



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN BIOQUÍMICA

**Rol de la testosterona y su
receptor frente a la apoptosis
en células musculares
esqueléticas murinas**

LUCÍA PRONSATO

BAHÍA BLANCA

2013

ARGENTINA

Director de Tesis

DR. RICARDO L. BOLAND

Directora Adjunta de Tesis

DRA. LORENA M. MILANESI

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 durante el período comprendido entre el 20 de Octubre de 2009 y el 11 de Noviembre de 2013, bajo la dirección del Dr. Ricardo L. Boland (director) y la Dra. Lorena M. Milanesi (directora adjunta).

Bioq. Lucía Pronsato



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Postgrado y Educación Continua

La presente Tesis ha sido aprobada el/...../....., mereciendo la calificación de (.....).

*A Quienes con Amor incondicional
me sostuvieron en este camino e
hicieron este trabajo posible.*

Agradecimientos

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a las siguientes instituciones y personas, porque sin ellas no hubiera podido realizar este trabajo:

A la Universidad Nacional del Sur y al Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, por darme la oportunidad de estudiar una carrera de grado, por brindarme el lugar y los recursos necesarios para mi formación académica de postgrado.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por concederme una beca de postgrado, la cual permitió llevar a cabo este trabajo de tesis.

Al Dr. Ricardo Boland por abrirme las puertas de su laboratorio aún cuando era estudiante, por haberme facilitado los recursos para el desarrollo de esta tesis, por transmitirme su conocimiento, experiencia, por su asesoramiento y supervisión; por confiar en mí.

A la Dra. Lorena Milanesi, por enseñarme a dar mis primeros pasos en la investigación, por transmitirme sus conocimientos y su experiencia laboral y personal, por su ayuda invaluable, por su compañía incondicional, su cuidado y generosidad. Por alegrarse y disfrutar juntas de cada logro conquistado.

A la Dra. Ana Russo de Boland, y a todos mis compañeros de Química Biológica, porque de distintas formas y a su manera, todos estuvieron presente para que esto fuera posible. En particular a la Dra. Andrea Vasconsuelo por estar siempre dispuesta a ayudarme, por intentar solucionar siempre cada problema con humor, por el café compartido de cada tarde. A la Dra. Ana Carolina Ronda, por su amistad, por hacerme reír y compartir la fe en nuestro ámbito laboral. A Anabela La Colla que hizo cada almuerzo un pequeño almuerzo familiar diario, a Silvia Benassati y Gastón Stockman, con quienes comparto a diario el lugar de trabajo, por su

solidaridad y compañerismo. A todos agradezco tan gratas horas de trabajo que incluyeron risas, llantos, momentos de mucha alegría y otros no tantos, y que en su conjunto me hicieron crecer y aprender.

A Roberto y a mis hermanos de comunidad, por sus oraciones que me sostuvieron y fortalecieron en los momentos más difíciles, por contenerme y enseñarme a ver a Dios tan cotidianamente en mi vida. A Manu que se tomó esta tesis como personal. A Vani, Vale, José y a todos los que de alguna manera estuvieron pendientes y presentes en la realización de esta tesis.

A mis papás por ser ejemplo de sacrificio y entrega. Por enseñarme a ser ante todo una buena persona. Por alentarme y acompañarme incondicionalmente en las dificultades. Por ser siempre un refugio donde poder descansar.

A mis hermanos, que a pesar de las distancias físicas que muchas veces nos separaron, siempre estuvieron tan cerca. A Adolfo por estar siempre presente y disponible a ayudar aún desde lejos. A Estela por su incondicionalidad, por defenderme como madre y encontrar siempre una solución a todos mis problemas. A Tere por sus oraciones, por su compartir y testimonio, por crecer juntas en la fe. A César por las horas de charlas telefónicas, por su contención, sus consejos, su escucha, su ánimo, su psicología, por ser mi compañero siempre.

A Estela y a mi mamá, por corregirme y sacarme cualquier duda que me surgiera del inglés, aprendiendo conmigo de apoptosis y sarcopenia.

A Dios por soñarme hoy acá. Por derramar sus gracias y brindarme los medios necesarios para poder desarrollar esta vocación científica. Por su providencia, por ser un pilar en mi vida, porque sin su presencia viva en cada uno de estos días, nada de esto hubiera sido posible.

RESUMEN

La pérdida de masa y fuerza del músculo esquelético, característico de ciertas miopatías como la sarcopenia, es una condición frecuente durante el envejecimiento, y está asociada a disfunciones de los sistemas muscular y esquelético. Aunque los mecanismos moleculares involucrados en esta patología no están totalmente esclarecidos, existen evidencias que demuestran que la apoptosis es en parte responsable de la pérdida de miocitos en la adultez, contribuyendo a la patogénesis de la sarcopenia. Puesto que los niveles de hormonas sexuales disminuyen con la edad, la sarcopenia se ha asociado al déficit de las mismas. En este trabajo, se ha demostrado que la testosterona, a concentración fisiológica, protege frente a la apoptosis inducida por H_2O_2 en la línea celular de músculo esquelético murino C2C12. Las alteraciones morfológicas típicas de la apoptosis tales como fragmentación nuclear, desorganización del citoesqueleto, reorganización/disfunción mitocondrial y liberación de citocromo c inducidos por el H_2O_2 , son inhibidas cuando las células son previamente tratadas con la hormona. Se ha observado que las células C2C12 muestran una respuesta bifásica en presencia del agente apoptótico. A tiempos cortos de exposición al H_2O_2 , las células activan un mecanismo de defensa, para evitar entrar en apoptosis, el cual consiste en la fosforilación de ERK2, Akt y Bad y en un aumento de expresión de la proteína asociada a eventos de supervivencia, HSP70. Simultáneamente y a partir de aproximadamente media hora de tratamiento con H_2O_2 , se observa la fosforilación de JNK, p66Shc y p53, estas últimas mostrando un pico máximo de activación a la 1-2 hs. A tiempos más largos de exposición al agente apoptótico (4 hs) se produce la defosforilación de ERK2, Akt y Bad, se mantiene la fosforilación de JNK, disminuye la activación de p53 y p66Shc, se produce la liberación de citocromo c, el clivaje de PARP, la fragmentación del ADN y la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial, indicando que las células inician finalmente el proceso de muerte celular programada. Sin embargo, cuando las células son tratadas con testosterona, previo a la exposición al H_2O_2 , se reduce la fosforilación de JNK, se observa la inactivación de la proteína apoptótica Bad, disminución de los niveles de la proteína apoptótica Bax, inhibición del clivaje de PARP, prevención de la pérdida del potencial de

membrana mitocondrial y disminución de la fosforilación y localización mitocondrial de la proteína amplificadora del estrés oxidativo, p66Shc. El empleo de un antagonista no esteroideo específico para la testosterona, la Flutamida, reduce el efecto protector del esteroide, involucrando al receptor de andrógenos (AR) en los efectos antiapoptóticos de la hormona. También, se obtuvieron evidencias bioquímicas, farmacológicas e inmunológicas, que demuestran la presencia del AR con localización clásica (nuclear) y no clásica en microdominios (específicamente caveolas y *rafts*) y mitocondrias. Las distintas localizaciones del AR podrían mediar el efecto antiapoptótico de la testosterona a distintos niveles subcelulares. Los resultados aquí presentados permiten comenzar a definir y esclarecer los mecanismos de señalización activados por la testosterona y su receptor, que median el efecto protector frente al daño oxidativo en músculo esquelético y su relación con miopatías asociadas al déficit de hormonas sexuales.

ABSTRACT

The loss of muscle mass and strength with aging, also referred to as sarcopenia, is a highly prevalent condition among the elderly, and it is associated with skeletal muscle dysfunction. Although the exact mechanisms underlying sarcopenia are far from being clarified, accumulating evidence suggests that an age-related acceleration of myocyte loss via apoptosis might represent a key mechanism responsible for impairment of muscle performance. Sarcopenia has been associated with a deficit of sex hormones as the levels of estrogens and/or testosterone decline with aging. In this work, it has been demonstrated that, at physiological concentrations, testosterone protects against H₂O₂-induced apoptosis in C2C12 muscle cells. Typical changes of apoptosis such as nuclear fragmentation, cytoskeleton disorganization, mitochondrial reorganization/dysfunction and cytochrome c release induced by H₂O₂, are abolished when cells are previously exposed to the hormone. It has been observed that C2C12 cells show a biphasic response when they are treated with the apoptotic agent. At short times of exposure to H₂O₂, C2C12 cells exhibit a defense response showing ERK2, Akt and Bad phosphorylation and an increase of HSP70 levels. Simultaneously and approximately after half an hour from the beginning of H₂O₂ treatment, JNK, p53 and p66Shc phosphorylation are observed, with maximum activation for p53 and p66Shc after 1-2 hours. At longer treatment times (4 hs), dephosphorylation of ERK2, Akt and Bad is observed, JNK continues phosphorylated, the activation of p53 and p66Shc decreases and cytochrome c release, PARP cleavage, DNA fragmentation and the loss of mitochondrial membrane potential occur, indicating that cells finally enter into apoptosis. However, incubation with testosterone prior to H₂O₂, reduces JNK phosphorylation, induces Bad inactivation, inhibition of PARP cleavage, a decrease in Bax levels; reduces the loss of mitochondrial membrane potential and p66Shc phosphorylation and its mitochondrial localization. The employment of the androgen receptor (AR) antagonist, Flutamide, decreases the protective effects of the hormone, pointing to a possible participation of the AR in the anti-apoptotic effect of testosterone. Moreover, biochemical, pharmacological and immunological data

demonstrate a classical (nuclear) and non-classical localization of the AR in microdomains (caveolae and *rafts*) and mitochondria. These results assign an active role for the AR during the anti-apoptotic effect of the hormone, possibly, at different subcellular levels. The data presented in this work unravel in part the molecular mechanisms activated by testosterone and its receptor, underlying the survival action of the hormone against oxidative stress damage in skeletal muscle and its relationship with myopathies associated with sex hormonal dysregulation.

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

Firma del Director

ÍNDICE

ABREVIATURAS	2
INTRODUCCIÓN	5
I. TESTOSTERONA: HISTORIA, SÍNTESIS Y ACCIONES BIOLÓGICAS	5
1. El descubrimiento de la testosterona: breve reseña histórica	5
2. Biosíntesis de la testosterona.....	8
3. Regulación de la síntesis de testosterona y transporte	12
4. Funciones biológicas de la testosterona	13
Andrógenos y músculo esquelético	14
II. EL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS	16
1. Organización estructural del gen del AR.....	17
2. Estructura proteica del AR	18
3. Mecanismo de acción clásico del AR	19
4. Mecanismos de acción no-clásicos del AR.....	21
OBJETIVOS	24
METODOLOGÍA	25
Modelo experimental	26
Cultivos de células C2C12.....	27
Tratamientos celulares.....	27
Materiales	28
<i>Western blot</i>	29
Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)	29
Transferencia	30
Bloqueo.....	30
Revelado con anticuerpos.....	30
Rehibridación de las membranas de <i>Western Blot</i>	31
Fraccionamiento subcelular.....	31
Aislamiento de caveolas y <i>rafts</i>	32
Inmunocitoquímica	34
Microscopía	34
a. Microscopía de fluorescencia convencional	34
b. Microscopía confocal.....	34
Tinciones mitocondriales	35
a. Mitotracker.....	35

b. Verde Jano	35
Tinciones nucleares	36
a. DAPI	36
b. TUNEL	36
Evaluación de la integridad de la membrana mitocondrial.....	37
a. Medición de la integridad de la membrana mitocondrial externa	37
b. Medición del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)	38
c. Medición de la apertura del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (mPTP).....	38
Ensayos de ligado usando [³ H] testosterona.....	39
Preparación de la suspensión de carbón/dextrano.....	41
Inmunoprecipitación	41
Preparación de las suspensiones de proteína A sefarosa	41
Fragmentación del ADN.....	42
Real time PCR.....	42
a. Extracción de ARN total.....	43
b. Retrotranscripción del ARNm a ADNc.....	43
c. Real time PCR.....	44
Análisis estadístico	45

CAPÍTULO I: El H₂O₂ como inductor de apoptosis en células musculares C2C12: respuesta celular y rol de la testosterona

RESULTADOS	47
I. Activación de proteínas asociadas a eventos de supervivencia e inactivación de proteínas apoptóticas a tiempos cortos de exposición al H ₂ O ₂	47
II. Efecto protector de la testosterona frente a la apoptosis tras la exposición de las células C2C12 a tiempos largos de H ₂ O ₂	51
Efecto de la testosterona sobre los niveles de expresión de la proteína apoptótica Bax y Actina.....	54
Efecto de la testosterona sobre la localización subcelular de Bax.....	56
III. Efecto de la testosterona sobre los cambios morfológicos y funcionales inducidos por el H ₂ O ₂ en células C2C12	57
a. Evaluación de la morfología nuclear, distribución mitocondrial y estabilidad del citoesqueleto.....	57
b. Cuantificación de núcleos apoptóticos (picnóticos).....	59
c. Alteraciones en la integridad y el potencial de la membrana mitocondrial por el tratamiento con H ₂ O ₂ : rol de la testosterona	63
Empleo de colorantes supravitales	63

Liberación mitocondrial de citocromo c	65
Apertura del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (mPTP).....	66
Evaluación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)	69
DISCUSIÓN	72
 CAPÍTULO II: Localización no clásica del receptor de andrógenos	
RESULTADOS	79
I. Distribución subcelular del receptor de andrógenos	79
II. Localización del receptor de andrógenos en <i>rafts</i> y caveolas.....	81
III. Detección del receptor de andrógenos con localización no clásica por inmunocitoquímica	82
IV. Efecto de la testosterona sobre la localización subcelular de la HSP90.....	86
V. Caracterización del AR mitocondrial y de membrana mediante ensayos de ligado de [³ H] testosterona	86
VI. Interacción del AR y Caveolina-1 en la fracción microsomal	89
VII. La testosterona induce la translocación del mAR.....	90
DISCUSIÓN	93
 CAPÍTULO III: Activación de vías de señalización y regulación de la expresión génica durante el estrés oxidativo: rol de la testosterona	
RESULTADOS	100
I. Efecto del estrés oxidativo sobre p53 en C2C12.....	100
II. Efecto de la testosterona sobre la activación de p53.....	103
III. Efecto de la testosterona sobre la activación de p66Shc inducida por el H ₂ O ₂	105
IV. Colocalización e interacción de p66Shc y HSP70 en mitocondrias	113
V. Efecto de la testosterona sobre la activación de JNK.....	114
VI. Introducción al análisis de la expresión génica.....	117
DISCUSIÓN	122
 CONCLUSIONES GENERALES	131
 REFERENCIAS	134
 TRABAJOS GENERADOS	164

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS EN INGLÉS UTILIZADAS EN ESTA TESIS

AMPc: Cyclic 3',5'-adenosine monophosphate

AR: Androgen receptor

AREs: Androgen response elements

mAR: Membrane androgen receptor

BAD: Bcl-2-associated death promoter

BSA: Bovine serum albumin

DBD: DNA-binding domain

DIABLO: Direct IAP-binding protein

DHT: Dihydrotestosterone

DHEA: Dehydroepiandrosterone

DMEM: Dulbecco's modified Eagle medium

DTT: Dithiothreitol

ERK: Extracellular signal-regulated kinase

HSP: Heat shock protein

JNK: c-jun NH₂-terminal kinase

LBD: Ligand binding domain

LDL: Low density lipoproteins

LH: Luteinizing hormone

LHRH: Luteinizing-hormone-releasing hormone

MAPK: Mitogen activated protein kinase

mPTP: Mitochondrial permeability transition pore

NF-κB: Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NRs: Nuclear receptors

PARP: Poly-(ADP ribose)-polymerase

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

PKA: Protein kinase A

PKC: Protein kinase C

PMA: Phorbol 12-Myristate 13-acetate

PMSF: Phenylmethylsulphonyl fluoride

PUMA: p53 up-regulated modulator of apoptosis

PVDF: Polyvinylidene fluoride

qPCR: Quantitative polymerase chain reaction

ROS: Reactive oxygen species

SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate – polyacrilamide gel electrophoresis

SHBG: Steroid hormone binding globulin

Smac: Second mitochondria-derived activator of caspases

StAR: Steroidogenic acute regulatory protein

TUNEL: TdT-mediated dUTP nick end-labeling

VDAC: Voltage – dependent anion - selective channel

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La endocrinología es una rama moderna de la ciencia, que aunque arraigada en la antigüedad, es virtualmente una creación del siglo XX. A mediados del siglo XIX, el fisiólogo Claude Bernard (1813-1878) introdujo el término “*secreción interna*” para describir sus observaciones sobre la función gluconeogénica del hígado, paso decisivo en el nacimiento de la endocrinología. Postuló así la capacidad de ciertos órganos de producir sustancias específicas que pasaban a la sangre para contribuir al mantenimiento del equilibrio del organismo. Sin embargo, en el siglo XX fueron William Bayliss (1860-1924) y Ernest Henry Starling (1866-1927) los primeros en proporcionar una demostración clara del mecanismo de acción de las secreciones internas, con su trabajo publicado en 1902 sobre la secretina, siendo ésta considerada la primera hormona. La prueba de su existencia y modo de acción, confirmó una idea de siglos pasados: *el flujo sanguíneo transporta secreciones internas que pueden tener influencia sobre las actividades de los órganos dentro del cuerpo*. Starling acuñó la palabra “hormona” para dichas secreciones glandulares internas (palabra proveniente de *hormon*, que significa poner en movimiento, excitar), que con el tiempo fue utilizada para designar en forma genérica, a todas las sustancias producidas por las diferentes glándulas endócrinas. Desde entonces, el estudio de las hormonas y su mecanismo de acción ha sido de gran interés para el hombre.

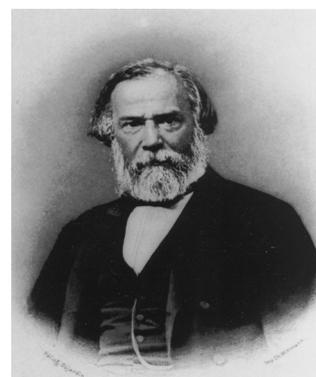
I. TESTOSTERONA: HISTORIA, SÍNTESIS Y ACCIONES BIOLÓGICAS

1. El descubrimiento de la testosterona: breve reseña histórica

Los efectos hormonales de los testículos han sido empíricamente comprendidos desde el Neolítico, con la observación de los efectos que

producía la castración en los animales. Sin embargo, que la responsable de tales efectos era principalmente la testosterona, se desconoció hasta casi 6.000 años más tarde [Freeman et al. 2001]. En 1849 Arnold Berthold (1801-1863) ya contaba con la ventaja de la ciencia del siglo XIX para relacionar los cambios observados en animales castrados, con alguna sustancia secretada por los testículos. Berthold notó que la disminución en el tamaño de la cresta de los gallos castrados (carácter sexual secundario de este animal), se revertía luego de reimplantar los testículos en la cavidad abdominal del animal. Dado que los testículos reimplantados ya no estaban inervados, Berthold postuló que los mismos debían secretar a la sangre alguna sustancia que afectara el comportamiento y los caracteres sexuales del animal.

En 1889, a los 72 años de edad, el fisiólogo francés Charles Edouard Brown-Séquard (1817-1894), discípulo de Claude Bernard, realizó sobre sí mismo un experimento realmente inusual. Observó que cuando se inyectaba extractos de testículo de perro y de cobayo, se producía una mejora en el estado general de su salud, de su fuerza muscular, del apetito, de la regulación intestinal y de sus facultades mentales [Brown-Séquard 1889].



Charles Edouard Brown-Séquard (1817-1894)

Brown-Séquard proclamó que sus extractos tenían el poder de "aumentar la fuerza de muchas partes del cuerpo humano", lo que causó sensación y provocó, que este experimento poco riguroso y serio desde el punto de vista científico, fuera utilizado por algunos cirujanos que se enriquecían administrando inyecciones de extractos acuosos de glicerol de testículos de animales, para el tratamiento de diversas enfermedades. Su popularidad aumentaba ya que se lo promocionaba como el elixir de la eterna juventud. [Hoberman y Yesalis 1995; Tattersall 1994; Hansen 1999].

Muchos científicos comenzaron a investigar los testículos y otras glándulas para entender mejor lo que Claude Bernard había llamado "secreción interna". Paul Ancel (1873-1961) y Pol Bouin (1870-1962) identificaron una "porción generativa" y una "porción endócrina", al examinar la histología de los testículos [Haire 1925; Sengoopta 1998]. Postularon a la porción generativa como la encargada de la producción de

esperma mientras que la porción endócrina sería la fuente de la sustancia responsable de los efectos observados por Brown-Séquard.

Siguiendo los pasos de Brown-Séquard, el fisiólogo vienés Eugen Steinach (1861-1944) estudió los efectos del rejuvenecimiento tras la vasectomía en animales viejos. En 1920 Steinach postuló que al ligar el conducto deferente testicular y bloquear la salida de esperma de la glándula, se atrofiaban las células productoras de esperma, lo que llevaba a la proliferación de las células endócrinas, para llenar el "espacio vacío", aumentando así la producción de hormonal. Steinach describió cómo en sus experimentos las ratas más viejas se tornaban más vivaces luego de la operación. En poco tiempo la "operación Steinach" y los injertos de tejido testicular se convirtieron en el procedimiento quirúrgico más popular, entre quienes buscaban escapar de los efectos del envejecimiento. Muchos argumentaban que la Primera Guerra Mundial había devastado la generación de jóvenes europeos, por lo que la "operación Steinach" proporcionaba una tentadora solución [Schultheiss 1997, Hirshbein 2000, Sengoopta 2003].



Adolf Butenandt
(1903-1995)

La industria farmacéutica estaba ansiosa por aprovechar la popularidad de organoterapia a pesar de su dudosa eficacia. Fue el estudiante de química Adolf Butenandt, quién en 1929 aisló la primer hormona sexual, la estrona, a partir de orina de mujeres embarazadas. En 1931, Butenandt consiguió aislar una sustancia químicamente pura de un extracto de 15.000 litros de orina de policías. El análisis químico de dicha sustancia reveló que contenía un núcleo policíclico muy parecido al núcleo del colesterol, al que estaban ligados un grupo hidroxil y una cetona. El autor denominó a la sustancia "androsterona" ("andro"=masculino, "ster"=esterol, "ona"=cetona) [Kochakian 1993; Daintith y Gjertsen 1999; Freeman et al. 2001]. Sin embargo, los testículos resultaron contener un factor androgénico aún más potente. En 1935 Ernst Laqueur y colaboradores, consiguen aislar e identificar químicamente la testosterona ("testo"= testículo, "ster"=esterol, "ona"=cetona) además de contribuir al conocimiento de la fisiología, farmacología y clínica de las hormonas

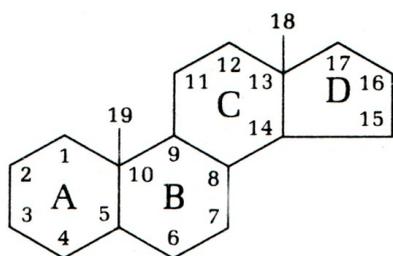
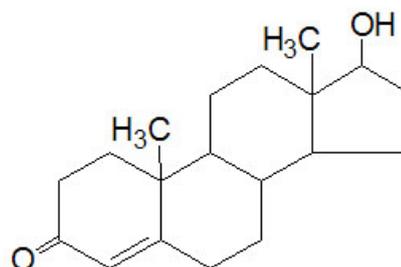
sexuales. La síntesis de la testosterona llegó ese mismo año, de la mano de Butenandt y Hanish, quienes publicaron el trabajo titulado "Método para preparar testosterona a partir del colesterol". Una semana más tarde Ruzicka y Wettstein presentan el artículo "Preparación artificial de la hormona testicular testosterona" y reclaman su patentación. En 1939 Ruzicka y Butenandt reciben el premio Nobel de química por sus trabajos con hormonas sexuales, aunque Butenandt fue forzado por el gobierno Nazi a rechazar tal honor [Daintith y Gjertsen 1999].

Aunque el nombre de testosterona tiene solo 65 años, esta hormona ha sido foco de interés científico por más de 150 años. Su influencia sobre el desarrollo físico y sexual, así como sus potenciales propiedades terapéuticas seguirá inspirando nuevas investigaciones y controversias.

2. Biosíntesis de la testosterona

Los andrógenos son los principales esteroides sexuales del hombre y los responsables del desarrollo fenotípico masculino durante la embriogénesis y la maduración sexual en la pubertad. El principal andrógeno circulante en el hombre es la testosterona aunque es la dihidrotestosterona (DHT), su metabolito más activo, y quien participa en diversos procesos biológicos.

La testosterona, como todas las hormonas esteroideas, es un derivado del colesterol y está formada por una estructura básica de ciclopentanoperhidrofenantreno, compuesto por tres anillos de 6 carbonos (A, B y C) y uno de 5 carbonos (D). La testosterona tiene 19 átomos de carbono, un doble enlace entre C4 y C5, un átomo de oxígeno en C3 y un radical hidroxilo (OH) en C17, siendo esta estructura necesaria para el mantenimiento de la actividad androgénica.

**Ciclopentanoperhidrofenantreno****Testosterona**

El 95% de los andrógenos circulantes son producidos en las células intersticiales de Leydig del testículo, siendo la testosterona el esteroide sintetizado en mayor concentración, por lo que es considerada el principal andrógeno testicular. Aunque las células de Leydig son el sitio principal de síntesis de testosterona, ésta también se sintetiza en otros tejidos a partir de los andrógenos circulantes (androstenediona, dehidroepiandrosterona (DHEA)), provenientes de la corteza suprarrenal (zona reticular).

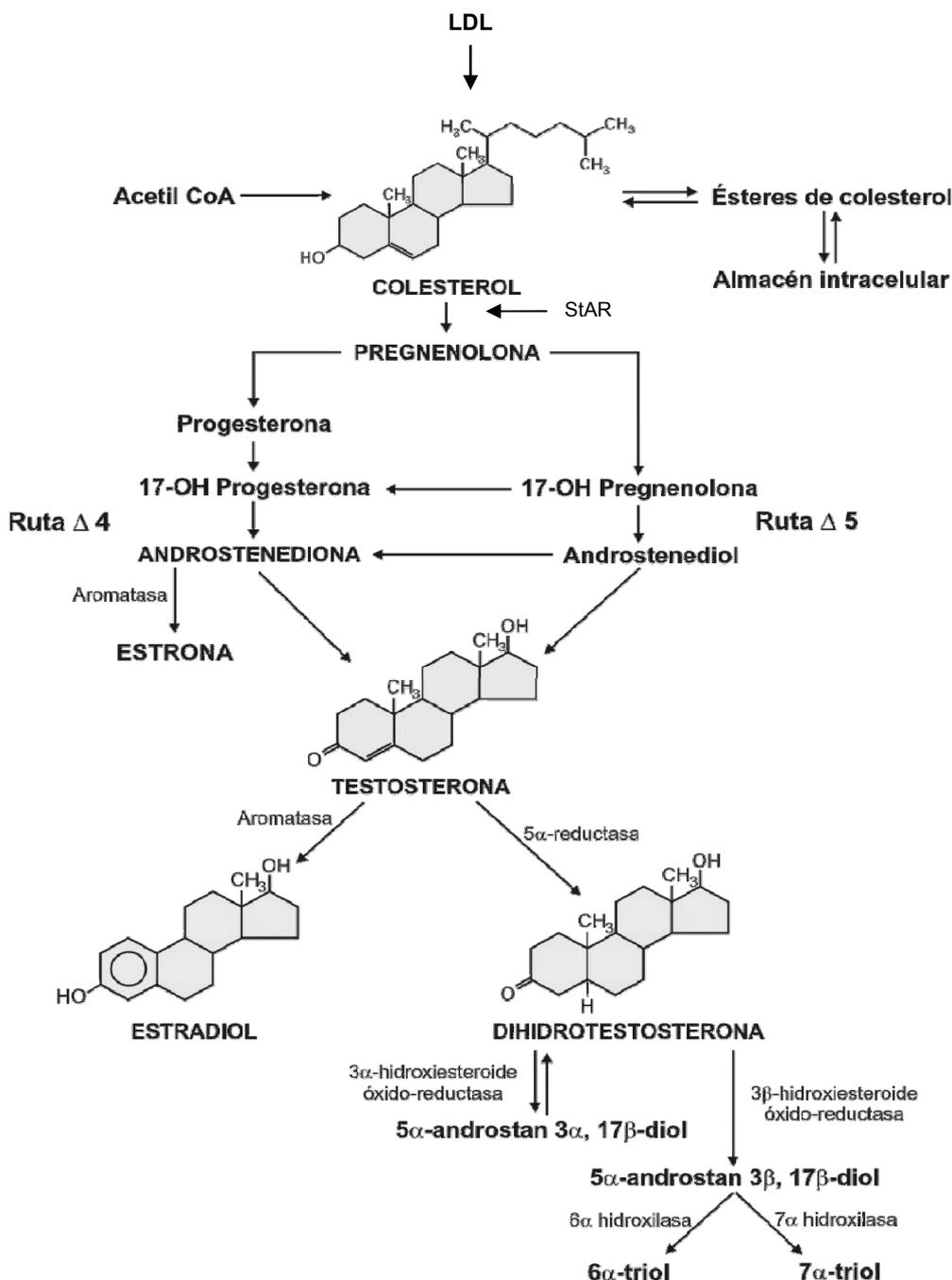
El colesterol, como se mencionó anteriormente, actúa como precursor en la síntesis de los andrógenos. Las fuentes celulares de colesterol son: la síntesis celular *de novo* a partir de Acetil CoA, las lipoproteínas plasmáticas transportadoras de colesterol o bien las gotas citoplasmáticas de ésteres de colesterol que actúan a modo de reservas. Aproximadamente, el 60 % del colesterol es producido localmente por las células de Leydig, y el resto es aportado por los ésteres de colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) las cuales atraviesan la membrana plasmática por endocitosis mediada por receptor. Los ésteres de colesterol pueden almacenarse en forma de gotas de lípidos o convertirse en colesterol libre para ser utilizado en la síntesis de esteroides. En las células esteroideogénicas existe un equilibrio entre el colesterol libre y los ésteres de colesterol. Dicho equilibrio es regulado por la enzima Acil CoA-Colesterol-Acil-Transferasa (ACAT) que esterifica al colesterol, y por la enzima colesterol éster hidrolasa o esterasa que cataliza la reacción inversa.

La síntesis de testosterona comienza con la movilización del colesterol hacia la mitocondria en respuesta al estímulo gonadotrófico, la cual es mediada principalmente por la proteína StAR (*steroidogenic acute regulatory protein*). Las células esteroideogénicas, en respuesta al estímulo

hormonal trófico, sintetizan la proteína citoplasmática StAR la cual se asocia a chaperonas que impiden su plegamiento. La interacción de StAR con un receptor específico presente en la membrana externa mitocondrial provoca un cambio en su conformación que generaría puntos de contacto entre las membranas externa e interna de la mitocondria, permitiendo la entrada de colesterol a la mitocondria. Así, el ingreso de colesterol a la mitocondria, estaría controlado por la síntesis y el procesamiento de StAR, y la formación de sitios de contacto entre las dos membranas de la organela.

Es en la membrana interna mitocondrial donde se produce la conversión del colesterol a pregnenolona, catalizada por un complejo multienzimático dependiente del citocromo P-450 que escinde la cadena lateral del colesterol (desmolasa o P450scc) entre los carbonos 20 y 22. La pregnenolona sale de la mitocondria hacia el retículo endoplasmático liso, donde puede seguir dos caminos diferentes: Δ^4 o Δ^5 , designando esta terminología la posición del enlace insaturado. La progesterona, originada a través del camino Δ^4 es transformada en androstenediona por el complejo enzimático 17 α hidroxilasa C17-20 liasa, dependiente del citocromo P-450 (P-450c17). Pero también, la pregnenolona puede seguir la vía Δ^5 obteniéndose primeramente DHEA por acción del complejo P-450c17 y luego, por isomerización, androstenediona. En el humano la ruta más importante es la Δ^5 , mientras que en los roedores es la Δ^4 . El paso final en la síntesis de testosterona está regulado por la enzima microsomal 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β HSD), que cataliza la conversión de androstenediona a testosterona. Dicha reacción es reversible, siendo su dirección regulada por la concentración de sustrato y producto. La testosterona puede metabolizarse en otros esteroides biológicamente activos, en DHT a través de la enzima 5 α -reductasa y a continuación en 3 α ó 3 β dioles. Finalmente, estos dioles son metabolizados a trioles, quienes son los productos finales del metabolismo de la testosterona, muy solubles en agua, sin actividad androgénica y que no pueden volver a convertirse en DHT. Aproximadamente, el 80% de la DHT circulante es producida por la conversión periférica de testosterona, y el 20% es secretada directamente por los testículos. Tanto la testosterona como la DHT se fijan al mismo receptor androgénico y sus efectos se complementan entre sí. Pero la DHT posee una mayor afinidad por el receptor, unas seis a diez veces más,

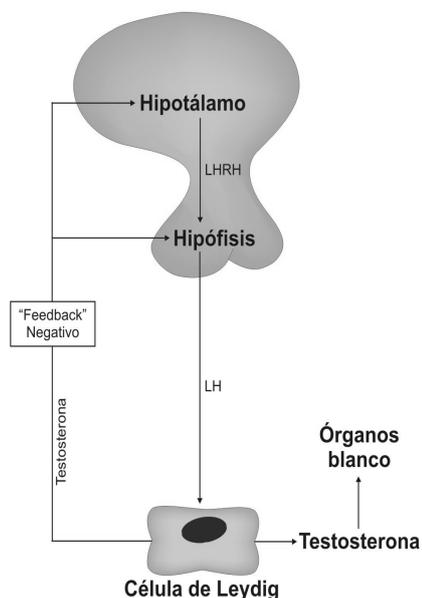
siendo así un andrógeno más potente que la testosterona. También, por la ruta de la aromatasa, la testosterona puede metabolizarse en varios tejidos a estradiol, y la androstenediona a estrona [Bellido 1999; Cingolani y Houssay 2010].



Biosíntesis de testosterona en las células de Leydig. La síntesis de testosterona comienza en la mitocondria a partir del colesterol, y luego puede llevarse a cabo a partir de la 17-hidroxipregnenolona (ruta Δ5) o a partir de la 17-hidroxi-progesterona (ruta Δ4) en el retículo endoplasmático liso. Una vez sintetizada, la testosterona pasa a la circulación sanguínea donde es transportada unida a proteínas. Tomado y modificado de Bellido 1999.

3. Regulación de la síntesis de testosterona y transporte

La síntesis de los andrógenos es regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas. La hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) es liberada del hipotálamo, estimulando la secreción pulsátil de hormona luteinizante (LH) en la adenohipófisis, la cual posteriormente estimulará a las células de Leydig para inducir la síntesis de testosterona. La acción estimuladora de la LH sobre la producción de andrógenos se ejerce a través de su unión a receptores específicos ubicados en la membrana de las células de Leydig, que responden a su estímulo induciendo el transporte de colesterol a la mitocondria y regulando las enzimas que involucradas en la biosíntesis de testosterona. La testosterona a través de un mecanismo de retroalimentación negativa inhibe la secreción de gonadotrofinas, previniendo la liberación de la LHRH y, en consecuencia, la disminución de la sensibilidad de la adenohipófisis a la LHRH. Una vez sintetizada, la testosterona pasa a la circulación sanguínea. Debido a su hidrofobicidad, la testosterona es transportada en sangre, en su mayor parte, unida a proteínas. El principal transportador, es una β -globulina denominada β -globulina fijadora de hormona sexuales (SHBG), producida mayoritariamente por el hígado. La albúmina sérica actúa también como un transportador inespecífico de testosterona, manteniendo una unión laxa con la hormona. Esta baja afinidad permite que la testosterona se libere fácilmente en los capilares para pasar al interior de las células de los órganos diana. Sólo un 2 % de la testosterona en sangre permanece libre. Esta porción puede atravesar rápidamente las membranas celulares y por ello es la forma activa desde el punto de vista biológico. Así surge el concepto de «*testosterona biodisponible*» la cual comprende la suma de la porción de la testosterona libre más la unida a la albúmina.



4. Funciones biológicas de la testosterona

La función clásica de la testosterona, comprende efectos androgénicos y anabólicos. A nivel sexual ejerce un papel fundamental sobre el desarrollo y el mantenimiento de los caracteres sexuales masculinos y sobre el desarrollo y funcionamiento del aparato genital (próstata, vesículas seminales, pene, escroto) [Mooradian et al. 1987]. Los andrógenos actúan sobre el sistema nervioso central (SNC), durante la gestación influyendo en la "masculinización del cerebro" mediante la regulación de la expresión del receptor de andrógenos [Dakin et al. 2008] y en la adultez estimulando y manteniendo la motivación sexual e influyendo en el comportamiento [Berenbaum y Beltz 2011; Jordan et. al 2011]. Pero la testosterona y sus metabolitos son bastante más que una hormona sexual, y desempeñan numerosas acciones fisiológicas importantes en el organismo, para la salud y el bienestar general [Bassil et al. 2009]. Los efectos anabólicos de la testosterona, involucran el mantenimiento de la masa ósea (el hipogonadismo es una de las principales causas de la osteoporosis en los hombres) [Rucker et al. 2004; Isidori et al. 2005; Tuck y Francis 2009] así como también el aumento de la masa y fuerza muscular y reducción de la grasa corporal [Bhasin et al. 1996, 2001a; Fernando et al. 2010]. También ha sido bien establecida la capacidad de la testosterona de estimular la eritropoyesis aumentando la producción de eritropoyetina y estimulando las células madre de la médula ósea, empleándose en el tratamiento ante diversas anemias [Krabbe et al. 1978; Shahani et al. 2009]. A nivel cardiovascular, se han demostrado efectos que favorecen la salud cardíaca, los cuales comprenden vasodilatación y reducción de la presión arterial, acción antitrombótica [Glueck et al. 1993; Webb et al. 1999; Fogari et al. 2005; Borst et al. 2010] y mejoramiento del perfil lipídico [Monroe y Dobs 2013]. Los andrógenos desempeñan también un importante papel en la protección de la función cognitiva y prevención de la enfermedad de Alzheimer [Yao et al. 2008; Pike et al. 2009; Barron y Pike 2012].

Andrógenos y músculo esquelético

La pérdida de masa y fuerza muscular asociada al envejecimiento, también conocida como sarcopenia, es una condición altamente prevalente en la adultez y en los años posteriores a la menopausia, representando un factor de riesgo para la osteoporosis, ya que está asociada a discapacidad física e inmovilidad produciendo pérdida de masa ósea. Esta pérdida de masa muscular es el resultado de la reducción tanto del tamaño como del número de las fibras musculares [Lexell 1993], posiblemente debido a un proceso multifactorial que involucra la falta de actividad física, una reducida ingesta nutricional, estrés oxidativo y cambios hormonales [Baumgartner et al. 1999; Roubenoff y Hughes 2000]. A pesar de que los mecanismos moleculares involucrados en esta patología no han sido completamente dilucidados, existen evidencias que sugieren que la apoptosis podría ser responsable de la pérdida de miocitos en la adultez, siendo clave en el deterioro del rendimiento muscular. La activación de la muerte celular programada, que culmina en la autodestrucción celular sin inflamación ni daño de tejidos circundantes, sería responsable de la pérdida de músculo esquelético, contribuyendo a la patogénesis de la sarcopenia [Dirks y Leeuwenburgh 2002; Dupont-Versteegden 2005].

La muerte programada por apoptosis de las células musculares, es considerada como un potencial mecanismo de atrofia y desgaste muscular asociado al envejecimiento, a lesiones y a la patogénesis de muchas enfermedades como cardiomiopatías, enfermedades pulmonares obstructivas crónicas (EPOC), distrofias musculares u otros desórdenes neuromusculares [Primeau et al. 2002; Dupont-Versteegden 2005; Kujoth et al. 2005; Tews 2005]. La apoptosis es desencadenada por diversos estímulos que activan una o más vías de señalización que convergen en la activación de una familia conservada de cisteín-proteasas conocidas como caspasas [Steller 1995]. La activación de las caspasas puede llevarse a cabo tanto por la vía intrínseca como por la vía extrínseca de la apoptosis. La vía intrínseca involucra la participación de proteínas mitocondriales y la formación del apoptosoma tras la activación de las caspasas. Mientras que la vía extrínseca se inicia a través de la activación de los receptores de la muerte localizados en la membrana plasmática que transmiten la señal de

muerte hacia el interior celular, llevando a la activación de las caspasas [Kischkel et al. 1995; Ashkenazi y Dixit 1998]. Estudios en mioblastos han demostrado que la apoptosis juega un rol importante en el desarrollo muscular, controlando la población de mioblastos proliferantes que van a diferenciarse y generar miotubos maduros [Walsh 1997; Sandri y Carraro 1999; Huppertz et al. 2001]. Por lo tanto, los efectos de las hormonas esteroides en el desarrollo del músculo esquelético, podrían también ser regulados, en parte, a través de sus efectos sobre la apoptosis.

Puesto que los niveles de hormonas sexuales disminuyen con la edad, la sarcopenia ha sido asociada al déficit de estas hormonas. Como se mencionó anteriormente, los andrógenos son importantes reguladores de la fisiología reproductiva y de las actividades biológicas anabólicas en múltiples tejidos [Omwancha y Brown 2006]. Su rol protector sobre los mismos, está recibiendo en la actualidad creciente atención. Los efectos beneficiosos de los andrógenos frente a la apoptosis, se han observado en el sistema cardiovascular, el páncreas, neuronas, testículos y hueso [Erkkila et al. 1997; Morimoto et al. 2005; Pike et al. 2008; Chen et al. 2010; Sánchez-Más et al. 2010]. Es bien conocido que el músculo esquelético es un tejido blanco para los andrógenos. La testosterona a través de sus efectos sobre la masa muscular y tejido adiposo, es un importante determinante en la composición del cuerpo en mamíferos machos, incluyendo los humanos. El suplemento con testosterona aumenta la masa muscular en hombres saludables jóvenes y ancianos, en hombres sanos hipogonadales y en otras condiciones patológicas o fisiológicas que transcurren con bajos niveles de esta hormona [Bhasin et al. 2006]. El aumento del tamaño del músculo inducido por la testosterona, está asociado a la hipertrofia de las fibras musculares y al aumento significativo en el número de miocitos y células satélites [Sinha-Hikim et al. 2002, 2003, 2006]. Estudios en ratas han mostrado también, que la administración exógena de testosterona resulta en una recuperación más rápida de la parálisis de los miembros posteriores inducida por la lesión del nervio ciático [Brown et al. 1999], así como también previene la apoptosis de las células musculares del músculo elevador del ano en ratas castradas [Boissonneault 2001].

Como se ha detallado, la testosterona cumple un rol importante en la fisiología del músculo esquelético. Sin embargo, no se conocen hasta el momento, los mecanismos moleculares por los cuales esta hormona revierte el deterioro de la fibra muscular, al mismo tiempo que favorece la proliferación y diferenciación de las células satélite.

La enzima 5α -reductasa ha sido encontrada en bajas concentraciones en el músculo [Bartsch et al. 1980; Normington y Russell 1992; Azzouni et al. 2012], aunque no está del todo claro si la conversión de la testosterona a DHT es necesaria o no para mediar los efectos androgénicos en el músculo [Bhasin et al. 2001b]. Sin embargo, estudios realizados en ratas empleando testosterona y un inhibidor de la 5α -reductasa, demostraron que inhibiendo la enzima era posible bloquear selectivamente los efectos adversos de la testosterona sobre el agrandamiento de la próstata, preservándose los efectos anabólicos de la hormona en hueso y músculo [Borst et al. 2007]. Por lo que los efectos en músculo, serían mediados por la testosterona y no por la DHT, a diferencia de lo observado en próstata, donde la DHT es el principal agonista. En base a estas observaciones, en el presente trabajo de investigación se empleó la testosterona para estudiar el mecanismo involucrado en los efectos protectivos del esteroide frente al deterioro de la fibra muscular ante el estrés oxidativo.

II. EL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

La acción de los andrógenos, se ejerce a través del receptor de andrógenos (AR) el cual se agrupa dentro de la familia de los receptores nucleares (NRs). Éstos comprenden una superfamilia de proteínas que funcionan como factores de transcripción activados por ligandos, que regulan la expresión de genes específicos [Evans 1988; Laudet 1997] y están implicados en funciones biológicas de desarrollo, diferenciación, reproducción y homeostasis metabólica de organismos eucariotas. Estos NRs se han conservado durante la evolución [Eick y Thornton 2011] y son clasificados en subfamilias: los clase I, son receptores de esteroides que incluyen al receptor de andrógenos, estrógenos, progesterona, mineralocorticoides y glucocorticoides, clásicamente definidos como ligando-

dependientes que se homodimerizan para ejercer su función. Los clase II, son conocidos como familia retinoidea – tiroidea, conformada por los receptores de la vitamina D, los tiroideos, del ácido retinoico, y el receptor activado proliferador de peroxisoma; son ligando independientes con potencial tanto para homodimerizarse como para heterodimerizarse [Bain et al. 2007]. Finalmente, los receptores de la tercera clase, llamados *Orfan*, comprenden un grupo de proteínas que comparten secuencias con homologías significativas, para las cuales los ligandos no han sido caracterizados [Enmark y Gustafsson 1996; Benoit et al. 2006]. Los análisis comparativos tanto funcionales como estructurales de los receptores nucleares hormonales, revelaron que comparten una misma organización estructural y pueden ser divididos en cuatro dominios funcionales: un dominio N-terminal, un dominio de unión al ADN, una región bisagra y un dominio de unión al ligando.

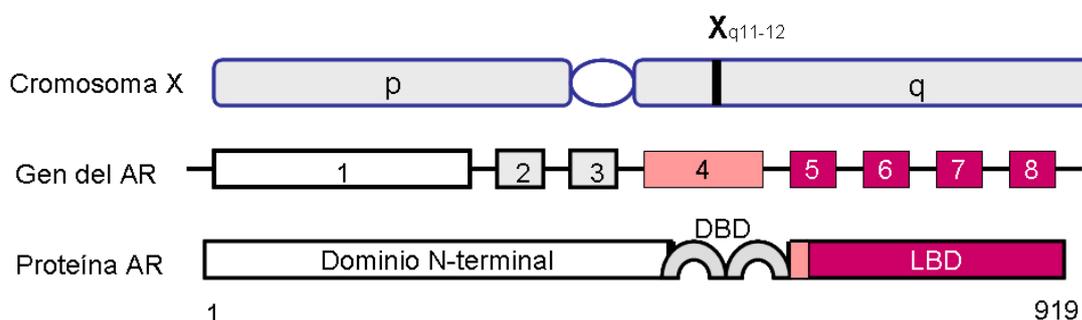
1. Organización estructural del gen del AR

El gen que codifica para el AR se encuentra en el brazo largo del cromosoma X (Xq11.2-12), y fue descubierto en 1981, cuando se estudiaba genéticamente a humanos y ratones que mostraban insensibilidad a los andrógenos [Migeon et al. 1981; Brown et al. 1989; Gao et al. 2005]. El ADNc del AR fue clonado por primera vez en 1988, a pesar de las dificultades para la obtención de cantidades suficientes de la proteína purificada, como para generar anticuerpos o secuencias aminoacídicas parciales para diseñar sondas de oligonucleótidos sintéticos [Evans 1988; Beato 1989]. El gen del AR posee un tamaño de aproximadamente 90 kilobases y contiene 8 exones, y su organización estructural es casi idéntica a la de los genes que codifican para los otros miembros de los receptores hormonales esteroideos, lo que sugiere un pasado ancestral común [Kuiper et al. 1989; Lubahn et al. 1989]. La posibilidad de la existencia de genes del AR adicionales, que codifiquen para un AR de localización en membrana plasmática, ha sido sugerida. Esto surgió de la observación de efectos desencadenados por la testosterona, a tiempos cortos de tratamiento hormonal (respuestas de unos pocos minutos o segundos) como para ser

consecuencia de la actividad transcripcional del AR clásico, en cerebro y osteoblastos [Bran et al. 1995; Lieberherr y Grosse 1994]. Si bien en humanos solo ha sido detectado un gen para el AR, dos isoformas de ARNm para el AR se encontraron en laringe masculina de *Xenopus laevis* [Fischer et al. 1993]. Dado que para el receptor de estrógenos se ha encontrado un segundo gen que lo codifica, es posible que otros miembros de la familia de receptores esteroideos también presenten múltiples isoformas del gen codificante.

2. Estructura proteica del AR

La proteína AR consta de aproximadamente 919 aminoácidos y una masa molecular de 98 kDa, que se estructuran en 4 dominios funcionales [Dehm y Tindall 2007]. El dominio regulador N-terminal, codificado principalmente por el exón 1 (1-555 bp), media la actividad transcripcional. Este dominio contiene la región de activación de la transcripción independiente de ligando (TAF-1), siendo el lugar de interacción con ciertos correguladores. El dominio de unión al ADN (DBD), codificado por los exones 2 y 3 (556-623 bp), contiene dos dedos de zinc capaces de interactuar específicamente con pequeñas secuencias denominadas elementos de respuesta a andrógenos (AREs). La región bisagra, codificada por el exón 4 entre 624-665 bp, es importante para el movimiento del receptor. Finalmente el dominio de unión al ligando (LBD) C-terminal, codificado por los últimos exones 5, 6, 7 y 8 entre 666-918 bp, es el lugar de unión de los andrógenos al receptor y contiene la región de activación de la transcripción dependiente de ligando (TAF-2) [Hiipakka y Liao 1998; Fragkaki et al. 2009]. El DBD y el LBD comparten un alto grado de homología con los otros receptores esteroideos.



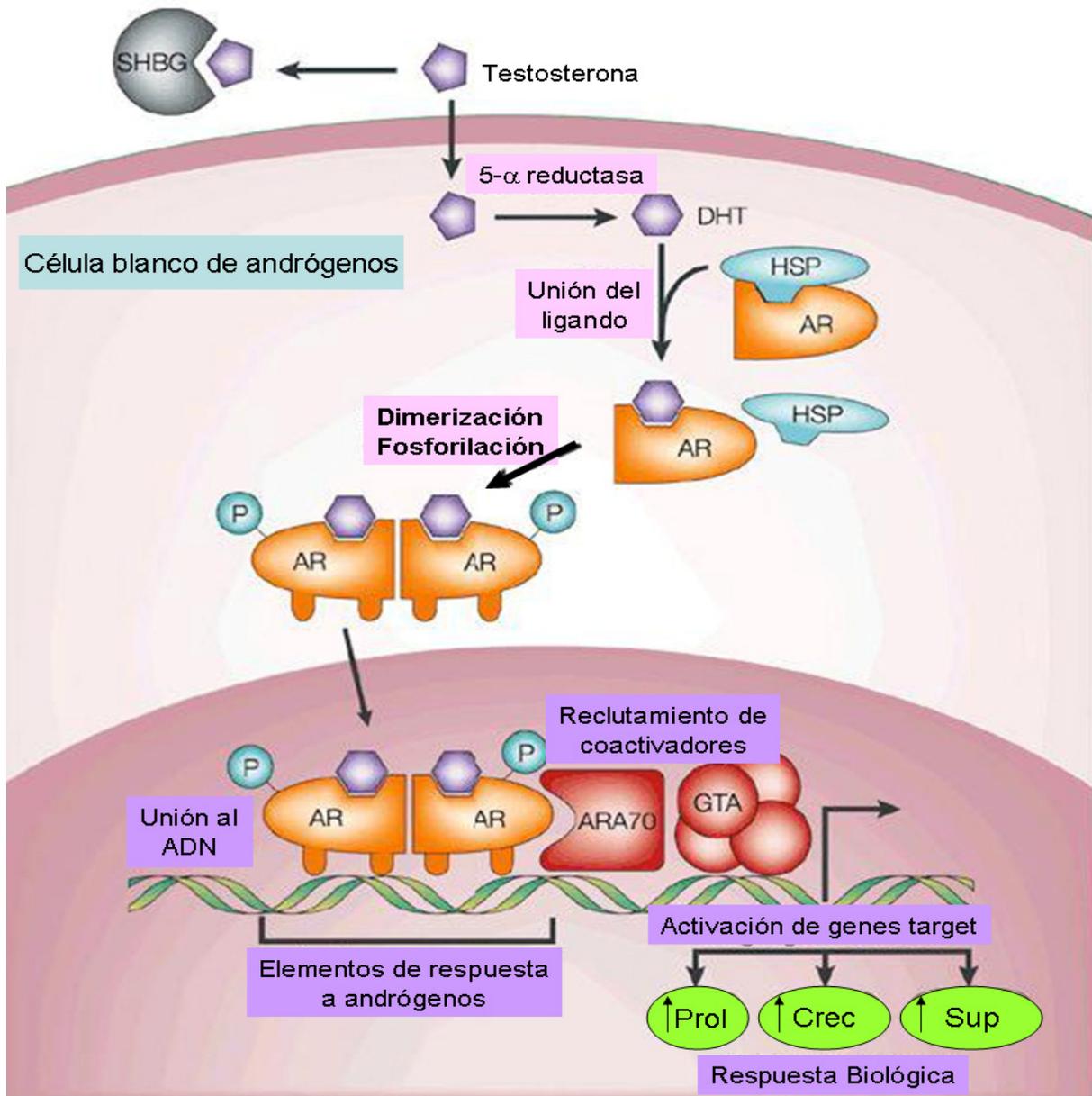
Representación esquemática del gen de AR humano. El gen del AR se localiza en el brazo largo del cromosoma X. Está codificado por 8 exones (919 aminoácidos) y la proteína consta de diferentes dominios estructurales.

3. Mecanismo de acción clásico del AR

En ausencia de hormona, el AR se encuentra de forma monomérica formando un complejo con proteínas de choque térmico (Hsp), entre las que se encuentran Hsp90, Hsp70 y Hsp56 [Heinlein y Chang 2001]. Dicho complejo es dinámico y puede translocar entre el citoplasma y el núcleo celular, aunque la distribución subcelular relativa en ausencia de ligando es principalmente citoplasmática. Los andrógenos, como son hormonas lipídicas derivadas del colesterol, son capaces de difundir libremente a través de la membrana plasmática. La unión de la hormona (testosterona o dihidrotestosterona) al dominio de unión al ligando, produce una serie de cambios conformacionales en el receptor (estado activado) que provocan la liberación de las proteínas de choque térmico, la translocación al núcleo, (en el caso de los receptores con localización citoplasmática al momento de unión de la hormona), fosforilación y dimerización.

El receptor no unido al ligando se asocia débilmente al ADN. Una vez unido a éste el AR interacciona de manera estable con las secuencias de ADN conocidas como elementos de respuesta a andrógenos (AREs), las cuales se caracterizan por una secuencia consenso repetida 5´-TGTTCT-´3 que se encuentra localizada en la región promotora y potenciadora de los genes que responden a andrógenos [Gao et al. 2005]. Esta unión desencadena el reclutamiento de otras proteínas denominadas correguladores

(coactivadores o correpresores), necesarias para activar o reprimir la transcripción de genes específicos [McKenna y O' Malley 2002].



Acción de los andrógenos. La testosterona circula por la sangre unida a proteínas (albúmina o SHBG). La testosterona libre ingresa a la célula blanco donde puede ser convertida a DHT por la 5α-reductasa. La unión de la hormona al AR induce la disociación del receptor de las proteínas de choque térmico (Hsp) y su fosforilación. El AR se dimeriza y transloca al núcleo donde se une a elementos de respuesta a andrógenos (AREs) en la región promotora del gen blanco. Los corre reguladores también se unen al complejo de transcripción promoviendo o previniendo la interacción de la maquinaria general de la transcripción (GTA). La activación o represión de los genes blanco conduce a las distintas respuestas biológicas que incluyen crecimiento, proliferación, supervivencia entre otros. Tomado y modificado de Feldman y Feldman 2001.

4. Mecanismos de acción no-clásicos del AR

El mecanismo de acción hormonal clásico de los receptores nucleares es de tipo genómico. Como se describió antes, las hormonas esteroideas se unen a receptores presentes en el núcleo o en el citoplasma, y a continuación transloca el complejo receptor-ligando al núcleo donde modula la transcripción y síntesis de proteínas. Este es un proceso lento que requiere de por lo menos 30 ó 40 minutos para modificar la expresión de genes a nivel transcripcional y de varias horas para producir cambios significativos en los niveles de las proteínas recientemente sintetizadas [Foradori et al. 2008]. Sin embargo, en los últimos años se han descrito acciones no genómicas mediadas por hormonas a través de sus receptores [Losel y Wehling 2003; Simoncini y Genazzani 2003; Levin 2005]. Estas acciones ocurren en pocos segundos o minutos después de la adición del agonista.

Numerosos estudios sugieren que los andrógenos modulan procesos celulares a través de un mecanismo no clásico [Migliaccio et al. 2000; Silva et al. 2002; Cato et al. 2002; Fix et al. 2004; Kang et al. 2004, Cheng et al., 2007; Cinar et al. 2007; Agoulnik et al. 2008; Yu et al. 2012]. Estas acciones no clásicas implican la estimulación rápida de cascadas de señalización induciendo el aumento en los niveles intracelulares de Ca^{2+} , AMPc, la activación de MAPK, PKA, PKC y la vía 3-fosfoinositol proteína quinasa (PI3K/Akt) [Rahman y Christian, 2007]. También se ha sugerido que el AR citoplasmático puede interactuar con la proteína tirosina quinasa c-Src y causar la activación rápida de las MAPKs y la vía PI3K/Akt, regulando así las cascadas de señalización intracelulares de éstas quinasas [Migliaccio et al. 2000; Sun et al. 2003]. Los mecanismos moleculares que median estas acciones no genómicas aún son poco comprendidos.

Se ha postulado también, que las acciones no clásicas de los andrógenos podrían ser inducidas a través de un efecto no-transcripcional del AR clásico, o bien podría participar un receptor de localización no clásica en membrana plasmática [Heinlein y Chang 2002; Rahman y Christian 2007].

La evidencia científica acumulada en los últimos años, apunta a la existencia de receptores androgénicos en membrana (mAR), disparando las

señales rápidas no transcripcionales. A pesar que la identidad molecular exacta de los mAR es aún desconocida, se han presentado evidencias que sugieren la existencia de sitios de ligado a los andrógenos en la membrana plasmática de diversos tipos celulares y tejidos, como linfocitos T, células de próstata, músculo esquelético, células de Sertoli y ovocitos [Benten et al. 1999; Kampa et al. 2002; Estrada et al. 2003; Fix et al. 2004; Gill et al. 2004]. El mecanismo de señalización dependiente de mAR se caracterizó recientemente en detalle en líneas celulares de cáncer de próstata y mama [Foradori et al. 2008; Kampa et al. 2008; Michels y Hoppe 2008; Papadopoulou et al. 2009]. En células de cáncer de próstata han sido involucradas las proteínas Akt, NF- κ B, Bad, Fas y caspasa-3 en la regulación de la respuesta apoptótica inducida por la activación del mAR [Papadopoulou et al. 2008].

OBJETIVOS

I. OBJETIVOS GENERALES de la tesis

Establecer en la línea muscular esquelética murina C2C12:

- ❖ El mecanismo mediante el cual la testosterona ejerce su acción antiapoptótica.

- ❖ El rol del receptor de andrógenos (AR) durante la acción hormonal.

II. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Identificar las cascadas apoptóticas activadas por el agente inductor de apoptosis, peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y evaluar sobre qué componente/s de dichas vías la testosterona ejerce su efecto protectorio.

- ✓ Estudiar los efectos de la testosterona sobre la fisiología mitocondrial y la regulación de la expresión génica en condiciones normales y de apoptosis.

- ✓ Investigar la presencia y localización subcelular (clásica y no clásica) del AR empleando enfoques bioquímicos, inmunoquímicos y farmacológicos.

- ✓ Evaluar la participación del AR en las vías de señalización reguladas por la hormona durante los eventos apoptóticos.

METODOLOGÍA

Modelo experimental

Para estudiar los efectos de la testosterona y su receptor sobre el músculo esquelético, se utilizó como modelo experimental la línea celular de músculo esquelético de ratón C2C12 en estadio proliferativo.

La miogénesis, el proceso de determinación y formación de las células del tejido muscular, tiene lugar desde las primeras semanas del desarrollo embrionario y es rememorado en el músculo esquelético maduro para su mantenimiento y reparación. Durante la embriogénesis las células mesenquimales totipotenciales originan una población de células fusiformes mononucleadas llamadas mioblastos, precursoras de las células musculares contráctiles. Estos mioblastos, se fusionan progresivamente para formar un sincitio plurinuclear, dando origen a miotubos que finalmente se diferenciarán a células musculares esqueléticas maduras [Lawson y Purslow 2000]. Bajo el control de proteínas reguladoras, y como consecuencia de acciones hormonales y/o neuronales, la fibra del músculo esquelético aumenta de tamaño, y adquiere funciones y estructuras contráctiles [Ogilvie et al. 2000]. Un número residual de mioblastos, escapan al desarrollo y persisten en el músculo adulto como "células satélites" localizadas entre el sarcolema y la membrana basal de las fibras musculares [Cooper et al. 1999]. El crecimiento y la reparación de los músculos degenerados dependen de este pequeño grupo de células madre del músculo esquelético [Mauro 1961]. Las células satélites conforman un grupo de células precursoras del músculo quiescentes y proporcionan la principal fuente de mionúcleos adicionales para el crecimiento muscular [Rosenblatt et al. 1994; Friday y Pavlath 2001]. Una vez activadas, bajo condiciones particulares tales como denervación, estrés por ejercicio físico o daño muscular, las células satélites dan origen a mioblastos que proliferan, se diferencian y se fusionan para formar nuevas fibras musculares o para reparar las fibras musculares dañadas [Hawke y Garry 2001; Charge y Rudnicki 2004].

Las células C2C12 son mioblastos murinos derivadas de células satélites, que se comportan como el linaje progenitor, y son un subclon de los mioblastos C2 [Yaffe y Saxel 1977]. Estas células se diferencian espontáneamente al suplementar el medio de cultivo con 2 % de suero de

caballo [Blau et al. 1983]. Las células C2C12 en estado proliferativo son equivalentes a las células satélites activadas que rodean a las fibras musculares, mientras que las referidas como "arrestadas" corresponden a células satélites quiescentes [Yoshida et al. 1998].

Cultivos de células C2C12

Las células de músculo esquelético murino C2C12, obtenidas de *American Type Culture Collection* (ATCC número: CRL-1772™), fueron cultivadas en el medio de cultivo DMEM (medio *Eagle* modificado por Dulbecco) sin rojo fenol, suplementado con 10 % de suero fetal bovino inactivado por calor (30 min, 56 °C), 1 % de nistatina y 2 % de estreptomina. Las células C2C12 fueron cultivadas en monocapa, a 37 °C bajo atmósfera húmeda de 94,5 % aire / 5,5 % CO₂. Los cultivos se mantienen en medio fresco repicándolos cada 48 hs. Una vez alcanzado el 70-80 % de confluencia (120.000 células/cm²), las células fueron sometidas a los distintos tratamientos.

Tratamientos celulares

Para estudiar los efectos protectivos de la testosterona frente a la apoptosis inducida por H₂O₂, las células fueron incubadas en medio DMEM sin suero fetal bovino durante 20 minutos. La ausencia de suero permite sincronizar las células en un estado basal, evitando que la presencia de suero active vías proliferativas que puedan enmascarar o eviten la visualización de los efectos específicos de la hormona. Luego de esta preincubación de 20 minutos, se procedió al agregado de inhibidores o activadores específicos en los casos que correspondiera. A continuación, las células fueron estimuladas con testosterona 10⁻⁹ M o con el vehículo de la hormona (isopropanol 0,001 %) durante 60 minutos. Luego, fueron expuestas a 1 mM de H₂O₂ disuelta en DMEM sin suero durante 3-4 horas, para la inducción de la apoptosis (datos previos de nuestro grupo y otros demostraron que el H₂O₂ induce apoptosis en C2C12: Jiang et al. 2005;

Vasconsuelo et al. 2008), recambiándoles el medio con el tratamiento correspondiente, a las 2 horas. De esta manera se mantuvo el estímulo durante todo el tiempo de tratamiento, evitándose la posible degradación de sus componentes (H_2O_2 u hormona). Para evaluar la participación del receptor de andrógenos en los efectos del esteroide, las células fueron preincubadas con testosterona 10^{-9} M y con el antagonista de receptor de andrógenos, Flutamida, en una concentración de 10^{-8} M durante 60 minutos, previo a la inducción de apoptosis. Todos los tratamientos se realizaron a 37 °C bajo atmósfera húmeda de 94,5 % aire / 5,5 % CO_2 .

Materiales

Marca	Producto
Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA)	Anti-fosfo-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), Anti-fosfo-Akt (Ser473), Anti-fosfo-Bad (Ser136), Anti-fosfo-Bad (Ser112) Anti-ERK1/2, Anti-Smac/DIABLO , Anti-p53 (Ser15), SP600125
Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, USA)	Anti- β -tubulina, Anti-Bax, Anti-HSP70, Anti-PARP.
Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA)	Anti-Akt, Anti-Bad, Anti-AR (C-19), Anti-Lamina B (C-20), Anti-Caveolina-1 (4H312 y N-20), Anti-fosfo-JNK1/2 (Tyr185 y Thr183).
Molecular Probes (Eugene, OR, USA)	4',6-Diamidino-2-fenil indol diclorhidrato (DAPI), MitoTracker (MitoTracker [®] Red CMXRos), Anti-Rabbit Alexa Fluor 488, Anti-Mouse Alexa Fluor 568.
Perkin Elmer (Boston, MA, USA)	Testosterona [$1,2,6,7$ - $^3H(N)$]

Sigma–Aldrich (St Louis, MO, USA)	Testosterona, Dihidrotestosterona, Progesterona, 17β–estradiol, Proteína A Sefarosa, Anti-Actina, Cytochrome c Oxidase Assay Kit.
Abcam (Cambridge, MA, USA)	Anti-SHC (fosfo Ser36)
Promega (Madison, WI, USA)	4α-Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)

Western Blot

Luego de los distintos tratamientos, el medio fue removido por aspiración y las células fueron lisadas con buffer lisis: Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, Tritón X-100 1 %, DTT 2 mM, aprotinina 20 µg/ml, leupeptina 20 µg/ml, PMSF 1 mM, NaF 25 mM y Na₃VO₄ 1 mM, a 4 °C. Los lisados se colectaron en tubos *ependorf* y se agitaron con *vórtex* durante 30 segundos para favorecer el lisado celular. Para descartar restos celulares, los lisados fueron brevemente centrifugados a 10.000 x *g*. Del sobrenadante obtenido se tomaron alícuotas de 5 µl en donde se cuantificó el contenido proteico por el método de Bradford [Bradford 1976]. A continuación se tomaron alícuotas de los lisados celulares, las cuales fueron desnaturalizadas en buffer muestra 6X (0,25 M Tris-HCl pH 6,8, 8 % SDS, 40 % glicerol, 500 mM DTT, 2 µg/ml azul de bromofenol) a 100 °C durante 5 minutos.

Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

Las muestras proteicas obtenidas anteriormente, se separaron por electroforesis sembrando 20-30 µg proteína/calle en geles de 1,5 mm de espesor, al 10 % de poliacrilamida / bisacrilamida, de acuerdo al protocolo en placa descrito por Laemmli [Laemmli 1970]. En paralelo, se sembraron marcadores proteicos coloreados de peso molecular conocido de amplio rango (220-10 kDa), para poder determinar la migración relativa de las bandas proteicas de interés. Los geles se corrieron a voltaje constante de

100 V en buffer de corrida (Tris-Base 25 mM pH 8,8, glicina 192 mM, 0,1 % SDS).

Transferencia

Las proteínas se electrotransfirieron desde los geles a membranas sintéticas de polifluoruro de vinilideno o PVDF ("Inmobilon-P", Millipore Corporation, MA, USA), previamente activadas en metanol puro durante 30 segundos. La transferencia se realizó durante 2 horas a amperaje constante de 100 mA por gel, de acuerdo al método de Towbin et al. (1979), empleando un sistema semi-seco (*Hoefer MiniVE Blotter*, Amersham Pharmacia Biotech, CA, USA) y manteniendo los geles y las membranas embebidas en buffer de transferencia (25 mM Tris-Base pH 8,3, 192 mM Glicina, 20 % metanol) [Towbin et al. 1979].

Bloqueo

A continuación, las membranas fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente en buffer PBS-T (200 mM NaCl, 20 mM NaH₂PO₄, 80 mM Na₂HPO₄, 0,1 % Tween 20) conteniendo 5 % de leche descremada en polvo para bloquear sitios de ligado inespecíficos.

Revelado con anticuerpos

Las membranas con las proteínas transferidas fueron incubadas durante toda la noche a 4 °C con las diluciones apropiadas de cada anticuerpo primario (en PBS-T con albúmina bovina sérica (BSA) al 1 %). Al día siguiente, las membranas fueron lavadas 3 veces durante 20 minutos cada vez, con PBS-T. Luego, fueron incubadas con la dilución apropiada del anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa (anti globulina de la especie animal correspondiente al anticuerpo primario usado) en PBS-T 0,1 % BSA, durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación suave. Finalmente, las membranas se lavaron nuevamente en PBS-T, como se mencionó anteriormente, procediéndose luego al revelado de las bandas inmunorreactivas por el método de quimioluminiscencia, siguiendo las instrucciones del *kit* comercial ECL (NENTM Life Science Products, Inc. Boston, MA, USA). La detección de los inmunocomplejos se llevó a cabo exponiendo las membranas a placas radiográficas *Kodak BioMax Light film*

durante intervalos de tiempo variables. Las imágenes de quimioluminiscencia fueron digitalizadas usando el scanner *Genius ColorPage-Vivid+* a una resolución de 300 dpi. La cuantificación de las bandas se realizó con el *software* ImageJ [NIH, USA; Abramoff et al. 2004] y los valores numéricos fueron procesados en planillas Excel para la realización de los gráficos correspondientes.

Rehibridación de las membranas de Western Blot

Las membranas de PVDF fueron rehibridadas 1-2 veces sucesivas con diferentes anticuerpos, someténdolas previamente a un tratamiento desnaturalizante con buffer *stripping* (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8; 2 % SDS y β -mercaptoetanol 50 mM) a 55 °C durante 30 minutos en agitación constante, lo cual permitió la remoción completa de anticuerpos primarios y secundarios de las membranas. A continuación, las membranas se lavaron con PBS-T (1 % Tween-20) por 30 minutos y se bloquearon como se indicó anteriormente. Luego se procedió a la incubación con otros anticuerpos de interés, de la manera usual.

Fraccionamiento subcelular

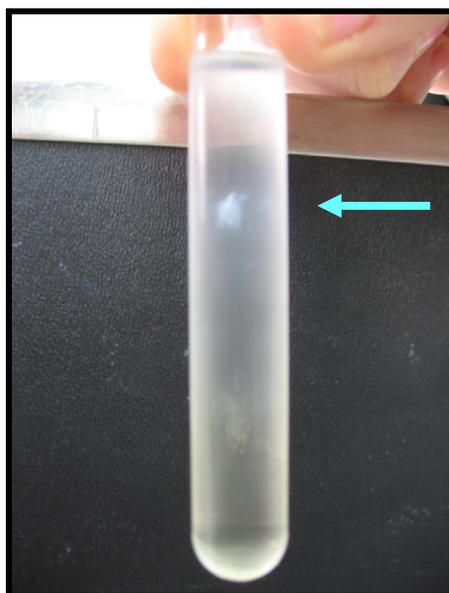
Luego de realizar los tratamientos correspondientes, se descartó el medio de cultivo y las células fueron recolectadas y homogeneizadas a 4 °C en buffer TES (50 mM Tris/HCl pH=7,4, 1 mM EDTA, 250 mM sacarosa, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 20 μ g/ml leupeptina, 20 μ g/ml aprotinina, y 20 μ g/ml de inhibidor de tripsina). El aislamiento de las fracciones subcelulares por centrifugación diferencial se realizó en una centrífuga refrigerada Sorvall (rotor SM-24) para la obtención de las fracciones nuclear y mitocondrial, empleándose luego, en la etapa final del fraccionamiento, una ultracentrífuga refrigerada Beckman (rotor Ti-50) para la obtención de las fracciones microsomal y citosólica. Inicialmente, el homogenado total fue centrifugado a 500 rpm (100 x *g*) durante 5 minutos para sedimentar y eliminar los restos celulares. El sobrenadante obtenido, se centrifugó a 1.800 rpm (300 x *g*) durante 20 minutos para obtener el sedimento correspondiente a la fracción enriquecida en núcleos. El sobrenadante

postnuclear fue centrifugado 30 minutos a 10.000 rpm (8.000 x *g*) para la obtención del sedimento enriquecido en mitocondrias. El sobrenadante resultante se centrifugó nuevamente durante 60 minutos, a 40.000 rpm (120.000 x *g*), colectándose la fracción citosólica soluble y el sedimento microsomal. Cada fracción subcelular fue lavada, resuspendiendo los sedimentos en buffer TES y volviéndose a centrifugar a las velocidades especificadas anteriormente. Alícuotas de las distintas fracciones se resuspendieron en el buffer TES y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido, conservándose a -70 °C hasta el momento de su uso para ensayos de *binding* con testosterona tritiada. Para el análisis por *Western blot* de las distintas fracciones subcelulares, los precipitados fueron resuspendidos en buffer lisis y conservados a -20 °C hasta su utilización. Paralelamente, se tomaron alícuotas de cada una de las fracciones subcelulares recuperadas para la cuantificación de proteínas por el método colorimétrico de Bradford (1976). La contaminación de las fracciones nucleares, microsomales y citosólicas con componentes mitocondriales se evaluó mediante la inmunodetección del marcador mitocondrial Smac/DIABLO. El anticuerpo anti-Lamina B se utilizó para la inmunodetección del marcador nuclear Lamina B en las diferentes fracciones.

Aislamiento de caveolas y rafts

La purificación de *rafts* y caveolas fue llevada a cabo mediante el empleo de un gradiente de sacarosa, de acuerdo a la modificación del protocolo de Brown y Rose (1992). Las células fueron cultivadas en monocapa en placas de 10 cm hasta una confluencia del 80 %, utilizándose 8 placas por cada gradiente. Las células fueron lavadas con PBS, y luego lisadas con buffer HEPES sin glicerol (50 mM Hepes, 300 mM KCl-Tris, 0,1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0,1 % NP-40, 1 mM leupeptina, 0,5 µg/ml aprotinina). El lisado celular (2 ml) fue colectado en un tubo de policarbonato de pared delgada para centrífuga, y se le agregó 2 ml de sacarosa al 80 % preparada en buffer Hepes. Luego se agregaron lentamente, 4 ml de sacarosa al 30 % y finalmente 4 ml más de sacarosa al

5 % sobre la porción superior del tubo. Las muestras contenidas en el gradiente fueron centrifugadas a 120.000 x *g* durante 18-20 horas, en una ultracentrífuga refrigerada *Beckman* (rotor SW41). La fracción correspondiente a las membranas ligeras (*rafts* y caveolas) puede apreciarse en suspensión, luego de la centrifugación, en la interfase entre sacarosa 30 % y sacarosa 5 %.



Tubo de centrífuga Beckman conteniendo el gradiente de sacarosa, luego de 18-20 hs de centrifugación a 120.000 x *g*. La flecha indica las membranas ligeras en suspensión en la interfase sacarosa 30 % - sacarosa 5 %.

A continuación, se colectaron alícuotas de 1 ml desde la porción superior hasta la porción inferior del tubo, en 12 tubos de centrífuga, los cuales fueron nuevamente centrifugados a 120.000 x *g* durante 1 hora, para remover la sacarosa y concentrar la muestra. Finalmente, el precipitado de cada tubo fue resuspendido en 30 μ l de bufer Lisis (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 1% Triton X-100, 0,2 mM Na_2VO_4 , 2 mM EDTA, 25 mM NaF, 1 mM PMSF, 20 μ g/ml leupeptina y 20 μ g/ml aprotinina) y sometido al análisis por *Western blot* empleando los anticuerpos específicos contra el AR o Caveolina-1.

Inmunocitoquímica

Las células C2C12 se cultivaron en cajas de Petri de 3 cm con cubreobjetos en la base, hasta alcanzar un 60-70 % de confluencia. Las células fueron fijadas y permeabilizadas con metanol a -20 °C durante 20 minutos. Luego se realizaron 3 lavados con PBS durante 5 minutos para eliminar los restos de metanol. Los sitios de ligado no específicos se bloquearon con 5 % BSA en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Posteriormente, las muestras fueron incubadas durante toda la noche a 4 °C en PBS conteniendo 2 % de BSA, con una dilución 1:50 del anticuerpo primario empleado en cada experimento. Al día siguiente, luego de 3 lavados con PBS durante 15 minutos, las muestras se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos (1:200) por 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron 3 lavados más de 15 minutos con PBS para eliminar el exceso de anticuerpo secundario. Finalmente las muestras se montaron sobre portaobjetos con glicerol 95 % para ser examinadas por microscopía de fluorescencia convencional o confocal.

Microscopía

a. Microscopía de fluorescencia convencional

Las muestras fueron analizadas en un microscopio de fluorescencia (*NIKON Eclipse E 600*) equipado con filtros estándar adecuados para capturar las señales fluorescentes. Las imágenes fueron tomadas utilizando una cámara digital acoplada al microscopio.

b. Microscopía confocal

A diferencia de la microscopía convencional, en donde todas las partes del espécimen a lo largo de su ruta óptica son excitadas y su fluorescencia detectada, el microscopio confocal utiliza un sistema de iluminación puntual en el cual sólo la luz que está dentro del plano focal puede ser detectada, eliminándose toda información que se encuentre fuera

de foco. De este modo, la calidad de imagen es mucho mejor que las obtenidas por microscopía de fluorescencia convencional. Se utilizó un microscopio confocal *Leica TCS SP2 AOBS*. Para excitar las muestras se empleó un láser iónico de argón de 488 nm y un láser de helio-neón de 543 nm. Se utilizó el filtro DD 488/543 para separar las señales de fluorescencia rojo/verde y se usó el *Software Meridian* para la obtención de las imágenes que luego fueron exportadas al *Adobe PhotoShop* para su procesamiento digital.

Tinciones mitocondriales

a. Mitotracker

El *Mitotracker* es un colorante catiónico, lipofílico, fluorescente y específico de la mitocondria. Cuando la sonda ingresa a una célula (en su forma reducida no fluorescente) que respira activamente, es oxidada dentro de la mitocondria (forma fluorescente), reaccionando con los grupos tioles de las proteínas mitocondriales, de forma específica e irreversible. Las células cultivadas sobre cubreobjetos hasta un 60-70 % de confluencia, fueron incubadas en medio DMEM sin suero con *Mitotracker* (disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO)) en una concentración final de 1 $\mu\text{mol/L}$ durante 30 minutos a 37 °C. Luego las células fueron lavadas con PBS durante 15 minutos y fijadas con metanol a -20 °C durante 30 minutos, siempre resguardándolas de la luz. Las muestras fueron montadas en portaobjetos con glicerol 95 % y analizadas por microscopía de fluorescencia convencional o confocal como se describió anteriormente.

b. Verde Jano

Para estudiar los cambios funcionales de las mitocondrias se usó el colorante supravital Verde Jano. Este colorante es absorbido por toda la célula viva tiñéndola de un color azul-verdoso (estado oxidado). Sin embargo, esta tinción citoplasmática desaparece unos minutos después, debido a su reducción, excepto en la mitocondria donde la enzima citocromo c oxidasa, específica de esta organela, mantiene al colorante en su estado

oxidado [Lazarow y Cooperstein 1953; Ernster y Schatz 1981]. Luego de los tratamientos correspondientes, las células fueron incubadas a 37 °C con una dilución 1:2 de Verde Jano 0,1 % en DMEM sin suero durante 30 minutos. Luego se realizaron 3 lavados con PBS durante 5 minutos y finalmente, se analizaron las células por microscopía convencional con luz blanca, capturando las imágenes con una cámara digital acoplada al microscopio.

Tinciones nucleares

a. DAPI

Para estudiar la morfología nuclear y poder detectar los núcleos picnóticos típicos de la apoptosis, las células se tiñeron con 4',6-Diamidino-2-fenil indol diclorhidrato (DAPI), el cual se une específicamente a ADN doble hebra. Luego de la realización de los tratamientos correspondientes, las células cultivadas sobre cubreobjetos fueron fijadas con metanol a -20 °C durante 20 minutos y posteriormente lavadas con PBS. A continuación, las células fijadas se incubaron con una dilución 1:500 de una solución stock de DAPI 5 mg/ml durante 30 minutos a temperatura ambiente, en oscuridad y con agitación suave. Luego de 3 lavados con PBS durante 15 minutos, los cubreobjetos se montaron con glicerol 95 % y las muestras se analizaron por microscopía de fluorescencia convencional. Se contaron al menos 500 células por condición experimental y se identificaron las células apoptóticas por condensación y/o fragmentación del núcleo. Los resultados se expresaron como porcentaje de núcleos apoptóticos.

b. TUNEL

La técnica de TUNEL (*TdT-mediated dUTP nick end-labeling*) [Gavrieli et al. 1992; Gorczyca et al. 1992] ha sido la más ampliamente utilizada para detectar y cuantificar células apoptóticas. Durante las fases finales de la apoptosis, las endonucleasas nucleares digieren el ADN genómico en fragmentos de 180-200 pares de bases. En esta técnica, los fragmentos de ADN son teñidos mediante la incorporación catalítica de dUTP marcado con fluoróforos en los extremos 3'-OH libres, por medio de la enzima

transferasa desoxinucleotidil terminal (TdT). Los nucleótidos marcados se adicionan a los fragmentos de ADN de cadena doble o simple, y pueden ser visualizados por microscopía de fluorescencia o cuantificados por citometría de flujo.

Las células crecidas sobre cubreobjetos fueron sometidas a los distintos tratamientos y luego a la detección *in situ* de la fragmentación del ADN nuclear mediante la técnica de TUNEL, empleando el *kit* comercial *DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System* (Promega, Madison, USA) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego, las células se montaron con glicerol 95 % y se evaluaron por microscopía de fluorescencia convencional. Se contaron al menos 500 células por condición experimental y se identificaron las células apoptóticas por la tinción de sus núcleos (núcleos TUNEL positivos). Los resultados se expresaron como porcentaje de núcleos apoptóticos.

Evaluación de la integridad de la membrana mitocondrial

a. Medición de la integridad de la membrana mitocondrial externa

La integridad de la membrana mitocondrial externa se evaluó mediante el empleo de un *kit* comercial de Sigma (*CYTOC-OX1*) que mide la actividad de la enzima citocromo c oxidasa, siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego de los distintos tratamientos, las células C2C12 fueron homogenizadas en buffer TES a 4 °C. Los lisados celulares fueron centrifugados a 10.000 rpm (8.000 x *g*) durante 20 minutos y en frío para sedimentar los restos celulares, núcleos y mitocondrias, y así obtener la fracción citosólica. Del sobrenadante obtenido, se tomaron alícuotas para determinar proteínas y actividad enzimática. Para medir la actividad de citocromo c oxidasa se agregaron 50 µl de sustrato (citocromo c reducido 0,22 mM) a 30 µl de muestra (fracción citosólica) y se midieron los cambios en la absorbancia a 550 nm durante 1 minuto. El porcentaje de actividad citocromo c oxidasa se calculó como: Unidades/ml = $\Delta\text{Abs}/\text{min} \times \text{dil} \times 1,1/(\text{vol muestra}) \times 21,84$, en donde $\Delta\text{Abs}/\text{min} = \text{Abs}/\text{minuto}_{\text{muestra}} - \text{Abs}/\text{minuto}_{\text{blanco}}$; dil: factor de dilución de la muestra; 1,1: volumen de

reacción en ml; 21,84: coeficiente de extinción. La actividad citocromo c se normalizó respecto a los niveles proteicos de la muestra, determinados por el ensayo de Bradford. Los resultados fueron expresados como % de mitocondrias con membrana mitocondrial externa dañada.

b. Medición del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

Mediante la utilización del *kit* comercial *JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Detection Kit* (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA) se evaluó el daño mitocondrial, mediante la medición del potencial de membrana mitocondrial y los efectos de la testosterona y su receptor sobre el mismo, durante el estrés oxidativo. Para ello se utilizó el colorante fluorescente catiónico 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3-3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina iodado (JC-1). Este colorante 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, mientras que en el citosol permanece sin agregar, fluoresciendo color verde. Las 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. 1995]. Luego de los distintos tratamientos, las células fueron tripsinizadas, recolectadas e incubadas con el colorante JC-1 durante 15 minutos a 37 °C, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células fueron analizadas por citometría de flujo en un equipo *FACS Calibur* (longitud de onda de excitación de 488 nm).

c. Medición de la apertura del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (mPTP)

La tinción con el fluoróforo Calceína fue realizada como estudios adicionales para la evaluación de la permeabilidad transitoria mitocondrial (mPT), según el método de Petronilli et al. (1999). Este método permite visualizar los cambios de permeabilidad en las mitocondrias, *in situ*. Tras la adición del éster de calceína/acetoximetilo (calceína-AM), el colorante entra a las células y se vuelve fluorescente tras su desesterificación. La adición de

cloruro de cobalto a los cultivos celulares, extingue la fluorescencia en la célula, excepto en las mitocondrias, debido a la impermeabilidad de la membrana mitocondrial al cobalto. Sin embargo, durante la inducción de la permeabilidad mitocondrial y la apertura del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (mPTP), el cobalto ingresa en la mitocondria extinguiendo la fluorescencia también en esta organela. La extinción de la fluorescencia representa una medida de mPT.

Para evaluar la apertura del mPTP por el método calceína-AM/cobalto, las células se cultivaron al 70-80 % de confluencia en placas de 3 cm con vidrio para microscopía y en cajas de 10 cm para citometría de flujo. Previo a la realización de los tratamientos con testosterona y el inductor de apoptosis, las células se incubaron durante 30 minutos a 37 °C con DMEM sin suero, conteniendo 1 mM de calceína-AM y 2 mM de CoCl_2 para extinguir la fluorescencia citosólica y nuclear. Luego se lavaron dos veces con DMEM sin suero a 37 °C y posteriormente se realizaron los tratamientos correspondientes. Para confirmar la localización mitocondrial de la calceína, las células fueron también teñidas con *MitoTracker Red CMXRos* (MitoRed; 100 nM) durante 30 minutos y las imágenes tanto de la tinción con calceína como la de *MitoRed* fueron capturadas individualmente por microscopía de fluorescencia convencional, mediante el uso de una cámara digital. Las imágenes fueron superpuestas para evaluar el grado de colocación de fluorescencia.

Para el análisis por citometría de flujo, las células teñidas con calceína, fueron tripsinizadas y recolectadas, luego de los tratamientos, para su análisis en el citómetro de flujo *FACS Calibur* (longitud de onda de excitación de 488 nm).

Ensayos de ligado usando [^3H] testosterona

Para evaluar la existencia de sitios de ligado específicos para la testosterona en las distintas fracciones subcelulares, se utilizaron cultivos al 70-80 % de confluencia, a partir de los cuales se obtuvieron las distintas fracciones subcelulares como se especificó anteriormente. Se incubaron 0,2 mg de proteínas contenidas en 0,1 ml de buffer TES, con 10 nM [^3H]

testosterona sola (ligado total) o en combinación de un exceso 1000X de hormona fría no radioactiva (ligado no específico) durante 16 hs a 4 °C (tiempo necesario para alcanzar el equilibrio). La separación de la hormona ligada de la libre se realizó agregando una suspensión de carbón/dextrano preparada al 0,5 % en buffer TE (50 mM Tris/HCl pH 7,4; 1 mM EDTA; 2 mM DTT; 0,3 mM PMSF) en proporción 1:4 [Haddad y Chyu 1971]. La mezcla de reacción se incubó durante 10 min en baño de hielo (4 °C), con agitación suave. Luego, se centrifugó durante 3 minutos a 800 x *g* para sedimentar el carbón, y el sobrenadante se recolectó para agregarle nuevamente la suspensión de carbón/dextrano, repitiéndose el procedimiento 2 veces más. El último sobrenadante fue recolectado en tubos plásticos para el conteo de la radioactividad por centelleo líquido usando un cóctel de tolueno, omnifluor y Tritón-X 100. El "ligado específico" se determinó como la diferencia entre el "ligado total" en presencia de la hormona tritiada sola (ligado total) y el ligado "no específico" en presencia de un exceso de hormona fría (ligado no específico).

Los ensayos de saturación, se realizaron exponiendo 140 µg de proteínas de la fracción mitocondrial o microsomal, a distintas concentraciones de [³H] testosterona que variaban entre 2 nM y 80 nM, siendo el volumen final de reacción de 0,1 ml. Los valores de la constante de afinidad (K_d) y el número total de sitios de ligado en las preparaciones, fueron estimadas de acuerdo al método de Scatchard (1949) y mediante el empleo del programa de computación *LIGAND* [Munson y Rodbard 1980].

En los estudios de especificidad de ligado, se evaluó la capacidad de competición por distintos ligandos esteroideos. Para ello, se incubaron 120 µg de proteínas de homogenado total (volumen de reacción: 0,1 ml) con una concentración constante de [³H] testosterona (10 nM) en ausencia o en presencia de cada uno de los esteroides no marcados (testosterona, dihidrotestosterona, 17β-estradiol, progesterona), en concentraciones que variaban de 10⁻⁶ M a 10⁻¹² M. Luego de 16 horas de incubación a 4 °C, la [³H] testosterona ligada fue separada por la técnica de carbón/dextrano como se describió anteriormente, y el conteo de la radioactividad se midió por centelleo líquido.

Preparación de la suspensión de carbón / dextrano

La suspensión de carbón/dextrano se preparó diluyendo la droga sólida comercial "Charcoal-Dextran Coated" (Sigma-Aldrich Chemical Co.) al 0,5 % (P/V) en buffer TE (50 mM Tris/HCl pH 7,4; 1 mM EDTA; 2 mM DTT; 0,3 mM PMSF). Las preparaciones de carbón/dextrano se conservaron a 4 °C durante no más de 30 días, ya que la preparación, una vez hidratada, se mantiene estable por tiempo limitado.

Inmunoprecipitación

La fracción microsomal obtenida por centrifugación diferencial, conteniendo 60 µg de proteínas, fue incubada con los anticuerpos primarios especificados en cada experimento, a razón de 4 µg de anticuerpo/mg proteína. La incubación se llevó a cabo durante toda la noche a 4 °C, con agitación suave. Los complejos antígeno-anticuerpo fueron precipitados con 10 µl de una suspensión al 50% de Proteína A Sefarosa (Sigma-Aldrich Chemical Co., USA), la cual se incubó durante 4 hs a 4 °C con agitación suave. Luego de centrifugar 3 min a 10.000 rpm para sedimentar los complejos, se realizaron 3 lavados sucesivos con buffer Hepes (50 mM Hepes, 10 % glicerol, 300 mM KCl Tris, 0,1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0,1% NP-40, 1 mM leupeptina, 0,5 µg/ml aprotinina y 10 µg/ml de inhibidor de tripsina), centrifugando cada vez. El sobrenadante de la primera centrifugación fue colectado para su análisis posterior. Los *pellets* finales se resuspendieron en buffer Laemmli-SDS 2X deprivado o no del agente reductor (β -mercaptoetanol o DTT), dependiendo del peso molecular de la proteína de interés a detectar. Posteriormente las muestras fueron sembradas en geles de poliacrilamida al 10 %.

Como control negativo de la inmunoprecipitación, se emplearon muestras del homogenado total a las cuales solo se les agregó la proteína A sefarosa.

Preparación de las suspensiones de proteína A sefarosa

La suspensión se preparó resuspendiendo la droga sólida, al 10 % P/V, en buffer PBS 1X. La preparación se centrifugó 5 min a 10.000 rpm a 4 °C. El sobrenadante se descartó y el *pellet* se lavó 3 veces más con PBS 1X

centrifugando cada vez. La proteína se preparó al menos 24 hs antes de su empleo y se la guardó a 4 °C por no más de una semana.

Fragmentación del ADN

Luego de los distintos tratamientos, las células fueron lisadas con buffer Citrato de Na 0,01 M NaCl 0,14 M. Los lisados fueron centrifugados durante 15 min a 800 x *g*, descartándose el sobrenadante y solubilizando el pellet en 2 ml de NaCl 2,6 M. Luego se agregó igual volumen de isopropanol y se incubaron las muestras durante toda la noche a -20 °C, para precipitar el ADN. Al día siguiente, las muestras fueron centrifugadas a 8.000 x *g* durante 20 min, y el *pellet* obtenido se resuspendió en agua estéril. La integridad del ADN se evaluó por electroforesis en gel de agarosa 1 %. La detección de las bandas se realizó mediante la tinción de los geles con bromuro de etidio y posterior visualización en un transiluminador de luz UV.

Real Time PCR

Higuchi y colaboradores consiguieron en el año 1992 la primera demostración de la *Real Time* PCR, lo que representó un importante salto tecnológico, que ha abierto la posibilidad de nuevas y poderosas aplicaciones para la investigación a nivel mundial [Higuchi et al. 1992]. La PCR a tiempo real o PCR cuantitativa es una variación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) estándar, utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar ADN o ARN mensajero (ARNm) de una muestra, a medida que la reacción avanza, es decir, "en tiempo real". Utilizando *primers* específicos, es posible determinar el número de copias o la cantidad relativa de una determinada secuencia de ADN o ARN.

Cuando la PCR a tiempo real se combina con una reacción de retro-transcripción o RT (RT-PCR), puede determinarse la cantidad de ARNm de una muestra mediante una cuantificación relativa. Dicha cuantificación se denomina relativa ya que se compara entre diferentes muestras la cantidad relativa o relación del ARNm de un gen específico, respecto a la cantidad de ARNm de un gen constitutivo (control endógeno).

Para la cuantificación, se mide en cada ciclo de PCR la cantidad de *amplicón* producido. La cuantificación del producto se produce mediante la adición de fluoróforos que se unen al *amplicón* de forma cuantitativa, de modo que a mayor producto generado, mayor fluorescencia se emitirá. Los sistemas de PCR a tiempo real detectan la cantidad de fluorescencia producida en cada ciclo de PCR y los *softwares* de análisis representan gráficamente dicha fluorescencia respecto al número de ciclos. La cantidad de *amplicón* producido es proporcional al número de moléculas de ARN/ADN iniciales (en aquellas muestras con mayor expresión del gen, el *amplicón* fluorescente aparecerá en ciclos anteriores) [Kubista et al. 2006].

a. Extracción de ARN total

El ARN total fue aislado a partir de los cultivos sometidos a los distintos tratamientos ($\sim 10^6$ células/condición), empleando el *kit* comercial *High Pure RNA Isolation kit* (11828665001) de Roche, siguiendo las instrucciones del fabricante. La cantidad y calidad del ARN aislado se determinó espectrofotométricamente. Esta determinación se basa en la medida de la densidad óptica teniendo en cuenta que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 40 $\mu\text{g/mL}$ de ARN. Se chequeó la ausencia de contaminación proteica, considerando que la relación entre las absorbancias a 260 nm / 280 nm estaba comprendida entre 1,8 - 2,0. Las muestras de ARN fueron guardadas a $-70\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su utilización.

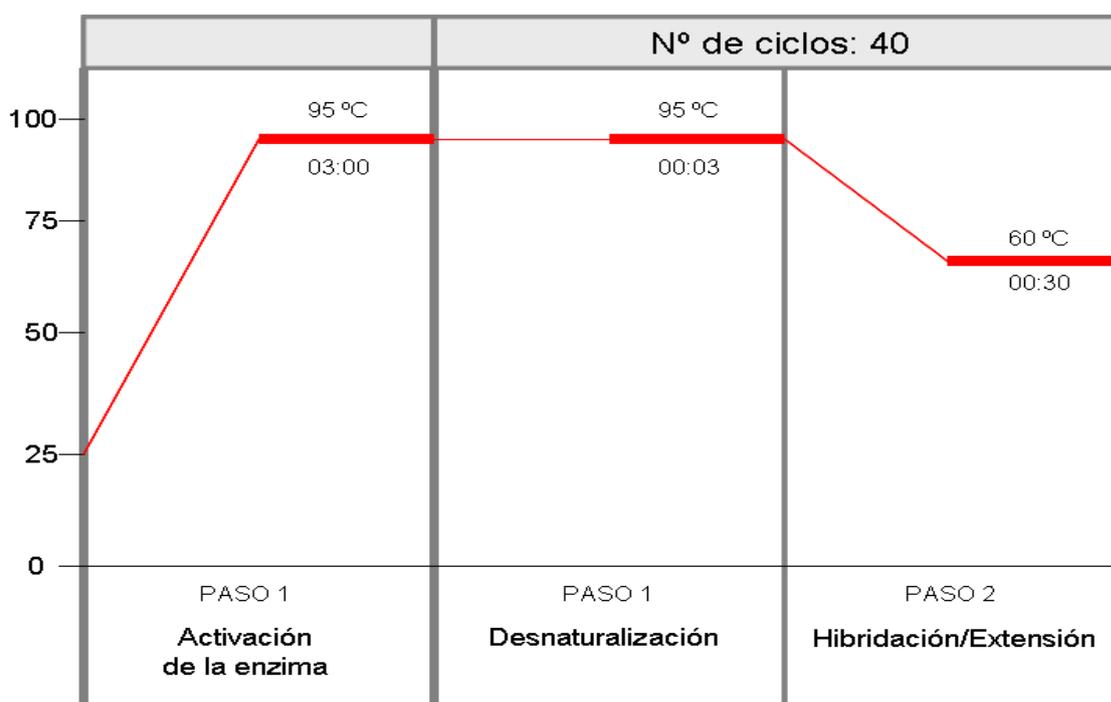
b. Retrotranscripción del ARNm a ADNc

A partir del ARNm obtenido anteriormente se sintetizó el ADN complementario (ADNc) a partir de 2 μg del ARN previamente purificado, utilizando el *kit* comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (4368814) de Applied Biosystems, provisto de *random primers* como cebadores, y de la enzima *MultiScribe™ Reverse Transcriptase*. La retrotranscripción se realizó en un termociclador *Eppendorf Mastercycler® Personal*, empleando un programa de 10 min a $25\text{ }^\circ\text{C}$, 120 min a $37\text{ }^\circ\text{C}$ y 5 min a $85\text{ }^\circ\text{C}$. La concentración de ADNc, que debe ser similar en todas las muestras, se determinó por espectrofotometría, empleando un programa para la medición de *single-stranded DNA*. Éste basa su determinación en la medida de la densidad óptica teniendo en cuenta que una unidad de

absorbancia a 260 nm equivale a 33 µg/mL de ADNc. El ADNc obtenido, correspondiente a cada condición, se almacenó a -20° C hasta su utilización.

c. Real time PCR

Finalmente se evaluaron los cambios en la expresión de los genes de interés por *Real Time-PCR*, empleando el reactivo *SYBR Green I* [Wang y Seed 2003], siguiendo el protocolo del *kit* comercial *KAPA SYBR® FAST qPCR Kit Master Mix (2X) Universal* (KR0389 - v8.12). Para la cuantificación de la expresión de los genes de interés, se empleó el equipo de *Real Time PCR* de Applied Biosystems modelo ABI 7500 adquirido con PME 2006-02493 de la ANPCyT, empleando los siguientes parámetros:



Esquema de las fases de la amplificación por *real time PCR*

En todos los casos, al finalizar los ciclos de PCR se realizaron curvas de desnaturalización (curvas de *melting*) para confirmar la amplificación del fragmento adecuado, chequeando la generación de un único *amplicón* por reacción. Los *primers* para la amplificación de los genes estudiados, fueron diseñados a partir de las secuencias adquiridas del *GenBank* (servicio en red

del *National Center for Biotechnology Information*, NCBI; perteneciente a la *National Library of Medicine*, dependiente del *National Institute of Health*, NIH) y mediante la utilización del programa *Primer BLAST* [Ye et al. 2012]. La secuencia de los *primers* utilizados se detalla a continuación:

GAPDH Forward 5' CGTCCCGTAGACAAAATGGT 3'

GAPDH Reverse 5' TTGATGGCAACAATCTCCAC 3'

Puma Forward 5' TACGAGCGGCGGAGACAAG 3'

Puma Reverse 5' GTGTAGGCACCTAGTTGGGC 3'

PERP Forward 5' ACCACATCCAGACATCGTCG 3'

PERP Reverse 5' CTCGTCCCCATGCGTACTCC 3'

Bcl-2 Forward 5' GCGTCAACAGGGAGATGTCA 3'

Bcl-2 Reverse 5' TTCCACAAAGGCATCCCAGC 3'

Para determinar la expresión relativa de los genes de interés, los datos fueron analizados por el método de la cuantificación relativa por comparación de C_T (*threshold cycle*, umbral de detección establecido) " ΔC_T " [Giulietti et al. 2001; Livak y Schmittgen 2001]. El nivel de transcripción del gen en estudio se comparó con un gen de referencia, el cual tiene una expresión constante. En este caso se utilizó el gen de la Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como gen de referencia. El nivel de transcripción relativo se determina a partir de diferencia entre los valores de C_T (ΔC_T). Los valores se expresan como $2^{-\Delta C_T}$.

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como promedio \pm desvío estándar (DE) y representan la media de al menos 3 experimentos independientes con resultados comparables. Las diferencias estadísticas entre los grupos fueron determinadas mediante el análisis de la varianza (ANOVA) seguido del estudio *post hoc*, considerándose significativas cuando se obtuvieron valores de probabilidad por debajo de 0,05 ($p < 0,05$).

CAPÍTULO I

"El H₂O₂ como inductor de apoptosis en células musculares C2C12: respuesta celular y rol de la testosterona"

RESULTADOS

I. Activación de proteínas asociadas a eventos de supervivencia e inactivación de proteínas apoptóticas a tiempos cortos de exposición al H₂O₂

Como una primera aproximación para evaluar el efecto del agente apoptótico sobre nuestro modelo experimental, los cultivos celulares fueron tratados con H₂O₂ 1 mM durante distintos períodos de tiempo que variaban entre 15 minutos y 16 horas, seguido del estudio de proteínas asociadas a eventos de supervivencia. Mediante técnicas de *Western blot* y utilizando anticuerpos específicos contra las formas fosforiladas/activas de Akt y ERK1/2 MAPK, se observó una respuesta tiempo-dependiente en la activación de las mismas, tras la exposición al agente apoptótico. A tiempos cortos de tratamiento con H₂O₂, ambas proteínas son fosforiladas, siendo máxima la activación a las 2 hs para Akt y a los 30 min para ERK, tiempo a partir del cual el efecto disminuye significativamente.

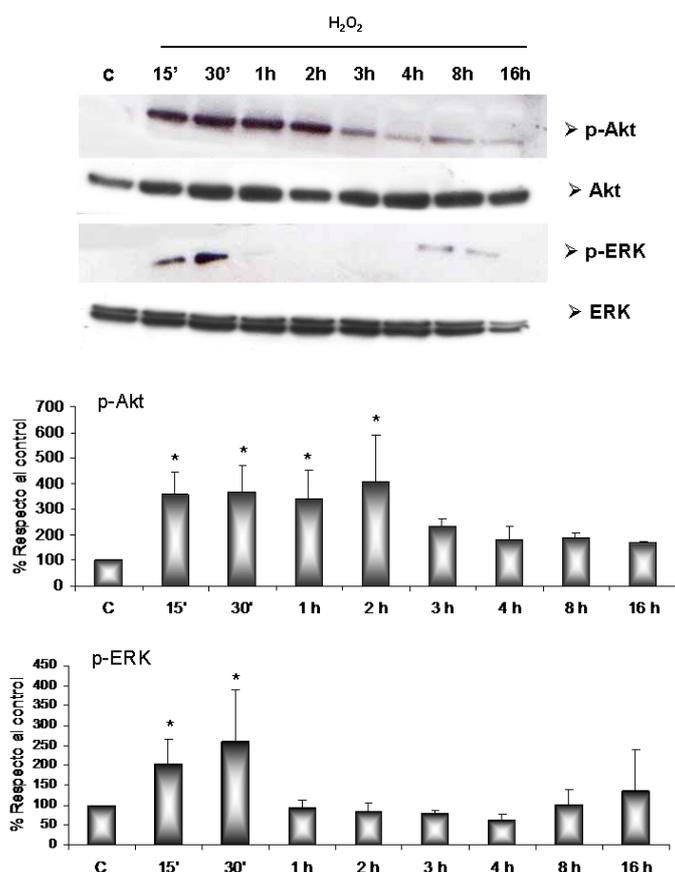


Figura 1: Estudio tiempo-respuesta de la activación de Akt y ERK por H₂O₂ en células musculares. Las células C2C12 fueron incubadas con H₂O₂ 1 mM durante los períodos de tiempo indicados. Los lisados celulares fueron sometidos al análisis por *Western blot* utilizando los anticuerpos anti-fosfo-Akt (Ser 473) y anti-fosfo-ERK (Thr202/Tyr 204). Se muestran los niveles de Akt y ERK total como control de equivalencia de siembra en cada condición. Los *blots* fueron cuantificados por densitometría y son representativos de 3 experimentos diferentes con resultados comparables. Los resultados se expresan como % de estímulo respecto al control, *p < 0,05.

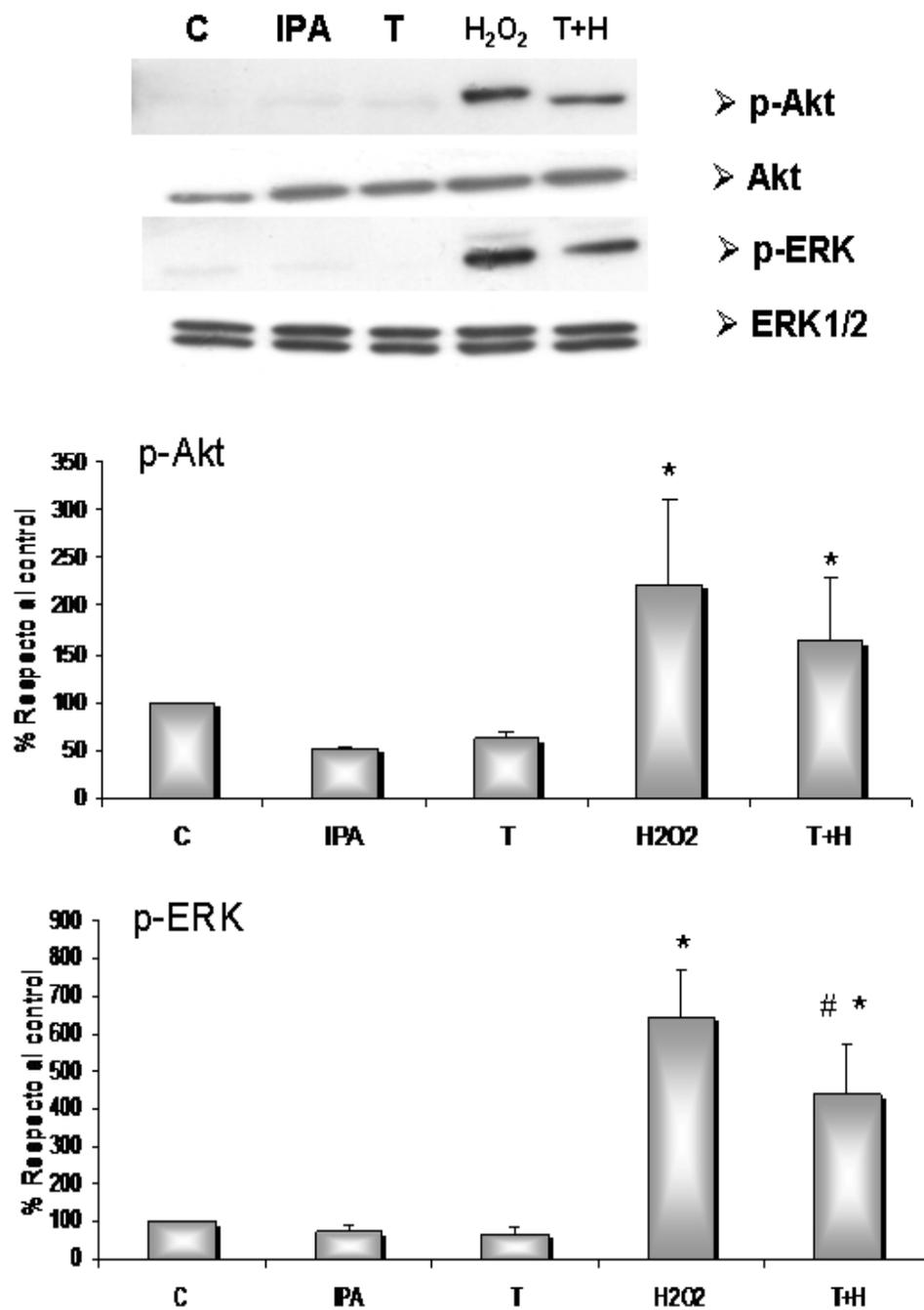
A su vez, las células fueron sometidas a tratamientos simultáneos con testosterona y H_2O_2 durante períodos de tiempo corto (2 hs). Para ello, los cultivos celulares fueron pretratados con testosterona 10^{-9} M durante 60 min y luego expuestos a H_2O_2 1 mM durante 2 hs. Se observó, no solo la activación de Akt y ERK2 en presencia de H_2O_2 (Figura 2A), sino también la inactivación (fosforilación en serina 136) de la proteína apoptótica Bad (Figura 2B), probablemente como consecuencia de la activación de Akt. La vía de señalización de la fosfatidilinositol-3-kinasa (PI3K) es crucial en numerosos aspectos celulares involucrados en el crecimiento y la supervivencia celular [Cross et al. 2000; Brazil y Hemmings 2001]. Esta vía es estimulada fisiológicamente como consecuencia de muchos factores de crecimiento y conduce, corriente abajo, a la activación de la proteína Akt la cual tiene múltiples blancos responsables de la supervivencia celular y de los efectos antiapoptóticos de esta vía [O’Groman et al. 2000; Xu et al. 2003; Grutzner et al. 2006]. Se ha reportado que la señalización por Akt inactiva varios factores proapoptóticos como Bad (fosforilándola en serina 136) y procaspasa-9 [Datta et al. 1997, Del Peso et al. 1997; Chen et al. 2001; Wang et al. 2002], al mismo tiempo que incrementa la expresión de genes antiapoptóticos como CREB, NF- κ B y HIF-1.

Por lo que a tiempos cortos de exposición al H_2O_2 , las células activarían un mecanismo de defensa frente al agente apoptótico. El hecho de que el tratamiento previo con testosterona reduzca la fosforilación (inactivación) de Bad en serina 136 inducida por el tratamiento a tiempos cortos de H_2O_2 , se debe probablemente al efecto protectoro frente a la apoptosis, que ejerce el esteroide en la célula. Cuando las células son tratadas con testosterona previo a la inducción de la apoptosis, las condiciones son menos adversas que los cultivos sin tratamiento que se exponen al H_2O_2 . Es por esto que no es esencial para la célula activar un mecanismo de defensa dado que la testosterona está ejerciendo una protección. Por lo tanto, la activación de Akt no es necesaria, y los niveles de p-Akt disminuyen. En consecuencia, se observan niveles menores de p-Bad en los tratamientos simultáneos con testosterona y H_2O_2 .

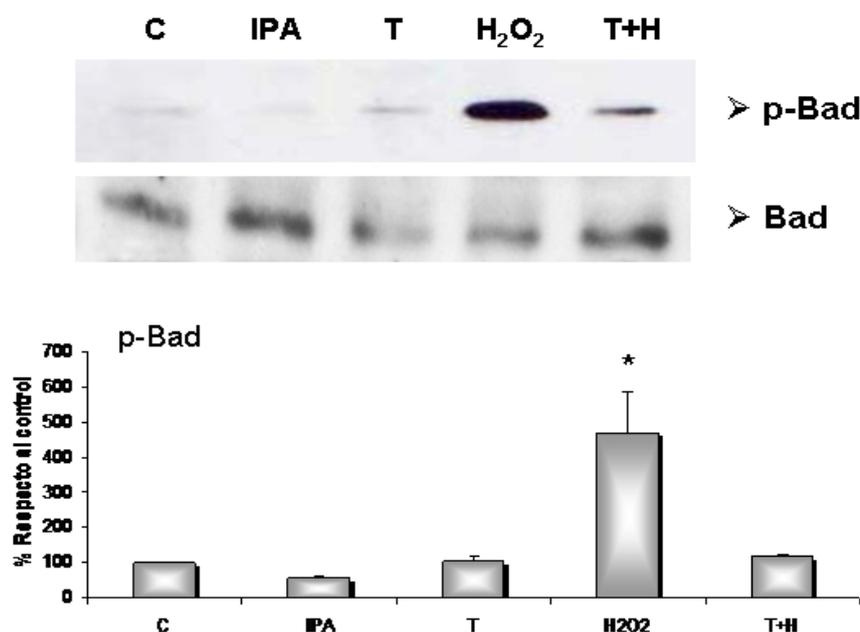
Además, se demostró por *Western blot*, que a tiempos cortos de tratamiento con H_2O_2 las células aumentan la expresión de la HSP70, proteína asociada a eventos de supervivencia (Figura 2C). Estos datos

sugieren que tratamientos cortos con H_2O_2 activarían vías de señalización asociadas a eventos de supervivencia como mecanismo de defensa para evitar entrar en apoptosis.

A.



B.



C.

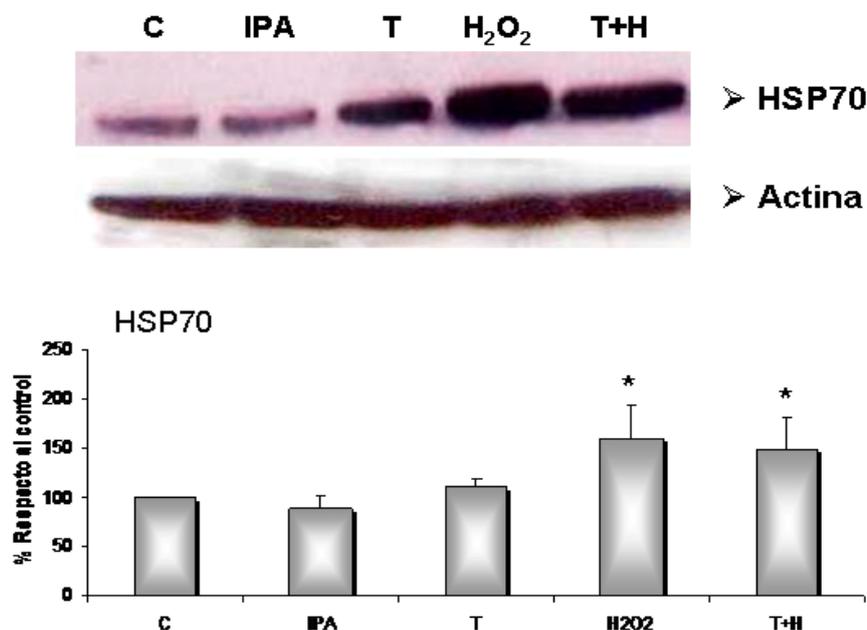


Figura 2: Efectos del tratamiento con H₂O₂ y testosterona durante períodos de tiempo cortos, en células musculares C2C12. Las células C2C12 se mantuvieron en DMEM sin suero (C) o fueron tratadas con isopropanol (0,001 %) (IPA) durante 60 min, con testosterona 10⁻⁹ M durante 60 min (T), con H₂O₂ 1 mM por 2 hs (H₂O₂) o pretratadas con testosterona 10⁻⁹ M durante 60 min y luego expuestas a H₂O₂ 1 mM por 2 hs (T+H). Los ensayos de *Western blot* se realizaron utilizando anticuerpos específicos A) anti-fosfo-ERK1/2 (Thr 202/Tyr 204) y anti-fosfo-Akt (Ser 473); B) anti-fosfo-Bad (Ser 136) y C) anti-HSP70. Los niveles de actina, Akt, ERK y Bad total se muestran como controles de equivalencia de siembra. Los *blots* son representativos de 3 experimentos distintos con resultados comparables. Fueron cuantificados por densitometría y los resultados son expresados como % de estímulo respecto al control, *p<0,05 o como % de estímulo respecto al H₂O₂, #p<0,05.

II. Efecto protector de la testosterona frente a la apoptosis tras la exposición de las células C2C12 a tiempos largos de H₂O₂

Cuando las células C2C12 son tratadas con H₂O₂ por períodos de tiempo más largos (4 hs), se observa la desfosforilación/inactivación tanto de Akt como de ERK2 (Figura 1). Esto lleva a pensar que al prolongar el tiempo del estímulo apoptótico, las células agotan los recursos para continuar defendiéndose e inician el proceso de muerte celular programada.

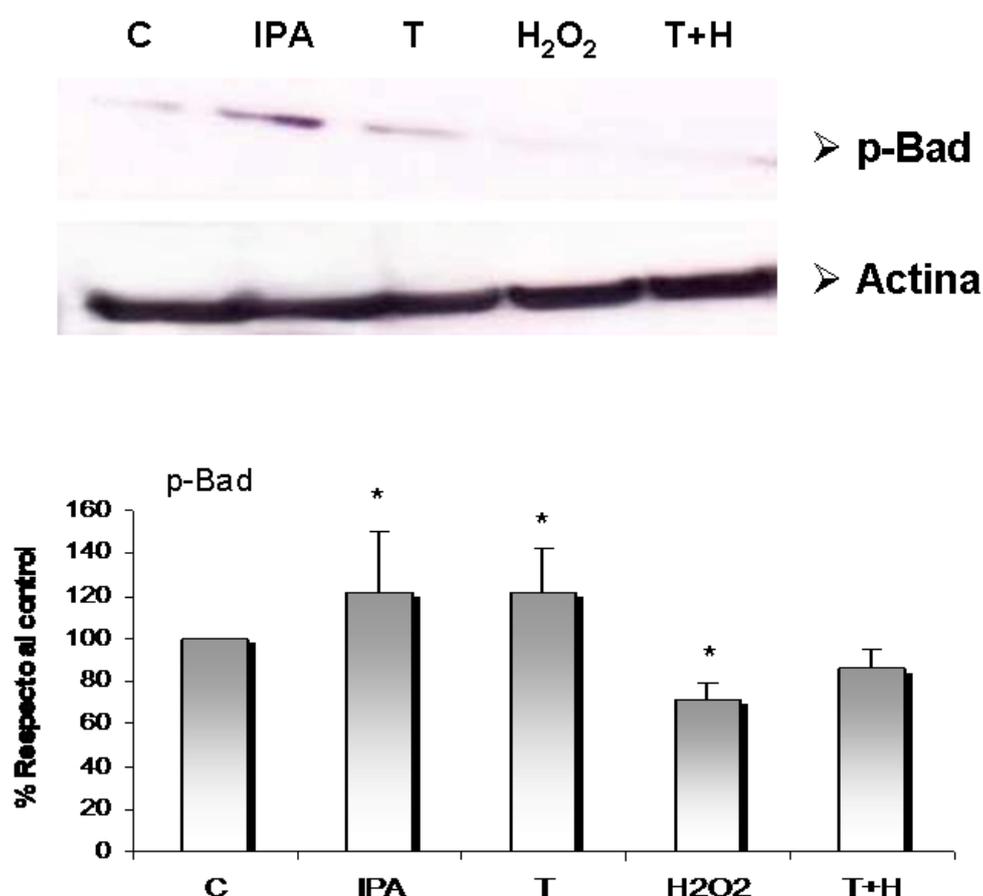
A fin de caracterizar el patrón de respuesta apoptótica cuando se expone las células a períodos de tiempo más largos con H₂O₂ y evaluar el efecto de la testosterona, se realizaron tratamientos simultáneos con el agente apoptótico y la hormona. Los cultivos fueron pretratados con testosterona 10⁻⁹ M durante 60 min y sometidos al tratamiento con H₂O₂ 1 mM durante 4 hs (T+H). Además se evaluó el efecto de un antagonista del receptor de andrógenos, la Flutamida, a fin de determinar la participación del AR en los eventos protectivos. Para esto, las células se pretrataron con testosterona 10⁻⁹ M y Flutamida 10⁻⁸ M durante 60 min y luego se sometieron a 4 hs de tratamiento con H₂O₂ 1 mM (T+F+H).

En concordancia con la disminución de la fosforilación/activación de Akt y ERK2 MAPK a tiempos largos de exposición al agente apoptótico, se observó por ensayos de *Western blot* la desfosforilación (activación) de la proteína apoptótica Bad tras el tratamiento con H₂O₂ (Figura 3A).

El análisis de la proteína nuclear PARP, cuyo clivaje ocurre en las fases finales de la apoptosis, reveló que el aumento del fragmento clivado de PARP inducido por tratamientos largos con H₂O₂, era revertido cuando las células se trataban con testosterona previo a la inducción de la apoptosis con H₂O₂ (4 hs). Sin embargo, la disminución del clivaje de PARP inducido por la hormona, fue casi completamente suprimido cuando se agregó al tratamiento anterior, la Flutamida (Figura 3B).

Resultados similares se obtuvieron cuando se estudió la expresión de la proteína apoptótica Bax, miembro de la familia de las proteínas Bcl-2, que juega un rol importante en la regulación de la apoptosis a nivel mitocondrial. Por técnicas de *Western blot* se observó que el tratamiento

con H_2O_2 a tiempos largos, aumentaba la expresión de Bax, efecto que fue disminuido cuando se pretrató las células con testosterona. El tratamiento con Flutamida revirtió el efecto de la hormona, y los niveles de Bax se vieron nuevamente incrementados (Figura 3B). Estos datos revelan que a tiempos largos de exposición al agente apoptótico, las células inician finalmente el proceso de muerte celular por apoptosis. Los tratamientos simultáneos con H_2O_2 , testosterona y Flutamida, reducen el efecto protector del esteroide, indicando la posible participación del AR como mediador de las acciones de la testosterona durante a la apoptosis en las células C2C12.

A.

B.

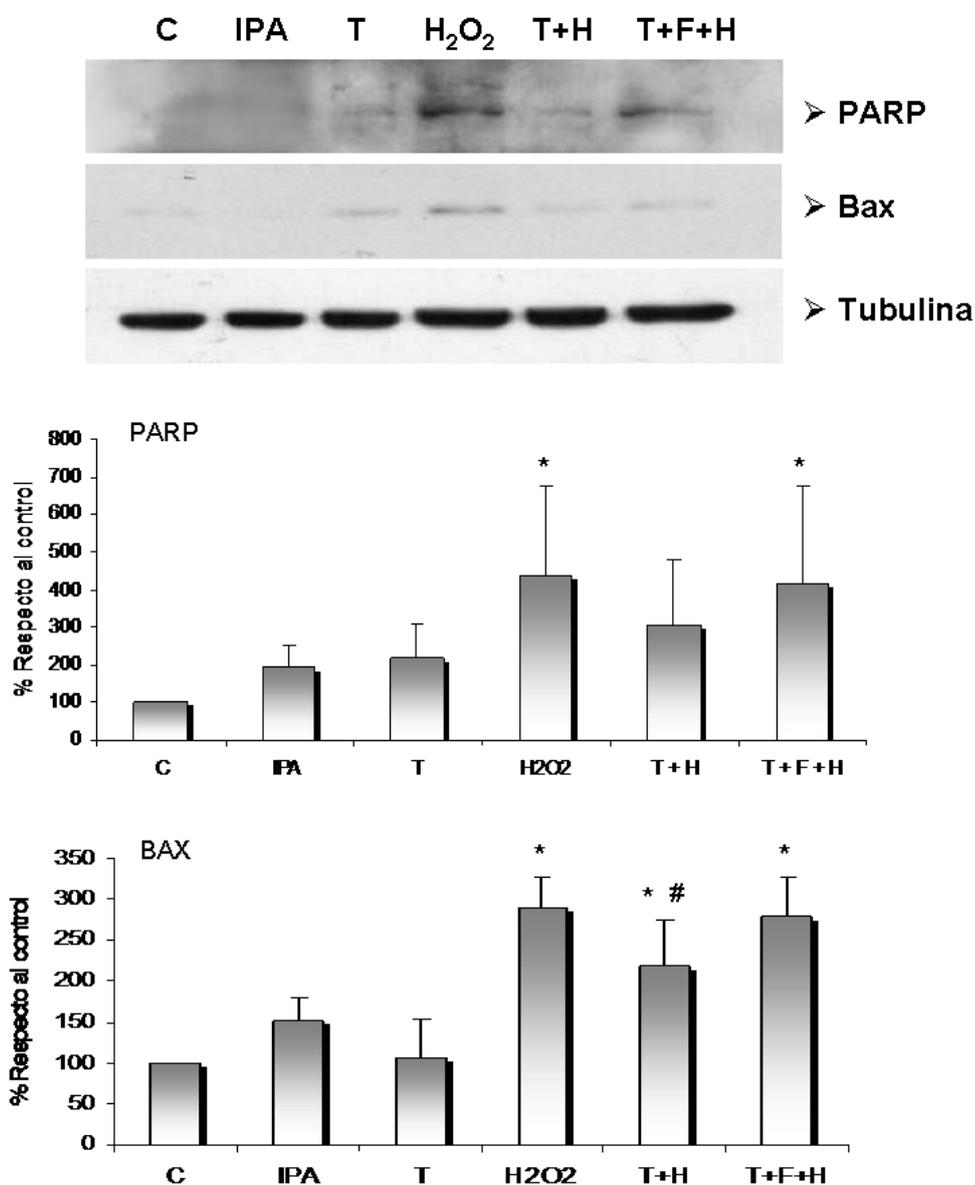


Figura 3: Efecto protector de la testosterona frente a la apoptosis inducida por tiempos largos de exposición al H₂O₂ en células musculares C2C12. Las células C2C12 fueron tratadas con siguientes estímulos: (C) DMEM sin suero; (IPA) isopropanol 0,001 % por 60 min; (T) testosterona 10⁻⁹ M por 60 min, (H₂O₂) H₂O₂ 1 mM durante 4 hs; (T+H) pretratamiento con testosterona 10⁻⁹ M por 60 min, seguido de 4 hs con H₂O₂ 1 mM; (T+F+H) pretratamiento con testosterona 10⁻⁹ M y Flutamida 10⁻⁸ M durante 60 min, seguido de 4 hs con H₂O₂ 1 mM. Los ensayos de *Western blot* se realizaron utilizando los anticuerpos (A) anti-fosfo-Bad (Ser 112); (B) anti-PARP y anti-Bax. Los niveles de actina y tubulina se muestran como controles de siembra. Los *blots* son representativos de 3 experimentos diferentes con resultados comparables. La cuantificación densitométrica muestra los % de estímulo respecto al control *p<0,05 o respecto al H₂O₂ #p<0,05.

Efecto de la testosterona sobre los niveles de expresión de la proteína apoptótica Bax y actina

También se evaluó el efecto directo de la testosterona sobre la expresión de la proteína apoptótica Bax, así como también sobre los niveles de actina. Para ello las células C2C12 fueron incubadas con distintas concentraciones de la hormona (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} y 10^{-11} M) o bien con el vehículo isopropanol como control, en el porcentaje de alcohol equivalente al presente en las condiciones 10^{-6} y 10^{-8} M de testosterona. Mediante técnicas de *Western blot* y utilizando anticuerpos específicos contra Bax y actina, se vio cómo la testosterona es capaz de disminuir notablemente la expresión de Bax respecto al control, mostrando su efecto protector al regular negativamente la expresión de la proteína proapoptótica. Al mismo tiempo, se evidenció la capacidad de la hormona de aumentar los niveles de actina, componente primordial del citoesqueleto celular, lo que contribuiría a su estabilización (Figura 4). Dado el efecto observado de la testosterona sobre la expresión de la actina, la cual habitualmente se emplea como control de equivalencia de siembra, es que fue necesario dejar de utilizarla para tal fin cuando se realizaran tratamientos hormonales, reemplazándosela por la tubulina como control de siembra.

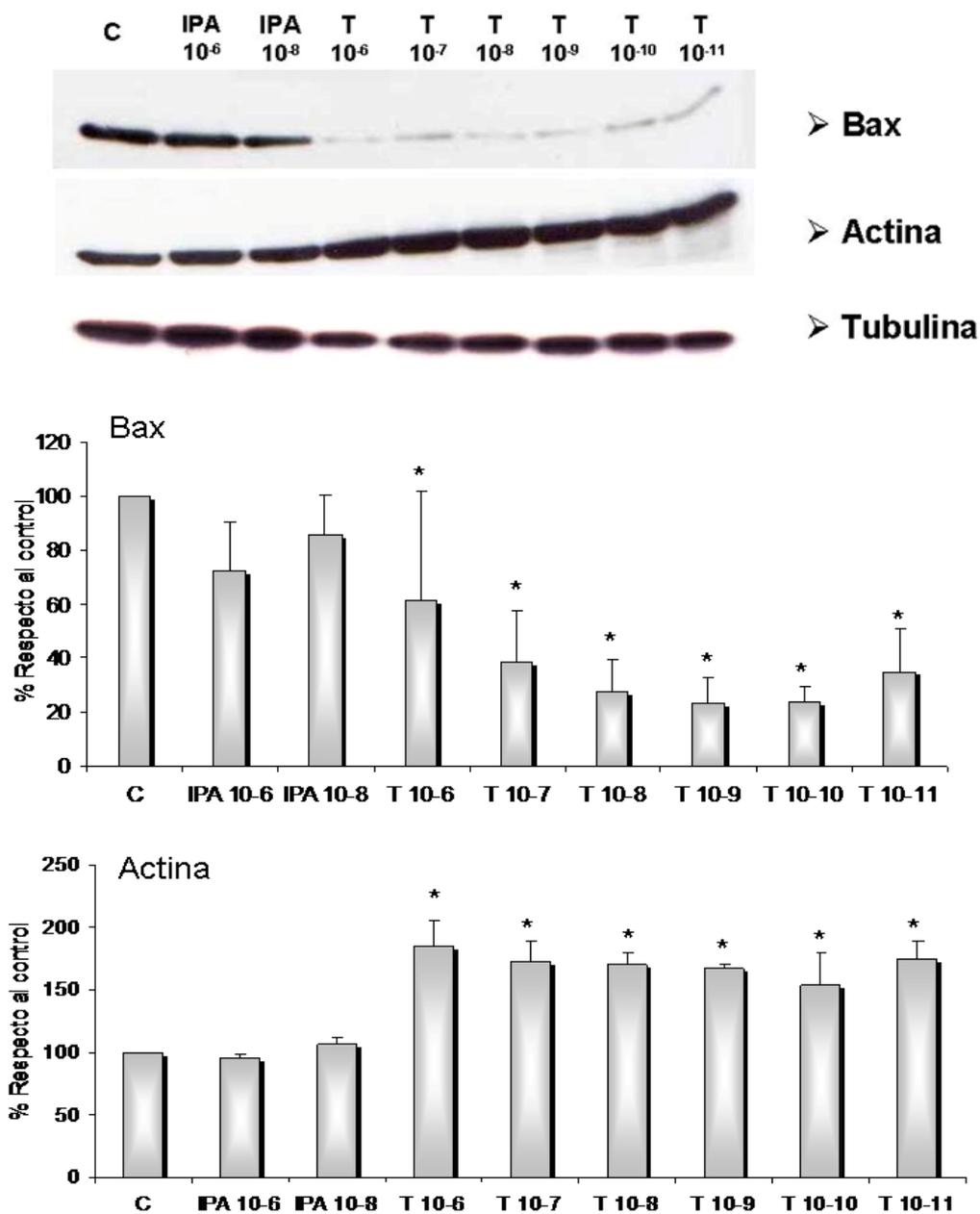


Figura 4: Efectos de la testosterona sobre la expresión de Bax y actina en células C2C12. Los cultivos celulares fueron tratados con testosterona (T) en las concentraciones especificadas (T10⁻⁶, T10⁻⁷, T10⁻⁸, T10⁻⁹, T10⁻¹⁰ y T10⁻¹¹ M) o con su vehículo (IPA) en el porcentaje de alcohol equivalente al presente en las condiciones 10⁻⁶ y 10⁻⁸ M de testosterona (IPA 10⁻⁶, IPA 10⁻⁸ M), durante 60 min o bien se mantuvieron sin tratamiento en DMEM sin suero (C). Los ensayos de *Western blot* se realizaron empleando anticuerpos específicos contra Bax y actina. Los niveles de tubulina se muestran como control de equivalencia de siembra. Los *blots* son representativos de 3 experimentos distintos con resultados comparables. Fueron cuantificados por densitometría y los valores se muestran como porcentaje de estímulo respecto al control, *p<0,05.

Efecto de la testosterona sobre la localización subcelular de Bax

Como se mencionó anteriormente, Bax es un miembro de la familia de las proteínas Bcl-2, que juega un rol importante en la regulación de la apoptosis. Ante un estímulo apoptótico, Bax transloca a mitocondria [Hsu et al. 1997; Wolter et al. 1997] donde induce la liberación de citocromo c, mediante la formación de poros o bien por la apertura de canales, en la membrana mitocondrial, desencadenando la muerte celular programada [Shimizu et al. 1999; Saito et al. 2000; Kuwana et al. 2002].

Dado que previamente se observó que la testosterona es capaz de disminuir los niveles de expresión de Bax, se estudió a continuación el efecto de la hormona y su receptor, sobre la distribución subcelular de esta proteína apoptótica. Las células C2C12 fueron tratadas con testosterona 10^{-9} M, Flutamida 10^{-8} M y H_2O_2 1 mM por 4 horas y luego sometidas al fraccionamiento subcelular. Las distintas fracciones fueron analizadas por *Western blot* utilizando un anticuerpo específico contra Bax. Como se puede observar en los *blots*, el tratamiento con H_2O_2 provoca la translocación de Bax a mitocondria. Este efecto fue revertido por el pretratamiento con testosterona. El tratamiento simultáneo con la hormona, Flutamida y H_2O_2 , parece aumentar nuevamente la localización mitocondrial de Bax (Figura 5), sin embargo no se observa un cambio altamente significativo.

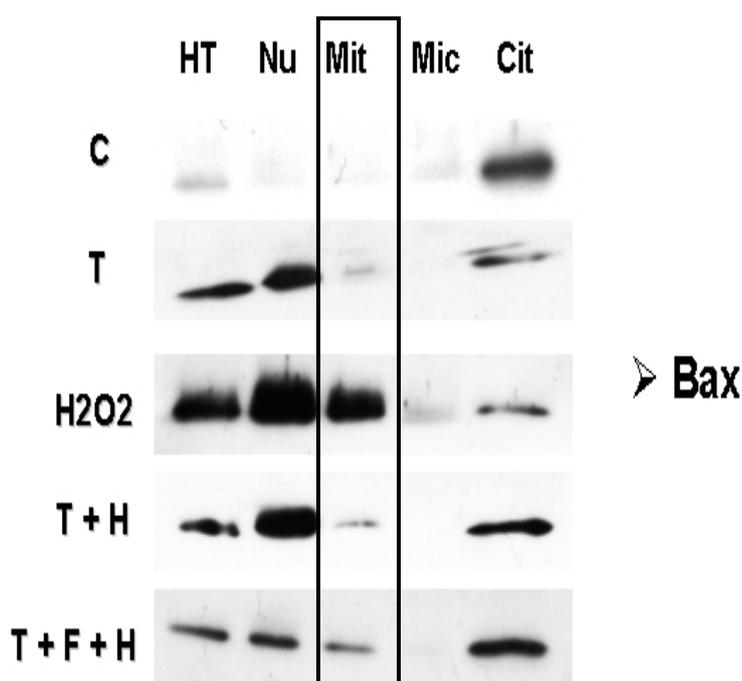


Figura 5: Disminución de la localización mitocondrial de Bax inducida por H_2O_2 , luego del tratamiento con testosterona.

(C) Células tratadas con el vehículo de la hormona, isopropanol 0,001 % por 60 min; (T) Células incubadas con testosterona 10^{-9} M durante 60 min; (H_2O_2) Células tratadas con H_2O_2 1 mM durante 4 hs; (T+H) Células incubadas con testosterona 10^{-9} M durante 60 min y luego sometidas a 4 hs de tratamiento con H_2O_2 1 mM; (T+F+H) Células incubadas con testosterona 10^{-9} M y Flutamida 10^{-8} M durante 60 min y luego sometidas a 4 hs de tratamiento con H_2O_2 1 mM. Las distintas fracciones subcelulares fueron analizadas por *Western blot* utilizando un anti-Bax específico.

III. Efecto de la testosterona sobre los cambios morfológicos y funcionales inducidos por el H₂O₂ en células C2C12

a. Evaluación de la morfología nuclear, distribución mitocondrial y estabilidad del citoesqueleto

Mediante técnicas inmunocitoquímicas y microscopía de fluorescencia se evaluó la morfología nuclear, la distribución y morfología mitocondrial y la estabilidad del citoesqueleto empleando los marcadores DAPI, *Mitotracker* y anti-actina respectivamente, a fin de visualizar los efectos protectivos de la testosterona frente a la apoptosis inducida por la exposición al H₂O₂ durante tiempos largos. En la Figura 6 pueden observarse los núcleos intactos/normales de las células musculares en las condiciones control (isopropanol) y tratadas con 10⁻⁹ M de testosterona. Los núcleos de las células C2C12 que fueron expuestas a H₂O₂ 1 mM durante 4 horas, mostraron las alteraciones morfológicas típicas de la apoptosis tales como fragmentación o condensación nuclear (núcleos picnóticos). Estos efectos se vieron marcadamente disminuidos cuando se incubaron las células con testosterona 10⁻⁹ M durante 60 min previo a la inducción de apoptosis. Pudo observarse cómo una gran proporción de las mitocondrias de las células expuestas al H₂O₂ perdían su distribución clásica de "tela de araña" homogénea en el citoplasma (observada en el control o en la condición tratada con la hormona) y se concentraban alrededor del núcleo. Esta alteración en la distribución mitocondrial es prevenida por el tratamiento con testosterona previo al agregado de H₂O₂. Además, la típica distribución de los filamentos de actina observados en el control y en la condición tratada con la hormona, se pierde luego del tratamiento con H₂O₂, efecto que es prevenido por la testosterona. Pudo visualizarse así, que las alteraciones morfológicas típicas de la apoptosis, tales como la fragmentación nuclear, desorganización del citoesqueleto y relocalización subcelular de mitocondrias inducidas por el tratamiento a tiempos largos con el agente apoptótico, son reducidas por el tratamiento previo con testosterona.

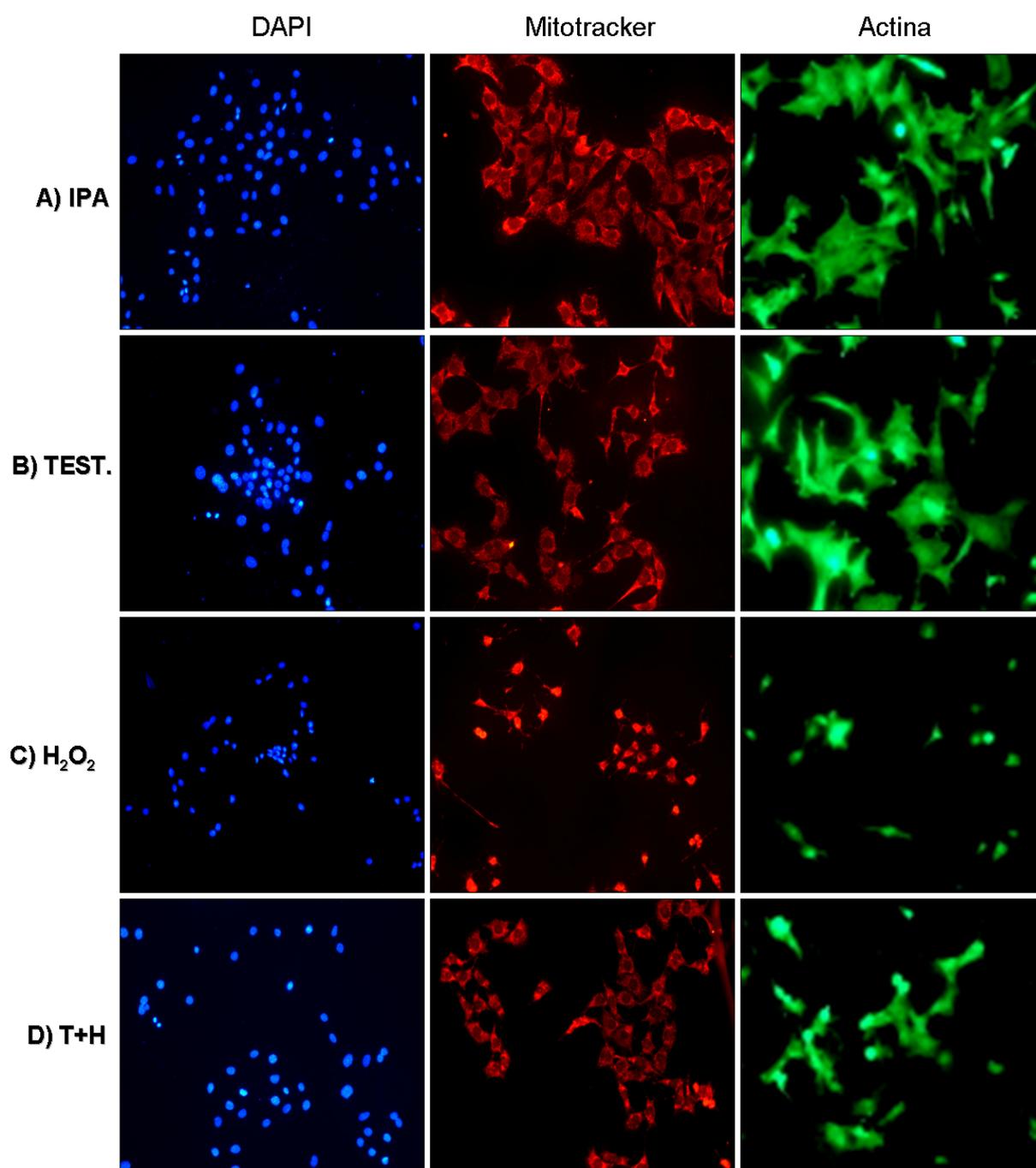


Figura 6: La testosterona previene las alteraciones morfológicas nucleares, mitocondriales y citoesqueléticas inducidas por el H₂O₂ en las células C2C12. Los cultivos celulares fueron tratados con A) isopropanol 0,001 % 60 min; B) testosterona 10⁻⁹ M 60 min; C) H₂O₂ 1 mM 4 hs; D) testosterona 10⁻⁹ M 60 min seguido de H₂O₂ 1 mM 4 hs. Luego las células fueron teñidas con DAPI (azul), *Mitotracker* (rojo) o utilizando el anticuerpo anti-actina (verde). Amplificación 20X.

b. Cuantificación de núcleos apoptóticos (picnóticos)

Una de las características más importantes de la apoptosis es la condensación del núcleo y la fragmentación del ADN en fragmentos de 200 bp (pares de bases) o múltiplos de ellos, generando un patrón de bandas de distintos pesos moleculares conocido como *DNA laddering* ("escalera de ADN"). Para poder determinar el porcentaje de células apoptóticas luego de los tratamientos con H₂O₂ a tiempos largos y evaluar el efecto protector de la hormona, se estudiaron por inmunocitoquímica y microscopía de fluorescencia, los cambios en la morfología nuclear empleando las tinciones de DAPI y TUNEL, y se contaron los núcleos picnóticos o núcleos TUNEL positivos (ADN fragmentado), luego de los distintos tratamientos.

La tinción con DAPI permitió demostrar que las células tratadas con H₂O₂ contenían un ~75 % de núcleos apoptóticos (núcleos picnóticos), mientras que el tratamiento con testosterona previo a la inducción de apoptosis, fue capaz de reducir el número de núcleo picnóticos a un ~25 % (Figura 7).

Mediante la detección de la fragmentación del ADN *in situ* por la técnica de TUNEL, se vio que el número de células TUNEL positivas aumentó a un ~70 % luego del tratamiento con H₂O₂. El pretratamiento con testosterona, fue capaz de reducir este número a un ~44 %. Sin embargo, el tratamiento simultáneo con testosterona, Flutamida y H₂O₂ elevó nuevamente los valores de células TUNEL positivas a un ~72 %, disminuyendo notablemente los efectos protectivos de la testosterona, lo que supone la participación del AR en los efectos protectivos del esteroide durante la fragmentación nuclear (Figura 8).

Para corroborar la fragmentación del ADN nuclear detectada por la técnica de TUNEL, se realizaron experimentos de *DNA Laddering*. Para éstos se aisló el ADN de los cultivos celulares sometidos a las distintas condiciones experimentales, y se los sembró en geles de agarosa al 1 % para chequear su fragmentación. Pudo observarse una reducción en los niveles del ADN íntegro de las células apoptóticas resultantes de la exposición a H₂O₂ 1 mM por 4 hs, efecto que parece disminuir con el tratamiento previo con testosterona. Sin embargo, no fue posible ver un

"laddering" nítido y claro que permitiera realizar comparaciones certeras, entre las distintas condiciones experimentales (Figura 9).

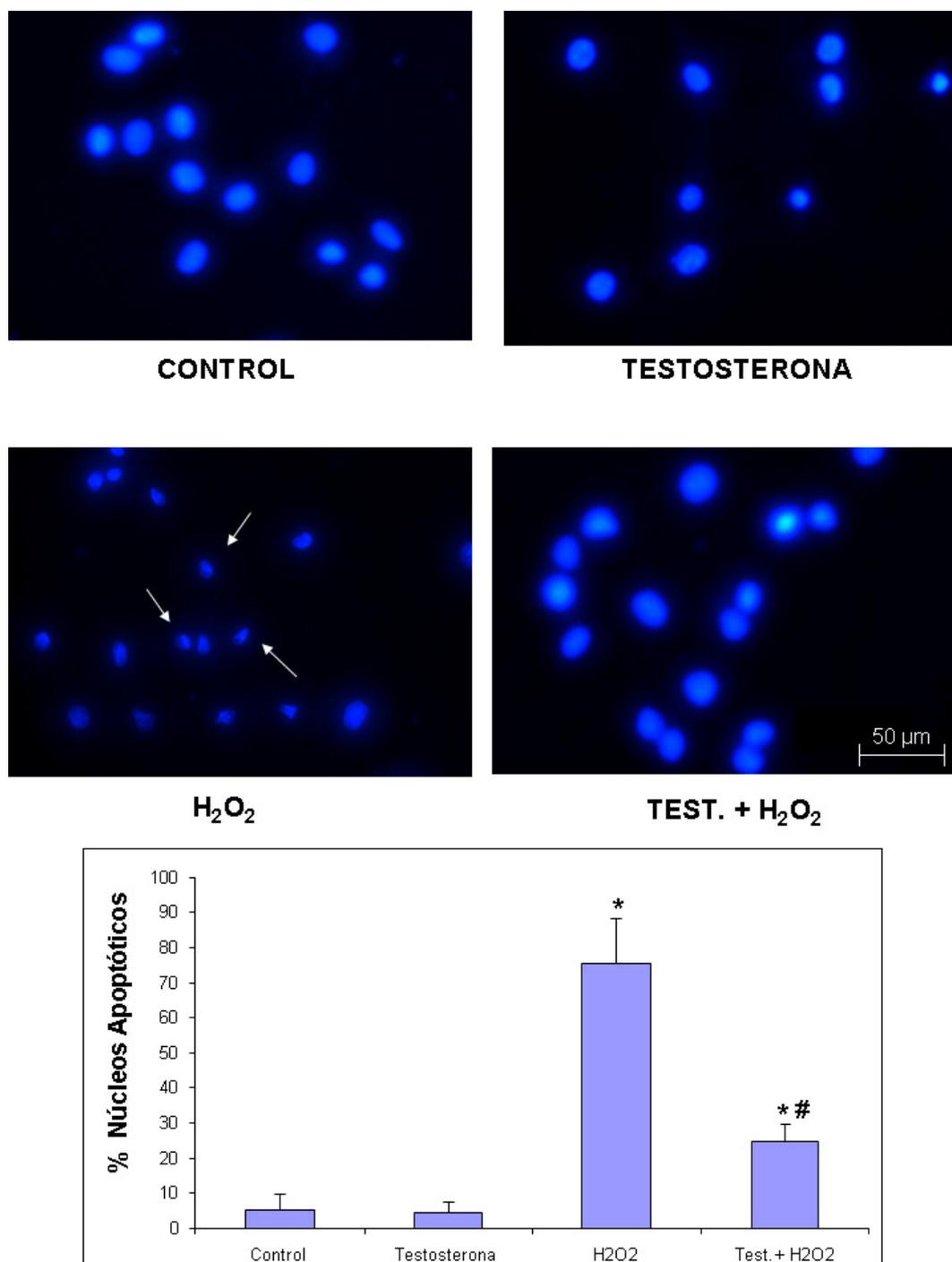


Figura 7: Efecto de la testosterona sobre la alteración de la morfología nuclear inducida por H_2O_2 en células C2C12. Los cultivos celulares fueron tratados con H_2O_2 1 mM durante 4 hs (H_2O_2) o preincubadas con testosterona 10^{-9} M antes de la adición del agente apoptótico (Test. + H_2O_2), y con testosterona 10^{-9} M sola (Testosterona) o con el vehículo de la hormona 0,001 % (IPA) durante 60 min como control. Luego de los tratamientos las células fueron teñidas con DAPI como se describió en *Metodología*. Se examinaron al menos diez campos por condición. Se realizaron tres experimentos diferentes con resultados comparables. Los resultados se expresan como porcentaje de núcleos apoptóticos respecto al control * $p < 0,05$ o respecto al H_2O_2 # $p < 0,05$.

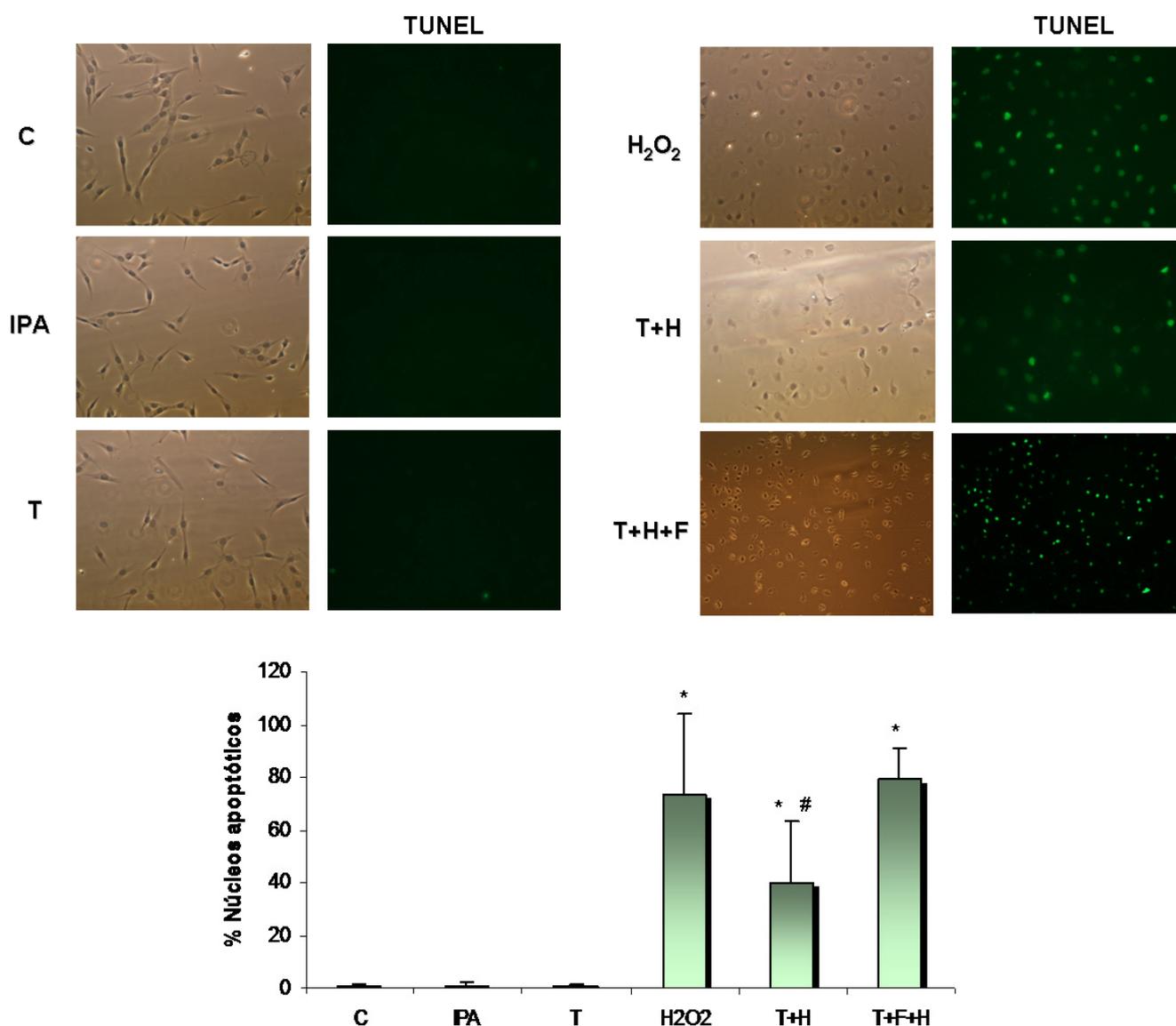


Figura 8: Efecto de la testosterona sobre la fragmentación del ADN nuclear inducida por el H₂O₂, en células musculares C2C12. Los cultivos celulares fueron tratados con H₂O₂ 1 mM durante 4 hs (H₂O₂) o preincubadas con testosterona 10⁻⁹ M (T+H) o con testosterona 10⁻⁹ M y Flutamida 10⁻⁸ M (T+F+H) antes de la exposición al agente apoptótico. El tratamiento con testosterona 10⁻⁹ M sola (T) o con el vehículo de la hormona 0,001 % (IPA) durante 60 min fueron utilizados como control. Luego de los tratamientos las células fueron teñidas por la técnica de TUNEL como se describió en *Metodología*. Los resultados se expresan como porcentaje de núcleos apoptóticos respecto al control *p<0,05 o respecto al H₂O₂ #p<0,05.

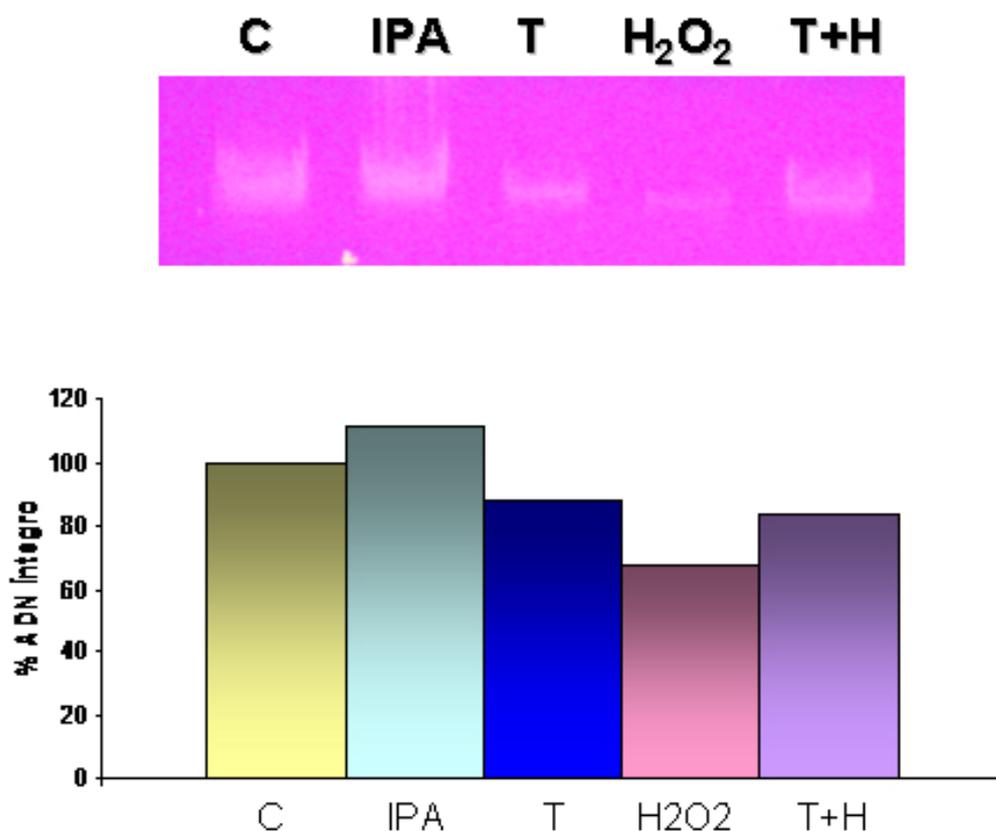


Figura 9: Efecto protector de la testosterona frente a la fragmentación del ADN nuclear inducida por el H₂O₂. Los cultivos celulares fueron tratados con isopropanol 0,001 % durante 60 min (IPA), testosterona 10⁻⁹ M durante 60 min (T), H₂O₂ 1 mM por 4 hs (H₂O₂), testosterona 10⁻⁹ M durante 60 min seguido de 4 hs de H₂O₂ 1 mM (T+H) o se mantuvieron en DMEM sin suero, sin tratamiento alguno (C). Luego se realizó el aislamiento de ADN como se describió en *Metodología* y se evaluó su integridad por electroforesis en geles de agarosa 1 %. La detección de las bandas se realizó mediante la tinción de los geles con bromuro de etidio y posterior visualización en un transiluminador de luz UV. Las bandas de ADN íntegro fueron cuantificadas por densitometría.

c. Alteraciones en la integridad y el potencial de la membrana mitocondrial por el tratamiento con H₂O₂: rol de la testosterona.

Empleo de colorantes supravitales

Los cambios funcionales de las mitocondrias se analizaron en una primera instancia, mediante el empleo de colorantes supravitales de los cultivos celulares con Verde Jano. Luego de los tratamientos adecuados, se tomaron fotografías de las distintas condiciones. Las imágenes de la Figura 10 muestran que las células expuestas a tiempos largos de H₂O₂ (panel C) exhiben una coloración azul-verdosa más intensa en el citoplasma que las células control (panel A) o las tratadas con testosterona solamente (panel B). Este resultado indica que la ruptura de la membrana externa mitocondrial debida al H₂O₂ provocó la liberación de su contenido al citoplasma induciendo la oxidación del colorante. Dicha tinción no se observó cuando las células fueron preincubadas con la hormona y luego tratadas con H₂O₂ (panel D), ya que la testosterona contrarrestó el daño oxidativo. También puede distinguirse en el panel C un alto número de células con características morfológicas típicas de apoptosis, con forma redondeada, núcleos picnóticos en los cuales no logran distinguirse los nucleolos y sin puntos de adhesión focal. Sin embargo, estas características son revertidas por la testosterona, observándose en el panel D un alto porcentaje de células no apoptóticas, con su clásica forma estrellada, citoplasmas claros, presencia de puntos de adhesión focal y núcleos no picnóticos donde claramente pueden distinguirse los nucleolos.

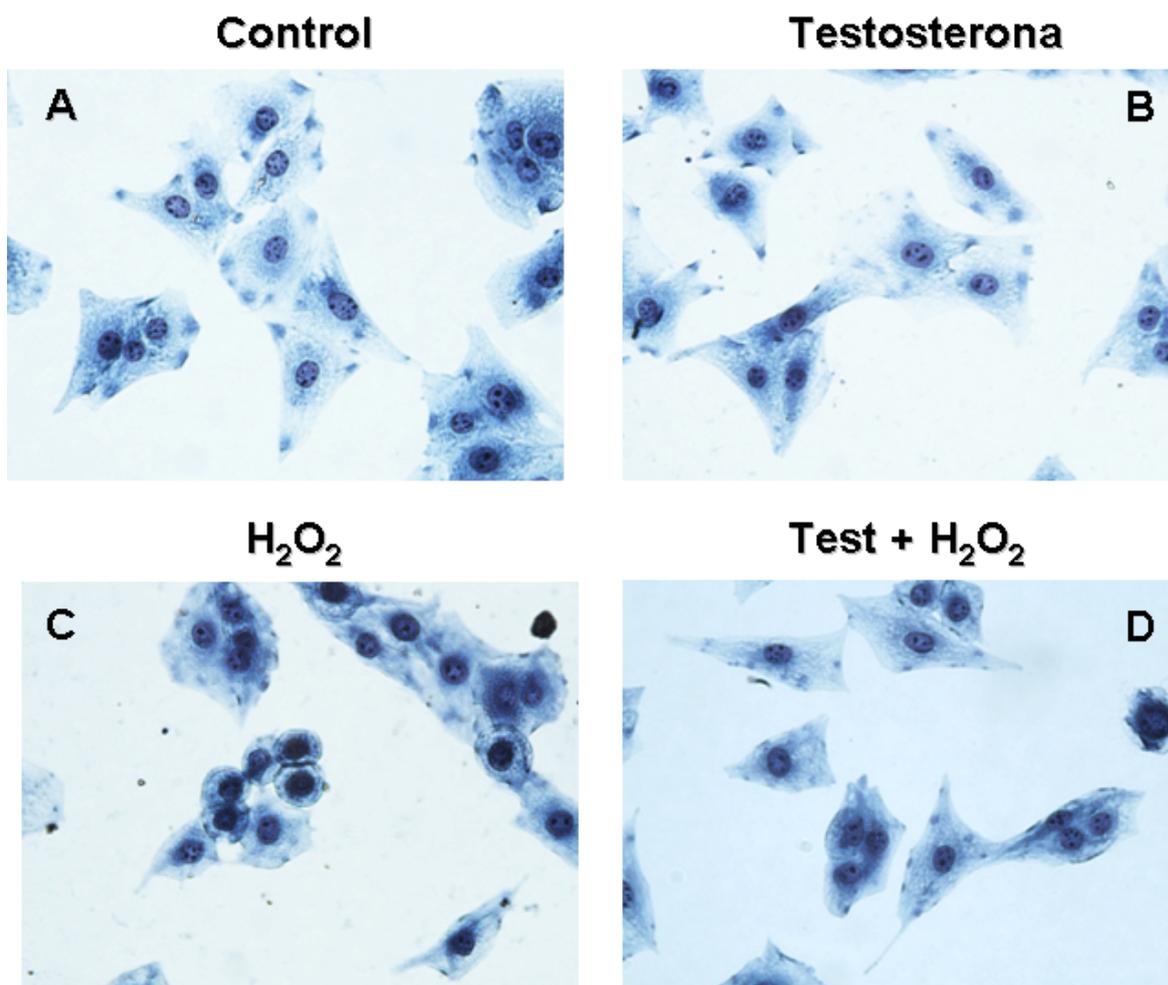


Figura 10: Efecto protector de la testosterona frente a las alteraciones funcionales mitocondriales inducidas por el H₂O₂ demostrada por la tinción Verde Jano. Los cultivos celulares fueron tratados con A) isopropanol 0,001 % durante 60 min B) testosterona 10⁻⁹ M durante 60 min C) H₂O₂ 1 mM por 4 hs D) testosterona 10⁻⁹ M durante 60 min seguido de 4 hs de H₂O₂ 1 mM. Luego de los distintos tratamientos las células fueron teñidas con Verde Jano y evaluadas con luz blanca por microscopía convencional. Fueron analizados al menos diez campos por condición. Amplificación 40X.

Determinación de la actividad citocromo c oxidasa: medición indirecta de la integridad de la membrana mitocondrial externa y de la liberación mitocondrial de citocromo c

La pérdida del potencial de membrana mitocondrial es un marcador temprano de apoptosis que se caracteriza por el aumento en la permeabilidad de la membrana y la liberación de factores proapoptóticos, como el citocromo c, desde el espacio intermembrana al compartimento citoplasmático [Penninger y Kroemer 2003]. Para determinar el grado de disfunción mitocondrial y el efecto de la testosterona durante el estrés oxidativo, se midió indirectamente la liberación de citocromo c como consecuencia de la pérdida de la integridad de la membrana mitocondrial externa inducida por el H_2O_2 , empleando el *kit* comercial (CYTOC-OX1). Se observó que el 44 % de las células presentaban daño mitocondrial luego del tratamiento con H_2O_2 por 4 hs, mientras que cuando los cultivos eran tratados con testosterona previo a la adición del agente apoptótico, solo un 29 % de las células presentaban daño (Figura 11).

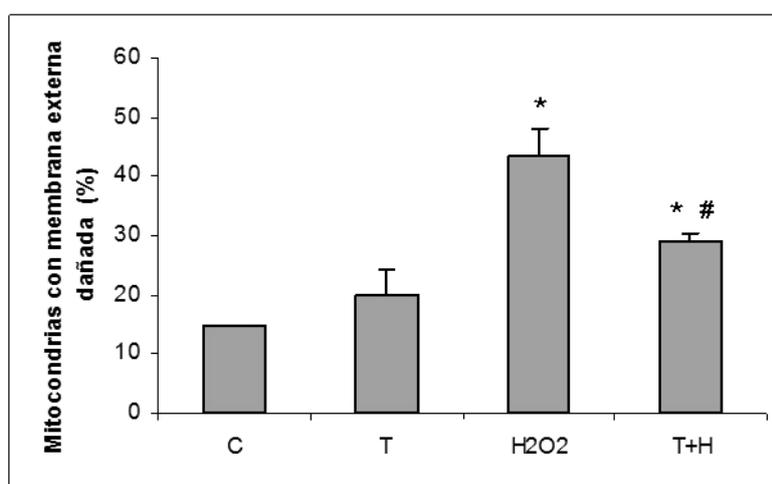


Figura 11: Efecto de la testosterona sobre la liberación mitocondrial de citocromo c inducida por H_2O_2 . Las células C2C12 fueron sometidas a los distintos tratamientos y luego la liberación de citocromo c fue medida tal como se describió en *Metodología*. (C) Células tratadas con el vehículo de la hormona, isopropanol 0,001 % por 60 min; (T) Células incubadas con testosterona 10^{-9} M durante 60 min; (H_2O_2) Células tratadas con H_2O_2 1 mM durante 4 hs; (T+H) Células incubadas con testosterona 10^{-9} M durante 60 min y luego expuestas H_2O_2 1 mM por 4 hs. Los valores se expresan como porcentaje de mitocondrias con membrana externa dañada respecto al control * $p < 0,05$ o respecto al H_2O_2 # $p < 0,05$ con $n=3$.

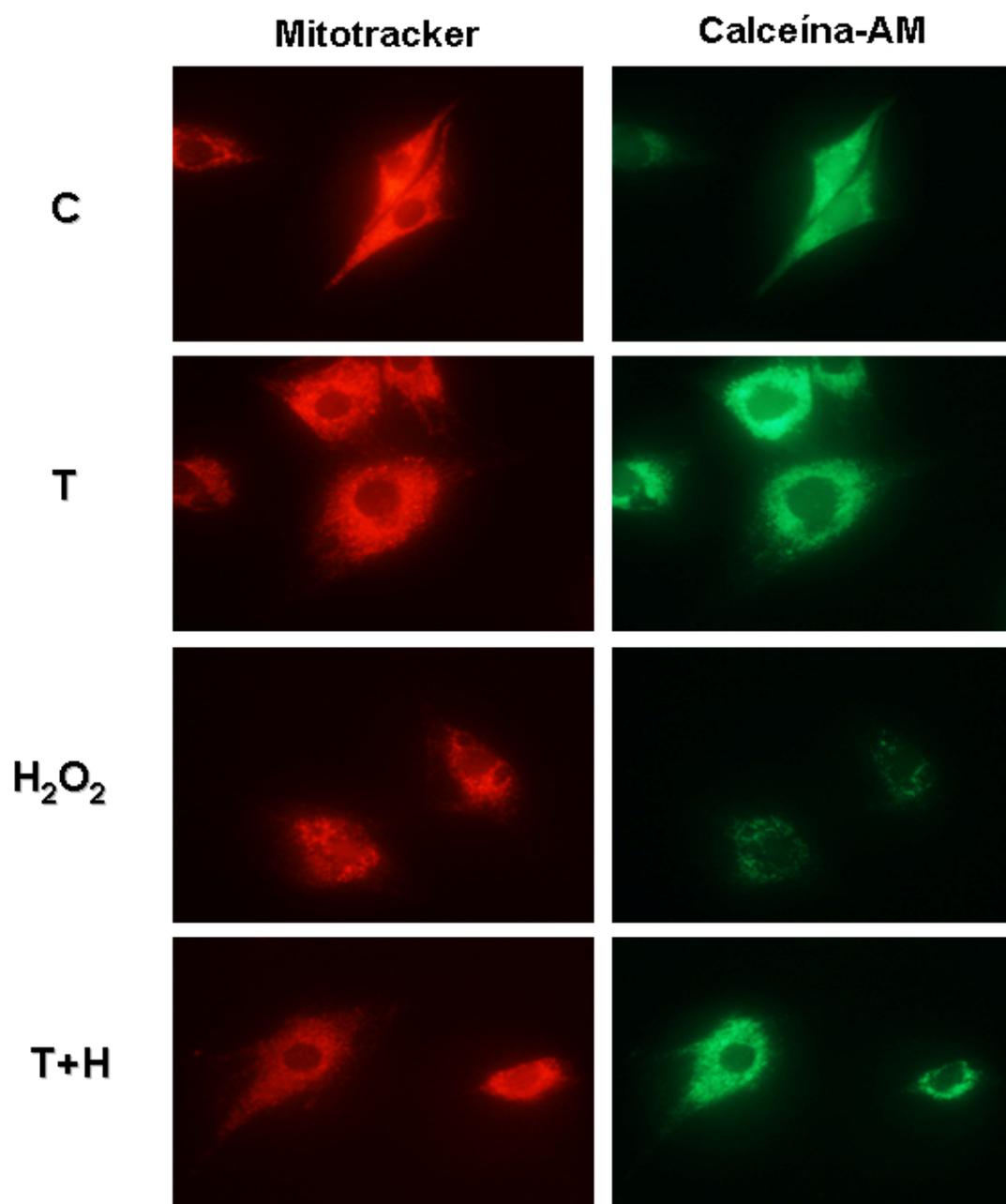
Apertura del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (mPTP)

La mitocondria juega un rol fundamental en la apoptosis, liberando al citoplasma factores proapoptóticos. Este proceso, requiere de un aumento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa, la cual depende probablemente de la activación y apertura del mPTP. Para evaluar los efectos de la testosterona en la funcionalidad del mPTP en las células C2C12, se utilizó el método calceína-AM/cobalto. La calceína-AM es un fluorocromo aniónico que ingresa libremente a la célula, tiñendo tanto el citoplasma como las mitocondrias, luego de que las esterasas remueven el grupo AM. Debido a que los iones de cobalto ingresan al citoplasma libremente, pero no son capaces de atravesar la membrana mitocondrial, la fluorescencia de la calceína citosólica puede ser apagada por el cobalto, no así la fluorescencia mitocondrial. En base a esto, la apertura del mPTP puede ser identificada por la disminución de la fluorescencia mitocondrial, ya que la apertura del poro permitiría el ingreso de los iones de cobalto a la organela [Petronilli et al. 1999].

Los cultivos celulares fueron cargados con Calceína-AM/CoCl₂ y luego tratados con testosterona o el vehículo de la hormona, previo a la inducción de apoptosis con H₂O₂ (4 hs). Las células fueron analizadas por microscopía de fluorescencia y citometría de flujo como se describió en "Metodología". Pudo observarse que el tratamiento con H₂O₂ provocó la disminución de la fluorescencia de la calceína como consecuencia de su apagado por el CoCl₂, tras la inducción de la apertura del mPTP. Sin embargo, cuando las células fueron pretratadas con testosterona, la disminución de la fluorescencia fue menor, sugiriendo un efecto protector del esteroide sobre el funcionamiento del poro mitocondrial (Figura 12A). Estos resultados fueron confirmados por citometría de flujo, lo que permitió la cuantificación de la fluorescencia celular. Las células tratadas con el inductor de apoptosis mostraron una disminución en la intensidad de fluorescencia verde, evidenciado por el corrimiento de la señal hacia la izquierda en el canal FL-1, al mismo tiempo que se detectó un población de células con una morfología e intensidad de fluorescencia distinta a la de los controles. De esta forma, se determinó que el tratamiento con H₂O₂ redujo la fluorescencia mitocondrial de la calceína respecto al control, de un ~80 % a

un ~63 %. Sin embargo, en presencia de testosterona, la reducción en la fluorescencia de la calceína fue de menor magnitud, siendo el porcentaje de células marcadas de un ~74 % (Figura 12B).

A)



B)

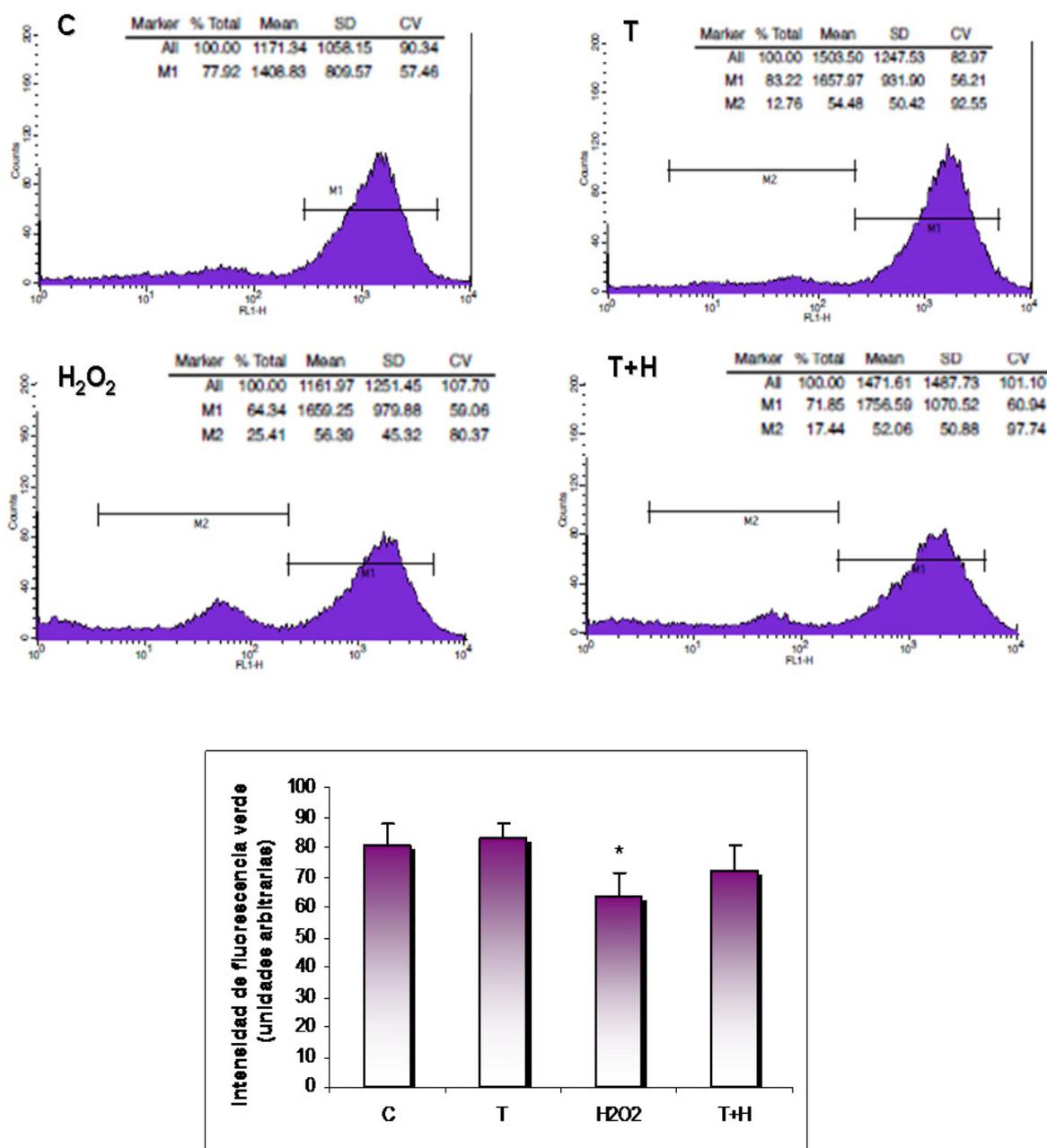


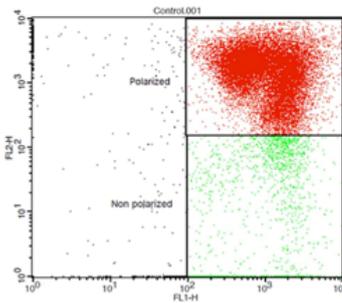
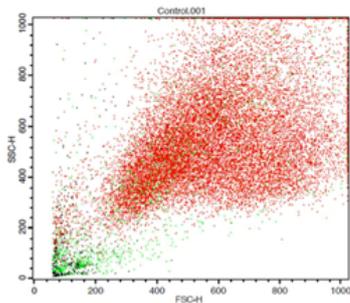
Figura 12: Efecto de la testosterona sobre la apertura de mPTP inducida por H₂O₂, en células C2C12. Las células fueron cargadas con calceína-AM/CoCl₂ y luego tratadas con testosterona 10⁻⁹ M (T) o con el vehículo de la hormona isopropanol 0,001 % (C), con H₂O₂ 1 mM durante 4 hs (H₂O₂) o pretratadas con testosterona 10⁻⁹ M previo a la inducción de apoptosis con H₂O₂ 1 mM por 4 hs (T+H). La apertura del mPTP fue analizada por: A) Microscopía de fluorescencia convencional. Las imágenes mostradas son representativas de cada condición; B) Citometría de flujo. Los valores se expresan como intensidad de fluorescencia respecto al control *p<0,05.

Evaluación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

Mediante la utilización del *kit* comercial JC-1 *Mitochondrial Membrane Potential Detection Kit* se evaluó el grado de daño mitocondrial y los efectos de la testosterona sobre el mismo, durante el estrés oxidativo. Para corroborar los resultados anteriores obtenidos tras la medición de la actividad citocromo c oxidasa, se estudió el estado de la membrana mitocondrial interna, mediante la utilización del colorante fluorescente 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3-3'-tetraetilben-zimidazolilcarbocianina iodado (JC-1). El JC-1 es un colorante catiónico que fluoresce diferencialmente en células sanas y apoptóticas. Cuando las células están sanas, el colorante es capaz de formar agregados dentro de la mitocondria, que fluorescen color rojo. En células apoptóticas, el colorante es incapaz de acumularse y agregarse en esta organela, debido a que el potencial de membrana mitocondrial se encuentra alterado, por lo que permanece en el citosol en su forma monomérica, fluoresciendo color verde. Por este motivo las células apoptóticas, cuyas mitocondrias están despolarizadas, presentan una disminución de fluorescencia roja respecto de la verde [Reers et al. 1995].

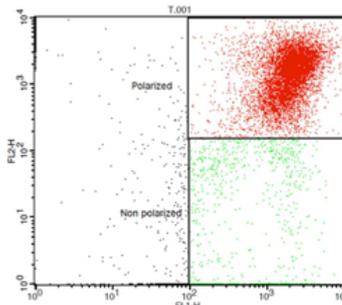
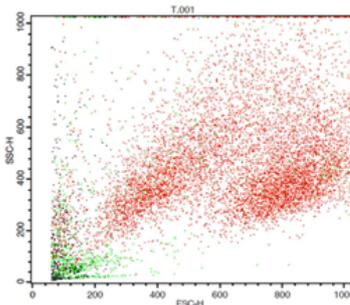
Luego de los distintos tratamientos, se determinó el $\Delta\Psi_m$ de las células C2C12 empleando al JC-1 como marcador. El tratamiento con H_2O_2 redujo significativamente el potencial de membrana mitocondrial. El porcentaje de células que perdieron la polaridad de la membrana mitocondrial aumentó de un 8 % en los cultivos controles (células tratadas con el vehículo de la hormona o con testosterona) a un 66 % en cultivos tratados con H_2O_2 . El tratamiento hormonal previo a la exposición al agente apoptótico, redujo el porcentaje de células despolarizadas a un 25 %. Además, el tratamiento con Flutamida, bloqueó casi completamente el efecto de la testosterona sobre el mantenimiento del $\Delta\Psi_m$, aumentando nuevamente el porcentaje de células despolarizadas a un 53 % (Figura 13). Estos resultados muestran un efecto protector de la testosterona sobre la integridad mitocondrial, y sugieren que la hormona estaría involucrada en la inhibición de la vía intrínseca de la apoptosis en las células C2C12. El hecho de que el antagonista del receptor de andrógenos bloquee el efecto de la testosterona, lleva a pensar en la posible participación del AR en los efectos protectivos de la testosterona a nivel mitocondrial.

C



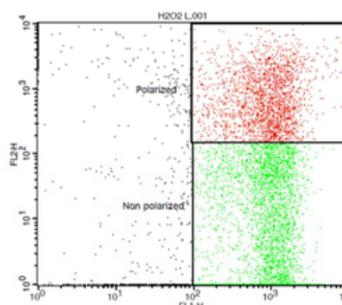
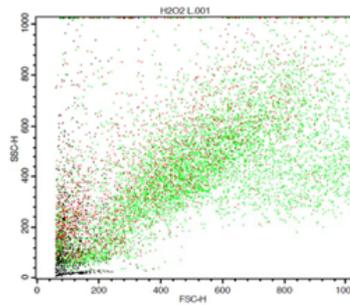
Gate	% Gated	% Total
Polarized	90.44	90.44
Non-polarized	7.42	7.42

T



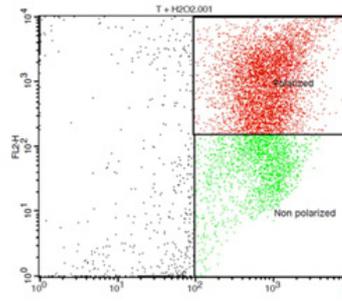
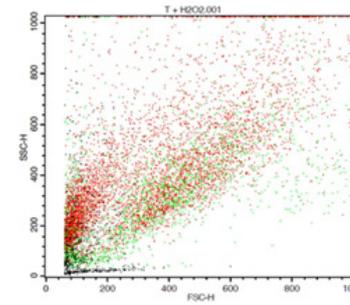
Gate	% Gated	% Total
Polarized	85.47	85.47
Non-polarized	9.18	9.18

H₂O₂



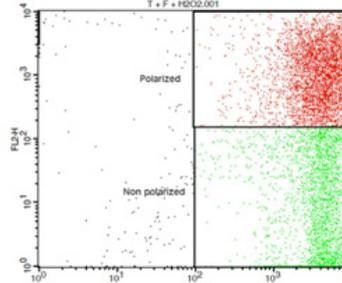
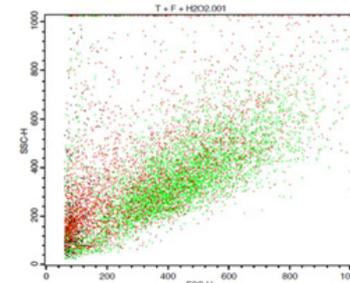
Gate	% Gated	% Total
Polarized	23.83	23.83
Non-polarized	66.35	66.35

T+H



Gate	% Gated	% Total
Polarized	63.92	63.92
Non-polarized	24.55	24.55

T+F+H



Gate	% Gated	% Total
Polarized	42.49	42.49
Non-polarized	53.38	53.38

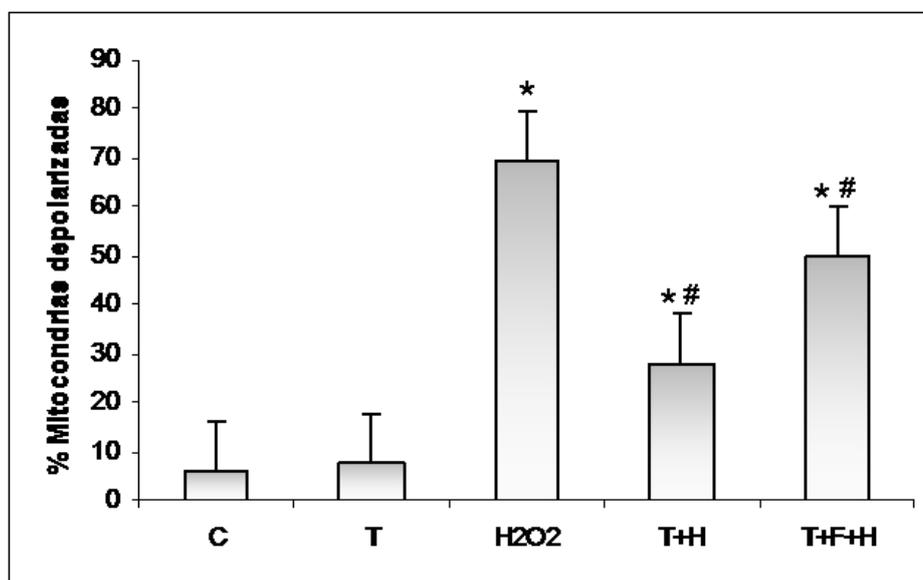


Figura 13: Efecto protector de la testosterona sobre la pérdida del potencial de membrana mitocondrial inducido por el H_2O_2 . (C) Células tratadas con el vehículo de la hormona, isopropanol 0,001 % por 60 min; (T) Células incubadas con testosterona 10^{-9} M durante 60 min; (H_2O_2) Células tratadas con H_2O_2 1 mM durante 4 hs; (T+H) Células incubadas con testosterona 10^{-9} M durante 60 min y luego sometidas a 4 hs de tratamiento con H_2O_2 1 mM; (T+F+H) Células incubadas con testosterona 10^{-9} M y Flutamida 10^{-8} M durante 60 min y luego expuestas a 4 hs de tratamiento con H_2O_2 1 mM. La pérdida del potencial de membrana mitocondrial se determinó por citometría de flujo utilizando el colorante catiónico JC-1 como se describió en *Metodología*. Los valores se expresan como porcentaje de células despolarizadas respecto al control * $p < 0,05$ o respecto al H_2O_2 # $p < 0,05$ con $n=3$.

DISCUSIÓN

Distintas evidencias reportadas demuestran que la testosterona puede ser esencial para la supervivencia celular o bien ser capaz de inducir apoptosis dependiendo del contexto biológico en que se encuentren las células [Morimoto et al. 2005; Nguyen et al. 2005; Estrada et al. 2006; Jin et al. 2006]. En este trabajo, utilizando la línea celular de músculo esquelético murino C2C12, se obtuvieron resultados que indican que la testosterona, en concentraciones fisiológicas, protege al músculo esquelético de la apoptosis inducida por H₂O₂.

Las células C2C12 responden de manera bifásica al agente apoptótico, el cual induce la muerte celular programada en una manera tiempo-dependiente. A tiempos cortos de exposición, el H₂O₂ activa un mecanismo de defensa que involucra la activación de vías asociadas a eventos de supervivencia, mientras que a tiempos largos de tratamiento con H₂O₂, las células inician finalmente el proceso de apoptosis.

El H₂O₂ es capaz de actuar como molécula de señalización en diversos procesos celulares como apoptosis [Singh y Singh 2008; Vasconsuelo et al. 2008], diferenciación [Steinbeck et al. 1998; Orzechowski et al. 2002] y proliferación [Sigaud et al. 2005], de manera dependiente del tiempo. En contraposición con la popular creencia de que el H₂O₂ sólo tiene efectos nocivos para la célula, se ha demostrado que el H₂O₂ es capaz de estimular el crecimiento/proliferación celular y la síntesis de ADN en distintos tipos de células, mostrando así su gran importancia como molécula de señalización [Rao y Berk 1992; Fiorani et al. 1995]. La exposición al H₂O₂ exógena ha sido empleada para la investigación de múltiples vías de señalización relacionadas a la contracción del músculo liso [Jin y Rhoades 1997], a la proliferación celular [Baas y Berk 1995] así como también a la apoptosis [Li et al. 1997].

En este trabajo se demostró que el tratamiento durante períodos de tiempo cortos con H₂O₂ 1 mM provoca la fosforilación de ERK2 en células C2C12 al mismo tiempo que induce la activación/fosforilación de Akt, y en consecuencia, la inactivación/fosforilación de la proteína apoptótica Bad. La quinasa PI3K y su quinasa blanco Akt, regulan una amplia gama de eventos

celulares [Cross et al. 2000; Brazil y Hemmings 2001] que incluyen tanto la supervivencia celular como la apoptosis [O'Groman et al. 2000; Xu et al. 2003; Grutzner et al. 2006]. Dado que Bad puede ser un blanco de Akt [Datta et al. 1997], la fosforilación de Bad en serina 136, por parte de Akt, bloquearía su acción apoptótica (Bad), manteniéndola secuestrada en citosol y alejada de su sitio de acción mitocondrial, por la unión a la proteína 14-3-3, favoreciendo la supervivencia celular [Datta et al. 1997, Del Peso et al. 1997, Yano et al. 1998]. Como la exposición por tiempos cortos al H_2O_2 provoca la activación de la quinasa, se estudió la inactivación de Bad empleando anticuerpos específicos dirigidos contra la porción fosforilada en serina 136 de la proteína, la cual se vio incrementada tras el tratamiento con H_2O_2 . Se demostró así, que la estimulación con H_2O_2 por períodos de tiempo cortos activa vías de señalización mitogénicas para promover la supervivencia celular, como fue reportado también en otros modelos experimentales [Crossthwaite et al. 2002].

Sin embargo, el tratamiento por tiempos largos con H_2O_2 disminuye la fosforilación tanto de Akt como de ERK, al mismo tiempo que provoca la activación de Bad por desfosforilación. Efectos opuestos del H_2O_2 sobre el crecimiento celular, estimulando la proliferación [Guyton et al. 1996; Goldkorn et al. 1998] o bien activando la apoptosis [Li et al. 1997] han sido previamente reportados. El hecho que se desencadene una u otra respuesta, podría depender del tiempo de exposición al H_2O_2 , de la concentración empleada o del tipo celular. Hasta las 2 hs de tratamiento con H_2O_2 las células no mostraron los cambios morfológicos típicos de la apoptosis (condensación nuclear, redistribución/disfunción mitocondrial, pérdida de estabilidad del citoesqueleto y de adhesión celular) mientras que los tratamientos más largos (4 hs), revelaron estos cambios al microscopio en las células tratadas con el agente apoptótico. Es posible entonces, que la estimulación de las vías PI3k/Akt y ERK MAPK tras la exposición a tiempos cortos de H_2O_2 , sea una respuesta temprana frente al estrés oxidativo a fin de evitar el daño celular.

Sin embargo, si las células C2C12 son expuestas a tiempos más largos con H_2O_2 1 mM, inician finalmente el proceso de muerte celular programada por apoptosis. El clivaje selectivo de la proteína nuclear PARP por las caspasas [Lazebnik et al. 1994], es uno de los últimos

acontecimientos típicamente observados durante la apoptosis inducida por diversos estímulos. En este trabajo se mostró por ensayos de *Western blot*, que la exposición de las células C2C12 a H_2O_2 1 mM por 4 hs induce el clivaje de PARP y la testosterona reduce el evento. El efecto de la hormona fue casi completamente suprimido por el antagonista del receptor de andrógenos, Flutamida, sugiriendo que la acción antiapoptótica de la testosterona estaría mediada por el AR. Cuando se analizó la expresión de la proteína Bax, se obtuvieron resultados similares. Bax es un miembro de la familia de proteínas Bcl-2 y juega un papel fundamental en la regulación de la apoptosis. Bax se localiza en el citosol, pero transloca a mitocondria tras un estímulo apoptótico [Hsu et al. 1997, Wolter et al. 1997]. Una vez en mitocondria, induce la liberación de citocromo c ya sea formando poros en la membrana mitocondrial externa por oligomerización, o bien abriendo otros canales de membrana [Shimizu et al. 1999; Saito et al. 2000; Kuwana et al. 2002]. Esta proteína proapoptótica disminuye su expresión luego del tratamiento con testosterona, efecto que es reducido notoriamente por la Flutamida. Además, se demostró que la regulación negativa de Bax por la testosterona es dependiente de la dosis, entre 10^{-6} M y 10^{-11} M, siendo máximo el efecto a una dosis de 10^{-9} M. Al analizar la localización subcelular de Bax, luego de los distintos tratamientos, se observó que la testosterona también reduce la translocación de Bax a mitocondria, inducida por el H_2O_2 . Estos resultados apoyan el concepto de la inhibición de la apoptosis por la testosterona en células musculares.

La mitocondria juega un rol fundamental en la apoptosis. En los últimos años, su participación en la regulación de la apoptosis ha sido muy bien documentada. Las células apoptóticas presentan cambios en la morfología y distribución de sus mitocondrias [Desagher y Martinou 2000]. La pérdida del potencial de membrana mitocondrial y el aumento en su permeabilidad, provocan la liberación de factores proapoptóticos al citosol, que llevan a la activación de una serie de eventos que conducen a la muerte celular programada [Zimmermann et al. 2001], siendo la pérdida del potencial de membrana un indicador temprano de la apoptosis. El potencial de membrana mitocondrial es generado por el gradiente electroquímico que se crea durante el transporte de electrones a través de la membrana mitocondrial. El colapso del potencial de membrana, provoca la filtración del

citocromo c desde la mitocondria, induciendo un aumento significativo de la población de células apoptóticas, luego del estrés oxidativo inducido con H_2O_2 . Esta proteína se encuentra en el espacio intermembrana unida débilmente a la membrana mitocondrial interna. En respuesta a una variedad de estímulos apoptóticos, el citocromo c se libera al citosol [Liu et al. 1996, Reed 1997]. Para que esto suceda es estrictamente necesaria la pérdida de la integridad de la membrana mitocondrial externa [Crompton et al. 1998, Green y Kroemer 2004]. En este trabajo, se evaluó la integridad de la membrana mitocondrial externa mediante la determinación de la actividad de la citocromo c oxidasa, la cual es un útil indicador de liberación mitocondrial del citocromo c. El aumento de la actividad enzimática en la fracción citosólica aislada, implica necesariamente la alteración de la membrana externa mitocondrial que posibilite la salida de la citocromo c oxidasa desde la membrana interna mitocondrial al citosol, por lo que también serán liberados los solutos del espacio intermembrana, como el citocromo c. Se demostró así, que la testosterona bloquea la liberación de este factor apoptótico de la mitocondria inducida por el tratamiento con H_2O_2 . Este resultado, junto con los efectos de la hormona sobre los cambios en la morfología y distribución mitocondrial observados por inmunocitoquímica, sugiere también un rol protector del esteroide en esta organela.

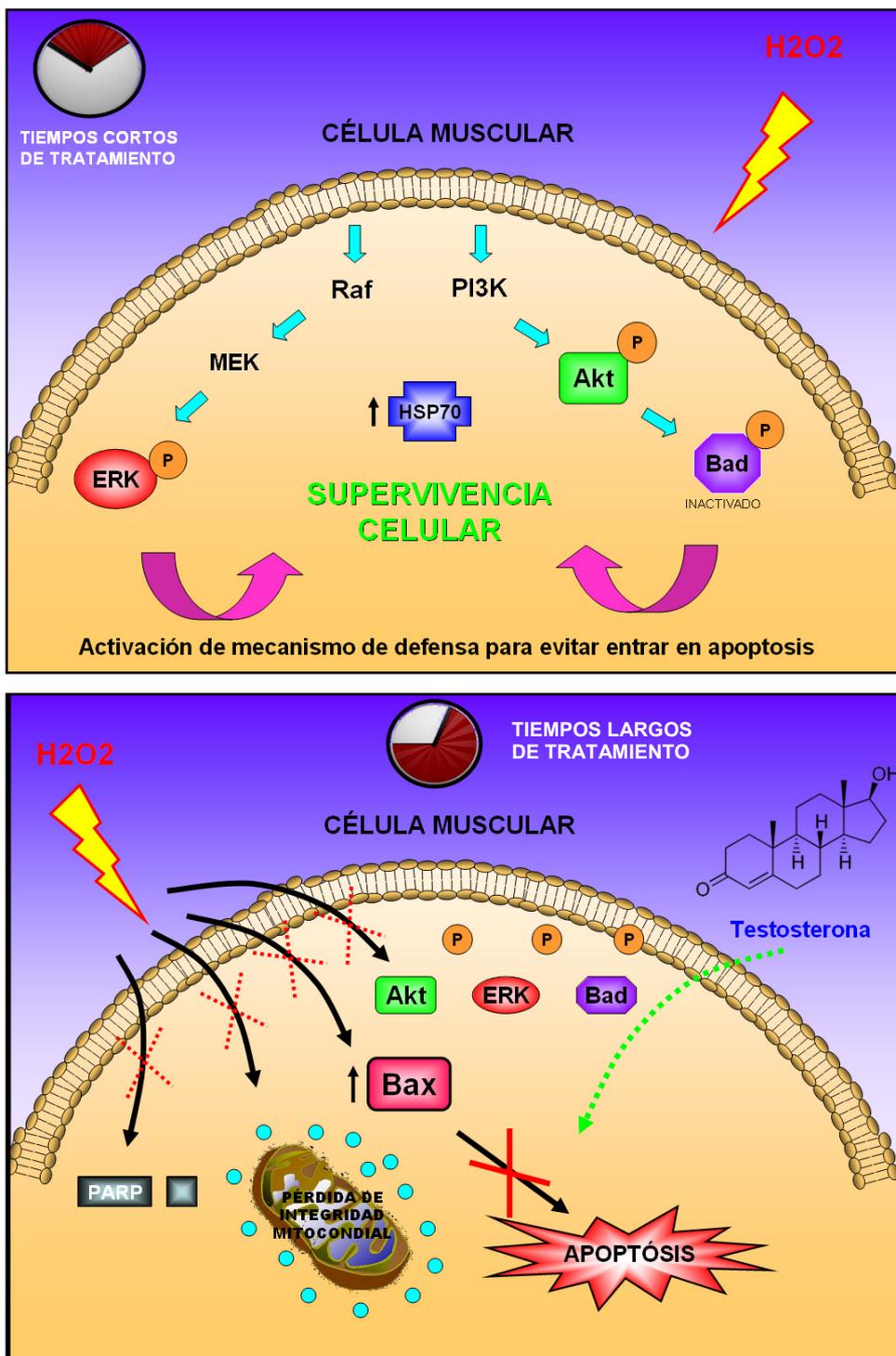
Centrando la atención en la mitocondria como organela clave en la regulación de la apoptosis, se evaluó además, mediante la utilización del método Calceína-AM/ $CoCl_2$, la apertura del mPTP. Se demostró de esta manera, que el tratamiento por tiempos largos con H_2O_2 induce la apertura del poro, lo que provoca la pérdida de la fluorescencia de la calceína como consecuencia de su apagado por el $CoCl_2$ citosólico. La translocación de la proteína apoptótica Bax a mitocondria inducida por el H_2O_2 en las células C2C12 mostrada en este trabajo, es un dato de importancia a tener en cuenta en este proceso. Ha sido reportado por otros investigadores, que Bax es capaz de interaccionar con componentes del mPTP en las mitocondrias de diversos tipos celulares [Marzo et al. 1998; Narita et al. 1998], pudiendo regular de esta forma la apertura del mPTP. En este trabajo se comprobó que el tratamiento con testosterona previo a la inducción de apoptosis, reduce la translocación de Bax a mitocondria así

como también la apertura del mPTP, inducidos por el H_2O_2 . El efecto de la testosterona sobre el cambio de localización subcelular de Bax sería el evento primario para reducir la apertura del mPTP durante la apoptosis.

También se estudió el $\Delta\Psi_m$ de las C2C12 empleando el colorante catiónico JC-1, el cual fluoresce diferencialmente en células sanas respecto de las apoptóticas. En células sanas, el colorante ingresa a la mitocondria, se acumula en ella, y cuando se excede la concentración crítica, forma agregados que fluorescen color rojo. Cuando las mitocondrias pierden el potencial de membrana durante la fase inicial de la apoptosis, el colorante es incapaz de acumularse en la organela, por lo que permanece en el citosol en su forma monomérica fluoresciendo color verde. Entonces, en células apoptóticas hay una disminución de la fluorescencia roja respecto de la verde. Por citometría de flujo se demostró que el tratamiento con H_2O_2 por tiempos largos, provoca la disrupción del potencial de membrana mitocondrial, registrado por la caída de la fluorescencia roja. Sin embargo, la testosterona fue capaz de reducir el efecto del agente apoptótico. Cuando los cultivos celulares se trataron simultáneamente con testosterona, Flutamida y H_2O_2 , el potencial de membrana mitocondrial disminuyó nuevamente, aumentando el porcentaje de células despolarizadas. Estos resultados en su conjunto, sugieren un rol protector de la testosterona sobre la mitocondria, y la posible participación del AR en este evento, a este nivel.

Resumiendo este primer capítulo, los resultados hasta aquí presentados indican que las células C2C12 activan un mecanismo de defensa para evitar entrar en apoptosis cuando se las trata con H_2O_2 por períodos de tiempo cortos. Esta respuesta defensiva ante el estrés oxidativo involucra la fosforilación de ERK2, Akt y Bad, así como también el aumento en la expresión de la HSP70. Sin embargo, la exposición al agente apoptótico por períodos de tiempo más largos, induce la desfosforilación de las proteínas antes mencionadas, el clivaje de PARP, la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y liberación de citocromo c, desencadenando finalmente el proceso de muerte celular por apoptosis. Cuando los cultivos son tratados con testosterona previo a la exposición al H_2O_2 , se observa la inactivación (fosforilación) de la proteína apoptótica Bad, la inhibición del clivaje de PARP y de la fragmentación del ADN, la disminución en los niveles

de Bax y el bloqueo de su translocación a mitocondria, así como también la prevención de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial. Estos resultados sugieren que la testosterona regula la vía intrínseca mitocondrial de la apoptosis. El hecho que el tratamiento simultáneo con testosterona, H₂O₂ y Flutamida reduzca los efectos protectivos de la hormona, es consistente con la participación del AR en los efectos antiapoptóticos de la testosterona.



CAPÍTULO II

"Localización no clásica del receptor de andrógenos"

RESULTADOS

I. Distribución subcelular del receptor de andrógenos

Como primera aproximación para analizar la localización subcelular del AR en la línea C2C12, luego de homogenizar y someter a centrifugación diferencial los cultivos, cantidades equivalentes de proteína de homogenado total y de las distintas fracciones subcelulares fueron analizadas por *Western blot*, empleando anticuerpos específicos contra el AR. Se inmunodetectó no solo la banda clásica de ~110 kDa del AR sino también otras bandas de menor peso molecular. Estas otras bandas corresponderían a variantes de *splicing* alternativo del AR (indicadas con flechas en la Figura 14A, junto al peso molecular estimado) ya que el mismo patrón de bandas se repitió en experimentos independientes, por lo que se desestimó la posibilidad que fueran productos de degradación. También pudo detectarse el AR y sus variantes de *splicing* no solo en núcleo y citosol (localizaciones clásicas), sino también en las fracciones mitocondrial y microsomal.

Para evaluar la funcionalidad de estos ARs con localización no clásica y verificar si verdaderamente eran entidades ligadoras de testosterona, se realizaron ensayos de competición con 10 nM [³H] testosterona y un exceso 1000X de hormona fría en cada fracción subcelular. En el gráfico de la Figura 14B se observa que los sitios de ligado a la hormona se encuentran predominantemente en núcleo. Sin embargo, una proporción considerable de sitios de ligado específico fueron detectados tanto en la fracción mitocondrial como en la microsomal. Estos resultados indican no solo la presencia de entidades inmunorreactivas para el AR con localización no clásica en mitocondrias y microsomas, sino también la capacidad de las mismas de ligar testosterona.

Para descartar la contaminación con núcleos en las distintas fracciones subcelulares, se realizaron ensayos de *Western blot* empleando anticuerpos contra Lamina B como marcador nuclear. La contaminación con mitocondrias de las fracciones nuclear, microsomal y citosólica fue descartada mediante la medición de la expresión de Smac/DIABLO (Figura 14C).

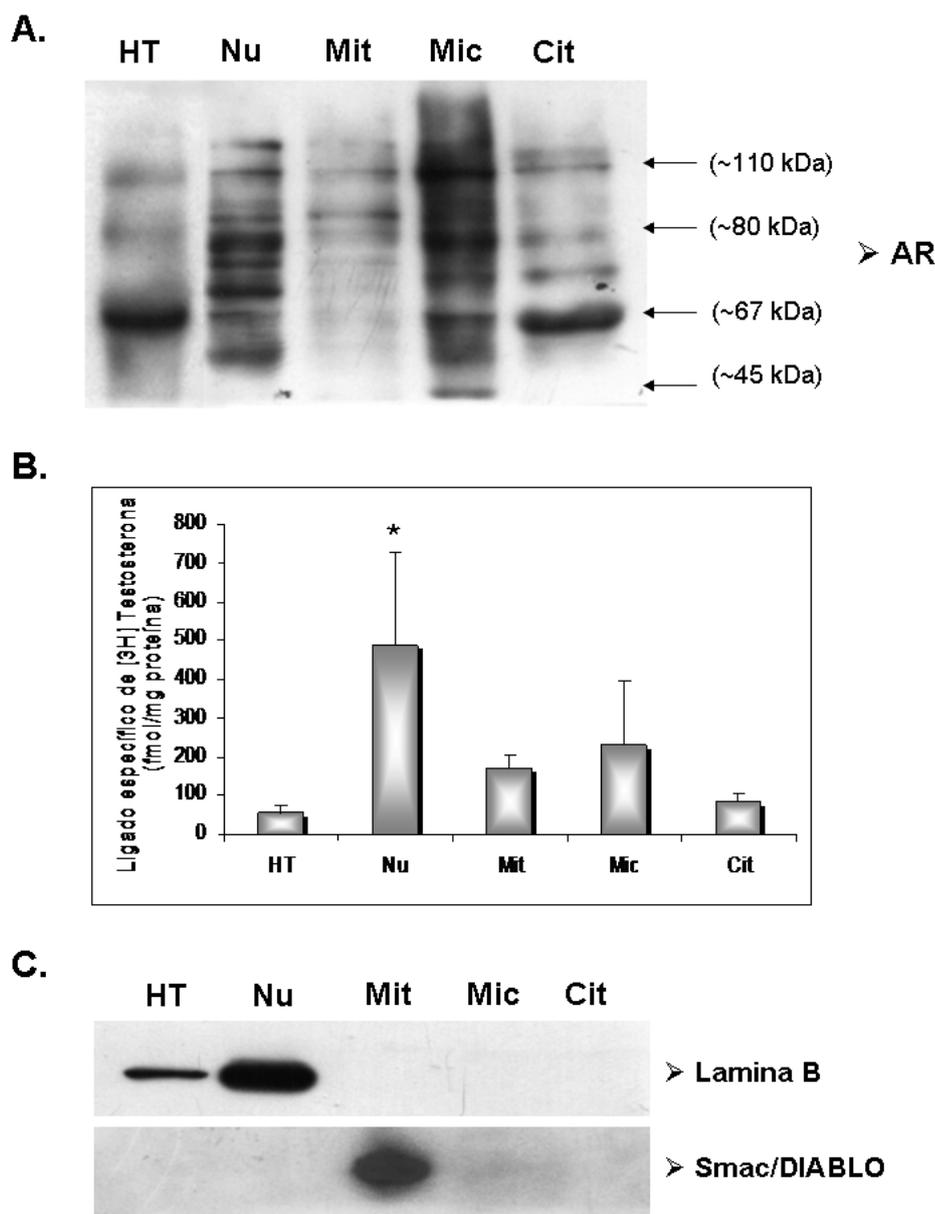


Figura 14: Distribución subcelular de proteínas funcionales e inmunorreactivas para el AR. A) Detección y distribución de AR *wild type* de 110 kDa y de sus variantes de *splicing* de menor peso molecular. Se sembraron cantidades iguales (25 μ g) de homogenado total de C2C12 (HT), fracción nuclear (Nu), fracción mitocondrial (Mit), fracción microsomal (Mic) y citosol (Cit) obtenidas por centrifugación diferencial como se describió en *Metodología*. Las muestras fueron sometidas al análisis por *Western blot* empleando anticuerpos específicos contra el AR. El *blot* es representativo de 3 experimentos distintos con resultados semejantes. B) Capacidad de ligado de [³H] testosterona de las distintas fracciones subcelulares de células C2C12. Iguales cantidades de proteína (200 μ g) de homogenado total (HT), núcleos (Nu), mitocondrias (Mit), microsomas (Mic) y citosol (Cit) fueron incubadas durante 16 hs con 10 nM [³H] testosterona sola o en presencia de un exceso 1000X de testosterona fría. El *binding* específico total se calculó como se describió en *Metodología*. Los resultados se muestran como ligado específico respecto al HT, * $p < 0,05$. C) Control de la pureza de las fracciones subcelulares aisladas. Se sembraron cantidades iguales de proteínas (20 μ g) de homogenado total (HT), fracción nuclear (Nu), fracción mitocondrial (Mit), fracción microsomal (Mic) y citosol (Cit) que fueron analizadas por *Western blot*, empleando anticuerpos específicos contra el marcador nuclear Lamina B y contra el marcador mitocondrial Smac/DIABLO.

II. Localización del receptor de andrógenos en rafts y caveolas

Para evaluar la posibilidad de una partición diferencial del AR dentro de la fracción microsomal en células musculares, se realizó un gradiente de sacarosa, de los homogenados de cultivos C2C12. Esta técnica ha sido empleada para aislar los subdominios de la membrana plasmática, que presentan propiedades o composición química diferentes, como son los *rafts* y caveolas. Éstos representan un subcompartimiento o microdominio dentro de la membrana plasmática, de composición lipídica particularmente rica en Caveolina, abundante en ciertos tipos celulares como fibroblastos, adipositos, células endoteliales, epiteliales y de músculo liso [Lisanti et al. 1994a; 1994b]. Los microdominios se aislaron mediante la centrifugación de un gradiente de sacarosa libre de detergente. Una alícuota de cada fracción del gradiente fue analizada por *Western blot*, empleando anticuerpos específicos contra el AR y Caveolina-1 (Figura 15). Pudo detectarse la presencia del AR mayoritariamente en las fracciones correspondientes a las membranas ligeras (fracciones 3-5). Estas fracciones están compuestas por las caveolas y *rafts*, las cuales pueden identificarse por la presencia de una proteína de 22-24 kDa, la Caveolina-1, que como se mencionó antes, es el principal componente de las caveolas y puede ser utilizada como marcador de estos microdominios (*rafts* y caveolas) [Rothberg et al. 1992]. Estos resultados demuestran que el AR de localización no clásica observado en la fracción microsomal, se encuentra específicamente en las caveolas y *rafts* de la membrana plasmática de las células C2C12.

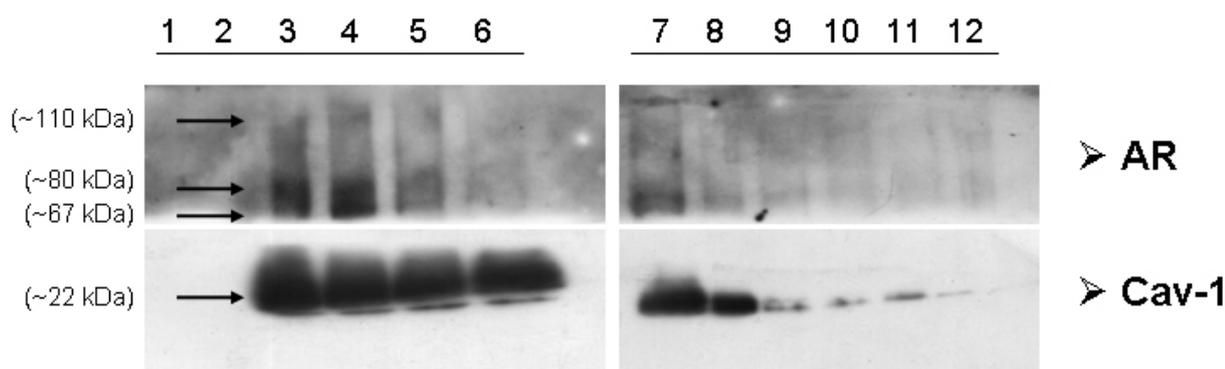


Figura 15: Localización del AR en caveolas y rafts de células C2C12. Los lisados celulares fueron sometidos a la centrifugación en un gradiente de sacarosa. 12 alícuotas de 1 ml fueron colectadas del gradiente y procesadas como se describió en *Metodología*. Cantidades iguales de proteínas (5 μ g) fueron analizadas por *Western blot* utilizando anti-Caveolina-1 y anti-AR. Los *blots* son representativos de tres experimentos distintos con resultados comparables.

III. Detección del receptor de andrógenos con localización no clásica por inmunocitoquímica

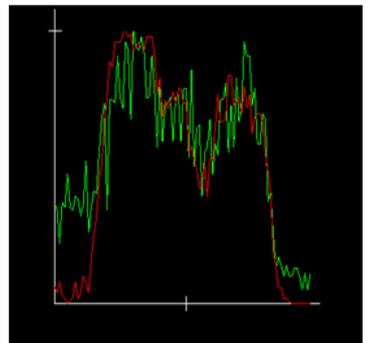
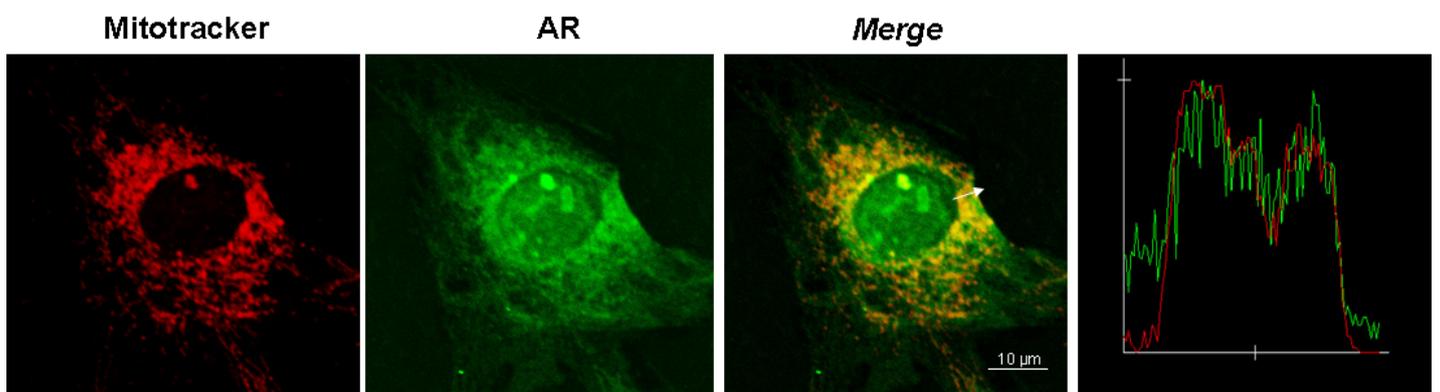
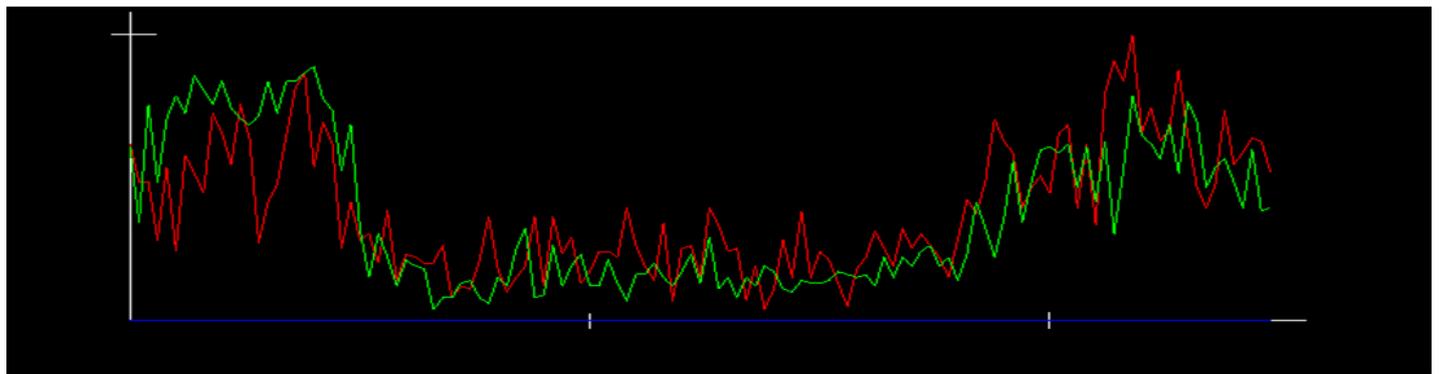
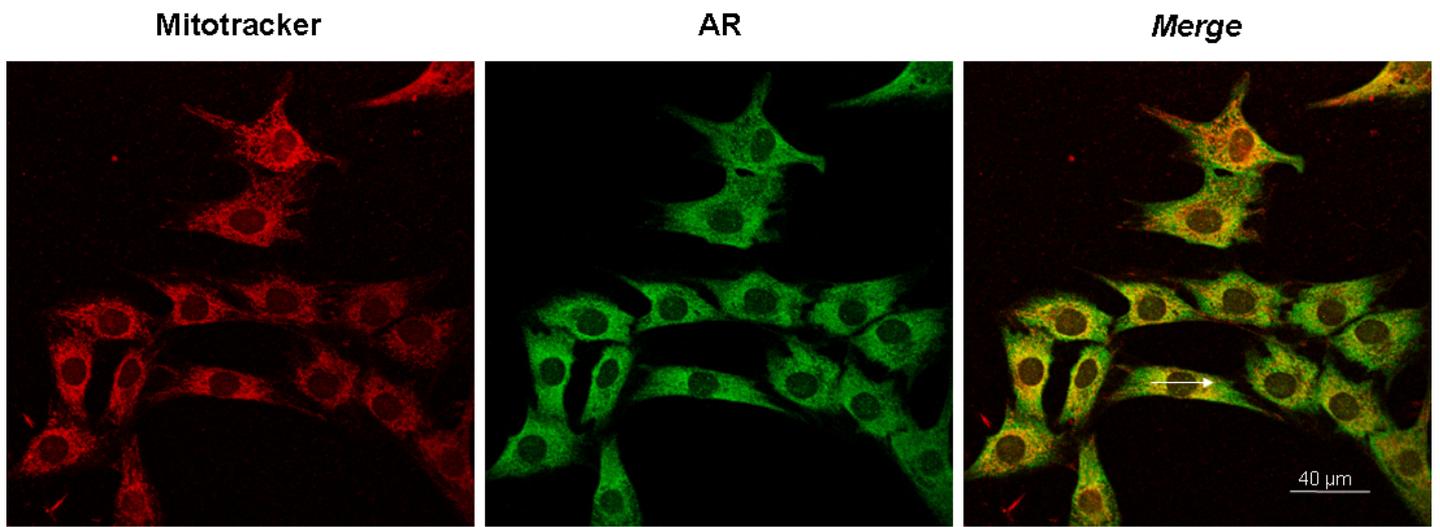
A fin de visualizar la localización no clásica del AR, detectado previamente por *Western blot* en mitocondrias y caveolas, se realizó la inmunodetección del AR por microscopía confocal. Dado que los receptores de hormonas esteroideas, pueden perder su interacción con membranas o núcleos, durante el fraccionamiento subcelular y quedar en la fracción citosólica, el empleo de técnicas inmunocitoquímicas evita este posible error de manipulación.

La localización del receptor en mitocondrias se evidenció empleando un anticuerpo policlonal contra el AR (fluorescencia verde) y el marcador selectivo de mitocondrias *Mitotracker* (fluorescencia roja). Las imágenes obtenidas por microscopía confocal (Figura 16A) revelan la presencia del AR en mitocondrias, la cual queda demostrada por la señal amarilla obtenida a partir de la superposición (*merge*) de las imágenes individuales. Al analizar los perfiles de intensidad de fluorescencia verde y roja a lo largo de la célula (flecha blanca en el *merge*), pudo observarse la coincidencia de ambos

perfiles de fluorescencia en una gran cantidad de puntos a lo largo del gráfico, lo que concuerda con la señal amarilla observada en el *merge*.

Resultados similares se obtuvieron cuando se emplearon anticuerpos específicos contra el AR (fluorescencia verde) y Caveolina-1 (fluorescencia roja) para marcar las células C2C12 previamente fijadas en metanol, a fin de visualizar el AR en membrana plasmática (Figura 16B). Aunque la señal amarilla obtenida luego de la superposición de las imágenes, fue mucho menos intensa y difícil de visualizar que la obtenida para el AR mitocondrial, los perfiles de intensidad de fluorescencia mostraron la coincidencia de las señales roja y verde en algunos puntos del gráfico (indicados con flechas sobre el gráfico del intensidad de fluorescencia). Si bien los perfiles de intensidad no se corresponden exactamente el uno con el otro, y en algunos casos oscilan en contrafase, se detectaron sitios en los cuales las fluorescencias coinciden. La dificultad para poder ver la señal amarilla en la membrana plasmática, se debe probablemente a la enorme cantidad de Caveolina-1 en membrana respecto al AR. Esto provoca que la señal verde del AR sea mucho más débil que la roja (Caveolina-1), por lo que al superponer las imágenes no logra verse el color amarillo, prevaleciendo el color rojo.

A)



B)

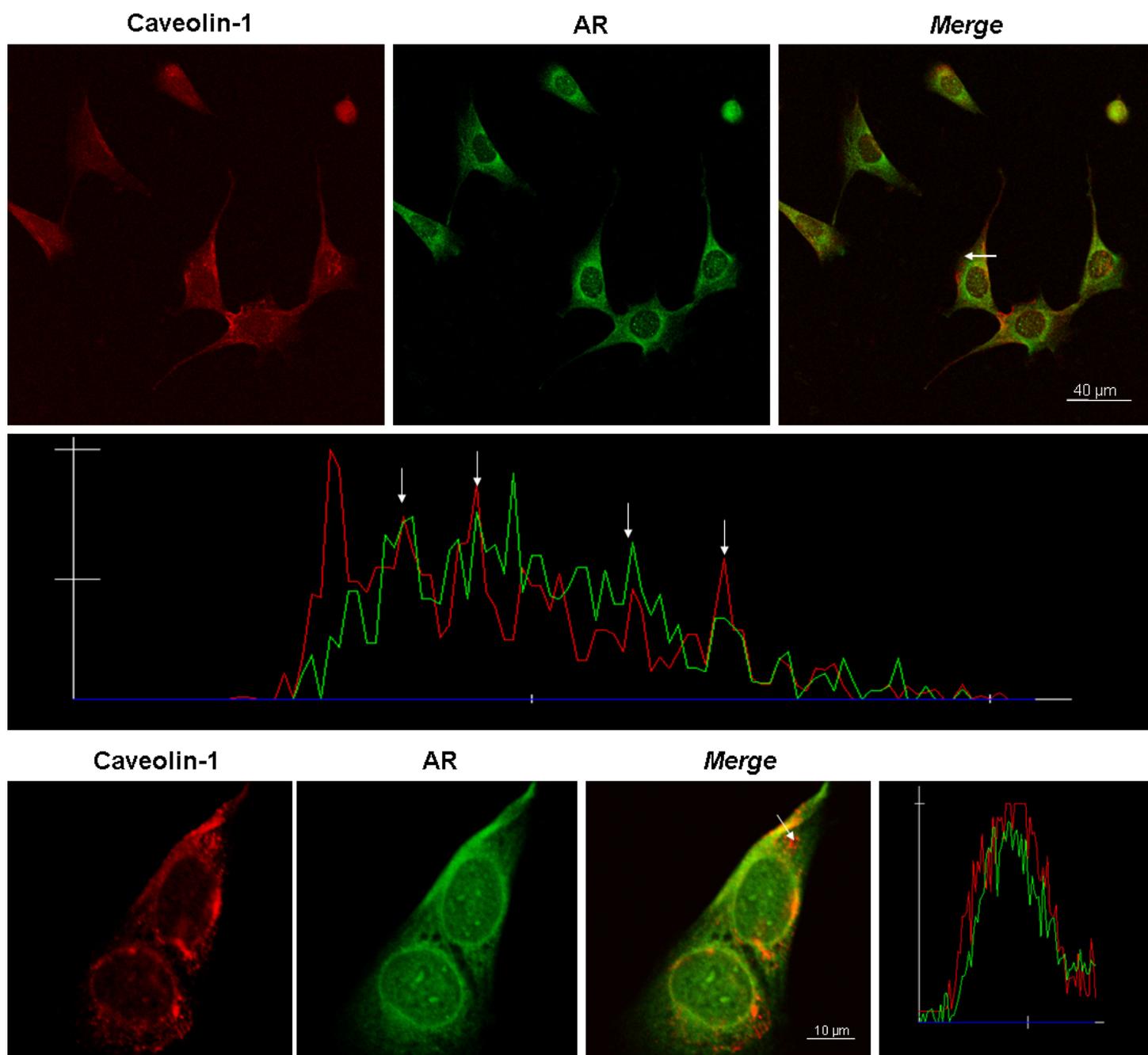


Figura 16: Detección inmunofluorescente del AR en mitocondrias y membrana plasmática en C2C12. A) Panel superior: Las células C2C12 fueron teñidas con el colorante mitocondrial *Mitotracker* (fluorescencia roja), con un anticuerpo específico contra el AR (fluorescencia verde) y analizadas por microscopía confocal. Los perfiles de intensidad de fluorescencia roja y verde fueron monitoreados a lo largo de la célula (flecha blanca en el *merge*). Se analizaron al menos diez campos por condición. Amplificación: 63X. Panel inferior: Imagen ampliada de una célula C2C12 teñida con *Mitotracker* y anti-AR como se mencionó anteriormente. B) Panel superior: Las células C2C12 fueron doblemente marcadas con anti-AR (fluorescencia verde) y anti-Caveolina-1 (fluorescencia roja) como se describió en *Metodología*. Al menos diez campos por condición fueron analizados. Amplificación: 63X. Panel inferior: Imagen ampliada de dos células C2C12 marcadas con anti-AR y anti-Caveolina-1 como se mencionó anteriormente. Se muestran también los perfiles de intensidad de fluorescencia roja y verde a lo largo de la flecha blanca en el *merge* de las imágenes.

IV. Efecto de la testosterona sobre la localización subcelular de la HSP90

Como se ha mencionado anteriormente, los receptores esteroideos no se encuentran en forma aislada en el citosol, sino formando heterocomplejos de alto peso molecular con chaperonas y co-chaperonas, que posibilitan su correcto funcionamiento. La HSP90, es la más abundante de las proteínas de choque térmico, contribuyendo a la estabilidad, el correcto plegamiento y la translocación de los receptores hacia y desde el núcleo [Echeverría y Picard 2010; Galigniana et al. 2010; Heinlein y Chang 2001].

Luego de los distintos tratamientos, se observó que la testosterona provoca un aumento de los niveles de la HSP90 en la fracción mitocondrial, al mismo tiempo que parece disminuir su nivel en la fracción citosólica. Coincidentemente con la localización no clásica del AR en mitocondrias observada anteriormente, la HSP90 podría regular la translocación a esta organela y contribuir a la estabilización del receptor, quién mediaría los efectos de la testosterona a este nivel.

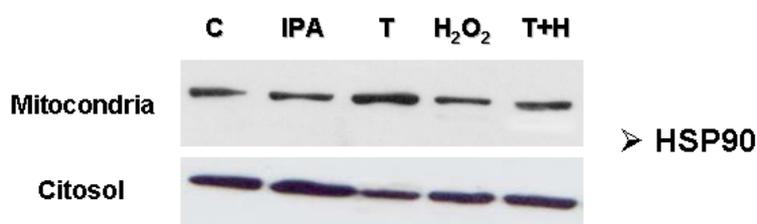


Figura 17: Translocación de la HSP90 a mitocondria inducida por la testosterona. Por técnicas de *Western blot* se evaluó la presencia de la HSP90 en la fracción mitocondrial y citosólica, luego de los distintos tratamientos.

V. Caracterización del AR mitocondrial y de membrana mediante ensayos de ligado de [³H] testosterona

Con el propósito de caracterizar las entidades ligadoras de testosterona detectadas en mitocondrias y membrana plasmática, se realizaron ensayos de *binding* a saturación en las fracciones mitocondrial y microsomal, empleando distintas concentraciones de [³H] testosterona. La

Figura 18A (panel superior) muestra que el ligado específico de testosterona en la fracción mitocondrial es un proceso saturable respecto a la concentración de ligando empleada, la cual varía de 2 a 80 nM. Los datos analizados por el método de *Scatchard*, muestran un único sitio de ligado para la hormona ($K_d = 64,43$ nM), con una capacidad de ligado máxima (B_{max}) de 1052 fmol/mg proteína (Figura 18A panel inferior). El ensayo sobre la fracción microsomal también mostró ser un proceso saturable, con un único sitio de ligado para la testosterona ($K_d = 143,3$ nM y B_{max} 2496 fmol/mg proteína) (Figura 18B).

En paralelo se realizaron ensayos de competición en homogenado total para evaluar la especificidad de los sitios de ligado. Se empleó una concentración constante de [3 H] testosterona como ligando y concentraciones crecientes (10^{-12} M – 10^{-6} M) de testosterona fría, DHT, 17β -estradiol o progesterona como competidores. La Figura 19 muestra el desplazamiento de la testosterona radiomarcada por la testosterona y DHT, mientras que el 17β -estradiol y la progesterona fueron incapaces de desplazar la [3 H] testosterona, demostrándose así la selectividad de los sitios ligadores de andrógenos en C2C12.

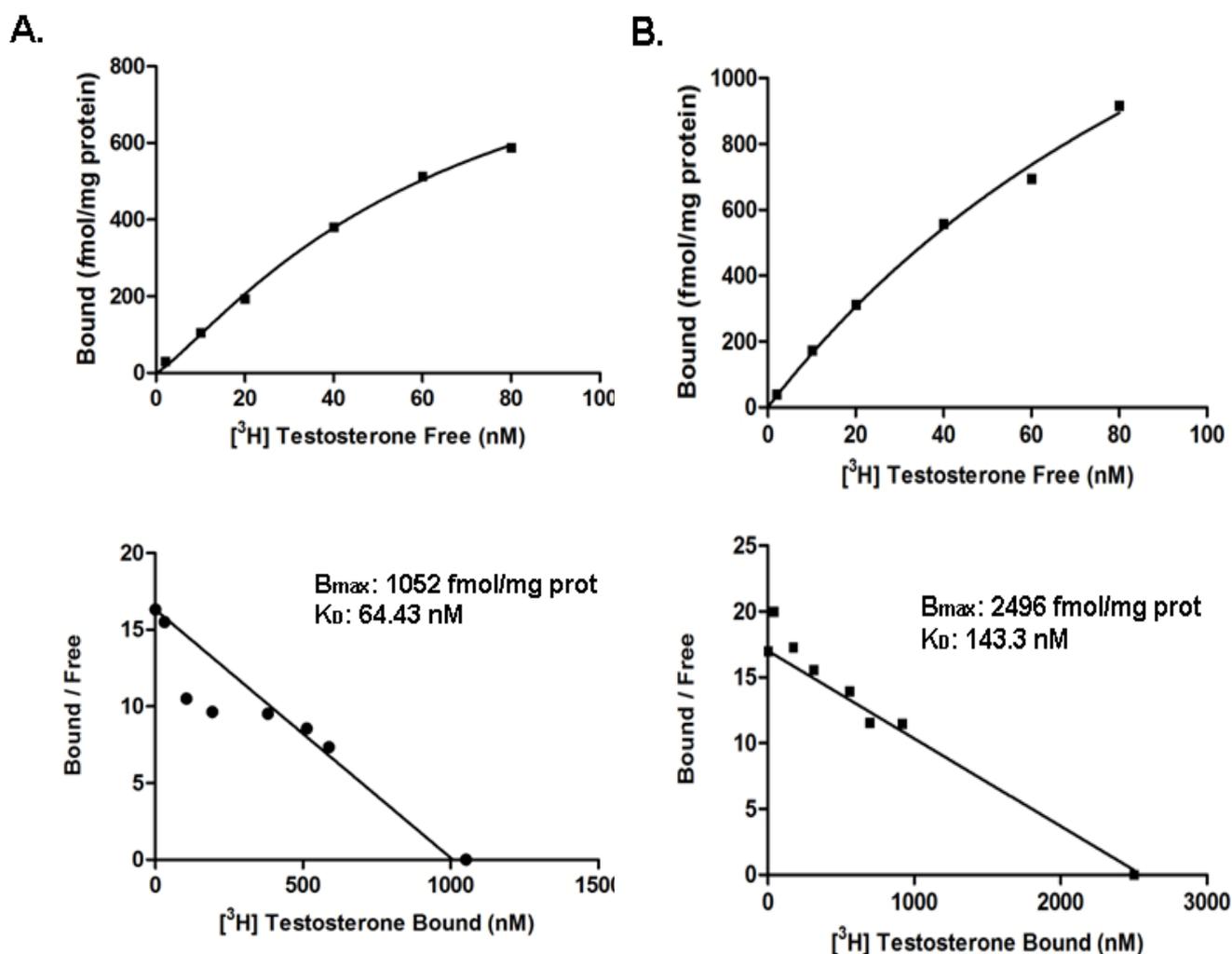


Figura 18: Ensayos de saturación con $[^3\text{H}]$ testosterona en la fracción mitocondrial y microsomal de las células musculares C2C12. A) Ensayos de saturación en la fracción mitocondrial. Panel superior: 140 μg de proteínas mitocondriales fueron incubadas a 4 $^{\circ}\text{C}$ durante la noche, con distintas concentraciones de $[^3\text{H}]$ testosterona que variaban entre 2 y 80 nM. Panel inferior: Determinación de los valores de K_D y B_{max} a partir de la curva de *Scatchard* obtenida a partir del ensayo de saturación. B) Ensayos de saturación en la fracción microsomal. Panel superior: 140 μg de proteínas microsomales fueron incubadas a 4 $^{\circ}\text{C}$ durante la noche, con distintas concentraciones de $[^3\text{H}]$ testosterona que variaban entre 2 y 80 nM. Panel inferior: Determinación de los valores de K_D y B_{max} a partir de la curva de *Scatchard* obtenida a partir del ensayo de saturación.

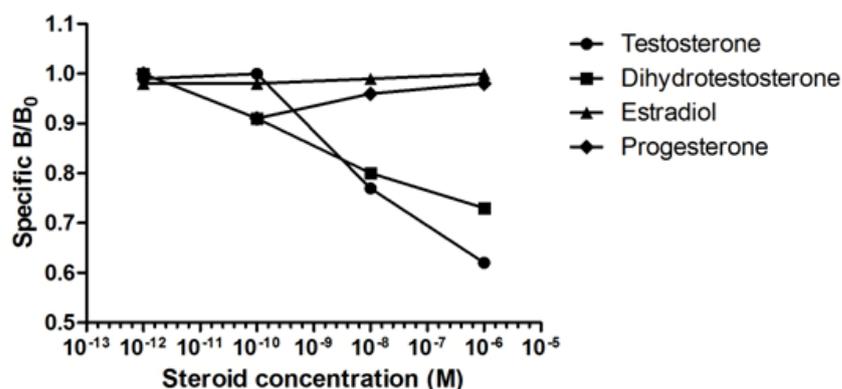


Figura 19: Ensayos de especificidad para los sitios de ligado a andrógenos en células C2C12. Los homogenados totales (120 µg) fueron incubados con [³H] testosterona 10 nM sola (ligado total, B₀) o en presencia de distintas concentraciones de esteroides no marcados (B: testosterona, DHT, 17β-estradiol, progesterona) que variaban de 10⁻¹² a 10⁻⁶ M. El ligado específico total se calculó como se describió en *Metodología* y estos valores se graficaron en función de la concentración de competidor empleada.

VI. Interacción del AR y Caveolina-1 en la fracción microsomal

Para evaluar si el AR detectado previamente en caveolas y *rafts* interacciona físicamente con el componente mayoritario de las caveolas, la Caveolina-1, se realizaron ensayos de coimmunoprecipitación utilizando un anticuerpo específico contra el AR, y la fracción microsomal de las células C2C12 tratadas con testosterona (10⁻⁹ M, 60 min) o con el vehículo de la hormona (isopropanol 0,001 % 60 min) como control. Los inmunoprecipitados fueron analizados por *Western blot* empleando un anticuerpo anti-Caveolina-1. Como puede verse en la Figura 20, el anti-AR inmunoprecipitó AR asociado a Caveolina-1, demostrando una interacción física entre ambas proteínas. Cuando las células fueron tratadas con testosterona 10⁻⁹ M durante 60 min, esta interacción disminuyó significativamente. La reacción de inmunoprecipitación inversa (inmunoprecipitación con anti-Caveolina-1 y revelado con anti-AR) también fue realizada, sin embargo, debido a la gran cantidad de Caveolina-1

inmunoprecipitada con el anticuerpo específico, las diferencias entre las condiciones control y tratado no pudieron visualizarse por *Western blot*.

Dado que los datos presentados anteriormente sugieren el rol activo del AR en la acción protectora de la testosterona frente a la apoptosis, estos resultados permiten hipotetizar la participación de un AR de membrana (mAR), el cual sería disociado por la hormona, luego de su activación, de la Caveolina-1 para translocar entonces a algún otro compartimiento subcelular para ejercer su acción protectora.

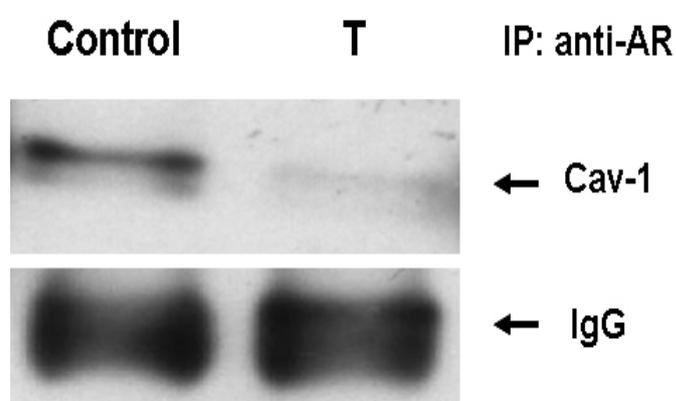


Figura 20: Interacción del AR y Caveolina-1 en células C2C12. La fracción microsomal (60 μg) obtenida a partir de cultivos tratados con el vehículo isopropanol 0,001 % (C) o con testosterona 10^{-9} M (T) por 60 min, fue inmunoprecipitada con un anticuerpo específico contra el AR y luego analizada por ensayos de *Western blot* empleando un anti-Caveolina-1. Se muestran también los niveles de IgG. El *blot* es representativo de tres experimentos independientes.

VII. La testosterona induce la translocación del mAR

La translocación clásica del AR ha sido ampliamente reportada. El receptor se localiza en su forma inactiva en el citosol, en forma de complejo multiproteico junto con proteínas de choque térmico (chaperonas) e inmunofilinas de alto peso molecular. Al ser activado por la hormona, el receptor se disocia del complejo multiproteico y transloca al núcleo donde ejerce su función como factor de transcripción [Gobinet et al. 2002]. Sin embargo, existe mucha menos información acerca de la localización no clásica del AR.

Dado que en este trabajo se ha demostrado que la localización del AR en *rafts* y caveolas implica la interacción física del receptor con Caveolina-1 y que dicha asociación se pierde luego del tratamiento con testosterona, se estudió la localización del AR en las distintas fracciones subcelulares luego del tratamiento hormonal, para determinar la localización del receptor cuando pierde su interacción con Caveolina-1. Cuando las células son tratadas con testosterona 10^{-9} M, se observa la disminución de los niveles de las bandas de ~ 110 kDa y ~ 80 kDa del AR en la fracción microsomal respecto a las células sin tratar (Figuras 21 A y B). En concordancia con los resultados obtenidos en los ensayos de inmunoprecipitación, estos mARs perderían la interacción con Caveolina-1, abandonando las caveolas y dirigiéndose a otro compartimiento subcelular, probablemente al núcleo. Como puede verse en la Figura 21 C, las variantes de *splicing* de ~ 80 kDa y ~ 45 kDa inmunorreactivas para el AR que disminuyen sus niveles en la fracción microsomal luego del tratamiento con testosterona, son las mismas que aumentan su expresión en la fracción nuclear, de manera significativa. Esto lleva a pensar que la activación de estos mARs por la testosterona, podría provocar la disociación de la Caveolina y la translocación del receptor al núcleo, para regular los efectos antiapoptóticos de la testosterona, probablemente mediante la regulación de la expresión génica. Sin embargo, la variante de ~ 110 kDa, si bien disminuye su expresión significativamente en microsomas luego del tratamiento hormonal, no se observa un aumento significativo en la fracción nuclear, por lo que no es posible asegurar que esté dirigiéndose al núcleo cuando abandona la fracción microsomal. Por el mismo motivo, el resto de las variantes no fueron analizadas ya que los cambios en su localización no fueron significativos.

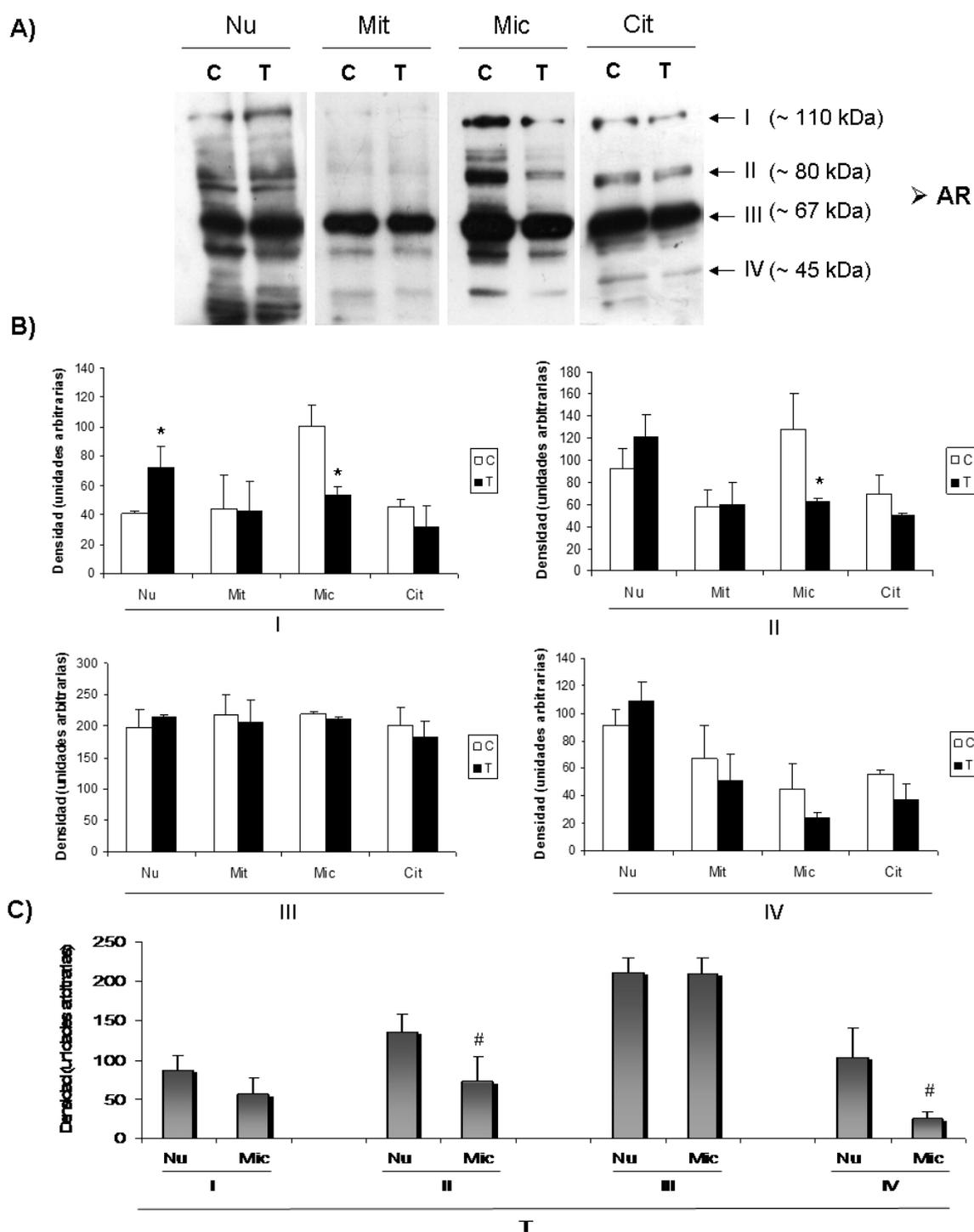


Figura 21: Distribución subcelular del AR luego del tratamiento con testosterona en células C2C12. A) Los cultivos celulares fueron incubados con isopropanol 0,001 % o con testosterona 10^{-9} M durante 60 min, y luego se aislaron las distintas fracciones subcelulares. Igual cantidad de proteínas provenientes de las fracciones nuclear (Nu), mitocondrial (Mit), microsomal (Mic) y citosólica (Cit) fueron analizadas por *Western blot* utilizando un anticuerpo específico contra el AR. El *blot* es representativo de tres experimentos independientes, con resultados comparables. B) Cuantificación densitométrica del AR *wild type* (I) y sus variantes de *splicing* (II, III, IV) en las distintas fracciones subcelulares. Los resultados se expresan como porcentajes de señal respecto a las células sin tratamiento hormonal (C), * $p < 0,05$. C) Cuantificación densitométrica del AR *wild type* (I) y sus variantes de *splicing* (II, III, IV) en núcleos y microsomas, luego del tratamiento con testosterona. Los resultados se expresan como porcentajes de señal respecto a la misma banda correspondiente, en la fracción nuclear, # $p < 0,05$.

DISCUSIÓN

Varios estudios realizados *in vitro* e *in vivo* demuestran que las vías de señalización activadas por los andrógenos y su receptor, son necesarias para el desarrollo del músculo esquelético y para el mantenimiento de la masa muscular, la fuerza y la síntesis proteica [Herbst y Bhasin 2004]. Los resultados presentados en este trabajo, han mostrado que la testosterona protege las células de músculo esquelético C2C12 frente a la apoptosis, a través de un mecanismo que involucra intermediarios de la vía intrínseca de la apoptosis y el AR. La mitocondria desempeña un importante papel en la apoptosis inducida por muchos estímulos. De relevancia para este trabajo, ha sido demostrada la presencia de receptores de hormonas esteroides en esta organela en una gran variedad de células [Monje y Boland 2001; Cammarata et al. 2004; Chen et al. 2004; Yang et al. 2004; Solakidi et al. 2005; Milanesi et al. 2008, 2009]. A su vez, existen líneas de evidencia recientes que apoyan la existencia de un AR de membrana involucrado en la activación rápida de señales no genómicas [Papadopoulou et al. 2009].

En vista de estas evidencias, se intentó determinar en este trabajo, si el AR que participa en el efecto protector de la testosterona frente a la apoptosis en las células C2C12, podría mediar la función antiapoptótica desde diferentes compartimientos subcelulares, involucrando tanto la vía intrínseca de la apoptosis, como las respuestas mediadas por proteínas de membrana y acciones genómicas. En una primera aproximación para abordar esta idea, se evaluó la distribución subcelular del AR en las células C2C12. Los ensayos de *Western blot* a las distintas fracciones subcelulares, permitieron la inmunodetección de una banda de ~110 kDa, probablemente correspondiente al AR clásico, en el homogenado total y en las distintas fracciones, incluyendo mitocondrias y microsomas. El AR es predominantemente un receptor nuclear. Sin embargo, cada vez más evidencias apuntan a la presencia de entidades estructural y funcionalmente similares al AR de localización extranuclear. Curiosamente, en este trabajo, se detectaron bandas inmunorreactivas adicionales de menor peso molecular que el AR clásico, en todas las fracciones subcelulares analizadas. Estas proteínas inmunorreactivas podrían ser variantes de *splicing*

alternativo del AR, como se ha reportado en otros estudios [Solakidi et al. 2005; Guo y Qiu 2011]. El principal producto de la transcripción del gen del AR, denominado como variante de transcripción I (GI: 21322251, *Genbank*), codifica una proteína de ~110 kDa (GI: 21322252, *Genbank*) conocida como AR "wild type". Además de esta clásica proteína de 110 kDa, en humano han sido reportadas otras de menor peso molecular, identificadas como productos del *splicing* alternativo del AR (GI: 270358642, GI: 224181614, GI: 58535455, entre otras) [Guo y Qiu, 2011]. Por el momento, sólo han sido caracterizadas las variantes humanas (las secuencias se encuentran disponibles en el *Genbank*), sin embargo los trabajos de Watson y colaboradores describen en sistemas murinos dos proteínas de ~60 y ~80 kDa [Watson et al. 2010] que podrían ser el producto del *splicing* del AR clásico.

En este trabajo se detectó no solo la banda de ~110 kDa, sino también bandas de menor peso molecular, la cuales fueron consideradas productos de *splicing* del AR. Si bien no se dispone de anticuerpos específicos que puedan confirmar que se trate realmente de variantes del receptor, en cada experimento realizado empleando un anticuerpo dirigido contra el extremo C-terminal del AR, se observó el mismo patrón de bandas. Esto último descartó la posibilidad de que fueran productos de degradación del AR.

Las bandas detectadas en las células C2C12, podrían o no ser análogas a las reportadas en el *Genbank* para el humano (GI: 270358642, GI: 224181614, GI: 58535455), ya que pueden presentarse variantes distintas en distintos tipos celulares dentro de una misma especie, y más aún entre especies diferentes. Esto ha sido demostrado y bien caracterizado en los receptores de estrógenos, principalmente la isoforma alfa [Herynk y Fuqua 2004].

Respecto a la capacidad de ligar la hormona (y mediar un efecto por unión a ésta) de las bandas de menor peso molecular detectadas en C2C12, la inmunodetección se realizó empleando un anticuerpo dirigido contra los últimos 20 aminoácidos del extremo C-terminal, esto último no permite asegurar la presencia del LBD completo o del mínimo dominio necesario para unir al esteroide. Sin embargo, los cambios en la localización subcelular observados, luego del tratamiento con la hormona, en algunas de

las bandas inmunodetectadas, podrían indicar la capacidad de respuesta al esteroide por parte de esas proteínas.

Los resultados aquí presentados no solo demuestran la presencia de proteínas inmunorreactivas para el AR con localización no clásica, sino también la capacidad de las mismas de ligar andrógenos. La identificación y caracterización de estas entidades ligadoras de andrógenos detectadas en homogenado total y en las fracciones subcelulares de las células C2C12, se realizaron mediante ensayos de competición, con [³H] testosterona como radioligando y hormona fría. Los estudios revelaron la presencia de ligado específico en las diferentes fracciones subcelulares, predominantemente en la fracción nuclear (*p<0,05 respecto al homogenado total).

Además se demostró que el ligado específico detectado en las fracciones mitocondriales y microsomales de las células C2C12 es un proceso saturable respecto a la concentración de ligando. La linealización de los datos obtenidos, por el método de *Scatchard* mostró un único sitio de ligado a la hormona en cada fracción. Los ensayos de *Western blot* sobre las fracciones subcelulares, empleando anti-Lamina B como marcador nuclear y anti-Smac/DIABLO como marcador mitocondrial, descartaron la posibilidad de contaminación cruzada entre las distintas fracciones subcelulares.

La detección de sitios de ligado al AR no sólo en citosol y núcleo, sino también en el resto de las fracciones particuladas aisladas, concuerda con trabajos previamente reportados en los que se hallaron cantidades apreciables de ARs en las fracciones mitocondrial y microsomal de distintos tipos celulares [Benten et al. 1999; Kampa et al. 2002; Hatzoglou et al. 2005; Solakidi et al. 2005; Gatson et al. 2006; Kallergi et al. 2007; Wang et al. 2008; Papadopoulou et al. 2008, 2009; Gu et al. 2009].

Los estudios de desplazamiento realizados con distintas hormonas esteroideas (testosterona, DHT, 17β-estradiol y progesterona), confirmaron la especificidad de los sitios de ligado del AR. Las entidades ligadoras de andrógenos detectadas en homogenados totales de C2C12, mostraron afinidad y especificidad por los competidores androgénicos, demostrado por el desplazamiento de la testosterona radiomarcada por la testosterona fría y la DHT, pero no así por el estradiol y la progesterona.

La presencia de proteínas inmunorreactivas para el AR en mitocondrias y microsomas, fue confirmada por inmunocitoquímica y

microscopía confocal mediante la tinción de las células con *MitoTracker* rojo y un anticuerpo anti-AR, o con anti-AR y anti-Caveolina-1, respectivamente. Si bien el AR en membrana plasmática fue más difícil de visualizar en el *merge* de las imágenes individuales, probablemente debido a la enorme cantidad de caveolina-1 respecto al AR en membrana, el perfil de intensidad de fluorescencias mostró algunos puntos de colocalización del AR con la proteína integral de membrana plasmática, caveolina-1.

Además, el aislamiento de microdominios mediante el empleo de un gradiente de sacarosa, mostró la presencia del AR en los fragmentos de membranas de baja densidad, correspondientes a *rafts* y caveolas. La caveola representa un subcompartimiento de la membrana plasmática que ha sido implicada en diversas vías de señalización, incluyendo vías de transducción acopladas a proteína G [Sargiacomo et al. 1993, Chang et al. 1994; Lisanti et al. 1994a, 1994b; Shenoy-Scaria et al. 1994; Robbins et al. 1995; Schnitzer et al. 1995]. La caveolina es una proteína integral de membrana y el componente principal de las caveolas. En estado basal, más del 90 % de la caveolina se encuentra morfológica y bioquímicamente localizada dentro de las caveolas de la membrana plasmática [Rothberg et al. 1992; Dupree et al. 1993; Smart et al. 1994]. En este trabajo también se demostró que la localización no clásica del AR en caveolas implica la interacción física del receptor con caveolina-1. Sin embargo, como se muestra en los análisis por *Western blot* de los inmunoprecipitados microsomales, esta asociación se pierde luego del tratamiento con testosterona. Se observó además, que algunas de las variantes de *splicing* alternativo del AR, disminuían su expresión luego de la exposición a la hormona en la fracción microsomal, al mismo tiempo que parecían aumentar en núcleo. La testosterona entonces, podría activar el AR de membrana induciendo su translocación a otros compartimentos subcelulares, como por ejemplo al núcleo, desde donde regularía los efectos antiapoptóticos de la hormona.

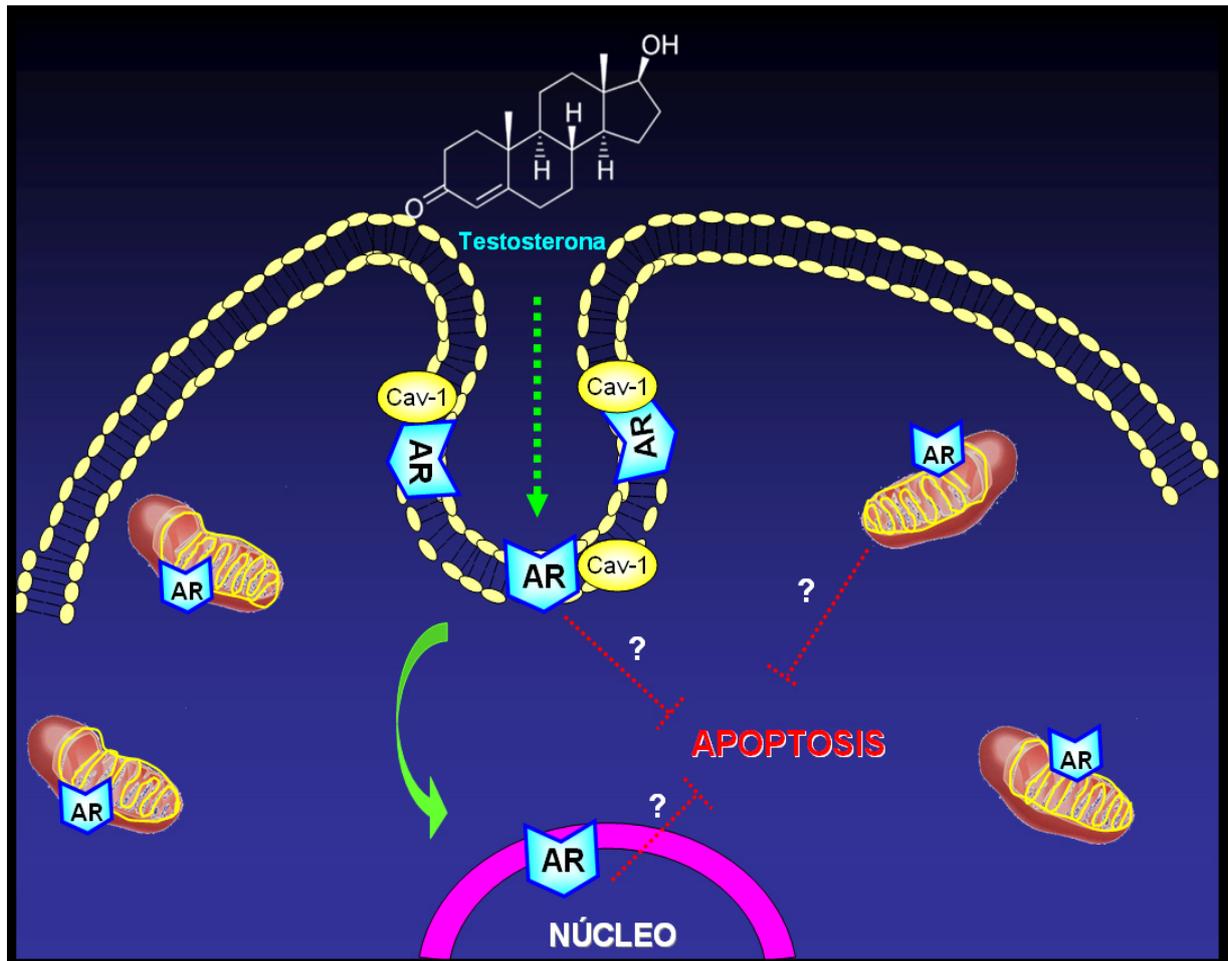
En conjunto, los resultados aquí presentados permiten proponer la presencia de ARs extranucleares en la línea celular de músculo esquelético murino C2C12. La similitud bioquímica e inmunológica de las entidades reactivas detectadas en mitocondrias y membrana, con el AR, fortalecen la

idea general de la existencia de una subpoblación de AR con localización no clásica.

En cuanto a la participación del AR en las funciones reguladas por la testosterona en el músculo esquelético, los resultados presentados en el capítulo anterior mostraron que los cambios típicos de la apoptosis, tales como la fragmentación nuclear, la desorganización del citoesqueleto, reorganización/disfunción mitocondrial, la liberación del citocromo c, el clivaje de PARP y la pérdida de potencial de membrana mitocondrial inducida por H₂O₂, eran suprimidas por el pretratamiento con testosterona en las células musculares C2C12. El empleo del antagonista del AR, Flutamida, inhibió la acción protectora de la hormona, lo que sugiere un papel funcional del AR, cuya localización se demostró novedosamente en las mitocondrias y caveolas de las células C2C12.

El AR podría ejercer un rol activo en la mediación del efecto antiapoptótico de la testosterona a distintos niveles según su localización subcelular: núcleo (regulando la respuesta genómica); mitocondria (mediando la vía intrínseca), microsomas (interviniendo en las respuestas mediadas por proteínas de membrana y nucleares para las entidades que se translocan a núcleo). Sin embargo, resulta altamente complejo poder establecer qué vía está siendo regulada por cada receptor. El desconocimiento de las estructuras químicas, hace imposible la generación de técnicas que bloqueen específicamente a cada receptor y determinar así las vías mediadas por cada uno de ellos. El conjugado de testosterona-BSA ha sido ampliamente utilizado para el estudio de los ARs asociados a membrana plasmática. Sin embargo, el mAR detectado en las células C2C12, se localiza mayoritariamente en caveolas y *rafts*, interaccionando con Caveolina-1. Esto hace muy poco probable la existencia de un sitio de ligado a la hormona en el exterior celular. El aislamiento y la secuenciación de cada receptor, permitiría evaluar si se trata de entidades estructuralmente diferentes, posibilitando el diseño de secuencias de siRNA que silencien específicamente los ARNm o anticuerpos específicos para cada uno. También podría suceder, que sean receptores estructuralmente similares en su secuencia aminoacídica, con modificaciones postraduccionales que cambien su localización subcelular para mediar

distintos efectos, lo cual complicaría aun más el intento de esclarecer la participación del AR en los efectos antiapoptóticos de la testosterona.



CAPÍTULO III

*"Activación de vías de señalización
y regulación de la expresión
génica durante el estrés oxidativo:
rol de la testosterona"*

RESULTADOS

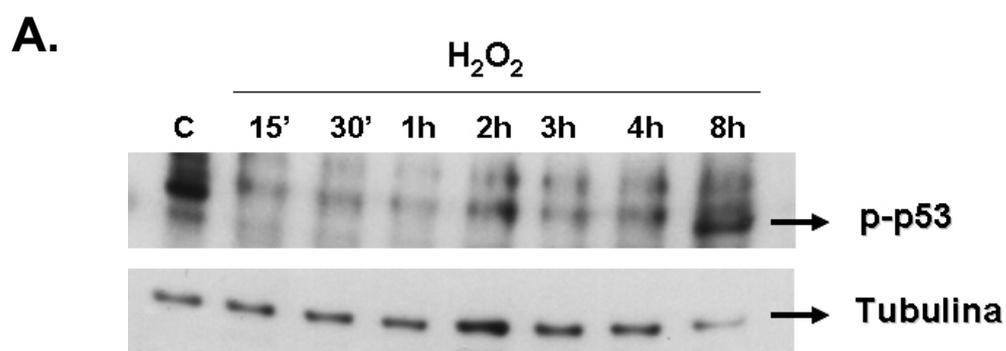
I. Efecto del estrés oxidativo sobre p53 en C2C12

P53, popularmente conocida como el “guardián del genoma”, es una proteína esencial para el control del daño celular. Su activación se produce postranscripcionalmente (acetilación, metilación, fosforilación) por diversos estímulos que incluyen daño del ADN, deprivación energética, desarreglos oncogénicos, hipoxia o estrés oxidativo. La activación de p53 conlleva a un número de respuestas celulares que en su conjunto evitan la propagación del daño. Las mismas, incluyen el arresto del ciclo celular, la reparación del ADN, senescencia y diferenciación celular, o inducción de apoptosis. P53 ejerce sus funciones, actuando principalmente como factor de transcripción, regulando positiva o negativamente una amplia variedad de genes [Vousden y Lu 2002; Riley et al. 2008].

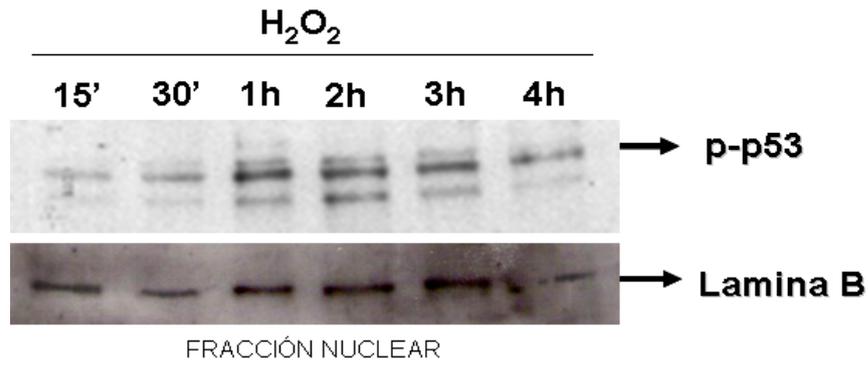
Para evaluar cómo se comporta esta proteína frente al estrés oxidativo en nuestro modelo experimental, los cultivos de C2C12 fueron expuestos a distintos tiempos de H₂O₂ 1 mM, y luego los homogenados celulares fueron analizados por *Western blot* empleando un anticuerpo específico contra la forma fosforilada en serina 15 de p53. Como puede verse en la Figura 22A, la activación/fosforilación de p53 parece correlacionarse positivamente con el tiempo de exposición al agente apoptótico. El leve aumento en la señal observado, puede deberse a la utilización de homogenados totales, donde probablemente la proteína se diluye entre todos los componentes celulares, lo que dificulta la visualización de los cambios en su activación. Sin embargo, es de notable interés en este experimento, la activación de p53 en el control (células sin tratar, con DMEM sin suero) el cual se frenó junto con el último tiempo de exposición al H₂O₂ (8 hs). Supusimos que el tiempo de deprivación de suero (estarveo con DMEM sin suero) generaba estrés en las células, provocando a la activación de p53. Por lo tanto, posteriormente, para evaluar el efecto de la deprivación de suero sobre las células C2C12, se estudió por *Western blot* la activación de p53, tras el estarveo durante distintos intervalos de tiempo.

Dado que p53 al activarse actúa como factor de transcripción, regulando la expresión de genes en el núcleo, se estudió, el efecto del tratamiento con H_2O_2 durante distintos tiempos, sobre la fracción nuclear. De esta manera fue posible una mejor visualización en la correlación del tiempo de exposición al agente apoptótico y la activación de p53, detectándose una activación máxima de p53 a la 1-2 hs de tratamiento con H_2O_2 (Figura 22B). El análisis inmunocitoquímico permitió visualizar los efectos del H_2O_2 sobre la activación de p53, previamente detectados por *Western blot*. Tras el estrés oxidativo inducido con H_2O_2 , es posible observar la localización nuclear de p53 activado, detectándose una intensidad de fluorescencia nuclear máxima a la hora de tratamiento y hasta las 2 hs, tiempo a partir del cual la fluorescencia decae significativamente, hasta hacerse casi nula (Figura 22C). Tiempos de exposición al agente apoptótico mayores a 4 hs, fueron imposibles de analizar por inmunocitoquímica ya que el tiempo prolongado de estrés oxidativo, provocó la pérdida casi total de las células adheridas al cubreobjetos. Para corroborar que los efectos fueran debido al estrés oxidativo y no a la deprivación de suero (como se había sospechado en los experimentos con homogenado total), se analizó el efecto que tenían los distintos tiempos de deprivación de suero sobre la activación de p53 en las fracciones nucleares. Se inmunodetectó a p53 activa a partir de las 4 hs de deprivación. Esto se correlaciona con el resultado anterior sobre homogenados totales, en el cual se había utilizado un control con el máximo tiempo de estarveo (8 hs) (Figura 22D).

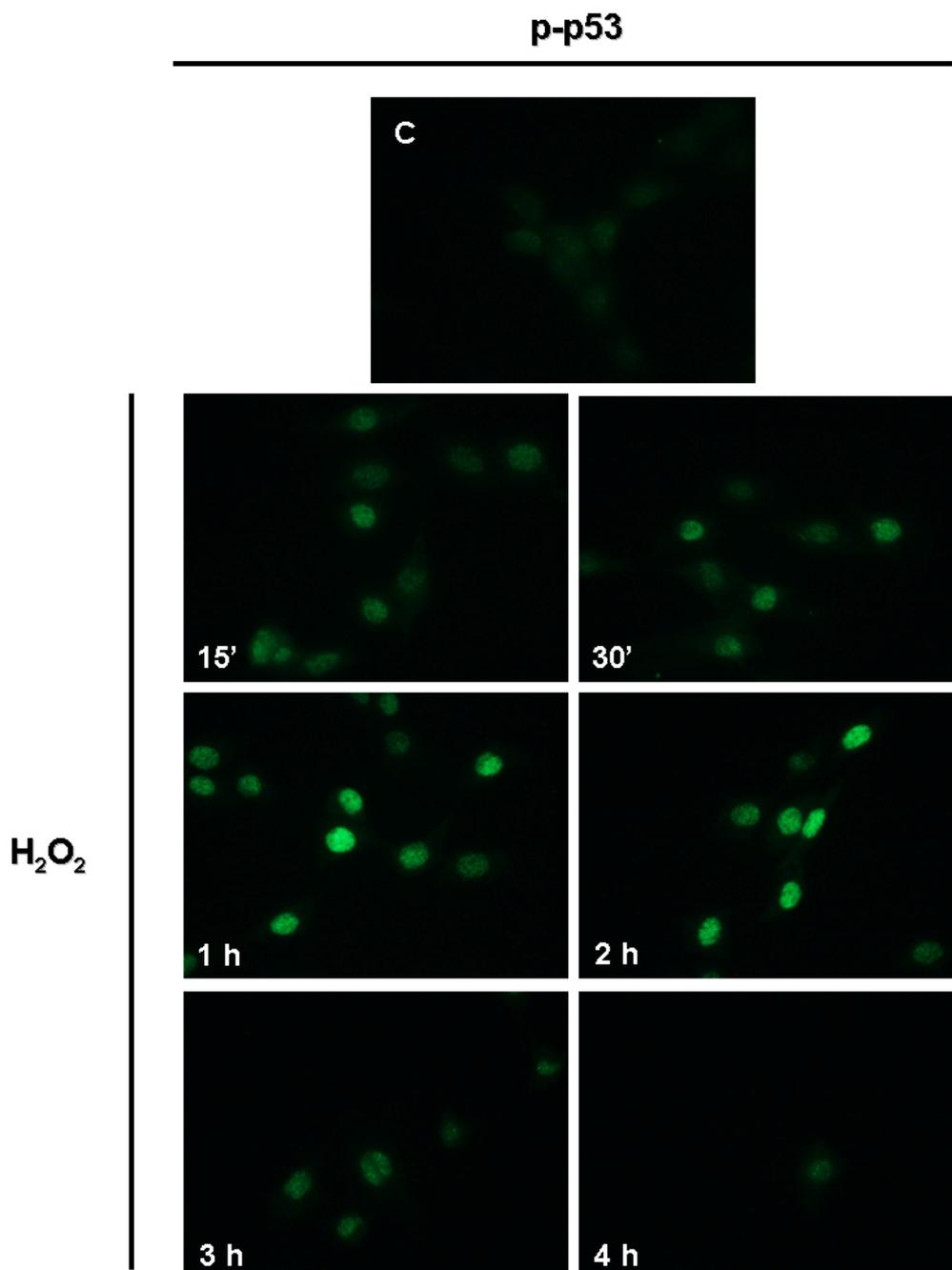
Por lo tanto, los resultados obtenidos, por *Western blots* e inmunocitoquímica, de activación y localización nuclear de p53 hasta las 2 hs de tratamiento, corresponden a un efecto específico del agente apoptótico y no al efecto de la falta de suero.



B.



C.



D.

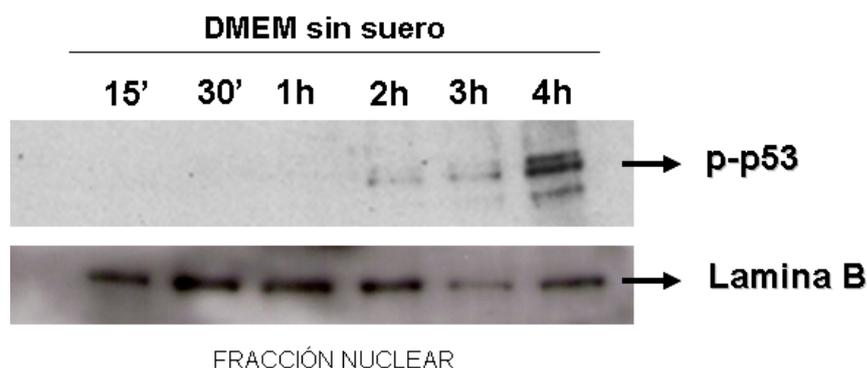


Figura 22: Activación de p53 por H₂O₂ en células musculares C2C12. A) Los cultivos celulares fueron incubados con H₂O₂ 1 mM durante los períodos de tiempo especificados o con DMEM sin suero durante 8 hs (C). Los homogenados totales fueron analizados por ensayos de *Western blot* utilizando un anticuerpo específico contra la forma fosforilada en serina 15 de p53. Los niveles de tubulina se muestran como control de siembra. B) Los cultivos celulares fueron incubados durante los tiempos indicados con H₂O₂ 1 mM. Luego se aisló la fracción nuclear como se describió en *Metodología* y se la analizó por *Western blot* utilizando un anti-p-p53 (Ser 15) específico. Los niveles de Lamina B se muestran como control de la fracción nuclear. C) Las células cultivadas sobre cubreobjetos fueron tratadas con H₂O₂ 1 mM durante los períodos de tiempo especificados y luego marcadas con anti-p-p53 (Ser 15) como se describió en *Metodología*. Fueron analizados, por microscopía de fluorescencia convencional, al menos diez campos por condición. Amplificación: 63X. D) Los cultivos celulares fueron incubados durante los tiempos indicados con DMEM sin suero. Luego se aisló la fracción nuclear como se describió en *Metodología* y se la analizó por *Western blot* utilizando un anti-p-p53 (Ser 15) específico. Los niveles de Lamina B se muestran como control de la fracción nuclear.

II. Efecto de la testosterona sobre la activación de p53

Se evaluó a continuación, el efecto del tratamiento hormonal sobre el estado de p53. Para ello los cultivos fueron tratados con testosterona 10⁻⁹ M sola o bien junto con Flutamida 10⁻⁸ M durante 60 min, previo a la inducción de apoptosis con H₂O₂ durante 2 hs (tiempo de tratamiento requerido para inducir la máxima activación de p53). Luego se aisló la fracción nuclear de cada condición. El análisis por *Western blot* reveló una disminución en la activación de p53 en presencia de la hormona, respecto al tratamiento con H₂O₂ sola. En presencia de Flutamida, la hormona es incapaz de producir tal efecto, sugiriendo la participación del AR en este evento (Figura 23A). Estos resultados fueron también observados por inmunocitoquímica. Las células C2C12 crecidas sobre cubreobjetos, fueron marcadas con anti-p-p53 luego de los distintos tratamientos, y analizadas por microscopía de fluorescencia. Puede observarse la activación y la localización nuclear de p53 inducida por

el H_2O_2 respecto a las condiciones control (células tratadas con la testosterona o con su vehículo) las cuales prácticamente carecen de fluorescencia. El tratamiento con testosterona previo a la inducción de la apoptosis, parece reducir la intensidad de fluorescencia verde nuclear observada en las células C2C12. En presencia de Flutamida, prácticamente no se observan diferencias con la condición de H_2O_2 sola (Figura 23B). Esto resultados indicarían, que en presencia de testosterona, las condiciones son menos adversas por lo que los daños celulares son de menor magnitud, entonces la activación de p53 no es requerida ya sea para frenar el ciclo y reparar el daño, o bien inducir apoptosis.

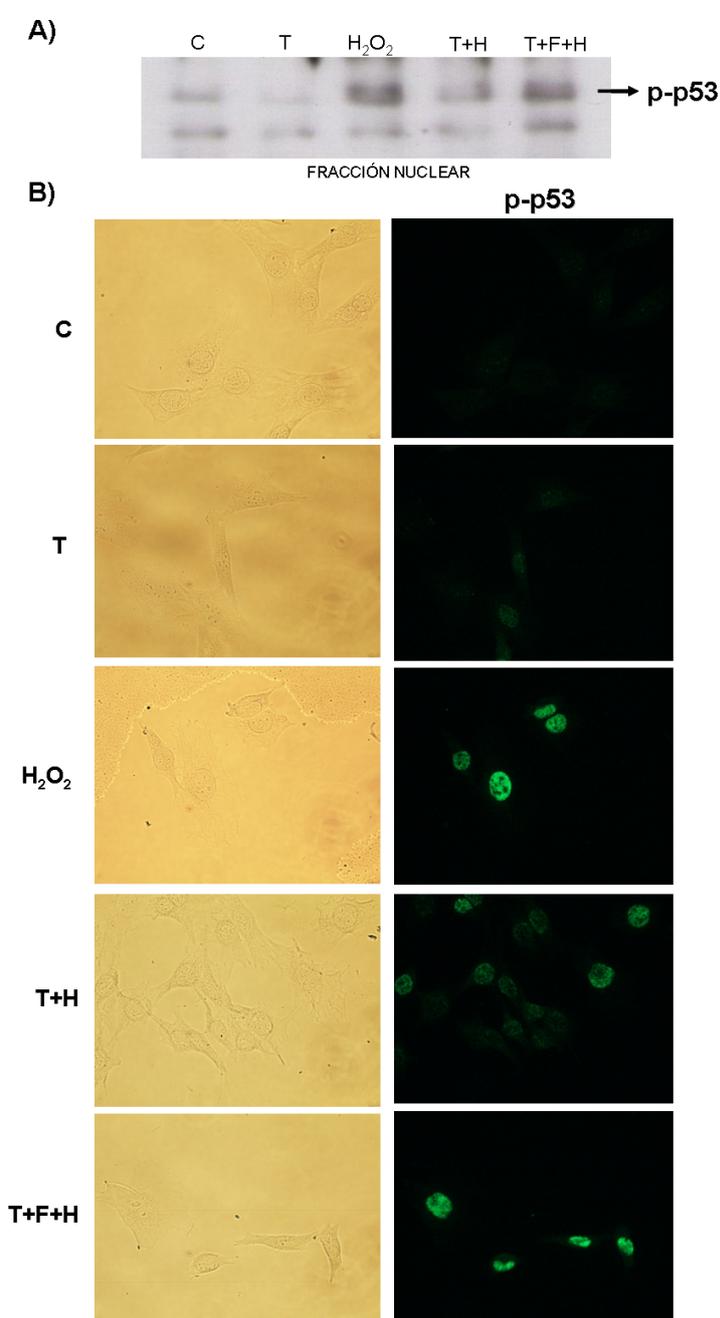


Figura 23: Efecto de la testosterona sobre la activación de p53 inducida por H_2O_2 . A) Los cultivos celulares fueron tratados con: el vehículo de la hormona, isopropanol 0,001 % por 60 min (C); testosterona 10^{-9} M durante 60 min (T); H_2O_2 1 mM durante 2 hs (H_2O_2); testosterona 10^{-9} M durante 60 min y luego sometidas a 2 hs de tratamiento con H_2O_2 1 mM (T+H); testosterona 10^{-9} M y Flutamida 10^{-8} M durante 60 min y luego sometidas a 2 hs de tratamiento con H_2O_2 1 mM (T+F+H). Se aisló la fracción nuclear como se describió en *Metodología* y se la analizó por *Western blot* utilizando un anti-p-p53 (Ser15). B) Las células cultivadas sobre cubreobjetos fueron sometidas a los mismos tratamientos mencionados anteriormente. Luego fueron marcadas con anti-p-p53 (Ser 15) como se describió en *Metodología*, y analizadas por microscopia de fluorescencia convencional. Amplificación: 63X.

III. Efecto de la testosterona sobre la activación de p66Shc inducida por el H₂O₂

Una de las formas con que p53 induce apoptosis es mediante la regulación positiva de la expresión de p66Shc, una proteína adaptadora que aumenta la producción de H₂O₂ mitocondrial [Trinei et al. 2002]. P66Shc ha cobrado gran interés como determinante principal de la susceptibilidad celular al daño oxidativo y por sus efectos en la sobrevivencia de ratones *knockout* para esta proteína [Migliaccio et al. 1999]. Diversas señales proapoptóticas incluyendo el estrés oxidativo, activan quinasas como la PKC β y JNK las cuales provocan la fosforilación de p66shc en serina 36. Esta fosforilación/activación induce la translocación de p66Shc a la membrana interna mitocondrial, donde actúa como enzima redox para amplificar el estrés oxidativo, provocando un incremento en el H₂O₂ mitocondrial. Este aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la mitocondria, provoca la apertura del poro de transición mitocondrial, liberación de citocromo c, y eventualmente la muerte celular por apoptosis [Giorgio et al. 2005, 2007].

El comportamiento de p66Shc tras la inducción de apoptosis con H₂O₂ fue evaluado en una primera instancia, en las células C2C12. Los cultivos fueron expuestos a distintos tiempos de H₂O₂ 1 mM, y luego los homogenados totales fueron analizados por *Western blot* empleando un anticuerpo específico contra la forma fosforilada (activa) en serina 36 de p66Shc. En la Figura 24A puede observarse el incremento en la fosforilación de p66Shc respecto del tiempo de exposición al agente apoptótico. Al igual que para p53, la utilización de homogenado total dificulta la visualización nítida de la activación de la proteína. Nuevamente, al igual que para p53, se observa la activación de p66Shc en el control (medio sin suero, frenado junto con la última condición de 4 hs de H₂O₂). Como se vio previamente, el estarveo a partir de las 4 hs provoca la activación de p53. Esta proteína, junto a las condiciones estresantes del medio, serían las responsables del aumento tanto en la expresión como en la activación de p66Shc.

Para una mejor visualización de los cambios inducidos por el H₂O₂ en la activación de p66Shc, se estudió el efecto del tratamiento con distintos tiempos de exposición al agente apoptótico sobre la fracción mitocondrial.

En la Figura 24B, se observa que la localización mitocondrial de p-p66Shc es máxima hasta la hora de tratamiento con H_2O_2 , tiempo a partir del cual decae levemente. Este resultado de activación rápida de p66Shc se relaciona con $PKC\beta$ o con JNK, quienes están involucradas en vías de señalización de respuestas rápidas, y han sido caracterizadas como quinasas activadoras de p66Shc.

Se evaluó en paralelo a éstos resultados, si los distintos tiempos de estarveo afectaban la localización mitocondrial de p66Shc, pero no se observaron cambios significativos en la baja señal detectada por *Western blot* (Figura 24 C).

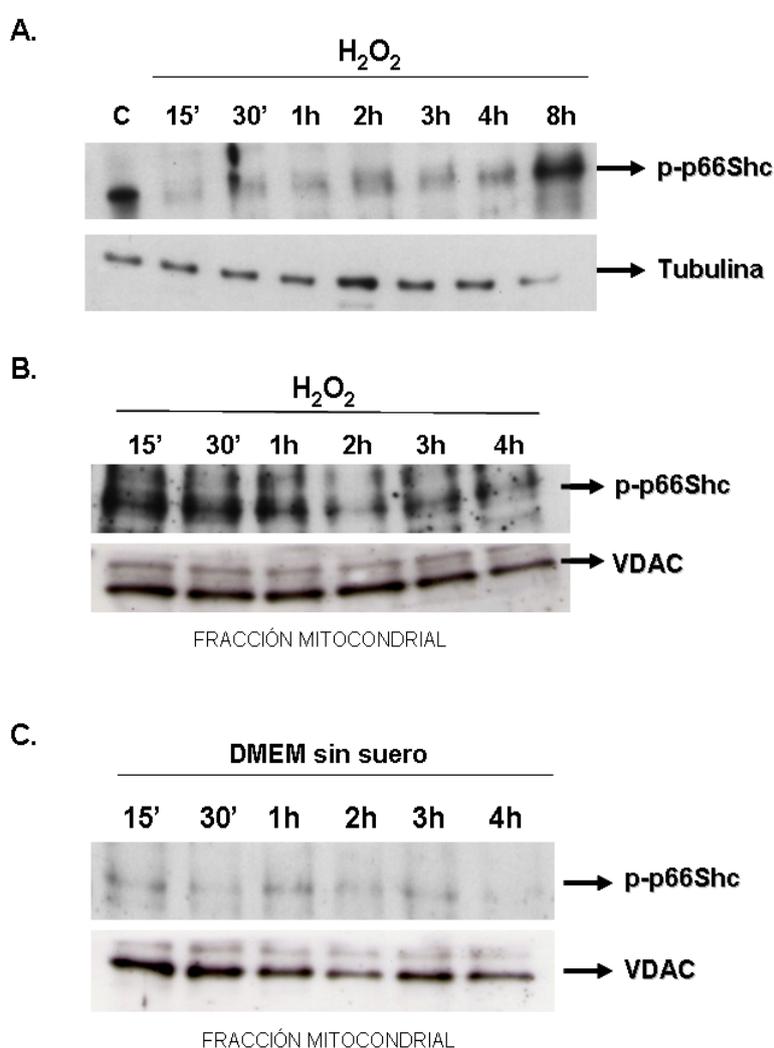


Figura 24: Activación de p66Shc por H_2O_2 en células musculares C2C12. A) Los cultivos celulares fueron incubados con H_2O_2 1 mM durante los períodos de tiempo especificados o con DMEM sin suero durante 8 hs (C). Los homogenados totales fueron analizados por *Western blot* utilizando un anticuerpo específico contra la forma fosforilada en serina 36 de p66Shc. Los niveles de tubulina se muestran como control de siembra. B,C) Los cultivos celulares fueron incubados durante los tiempos indicados con B) H_2O_2 1 mM o con C) DMEM sin suero. La fracción mitocondrial fue aislada a continuación como se describió en *Metodología* y se la analizó por *Western blot* utilizando un anti-p-p66Shc específico. Los niveles de VDAC se muestran como marcador mitocondrial y control de siembra.

Los cambios de activación/localización de p66Shc tras el tratamiento a distintos tiempos con el agente inductor de apoptosis (1 mM), se analizaron también por inmunocitoquímica. Luego de los tratamientos, los cultivos fueron fijados con metanol y posteriormente marcados con el anticuerpo específico dirigido contra la región fosforilada en Serina 36 de p66Shc. Se observó la localización casi completamente nuclear de p-p66Shc en el control (células sin tratar mantenidas en DMEM sin suero) (Figura 25). Como se mencionó anteriormente, trabajos de otros grupos y en diferentes líneas celulares, reportan que esta proteína permanece inactivada en citosol hasta que un estímulo apoptótico desencadena su activación y translocación a mitocondria, donde ejerce su acción apoptótica amplificando la señal oxidativa. Sin embargo, en la línea celular C2C12 se observa la localización nuclear de p-p66Shc. Cuando las células son tratadas con H₂O₂ se observa un leve aumento generalizado en la intensidad de fluorescencia verde al mismo tiempo que las células van tomando la típica forma apoptótica redondeada. Además, la localización de p66Shc ya no es casi exclusivamente nuclear, sino más homogénea a lo largo de la célula. A la 1-2 hs de tratamiento, se aprecian los núcleos menos marcados, localizándose una mayor intensidad de fluorescencia a sus alrededores. Esto plantea la posibilidad que el estímulo apoptótico induce la translocación de p66Shc desde el núcleo (donde podría ser secuestrada por alguna chaperona o asociada a algún factor de transcripción, cumpliendo alguna función hasta el momento desconocida) hacia la mitocondria, para regular así la apoptosis. A las 4 hs de tratamiento con H₂O₂ la intensidad de fluorescencia disminuye notablemente hasta hacerse casi imperceptible. Asimismo, el número de células en esta última condición se redujo considerablemente y tiempos mayores de tratamiento fueron imposibles de analizar por inmunocitoquímica dada la pérdida total de las células adheridas al cubreobjetos.

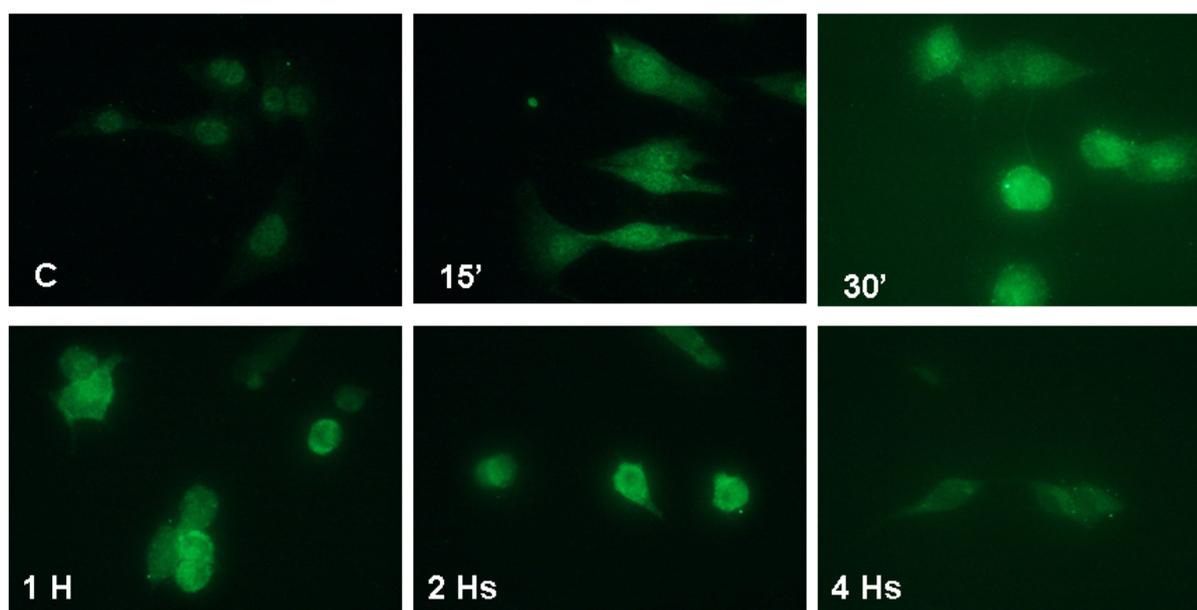
p-p66Shc

Figura 25: Efecto del H₂O₂ sobre la activación de p66Shc. Las células cultivadas sobre cubreobjetos fueron tratadas con H₂O₂ 1 mM durante los períodos de tiempo especificados, variando entre 15 minutos y 4 horas, o bien se mantuvieron en DMEM sin suero durante 2 hs (C). Luego fueron marcadas con anti-p-p66Shc (Ser 36) como se describió en *Metodología*. Fueron analizados, por microscopia de fluorescencia convencional, al menos diez campos por condición. Amplificación: 63X.

A continuación se estudió si la testosterona y su receptor, ejercían algún tipo de efecto sobre la activación de p66Shc. Las células C2C12 fueron entonces tratadas con testosterona 10^{-9} M sola o bien junto con Flutamida 10^{-8} M durante 60 min previo a la inducción de apoptosis con H₂O₂ durante 2-3 hs (no se utilizaron tratamientos con H₂O₂ más prolongados para evitar que las células se vean afectadas por la privación de suero). Luego de los distintos tratamientos, se aislaron las fracciones mitocondriales de cada condición, las cuales fueron analizadas por *Western blot* empleando el anticuerpo específico contra la forma fosforilada en serina 36 de p66Shc. En la Figura 26 se muestra cómo el tratamiento con testosterona previo al H₂O₂ disminuye la expresión de p-p66Shc en

mitocondria, la cual había sido levemente aumentada por el estímulo apoptótico. Este efecto es revertido por la Flutamida, lo que sugiere la participación del receptor de andrógenos en la prevención de la fosforilación/activación y/o localización mitocondrial de p66Shc, evitando así la amplificación del estrés oxidativo por esta proteína, a este nivel.

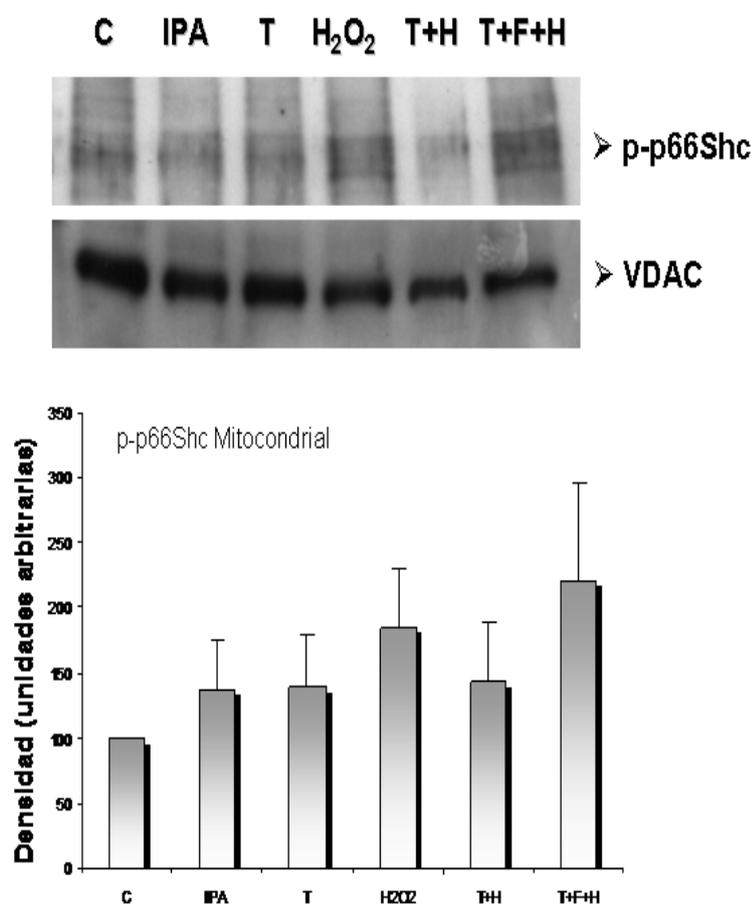


Figura 26: Efecto de la testosterona sobre la activación de p66Shc inducida por H₂O₂. (C) Células en DMEM sin suero; (IPA) Células tratadas con el vehículo de la hormona, isopropanol 0,001 % por 60 min; (T) Células incubadas con testosterona 10⁻⁹ M durante 60 min; (H₂O₂) Células tratadas con H₂O₂ 1 mM durante 2-3 hs; (T+H) Célula incubadas con testosterona 10⁻⁹ M durante 60 min y luego sometidas a 2-3 hs de tratamiento con H₂O₂ 1 mM; (T+F+H) Células incubadas con testosterona 10⁻⁹ M y Flutamida 10⁻⁸ M durante 60 min y luego sometidas a 2-3 hs de tratamiento con H₂O₂ 1 mM. La fracción mitocondrial fue aislada como se describió en *Metodología* y se la analizó por *Western blot* utilizando un anti-p-p66Shc (Ser36). Los niveles de VDAC se muestran como control de fracción mitocondrial y siembra. El *blot* fue cuantificado por densitometría y es representativo de al menos 2 experimentos con resultados comparables.

El efecto de la testosterona sobre la fosforilación de p66Shc, también fue visualizado preincubando los cultivos celulares con testosterona 10⁻⁹ M durante los períodos de tiempo indicados en la Figura 27, seguido del tratamiento con H₂O₂ 1 mM durante 2-3 hs. Los homogenados celulares se analizaron por *Western blot*, empleando un anti-p-p66Shc específico. Si bien no se visualiza un cambio altamente significativo entre los distintos tiempos de preincubación con testosterona, pudo observarse la tendencia a

regular negativamente la fosforilación/activación de p66Shc, dándole peso a estos resultados, al efecto protector de la testosterona a nivel mitocondrial.

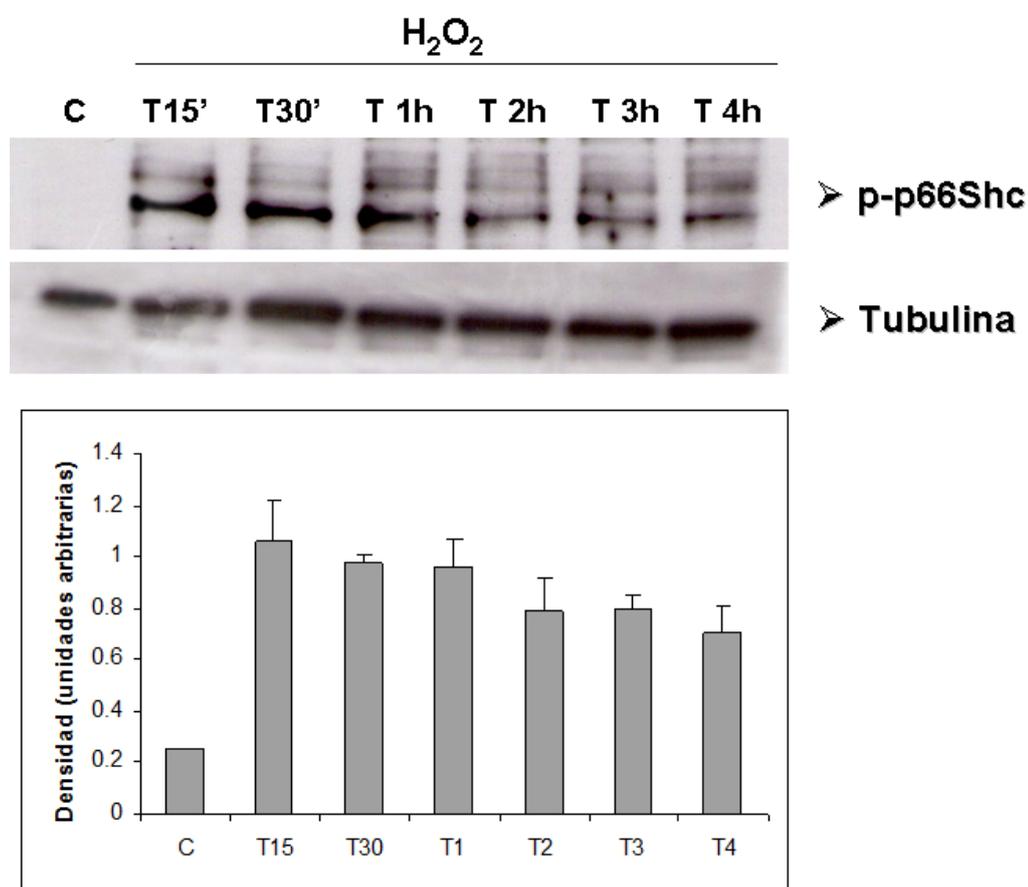


Figura 27: Efecto de la testosterona sobre la activación de p66Shc. Los cultivos fueron tratados con testosterona 10^{-9} M durante los períodos de tiempo especificados, que variaban entre 30 min y 4 horas. A continuación las células fueron expuestas a H_2O_2 1 mM durante 2-3 hs. El control (C) corresponde a células que no recibieron tratamiento alguno. Los lisados celulares fueron analizados por *Western blot* utilizando un anticuerpo contra la forma fosforilada en serina 36 de p66Shc. Los niveles de tubulina se muestran como control de siembra. Las bandas se cuantificaron por densitometría.

Para poder visualizar los efectos de los distintos tratamientos sobre el estado de activación de p66Shc, se realizaron análisis inmunocitoquímicos sobre las células C2C12 luego de los tratamientos habituales y empleando un inhibidor de JNK (SP600125) y un activador de PKC (PMA), principales quinasas involucradas en la fosforilación/activación de p66Shc. Para ello, las células crecidas sobre cubreobjetos fueron tratadas con testosterona 10^{-9} M durante 1 hora previo a la inducción de apoptosis con H_2O_2 1 mM por 2 hs, o

bien con H₂O₂ 1 mM sola, comparándose los efectos con las condiciones control tratadas con la hormona sola o con su vehículo isopropanol 0,001 %. Además las células fueron preincubadas en DMEM sin suero conteniendo SP600125 10 μM durante 1 hora y luego expuestas a H₂O₂ 1 mM durante 2 horas. También se indujo la activación de las PKC mediante el tratamiento con PMA 100 nM durante 2 horas. Luego, las células fueron marcadas con anti-p-p66Shc y con el marcador mitocondrial *Mitotracker*, y analizadas por microscopía de fluorescencia convencional. Como puede observarse en la Figura 28, nuevamente se detecta una marcada localización nuclear de p66Shc en las condiciones control (C, T). El tratamiento con H₂O₂ no solo indujo el aumento de células apoptóticas con su clásica forma redondeada y condensada (picnótica), sino también que permitió la visualización de la señal amarilla en el *merge* de las imágenes individuales, lo que demuestra la localización mitocondrial de p-p66Shc. Puede verse además una disminución en la marcación nuclear de p-p66Shc, al mismo tiempo que aumenta la marcación mitocondrial. Estos efectos fueron reducidos por el tratamiento con testosterona previo a la inducción de apoptosis. La activación de las PKC por el tratamiento con PMA, produjo efectos similares a los del H₂O₂, incluso más marcados. Se detectó un alto porcentaje de células apoptóticas intensamente marcadas, con una aumentada localización mitocondrial de p-p66Shc, evidenciada por la señal amarilla detectada en el *merge*. Por lo que en las células C2C12 las PKC estarían ejerciendo una función claramente proapoptótica. Por otro lado, la inhibición de JNK bloqueó casi completamente los efectos del H₂O₂, no detectándose prácticamente diferencias entre la condición tratada con SP600125 + H₂O₂ y los controles. Esto permite asignarle a JNK un rol fundamental en la regulación de la apoptosis, en este modelo experimental.

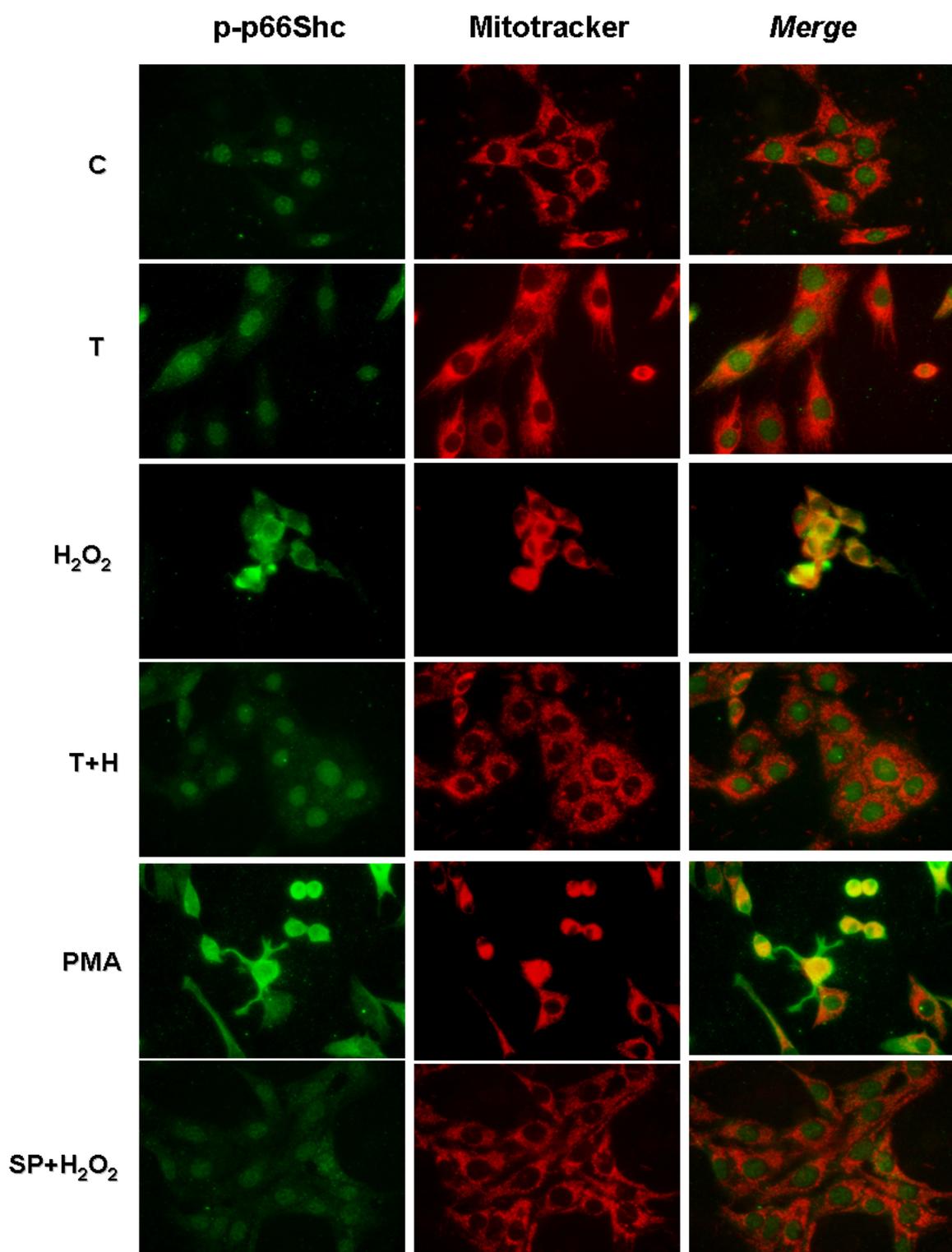


Figura 28: Efecto de los distintos tratamientos sobre la activación y localización subcelular de p66Shc. (C) Células tratadas con el vehículo de la hormona, isopropanol 0,001 % por 60 min; (T) Células incubadas con testosterona 10^{-9} M durante 60 min; (H₂O₂) Células tratadas con H₂O₂ 1 mM durante 2 hs; (T+H) Células incubadas con testosterona 10^{-9} M durante 60 min y luego sometidas a 2 hs de tratamiento con H₂O₂ 1 mM; (PMA) Células tratadas con PMA 100 nM durante 2 hs; (SP+H₂O₂) Células tratadas con SP600125 10 μ M durante 1 hora y luego expuestas a H₂O₂ 1 mM por 2 hs. Luego de los distintos tratamientos las células fueron teñidas con *Mitotracker* y posteriormente marcadas con anti-p-p66Shc, como se describió en *Metodología*. Fueron analizados, por microscopía de fluorescencia convencional, al menos diez campos por condición. Amplificación: 63X.

IV. Colocalización e interacción de p66Shc y HSP70 en mitocondrias

Como se mencionó anteriormente, p66Shc es un mediador de la apoptosis inducida por estrés oxidativo. Ha sido previamente reportado que la fracción de p66Shc localizada en mitocondria se encuentra formando complejos de alto peso molecular con otras proteínas dentro de las que se encuentra la proteína de choque térmico HSP70 de localización mitocondrial (mtHSP70). Luego de la propagación de la señal apoptótica inducida por el estrés oxidativo, los niveles de p66Shc mitocondrial aumentan levemente, al mismo tiempo que se produce su disociación de la mtHSP70 [Orsini et al. 2004]. Las proteínas de choque térmico son conocidas como reguladores negativos de la apoptosis [Bruey et al 2000]. La mtHSP70, es un miembro de la familia de las chaperonas HSP70, que está asociada a la regulación de la senescencia celular e inmortalidad. Al parecer, la mtHSP70 previene el daño de la organela inducido por estrés oxidativo [Sadkova et al. 1997; Yokoyama et al. 2002; Kaul et al. 2003]. Por lo que la mtHSP70 interaccionaría físicamente con p66Shc, secuestrándola y bloqueando así su acción apoptótica mitocondrial. En base a esto es que se intentó determinar la existencia de la interacción física entre las proteínas p66Shc y HSP70 en las fracciones mitocondrial y citosólica de las células C2C12, y si tal asociación se veía afectada tras el tratamiento con el inductor de apoptosis y la testosterona. Para ello, los cultivos celulares fueron sometidos a los distintos tratamientos y posteriormente se obtuvieron por centrifugación diferencial, las fracciones mitocondrial y citosólica. A continuación se realizaron ensayos de coimmunoprecipitación sobre ambas fracciones subcelulares, con un anticuerpo específico contra la HSP70. Los inmunoprecipitados fueron luego analizados por *Western blot* empleando el anticuerpo anti-p-p66Shc. La Figura 29 indica que existe una leve interacción física entre la chaperona y p-p66shc, principalmente en la fracción citosólica. Si bien el tratamiento hormonal parece aumentar levemente la señal respecto a la condición de H₂O₂, es imposible afirmar un efecto de la testosterona en este evento, dada la baja intensidad de señal obtenida.

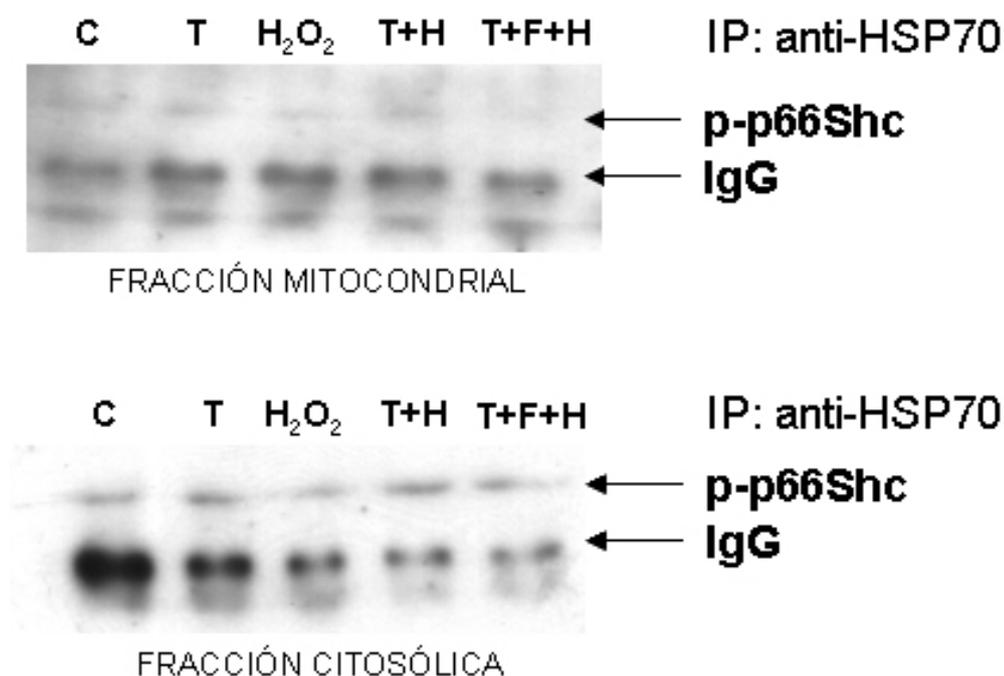


Figura 29: Interacción de p-p66Shc y HSP70 en células C2C12. La fracción mitocondrial y la fracción citosólica (30 μ g) obtenidas a partir de cultivos tratados con el vehículo isopropanol 0,001 % (C), testosterona 10^{-9} M durante 60 min (T); H_2O_2 1 mM durante 2 hs (H_2O_2); testosterona 10^{-9} M durante 60 min y luego sometidas a 2 hs de tratamiento con H_2O_2 1 mM (T+H); testosterona 10^{-9} M y Flutamida 10^{-8} M durante 60 min y luego sometidas a 2 hs de tratamiento con H_2O_2 1 mM (T+F+H), fueron inmunoprecipitadas con anti-HSP70 y luego analizadas por *Western blot* empleando anti-p-p66Shc. Se muestran también los niveles de IgG. El *blot* es representativo de tres experimentos independientes, con resultados comparables.

V. Efecto de la testosterona sobre la activación de JNK

Una de las vías involucradas en la señalización de la muerte celular mediada por estrés oxidativo es la activación de la vía MAP kinasa de JNK. La activación de JNK, induce diferentes respuestas biológicas, de las cuales se destaca por sobre todo la activación de la muerte celular programada [Davis 2000; Wajant et al. 2003; Papa et al. 2004]. c-Jun fue el primer sustrato de JNK descrito [Pulverer et al. 1991], sin embargo posteriormente se identificaron otras dianas de JNK como p53, Elk-1 y c-

Myc [Buschmann et al. 2000; Davis 2000]. Como se mencionó anteriormente, dependiendo del contexto celular y el estímulo apoptótico, la fosforilación/activación de p66Shc en serina 36 puede ser llevada a cabo por distintas quinasas, dentro de las cuales se ha identificado a JNK [Le et al. 2001].

En una primera aproximación para evaluar el comportamiento de las células C2C12 ante el estrés oxidativo en lo que respecta a la activación de JNK, los cultivos fueron tratados con H₂O₂ 1 mM durante distintos períodos de tiempo que variaban entre 15 minutos y 4 horas. Como puede verse en la Figura 30, el estrés oxidativo inducido por H₂O₂ provoca la activación de JNK a partir de los 15 min de tratamiento para la isoforma de 46 kDa y a partir de la hora para la de 54 kDa, en las células C2C12.

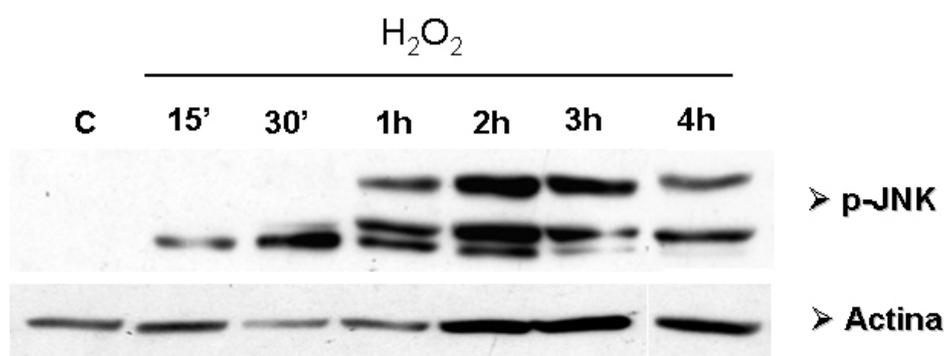


Figura 30: Activación tiempo-dependiente de JNK por el H₂O₂. Las células fueron tratadas con H₂O₂ 1 mM durante 15 y 30 minutos, 1, 2, 3 y 4 horas, o se mantuvieron sin tratar en medio sin suero (C). Los lisados fueron analizados por *Western blot* empleando un anticuerpo específico anti-fosfo-JNK1/2 (Tyr185 y Thr183). Los niveles de actina se muestran como control de siembra.

Dado que anteriormente se observó que la testosterona era capaz de disminuir la fosforilación de p66Shc inducida por el H₂O₂, se evaluó entonces si JNK participa en estos eventos y si la testosterona ejercía algún efecto sobre esta quinasa. Para ello, los cultivos celulares se preincubaron con testosterona 10⁻⁹ M y luego se trataron con H₂O₂ 1 mM durante 1-2 hs, comparándose los efectos con los cultivos tratados con el agente apoptótico solo, y con los controles (células sin tratar (C) o tratadas con testosterona 10⁻⁹ M (T) o con el vehículo isopropanol 0,001 % (IPA)). Por ensayos de *Western blot* y empleando un anticuerpo específico contra las formas

fosforiladas en tirosina 185 y treonina 183 de JNK1/2, se observó que la activación de la quinasa, inducida por el H_2O_2 era revertida por el pretratamiento con testosterona (Figura 31). Probablemente en presencia de testosterona, las condiciones estresantes a las que se somete a las células, no sean tan adversas como para activar a JNK. Por lo que a través del bloqueo de la activación de JNK, la testosterona evitaría la activación de p66Shc, ejerciendo así su efecto protector frente a la apoptosis a nivel mitocondrial.

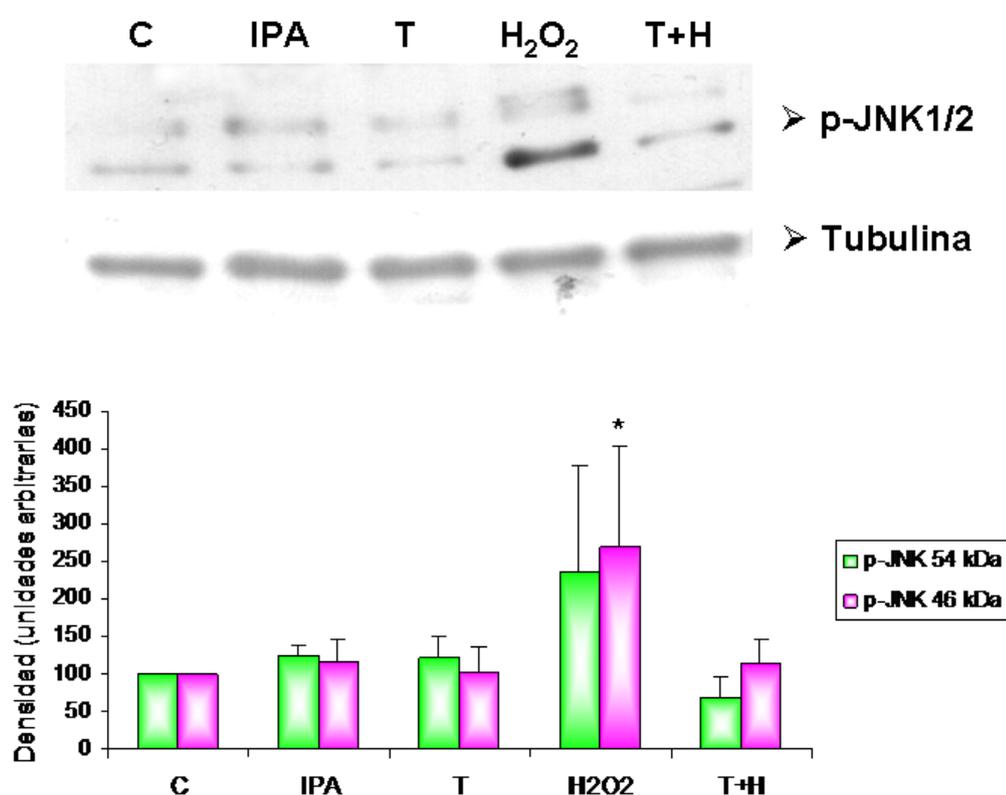


Figura 31: Efecto de la testosterona sobre la activación de JNK inducida por el H_2O_2 . (C) Células en DMEM sin suero; (IPA) Células tratadas con el vehículo de la hormona, isopropanol 0,001 % por 60 min; (T) Células incubadas con testosterona 10^{-9} M durante 60 min; (H_2O_2) Células tratadas con H_2O_2 1 mM durante 2 hs; (T+H) Células incubadas con testosterona 10^{-9} M durante 60 min y luego sometidas a 2 hs de tratamiento con H_2O_2 1 mM. Los lisados celulares fueron analizados por *Western blot* empleando un anticuerpo específico anti-fosfo-JNK1/2 (Tyr185 y Thr183). Los niveles de tubulina se muestran como control de equivalencia de siembra. Las bandas fueron cuantificadas por densitometría. El *blot* es representativo de 3 experimentos diferentes con resultados comparables. Los valores se expresan como porcentaje de estímulo respecto al control; * $p < 0,05$.

VI. Introducción al análisis de la expresión génica

En un primer intento en el estudio de la expresión de distintos genes involucrados en la apoptosis de las células C2C12 y su posible regulación por la testosterona, se analizaron por PCR cuantitativo (qPCR) la expresión de los genes Puma, PERP (apoptóticos) y Bcl-2 (antiapoptótico).

En respuesta al estrés, p53 juega un rol central en la crítica decisión de las células de arrestar el ciclo celular y entrar en estado quiescente, o bien desencadenar la muerte celular programada por apoptosis. Que se desencadene uno u otro evento dependerá de la regulación positiva o negativa de la expresión de los genes que induzca la activación de p53. Dentro de los numerosos genes *target* de p53, se encuentran los que regulan tanto la vía extrínseca de la apoptosis como Fas y Killer/DR5, que codifican los receptores de muerte [Munsch et al. 2000; Takimoto y El Deiry 2000], así como también de la vía intrínseca, como Bax, Noxa y Puma (*p53 up-regulated modulator of apoptosis*), cuyos productos de transcripción pueden localizarse en la mitocondria [Miyashita y Reed 1995, Oda et al. 2000a, Nakano y Vousden 2001] y contribuir a la liberación de citocromo c.

En una primera instancia se analizó, tras el estímulo apoptótico, la expresión del gen proapoptótico activado por p53, Puma, y PERP (*p53 apoptosis effector related to PMP-22*) el cual se encuentra altamente expresado en células llevadas a apoptosis, tras la activación de p53, en comparación con aquellas en las que ocurre el arresto del ciclo celular [Ihrie et al. 2003; Yu y Zhang 2003]. En paralelo se evaluó el comportamiento del gen antiapoptótico Bcl-2, luego de la inducción a apoptosis con H₂O₂. Para determinar los niveles de expresión relativa de estos genes, se realizó qPCR utilizando el método comparativo del C_T descrito en *Metodología*. Para cuantificar los niveles de ARNm de Puma, PERP y Bcl-2 en las células C2C12, se aisló el ARN total de los cultivos celulares expuestos a distintos tiempos de H₂O₂ 1 mM, que variaban entre 30 minutos y 4 horas, y se lo utilizó para determinar los niveles relativos de expresión de los ARNm. El gen GAPDH se utilizó como gen de referencia y con respecto al cual se determinó el nivel relativo de expresión de cada uno de los genes probados. Como se muestra en la Figura 32 se detectó un incremento en los niveles de ARNm de las proteínas apoptóticas Puma y PERP a la hora y media, y a

las 3 horas de tratamiento con H_2O_2 , respectivamente, tiempo a partir del cual la expresión del mensajero decae significativamente. Por otro lado, la expresión relativa del gen que codifica la proteína antiapoptótica Bcl-2, experimenta una clara tendencia a disminuir en función del tiempo de tratamiento con el H_2O_2 . El hecho que luego del tratamiento con H_2O_2 la expresión relativa de Bcl-2 aumente respecto al control sin tratar, puede ser parte del mecanismo de defensa activado por la células a tiempos cortos de exposición al agente apoptótico, descrito en el capítulo I. Para los 3 genes estudiados, se observó un muy bajo nivel de ARNm a las 4 horas de tratamiento con H_2O_2 , lo que probablemente sea consecuencia de la degradación del ADN y ARNm ante la exposición a tiempos prolongados de H_2O_2 .

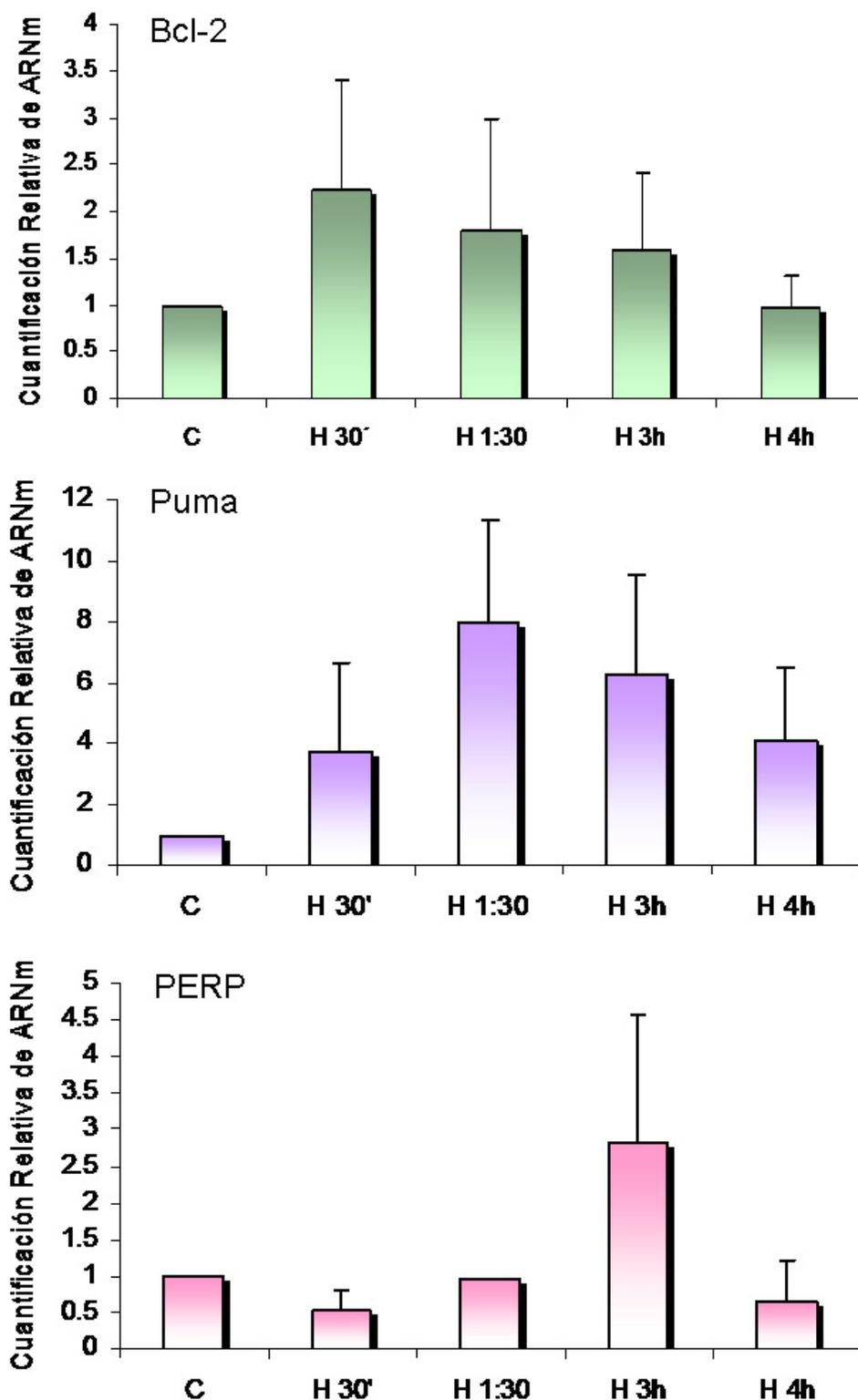


Figura 32: Efecto del tratamiento a distintos tiempos de H_2O_2 sobre la expresión de genes pro y antiapoptóticos. Los niveles de los transcritos de Bcl-2, Puma y PERP se determinaron por qPCR como se describió en *Metodología*, a partir de cultivos de C2C12 expuestos a H_2O_2 1 mM durante 30 minutos (H 30'), 1 hora 30 min (H 1:30), 3 horas (H 3h) y 4 horas (H 4h). Los niveles de expresión de los transcritos se expresan en unidades relativas a la expresión del gen GAPDH. Los valores se expresan respecto al control de células sin tratar (C).

A continuación se evaluó, si la testosterona era capaz de contrarrestar los efectos del H₂O₂ sobre los niveles de expresión de los genes analizados. Para estos estudios, los cultivos de C2C12 fueron tratados con testosterona 10⁻⁹ M durante 60 min, y luego expuestos a los mismos tiempos de H₂O₂ 1 mM que se analizaron anteriormente. El ARNm se aisló como se describió en *Metodología* y los niveles relativos de la expresión de los genes se cuantificaron por qPCR. Las células tratadas con testosterona previo a la inducción de apoptosis, fueron capaces de reducir el efecto del H₂O₂ en varios puntos de la curva, ya sea aumentando la expresión del gen antiapoptótico (Bcl-2), o bien revirtiendo el aumento de la expresión de los genes proapoptóticos (Puma y PERP) inducidos por el H₂O₂ (Figura 33). Estos datos indican que el efecto protector de la testosterona frente a la apoptosis inducida por H₂O₂ media finalmente la regulación de la transcripción génica.

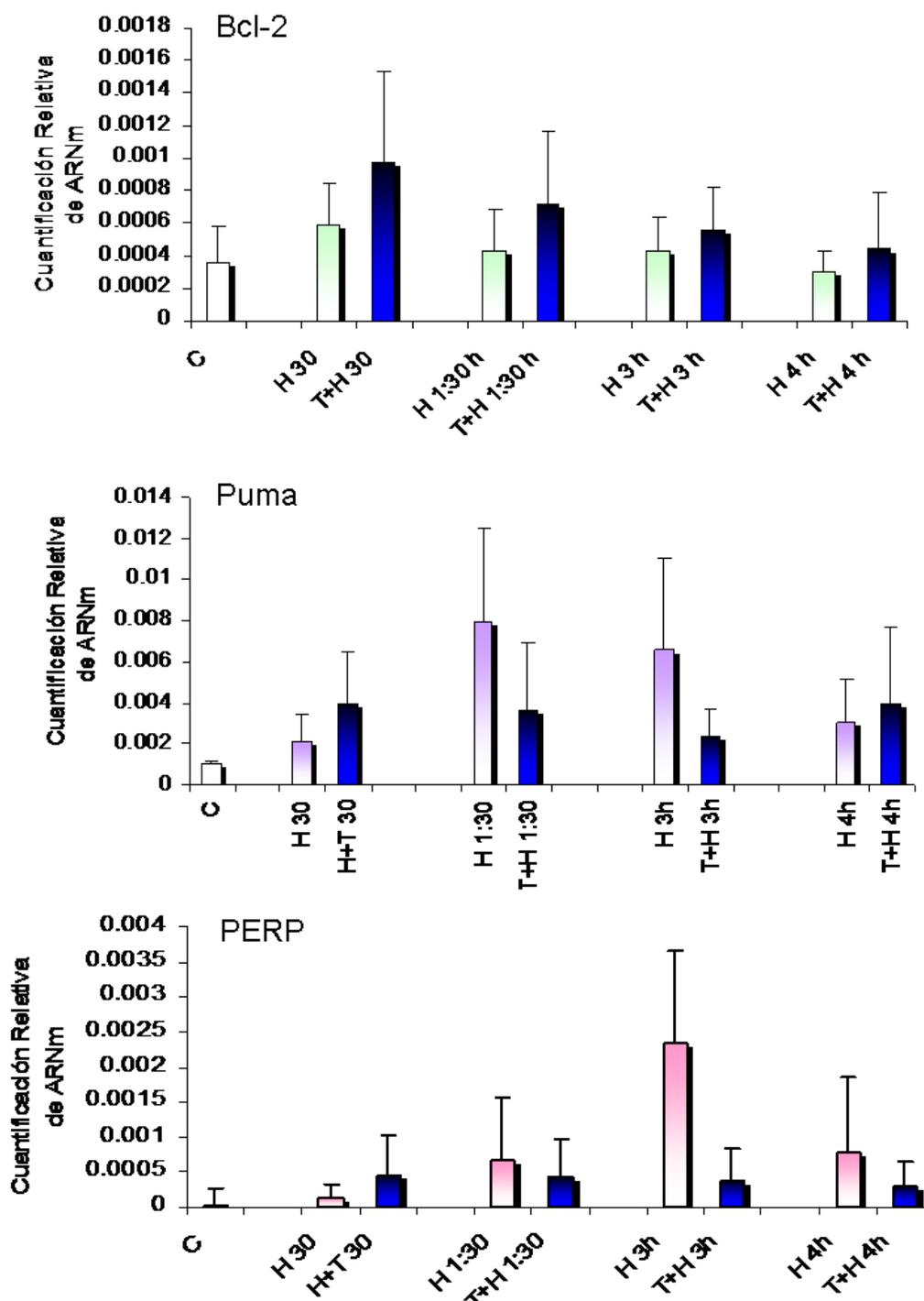


Figura 33: Efecto de la testosterona sobre la expresión de genes pro y antiapoptóticos. Los niveles de los transcritos de Bcl-2, Puma y PERP se determinaron por qPCR como se describió en *Metodología*, a partir de cultivos de C2C12 preincubados con testosterona 10^{-9} M durante 60 min y luego expuestos a H_2O_2 1 mM durante 30 minutos (T+H 30), 1 hora 30 min (T+H 1:30), 3 horas (T+H 3h) y 4 horas (T+H 4h), o bien tratados con H_2O_2 1 mM sola durante los mismos períodos de tiempo especificados; (C) células sin tratar. Los niveles de expresión de los transcritos se expresan en unidades relativas a la expresión del gen GAPDH.

DISCUSIÓN

En este capítulo se evaluaron algunos de los componentes *upstream* de las rutas de señalización clásicas de la apoptosis, que actuarían o no como factores de transcripción y que podrían desencadenar, finalmente, la respuesta apoptótica y en paralelo, el rol de la testosterona durante la activación de estas señales. Finalmente se determinaron los niveles de expresión de proteínas pro y antiapoptóticas y la capacidad de regulación de los niveles de éstos mensajeros por parte de la hormona.

El estrés oxidativo provocado por la exposición al H₂O₂, induce en las células C2C12 la activación de p53 de manera tiempo-dependiente, con un nivel máximo de fosforilación a la 1-2 horas de tratamiento, tiempo a partir del cual decae su activación. La vía p53 es promovida por una amplia gama de estímulos que amenazan con afectar la integridad genómica o la adecuada proliferación celular, siendo p53 el eje central de esta intrincada red, integrando y traduciendo estos estímulos en la respuesta más apropiada (arresto del ciclo celular, reparación del ADN, senescencia, apoptosis). La respuesta desencadenada por p53, se verá afectada por el tipo celular, la naturaleza y duración del estímulo, y por la amplia variedad de moduladores que regulan su estabilidad y actividad [Murray-Zmijewski et al. 2008; Levine y Oren 2009; Vousden y Prives 2009; Vousden y Ryan 2009]. En este capítulo se observó, por ensayos inmunocitoquímicos y por *Western blot*, que la activación de p53 inducida por el H₂O₂ es reducida por el tratamiento previo con testosterona. Las condiciones oxidativas estresantes a las que se someten los cultivos de C2C12 por el tratamiento con H₂O₂, son atenuadas en presencia de la hormona, y las condiciones ambientales se vuelven menos adversas, por lo que el estímulo estresante inductor de la activación de p53 es de menor intensidad.

Esta proteína ejerce su acción esencialmente como factor de transcripción, siendo capaz de promover la expresión coordinada de una amplia gama de genes *target* responsables de arrestar el ciclo celular, llevar a senescencia o apoptosis [Levine y Oren 2009]. Según el tipo celular, el estímulo estresante y el medio ambiente extracelular, la activación de p53 puede llevar a apoptosis en lugar de provocar el arresto del ciclo celular,

induciendo la transactivación de un número de genes apoptóticos tales como Bax, Bid, Puma, Noxa, p53 AIP-1, PERP [Miyashita y Reed 1995; Oda et al. 2000a, 2000b; Nakano y Vousden 2001; Sax et al. 2002] y la represión de genes antiapoptóticos como Bcl-2 y Bcl-XL [Miyashita et al. 1994a, 1994b].

Una de las formas con que p53 induce apoptosis es mediante la regulación positiva de la expresión de p66Shc, una proteína adaptadora que amplifica la generación de peróxido de hidrógeno mitocondrial [Trinei et al. 2002]. P66Shc es un miembro de la familia de proteínas ShcA, la cual comprende además dos proteínas adaptadoras citoplasmáticas p52Shc y p46Shc que participan en la regulación de la proliferación, asociadas a la vía de señalización de Ras [Pelicci et al. 1992]. Si bien se ha reportado la capacidad de p66Shc de competir por los sitios de ligado a Grb2 y regular negativamente la vía de Ras mediada por p52Shc/p46Shc [Migliaccio et al. 1997; Okada et al. 1997], su principal función comprende la regulación de vías implicadas en el metabolismo de ROS y la apoptosis [Migliaccio et al. 1999; Trinei et al. 2002]. En 1999, Migliaccio y colaboradores descubrieron que la participación de p66Shc en las vías de señalización activadas por ROS, favorecía la apoptosis, el daño tisular y el envejecimiento. Observaron que la duración de la vida de ratones transgénicos carentes de p66Shc, era un 30-40% más larga que la de los ratones *wild-type*. Por lo que p66Shc fue propuesta como un regulador de la longevidad en mamíferos, despertando gran interés en el estudio del envejecimiento. Efectos protectivos frente a la apoptosis también han sido reportados en timocitos y linfocitos T deficientes en p66Shc [Pacini et al. 2004].

A diferencia de p46Shc y p52Shc, p66Shc posee un dominio adicional rico en prolina N-terminal (CH2), con un sitio de fosforilación (Serina 36). La fosforilación en este residuo, es esencial en su respuesta al estrés oxidativo y su acción apoptótica. Varios estudios han demostrado que p66Shc se fosforila en Ser36, en respuesta a la exposición a los rayos UV o al tratamiento con H₂O₂ [Migliaccio et al. 1999; Le et al. 2001]. Dependiendo del contexto celular y de la naturaleza del estímulo, distintas quinasas pueden fosforilar p66Shc, dentro de las cuales se encuentran la PKC β y JNK [Le et al. 2001; Pinton et al. 2007]. Esta fosforilación, induce la translocación de p66Shc desde el citosol a la mitocondria, en donde ejerce

su acción apoptótica provocando alteraciones en la estructura y funcionalidad de la organela, actuando como enzima redox generadora de ROS, induciendo la apertura del poro de transición mitocondrial y la oxidación y liberación de citocromo c [Giorgio et al. 2005; Pinton et al. 2007]. Si bien aún se desconoce en su totalidad los mecanismos implicados en la translocación e internalización de p66Shc en la mitocondria, la fosforilación en Ser 36 sería el punto inicial y fundamental de dicho proceso.

En este trabajo, se demostró que la testosterona regula negativamente la activación/fosforilación de la proteína apoptótica p66Shc, inducida por el H₂O₂. El tratamiento hormonal previo al estímulo apoptótico, logró reducir los niveles de p-p66Shc y su localización mitocondrial, aumentados tras el tratamiento con H₂O₂. El estrés oxidativo induce en las células C2C12, la activación de p53, el cual contribuye probablemente al aumento de los niveles de p66Shc circulantes. Además, el H₂O₂ induce la activación JNK, la cual podrá actuar ya sea como quinasa activadora del *pool* de p66Shc citosólico, induciendo su translocación a mitocondria para que ejerza allí su acción apoptótica [Le et al. 2001] o bien activando y estabilizando a p53 [Buschmann et al. 2000; Davis 2000]. En *stem cells* embrionarias ha sido demostrado que el H₂O₂ provoca la fosforilación de JNK mientras que la DHT, a través del AR, disminuye este efecto y los niveles de ROS, aumentando la actividad de la catalasa [Lee et al. 2007]. En músculo de ratas seniles se ha encontrado a JNK altamente fosforilada y el tratamiento con testosterona ha revertido esta situación disminuyendo, en paralelo, la expresión de la proteína p21 [Kovacheva et al. 2010]. En concordancia con lo observado por estos autores, en este trabajo se demostró que el tratamiento con testosterona previo a la inducción de apoptosis, revierte la fosforilación/activación de JNK inducida por el H₂O₂. La reducción en la activación de JNK, por acción de la testosterona, podría ser responsable, en parte, de la disminución en la fosforilación de p53 y de p66Shc (y su translocación a mitocondria).

En células MEFs, ha sido reportado que dentro de la mitocondria, p66Shc se encuentra formando complejos de alto peso molecular con distintas proteínas, dentro de las cuales se encuentra la mtHSP70, chaperona miembro de la familia de las HSP70, de localización mitocondrial. El tratamiento con agentes proapoptóticos como la radiación UV o H₂O₂

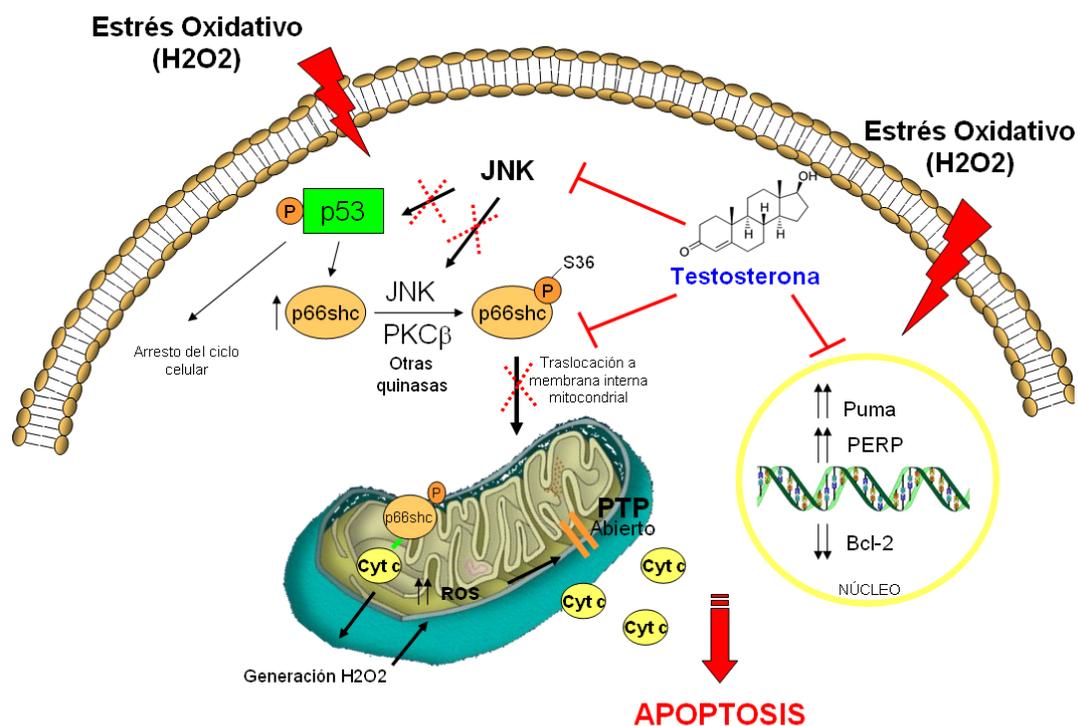
inducen la disociación de estos complejos y la liberación de p66Shc, la cual puede ejercer de esta manera, su acción apoptótica como enzima redox en la mitocondria [Orsini et al. 2001]. Para corroborar este comportamiento en el modelo experimental estudiado y evaluar los efectos de la testosterona sobre la disociación de estos complejos, las fracciones mitocondrial y citosólica de las células C2C12 fueron sometidas, luego de los distintos tratamientos, a la inmunoprecipitación mediante el empleo de un anticuerpo específico contra la HSP70. Los inmunoprecipitados fueron luego analizados por *Western blot* utilizando un anti-p-p66Shc. Si bien una tenue banda de ~66 kDa fue detectada por encima de las inmunoglobulinas en ambas fracciones, sugiriendo la interacción física entre ambas proteínas, no se observaron prácticamente cambios en los distintos tratamientos. Probablemente los bajos niveles de proteínas, hacen imposible la visualización de cambios claros por estas técnicas.

Estudios sobre la distribución subcelular de p66Shc en fibroblastos embrionarios de ratón (células MEFs), mostraron que alrededor del 32% se localiza en el citoplasma, un 24% en el retículo endoplasmático y un 44% en la mitocondria [Orsini et al. 2004]. Dentro de la mitocondria, un 35% de p66Shc se encuentra en el espacio intermembrana, un 56% asociada a la membrana interna y un 9% en la matriz mitocondrial [Giorgio et al. 2005]. Las diferencias en los niveles de su distribución subcelular, dependerán de las influencias externas que induzcan la translocación de p66Shc. Ha sido reportado en células MEFs, que si bien la fosforilación en Ser 36 es un evento clave para la translocación de p66Shc, en el *pool* mitocondrial no se detecta la proteína fosforilada [Giorgio et al. 2005]. Sin embargo, estudios posteriores del mismo grupo de trabajo demuestran un aumento en los niveles de p-p66Shc en la fracción mitocondrial de ratones seniles respecto a los ratones jóvenes [Lebiedzinska et al. 2009]. Teniendo en cuenta la teoría de los radicales libres en el envejecimiento [Harman 1956], se puede suponer que p66Shc está participando en la respuesta celular al estrés oxidativo en la adultez, lo que explica el aumento en la producción de radicales libres y de los daños producidos por los mismos en ratones seniles, así como también la resistencia al estrés oxidativo en animales deficientes en p66Shc.

Por ensayos inmunocitoquímicos se intentó entonces, determinar la localización subcelular de p66Shc en las células C2C12, luego del tratamiento con H₂O₂ y la influencia del pretratamiento hormonal, sobre los efectos del agente apoptótico. Sorprendentemente, los controles de células tratadas con el vehículo de la hormona o bien con testosterona, mostraron una clara localización nuclear de p-p66Shc. Hasta el momento, no existen reportes que describan una localización no clásica de esta proteína en núcleo, ni de la función que podría estar ejerciendo a este nivel. Sólo en embriones bovinos fue detectada la localización nuclear y perinuclear de p66Shc [Favetta et al. 2007], aunque se desconoce el rol que cumple a este nivel. Nuestras especulaciones apuntan a la regulación en la activación o inactivación de algún factor de transcripción, como ya fue descrito para los factores de transcripción de la familia *Forkhead* [Nemoto y Finkel 2002], o bien que se encuentre unida a alguna chaperona o corregulador de la transcripción génica. Se observó también que luego del tratamiento con H₂O₂ se produce, no solo el aumento en el número de células con la morfología clásica apoptótica, sino también el aumento de la localización mitocondrial de p-p66Shc, evidenciada por la señal amarilla resultante del *merge* de las imágenes individuales. A su vez, estas células apoptóticas parecen “vaciar” sus núcleos de p-p66Shc, lo que sugiere una posible translocación de la proteína desde el núcleo hacia la mitocondria, para ejercer allí su acción apoptótica. El tratamiento con testosterona previo a la inducción de apoptosis revierte los efectos del H₂O₂, observándose nuevamente una clara marcación nuclear. Tras la activación de las PKC por el tratamiento con PMA, se observaron los mismos efectos desencadenados por el H₂O₂, incluso aún más marcados, lo que le confiere a estas quinasas un claro efecto apoptótico en las células C2C12, así como también un importante rol en la modulación de la activación de p66Shc. La utilización de un inhibidor de JNK previo a la inducción de apoptosis, bloqueó casi completamente los efectos del H₂O₂ observándose las células C2C12 con su clásica forma estrellada, sin la presencia de células picnóticas y con el mismo patrón en lo que respecta a la localización y activación de p-p66Shc, que el observado en los controles, lo cual implica a JNK como una proteína clave en las vías de señalización que llevan a la apoptosis de las células C2C12.

Por ensayos de PCR en tiempo real, se determinaron también los niveles de ARNm de proteínas pro y antiapoptóticas en la línea celular C2C12, luego del tratamiento con distintos tiempos de H₂O₂, evaluándose también el efecto del tratamiento hormonal previo al estímulo oxidativo. Los resultados obtenidos mostraron que el H₂O₂ regula negativamente la expresión relativa de la proteína antiapoptótica Bcl-2 en función del tiempo, al mismo tiempo que provoca el incremento en los niveles de ARNm de las proteínas apoptóticas Puma (con un máximo de expresión a la hora y media de tratamiento con H₂O₂) y PERP (máximo de expresión a las 3 horas). Sin embargo, en presencia de testosterona, los efectos del H₂O₂ son contrarrestados, disminuyendo la regulación negativa de Bcl-2 y atenuando el incremento del ARNm de las proteínas apoptóticas Puma y PERP, lo que le confiere a la hormona, también un rol protector a nivel de la regulación de la transcripción génica.

Si bien son necesarios estudios adicionales para esclarecer el rol de la testosterona en las vías de señalización que involucran a p53 y p66Shc, en este capítulo se demostró la acción protectora del esteroide frente a la apoptosis, al atenuar la activación de estas proteínas, inducidas por el H₂O₂. Además la testosterona reduce la activación de JNK (posible activadora de p66Shc y p53) mostrando a dicha quinasa con un rol central durante la inducción de la apoptosis en las células C2C12. Asimismo, se demostró que la hormona es capaz de reducir los efectos del H₂O₂ sobre la regulación negativa de genes antiapoptóticos y la inducción de la expresión de genes apoptóticos, lo que sugiere un efecto antiapoptótico de la testosterona a nivel de la regulación génica.



Los resultados presentados en este trabajo, permiten comenzar a esclarecer los mecanismos moleculares activados ante el estrés oxidativo inducido con H_2O_2 en las células musculares C2C12 y el rol que cumple la testosterona y su receptor en estos eventos. Se ha observado, que dependiendo de la duración del estímulo oxidante, las células C2C12 responden de una manera bifásica. A tiempos cortos de exposición al H_2O_2 las células activan vías asociadas a eventos de supervivencia, como un mecanismo de defensa ante el estrés oxidativo. De perdurar el estímulo, las células inician el proceso de muerte celular por apoptosis, provocándose las alteraciones morfológicas típicas como la fragmentación nuclear, redistribución/disfunción mitocondrial y desorganización del citoesqueleto. Además se produce el clivaje irreversible de PARP, el aumento en la expresión y localización mitocondrial de Bax, la apertura del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial y pérdida del potencial de membrana mitocondrial, así como también la activación de p53, p66Shc y JNK. Sin embargo, el pretratamiento con testosterona reduce los efectos apoptóticos inducidos por el H_2O_2 , mediando los efectos protectivos de la testosterona, el AR con localización clásica (nuclear) y no clásica (mitocondrias y microdominios). Asimismo, la testosterona es capaz de reducir la expresión

de los genes apoptóticos (Puma y PERP) que el H₂O₂ regula positivamente y aumentar la expresión del gen antiapoptótico Bcl-2, regulado negativamente por el inductor de apoptosis. Así, la testosterona cumpliría un importante rol protectorio a nivel transcripcional.

La hormona favorecería entonces, la expresión de genes relacionados con la supervivencia respecto a aquellos genes apoptóticos y antiproliferativos, ejerciendo de esta manera su efecto protectorio a nivel de la expresión génica.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES GENERALES

Puntualmente, los datos obtenidos permiten concluir que:

➤ Las células C2C12 responden de manera bifásica al agente apoptótico, activando a tiempos cortos de exposición al H₂O₂, un mecanismo de defensa que implica vías asociadas a eventos de supervivencia, mientras que de perdurar el estímulo, las células inician finalmente el proceso de apoptosis.

➤ La exposición al H₂O₂ por tiempos largos induce la apoptosis de las células C2C12, sin embargo las alteraciones morfológicas típicas como la fragmentación nuclear, redistribución/disfunción mitocondrial y desorganización del citoesqueleto, son revertidas por la testosterona.

➤ La activación de Bad, el clivaje selectivo de PARP y el aumento de la expresión de Bax y de su localización mitocondrial, inducidas por el agente apoptótico, se ven reducidas por el tratamiento hormonal, participando el AR en estos eventos.

➤ La testosterona reduce la expresión de Bax y aumenta los niveles de actina de una manera dosis dependiente.

➤ La testosterona previene la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y la apertura del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial, inducidos por el H₂O₂.

➤ El AR se localiza de manera no clásica en mitocondrias y membrana plasmática, específicamente en caveolas y *rafts*.

➤ La localización del AR en caveolas y *rafts* implica la interacción física del receptor con Caveolina-1. Esta asociación se pierde luego del tratamiento con testosterona. El estudio de las fracciones subcelulares

sugiere la translocación del AR desde la membrana plasmática al núcleo, cuando es activado por la hormona.

➤ La testosterona previene la activación de p53 y p66Shc, al mismo tiempo que reduce la fosforilación de JNK (quinasa involucrada en la regulación de la activación de estas proteínas).

➤ La inducción de la expresión de los genes apoptóticos Puma y PERP, así como la regulación negativa del gen antiapoptótico Bcl-2 inducidos por el H₂O₂, son contrarrestados por el tratamiento hormonal.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

Abramoff MD, Magelhaes PJ y Ram SJ (2004). Image processing with Image J. *Biophotonics International*, 11: 36–42.

AgoulNIK IU, Bingman WE 3rd, Nakka M, Li W, Wang Q, Liu XS, Brown M, y Weigel NL (2008). Target genespecific regulation of androgen receptor activity by p42/p44 mitogen-activated protein kinase. *Mol Endocrinol*, 22: 2420-2432.

Alexaki VI, Charalampopoulos I, Kampa M, Nifli AB, Hatzoglou A, Gravanis A y Castanas E (2006). Activation of membrane estrogen receptors induce pro-survival kinases. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 98: 97–110.

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

Azzouni F, Godoy A, Li Y y Mohler J (2012). The 5 Alpha-Reductase Isozyme Family: A Review of Basic Biology and Their Role in Human Diseases. *Adv Urol*, 2012: 530121.

Baas AS y Berk BC (1995). Differential activation of mitogen-activated protein kinases by H₂O₂ and O₂⁻ in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 77: 29–36.

Bain DL, Heneghan AF, Connaghan-Jones KD y Miura MT (2007). Nuclear receptor structure: implications for function. *Annu Rev Physiol*, 69: 201–20.

Barron AM y Pike CJ (2012). Sex hormones, aging and Alzheimer's disease. *Front Biosci (Elite Ed)*, 4: 976-997.

Bartsch W, Kreig M y Voigt KD (1980). Quantitation of endogenous testosterone, 5-alpha-dihydrotestosterone and 5-alpha-androstane-3-alpha, 17-beta-diol in subcellular fractions of the prostate, bulbocavernosus/levator ani muscle, skeletal muscle and heart muscle of the rat. *J Steroid Biochem*, 13: 259-267.

Bassil N, Alkaade S y Morley JE (2009). The benefits and risks of testosterone replacement therapy: a review. *Ther Clin Risk Manag*, 5: 427–448.

Baumgartner RN, Waters DL, Gallagher D, Morley JE y Garry PJ (1999). Predictors of skeletal muscle mass in elderly men and women. *Mech Ageing Dev*, 107: 123–136.

Beato M (1989). Gene regulation by steroid hormones. *Cell*, 56: 335–44.

Bellido MC (1999). Reproducción en el varón. Fisiología Humana. Editado por Tresguerres JAF. Madrid, España: *McGRAW-Hill-Interamericana*; 1999: 1033-1047.

Benoit G, Cooney A, Giguere V, Ingraham H, Lazar M, Muscat G, Perlmann T, Renaud JP, Schwabe J, Sladek F, Tsai MJ y Laudet V (2006). International Union of Pharmacology. LXVI. Orphan Nuclear Receptors. *Pharmacol Rev*, 58(4): 798-836.

Benten WP, Lieberherr M, Giese G, Wrehlke C, Stamm O, Sekeris CE, Mossmann H y Wunderlich F (1999). Functional testosterone receptors in plasma membrane of T cells. *FASEB J*, 13: 123-133.

Berenbaum SA y Beltz AM (2011). Sexual differentiation of human behavior: Effects of prenatal and pubertal organizational hormones. *Front Neuroendocrinol*, 32: 183–200.

Bhasin S, Calof OM, Storer TW, Lee ML, Mazer NA, Jasuja R, Montori VM, Gao W y Dalton JT (2006). Drug insight: testosterone and selective androgen receptor modulators as anabolic therapies for chronic illness and aging. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 2: 146–159.

Bhasin S, Storer TW, Berman N, Callegari C, Clevenger B, Phillips J, Bunnell TJ, Tricker R, Shirazi A y Casaburi R (1996). The effects of supraphysiologic doses of testosterone on muscle size and strength in normal men. *N Engl J Med*, 335(1): 1–7.

Bhasin S, Woodhouse L, Casaburi R, Singh AB, Bhasin D, Berman N, Chen X, Yarasheski KE, Magliano L, Dzekov C, Dzekov J, Bross R, Phillips J, Sinha-Hikim I, Shen R y Storer TW (2001a). Testosterone dose-response relationships in healthy young men. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 281: E1172-81.

Bhasin S, Woodhouse L y Storer TW (2001b). Proof of the effect of testosterone on skeletal muscle. *J Endocrinol*, 170: 27-38.

Blau H, Chiu C y Webster C (1983). Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons. *Cell*, 32: 1171-1180.

Boissonneault G (2001). Evidence of apoptosis in the castration-induced atrophy of the rat levator ani muscle. *Endocr Res*, 27: 317-328.

Borst SE, Conover CF, Carter CS, Gregory CM, Marzetti E, Leeuwenburgh C, Vandeborne K y Wronski TJ (2007). Anabolic effects of testosterone are preserved during inhibition of 5 alpha-reductase. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 293(2): E507-E514.

Borst SE, Quindry JC, Yarrow JF, Conover CF y Powers SK (2010). Testosterone administration induces protection against global myocardial ischemia. *Horm Metab Res*, 42(2): 122-129.

Bradford 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.

Bran DW, Hendry LB y Mahesh VB (1995). Emerging diversities in the mechanism of action of steroid hormones. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 52: 113-33.

Brazil DP y Hemmings BA (2001). Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biocheml Sci*, 26: 657-664.

Brown CJ, Goss SJ, Lubahn DB, Joseph DR, Wilson EM, French FS, Willard HF (1989). Androgen receptor locus on the human X chromosome: regional

localization to Xq11–12 and description of a DNA polymorphism. *Am J Hum Genet*, 44: 264–269.

Brown DA y Rose JK (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell*, 68: 533–544.

Brown TJ, Khan T y Jones KJ (1999). Androgen induced acceleration of functional recovery after rat sciatic nerve injury. *Restor Neurol Neurosci*, 15: 289–295.

Brown-Séquard CE (1889). Note on the effects produced on man by subcutaneous injections of a liquid obtained from the testicles of animals. *Lancet*, 134: 105.

Bruey JM, Ducasse C, Bonniaud P, Ravagnan L, Susin SA, Diaz-Latoud C, Gurbuxani S, Arrigo AP, Kroemer G, Solary E y Garrido C (2000). Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol*, 2: 645–652.

Buschmann T, Yin Z, Bhoumik A y Ronai Z (2000). Amino-terminal-derived JNK fragment alters expression and activity of c-Jun, ATF2, and p53 and increases H₂O₂-induced cell death. *J Biol Chem*, 275: 16590-16596.

Cammarata PR, Chu S, Moor A, Wang Z, Yang SH y Simpkins JW (2004). Subcellular distribution of native estrogen receptor alpha and beta subtypes in cultured human lens epithelial cells. *Exp Eye Res*, 78: 861–871.

Cato AC, Nestl A y Mink S (2002). Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways. *Sci STKE*, 138: RE9.

Chang WJ, Ying YS, Rothberg KG, Hooper NM, Turner AJ, Gambliel HA, De Gunzburg J, Mumby SM, Gilman AG y Anderson RG (1994). Purification and characterization of smooth muscle cell caveolae. *J Cell Biol*, 126(1): 127-138.

Charge SB y Rudnicki MA (2004). Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev*, 84: 209–238.

Chen JQ, Delannoy M, Cooke C y Yager JD (2004). Mitochondrial localization of ERalpha and ERbeta in human MCF7 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 286: E1011–1022.

Chen X, Deng Y, Zhou Z, Tao Q, Zhu J, Li X, Chen J y Hou J (2010). 17beta-estradiol combined with testosterone promotes chicken osteoblast proliferation and differentiation by accelerating the cell cycle and inhibiting apoptosis in vitro. *Vet Res Commun*, 34: 143–152.

Chen X, Thakkar H, Tyan F, Gim S, Robinson H, Lee C, Pandey SK, Nwokorie C, Onwudiwe N, Srivastava RK (2001). Constitutively active Akt is an important regulator of TRAIL sensitivity in prostate cancer. *Oncogene*, 20(42): 6073-6083.

Cheng J, Watkins SC y Walker W (2007). Testosterone Activates Mitogen-Activated Protein Kinase via Src Kinase and the Epidermal Growth Factor Receptor in Sertoli Cells. *Endocrinology*, 148: 2066-2074.

Cinar B, Mukhopadhyay NK, Meng G y Freeman MR (2007). Phosphoinositide 3-kinase-independent nongenomic signals transit from the androgen receptor to Akt1 in membrane raft microdomains. *J Biol Chem*, 282: 29584-29593.

Cingolani HE y Houssay AB (2010). Fisiología humana de Houssay. 7ma edición. Editado por *El Ateneo*. Buenos Aires, Argentina. 2010: 697-706.

Cooper R, Tajbakhsh S, Mouly V, Cossu G, Buckingham M y Butler-Browne G (1999). In vivo satellite cell activation via Myf5 and MyoD in regenerating mouse skeletal muscle. *J Cell Sci*, 112: 2895-2901.

Crompton M, Virji S y Ward JM (1998). Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *Eur J Biochem*, 258: 729–735.

Cross TG, Scheel-Toellner D, Henriquez NV, Deacon E, Salmon M y Lord JM (2000). Serine/threonine protein kinases and apoptosis. *Exp Cell Res*, 256: 34–41.

Crossthwaite AJ, Hasan S y Williams RJ (2002). Hydrogen peroxide-mediated phosphorylation of ERK1/2, Akt/PKB and JNK in cortical neurones: dependence on Ca²⁺C and PI3-kinase. *J Neurochem*, 80: 24–35.

Daintith J y Gjertsen D (1999). Oxford Dictionary of Scientists. Oxford: Oxford University Press, p468.

Dakin CL, Wilson CA, Kallo I, Coen CW y Davies DC (2008). Neonatal stimulation of 5-HT₂ receptors reduces androgen receptor expression in the rat anteroventral periventricular nucleus and sexually dimorphic preoptic area. *Eur J Neurosci*, 27: 2473–2480.

Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y y Greenberg ME (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell intrinsic death machinery. *Cell*, 91: 231–241.

Davis RJ (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*, 103(2): 239-252.

Dehm SM y Tindall DJ (2007). Androgen Receptor Structural and Functional Elements: Role and Regulation in Prostate Cancer. *Mol Endocrinol*, 21(12): 2855-2863.

Del Peso L, González-García M, Page C, Herrera R y Nuñez G (1997). Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science*, 278: 687–689.

Desagher S y Martinou JC (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol*, 1: 369–377.

Dirks A y Leeuwenburgh C (2002). Apoptosis in skeletal muscle with aging. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 282: R519–R527.

Dupont-Versteegden EE (2005). Apoptosis in muscle atrophy: relevance to sarcopenia. *Exp Gerontol*, 40: 473–481.

Dupree P, Parton RG, Raposo G, Kurzchalia TV y Simons K (1993). Caveolae and sorting in the trans-Golgi network of epithelial cells. *EMBO J*, 12: 1597–1605.

Echeverría PC y Picard D (2010). Molecular chaperones, essential partners of steroid hormone receptors for activity and mobility. *Biochim Biophys Acta*, 1803: 641-649.

Eick GN y Thornton JW (2011). Evolution of steroid receptors from an estrogen-sensitive ancestral receptor. *Mol Cell Endocrinol*, 334: 31–38.

Enmark E y Gustafsson JA (1996). Orphan nuclear receptors- The first eight years. *Mol Endocrinol*, 10(11): 1293-307.

Erkkila K, Henriksen K, Hirvonen V, Rannikko S, Salo J, Parvinen M y Dunkel L (1997). Testosterone regulates apoptosis in adult human seminiferous tubules in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*, 82: 2314–2321.

Ernster L y Schatz G (1981). Mitochondria: a historical review. *J Cell Biol*, 91: 227-255.

Estrada M, Espinosa A, Müller M y Jaimovich E (2003). Testosterone stimulates intracellular calcium release and mitogen-activated protein kinases via a G protein-coupled receptor in skeletal muscle cells. *Endocrinology*, 144: 3586-3597.

Estrada M, Varshney A y Ehrlich B (2006). Elevated testosterone induces apoptosis in neuronal cells. *J Biol Chem*, 281: 25492–25501.

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

Favetta LA, Madan P, Mastromonaco GF, St John EJ, King WA y Betts DH (2007). The oxidative stress adaptor p66Shc is required for permanent embryo arrest in vitro. *BMC Dev Biol*, 7: 132.

Feldman BJ y Feldman D (2001). The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer*, 1: 34-45.

Fernando SM, Rao P, Niel L, Chatterjee D, Stagljar M y Monks DA (2010). Myocyte androgen receptors increase metabolic rate and improve body composition by reducing fat mass. *Endocrinology*, 151(7): 3125-3132.

Fiorani M, Cantoni O, Tasinato A, Boscoboinik D y Azzi A (1995). Hydrogen peroxide- and fetal bovine serum-induced DNA synthesis in vascular smooth muscle cells: positive and negative regulation by protein kinase C isoforms. *Biochim Biophys Acta*, 1269: 98-104.

Fischer L, Catz D y Kelley D (1993). An androgen receptor mRNA isoform associated with hormone-induced cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 8254-8258.

Fix C, Jordan C, Cano P y Walker WH (2004). Testosterone activates mitogen-activated protein kinase and the cAMP response element binding protein transcription factor in Sertoli cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 110919-10924.

Fogari R, Preti P, Zoppi A, Fogari E, Rinaldi A, Corradi L y Mugellini A (2005). Serum testosterone levels and arterial blood pressure in the elderly. *Hypertens Res*, 28: 625-630.

Foradori SD, Weiser MJ y Handa RJ (2008). Non-genomic actions of androgens. *Front Neuroendocrinol*, 29: 169-181.

Fragkaki AG, Angelis YS, Koupparis M, Tsantili-Kakoulidou A, Kokotos G, y Georgakopoulos C (2009). Structural characteristics of anabolic androgenic steroids contributing to binding to the androgen receptor and to their

anabolic and androgenic activities. Applied modifications in the steroidal structure. *Steroids*, 74: 172–197.

Freeman ER, Bloom DA y McGuire EJ (2001). A brief history of testosterone. *J Urol*, 165: 371-373.

Friday BB y Pavlath GK (2001). A calcineurin- and NFAT-dependent pathway regulates Myf5 gene expression in skeletal muscle reserve cells. *J Cell Sci*, 114: 303–310.

Galigniana MD, Echeverría PC, Erlejman A y Piwien-Pilipuk G (2010). Role of molecular chaperones and TPR-domain proteins in the cytoplasmic transport of steroid receptors and their passage through the nuclear pore. *Nucleus*, 1: 299-308.

Gao W, Bohl CE y Dalton JT (2005). Chemistry and structural biology of androgen receptor. *Chem Rev*, 105: 3352–3370.

Gatson JW, Kaur P y Singh M (2006). Dihydrotestosterone differentially modulates the mitogen-activated protein kinase and the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathways through the nuclear and novel membrane androgen receptor in C6 cells. *Endocrinology*, 147: 2028–2034.

Gavrieli Y, Sherman Y y Ben-Sasson SA (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, 119: 493-501.

Gill A, Jamnongjt M y Hammes SR (2004). Androgens promote maturation and signalling in mouse oocytes independent of transcription: a release of inhibition model for mammalian oocyte meiosis. *Mol Endocrinol*, 18: 97-104.

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 y Pelicci PG (2005). Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. *Cell*, 122: 221–233.

Giorgio M, Trinei M, Migliaccio E y Pelicci PG (2007). Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8: 722–728.

Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R y Mathieu C (2001). An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, 25(4): 386-401.

Glueck CJ, Glueck HI, Stroop D, Speirs J, Hamer T y Tracy T (1993). Endogenous testosterone, fibrinolysis, and coronary heart disease risk in hyperlipidemic men. *J Lab Clin Med*, 122: 412–420.

Gobinet J, Poujol N y Sultan C (2002). Molecular action of androgens. *Mol Cell Endocrinol*, 198: 15–24.

Goldkorn T, Balaban N, Matsukuma K, Chea V, Gould R, Last J, Chan C y Chavez C (1998). EGF-receptor phosphorylation and signaling are targeted by H₂O₂ redox stress. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 19: 786–798.

Gorczyca W, Bruno S, Darzynkiewicz RJ, Gong J y Darzynkiewicz Z (1992). DNA strand break occurring during apoptosis: the early in situ detection by the terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays and prevention by serine protease inhibitors. *Int J Oncol*, 1: 639-648.

Green DR y Kroemer G (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*, 5684: 626–629.

Grutzner U, Keller M, Bach M, Kiemer AK, Meissner H, Bilzer M, Zahler S, Gerbes AL y Vollmar AM (2006). PI3-kinase pathway is responsible for antiapoptotic effects of atrial natriuretic peptide in rat liver transplantation. *World J Gastroenterol*, 7: 1049–1055.

Gu S, Papadopoulou N, Gehring EM, Nasir O, Dimas K, Bhavsar SK, Föller M, Alevizopoulos K, Lang F y Stournaras C (2009). Functional membrane

androgen receptors in colon tumors trigger pro-apoptotic responses in vitro and reduce drastically tumor incidence in vivo. *Mol Cancer*, 8: 114.

Guo Z y Qiu Y (2011). A new trick of an old molecule: androgen receptor splice variants taking the stage?! *Int J Biol Sci*, 7: 815–822.

Guyton KZ, Liu Y, Gorospe M, Xu Q y Holbrook NJ (1996). Activation of mitogen activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem*, 271: 4138–4142.

Haddad JG y Chyu KJ (1971). Competitive protein-binding radioassay for 25-hydroxycholecalciferol. *Biochim Biophys Acta*, 248: 471–481.

Haire N (1925). Rejuvenation: The Work of Steinach, Voronoff, and Others. New York: The Macmillan Company 1925.

Hansen B (1999). New images of a new medicine: visual evidence for the widespread popularity of therapeutic discoveries in America after 1885. *Bull Hist Med*, 73: 629-678.

Harman D (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*, 11: 298–300.

Hatzoglou A, Kampa M, Kogia C, Charalampopoulos I, Theodoropoulos PA, Anezinis P, Dambaki C, Papakonstanti EA, Stathopoulos EN, Stournaras C, Gravanis A y Castanas E (2005). Membrane androgen receptor activation induces apoptotic regression of human prostate cancer cells in vitro and in vivo. *J Clin Endocrinol Metab*, 90: 893–903.

Hawke TJ y Garry DJ (2001). Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol*, 91: 534–551.

Heemers HV y Tindall DJ (2007). Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex. *Endocr Rev*, 28:778-808.

Heinlein CA y Chang C (2001). Role of chaperones in nuclear translocation and transactivation of steroid receptors. *Endocrine*, 14(2): 143-149.

Heinlein CA y Chang C (2002). The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. *Mol Endocrinol*, 16: 2181-2187.

Herbst KL y Bhasin S (2004). Testosterone action on skeletal muscle. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 7: 271-277.

Herynk MH y Fuqua SA (2004). Estrogen receptor mutations in human disease. *Endocr Rev*, 25: 869-898.

Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS y Griffith R (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA-sequences. *Biotechnology*, 10(4): 413-417.

Hiipakka RA y Liao S (1998). Molecular mechanism of androgen action. *Trends Endocrinol Metab*, 9(8): 317-324.

Hirshbein LD (2000). The glandular solution: sex, masculinity, and aging in the 1920s. *J Hist Sex*, 9: 277-304.

Hoberman JM y Yesalis CE (1995). The history of synthetic testosterone. *Sci Am*, 272: 76.

Hsu YT, Wolter KG y Youle RJ (1997). Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *PNAS*, 94: 3668-3672.

Huppertz B, Tews DS y Kaufmann P (2001). Apoptosis and syncytial fusion in human placental trophoblast and skeletal muscle. *Int Rev Cytol*; 205: 215-253.

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

Isidori AM, Giannetta E, Greco EA, Gianfrilli D, Bonifacio D, Isidori A, Lenzi A y Fabbri A (2005). Effects of testosterone on body composition, bone metabolism and serum lipid profile in middle-aged men: a meta-analysis. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 63: 280–293.

Jiang B, Xiao W, Shi Y, Liu M y Xiao X (2005). Role of Smac/DIABLO in hydrogen peroxide-induced apoptosis in C2C12 myogenic cells. *Free Radic Biol Med*, 39: 658-667.

Jin L, Ai X, Liu L, Wang Z, Cheng Y y Qiao Z (2006). Testosterone induces apoptosis via Fas/FasL-dependent pathway in bone marrow-derived macrophages. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 28: 283–293.

Jin N y Rhoades RA (1997). Activation of tyrosine kinases in H₂O₂-induced contraction in pulmonary artery. *Am J Physiol*, 272: H2686–H2692.

Jordan K, Fromberger P, Stolpmann G y Müller JL (2011). The Role of Testosterone in Sexuality and Paraphilia-A Neurobiological Approach. Part I: Testosterone and Sexuality. *J Sex Med*, 8: 2993–3007.

Kallergi G, Agelaki S, Markomanolaki H, Georgoulas V y Stournaras C (2007). Activation of FAK/PI3K/Rac1 signaling controls actin reorganization and inhibits cell motility in human cancer cells. *Cell Physiol Biochem*, 20: 977–986.

Kampa M, Papakonstanti EA, Hatzoglou A, Stathopoulos EN, Stournaras C y Castanas E (2002). The human prostate cancer cell line LNCaP bears functional testosterone receptors, which increase PSA secretion and modify actin cytoskeleton. *FASEB J*, 16: 1429-1431.

Kampa M, Pelekanou V, Castanas E (2008). Membrane-initiated steroid action in breast and prostate cancer. *Steroids*, 73: 953–960.

Kang HY, Cho CL, Huang KL, Wang JC, Hu YC, Lin HK, Chang C y Huang KE (2004). Non-genomic androgen activation of phosphatidylinositol 3-

kinase/Akt signaling pathway in MC3T3-E1 osteoblasts. *J Bone Miner Res*, 19: 1181-1190.

Kaul SC, Yaguchi T, Taira K, Reddel RR y Wadhwa R (2003). Overexpressed mortalin (mot-2)/mthsp70/GRP75 and hTERT cooperate to extend the in vitro lifespan of human fibroblasts. *Exp Cell Res*, 286: 96-101.

Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH y Peter ME (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J*, 14: 5579-5588.

Kochakian CD (1993). History, chemistry and pharmacodynamics of anabolic-androgenic steroids. *Wien Med Wochenschr*, 143: 359-363.

Kovacheva E, Sinha Hikim A, Shen R, I Sinha I y Sinha-Hikim I (2010). Testosterone supplementation reverses sarcopenia in aging through regulation of myostatin, c-Jun NH2-terminal kinase, Notch, and Akt signaling pathways. *Endocrinology*, 151: 628-638.

Krabbe S, Christensen T, Worm J, Christiansen C y Transbl I (1978). Relationship between haemoglobin and serum testosterone in normal children and adolescents and in boys with delayed puberty. *Acta Paediat Scand*, 67: 655-658.

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jona´k J, Lind K, Sindelka R, Sjoback R, Sjogreen S, Strombom L, Stahlberg A y Zoric N (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*, 27: 95-125.

Kuiper G, Faber P, van Rooij H, van der Korput J, Ris-Stalpers C, Trapman J y Brinkmann AO (1989). Structural organization of the human androgen receptor gene. *J Mol Endocrinol*, 2: R1-R4.

Kujoth GC, Hiona A, Pugh TD, Someya S, Panzer K, Wohlgemuth SE, Hofer T, Seo AY, Sullivan R, Jobling WA, Morrow JD, Van Remmen H, Sedivy JM,

Yamasoba T, Tanokura M, Weindruch R, Leeuwenburgh C y Prolla TA. (2005). Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science*, 309: 481-484.

Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, Ellisman MH, Latterich M, Schneider R, Green DR y Newmeyer DD (2002). Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell*, 111: 331-342.

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

Laudet V (1997). Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J Mol Endocrinol*, 19: 207-226.

Lawson M y Purslow P (2000). Differentiation of myoblasts in serum-free media: effects of modified media are cell line-specific. *Cells Tissues Organs*, 167: 130-137.

Lazarow A y Cooperstein S (1953). Studies on the mechanism of Janus green B staining of mitochondria. *Exp Cell Res*, 5: 56-69.

Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG y Earnshaw WC (1994). Cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature*, 371: 346-347.

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

Lebiedzinska M, Duszynski J, Rizzuto R, Pinton P y Wieckowski MR (2009). Age-related changes in levels of p66Shc and serine 36-phosphorylated p66Shc in organs and mouse tissues. *Arch Biochem Biophys*, 486(1): 73-80.

Lee SH, Heo J, Lee MY y Han HJ (2007). Effect of dihydrotestosterone on hydrogen peroxide-induced apoptosis of mouse embryonic stem cells. *J Cell Physiol*, 216(1): 269-275.

Levin ER (2005). Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol Endocrinol*, 19(8): 1951-1959.

Levine AJ y Oren M (2009). The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer*, 9: 749-758.

Lexell J (1993). Ageing and human muscle: observations from Sweden. *Can J Appl Physiol*, 18: 2-18.

Li PF, Dietz R y von Harsdorf R (1997). Differential effect of hydrogen peroxide and superoxide anion on apoptosis and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circulation*, 96: 3602-3609.

Lieberherr M y Grosse B (1994). Androgens increase intracellular calcium concentration and inositol 1,4,5-triphosphate and diacylglycerol formation via a pertussis toxin-sensitive G protein. *J Biol Chem*, 269: 7217-7223.

Lisanti MP, Scherer PE, Tang Z y Sargiacomo M (1994b). Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains: a signalling hypothesis. *Trends Cell Biol*, 4: 231-235.

Lisanti MP, Scherer PE, Vidugiriene J, Tang Z, Hermanoski-Vosatka A, Tu YH, Cook RF y Sargiacomo M (1994a). Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J Cell Biol*, 126: 111-126.

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

Livak KJ y Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4): 402-408.

Losel R y Wehling M (2003). Non-genomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(1): 46-56.

Lubahn DB, Brown TR, Simental JA, Higgs HN, Migeon CJ, Wilson EM y French FS. (1989). Sequence of the intron/exon junctions of the coding region of the human androgen receptor gene and identification of a point mutation in a family with complete androgen insensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 9534-9538.

Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Jurgensmeier JM, Susin SA, Vieira HL, Prevost MC, Xie Z, Matsuyama S, Reed JC y Kroemer G (1998). Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science*, 281: 2027-2031.

Mauro A (1961). Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol*, 9: 493-495.

McKenna NJ y O' Malley BW (2002). Minireview: nuclear receptor coactivators--an update. *Endocrinology*, 143(7): 2461-2465.

Michels G y Hoppe UC (2008). Rapid actions of androgens. *Front. Neuroendocrinol*, 29: 182-198.

Migeon BR, Brown TR, Axelman J y Migeon CJ (1981). Studies of the locus for androgen receptor: localization on the human X chromosome and evidence for homology with the Tfm locus in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78: 6339-43.

Migliaccio A, Castoria G, Di Domenico M, de Falco A, Bilancio A, Lombardi M, Barone M V, Ametrano D, Zannini MS, Abbondanza C y Auricchio F (2000). Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor beta-*Src* complex triggers prostate cancer cell proliferation. *Embo J*, 19(20): 5406-5417.

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

Migliaccio E, Mele S, Salcini AE, Pelicci G, Lai KM, Superti-Furga G, Pawson T, Di Fiore PP, Lanfrancone L y Pelicci PG (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, Russo de Boland A y Boland R (2008). Expression and localization of estrogen receptor alpha in the C2C12 murine skeletal muscle cell line. *J Cell Biochem*, 104: 1254-1273.

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

Miyashita T, Harigai M, Hanada M y Reed JC (1994a). Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene. *Cancer Res*, 54: 3131-3135.

Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B y Reed JC (1994b). Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene*, 9: 1799-1805.

Miyashita T y Reed JC (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*, 80: 293–299.

Monje P y Boland R (2001). Subcellular distribution of native estrogen receptor alpha and beta isoforms in rabbit uterus and ovary. *J Cell Biochem*, 82: 467–479.

Monroe AK y Dobs AS (2013). The effect of androgens on lipids. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 20(2): 132-139.

Mooradian AD, Morley JE y Korenman SG (1987). Biological actions of androgens. *Endocr Rev*, 8(1): 1-28.

Morimoto S, Mendoza-Rodríguez CA, Hiriart M, Larrieta ME, Vital P y Cerbón MA (2005). Protective effect of testosterone on early apoptotic damage induced by streptozotocin in rat pancreas. *J Endocrinol*, 187: 217-224.

Normington K y Russell DW (1992). Tissue Distribution and Kinetic Characteristics of Rat Steroid 5 α -Reductase Isozymes. *J Biol Chem*, 267(27): 19548-54.

Munsch D, Watanabe-Fukunaga R, Bourdon JC, Nagata S, May E, Yonish-Rouach E y Reisdorf P (2000). Human and mouse Fas (APO-1/CD95) death receptor genes each contain a p53-responsive element that is activated by p53 mutants unable to induce apoptosis. *J Biol Chem*, 275: 3867-3872.

Munson PJ y Rodbard D (1980). Ligand: a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. *Anal Biochem*, 107: 220-239.

Murray-Zmijewski F, Slee EA y Lu X (2008). A complex barcode underlies the heterogeneous response of p53 to stress. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9: 702-712.

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

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

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

Nguyen TV, Yao M y Pike CJ (2005). Androgens activate mitogen-activated protein kinase signaling: role in neuroprotection. *J Neurochem*, 6: 1639-1651.

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

Oda K, Arakawa H, Tanaka T, Matsuda K, Tanikawa C, Mori T, Nishimori H, Tamai K, Tokino T, Nakamura Y y Taya Y (2000b). p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell*, 102: 849-862.

O'Groman DM, McKenna SL, McGahon AJ, Knox KA y Cotter TG (2000). Sensitization of HL60 human leukemic cells to cytotoxic drug-induced apoptosis by inhibition of PI3-kinase survival signals. *Leukemia*, 14: 602-611.

Ogilvie M, Yu X, Nicolas-Metral V, Pulido S, Liu C, Ruegg U y Noguchi C (2000). Erythropoietin stimulates proliferation and interferes with differentiation of myoblasts. *J Biol Chem*, 275: 39754-39761.

Okada S, Kao AW, Ceresa BP, Blaikie P, Margolis B y Pessin JE (1997). The 66-kDa Shc isoform is a negative regulator of the epidermal growth factor-stimulated mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem*, 272: 28042-28049.

Omwancha J y Brown TR (2006). Selective androgen receptor modulators: in pursuit of tissue-selective androgens. *Curr Opin Investig Drugs*, 7: 873-881.

Orsini F, Migliaccio E, Moroni M, Contursi C, Raker VA, 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 y Pelicci PG (2004). The life span determinant p66Shc localizes to mitochondria where it associates

with mitochondrial heat shock protein 70 and regulates transmembrane potential. *J Biol Chem*, 279: 25689-25695.

Orzechowski A, Grizard J, Jank M, Gajkowska B, Lokociejewska M y Zaron-Teperek MI (2002). Dexamethasone-mediated regulation of death and differentiation of muscle cells. Is hydrogen peroxide involved in the process? *Reprod Nutr Dev*, 42: 197-216.

Pacini S, Pellegrini M, Migliaccio E, Patrussi L, Ulivieri C, Ventura A, Carraro F, Naldini A, Lanfrancone L, Pelicci P y Baldari CT (2004). p66Shc promotes apoptosis and antagonizes mitogenic signaling in T cells. *Mol Cell Biol*, 24: 1747-1757.

Papa S, Zazzeroni F, Pham CG, Bubici C y Franzoso G (2004). Linking JNK signaling to NF-kappaB: a key to survival. *J Cell Sci*, 117(Pt 22): 5197-5208.

Papadopoulou N, Charalampopoulos I, Anagnostopoulou V, Konstantinidis G, Föller M, Gravanis A, Alevizopoulos K, Lang F y Stournaras C (2008). Membrane androgen receptor activation triggers down-regulation of PI-3K/Akt/NF-kappaB activity and induces apoptotic responses via Bad, FasL and caspase-3 in DU145 prostate cancer cells. *Mol Cancer*, 7: 88.

Papadopoulou N, Papakonstanti EA, Kallergi G, Alevizopoulos K y Stournaras C (2009). Membrane androgen receptor activation in prostate and breast tumor cells: molecular signaling and clinical impact. *IUBMB Life*, 61: 56-61.

Pelicci G, Lanfrancone L, Grignani F, McGlade J, Cavallo F, Forni G, Nicoletti I, Grignani F, Pawson T y Pelicci PG (1992). A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. *Cell*, 70: 90-104.

Penninger JM y Kroemer G (2003). Mitochondria, AIF and caspases – rivaling for cell death execution. *Nat Cell Biol*, 5: 97-99.

Petronilli V, Miotto G, Canton M, Brini M, Colonna R y Bernardi P (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.

Pike CJ, Nguyen TV, Ramsden M, Yao M, Murphy MP y Rosario ER (2008). Androgen cell signaling pathways involved in neuroprotective actions. *Horm Behav*, 53: 693–705.

Pike CJ, Carroll JC, Rosario ER y Barron AM (2009). Protective actions of sex steroid hormones in Alzheimer's disease. *Front Neuroendocrinol*, 30(2): 239-58.

Pinton P, Rimessi A, Marchi S, Orsini F, Migliaccio E, Giorgio M, Contursi C, Minucci S, Mantovani F, Wieckowski MR, Del Sal G, Pelicci PG y Rizzuto R (2007). Protein kinase C beta and prolyl isomerase 1 regulate mitochondrial effects of the lifespan determinant p66Shc. *Science*, 315(5812): 659–663.

Primeau AJ, Adhietty PJ y Hood DA (2002). Apoptosis in heart and skeletal muscle. *Can J Appl Physiol*, 27: 349-395.

Pulverer BJ, Kyriakis JM, Avruch J, Nikolakaki E y Woodgett JR (1991). Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature*, 353(6345): 670-674.

Rahman F y Christian HC (2007). Non-classical actions of testosterone: an update. *Trends Endocrinol Metab*, 18: 371-378.

Rao GN y Berk BC (1992). Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ Res*, 70: 593–599.

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

Reers M, Smiley ST, Mottola-Hartshorn C, Chen A, Lin M y Chen LB (1995). Mitochondrial membrane potential monitored by JC-1 dye. *Methods Enzymol*, 260: 406–417.

Riley T, Sontag E, Chen P y Levine A (2008). Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(5): 402-412.

Robbins SM, Quintrell NA, Bishop MJ (1995). Myristoylation and differential palmitoylation of the HCK protein-tyrosine kinases govern their attachment to membranes and association with caveolae. *Mol Cell Biol*, 15: 3507-3515.

Rosenblatt JD, Yong D y Parry DJ (1994). Satellite cell activity is required for hypertrophy of overloaded adult rat muscle. *Muscle Nerve*, 17: 608-613.

Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying Y, Glenney JR y Anderson RG (1992). Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell*, 68: 673-682.

Roubenoff R y Hughes VA (2000). Sarcopenia: current concepts. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 55: M716-M724.

Rucker D, Ezzat S, Diamandi A, Khosravi J y Hanley DA (2004). IGF-I and testosterone levels as predictors of bone mineral density in healthy, community-dwelling men. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 60(4): 491-499.

Sadekova S, Lehnert S y Chow TY (1997). Induction of PBP74/mortalin/Grp75, a member of the hsp70 family, by low doses of ionizing radiation: a possible role in induced radioresistance. *Int J Radiat Biol*, 72: 653-660.

Saito M, Korsmeyer SJ y Schlesinger PH (2000). BAX-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes. *Nat Cell Biol*, 2: 553-555.

Sánchez-Más J, Turpín MC, Lax A, Ruipérez JA, Valdés Chévarri M y Pascual-Figal DA (2010). Differential actions of eplerenone and spironolactone on the protective effect of testosterone against cardiomyocyte apoptosis in vitro. *Rev Esp Cardiol*, 63: 779-787.

Sandri M y Carraro U (1999). Apoptosis of skeletal muscles during development and disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 31: 1373-1390.

Sargiacomo M, Sudol M, Tang ZL y Lisanti MP (1993). Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells. *J Cell Biol*, 122: 789-807.

Sax JK, Fei P, Murphy ME, Bernhard E, Korsmeyer SJ y El-Deiry WS (2002). BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. *Nat Cell Biol*, 4: 842-849.

Schnitzer JE, Liu J y Oh P (1995). Endothelial caveolae have the molecular transport machinery for vesicle budding, docking, and fusion including VAMP, NSF, SNAP, annexins, and GTPases. *J Biol Chem*, 270: 14399-14404.

Schultheiss D, Denil J y Jonas U (1997) Rejuvenation in the early 20th century. *Andrologia*, 29: 351-355.

Sengoopta C (1998). Glandular politics. Experimental biology, clinical medicine, and homosexual emancipation in fin-de-siècle central Europe. *Isis*, 89: 445-473.

Sengoopta C (2003). 'Dr Steinach coming to make old young!': sex glands, vasectomy and the quest for rejuvenation in the roaring twenties. *Endeavour*, 27(3): 122-126.

Shahani S, Braga-Basaria M, Maggio M y Basaria S (2009). Androgens and erythropoiesis: past and present. *J Endocrinol Invest*, 32(8): 704-16.

Shenoy-Scaria AM, Dietzen DJ, Kwong J, Link DC y Lublin DM (1994). Cysteine3 of Src family protein tyrosine kinase determines palmitoylation and localization in caveolae. *J Cell Biol*, 126: 353-363.

Shimizu S, Narita M y Tsujimoto Y (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*, 399: 483-487.

Sigaud S, Evelson P y González-Flecha B (2005). H₂O₂-induced proliferation of primary alveolar epithelial cells is mediated by MAP kinases. *Antioxid Redox Signal*, 7: 6-13.

Silva FR, Leite LD y Wassermann GF (2002). Rapid signal transduction in Sertoli cells. *Eur J Endocrinol*, 147: 425-433.

Simoncini T y Genazzani AR (2003). Non-genomic actions of sex steroid hormones. *Eur J Endocrinol*, 148(3): 281-292.

Singh M y Singh N (2008). Induction of apoptosis by hydrogen peroxide in HPV 16 positive human cervical cancer cells: involvement of mitochondrial pathway. *Mol Cell Biochem*, 310: 57-65.

Sinha-Hikim I, Artaza J, Woodhouse L, Gonzalez-Cadavid N, Singh AB, Lee MI, Storer TW, Casaburi R, Shen R y Bhasin S (2002). Testosterone induced increase in muscle size in healthy young men is with muscle fiber hypertrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 283: E154-E164.

Sinha-Hikim I, Cornford M, Gaytan H, Lee ML y Bhasin S (2006). Effects of testosterone supplementation on skeletal muscle fiber hypertrophy and satellite cells in community dwelling, older men. *J Clin Endocrinol Metab*, 91: 3024-3033.

Sinha-Hikim I, Roth SM, Lee MI y Bhasin S (2003). Testosterone induced muscle hypertrophy is associated with an increase in satellite cell number in healthy, young men. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 285: E197-E205.

Smart E, Ying YS, Conrad P y Anderson RG (1994). Caveolin moves from caveolae to the Golgi apparatus in response to cholesterol oxidation. *J Cell Biol*, 127: 1185-1197.

Solakidi S, Psarra AM, Nikolaropoulos S y Sekeris CE (2005). Estrogen receptors alpha and beta (ERalpha and ERbeta) and androgen receptor (AR) in human sperm: localization of ERbeta and AR in mitochondria of the midpiece. *Hum Reprod*, 20: 3481-3487.

Somjen D, Kohen F, Gayer B, Knoll E, Limor R, Baz M, Sharon O, Posner GH y Stern N (2004). A non-calcemic Vitamin D analog modulates both nuclear and putative membranal estrogen receptors in cultured human vascular smooth muscle cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 89-90(1-5): 397-9.

Steinbeck MJ, Kim JK, Trudeau MJ, Hauschka PV y Karnovsky MJ (1998). Involvement of hydrogen peroxide in the differentiation of clonal HD-11EM cells into osteoclast-like cells. *J Cell Physiol*, 176: 574-587.

Steller H (1995). Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*, 267: 1445-1449.

Sun M, Yang L, Feldman RI, Sun XM, Bhalla KN, Jove R, Nicosia SV y Cheng JQ (2003). Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway by androgen through interaction of p85, androgen receptor, and Src. *J Biol Chem*, 278: 42992-43000.

Takimoto R y El Deiry WS (2000). Wild-type p53 transactivates the KILLER/DR5 gene through an intronic sequence-specific DNA-binding site. *Oncogene*, 19: 1735-1743.

Tattersall RB (1994). Charles-Edouard Brown-Séguard: double hyphenated neurologist and forgotten father of endocrinology. *Diabet Med*, 11: 728-731.

Tews DS (2005). Muscle fiber apoptosis in neuromuscular diseases. *Muscle Nerve*, 32: 443-458.

Towbin H, Staehelin T y Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76: 4350-4354.

Trinei M, Giorgio M, Cicalese A, Barozzi S, Ventura A, Migliaccio E, Milia E, Padura IM, Raker VA, Maccarana M, Petronilli V, Minucci S, Bernardi P, Lanfrancone L y Pelicci PG (2002). A p53-p66Shc signalling pathway controls intracellular redox status, levels of oxidation-damaged DNA and oxidative stress-induced apoptosis. *Oncogene*, 21: 3872-3878.

Tuck SP y Francis RM (2009). Testosterone, Bone and Osteoporosis. *Front Horm Res*, 37: 123-132.

Vasconsuelo A, Milanesi LM y Boland R (2008). 17Beta-estradiol abrogates apoptosis in murine skeletal muscle cells through estrogen receptors: role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Endocrinol*, 96: 385-397.

Vousden KH y Lu X (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer*, 2(8): 594-604.

Vousden KH y Prives C (2009). Blinded by the light: the growing complexity of p53. *Cell*, 137: 413-431.

Vousden KH y Ryan KM (2009). p53 and metabolism. *Nat Rev Cancer*, 9: 691-700.

Wajant H, Pfizenmaier K y Scheurich P (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*, 10(1): 45-65.

Walsh K (1997). Coordinate regulation of cell cycle and apoptosis during myogenesis. *Prog Cell Cycle Res*, 3: 53-58.

Wang Q, Wang X, Hernandez A, Hellmich MR, Gatalica Z y Evers BM (2002). Regulation of TRAIL expression by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/GSK-3 pathway in human colon cancer cells. *J Biol Chem*, 277(39): 36602-36610.

Wang X y Seed B (2003). A PCR primer bank for quantitative gene expression analysis. *Nucleic Acids Res*, 31(24): e154.

Wang Z, Liu L, Hou J, Wen D, Yan C, Pu J, Ouyang J y Pan H (2008). Rapid membrane effect of testosterone in LNCaP cells. *Urol Int*, 81: 353–359.

Watson PA, Chen YF, Balbas MD, Wongvipat J, Socci ND, Viale A, Kim K y Sawyers CL (2010). Constitutively active androgen receptor splice variants expressed in castration-resistant prostate cancer require full-length androgen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(39): 16759-16765.

Webb CM, McNeill JG, Hayward CS, de Zeigler D y Collins P (1999). Effects of testosterone on coronary vasomotor regulation in men with coronary heart disease. *Circulation*, 100(16): 1690-1696.

Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG y Youle RJ (1997). Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol*, 139: 1281–1292.

Xu Q, Simpson SE, Scialla TJ, Bagg A y Carroll M (2003). Survival of acute myeloid leukaemia cells requires PI3 kinase activation. *Blood*, 102: 972–980.

Yaffe D y Saxel O (1977). Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature*, 270: 725-727.

Yang SH, Liu R, Perez EJ, Wen Y, Stevens SM Jr, Valencia T, Brun-Zinkernagel AM, Prokai L, Will Y, Dykens J, Koulen P y Simpkins JW (2004). Mitochondrial localization of estrogen receptor beta. *Proc Nat Acad Sci USA*, 101: 4130–4135.

Yano S, Tokumitsu H y Soderling TR (1998). Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway. *Nature*, 396: 584–587.

Yao M, Nguyen TV, Rosario ER, Ramsden M y Pike CJ (2008). Androgens regulate neprilysin expression: role in reducing beta-amyloid levels. *J Neurochem*, 105(6): 2477-2488.

Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S y Madden TL (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13: 134.

Yokoyama K, Fukumoto K, Murakami T, Harada S, Hosono R, Wadhwa R, Mitsui Y y Ohkuma S (2002). Extended longevity of *Caenorhabditis elegans* by knocking in extra copies of hsp70F, a homolog of mot-2 (mortalin)/mthsp70/Grp75. *FEBS Lett*, 516: 53-57.

Yoshida N, Yoshida S, Koishi K, Masuda K y Nabeshima Y (1998). Cell heterogeneity upon myogenic differentiation: down-regulation of MyoD and Myf-5 generates 'reserve cells'. *J Cell Sci*, 111: 769-79.

Yu J, Akishita M, Eto M, Koizumi H, Hasimoto R, Ogawa S, Tanaka K, Ouchi Y y Okabe T (2012). Src kinase-mediates androgen receptor-dependent non-genomic activation of signaling cascade leading to endothelial nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun*, 424(3): 538-543.

Yu J y Zhang L (2003). No PUMA, no death: Implications for p53-dependent apoptosis. *Cancer Cell*, 4(4): 248-249.

Zimmermann KC, Bonzon C y Green DR (2001). The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther*, 92: 57-70.

TRABAJOS GENERADOS

Trabajos generados a partir de esta tesis

Publicaciones en revistas científicas

- ❖ Pronsato L, Ronda A, Milanesi L, Vasconsuelo A, Boland R. "*Protective role of 17 β -estradiol and testosterone in apoptosis of skeletal muscle*". Actualizaciones en Osteología (2010). ISSN: 1669-8975 (print); ISSN: 1669-8983 (online). 6(2), 65-80.

- ❖ Vasconsuelo A, Pronsato L, Ronda AC, Boland R, Milanesi L. "*Role of 17 β -estradiol and testosterone in apoptosis*". Steroids (2011). ISSN: 0039-128X. 76, 1223-1231.

- ❖ Pronsato L, Boland R, Milanesi L. "*Testosterone exerts anti-apoptotic effects against H₂O₂ in C2C12 skeletal muscle cells through the apoptotic intrinsic pathway*". Journal of Endocrinology (2012). ISSN: 0022-0795. 212, 371-381.

- ❖ Pronsato L, La Colla A, Ronda AC, Milanesi L, Boland R, Vasconsuelo A. "*High passage numbers induce resistance to apoptosis in C2C12 muscle cells*". Biocell (2013). ISSN 1667-5746. 37(1): 1-9.

- ❖ Pronsato L, Boland R, Milanesi L. "*Non-classical localization of androgen binding proteins in the C2C12 skeletal muscle cell line*". Archives of Biochemistry and Biophysics (2013). ISSN: 0003-9861. 530, 13-22. Las imágenes de este trabajo fueron seleccionadas como tapa de la revista.

Resúmenes publicados en revistas científicas

- Vasconsuelo A, Milanesi L, Pronsato L, Boland R. "Role of hsp 27 in the antiapoptotic effects of 17 β -estradiol in skeletal muscle cells". Biocell. (2007). ISSN: 0327-9545. Vol. 31, pag. 16.
- Pronsato L, Ronda A, Milanesi L, Vasconsuelo A, Boland R. "Protective role of sex hormones in apoptosis of skeletal muscle". Bone (2009) ISSN: 8756-3282. Vol. 45, Issue 6, Page S149.
- Pronsato L, Ronda A, Milanesi L, Vasconsuelo A, Boland R. "Acciones antiapoptóticas de Estradiol y Testosterona en músculo esquelético". Revista de la Asociación Médica de Bahía Blanca. (2009). ISSN: 1515-8659. Vol. 19, suplemento: 1, pag. 16.
- Pronsato L, Boland R, Milanesi L. "Role of testosterone in the intrinsic apoptotic pathway of skeletal muscle". Bone (2010) ISSN: 8756-3282. Vol. 48, Issue 6, Page S288.
- Pronsato L, Boland R, Milanesi L. "Testosterone inhibits the intrinsic apoptotic pathway induced by H₂O₂ in C2C12 skeletal muscle cells". Biocell. (2010). ISSN: 0327-9545. Vol. 34, pag. 75.
- Pronsato L, Boland R, Milanesi L. "Role of androgen receptor in the protective action of testosterone during apoptosis in skeletal muscle". Bone (2011) ISSN: 8756-3282. Vol. 49, Issue 6, Page 1376.
- Pronsato L, La Colla A, Ronda A, Milanesi L, Vasconsuelo A, Boland R. "Antiapoptotic effects of testosterone and 17 β -estradiol in skeletal muscle". Biocell (2011) ISSN: 0327-9545. Vol. 35, pag. 125.
- Pronsato L, La Colla A, Ronda AC, Milanesi L, Vasconsuelo A, Boland R. "AR, ER, MnSOD and COXIV in 17 β -estradiol and testosterone antiapoptotic effects in C2C12 cells". Biocell (2012) ISSN: 0327-9545. Vol. 36, pag. 58.

Presentaciones en Congresos

Se presentaron 15 trabajos en congresos científicos nacionales e internacionales.