existente entre la acción de la hormona y la expresión de los miembros de la familia Bcl-2 en la apoptosis no se ha dilucidado totalmente.

La proteína Bcl-2 pertenece al subgrupo de miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2. La transcripción del gen que codifica para esta proteína está controlada por dos promotores: P1 y P2 (Seto et al., 1988). Sin embargo, estos no presentan elementos de respuesta al E₂ (EREs) (Perillo et al., 2000). Si bien generalmente los EREs se localizan en los promotores, también se han identificado en otras regiones (Hyder et al., 1992; Hyder et al., 1995). En células MCF-7 de cáncer mamario humano, se ha reportado que el E₂ induce la transcripción de Bcl-2 mediante la interacción con EREs no presentes en los promotores (Perillo et al., 2000).

En esta tesis, en la línea celular de mioblastos C2C12, se evidenció que la apoptosis inducida por H₂O₂ involucra la modulación negativa de la transcripción del gen que codifica para Bcl-2, mientras que el tratamiento con E₂ antes de la inducción de apoptosis pone en evidencia que uno de los mecanismos que dispara la hormona esteroidea para ejercer su rol antiapoptótico es la regulación positiva a nivel transcripcional de este gen antiapoptótico.

Como fue expuesto en la Introducción, dentro de la familia Bcl-2 se encuentra el subgrupo de proteínas solo-BH3 que incluye a las proteínas proapoptóticas Bim, Noxa y PUMA, entre otras. Se han planteado diferentes modelos para explicar las consecuencias celulares de las interacciones entre los tres grupos que conforman esta familia (miembros antiapoptóticos, proapoptóticos efectores y proapoptóticos solo-BH3) que pueden resultar en supervivencia o muerte celular. Sin embargo, ninguno de ellos clarifica fehacientemente un aspecto muy ambiguo que resulta de la interacción entre las proteínas solo-BH3 y los miembros antiapoptóticos, tal como ocurre entre Bim y Bcl-2 (Chen et al., 2005). Si una proteína activadora solo-BH3 se une a un miembro antiapoptótico puede suceder que la proteína antiapoptótica secuestre a la proteína solo-BH3, o que la proteína BH3 secuestre al miembro antiapoptótico. Así también, se podría pensar que la interacción entre ambas proteínas conduce al secuestro mutuo de ambas, previniendo sus efectos inhibitorios y activadores sobre las proteínas

efectoras proapoptóticas de la familia. El efecto final observado estará estrictamente relacionado con la prevalencia en la expresión de una u otra proteína de acuerdo al tipo celular interviniente, y a la clase y condiciones ensayadas del agente inductor de apoptosis.

En la presente tesis, se observó que en células C2C12 el gen que codifica para Bim es regulado a nivel transcripcional en la apoptosis inducida por H_2O_2 . En vista de la capacidad de la proteína Bcl-2 de interaccionar con Bim, los resultados obtenidos en este trabajo en los que se visualiza que el agente apoptótico disminuye los niveles de expresión del ARNm de Bcl-2 junto con niveles aumentados de Bim, sugieren que primaría la acción apoptótica de la proteína solo-BH3, quien no podría ser secuestrada en su totalidad por Bcl-2 y el balance resultante conduciría a la muerte celular. En contraposición, el tratamiento con la hormona previo a la inducción de la apoptosis si bien condujo a niveles de expresión de Bim elevados, al mismo tiempo incrementó los niveles de expresión del ARNm de Bcl-2 lo que, como consecuencia de la interacción entre las proteínas derivadas Bim y Bcl-2, podría regular negativamente la actividad de Bim y conducir a la inhibición de la acción apoptótica mediada por Bim.

Como se describió en la Introducción, muchos de los efectos de p53 son mediados a través de la activación o represión transcripcional de diferentes genes blanco. Junto con la proteína Noxa que generalmente presenta una actividad minoritaria, PUMA es un miembro fundamental para la actividad proapoptótica de p53 (Yu y Zhang, 2008). En condiciones fisiológicas normales, se expresan bajos niveles de PUMA, pero rápidamente puede inducirse su expresión en respuesta a diversas situaciones de estrés en diferentes tejidos (Yu et al., 2001). En efecto, mediante RT-qPCR, se demuestra en este trabajo que PUMA es regulada positivamente a nivel transcripcional en respuesta al tratamiento con H_2O_2 , mientras que la hormona previene este efecto provocando la disminución de los niveles de su ARNm para así contrarrestar el rol apoptótico de este miembro de la familia Bcl-2. Sin embargo, no se observaron cambios en el nivel de expresión del

ARNm de Noxa en la apoptosis inducida por H₂O₂ en este modelo experimental. Se podría postular que PUMA, pero no así Noxa, sería un gen blanco de p53 activado en respuesta a niveles elevados de ROS, puesto que presentan el mismo patrón de activación/aumento de expresión, lo que conduciría a la muerte celular de los mioblastos y constituiría, asimismo, un gen capaz de ser modulado por el E₂ mediante el cual ejercería su rol protector.

En la apoptosis relacionada a p53, es necesaria la regulación transcripcional de varios genes blanco que, actuando de manera coordinada, inducen la muerte celular. Como se mencionó en la Introducción, PERP es otro de los genes sobre los cuales p53 puede actuar para inducir apoptosis. En este trabajo se demuestra que en células C2C12 el gen que codifica para PERP es regulado positivamente a nivel transcripcional por el inductor de apoptosis H₂O₂. Asimismo, tal como se evidenció para PUMA, el tratamiento con la hormona previo a la inducción de apoptosis conduce a la disminución de los niveles de su ARNm, mostrando que E₂ puede ejercer su efecto protector modulando negativamente a PERP a nivel transcripcional para así ejercer su rol antiapoptótico. Podría hipotetizarse que p53 es el encargado de estimular la transcripción de PERP, puesto que comparten el patrón de activación/aumento de expresión.

En células bajo condiciones fisiológicas normales, el tiempo de vida media de p53 es de minutos, sin embargo, diferentes situaciones de estrés prolongan su tiempo de vida media a horas (Maltzman y Czyzyk, 1984). De hecho, los niveles celulares de p53 están principalmente determinados por su tasa de degradación más que por su síntesis (Harris y Levine, 2005). La ubiquitina ligasa MDM2 es la proteína más importante en la asociación directa con p53 que resulta en su ubiquitinización y su consecuente degradación (Fuchs et al., 1998a; Haupt et al., 1997; Honda et al., 1997; Kubbutat et al., 1997). Entre p53 y MDM2 existe un mecanismo regulatorio de retroalimentación que es esencial para mantener los niveles de p53 estrictamente regulados en células estresadas y no estresadas. Sin embargo, también existen controles adicionales a través de modificaciones

postraduccionales, principalmente mediante la fosforilación en el residuo Ser¹⁵ de p53 (Appella y Anderson, 2001), que afectaría la interacción p53-MDM2 y, en consecuencia, influiría en la naturaleza de los genes blanco transcritos (Mayo et al., 2005). Asimismo, se ha reportado que FoxO3a puede ser degradado mediante ubiquitinización y degradación mediada por el proteosoma, procesos en los que estaría involucrada MDM2 (Plas y Thompson, 2003) y que requeriría de la participación de ERK (Yang et al., 2008). Se ha evidenciado, además, que la fosforilación mediada por Akt de este factor de transcripción también puede conducir a su degradación mediada por el proteosoma (Plas y Thompson, 2003).

En esta tesis, se evidenció que la regulación de MDM2 a nivel transcripcional en la apoptosis inducida por H₂O₂ presenta dos comportamientos disímiles de acuerdo al período de la apoptosis que se esté evaluando en células C2C12. En el inicio de la apoptosis (30 min y 1h), el tratamiento con H₂O₂ modula positivamente a MDM2 a nivel transcripcional, de modo de favorecer su nueva síntesis proteica, la interacción entre p53-MDM2 y p-FoxO3a-MDM2, y la consecuente degradación de las primeras. La regulación positiva de MDM2 mediada por H₂O₂ en períodos tempranos de la apoptosis aquí observada podría deberse a una primera respuesta celular para protegerse de la apoptosis, favoreciendo la degradación de p53 y FoxO3a (fosforilado/inactivo). El período de incubación de 1h con el agente apoptótico pareciera ser un punto de inflexión clave en la apoptosis dependiente de p53 y FoxO3a. En este período (1h) se inicia la activación de quinasas claves para el progreso apoptótico, comienza la fosforilación de p53 en Ser¹⁵, al mismo tiempo que FoxO3a es regulado adicionalmente por JNK (discutido anteriormente), eventos que se encontrarían relacionados con la posterior disminución en el nivel de expresión del ARNm de MDM2 a niveles similares a los basales (3h y 4h de tratamiento). Esto sugiere que en períodos más avanzados del proceso apoptótico, la modificación postraduccionales que sufre p53 y la activación de nuevas vías de señalización que afectan a FoxO3a, influiría en el control transcripcional de MDM2, lo que conduciría a niveles de MDM2 similares a los basales, y en consecuencia,

disminuiría la tasa de degradación de p53 y FoxO3a, inclinando el equilibrio hacia la apoptosis. Por su parte, la hormona regula positivamente la expresión de su ARNm, de manera de favorecer la ubiquitinización y degradación de p53 activa, demostrando su rol antiapoptótico. Respecto a FoxO3a, la hormona no ejercería ningún efecto sobre la degradación del mismo en este período, puesto que FoxO3a activo/no fosforilado no es capaz de interaccionar con MDM2.

Si bien, hasta el momento, no se ha descrito totalmente el mecanismo mediante el cual la ubiquitina ligasa MDM2 interviene en la degradación de FoxO3a, se ha propuesto a ERK como la quinasa promotora de su ubiquitinización (Yang et al., 2008). En concordancia, los resultados obtenidos mediante la utilización de un inhibidor específico sugieren que ERK estaría relacionada con la regulación positiva de MDM2 mediada por el agente apoptótico en períodos tempranos del proceso de apoptosis. De esta manera, no solo Akt, sino también ERK, al actuar sobre FoxO3a promoverían un efecto de supervivencia, al favorecer la degradación de p-FoxO3a y, consecuentemente, impedir la transcripción de genes proapoptóticos.

Hasta el momento, se ha evidenciado en esta tesis que bajo condiciones de estrés, las células C2C12 podrán activar diferentes vías de señalización intracelular que afectarían funciones mitocondriales y enzimas antioxidantes, así como también regularían la expresión de diversos genes blanco a nivel nuclear, dependiendo del período del proceso apoptótico en el que se encuentre. Mientras que la hormona E₂ regula de manera opuesta los eventos proapoptóticos activados por el H₂O₂. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que las células no se encuentran aisladas, sino que, por el contrario, reciben influencias derivadas de las células cercanas a través de redes de comunicación intercelular. De este modo, en cierta medida, las células son capaces de detectar la señal de estrés que ha afectado a su célula vecina. Tal como se describió en la Introducción, durante la apoptosis, se ha reportado la formación de estructuras tubulares que

interconectan a las células, llamadas TNTs, que intervienen en la comunicación celular, permitiendo el pasaje de diversos componentes (Rustom et al., 2004).

La presencia de TNTs ha sido descrita en varios tipos celulares, por ejemplo entre células progenitoras endoteliales y cardiomiocitos, células madre mesenquimales y cardiomiocitos, entre células PC12, y entre astrocitos (Koyanagi et al., 2005; Plotnikov et al., 2008; Rustom et al., 2004, Wang et al., 2011). En este trabajo de tesis, se observa que en las células C2C12 expuestas al agente apoptótico se favorece la comunicación intercelular a través de la formación de estructuras tipo-TNT. Sin embargo, el tratamiento con E_2 antes de la inducción de apoptosis produce una disminución de estas estructuras de membrana. Asimismo, se sabe que estos TNTs pueden permitir el tráfico de pequeñas moléculas, organelas y/o vesículas entre las células interconectadas, ya que están conformados por diferentes componentes del citoesqueleto que permiten este pasaje. En este trabajo de tesis, se observó que la estructura de estas proyecciones tipo-TNT en células C2C12 está formada, no solo por filamentos de actina, sino también por microtúbulos, en concordancia con estudios previos en células humanas de cáncer de próstata, macrófagos y células H9c2 (He et al., 2010; Onfelt et al., 2006; Vidulescu et al., 2004). Entonces, estos filamentos del citoesqueleto cumplirían un rol importante en el transporte a través de las estructuras tipo-TNT.

Si bien hasta el momento no se ha esclarecido totalmente el mecanismo molecular mediante el cual se produce el pasaje de información a través de los TNTs, en esta tesis en células C2C12 se observa la transferencia de mitocondrias a través de estos nanotubos e, incluso, se las ha evidenciado dentro del nanotubo, en el tránsito hacia su célula receptora. Sin embargo, no puede desestimarse que existan otras vías de transferencia mitocondrial e, incluso, que se transporten otras organelas y/o moléculas a través de los TNTs. Los experimentos realizados en esta tesis sugieren que, durante el inicio de la apoptosis (1h), se promovería la formación de estas estructuras de membrana tipo-TNT con el fin de favorecer el

pasaje de mitocondrias. En concordancia con otros datos obtenidos en esta tesis que sugieren que, en este período del proceso apoptótico, las células C2C12 activan diferentes mecanismos para enfrentar a este estímulo de muerte y promover su supervivencia, se observó que cuando se cocultivaban células tratadas y no tratadas con H_2O_2 , el pasaje de mitocondrias sucedía desde las células sanas (no tratadas) hasta las células expuestas al estímulo apoptótico. Sin embargo, cuando se realizaron los mismos ensayos pero en presencia de E_2 , se evidenció que la hormona inducía una disminución de la transferencia mitocondrial a través de los nanotubos. Este último hallazgo se relacionaría con la reducción, discutida en párrafos anteriores, de la formación de estas estructuras de membrana cuando las células son expuestas al esteroide antes de la inducción de apoptosis. Estos resultados, en conjunto, sugieren que las estructuras tipo-TNT cumplirían un rol en el rescate celular que se observa en el inicio de la apoptosis en las células C2C12. En este sentido, la disfunción mitocondrial derivada de la apertura sostenida del MPTP y de la pérdida del $\Delta\Psi_m$ presente en una proporción de las células C2C12 tratadas con H_2O_2 , podría ser restablecida mediante la transferencia de mitocondrias desde las células sanas. El intento celular de sobrevivir al estímulo apoptótico sería el causante del aumento en la formación de estos nanotubos. Mientras que los resultados obtenidos en presencia de E_2 sugieren que, debido al efecto protector derivado de la acción de esta hormona sobre la preservación del MPTP y el $\Delta\Psi_m$, las células C2C12 no necesitarían establecer tantas conexiones celulares para permitir el pasaje de mitocondrias sanas. Este comportamiento se ha reportado en cocultivos de células PC12, y de células madre mesenquimales y células endoteliales (Liu et al., 2014; Wang y Gerdes, 2015). Sin embargo, el efecto del E_2 sobre la formación de estructuras tipo-TNT y sobre la transferencia de mitocondrias a través de ellos en cocultivos celulares, hasta el momento, no ha sido descrito por otros autores.

Finalmente, si bien es indudable la complejidad de los mecanismos que se activan en una célula frente a estímulos de muerte o supervivencia, los datos presentados en esta tesis contribuyen al esclarecimiento de los eventos

moleculares que se desencadenan en la apoptosis y su regulación por la hormona E₂ en un modelo de envejecimiento muscular. Este conocimiento es un factor fundamental para el desarrollo de nuevos diseños farmacológicos de potencial aplicación terapéutica en alteraciones musculares por desregulación de la apoptosis asociada a desbalance hormonal.

Conclusiones

Las conclusiones de este trabajo doctoral de tesis son:

- La inducción de apoptosis por H_2O_2 en mioblastos murinos C2C12 conduce a la activación/fosforilación temprana de PKD, y posteriormente de JNK, PKC δ , PKC θ , p53 y p66Shc, efectos que son revertidos por el pretratamiento con E_2 .
- PKC δ actúa *upstream* JNK en la cascada apoptótica activada por H_2O_2 en células C2C12.
- JNK, pero no PKC δ , actúa *upstream* p66Shc en la cascada apoptótica activada por H_2O_2 en células C2C12, promoviendo la translocación hacia mitocondria de la proteína Shc.
- Al comienzo de la apoptosis inducida por H_2O_2 en células C2C12, FoxO3a es regulado negativamente por Akt, mientras que posteriormente es regulado por JNK, al mismo tiempo que FoxO4 es regulado positivamente por esta misma quinasa. El E_2 ejerce su efecto protector modulando la actividad de estos factores de transcripción.
- E_2 , a través de su receptor, regula positivamente las actividades enzimáticas de MnSOD, GPx y CAT. La disminución de la capacidad antioxidante inducida por H_2O_2 en células C2C12 es revertida por el pretratamiento con E_2 .
- E_2 previene la apertura prolongada del MPTP, la pérdida del $\Delta\Psi_m$ y la translocación de Bax a mitocondria inducidas por el H_2O_2 en células C2C12.
- La inducción de apoptosis por H_2O_2 en células C2C12 conduce a la regulación negativa a nivel transcripcional de la proteína antiapoptótica Bcl-2 y a la regulación positiva a nivel transcripcional de las proteínas proapoptóticas p66Shc, PUMA y PERP. Estos efectos transcripcionales generados por el inductor de apoptosis son prevenidos por la exposición a E_2 .

- La regulación a nivel transcripcional de la proteína proapoptótica Bim se encuentra en estricta relación con la transcripción de la proteína antiapoptótica Bcl-2, que inclinaría la balanza hacia la muerte celular. Este efecto transcripcional sería prevenido por el tratamiento con E₂.
- La regulación a nivel transcripcional de MDM2, regulada por ERK, podría estar relacionada con la degradación de p53 y FoxO3a (fosforilado).
- La inducción de apoptosis mediada por el H₂O₂ en células C2C12 conduce a la formación de estructuras tipo-TNT formadas por filamentos de actina y microtúbulos, encargados del tráfico de mitocondrias sanas para rescatar a las células estresadas en el inicio de la apoptosis.

Las conclusiones presentadas en este trabajo de tesis doctoral resumen los mecanismos moleculares activados en la apoptosis inducida por H₂O₂ en células mioblásticas murinas C2C12 que son regulados por E₂ para ejercer su efecto antiapoptótico (Figura C1). Los resultados obtenidos en este estudio son de relevancia para la fisiología del músculo esquelético, puesto que las células C2C12 se asemejan a las células satélites que rodean a las fibras musculares esqueléticas maduras. Debido a que las fibras musculares diferenciadas presentan escasa/nula capacidad regenerativa en respuesta a una injuria, las células satélites son las encargadas de reparar el músculo dañado por su capacidad de proliferar y diferenciarse para formar nuevo músculo. En este contexto, la respuesta que presentan las células satélites al estrés oxidativo es importante para un adecuado funcionamiento/regeneración del músculo esquelético. Dado que se ha relacionado al aumento de la apoptosis de células satélites que se observa durante el envejecimiento con una comprometida recuperación del músculo en animales, el conocimiento de estos mecanismos moleculares que se presentan en miopatías del envejecimiento, cuando los niveles hormonales son bajos, contribuirían al planeamiento de nuevas estrategias terapéuticas para su tratamiento, que podrían focalizarse en los diversos blancos

Referencias

Acconcia, F., Ascenzi, P., Bocedi, A., Spisni, E., Tomasi, V., Trentalance, A., Visca, P., Marino, M. (2005) Palmitoylation-dependent estrogen receptor membrane localization regulation by 17- β -estradiol. *Mol. Biol. Cell*, 16: 231-237.

Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D.G., Heuser, J.E., Wang, X., Akey, C.W. (2002) Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol. Cell*, 9: 423-432.

Adams, J.M. (2003) Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev.*, 17: 2481-2495.

Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol.*, 105: 121-126.

Aguirre, C.C., Baudry, M. (2009) Progesterone reverses 17 β -estradiol-mediated neuroprotection and BDNF induction in cultured hippocampal slices. *Eur. J. Neurosci.*, 29: 447-454.

Ahmad, T., Mukherjee, S., Pattnaik, B., Kumar, M., Singh, S., Rehman, R., Tiwari, B.K., Jha, K.A., Barhanpurkar, A.P., Wani, M.R., Roy, S.S., Mabalirajan, U., Ghosh, B., Agrawal, A. (2014) Miro1 regulates intercellular mitochondrial transport & enhances mesenchymal stem cell rescue efficacy. *EMBO J.*, e201386030.

Ahnadi, C.E., Giguère, P., Gravel, S., Gagné, D., Goulet, A.C., Fülöp, T., et al. (2000) Chronic PMA treatment of Jurkat T lymphocytes results in decreased protein tyrosine phosphorylation and inhibition of CD3-but not Ti-dependent antibody-triggered Ca²⁺ signaling. *J. Leukoc. Biol.*, 68: 293-300.

Allen, E., Doisy, E.A. (1923) An ovarian hormone: preliminary report on its localization, extraction and partial purification, and action in test animals. *Jama*, 81: 819-821.

Almeida, M., Martin-Millan, M., Ambrogini, E., Bradsher, R., Han, L., Chen, X.D., Roberson, P.K., Weinstein, R.S., O'Brien, C.A., Jilka, R.L., Manolagas, S.C. (2010)

Estrogens attenuate oxidative stress and the differentiation and apoptosis of osteoblasts by DNA-binding-independent actions of the ER α . *J. Bone Miner. Res.*, 25: 769-781.

Andersson, G., Enmark, E., Pettersson, K., Warner, M., Gustafsson, J.A. (2001) Mechanisms of estrogen action. *Physiol. Rev.*, 81:1535-1565.

Antignani, A., Youle, R.J. (2006) How do Bax and Bak lead to permeabilization of the outer mitochondrial membrane? *Curr. Opin. Cell Biol.*, 18: 685-689.

Antonsson, B., Martinou, J.C. (2000). The Bcl-2 protein family. *Exp. Cell Res.*, 256: 50-57.

Appella, E., Anderson, C.W. (2001) Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur. J. Biochem.*, 268: 2764-2772.

Arkwright, P.D., Luchetti, F., Tour, J., Roberts, C., Ayub, R., Morales, A.P., Rodríguez, J.J., Gilmore, A., Canonico, B., Papa, S., Esposti, M.D. (2010) Fas stimulation of T lymphocytes promotes rapid intercellular exchange of death signals via membrane nanotubes. *Cell Res.*, 20: 72-88.

Armstrong, J.S. (2006) The role of the mitochondrial permeability transition in cell death. *Mitochondrion*, 6: 225-234.

Aronica, S.M., Kraus, W.L., Katzenellenbogen, B.S. (1994) Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91: 8517-8521.

Aschheim, S., Zondek, B. (1927) Das Hormon des Hypophysenvorderlappens. *Klin. Wchnschr.*, 6: 248-252.

Ashkenazi, A., Dixit, V.M. (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281: 1305-1308.

Attardi, L.D., Lowe, S.W., Brugarolas, J., Jacks, T. (1996) Transcriptional activation

by p53, but not induction of the p21 gene, is essential for oncogene-mediated apoptosis. *EMBO J.*, 15: 3693.

Attardi, L.D., Reczek, E.E., Cosmas, C., Demicco, E.G., McCurrach, M.E., Lowe, S.W., Jacks, T (2000) PERP, an apoptosis associated target of p53, is a novel member of the PMP-22/gas3 family. *Genes Dev.*, 14: 704-718.

Au, P.Y.B., Yeh, W.C. (2007). Physiological roles and mechanisms of signaling by TRAF2 and TRAF5. In *TNF Receptor Associated Factors (TRAFs)* 32-47. Springer New York.

Bai, L., Zhu, W.G. (2006) p53: structure, function and therapeutic applications. *J. Cancer Mol.*, 2: 141-153.

Baltgalvis, K.A., Greising, S.M., Warren, G.L., Lowe, D.A. (2010). Estrogen regulates estrogen receptors and antioxidant gene expression in mouse skeletal muscle. *PLoS One*, 5: e10164.

Barak, Y., Gottlieb, E., Juven-Gershon, T., Oren, M. (1994) Regulation of mdm2 expression by p53: alternative promoters produce transcripts with nonidentical translation potential. *Genes Dev.* 8, 1739-1749.

Barnhart, B.C., Alappat, E.C., Peter, M.E. (2003) The CD95 type I/type II model. *Semin. Immunol.*, 15: 185-193.

Beato, M. (1989) Gene regulation by steroid hormones. *Cell*, 56: 335-344.

Bennett, N.C., Hooper, J.D., Lambie, D., Lee, C.S., Yang, T., Vesey, D.A., et al. (2012) Evidence for steroidogenic potential in human prostate cell lines and tissues. *Am. J. Pathol.*, 181: 1078-1087.

Biggs, W.H.I., Meisenhelder, J., Hunter, T., Cavenee, W.K., Arden, K.C. (1999) Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 96: 7421-

7426.

Blass, M., Kronfeld, I., Kazimirsky, G., Blumberg, P., Brodie, C. (2002) Tyrosine phosphorylation of protein kinase C delta is essential for its apoptotic effect in response to etoposide. *Mol. Cell. Biol.*, 22: 182-195.

Bogoyevitch, M.A., Kobe, B. (2006). Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases. *MMBR*, 70: 1061-1095.

Bokoch, G.M. (1998) Caspase-mediated activation of PAK2 during apoptosis: proteolytic kinase activation as a general mechanism of apoptotic signal transduction? *Cell Death Differ.*, 5: 637-645.

Boland, R., Vasconsuelo, A., Milanesi, L., Ronda, A.C., de Boland, A.R. (2008) 17 β -Estradiol signaling in skeletal muscle cells and its relationship to apoptosis. *Steroids*, 73: 859-863.

Borrás, C., Gambini, J., López-Grueso, R., Pallardó, F.V., Viña, J. (2010) Direct antioxidant and protective effect of estradiol on isolated mitochondria. *BBA-Mol. Basis Dis.*, 1802: 205-211.

Boveris, A., Chance, B.C. (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.*, 143: 707-716.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.

Brodie, C., Blumberg, P.M. (2003) Regulation of cell apoptosis by protein kinase c δ . *Apoptosis*, 8: 19-27.

Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M., Arden, K.C., Blenis, J., Greenberg, M.E. (1999). Akt promotes cell survival by

phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*, 96: 857-868.

Brunet, A., Kanai, F., Stehn, J., Xu, J., Sarbassova, D., Frangioni, J.V., Dalal, S.N., De Caprio, J.A., Greenberg, M.E., Yaffe, M.B. (2002) 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *J. Cell. Biol.*, 156: 817-828.

Brunet, A., Sweeney, L.B., Sturgill, J.F., Chua, K.F., Greer, P.L., Lin, Y., Tran, H., Ross, S.E., Mostoslavsky, R., Cohen, H.Y., Hu, L.S., Cheng, H-L., Jedrychowski, M.P., Gygi, S.P., Sinclair, D.A., Alt, F.W., Greenberg, M.E. (2004) Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science*, 303: 2011-2015.

Burattini, S., Ferri, P., Battistelli, M., Curci, R., Luchetti, F., Falcieri, E. (2004) C2C12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle development: morpho-functional characterization. *Eur. J. Histochem.*, 48: 223-233.

Bursch, W., Oberhammer, F., Schulte-Hermann, R. (1992) Cell death by apoptosis and its protective role against disease. *Trends Pharmacol. Sci.*, 13: 245-251.

Byers, T., Bowman, B. (1993) Vitamin E supplements and coronary heart disease. *Nutrition Rev.*, 51: 333-336.

Caelles, C., Helmberg, A., Karin, M. (1994) p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature*, 370: 220-223.

Calnan, D.R., Brunet, A. (2008) The foxo code. *Oncogene*, 27: 2276-2288.

Chahdi, A., Sorokin, A. (2008) Endothelin-1 Couples β Pix to p66Shc: Role of β Pix in Cell Proliferation through FOXO3a Phosphorylation and p27^{kip1} Down-Regulation Independently of Akt. *Mol. Biol. Cell*, 19: 2609-2619.

Chambliss, K.L., Yuhanna, I.S., Anderson, R.G., Mendelsohn, M.E., Shaul, P.W. (2002) ER β has nongenomic action in caveolae. *Mol. Endocrinol.*, 16: 938-946.

Chan, F.K., Chun, H.J., Zheng, L., Siegel, R.M., Bui, K.L., Lenardo, M.J. (2000) A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science*, 288: 2351-2354.

Chang, H.Y., Yang, X. (2000) Proteases for Cell Suicide: Functions and Regulation of Caspases. *MMBR*, 64: 821-846.

Chen, J.Q., Delannoy, M., Cooke, C., Yager, J.D. (2004a) Mitochondrial localization of ER alpha and ER beta in human MCF7 cells. *Am. J. Physiol.*, 286: E1011-E1022.

Chen, J.Q., Eshete, M., Alworth, W.L., Yager, J.D. (2004b) Binding of MCF-7 cell mitochondrial proteins and recombinant human estrogen receptors alpha and beta to human mitochondrial DNA estrogen response elements. *J. Cell. Biochem.*, 93: 358-373.

Chen, L., Willis, S.N., Wei, A., Smith, B.J., Fletcher, J.I., Hinds, M.G., Colman, P.M., Day, C.L., Adams, J.M., Huang, D. C. (2005) Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol. Cell*, 17: 393-403.

Chen, Z., Wang, G., Zhai, X., Hu, Y., Gao, D., Ma, L., Yao, J., Tian, X. (2014) Selective inhibition of protein kinase C β 2 attenuates the adaptor P66Shc-mediated intestinal ischemia–reperfusion injury. *Cell Death Dis.*, 5: e1164.

Cheng, J., Wu, Y., Mohler, J.L., Ip, C. (2010) The transcriptomics of de novo androgen biosynthesis in prostate cancer cells following androgen reduction. *Cancer Biol. Ther.*, 9: 1033-1042.

Chipuk, J.E., Green, D.R. (2008) How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol.*, 18: 157-164.

Chipuk, J.E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M.J., Green, D.R. (2010) The BCL-2 family reunion. *Mol. Cell*, 37: 299-310.

Clancy, L., Mruk, K., Archer, K., Woelfel, M., Mongkolsapaya, J., Screaton, G., Lenardo, M. J., Chan, F.K. (2005) Preligand assembly domain-mediated ligand-independent association between TRAIL receptor 4 (TR4) and TR2 regulates TRAIL-induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102: 18099-18104.

Coffey, E.T. (2014) Nuclear and cytosolic JNK signalling in neurons. *Nat. Rev. Neurosci.*, 15: 285-299.

Colson, B.A., Petersen, K.J., Collins, B.C., Thomas, D.D., Lowe, D.A. (2015). The Myosin Super-Relaxed State is regulated by Estradiol. *Biophys. J.*, 108: 339a.

Corbalán-García, S., Gómez-Fernández, J.C. (2006) Protein kinase C regulatory domains: the art of decoding many different signals in membranes. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Biol. Lipids*, 1761: 633-654.

Couse, J.F., Korach, K.S. (1999) Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us. *Endocr. Rev.*, 20: 358-417.

Crawford, E.D., Wells, J.A. (2011) Caspase substrates and cellular remodeling. *Ann. Rev. Biochem.*, 80: 1055-1087.

Crompton, M. (1999) The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J.*, 341: 233-249.

Cselenyak, A., Pankotai, E., Horvath, E.M., Kiss, L., Lacza, Z. (2010) Mesenchymal stem cells rescue cardiomyoblasts from cell death in an in vitro ischemia model via direct cell-to-cell connections. *BMC Cell Biol.*, 11: 29.

Czerwinski, R., Aulabaugh, A., Greco, R. M., Olland, S., Malakian, K., Wolfrom, S., Lin, L., Kriz, R., Stahl, M., Huang, Y., Liu, L., Chaudhary, D. (2005) Characterization of protein kinase C θ activation loop autophosphorylation and the kinase domain catalytic mechanism. *Biochemistry*, 44: 9563-9573.

Davis, R.J. (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*, 103:

239-252.

Davis, D.M., Sowinski, S. (2008) Membrane nanotubes: dynamic long-distance connections between animal cells. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 9: 431-436.

Dempsey, E.C., Newton, A.C., Mochly-Rosen, D., Fields, A.P., Reyland, M.E., Insel, P.A., Messing, R.O. (2000) Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.*, 279: L429-L438.

Dhar, S.K., Xu, Y., St. Clair, D.K. (2010) Nuclear Factor κ B- and Specificity Protein 1-dependent p53-mediated Bi-directional Regulation of the Human Manganese Superoxide Dismutase Gene. *J. Biol. Chem.*, 285: 9835-9846.

Dijkers, P.F., Medema, R.H., Lammers, J.W.J., Koenderman, L., Coffey, P.J. (2000). Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr. Biol.*, 10: 1201-1204.

Dionne, I.J., Kinaman, K.A., Poehlman, E.T. (1999) Sarcopenia and muscle function during menopause and hormone-replacement therapy. *J. Nutr. Health Aging*, 4: 156-161.

Diplock, A.T. (1994) Antioxidants and disease prevention. *Mol. Aspects Med.*, 15: 293-376.

Dirks, A.J., Leeuwenburgh, C. (2005) The role of apoptosis in age-related skeletal muscle atrophy. *Sports Medicine*, 35: 473-483.

Dumaz, N., Meek, D.W. (1999) Serine 15 phosphorylation stimulates p53 transactivation but does not directly influence interaction with HDM2. *EMBO J.*, 18: 7002-7010.

Eijkelenboom, A., Burgering, B.M. (2013) FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 14: 83-97.

El-Deiry, W.S. (1998) Regulation of p53 downstream genes. *Semin. Cancer Biol.*,

8: 345-357.

Endo, K., Oki, E., Biedermann, V., Kojima, H., Yoshida, K., Johannes, F.J., Kufe, D., Datta, R. (2000) Proteolytic cleavage and activation of protein kinase C μ by caspase-3 in the apoptotic response of cells to 1- β -d-arabinofuranosylcytosine and other genotoxic agents. *J. Biol. Chem.*, 275: 18476-18481.

Endoh, H., Sasaki, H., Maruyama, K., Takeyama, K., Waga, I., Shimizu, T., Kato, S., Kawashima, H. (1997) Rapid activation of MAP kinase by estrogen in the bone cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1: 99-102.

Enmark, E., Pelto-Huikko, M., Grandien, K., Fried, G., Lagerkrantz, S., Lagerkrantz, J., Nordenskjo, L.D.M, Gustafsson, J-Å. (1997) Human estrogen receptor b-gene structure, chromosomal localisation and expression pattern. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 82: 4258-4265.

Essers, M.A., Weijzen, S., de Vries-Smits, A.M., Saarloos, I., de Ruiter, N.D., Bos, J.L., Burgering, B.M.T. (2004) FOXO transcription factor activation by oxidative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK. *EMBO J.*, 23: 4802-4812.

Evans, A., Muldoon, T.G. (1991) Characterization of estrogen-binding sites associated with the endoplasmic reticulum of rat uterus. *Steroids*, 56: 59-65.

Evans, R.M. (1988) The steroid and thyroid hormone superfamily. *Science*, 240: 889-895.

Faisal, A., el-Shemerly, M., Hess, D., Nagamine, Y. (2002) Serine/threonine phosphorylation of shca regulation of protein-tyrosine phosphatase-pest binding and involvement in insulin signaling. *J. Biol. Chem.*, 277: 30144-30152.

Foschi, M., Franchi, F., Han, J., La Villa, G., Sorokin, A. (2001) Endothelin-1 induces serine phosphorylation of the adaptor protein p66Shc and its association with 14-3-3 protein in glomerular mesangial cells. *J. Biol. Chem.*, 276: 26640-26647.

Francia, P., delli Gatti, C., Bachschmid, M., Martin-Padura, I., Savoia, C., Migliaccio, E., Pelicci, P.G., Schiavoni, M., Luscher, T.F., Volpe, M., Cosentino, F. (2004) Deletion of p66shc gene protects against age-related endothelial dysfunction. *Circulation*, 110: 2889-2895.

Frescas, D., Valenti, L., Accili, D. (2005) Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via Sirt-dependent deacetylation promotes expression of glucogenetic genes. *J. Biol. Chem.*, 280: 20589-20595.

Freund, D., Bauer, N., Boxberger, S., Feldmann, S., Steller, U., Ehninger, G., Werner, C., Bornhäuser, M., Oswald, J., Corbeil, D. (2006) Polarization of human hematopoietic progenitors during contact with multipotent mesenchymal stromal cells: effects on proliferation and clonogenicity. *Stem Cells Dev.*, 15: 815-829.

Fridovich, I. (1975) Superoxide dismutases. *Ann. Rev. Biochem.*, 44: 147-159.

Fridovich, I. (1989) Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J. Biol. Chem.*, 264: 7761-7764.

Fridovich, I. (1997) Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. *J. Biol. Chem.*, 272: 18515-18517.

Fu, Y., Rubin, C.S. (2011) Protein kinase D: coupling extracellular stimuli to the regulation of cell physiology. *EMBO Rep.*, 12: 785-796.

Fuchs, S.Y., Adler, V., Buschmann, T., Wu, X., Ronai, Z.E. (1998a) Mdm2 association with p53 targets its ubiquitination. *Oncogene*, 17: 2543-2547.

Furuyama, T., Nakazawa, T., Nakano, I., Mori, N. (2000). Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues. *Biochem. J.*, 349: 629-634.

Galimov, E.R. (2010) The Role of p66shc in Oxidative Stress and Apoptosis. *Acta Naturae*, 2: 44-51.

Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J.M., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., et al. (2012) Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.*, 19: 107-120.

Garcia-Bermejo, M.L., Leskow, F.C., Fujii, T., Wang, Q., Blumberg, P.M., Ohba, M., Kuroki, T., Han, K.C., Lee, J., Marquez, V.E., Kazanietz, M.G. (2002) Diacylglycerol (DAG)-lactones, a new class of protein kinase C (PKC) agonists, induce apoptosis in LNCaP prostate cancer cells by selective activation of PKC α . *J. Biol. Chem.*, 277: 645-655.

George, F.W., Russell, D. W., Wilson, J. D. (1991) Feed-forward control of prostate growth: dihydrotestosterone induces expression of its own biosynthetic enzyme, steroid 5 alpha-reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88: 8044-8047.

Gerdes, H.H., Carvalho, R.N. (2008) Intercellular transfer mediated by tunneling nanotubes. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 20: 470-475.

Giaccia, A.J., Kastan, M.B. (1998). The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev.*, 12: 2973-2983.

Giorgio, M., Migliaccio, E., Orsini, F., Paolucci, D., Moroni, M., Contursi, C., Pelliccia, G., Luzi, L., Minucci, S., Marcaccio, M., Pinton, P., Rizzuto, R., Bernardi, P., Paolucci, F., Pelicci, P.G. (2005) Electron transfer between cytochrome c and p66 Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. *Cell*, 122: 221-233.

Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., Mathieu, C. (2001) An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, 25: 386-401.

Gogvadze, V., Orrenius, S., Zhivotovsky, B. (2006) Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta-*

Bioenerget., 1757: 639-647.

Gonzalez-Guerrico, A.M., Meshki, J., Xiao, L., Benavides, F., Conti, C.J., Kazanietz, M.G. (2005) Molecular Mechanisms of Protein Kinase C-induced Apoptosis in Prostate Cancer Cells. *J. Biochem. Mol. Biol.*, 38: 639.

Gonzalvez, F., Schug, Z.T., Houtkooper, R.H., MacKenzie, E.D., Brooks, D.G., Wanders, R.J.A., Petit, P.X., Vaz, F.M., Gottlieb, E. (2008) Cardiolipin provides an essential activating platform for caspase-8 on mitochondria. *J. Cell Biol.*, 183: 681-696.

Gottlicher, M., Heck, S., Herrlich, P. (1998) Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action. *J. Mol. Med.*, 76: 480-489.

Gottsch, M.L., Navarro, V.M., Zhao, Z., Glidewell-Kenney, C., Weiss, J., Jameson, Clifton, D.K., Levine, J.E., J.L., Steiner, R.A. (2009) Regulation of Kiss1 and dynorphin gene expression in the murine brain by classical and nonclassical estrogen receptor pathways. *J. Neurosci.*, 29: 9390-9395.

Green, D.R., Kroemer, G. (2004) The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*, 5684: 626-629.

Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J.M., Argos, P., Chambom, P. (1986) Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature*, 320: 134-139.

Greene, G.L., Gilna, P., Waterfield, M., Baker, A., Hort, Y., Shine, J. (1986) Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science*, 231: 1150-1154.

Greising, S.M., Baltgalvis, K.A., Lowe, D.A., Warren, G.L. (2009) Hormone therapy and skeletal muscle strength: a meta-analysis. *J. Gerontol. Series A: Biol. Sci. Med. Sci.*, 64: 1071-1081.

Gross, A., Yin, X.M., Wang, K., Wei, M.C., Jockel, J., Milliman, C., Erdjument-

Bromage, H., Tempst, P., Korsmeyer, S. J. (1999) Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J. Biol. Chem.*, 274: 1156-1163.

Gulbins, E., Dreschers, S., Bock, J. (2003) Role of mitochondria in apoptosis. *Exp. Physiol.*, 88: 85-90.

Guo, J., Gertsberg, Z., Ozgen, N., Steinberg, S.F. (2009) p66Shc links alpha1-adrenergic receptors to a reactive oxygen species-dependent AKTFOXO3A phosphorylation pathway in cardiomyocytes. *Circ. Res.*, 104: 660-669.

Gurke, S., Barroso, J.F.V., Gerdes, H.H. (2008) The art of cellular communication: tunneling nanotubes bridge the divide. *Histochem. Cell Biol.*, 129: 539-550.

Gutteridge, J.M., Stocks, J. (1981) Caeruloplasmin: physiological and pathological perspectives. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 14: 257.

Halban, J. (1900) Die innere Sekretion von Ovarium und Placenta und ihre Bedeutung fuer die Function der Milchdruese. *M Schr. Geburtsh. Gynaek.*, 12: 496-503.

Haldar, S., Negrini, M., Monne, M., Sabbioni, S., Croce, C.M. (1994) Down-regulation of bcl-2 by p53 in breast cancer cells. *Cancer Res.*, 54: 2095-2097.

Halestrap, A.P., McStay, G.P., Clarke, S.J. (2002) The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie*, 84: 153-166.

Halliwell, B. (1996) Antioxidants in human health and disease. *Annu. Rev. Nutr.*, 16: 33-50.

Hannun, Y.A., Loomis, C.R., Merrill, A.H., Bell, R.M. (1986) Sphingosine inhibition of protein kinase C activity and of phorbol dibutyrate binding in vitro and in human platelets. *J. Biol. Chem.*, 261: 12604-12609.

Hard, T., Gustafsson, J-Å. (1993) Structure and function of the DNAbinding domain of the glucocorticoid receptor and other members of the nuclear receptor supergene family. *Acc. Chem. Res.*, 26: 644-650.

Harris, S.L., Levine, A.J. (2005) The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*, 24: 2899-2908.

Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., Oren, M. (1997) Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, 387: 296-299.

Haupt, Y., Rowan, S., Shaulian, E., Vousden, K. H., Oren, M. (1995) Induction of apoptosis in HeLa cells by trans-activation-deficient p53. *Genes Dev.*, 9: 2170-2183.

He, K.M., Luo, W.X., Zhang, Y.L., Liu, F., Liu, D., Xu, L., Qin, L., Xiong, C., Lu, Z., Fang, X., Zhang, Y. (2010) Intercellular transportation of quantum dots mediated by membrane nanotubes. *ACS Nano.*, 4: 3015-3022.

Hess, P., Pihan, G., Sawyers, C.L., Flavell, R.A., Davis, R.J. (2002) Survival signaling mediated by c-Jun NH(2)- terminal kinase in transformed B lymphoblasts. *Nat. Genet.*, 32: 201-205.

Honda, R., Tanaka, H., Yasuda, H. (1997) Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS letters*, 420: 25-27.

Horvitz, H.R. (1999) Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res.*, 59: 1701s-1706s.

Hu, Y., Wang, X., Zeng, L., Cai, D.Y., Sabapathy, K., Goff, S.P., Firpo, E.J., Li, B. (2005) ERK Phosphorylates p66shcA on Ser36 and Subsequently Regulates p27^{kip1} Expression via the Akt-FOXO3a Pathway: Implication of p27^{kip1} in Cell Response to Oxidative Stress. *Mol. Biol. Cell.*, 16: 3705-3718.

Hyder, S.M., Nawaz, Z., Chiappetta, C., Yokoyama, K., Stancel, G.M. (1995) The protooncogene c-jun contains an unusual estrogen-inducible enhancer within the

coding sequence. *J. Biol. Chem.*, 270: 8506-8513.

Hyder, S.M., Stancel, G.M., Nawaz, Z., Mc Donnell, D.P., Loose-Mitchell, D.S. (1992) Identification of an estrogen response element in the 3'-flanking region of the murine c-fos protooncogene. *J. Biol. Chem.*, 267: 18047-18054.

Iglesias, T., Rozengurt, E. (1998) Protein kinase D activation by mutations within its pleckstrin homology domain. *J. Biol. Chem.*, 273: 410-416.

Ihrie, R.A., Reczek, E., Horner, J.S., Khachatryan, L., Sage, J., Jacks, T., Attardi, L.D. (2003) Perp is a mediator of p53-dependent apoptosis in diverse cell types. *Curr. Biol.*, 13: 1985-1990.

Jackson, D.N., Foster, D.A. (2004) The enigmatic protein kinase cδ: complex roles in cell proliferation and survival. *FASEB J.*, 18: 627-636.

Javadov, S., Kuznetsov, A. (2013) Mitochondrial Permeability Transition and Cell Death: The Role of Cyclophilin D. *Front. Physiol.*, 4: 76.

Jejurikar, S.S., Henkelman, E.A., Cederna, P.S., Marcelo, C.L., Urbanek, M.G., Kuzon, W.M. (2006) Aging increases the susceptibility of skeletal muscle derived satellite cells to apoptosis. *Exp. Geront.*, 41: 828-836.

Jejurikar, S.S., Kuzon, M. Jr (2003) Satellite cell depletion in degenerative skeletal muscle. *Apoptosis*, 8: 573-578.

Jensen, E.V., Jacobsen, H.I. (1962) Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Rec. Prog. Horm. Res.*, 18: 387-414.

Johannes, F.J., Prestle, J., Eis, S., Oberhagemann, P., Pfizenmaier, K. (1994) PKC ζ is a novel, atypical member of the protein kinase C family. *J. Biol. Chem.*, 269: 6140-6148.

Kadi, F., Karlsson, C., Larsson, B., Eriksson, J., Larval, M., Billig, H., Jonsdottir, I.H. (2002) The effects of physical activity and estrogen treatment on rat fast and

slow skeletal muscles following ovariectomy. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 23: 335-339.

Kamel, H.K., Maas, D., Duthie Jr, E.H. (2002) Role of hormones in the pathogenesis and management of sarcopenia. *Drugs Aging*, 19: 865-877.

Kelly, M.J., Levin, E.R. (2001) Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol. Metab.*, 12: 152-156.

Kerr, J.F. (1965) A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes. *J. Pathol. Bacteriol.*, 90: 419-435.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26: 239.

Kerr, J.F. (2002) History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology*, 181: 471-474.

Ketterer, B. (1986) Detoxication reactions of glutathione and glutathione transferases. *Xenobiotica*, 16: 957-973.

Kikkawa, U., Matsuzaki, H., Yamamoto, T. (2002) Protein kinase C δ (PKC δ): activation mechanisms and functions. *J. Biochem.*, 132: 831-839.

Kim, J.Y., Ahn, H.J., Ryu, J.H., Suk, K., Park, J.H. (2004) BH3-only protein Noxa is a mediator of hypoxic cell death induced by hypoxia-inducible factor 1 α . *J. Exp. Med.*, 199: 113-124.

Kinnula, V.L., Pietarinen, P., Aalto, K., Virtanen, I., Raivio, K.O. (1995) Mitochondrial superoxide dismutase induction does not protect epithelial cells during oxidant exposure in vitro. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.*, 268: L71-L77.

Kitamura, Y.I., Kitamura, T., Kruse, J.P., Raum, J.C., Stein, R., Gu, W., Accili, D. (2005) FoxO1 protects against pancreatic beta cell failure through NeuroD and MafA induction. *Cell Metab.*, 2: 153-163.

Knauer, E. (1900) Die ovarientransplantation. *Arch. Gynakol.*, 60: 322-376.

Konishi, H., Tanaka, M., Takemura, Y., Matsuzaki, H., Ono, Y., Kikkawa, U., Nishizuka, Y. (1997) Activation of protein kinase C by tyrosine phosphorylation in response to H₂O₂. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94: 11233-11237.

Konishi, H., Yamauchi, E., Taniguchi, H., Yamamoto, T., Matsuzaki, H., Takemura, Y., Ohmae, K., Kikkawa, U., Nishizuka, Y. (2001) Phosphorylation sites of protein kinase C delta in H₂O₂-treated cells and its activation by tyrosine kinase in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98: 6587-6592.

Kops, G.J., Dansen, T.B., Polderman, P.E., Saarloos, I., Wirtz, K.W., Coffey, P.J., Huang, T-T., Bos, J.L., Medema, R.H., Burgering, B. M. (2002). Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature*, 419: 316-321.

Korsmeyer, S.J. (1992) Bcl-2: a repressor of lymphocyte death. *Immunol. Today*, 13: 285-288.

Korsmeyer, S.J. (1999) BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res.*, 59: 1693s-1700s.

Koyanagi, M., Brandes, R.P., Haendeler, J., Zeiher, A.M., Dimmeler, S. (2005) Cell-to-cell connection of endothelial progenitor cells with cardiac myocytes by nanotubes: a novel mechanism for cell fate changes? *Circ. Res.*, 96: 1039-1041.

Krege, J.H., Hodgin, J.B., Couse, J.F., Enmark, E., Warner, M., Mahler, J.F., Sar, M., Korach, K.S., Gustafsson, J.A., Smithies, O. (1998) Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor b. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95: 15677-15682.

Kroemer, G., Dallaporta, B., Resche-Rigon, M. (1998) The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu. Rev. Physiol.*, 60: 619-642.

Kroemer, G., Galluzzi, L., Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol. Rev.*, 87: 99-163.

Kroemer, G., Zamzami, N., Susin, S.A. (1997) Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol. today*, 18: 44-51.

Kubbutat, M.H., Jones, S.N., Vousden, K.H. (1997) Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature*, 387: 299-303.

Kuiper, G.G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S., Gustaffson, J-Å. (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93: 5925-5930.

Kulkarni, J. (2009) Oestrogen--a new treatment approach for schizophrenia? *Med. J. Austral.*, 190: S37.

Kumarswamy, R., Chandna, S. (2009) Putative partners in Bax mediated cytochrome-c release: ANT, CypD, VDAC or none of them? *Mitochondrion*, 9: 1-8.

Kurosaka, K., Takahashi, M., Watanabe, N., Kobayashi, Y. (2003) Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J. Immunol.*, 171: 4672-4679.

Kvansakul, M., Yang, H., Fairlie, W.D., Czabotar, P.E., Fischer, S.F., Perugini, M.A., Huang, D.C.S., Colman, P.M. (2008) Vaccinia virus anti-apoptotic F1L is a novel Bcl-2-like domain-swapped dimer that binds a highly selective subset of BH3-containing death ligands. *Cell Death Differ.*, 15: 1564-1571.

Kwong, J.Q., Molkentin, J.D. (2015) Physiological and pathological roles of the mitochondrial permeability transition pore in the heart. *Cell Metab.*, 21: 206-214.

La Colla, A., Pronsato, L., Milanesi, L., Vasconsuelo, A. (2015) 17 β -Estradiol and

testosterone in sarcopenia: Role of satellite cells. *Ageing Res. Rev.*, pii: S1568-1637.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

Lallemant, C., Blanchard, B., Palmieri, M., Lebon, P., May, E., Tovey, M.G. (2007) Single-stranded RNA viruses inactivate the transcriptional activity of p53 but induce NOXA-dependent apoptosis via post-translational modifications of IRF-1, IRF-3 and CREB. *Oncogene*, 26: 328-338.

Le, S., Connors, T.J., Maroney, A.C. (2001) c-Jun N-terminal kinase specifically phosphorylates p66ShcA at serine 36 in response to ultraviolet irradiation. *J. Biol. Chem.*, 276: 48332-48336.

Lee, S.S., Kennedy, S., Tolonen, A.C., Ruvkun, G. (2003). DAF-16 target genes that control *C.elegans* life-span and metabolism. *Science*, 300: 644-647.

Lei, K., Davis, R.J. (2003) JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100: 2432-2437.

Lei, K., Nimnual, A., Zong, W.X., Kennedy, N.J., Flavell, R.A., Thompson, C.B., Bar-Sagi, D., Davis, R.J. (2002) The Bax subfamily of Bcl2-related proteins is essential for apoptotic signal transduction by c-Jun NH2-terminal kinase. *Mol. Cell. Biol.*, 22:4929-4942.

Lemoine, S., Granier, P., Tiffoche, C., Rannou-Bekono, F., Thieulant, M.L., Delamarche, P. (2003) Estrogen receptor alpha mRNA in human skeletal muscles. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 35: 439-443.

Leygue, E., Dotzlaw, H., Lu, B., Glor, C., Watson, P.H., Murphy, L.C. (1998) Estrogen receptor b: mine is longer than yours. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 83: 3754-3755.

Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., Yuan, J. (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 94: 491-501.

Li, P.F., Dietz, R., von Harsdorf, R. (1999) p53 regulates mitochondrial membrane potential through reactive oxygen species and induces cytochrome c-independent apoptosis blocked by Bcl-2. *EMBO J.*, 18: 6027-6036.

Lieberherr, M., Grosse, B., Kachkache, M., Balsan, S. (1993) Cell signaling and estrogens in female rat osteoblasts: a possible involvement of unconventional nonnuclear receptors. *J. Bone Min. Res.*, 8: 1365-1376.

Lin, A. (2003) Activation of the JNK signaling pathway: breaking the brake on apoptosis. *Bioessays*, 25: 1-8

Liou, G-Y., Storz, P. (2010) Reactive oxygen species in cancer. *Free Rad. Res.*, 44: 479-496.

Liu, H., Pedram, A., Kim, J. K. (2011) Oestrogen prevents cardiomyocyte apoptosis by suppressing p38 α -mediated activation of p53 and by down-regulating p53 inhibition on p38 β . *Cardiovasc. Res.*, 89: 119-128.

Liu, K., Ji, K., Guo, L., Wu, W., Lu, H., Shan, P., Yan, C. (2014) Mesenchymal stem cells rescue injured endothelial cells in an in vitro ischemia–reperfusion model via tunneling nanotube like structure-mediated mitochondrial transfer. *Microvasc. Res.*, 92: 10-18.

Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., Wang, X. (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 86: 147-157.

Liu, Y., Graham, C., Li, A., Fisher, R.J., Shaw, S. (2002) Phosphorylation of the protein kinase C-theta activation loop and hydrophobic motif regulates its kinase activity, but only activation loop phosphorylation is critical to in vivo nuclear-factor-kappaB induction. *Biochem. J.*, 361: 255-265.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25: 402-408.

Locke, J.A., Guns, E.S., Lubik, A.A., Adomat, H.H., Hendy, S.C., Wood, C.A., Ettinger, S.L., Gleave, M.E., Nelson, C.C. (2008) Androgen levels increase by intratumoral de novo steroidogenesis during progression of castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res.*, 68: 6407-6415.

Lockshin, R.A., Williams, C.M. (1964) Programmed cell death – II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *J. Insect. Physiol.*, 10: 643-649.

Lockshin, R.A., Williams, C.M. (1965) Programmed cell death – I. Cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the pernyi silkworm. *J. Insect. Physiol.*, 11: 123-133.

Loewe, S. (1925) Nachweis brunsterzeugender Stoffe im weiblichen Blute. *Klin. Wschr.*, 4: 1407.

Loewe, S., Lange, F. (1926) Der Gehalt des Frauenharnes an Brunsterzeugenden Stoffen in Abhängigkeit vom ovariellen Zyklus (Ueber weibliche Sexualhormone. VII). *Klin. Wchnschr.*, 5: 1038.

Long, X., Goldenthal, M.J., Marin-Garcia, J. (2007) Oxidative stress enhances phosphorylation of p53 in neonatal rat cardiomyocytes. *Mol. Cell. Biochem.*, 303: 167-174.

Losel, R., Wehling, M. (2003) Non genomic actions of steroid hormones. *Nat .Rev. Mol. Cell. Biol.*, 4: 46-56.

Luzi, L., Confalonieri, S., Di Fiore, P.P., Pelicci, P.G. (2000) Evolution of Shc functions from nematode to human. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 10: 668-674.

Ma, Q., Fang, H., Shang, W., Liu, L., Xu, Z., Ye, T., Wang, X., Zheng, M., Chen,

Q., Cheng, H. (2011) Superoxide flashes: early mitochondrial signals for oxidative stress-induced apoptosis. *J. Biol Chem.*, 286: 27573-27581.

MacCorquodale, D.W., Thayer, S.A., Doisy, E.A. (1936) Isolation of the principle oestrogenic substance of liquor folliculli. *J. Biol. Chem.*, 115: 435-448.

Maltzman, W., Czyzyk, L. (1984) UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol. Cell. Biol.*, 4: 1689-1694.

Mammucari, C., Milan, G., Romanello, V., Masiero, E., Rudolf, R., Del Piccolo, P., Burden, S.J., Di Lisi, R., Sandri, C., Zhao, J., Goldberg, A.L., Schiaffino, S., Sandri, M. (2007) FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell. Metab.*, 6: 458-471.

Manicassamy, S., Gupta, S., Sun, Z. (2006) Selective function of PKC-theta in T cells. *Cell Mol. Immunol.*, 3: 263-270.

Marchetti, P., Castedo, M., Susin, S. A., Zamzami, N., Hirsch, T., Macho, A., Haeflner, A., Hirsch, F., Geuskens, M., Kroemer, G. (1996). Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. *J. Exp. Med.*, 184: 1155-1160.

Marklund, S.L. (1980) Distribution of CuZn superoxide dismutase and Mn superoxide dismutase in human tissues and extracellular fluids. *Acta Physiol. Scand. Suppl.*, 492: 19-23.

Marklund, S.L. (1982) Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79: 7634-7638.

Marshall, F.H.A., Jolly, W.A. (1905) Contributions to the physiology of mammalian reproduction. *Philos. Trans. Roy. Soc. London*, 198: 99-142.

Marshall, K.A., Reist, M., Jenner, P., Halliwell, B. (1999) The neuronal toxicity of sulfite plus peroxynitrite is enhanced by glutathione depletion: implications for

Parkinson's disease. *Free Rad. Biol. Med.*, 27: 515-520.

Maruyama, K., Endoh, H., Sasaki-Iwaoka, H., Kanou, H., Shimaya, E., Hashimoto, S., Kato, S., Kawashima, H. (1998) A novel isoform of rat estrogen receptor beta with 18 amino acid insertion in the ligand binding domain as a putative dominant negative regulator of estrogen action. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 246: 142-147.

Marzetti, E., Leeuwenburgh, C. (2006) Skeletal muscle apoptosis, sarcopenia and frailty at old age. *Exp. Gerontol.*, 4: 1234-1238.

Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Jürgensmeier, J.M., Susin, S.A., Vieira, H.L., et al. (1998) Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science*, 281: 2027-2031.

Mayo, L.D., Seo, Y.R., Jackson, M.W., Smith, M.L., Rivera Guzman, J., Korgaonkar, C.K., Donner, D.B. (2005) Phosphorylation of human p53 at serine 46 determines promoter selection and whether apoptosis is attenuated or amplified. *J. Biol. Chem.*, 280: 25953-25959.

Mackay, H.J., Twelves, C.J. (2007). Targeting the protein kinase C family: are we there yet? *Nat. Rev. Cancer*, 7: 554-562.

McClung, J.M., Davis, J.M., Wilson, M.A., Goldsmith, E.C., Carson, J.A. (2006) Estrogen status and skeletal muscle recovery from disuse atrophy. *J. Appl. Physiol.*, 100: 2012-2023.

McEwen, B.S. (1999) The molecular and neuroanatomical basis for estrogen effects in the central nervous system. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 84: 1790-1797.

Medema, R.H., Kops, G.J., Bos, J.L., Burgering, B.M. (2000). AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature*, 404: 782-787.

Mellon, S.H., Deschepper, C.F. (1993) Neurosteroid biosynthesis: genes for

adrenal steroidogenic enzymes are expressed in the brain. *Brain Res.* 629: 283-292.

Mellor, H., Parker, P. (1998) The extended protein kinase C superfamily. *Biochem. J.*, 332: 281-292.

Mendelsohn, M.E., Karas, R.H. (1999) The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N. Engl. J. Med.*, 340: 1801-1811.

Migliaccio, E., Giorgio, M., Mele, S., Pelicci, G., Reboldi, P., Pandolfi, P.P., Lanfrancone, L., Pelicci, P.G. (1999) The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature*, 402: 309-313.

Migliaccio, E., Mele, S., Salcini, A.E., Pelicci, G., Lai, K.M.V., Superti-Furga, G., Pawson, T., Di Fiore, P.P., Lanfrancone, L., Pelicci, P. G. (1997) Opposite effects of the p52shc/p46shc and p66shc splicing isoforms on the EGF receptor–MAP kinase–fos signalling pathway. *EMBO J.*, 16: 706-716.

Milanesi, L., de Boland, A.R., Boland, R. (2008) Expression and localization of estrogen receptor α in the C2C12 murine skeletal muscle cell line. *J. Cell. Biochem.*, 104: 1254-1273.

Milanesi, L., Vasconsuelo, A., de Boland, A.R., Boland, R. (2009) Expression and subcellular distribution of native estrogen receptor β in murine C2C12 cells and skeletal muscle tissue. *Steroids*, 74: 489-497.

Mitchell, P., Moyle, J. (1965a) Stoichiometry of proton translocation through the respiratory chain and adenosine triphosphatase systems of rat liver mitochondria. *Nature*, 208: 147-151.

Mitchell, P., Moyle, J. (1965b) Evidence discriminating between the chemical and the chemiosmotic mechanisms of electron transport phosphorylation. *Nature*, 208: 1205-1206.

Miyashita, T., Harigai, M., Hanada, M., Reed, J.C. (1994) Identification of a p53-

dependent negative response element in the bcl-2 gene. *Cancer Res.*, 54: 3131-3135.

Monje, P., Zanello, S., Holick, M., Boland, R. (2001) Differential cellular localization of estrogen receptor α in uterine and mammary cells. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 181: 117-129.

Moore, J.T., McKee, D.D., Slentz-Kesler, K., Moore, L.B., Jones, S.A., Horne, E.L., Su, J.L., Kliewer, S.A., Lehmann, J.M., Wilson, T.M. (1998) Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 247: 75-78.

Moran, A.L., Nelson, S.A., Landisch, R.M., Warren, G.L., Lowe, D.A. (2007) Estradiol replacement reverses ovariectomy-induced muscle contractile and myosin dysfunction in mature female mice. *J. Appl. Physiol.*, 102: 1387-1393.

Murphy, C.T., Mc Carroll, S.A., Bargmann, C.I., Fraser, A., Kamath, R.S., Ahringer, J., Li, H., Kenyon, C. (2003) Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 424: 277-283.

Nagata, S. (1997) Apoptosis by death factor. *Cell*, 88: 355-365.

Nakano, K., Vousden, K.H. (2001) PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol. Cell*, 7: 683-694.

Nakashima, H., Frank, G.D., Shirai, H., Hinoki, A., Higuchi, S., Ohtsu, H., Eguchi, K., Sanjay, A., Reyland, M.E., Dempsey, P.J., Inagami, S., Eguchi, S. (2008). Novel role of protein kinase C- δ Tyr311 phosphorylation in vascular smooth muscle cell hypertrophy by angiotensin II. *Hypertension*, 51: 232-238.

Narita, M., Shimizu, S., Ito, T., Chittenden, T., Lutz, R.J., Matsuda, H., Tsujimoto, Y. (1998) Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95: 14681-14686.

Nemoto, S., Combs, C.A., French, S., Ahn, B.H., Fergusson, M.M., Balaban, R.S., Finkel, T. (2006) The mammalian longevity-associated gene product p66shc regulates mitochondrial metabolism. *J. Biol. Chem.*, 281:10555-10560.

Nemoto, S., Finkel, T. (2002) Redox regulation of forkhead proteins through a p66shc-dependent signaling pathway. *Science*, 295: 2450-2452.

Newton, A. (2003) Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: Protein kinase C as a paradigm. *Biochemical J.*, 370: 361-371.

Newton, A.C. (1995) Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J. Biol. Chem.*, 270: 28495-28498.

Newton, A.C. (1997) Regulation of protein kinase C. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 9: 161-167.

Newton, A.C. (2001) Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem. Rev.*, 101: 2353-2364.

Nikiforov, M.A., Riblett, M., Tang, W.H., Gratchouck, V., Zhuang, D., Fernandez, Y., Verhaegen, M., Varambally, S., Chinnaiyan, A.M., Jakubowiak, A.J., Soengas, M.S. (2007) Tumor cell-selective regulation of NOXA by c-MYC in response to proteasome inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104: 19488-19493.

Nishizuka, Y. (1992) Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*, 258: 607-614.

Nishizuka, Y. (1995) Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.*, 9: 484-496.

Norbury, C.J., Hickson, I.D. (2001) Cellular responses to DNA damage. *Ann. Rev. Pharm. Toxicol.*, 41: 367-401.

Oberley, T.D. (2004) Mitochondria, manganese superoxide dismutase, and cancer.

Antioxid. Redox. Signal., 6: 483-487.

Obsilova, V., Vecer, J., Herman, P., Pabianova, A., Sulc, M., Teisinger, J., Boura, E., Obsil, T. (2005) 14-3-3 Protein interacts with nuclear localization sequence of forkhead transcription factor FoxO4. *Biochemistry*, 44: 11608-11617.

Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., Tanaka, N. (2000) Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*, 288: 1053-1058.

Oh, S.W., Mukhopadhyay, A., Svrzikapa, N., Jiang, F., Davis, R.J., Tissenbaum, H.A. (2005) JNK regulates lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulating nuclear translocation of forkhead transcription factor/DAF-16. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102: 4494-4499.

Önfelt, B., Nedvetzki, S., Yanagi, K., Davis, D.M. (2004) Cutting edge: membrane nanotubes connect immune cells, *J. Immunol.*, 173: 1511-1513.

Önfelt, B., Nedvetzki, S., Benninger, R.K., Purbhoo, M.A., Sowinski, S., Hume, A.N., Seabra, M.C., Neil, M.A., French, P.M., Davis, D.M. (2006) Structurally distinct membrane nanotubes between human macrophages support long-distance vesicular traffic or surfing of bacteria, *J. Immunol.*, 177: 8476-8483.

Orsini, F., Migliaccio, E., Moroni, M., Contursi, C., Raker, V.A., Piccini, D., Martin-Padura, I., Pelliccia, G., Trinei, M., Bono, M., Puri, C., Tacchetti, C., Ferrini, M., Mannucci, R., Nicoletti, I., Lanfrancone, L., Giorgio, M., Pelicci, P.G. (2004) The life span determinant p66Shc localizes to mitochondria where it associates with mitochondrial heat shock protein 70 and regulates trans-membrane potential. *J. Biol. Chem.*, 279: 25689-25695.

Orsini, F., Moroni, M., Contursi, C., Yano, M., Pelicci, P., Giorgio, M., Migliaccio, E. (2006) Regulatory effects of the mitochondrial energetic status on mitochondrial p66Shc. *Biol. Chem.*, 387: 1405-1410.

Osada, S.I., Mizuno, K., Saido, T.C., Suzuki, K., Kuroki, T., Ohno, S. (1992) A new member of the protein kinase C family, nPKC theta, predominantly expressed in skeletal muscle. *Mol. Cell. Biol.*, 12: 3930-3938.

Oury, T.D., Day, B. J., Crapo, J.D. (1996) Extracellular superoxide dismutase in vessels and airways of humans and baboons. *Free Radical Biol. Med.*, 20: 957-965.

Pacifici, R.E., Davies, K.J.A. (1991) Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free-radical theory of aging revisited. *Gerontology*, 37: 166-180.

Pani, G., Bedogni, B., Anzevino, R., Colavitti, R., Palazzotti, B., Borrello, S., Galeotti, T. (2000) Deregulated manganese superoxide dismutase expression and resistance to oxidative injury in p53-deficient cells. *Cancer Res.*, 60: 4654-4660.

Parikh, I., Anderson, W.L., Neame, P. (1980) Identification of high affinity estrogen binding sites in calf uterine microsomal membranes. *J. Biol. Chem.*, 255: 10266-10270.

Parker, M.G. (1995) Structure and function of estrogen receptors. *Vitam. Horm.*, 51: 267-287.

Pedram, A., Razandi, M., O'Mahony, F., Lubahn, D., Levin, E.R. (2010) Estrogen receptor beta prevents cardiac fibrosis. *Mol. Endocrinol.*, 24: 2152-2165.

Pellegrini, M., Baldari, C.T. (2009) Apoptosis and oxidative stress-related diseases: the p66Shc connection. *Curr. Mol. Med.*, 9: 392-398.

Pellicci, G., Lanfrancone, L., Grignani, F., McGlade, J., Cavallo, F., Forni, G., Nicoletti, I., Grignani, F., Pawson, T., Pellicci, P.G. (1992) A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. *Cell*, 70: 93-104.

Perillo, B., Sasso, A., Abbondanza, C., Palumbo, G. (2000) 17 β -Estradiol inhibits

apoptosis in MCF-7 cells, inducing bcl-2 expression via two estrogen-responsive elements present in the coding sequence. *Mol. Cell. Biol.*, 20: 2890-2901.

Petersen, D.N., Tkalcevic, G.T., Koza-Taylor, P.H., Turi, T.G., Brown, T.A. (1998) Identification of estrogen receptor beta2, a functional variant of estrogen receptor beta expressed in normal rat tissues. *Endocrinology*, 139: 1082-1092.

Petronilli, V., Costantini, P., Scorrano, L., Colonna, R., Passamonti, S., Bernardi, P. (1994) The voltage sensor of the mitochondrial permeability transition pore is tuned by the oxidation-reduction state of vicinal thiols. Increase of the gating potential by oxidants and its reversal by reducing agents. *J. Biol. Chem.*, 269: 16638-16642.

Petronilli, V., Miotto, G., Canton, M., Brini, M., Colonna, R., Bernardi, P., Di Lisa, F. (1999) Transient and long-lasting openings of the mitochondrial permeability transition pore can be monitored directly in intact cells by changes in mitochondrial calcein fluorescence. *Biophys. J.*, 76: 725-734.

Phelps, M., Darley, M., Primrose, J.N., Blaydes, J.P. (2003) p53-independent activation of the hdm2-P2 promoter through multiple transcription factor response elements results in elevated hdm2 expression in estrogen receptor α -positive breast cancer cells. *Cancer Res.*, 63, 2616-2623.

Picotto, G., Massheimer, V., Boland, R. (1996) Acute stimulation of intestinal cell calcium influx induced by 17 β -estradiol via the cAMP messenger system. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 119: 129-134.

Pinton, P., Rimessi, A., Marchi, S., Orsini, F., Migliaccio, E., Giorgio, M., Contursi, C., Minucci, S., Mantovani, F., Wieckowski, M.R., Del Sal, G., Pelicci, P.G., Rizzuto, R. (2007) Protein Kinase C β and prolyl isomerase 1 regulate mitochondrial effects of the life-span determinant p66Shc. *Science*, 315: 659-663.

Plas, D.R., Thompson, C.B. (2003) Akt activation promotes degradation of tuberlin and FOXO3a via the proteasome. *J. Biol. Chem.*, 278: 12361-12366.

Plotnikov, E.Y., Khryapenkova, T.G., Vasileva, A.K., Marey, M.V., Galkina, S.I., Isaev, N.K., Sheval, E.V., Polyakov, V.Y., Sukhikh, G.T., Zorov, D.B. (2008) Cell-to-cell cross-talk between mesenchymal stem cells and cardiomyocytes in co-culture. *J. Cell. Mol. Med.*, 12: 1622-1631.

Pradhan, D.S., Yu, Y., Soma, K.K. (2008) Rapid estrogen regulation of DHEA metabolism in the male and female songbird brain. *J. Neurochem.*, 104: 244-253.

Puthalakath, H., Strasser, A. (2002) Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins, *Cell Death Differ.*, 9: 505-512.

Razandi, M., Oh, P., Pedram, A., Schnitzer, J., Levin, E.R. (2002) Estrogen receptors associate with and regulate the production of caveolin: implications for signaling and cellular actions. *Mol. Endocrinol.*, 16:100-115.

Razandi, M., Pedram, A., Levin, E.R. (2000) Plasma membrane estrogen receptors signal to anti-apoptosis in breast cancer. *Mol. Endocrinol.*, 14: 1434-1447.

Reczek, E.E., Flores, E.R., Tsay, A.S., Attardi, L.D., Jacks, T. (2003) Multiple response elements and differential p53 binding control Perp expression during apoptosis. *Mol. Cancer Res.*, 1: 1048-1057.

Reed, J.C. (1997) Cytochrome c: can't live with it – can't live without it. *Cell*, 91: 559-562.

Reed, J.C., Kroemer, G. (1998) The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and Bcl-2-related proteins. *J. Exp. Med.*, 187: 1261-1271.

Reers, M., Smiley, S.T., Mottola-Hartshorn, C., Chen, A., Lin, M., Chen, L.B. (1994) Mitochondrial membrane potential monitored by JC-1 dye. *Meth. Enzymol.*, 260: 406-417.

Reyland, M.E. (2007) Protein kinase Cdelta and apoptosis. *Biochem. Soc.*

Trans., 35: 1001.

Ries, S., Biederer, C., Woods, D., Shifman, O., Shirasawa, S., Sasazuki, T., McMahon, M., Oren, M., McCormick, F. (2000) Opposing effects of Ras on p53: transcriptional activation of mdm2 and induction of p19ARF. *Cell*, 103: 321-330.

Rinner, O., Mueller, L.N., Hubalek, M., Muller, M., Gstaiger, M., Aebersold, R. (2007) An integrated mass spectrometric and computational framework for the analysis of protein interaction networks. *Nat. Biotechnol.*, 25: 345-352.

Rodríguez, A.M., Carrico, P.M., Mazurkiewicz, J.E., Meléndez, J.A. (2000) Mitochondrial or cytosolic catalase reverses the MnSOD-dependent inhibition of proliferation by enhancing respiratory chain activity, net ATP production, and decreasing the steady state levels of H₂O₂. *Free Radic. Biol. Med.*, 29: 801-813.

Rodriguez, J., Lazebnik, Y. (1999) Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev.*, 13: 3179-3184.

Rodriguez-Pena, A., Rozengurt, E. (1984) Disappearance of Ca²⁺-sensitive, phospholipid-dependent protein kinase activity in phorbol ester-treated 3T3 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 120: 1053-1059.

Rosenberg, I.W. (1989) Epidemiologic and methodologic problems in determining nutritional-status of older persons. Summary comments. *Am. J. Clin. Nutr.*, 50: 1231-1233.

Rosenfeld, M.G., Glass, C.K. (2001) Coregulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors. *J. Biol. Chem.*, 276: 36865-36868.

Rozengurt, E. (2011) Protein kinase D signaling: multiple biological functions in health and disease. *Physiology (Bethesda)*, 26: 23-33.

Rozengurt, E., Rey, O., Waldron, R.T. (2005) Protein kinase D signaling. *J. Biol. Chem.*, 280: 13205-13208.

Ruvolo, P.P., Deng, X., Carr, B.K., May, W.S. (1998) A functional role for mitochondrial protein kinase C α in Bcl2 phosphorylation and suppression of apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 273: 25436-25442.

Rustom, A., Saffrich, R., Markovic, I., Walther, P., Gerdes, H.H. (2004) Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science*, 303: 1007-1010.

Sabbatini, P., Lin, J., Levine, A.J., White, E. (1995) Essential role for p53-mediated transcription in E1A-induced apoptosis. *Genes Dev.*, 9: 2184-2192.

Salih, D.A.; Brunet, A. (2008) FoxO transcription factors in the maintenance of cellular homeostasis during aging. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 20:126-136.

Sandstrom, J., Carlsson, L., Marklund, S. L., Elund, T. (1992) The heparin-binding domain of extracellular superoxide dismutase C and formation of variants with reduced heparin affinity. *J. Biol.Chem.*, 267: 18205-18209.

Sansone, P., Storci, G., Giovannini, C., Pandolfi, S., Pianetti, S., Taffurelli, M., Santini, D., Ceccarelli, C., Chieco, P., Bonafe, M. (2007) p66Shc/Notch-3 Interplay Controls Self-Renewal and Hypoxia Survival in Human Stem/Progenitor Cells of the Mammary Gland Expanded In Vitro as Mammospheres. *Stem Cells*, 25: 807-815.

Savill, J., Fadok, V. (2000) Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*, 407: 784-788.

Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H., Peter, M.E. (1998) Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.*, 17: 1675-1687.

Schlinger, B.A., Arnold, A.P. (1991) Androgen effects on the development of the zebra finch song system. *Brain Res.*, 561: 99-105.

Schuler, M., Green, D.R. (2001) Mechanisms of p53-dependent apoptosis.

Biochem. Soc. Trans., 29: 684-688.

Schwabe, J.W.R., Chapman, L., Finch, J.T., Rhodes, D. (1993) The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements. *Cell*, 75: 567–578.

Schweichel, J.U., Merker, H.J. (1973) The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology*, 7: 253-266.

Seto, M., Jaeger, U., Hockett, R.D., Graninger, W., Bennett, S., Goldman, P., Korsmeyer, S.J. (1988) Alternative promoters and exons, somatic mutation and deregulation of the bcl-2-Ig fusion gene in lymphoma. *EMBO J.*, 7:123–131.

Shalini, S., Puccini, J., Wilson, C.H., Finnie, J., Dorstyn, L., Kumar, S. (2014) Caspase-2 protects against oxidative stress in vivo. *Oncogene*, 34: 4995-5002.

Siegel, R.M., Frederiksen, J.K., Zacharias, D.A., Chan, F.K., Johnson, M., Lynch, D., Tsien, R.Y., Lenardo, M. J. (2000) Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science*, 288: 2354-2357.

Sies, H. (1993) Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.*, 215: 213-219.

Sionov, R.V., Haupt, Y. (1999) The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene*, 18: 6145-6157.

Singh, R., Czaja, M.J. (2007) Regulation of hepatocyte apoptosis by oxidative stress. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 22: S45-48.

Sitnick, M., Foley, A.M., Brown, M., Spangenburg, E.E. (2006) Ovariectomy prevents the recovery of atrophied gastrocnemius skeletal muscle mass. *J. Appl. Physiol.*, 100: 286-293.

Smith, W.W., Norton, D.D., Gorospe, M., Jiang, H., Nemoto, S., Holbrook, N.J., Finkel, T., Kusiak, J.W. (2005) Phosphorylation of p66Shc and forkhead proteins

mediates A β toxicity. *J. Cell Biol.*, 169: 331-339.

Song, J., Li, J., Lulla, A., Evers, B.M., Chung, D.H. (2006) Protein kinase D protects against oxidative stress-induced intestinal epithelial cell injury via Rho/ROK/PKC- δ pathway activation. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 290: C1469-1476.

Song, J., Li, J., Qiao, J., Jain, S., Evers, B.M., Chung, D.H. (2009) PKD prevents H₂O₂-induced apoptosis via NF- κ B and p38 MAPK in RIE-1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 378: 610.

Sowinski, S., Jolly, C., Berninghausen, O., Purbhoo, M.A., Chauveau, A., Köhler, K., Oddos, S., Eissmann, P., Brodsky, F.M., Hopkins, C., Önfelt, B., Sattentau, Q., Davis, D.M. (2008) Membrane nanotubes physically connect T cells over long distances presenting a novel route for HIV-1 transmission. *Nat. Cell Biol.*, 10: 211-219.

Sparatore, B., Passalacqua, M., Pedrazzi, M., Ledda, S., Patrone, M., Gaggero, D., Pontremoli, S., Melloni, E. (2003) Role of the kinase activation loop on protein kinase C θ activity and intracellular localisation. *FEBS letters*, 554: 35-40.

Srivastava, S., Toraldo, G., Weitzman, N.M., Cenci, S., Ross, F.P., Pacifici, R. (2001) Estrogen decreases osteoclast formation by down-regulating receptor activation of NF- κ B ligand (RANKL)-induced JNK activation. *J. Biol. Chem.*, 276: 8836-8840.

Steinberg, S. (2004) Distinctive activation mechanisms and functions for protein kinase C δ . *Biochem. J.*, 384: 449-459.

Steinberg, S.F. (2012) Regulation of protein kinase D1 activity. *Mol. Pharmacol.*, 81: 284-291.

Stirone, C., Duckles, S.P., Krause, D.N., Procaccio, V. (2005) Estrogen increases mitochondrial efficiency and reduces oxidative stress in cerebral blood

vessels. *Mol. Pharmacol.*, 68: 959-965.

Storz, P. (2007) Mitochondrial ROS - radical detoxification, mediated by protein kinase D. *Trends Cell. Biol.*, 17: 13-18.

Storz, P. (2011) Forkhead Homeobox Type O Transcription Factors in the Responses to Oxidative Stress. *Antiox. Redox Signal.*, 14: 593-605.

Strasser, A., Cory, S., Adams, J.M. (2011) Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. *EMBO J.*, 30: 3667-3683.

Sunayama, J., Tsuruta, F., Masuyama, N., Gotoh, Y. (2005) JNK antagonizes Akt-mediated survival signals by phosphorylating 14-3-3. *J. Cell. Biol.*, 170: 295–304.

SunTERS, A., Madureira, P.A., Pomeranz, K.M., Aubert, M., Brosens, J.J., Cook, S. J., Burgering, B.M.T., Coombes, R.C, Lam, E.W.F. (2006) Paclitaxel-induced nuclear translocation of FOXO3a in breast cancer cells is mediated by c-Jun NH2-terminal kinase and Akt. *Cancer Res.*, 66: 212-220.

Tait, W.G.T, Green, D.R. (2010) Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.*, 11: 621-632.

Takada, A., Nei, J., Matsuda, Y., Kanayama, R. (1982) Clinicopathological study of alcoholic fibrosis. *Am. J. Gastr.*, 77: 660-666.

Takuwa, N., Takuwa, Y., Rasmussen, H. (1988) Stimulation of mitogenesis and glucose transport by 1-monooleoylglycerol in Swiss 3T3 fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 263: 9738-9745.

Tchoudakova, A., Pathak, S., Callard, G.V. (1999) Molecular cloning of an estrogen receptor beta subtype from the goldfish, *Carassius auratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 113: 388–400.

Tenev, T., Zachariou, A., Wilson, R., Ditzel, M., Meier, P. (2005) IAPs are

functionally non-equivalent and regulate effector caspases through distinct mechanisms. *Nat. Cell Biol.*, 7: 70-77.

Thayer, S.A., Levin, L., Doisy, E.A. (1931) Characterization of Theelol. *J. Biol. Chem.*, 91: 655–665.

Thornborrow, E.C., Manfredi, J.J. (2001) The tumor suppressor protein p53 requires a cofactor to activate transcriptionally the human BAX promoter. *J. Biol. Chem.*, 276: 15598–15608.

Toker, A. (1998) Signaling through protein kinase C. *Front. Biosci.*, 3: 1134-1147.

Tolbert, N.E., Essner, E. (1981) Microbodies: peroxisomes and glyoxysomes. *J. Cell Biol.* 91: 271s-283s.

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76: 4350-4354.

Tran, H., Brunet, A., Grenier, J.M., Datta, S.R., Fornace, A.J., Di Stefano, P.S., Greenberg, M.E. (2002). DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein. *Science*, 296: 530-534.

Tremblay, G.B., Tremblay, A., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Labrie, F., Giguere, V. (1997) Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor b. *Mol. Endocrinol.*, 11: 352-365.

Trinei, M., Giorgio, M., Cicalese, A., Barozzi, S., Ventura, A., Migliaccio, E., et al. (2002) A p53-p66Shc signalling pathway controls intracellular redox status, levels of oxidation-damaged DNA and oxidative stress-induced apoptosis. *Oncogene*, 21: 3872-3878.

Truong, A.H., Cervi, D., Lee, J., Ben-David, Y. (2005) Direct transcriptional regulation of MDM2 by Fli-1. *Oncogene*, 24: 962-969.

Tukey, J.W. (1953) Some selected quick and easy methods of statistical analysis. *Trans. N. Y. Acad. Sci.*, 16: 88-97.

Vanacker, J.M., Pettersson, K., Gustafsson, J-Å., Laudet, V. (1999) Transcriptional targets shared by estrogen receptor-related receptors (ERRs) and estrogen receptor (ER) alpha, but not by ERbeta. *EMBO J.*, 18: 4270-4279.

Vasconsuelo, A., Milanesi, L., Boland, R. (2008) 17 β -Estradiol abrogates apoptosis in murine skeletal muscle cells through estrogen receptors: role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Endocrinol.*, 196: 385-397.

Vasconsuelo, A., Milanesi, L., Boland, R. (2013) Actions of 17 β -estradiol and testosterone in the mitochondria and their implications in aging. *Ageing Res. Rev.*, 12: 907-917.

Vasconsuelo, A., Pronsato, L., Ronda, A.C., Boland, R., Milanesi, L. (2011) Role of 17 β -estradiol and testosterone in apoptosis. *Steroids*, 76: 1223-1231.

Velders, M., Schleipen, B., Fritzemeier, K.H., Zierau, O., Diel, P. (2012) Selective estrogen receptor β activation stimulates skeletal muscle growth and regeneration. *FASEB J.*, 26: 1909-1920.

Veler, C.D., Thayer, S., Doisy, E.A. (1930) The Preparation of the Crystalline Follicular Ovarian Hormone: Theelin. *J. Biol. Chem.*, 87: 357-371.

Ventura, A., Maccarana, M., Raker, V.A., Pelicci, P.G (2004) A cryptic targeting signal induces isoform-specific localization of p46Shc to mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 279: 2299-2306.

Ventura, J.J., Hubner, A., Zhang, C., Flavell, R.A., Shokat, K.M., Davis, R.J. (2006) Chemical genetic analysis of the time course of signal transduction by JNK. *Mol. Cell.*, 21: 701-710.

Vidulescu, C., Clejan, S., O'Connor, K.C. (2004) Vesicle traffic through intercellular

bridges in DU 145 human prostate cancer cells. *J. Cell. Mol. Med.*, 8: 388-396.

Vousden, K.H., Lu, X. (2002) Live or let die: the cell's response to p53. *Nat. Rev. Cancer*, 2: 594-604.

Vrtačnik, P., Ostanek, B., Mencej-Bedrač, S., Marc, J. (2014). The many faces of estrogen signaling. *Biochem. Med.*, 24: 329-342.

Wagner, A.J., Kokontis, J.M., Hay, N. (1994) Myc-mediated apoptosis requires wild-type p53 in a manner independent of cell cycle arrest and the ability of p53 to induce p21waf1/cip1. *Genes Dev.*, 8: 2817-2830.

Wajant, H. (2002) The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science*, 296: 1635-1636.

Waldron, R.T., Iglesias, T., Rozengurt, E. (1999) Phosphorylation-dependent protein kinase D activation. *Electrophoresis*, 20: 382-390.

Waldron, R.T., Innamorati, G., Torres-Marquez, M.E., Sinnett-Smith, J., Rozengurt, E. (2012) Differential PKC-dependent and-independent PKD activation by G protein α subunits of the Gq family: Selective stimulation of PKD Ser 748 autophosphorylation by G α q. *Cell. Signal.*, 24: 914-921.

Wallace, D.C. (2005) A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Ann. Rev. Gen.*, 39: 359.

Wanagat, J., Cao, Z., Pathare, P., Aiken, J.M. (2001) Mitochondrial DNA deletion mutations colocalize with segmental electron transport system abnormalities, muscle fiber atrophy, fiber splitting, and oxidative damage in sarcopenia. *FASEB J.*, 15: 322-332.

Wang, X., Gerdes, H.H. (2015) Transfer of mitochondria via tunneling nanotubes rescues apoptotic PC12 cells. *Cell Death Differ.*, 22: 1181-1191.

Wang, Y., Cui, J., Sun, X., Zhang, Y. (2011) Tunneling-nanotube development in astrocytes depends on p53 activation. *Cell Death Differ.*, 18: 732-742.

Wang, Y., Takashi, E., Xu, M., Ayub, A., Ashraf, M. (2001) Downregulation of protein kinase C inhibits activation of mitochondrial KATP channels by diazoxide. *Circulation*, 104: 85-90.

Warren, G.L., Lowe, D.A., Inman, C.L., Orr, O.M., Hogan, H.A., Bloomfield, S.A., Armstrong, R.B. (1996) Estradiol effect on anterior crural muscles-tibial bone relationship and susceptibility to injury. *J. Appl. Physiol.*, 80: 1660-1665.

Watkins, S.C., Salter, R.D. (2005) Functional connectivity between immune cells mediated by tunneling nanotubules. *Immunity*, 23: 309-318.

Watson, C.S., Pappas, T.C., Gametchu, B. (1995) The other estrogen receptor in the plasma membrane: implications for the actions of environmental estrogens. *Environ. Health Perspect.*, 103: 41-50.

Wawrzak, Z., Duax, W.L., Strong, P.D., Weisz, J. (1988) Steroid structure and function. Molecular conformation of 4-hydroxyestradiol and its relation to other catechol estrogens. *J. Steroid. Biochem.*, 29: 387-392.

Weisiger, R.A., Fridovich, I. (1973) Superoxide dismutase organelle specificity. *J. Biol. Chem.*, 248: 3582-3592.

Welshons, W.V., Wolf, M.F., Murphy, C.S., Jordan, V.C. (1988) Estrogenic activity of phenol red. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 57: 169-178.

Whelan, R.D., Parker, P.J. (1998) Loss of protein kinase C function induces an apoptotic response. *Oncogene*, 16: 1939-1944.

Wiik, A., Ekman, M., Morgan, G., Johansson, O., Jansson, E., Esbjörnsson, M. (2005) Oestrogen receptor β is present in both muscle fibres and endothelial cells within human skeletal muscle tissue. *Histochem. Cell Biol.*, 124: 161-165.

Wilder, R.L. (1998) Hormones, pregnancy, and autoimmune diseases. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 840: 45-50.

Wu, Z., Rogers, B., Kachi, S., Hackett, S.F., Sick, A., Campochiaro, P.A. (2006) Reduction of p66Shc suppresses oxidative damage in retinal pigmented epithelial cells and retina. *J. Cell. Physiol.*, 209: 996-1005.

Xuan, Z., Zhang, M.Q. (2005). From worm to human: bioinformatics approaches to identify FOXO target genes. *Mech. Ageing Dev.*, 126: 209-215.

Yaffe, D., Saxel, O. (1977) Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature*, 270: 725-727.

Yang, J.Y., Zong, C.S., Xia, W., Yamaguchi, H., Ding, Q., Xie, X., Lang, J.Y., Lai, C.C., Chang, C.J., Huang, W.C., Huang, H., Kuo, H.P., Lee, D.F., Li, L.Y., Lien, H.C., Cheng, X., Chang, K.J., Hsiao, C.D., Tsai, F.J., Tsai, C.H., Sahin, A.A., Muller, W.J., Mills, G.B., Yu, D., Hortobagyi, G.N., Hung, M.C. (2008) ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation. *Nat. Cell Biol.*, 10: 138-148.

Yang, S.H., Liu, R., Perez, E.J., Wen, Y., Stevens, S.M., Valencia, T., Brun Zinkernagel, A.M., Prokai, L., Will, Y., Dykens, J., et al. (2004) Mitochondrial localization of estrogen receptor beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101: 4130-4135.

Yonish-Rouach, E. (1996) The p53 tumour suppressor gene: a mediator of a G1 growth arrest and of apoptosis. *Experientia*, 52: 1001-1007.

Yoshida, N., Yoshida, S., Koishi, K., Masuda, K., Nabeshima, Y.I. (1998) Cell heterogeneity upon myogenic differentiation: down-regulation of MyoD and Myf-5 generates 'reserve cells'. *J. Cell Sci.*, 111: 769-779.

Yu, C., Minemoto, Y., Zhang, J., Liu, J., Tang, F., Bui, T.N., Xiang, J., Lin, A. (2004) JNK suppresses apoptosis via phosphorylation of the proapoptotic Bcl-2

family protein BAD. *Mol. Cell*, 13: 329-340.

Yu, J., Zhang, L. (2008). PUMA, a potent killer with or without p53. *Oncogene*, 27: S71-S83.

Yu, J., Zhang, L., Hwang, P.M., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. (2001) PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol. Cell*, 7: 673-682.

Zhang, T., Sell, P., Braun, U., Leitges, M. (2015) PKD1 Protein Is Involved in Reactive Oxygen Species-mediated Mitochondrial Depolarization in Cooperation with Protein Kinase C δ (PKC δ). *J. Biol. Chem.*, 290: 10472-10485.

Zhao, J., Brault, J.J., Schild, A., Cao, P., Sandri, M., Schiaffino, S., Lecker, S.H., Goldberg, A.L. (2007) FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell. Metab.*, 6: 472-483.

Zhou, L.Z., Johnson, A.P., Rando, T.A. (2001) NF kappa B and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells. *Free Radic. Biol. Med.*, 31: 1405-1416.

Zhu, D., Tan, K.S., Zhang, X., Sun, A.Y., Sun, G.Y., Lee, J.C. (2005) Hydrogen peroxide alters membrane and cytoskeleton properties and increases intercellular connections in astrocytes, *J. Cell Sci.*, 118: 3695-3703.

Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A., Wang, X. (1997) Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*, 90: 405-413.

Zou, H., Li, Y., Liu, X., Wang, X. (1999) An APAF-1· cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J. Biol. Chem.*, 274: 11549-11556.

Trabajos generados en esta tesis

Los resultados generados a partir de este trabajo de tesis doctoral han sido incluidos en las siguientes publicaciones científicas y presentados en congresos nacionales e internacionales:

Publicaciones científicas

La Colla, A., Vasconsuelo, A., Boland, R. (2013) ESTRADIOL EXERTS ANTI-APOPTOTIC EFFECTS IN SKELETAL MYOBLASTS VIA MITOCHONDRIAL PTP AND MNSOD. *Journal of Endocrinology*, 216: 331-341.

Pronsato, L., La Colla, A., Ronda, A.C., Milanesi, L., Boland, R., Vasconsuelo, A. (2013) HIGH PASSAGE NUMBERS INDUCE RESISTANCE TO APOPTOSIS IN C2C12 MUSCLE CELLS. *BIOCELL*, 37: 1-9.

La Colla, A., Pronsato, L., Ronda, A.C., Milanesi, L., Vasconsuelo, A., Boland, R. (2014) 17 β -ESTRADIOL AND TESTOSTERONE PROTECT MITOCHONDRIA AGAINST OXIDATIVE STRESS IN SKELETAL MUSCLE CELLS. *Actualizaciones en Osteología*, 10: 122-135.

La Colla, A., Boland, R., Vasconsuelo, A. (2015) 17 β -ESTRADIOL ABROGATES APOPTOSIS INHIBITING PKC δ , JNK AND p66Shc ACTIVATION IN C2C12 CELLS. *Journal of Cellular Biochemistry*, 116: 1454-1465.

La Colla, A., Pronsato, L., Milanesi, L., Vasconsuelo, A. (2015) 17 β -ESTRADIOL and testosterone in sarcopenia: role of satellite cells. *Ageing Research Reviews*, pii S1568-1637.

Presentaciones a congresos

Se presentaron en 16 congresos nacionales e internacionales.