



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN BIOQUÍMICA



**Estudio de las vías de transducción de la  
señal del  $17\beta$ -estradiol en células  
musculares esqueléticas: cascadas MAPKs**

ANA CAROLINA RONDA



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

TESIS DE DOCTOR EN BIOQUÍMICA

**Estudio de las vías de transducción  
de la señal del 17 $\beta$ -estradiol en  
células musculares esqueléticas:  
cascadas MAPKs**

ANA CAROLINA RONDA

---

Director de Tesis  
**Dr. Ricardo L. Boland**

Codirector de Tesis  
**Dra. Claudia G. Buitrago**

Universidad Nacional del Sur

---

## 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 27 de Septiembre del 2005 y el 5 de Noviembre del 2008, bajo la dirección del Dr. Ricardo L. Boland, Profesor Titular de Química Biológica General e Investigador Superior del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), y la co-dirección de la Dra. Claudia Buitrago, Jefa de Trabajos Prácticos de Química Biológica General e Investigadora Asistente del CONICET.

Bqca. Ana Carolina Ronda



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR  
Secretaría General de Postgrado y Educación Continua

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

A la mujer cuya sonrisa anhelo imitar, mi mamá.

A los dos hombres que más amo en este mundo, mi esposo y mi papá.

**“A veces sentimos que lo que hacemos  
es tan sólo una gota del mar,  
pero el mar sería menos si faltara una gota.”**

Madre Teresa de Calcuta

## **Agradecimientos**

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

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

Al Dr. Ricardo Boland por confiar en mí y abrirme las puertas de su laboratorio aún cuando era estudiante. Por transmitirme su valioso conocimiento. Por sus ansias de ser mi "mentor", mi maestro. Por aumentar en mí el espíritu crítico y el compromiso por la ciencia.

A la Dra. Claudia Buitrago por enseñarme a dar los primeros pasos en este fascinante mundo de la investigación. Por su gran apertura y entusiasmo. Por su disposición para ayudarme siempre.

A la Dra. Ana Russo de Boland, por la primera entrevista en su oficina, la que dejó una huella y me puso en marcha en esta aventura.

A la Dra. Andrea Vasconsuelo, por recibirme y ayudarme. Por su "no preocuparum". Por intentar solucionar tantos problemas con mucho humor.

A todos mis compañeros de trabajo, porque de distintas formas y a su manera, cada uno estuvo presente para que esto fuera posible. Por sostener valores humanos en el trabajo. Por las risas y algunos llantos. Por todos los buenos momentos y también por los no tan buenos, que me hicieron crecer...

A mis compañeros de docencia de Química Biológica I, por transmitirme el don de enseñar. Por todas las charlas y horas compartidas... Por ser parte de algo que disfruto.

A mis hermanos de comunidad, por ser testimonios de entrega cada día y enseñarme a ver el paso de Dios en mi vida. Por contenerme y sostenerme. Por animarse a correr conmigo en dirección a la meta...

A todos mis amigos por estar incondicionalmente, lejos o cerca, con algo para compartir o con las manos vacías, con mucho para decir o con nada, simplemente por estar...

A la familia de mi esposo que me adoptó como hija, hermana y nieta. Por regalarme cariño y contención. Por brindarme tanta ayuda desinteresada.

A toda mi familia, especialmente a mis abuelas, por enseñarme a luchar en la vida por lo que quiero, y a mis tíos, por creer una y otra vez en mis posibilidades.

A mi hermana, por su ternura, ánimo, contención, afecto, sorpresas y humor. Por estar algo lejos pero a la vez tan cerca. A mi hermano por permanecer aún sin entender nada de todo lo que hago.

A mi papá por ser mi ejemplo de fortaleza. Por animarme a no bajar los brazos ante las dificultades de la vida. Por aceptarme tal cual soy y transmitirme a su manera cuánto me quiere...

A mi mamá, por todos los valores que me dejó. Por ser mi modelo de lucha, coraje y entrega... Por confiarme el legado de que vale la pena intentarlo siempre y con una sonrisa, hasta el final...

A mi esposo, por su amor y su paciencia ilimitada. Por estar a mi lado en las buenas y sobre todo en las malas. Por el humor que le pone a todas y cada una de las cosas, día tras día. Por elegir ser mi compañero en la vida.

A Dios por derramar esta vocación. Por darme a conocer un pedacito de su perfecta e infinita creación. Por mostrarme su Providencia y su Presencia cada uno de los días...

## Resumen

Las cascadas de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) son estimuladas por el 17 $\beta$ -estradiol en diferentes tipos celulares; sin embargo, la modulación de las MAPKs por esta hormona y su rol fisiológico en células musculares esqueléticas no han sido aún estudiados. En este trabajo de tesis se investigaron las acciones del 17 $\beta$ -estradiol sobre las vías ERK1/2 y p38 MAPK así como su participación en los efectos antiapoptóticos del estrógeno, en la línea celular de músculo esquelético murino C2C12 en estado proliferativo.

Los resultados obtenidos muestran que el 17 $\beta$ -estradiol induce una activación máxima de ERK2 y p38 MAPK a una concentración de 10<sup>-8</sup> M durante 15 minutos. Bajo estas condiciones, la hormona estimuló la fosforilación de los factores de transcripción CREB y Elk-1 y aumentó los niveles proteicos de c-Fos y c-Jun. La preincubación de las células con los inhibidores de ERK1/2 (U0126) y p38 MAPK (SB203580), reveló que la fosforilación de CREB, Elk-1 y el incremento de c-Fos y c-Jun inducidos por el estrógeno son dependientes de ambas MAPKs. Asimismo, los inhibidores de las familias Src (PP2) y PKC (Ro318220) suprimieron la activación de ERK2, p38 MAPK, CREB y Elk-1 así como la expresión de c-Fos y c-Jun en respuesta al estrógeno, indicando que PKC y Src participan *upstream* en la fosforilación de ERK2 y p38 MAPK por el 17 $\beta$ -estradiol. También, se evidenció que la hormona promueve la activación de Src en forma dependiente de PKC. Además, el uso de ICI182780, un antagonista de los receptores estrogénicos, y siRNAs específicos que bloquearon la expresión de los mismos, demostraron que ER $\alpha$  media la activación de ERK2 por el 17 $\beta$ -estradiol sin afectar el estímulo de la hormona

sobre la fosforilación de p38 MAPK. Adicionalmente, el uso del E2-BSA, el cual no ingresa al interior celular, demostró que, en la fosforilación de ambas MAPKs por el estrógeno, no están involucrados receptores localizados en la membrana plasmática.

Posteriormente, se profundizó sobre las acciones protectoras del 17 $\beta$ -estradiol en células musculares observadas previamente en nuestro laboratorio. Los resultados obtenidos con cultivos de células C2C12 expuestos al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mostraron cambios morfológicos en las mitocondrias, núcleos y citoesqueleto, desfosforilación de Akt y Bad, pérdida de la integridad de la membrana mitocondrial, liberación de Smac/DIABLO, clivaje de la procaspasa-3 y de PARP. El pretratamiento de las células con la hormona revirtió estos eventos excepto cuando fueron preincubadas con los inhibidores de ERK1/2 (U0126) y p38 MAPK (SB203580), sugiriendo un rol clave de ambas MAPKs en los efectos antiapoptóticos del estrógeno. Adicionalmente, estudios de inmunocitoquímica y fraccionamiento subcelular sugieren que la hormona induce la translocación de ERK2 activa a mitocondrias, organelas relacionadas con el proceso apoptótico.

En su conjunto, los resultados presentados en este trabajo de tesis, muestran que el 17 $\beta$ -estradiol en células musculares esqueléticas, induce la activación de las vías ERK2 y p38 MAPK, involucrando a dichas quinasas en la inducción de c-Fos y c-Jun, y en la acción protectora del estrógeno. La información obtenida contribuye al conocimiento de la regulación endócrina del metabolismo muscular en estados fisiológicos y patológicos.

## Summary

The signaling cascades of mitogen activated protein kinases (MAPKs) are stimulated by  $17\beta$ -estradiol in different cellular types. However, the modulation of MAPKs by this hormone and its physiological function in skeletal muscle cells have not been studied yet. In this thesis, the role of  $17\beta$ -estradiol mediated-activation of ERK1/2 and p38 MAPK on early gene expression and antiapoptotic effects of the estrogen were investigated in the murine skeletal muscle cell line C2C12 in proliferative state.

Initially, results showed that  $17\beta$ -estradiol induces a maximal activation of ERK2 and p38 MAPK in C2C12 muscle cells at a concentration of  $10^{-8}$  M during 15 minutes. Under these conditions, the hormone promoted the phosphorylation of CREB and Elk-1 transcription factors and increased c-Fos and c-Jun protein levels. Preincubation of the cells with ERK1/2 inhibitor (U0126) and p38 MAPK inhibitor (SB203580) revealed that CREB and Elk-1 phosphorylation and the increase of c-Fos and c-Jun induced by the estrogen were dependent of both MAPKs. In addition, inhibitors of Src family (PP2) and PKC family (Ro318220) suppressed the activation of ERK2, p38 MAPK, CREB and Elk-1 as well as the expression of c-Fos and c-Jun, indicating that PKC and Src participate upstream in ERK2 and p38 MAPK phosphorylation by  $17\beta$ -estradiol. Also, the hormone induced Src activation in a PKC-dependent manner. Furthermore, the use of ICI182780, an antagonist of the estrogen receptors, and specific siRNAs that blocked expression of ERs demonstrated that ER $\alpha$  mediates ERK2 activation by  $17\beta$ -estradiol without affecting the stimulus of the hormone on p38 MAPK phosphorylation. Moreover, the use of E2-BSA, which does not

enter into the cellular interior, demonstrated that activation of both MAPKs by the estrogen was not dependent on receptors localized at plasmatic membrane level.

The protective actions of  $17\beta$ -estradiol in muscle cells previously observed in our laboratory were characterized in more depth. The results obtained show that cultures exposed to  $H_2O_2$  present morphological changes of mitochondria, nucleus and cytoskeleton, Akt and Bad dephosphorylation, loss in mitochondrial membrane integrity, Smac/DIABLO release, and procaspase-3 and PARP cleavage. Pretreatment of the cells with the hormone reverted these events, except when C2C12 cells were preincubated with ERK1/2 inhibitor (U0126) and p38 MAPK inhibitor (SB203580), suggesting a key role of both MAPKs in the antiapoptotic effects of the estrogen. Additionally, immunocytochemistry and subcellular fractionation studies suggest that  $17\beta$ -estradiol induces translocation of activated ERK2 into mitochondria, organelles related to the apoptotic process.

Altogether, the results of this thesis show that through the activation of the ERK2 and p38 MAPK cascades,  $17\beta$ -estradiol induces the expression of early proto-oncogenes and exerts a protective action in skeletal muscle cells. These data contribute to the knowledge of endocrine regulation of muscle metabolism in physiological and pathological states.

---

# ÍNDICE

---

	<b>Pág</b>
<b>ABREVIATURAS EN INGLÉS Y ANGLICISMOS.....</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>10</b>
<b>I. EL 17<math>\beta</math>-ESTRADIOL: HISTORIA, BIOSÍNTESIS Y FUNCIONES.....</b>	<b>11</b>
1. Descubrimiento de hormonas esteroideas: estrógenos.....	11
2. Biosíntesis del 17 $\beta$ -estradiol.....	13
3. Regulación de la biosíntesis y metabolismo del 17 $\beta$ -estradiol.....	16
4. Funciones biológicas del 17 $\beta$ -estradiol.....	17
a. Déficit de 17 $\beta$ -estradiol: el caso de la menopausia.....	18
b. Estrógenos y músculo esquelético.....	19
<b>II. MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULARES.....</b>	<b>20</b>
1. Los receptores de estrógenos.....	20
2. Mecanismos de acción del 17 $\beta$ -estradiol.....	23
a. Acción genómica.....	23
b. Acción no genómica.....	23
c. Integración de las acciones no genómicas y genómicas.....	25
3. Proteínas quinasas activadas por mitógenos.....	25
<b>III. MUERTE CELULAR.....</b>	<b>28</b>
1. Necrosis.....	28
2. Apoptosis.....	30
3. Inducción de la apoptosis y vías implicadas.....	32
a. Las caspasas.....	33
b. Vía extrínseca.....	35
c. Mecanismo intrínseco.....	37

---

d. Integración de las vías extrínseca e intrínseca.....	40
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>41</b>
<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>44</b>
1. La línea celular C2C12 en estado proliferativo como modelo de células mioblásticas.....	45
2. Cultivos celulares.....	47
a. Cultivos de células C2C12.....	47
b. Cultivos primarios de músculo esquelético de ratón.....	47
3. Evaluación de la viabilidad celular por tinción con Azul de Tripán.....	48
4. Tratamientos de los mioblastos.....	48
5. Procesamiento de las muestras para ensayos de <i>Western Blot</i> .....	49
6. Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	50
7. Ensayos de <i>Western blot</i> .....	51
8. Extracción (por lavado) de los anticuerpos en las membranas: <i>Stripping</i> .....	52
9. Inmunocitoquímica.....	53
10. Microscopía .....	53
a. Microscopía de fluorescencia.....	53
b. Microscopía confocal.....	54
11. Fraccionamiento subcelular.....	54
12. Bloqueo de la expresión de ER $\alpha$ y ER $\beta$ : transfección con siRNA (pequeño ARN de interferencia).....	55
13. Medición de la integridad de la membrana mitocondrial.....	56
14. Tinción de las mitocondrias.....	56
a. Verde Jano.....	56
b. <i>Mitotracker</i> .....	57
15. Tinción de núcleos con DAPI.....	57

16. Análisis estadísticos.....	58
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>59</b>
<b>I. MODULACIÓN DE LAS PROTEÍNAS QUINASAS ACTIVADAS POR MITÓGENOS (MAPKs) ERK1/2 Y p38 MAPK POR 17β-ESTRADIOL EN CÉLULAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS.....</b>	<b>60</b>
1. Estudio dosis-respuesta de la fosforilación de ERK1/2 y p38 MAPK inducida por 17β-estradiol.....	60
2. Estudio tiempo-respuesta del efecto del 17β-estradiol sobre la fosforilación de ERK1/2 y p38 MAPK.....	66
<b>II. EVENTOS <i>DOWNSTREAM</i> A LA ACTIVACIÓN DE ERK2 Y p38 MAPK POR 17β-ESTRADIOL.....</b>	<b>69</b>
1. Inhibición por compuestos farmacológicos de la activación de ERK2 y p38 MAPK.....	71
2. Rol de las MAPKs en el efecto del 17β-estradiol sobre la fosforilación de CREB y Elk-1.....	73
3. Modulación de las oncoproteínas c-Fos y c-Jun por 17β-estradiol. Participación de MAPKs .....	75
<b>III. MODULACIÓN DE PROTEÍNAS <i>UPSTREAM</i> EN LA ACTIVACIÓN DE LAS MAPKs POR 17β-ESTRADIOL.....</b>	<b>79</b>
1. Participación de Src y PKC en la activación de las MAPKs inducida por 17β-estradiol.....	82
2. Activación de PKC y Src.....	85
3. Rol de Src y PKC en la fosforilación de CREB y Elk-1 por 17β-estradiol .....	89
4. Participación de Src y PKC en la inducción de las oncoproteínas c-Fos y c-Jun por 17β-estradiol.....	91

---

<b>IV. IMPLICANCIA DE LOS RECEPTORES ESTROGÉNICOS EN LA ACTIVACIÓN DE LAS MAPKs INDUCIDA POR 17β-ESTRADIOL.....</b>	<b>94</b>
1. Efectos del compuesto ICI182780 sobre la fosforilación de las MAPKs inducida por 17β-estradiol .....	94
2. Efecto del silenciamiento de la expresión de ERα y ERβ sobre la activación de ERK2 y p38 MAPK por 17β-estradiol.....	97
3. E2-BSA y fosforilación de las MAPKs.....	99
<b>V. ROL DE ERK2 Y p38 MAPK EN LOS EFECTOS ANTIAPOPTÓTICOS DEL 17β-ESTRADIOL EN CÉLULAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS.....</b>	<b>102</b>
1. Participación de ERK2 y p38 MAPK en los efectos antiapoptóticos del 17β-estradiol: cambios funcionales y morfológicos.....	103
2. Roles de ERK2 y p38 MAPK en eventos metabólicos de supervivencia activados por 17β-estradiol.....	116
3. Contribución de ERK2 y p38 MAPK en los efectos protectivos del 17β-estradiol en la integridad de la membrana mitocondrial.....	122
4. Participación de ERK2 y p38 MAPK en los efectos protectivos del 17β-estradiol: clivaje de caspasa-3 y PARP.....	126
<b>VI. TRANSLOCACIÓN DE ERK2 A MITOCONDRIAS INDUCIDA POR 17β-ESTRADIOL EN CÉLULAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS .....</b>	<b>130</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>137</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>151</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>155</b>
<b>PUBLICACIONES ORIGINADAS.....</b>	<b>174</b>

---

---

# **ABREVIATURAS Y ANGLICISMOS**

**ABREVIATURAS INGLESAS UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO DE TESIS**

<b>AF</b>	Activation function
<b>AMPC</b>	cyclic 3',5'-adenosine monophosphate
<b>ANT</b>	Adenine nucleotide translocator
<b>AP-1</b>	Activating protein 1
<b>Apaf-1</b>	Apoptosis protease-activating factor-1
<b>ATF-2</b>	Activating transcription factor-2
<b>BSA</b>	Bovine serum albumin
<b>CARD</b>	Caspase-recruitment domain
<b>CREB</b>	c-AMP-response-element binding protein
<b>DBD</b>	DNA-binding domain
<b>DD</b>	Death domain
<b>DED</b>	Death effector domain
<b>DIABLO</b>	Direct IAP-binding protein
<b>DISC</b>	Death inducing signalling complex
<b>DMEM</b>	Dulbecco's modified Eagle medium
<b>DMSO</b>	Dimethyl sulfoxide
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>E2</b>	17 $\beta$ -estradiol
<b>E2-BSA</b>	17 $\beta$ -estradiol conjugated with bovine serum albumin
<b>ER<math>\alpha</math></b>	Estrogen receptor $\alpha$
<b>ERE</b>	Estrogen response element
<b>ERK</b>	Extracellular signal-regulated kinase
<b>ER<math>\beta</math></b>	Estrogen receptor $\beta$
<b>FADD</b>	Fas-associated death domain protein
<b>FSH</b>	Follicle-stimulating hormone
<b>GPCR</b>	G protein coupled-receptor
<b>GPR30</b>	G Protein-coupled Estrogen Receptor 30
<b>IAP</b>	Inhibitory apoptosis protein
<b>JNK</b>	c-jun NH2-terminal kinase

<b>LBD</b>	Ligand-binding domain
<b>LH</b>	Luteinizing hormone
<b>MAP</b>	Mitogen activated protein
<b>MAPK</b>	Mitogen activated protein kinase
<b>MEK</b>	Mitogen activated protein kinase kinase
<b>MEKK</b>	MEK kinase
<b>mER</b>	Membrane estrogen receptor
<b>PARP</b>	Poly-(ADP ribose)- polymerase
<b>PBS</b>	Phosphate buffer saline
<b>PBS-T</b>	Phosphate buffer saline supplemented with 0.1% tween
<b>PCD</b>	Programmed cell death
<b>PI3K</b>	Phosphatidylinositol-3OH kinase
<b>PKC</b>	Protein kinase C
<b>PMA</b>	Phorbol myristate acetate
<b>PMSF</b>	Phenylmethanesulphonyl fluoride
<b>PVDF</b>	Polyvinylidene fluoride
<b>ROS</b>	Reactive oxygen species
<b>SDS-PAGE</b>	Sodium dodecyl sulfate – polyacrilamide gel electrophoresis
<b>SHBG</b>	Steroid hormone binding globulin
<b>siRNA</b>	Small interference RNA
<b>Smac</b>	Second mitochondria-derived activator of caspases
<b>SRE</b>	Serum response element
<b>TRAIL</b>	Tumor necrosis factor – related apoptosis – inducing ligand
<b>TNFR</b>	Tumor necrosis factor receptor
<b>VDAC</b>	Voltage – dependent anion - selective channel

**ANGLICISMOS UTILIZADOS EN ESTA TESIS**

<i>Western-Blot (blot)</i>	Ensayo de inmunodetección específica de proteínas presentes en membranas de PVDF.
<i>Stripping</i>	Técnica de lavado para remover los anticuerpos primarios adheridos a proteínas específicas de una membrana de PVDF.
<i>Downstream</i>	Cascada abajo, hacia abajo.
<i>Upstream</i>	Cascada arriba, hacia arriba.
<i>Target</i>	Blanco, objetivo, diana.
<i>Merge</i>	Superposición, fusión

---

# INTRODUCCIÓN

## I. 17 $\beta$ -ESTRADIOL: HISTORIA, BIOSÍNTESIS Y FUNCIONES

A mediados del siglo XIX, el fisiólogo Claude Bernard enuncia el concepto de que algunas células eran capaces de sintetizar compuestos químicos que se vertían a la circulación sanguínea y actuaban como mensajeros, produciendo efectos fisiológicos sobre órganos distantes. En el año 1905, Bayliss y Starling nombraron a estos mensajeros con el término "hormonas", palabra proveniente del griego *horman* (incitadores de actividad).

Desde entonces, el estudio de estas moléculas y su mecanismo de acción ha sido de gran interés para el hombre. Particularmente, el funcionamiento de las hormonas femeninas en la regulación del ciclo sexual y el embarazo se investigó por necesidad de hallar métodos anticonceptivos.

### 1. Descubrimiento de hormonas esteroideas: estrógenos

Un pionero en la investigación del sistema reproductor femenino fue el ginecólogo vienés Emil Knauer. Después de varios experimentos con ratas, Knauer entre los años 1850 y 1890 demostró que los ovarios eran órganos de naturaleza endócrina y que las hormonas segregadas por ellos eran responsables de las características sexuales femeninas secundarias.

En 1923, Edgard Allen y Edward Doisy, aislaron fluido folicular de los ovarios de cerdo y los inyectaron en roedores gonadectomizados restaurando los ciclos de celo (estro) [Allen y Doisy, 1923]. A partir de esta evidencia, se

---

estudió la existencia de una hormona sexual femenina en distintas especies, siendo Loewe y Lange quienes observaron que la concentración urinaria de tal molécula variaba con la fase del ciclo menstrual [Loewe y Lange, 1926]. Un año más tarde, Selmar Aschheim determinó grandes cantidades de esta hormona en la orina de mujeres durante el embarazo [Aschheim, 1927], lo cual permitió a los químicos aislarla y purificarla.



**Edward Adelbert Doisy**

En 1929, tres grupos de investigación (Allen y Doisy de Estados Unidos; Butenandt de Alemania y Ernest Laqueur de Holanda) lograron simultáneamente y de forma independiente el aislamiento de una hormona femenina en estado puro, la estrona [Butenandt, 1929; Doisy *et al.*, 1930, Laqueur *et al.*, 1930]. Consecutivamente en 1930 se descubrió el estriol,



**Adolf Frederick Johann  
Butenandt**

también obtenido de la orina de mujeres embarazadas [Marriam, 1930] y en 1936 se aísla otro derivado, el  $17\beta$ -estradiol [MacCorquodale *et al.*, 1936]. En su conjunto, estas hormonas fueron llamadas “estrógenos” término que proviene de las palabras griegas *Oistros* (deseos locos) y *Gennein* (engendrar). De importancia, cuando Butenandt aisló la estrona (Premio Nobel

de Química en 1939) y analizó su estructura, descubrió que se trataba de un esteroide y fue la primera molécula en clasificarse dentro de la familia de hormonas esteroideas.

## 2. Biosíntesis del 17 $\beta$ -estradiol

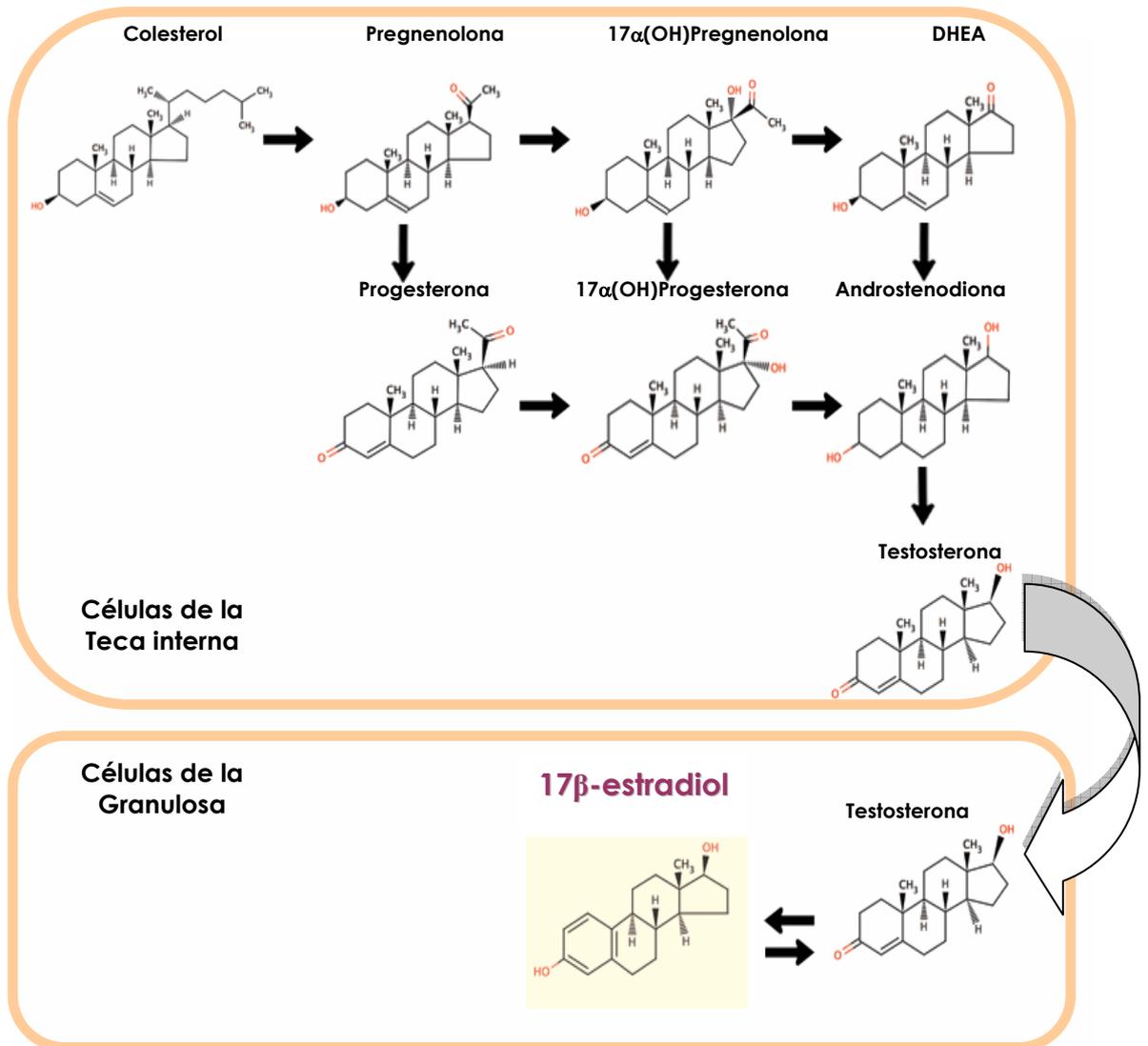
Como todas las hormonas esteroideas, el 17 $\beta$ -estradiol tiene una estructura básica de ciclopentanoperhidrofenantreno, formada por tres anillos ciclohexanos (A, B, y C) y un anillo ciclopentano (D). El anillo aromático A es la principal característica estructural de los estrógenos [Schroepfer, 1982], de la cual depende su unión selectiva y su alta afinidad a los receptores específicos [Duax *et al.*, 1984; Jordan *et al.*, 1985].



**Estructura del 17 $\beta$ -estradiol:** esquema de la estructura molecular del ciclopentanoperhidrofenantreno con el nombre de los anillos y la fórmula química de la hormona esteroidea 17 $\beta$ -estradiol.

El 17 $\beta$ -estradiol se sintetiza principalmente en los ovarios. Sin embargo, la conversión de precursores androgénicos en otros tejidos para generar esta hormona, se vuelve clínicamente importante luego de la menopausia o durante alteraciones de la función ovárica. Las vías metabólicas de formación del 17 $\beta$ -estradiol son comunes en todos los tejidos. En los ovarios, participan dos tipos celulares del folículo: las células de la teca interna y las células de la

granulosa. La biosíntesis de los estrógenos ocurre esencialmente a partir del colesterol, el cual en la membrana mitocondrial de las células de la teca interna, es convertido en pregnenolona por acción de la desmolasa (P450<sub>scc</sub>). La pregnenolona sale de la mitocondria y en el retículo endoplasmático es convertida a progesterona por la acción de la 3-β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3βHSD). Tanto la pregnenolona como la progesterona son sustratos de la 17α-hidroxilasa (P450C17/flavoproteína NADPH-citocromo P450 reductasa) y se convierten en deshidroepiandrosterona (DHEA) y androstenodiona, respectivamente. DHEA, por la acción de la 3βHSD, da lugar a la androstenodiona que es transformada en testosterona por la 17β-hidroxiesteroide-deshidrogenasa. Una parte de la testosterona formada pasa a los capilares sanguíneos y otra parte pasa a las células de la granulosa. Dentro de ellas, la testosterona ingresa a la mitocondria donde el C19 es oxidado en tres etapas por acción de monoaminooxigenasas. El producto final, rápida y espontáneamente (sin acción de enzimas), colapsa para dar un anillo aromático formándose el 17β-estradiol.



**Biosíntesis ovárica del 17 $\beta$ -estradiol:** en una primera etapa se sintetiza la testosterona a partir del colesterol en las células de la teca interna del folículo ovárico. En la segunda etapa, la testosterona es el precursor del 17 $\beta$ -estradiol formado en las células de la granulosa.

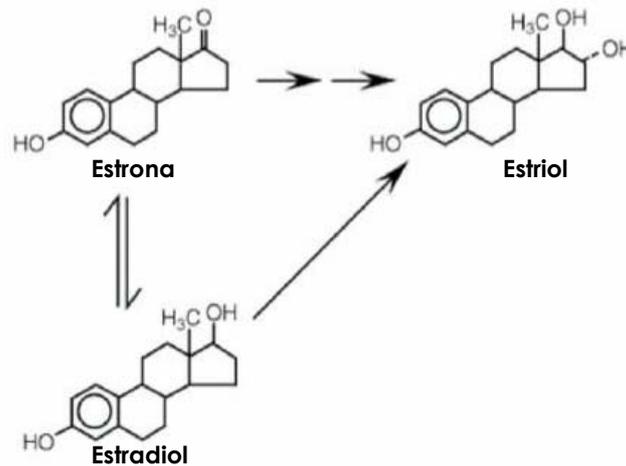
### **3. Regulación de la biosíntesis y metabolismo del 17 $\beta$ -estradiol**

Como se mencionó anteriormente, las células de la teca interna y de la granulosa del ovario tienen funciones complementarias en la síntesis de estrógenos. Las células de la teca interna poseen receptores para la Hormona Luteinizante (LH) y responden a su estímulo regulando las enzimas que transforman el colesterol en testosterona. En cambio, las células de la granulosa tienen receptores para la Hormona Folículo Estimulante (FSH) y responden a ella induciendo la síntesis de aromatasa (enzima que convierte la testosterona en 17 $\beta$ -estradiol). De esta manera, LH y FSH se complementan en su acción. En la mujer posmenopáusica el ovario deja de responder al estímulo de FSH, razón por la cual la aromatasa deja de sintetizarse en cantidades relevantes. En consecuencia, la síntesis de 17 $\beta$ -estradiol tiene lugar solamente en tejidos extraováricos.

Luego de ser liberados a la circulación, los esteroides gonadales se unen a proteínas plasmáticas [Norman y Litwak, 1987]. El estradiol se une con alta afinidad a la globulina específica de unión a hormonas esteroideas (SHBG) y con baja afinidad a la albúmina. SHBG se sintetiza en hígado y sus niveles son regulados positivamente por los estrógenos y negativamente por los andrógenos. Los estrógenos son metabolizados por el hígado y se excretan por orina conjugados con ácido glucurónico y sulfato.

#### 4. Funciones biológicas del 17 $\beta$ -estradiol

Existen tres hormonas estrogénicas naturales: el 17 $\beta$ -estradiol, el estriol, y la estrona. Esta última, es un producto de oxidación del estradiol, que ha incorporado una función cetona en C17. El estriol, es producto de la hidroxilación del estradiol, o también puede formarse a partir de la estrona (por oxidación e hidroxilación). La acción estrogénica del 17 $\beta$ -estradiol es 12 veces más potente que la estrona y 80 veces más que el estriol. Por este motivo se considera al 17 $\beta$ -estradiol como el estrógeno principal.



**Estrógenos:** estructuras moleculares de los diferentes estrógenos naturales: estradiol, estrona y estriol.

La función clásica de los estrógenos reside en su acción sobre la fisiología reproductiva femenina y masculina estimulando la proliferación, crecimiento y diferenciación celular en tejido mamario, útero, vagina, ovarios, testículos, epidídimo y próstata [Korach, 1994].

Sin embargo existen acciones de los estrógenos no relacionadas con el sistema reproductor, algunas de las cuales se detallan a continuación. Sobre el metabolismo óseo, el  $17\beta$ -estradiol favorece la actividad anabólica del esqueleto [Juul, 2001; Gruber *et al.*, 2001; Leder *et al.*, 2003]. En el sistema cardiovascular esta hormona modula la producción de factores vasoactivos y mejora el perfil lipídico [Kardos y Casadei, 1999; Subbiah, 2002]. Asimismo, los estrógenos son requeridos para el crecimiento y diferenciación neuronal y cobran importancia en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer [Kölsch y Rao, 2002; Cholerton *et al.*, 2002; Dykens *et al.*, 2005]. También se ha reportado que el  $17\beta$ -estradiol previene la progresión de enfermedades renales [Neugarten *et al.*, 1995; Dubey y Jackson, 2001].

#### **a. Déficit de $17\beta$ -estradiol: el caso de la menopausia**

La menopausia es un estado fisiológico de la mujer que ocurre alrededor de los 55 años. Es parte del proceso natural del envejecimiento y se caracteriza por el cese de la secreción hormonal ovárica. Al comienzo de esta etapa, los niveles de  $17\beta$ -estradiol circulantes disminuyen y el principal estrógeno en el cuerpo femenino pasa a ser la estrona, que se produce por conversión periférica de androstenodiona y testosterona. La menopausia provoca síntomas no deseables, asociados a la ausencia de estradiol como: sofocos, humor depresivo, ansiedad, insomnio, atrofia urogenital, enfermedad coronaria y osteoporosis [Korenman, 1982; Joffe *et al.*, 2003; Gambacciani y Vacca, 2004; Van Voorhis, 2005; Bachmann, 2005; Peeyananjarassri y Baber, 2005].

---

### **b. Estrógenos y músculo esquelético**

La sarcopenia del griego *sarx* (carne) y *penia* (pobreza) es la pérdida de masa muscular esquelética asociada al envejecimiento. Esta patología incrementa el riesgo de caídas y fracturas, aumenta la vulnerabilidad a las lesiones y, consecuentemente, puede ser causa de discapacidad motora. Entre los factores que originan esta patología, se encuentra el déficit de estrógenos [Dionne *et al.*, 2000]. Adicionalmente, se ha demostrado la expresión de receptores estrogénicos en el músculo esquelético de ratón, rata y humano indicando que éste es un tejido diana para los estrógenos [Dahlberg, 1982; Glenmark *et al.*, 2004; Wiik *et al.*, 2005]. Se ha reportado que, luego de una ovariectomía, la fisiología del músculo esquelético se recupera por administración de 17 $\beta$ -estradiol [Warren *et al.*, 1996; Kadi *et al.*, 2002]. Además, estudios recientes sugieren que esta hormona es importante en la recuperación de la masa muscular en casos de atrofia de dicho tejido [McClung *et al.*, 2006; Sitnick *et al.*, 2006], y que la hormona modula la actividad de la miosina, proteína clave en la contractilidad [Moran *et al.*, 2007]. De relevancia para este trabajo de tesis, otros reportes indican que el 17 $\beta$ -estradiol tiene efectos protectivos en el músculo esquelético contra el daño oxidativo [Persky *et al.*, 2000; Tiidus, 2005; Vasconsuelo *et al.*, 2008].

Como se ha detallado, el 17 $\beta$ -estradiol 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 ejerce su acción en células musculares esqueléticas.

## II. MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULARES

Los mecanismos de señalización intracelulares son la conexión necesaria entre un estímulo del ambiente externo a la célula y los procesos que ocurren en su interior, que permiten dar una respuesta fisiológica o patológica final. Algunas proteínas ancladas en la membrana plasmática de las células (receptores) actúan como "antenas" moleculares que capturan los estímulos externos y los transmiten al citoplasma. Además, existen moléculas capaces de pasar libremente a través de las membranas celulares e interactuar con proteínas que se encuentran en el citoplasma, núcleo o retículo endoplasmático y Golgi, transmitiendo de otra manera la señal.

### 1. Los receptores de estrógenos

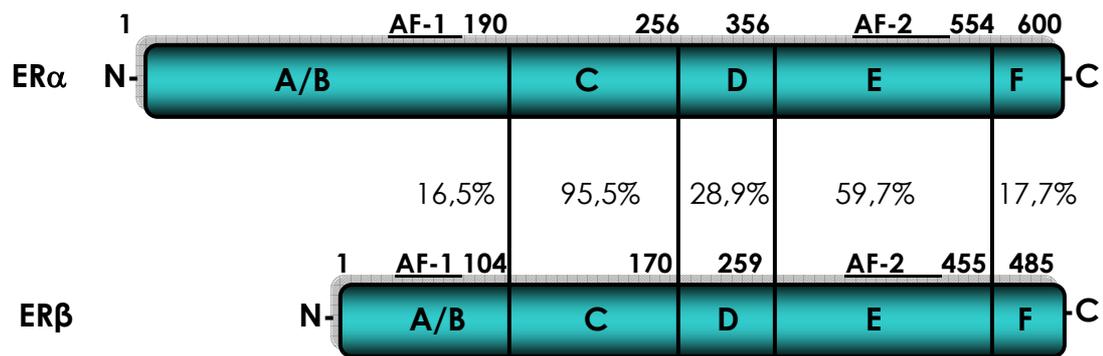
Los receptores de estrógenos (ERs) son proteínas pertenecientes a la súper familia de receptores nucleares que funcionan como factores de transcripción dependientes de ligando. El primer receptor estrogénico fue identificado en 1962 por Jensen y Jacobson, quienes describieron la presencia de sitios de unión para el 17 $\beta$ -estradiol en diferentes tejidos de ratas [Jensen y Jacobson, 1962]. Cuatro años más tarde, Toff y Gorski lo aislaron utilizando útero de ratas [Toff y Gorski, 1966]. Ambos grupos de investigadores desarrollaron distintos modelos para explicar cómo la hormona llevaba a cabo su acción uniéndose a su receptor específico en el núcleo, asumiendo la existencia de un solo tipo de receptor. Sin embargo, en 1996 se describe un nuevo receptor de estrógenos, por lo que se decide denominar ER $\alpha$  al

---

primeramente descubierto y ER $\beta$  al receptor más novel [Kuiper *et al.*, 1996]. En la mayoría de los vertebrados se expresan las dos isoformas del receptor ( $\alpha$  y  $\beta$ ) provenientes de la transcripción de genes diferentes. Ambos subtipos del receptor reconocen secuencias similares en el ADN y responden al 17 $\beta$ -estradiol de forma análoga, aunque existen diferencias en el grado de afinidad de unión al ADN y en la especificidad que poseen a ligandos farmacológicos. Si bien ER $\alpha$  y ER $\beta$  están ambos presentes en ciertos tejidos, poseen diferentes patrones de expresión y son funcionalmente distintos.

Como todos los receptores de esteroides, los receptores de estrógenos son proteínas modulares que consisten en un dominio de unión al ligando (LBD) o dominio C-terminal, un dominio de unión al ADN (DBD) localizado en la porción central y un dominio N-terminal. Existen al menos dos subdominios con funciones de activación (AFs): AF-1 en la porción N-terminal y AF-2 (dependiente del ligando) dentro del dominio LBD. Las regiones LBD y DBD de estos receptores son conservadas, mientras que el dominio N-terminal es altamente variable e importante para la actividad transcripcional de los mismos receptores [Mangelsdorf *et al.*, 1995; Thompson y Kumar, 2003]. El dominio N-terminal también contiene múltiples sitios de fosforilación en serina/treonina involucrando al receptor en diferentes caminos de señalización, en la modulación de la actividad de AF-1 y en la interacción con co-activadores específicos [Weigel, 1996; Rochette-Egly, 2003].

---



**ER $\alpha$  y ER $\beta$ :** Estructura de los receptores de estrógenos. A/B: dominio de transactivación, C: dominio DBD, de dimerización y localización nuclear, D: dominio de unión a HSP90, E: dominio LBD, de dimerización y transactivación. Los porcentajes indican el grado de homología en la composición aminoacídica entre los dominios de ER $\alpha$  y ER $\beta$ .

Aunque parte de este trabajo de tesis se focaliza en el estudio de los receptores mencionados, investigaciones recientes han revelado la existencia de otros receptores capaces de responder al 17 $\beta$ -estradiol. Uno de estos receptores, se ha denominado "Receptor Estrogénico acoplado a proteína G 30" (GPR30), el cual es una proteína transmembrana que se une con alta afinidad a la hormona mediando la activación de quinasas y respuestas transcripcionales [Revankar *et al.*, 2005; Filardo y Thomas, 2005; Prossnitz *et al.*, 2008]. Otra entidad receptora es el llamado "Receptor Estrogénico - X" (ER-X), el cual también tiene afinidad por el 17 $\alpha$ -estradiol y se lo ha encontrado en dominios caveolares de la membrana plasmática [Toran-Allerand *et al.*, 2002].

## 2. Mecanismos de acción del 17 $\beta$ -estradiol

Dada la gran cantidad de acciones del 17 $\beta$ -estradiol en diferentes tipos celulares, es importante describir los mecanismos moleculares desencadenados por esta hormona.

### a. Acción genómica

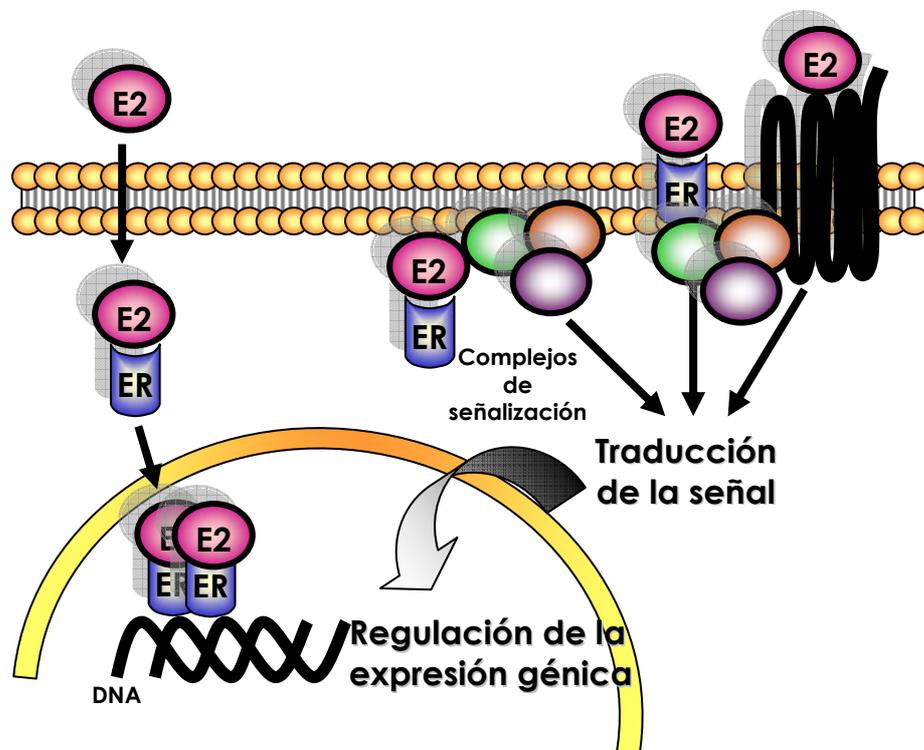
Este mecanismo está relacionado con los efectos de la hormona a largo plazo, donde se induce la síntesis de ARN *de novo* y que resulta en la producción final de nuevas proteínas. Dada su liposolubilidad, como todas las hormonas esteroideas, el 17 $\beta$ -estradiol atraviesa pasivamente la membrana celular y se liga a su receptor que puede estar presente en el citoplasma o en el núcleo, formando el complejo hormona-receptor. Este complejo se homodimeriza o heterodimeriza, y en el núcleo, se une a regiones específicas del ADN llamadas elementos de respuesta a estrógenos (EREs). La actividad de este complejo estimula la acción de las ARN polimerasas con la subsiguiente transcripción del ADN. Los ARNm sintetizados se dirigen al citoplasma, donde su traducción origina proteínas de función estructural, enzimática o de secreción [Klein-Hitpass *et al.*, 1986].

### b. Acción no genómica

Este modo de acción de la hormona no depende de la unión del complejo hormona-receptor al ADN y está asociado a efectos rápidos (de segundos a minutos) del 17 $\beta$ -estradiol sobre las células diana. Este mecanismo

---

puede iniciarse por interacción de la hormona con receptores estrogénicos en la membrana plasmática, con receptores localizados en el citoplasma que se asocian a complejos de señalización y, alternativamente, pueden transactivar a otros receptores. En cualquiera de los casos, se desencadena una rápida traducción de la señal hacia el núcleo que puede resultar también en la modulación de la expresión génica [Nemere y Farach-Carson, 1998; Levin, 1999; Falkenstein *et al.*, 2000; Pietras *et al.*, 2001; Kelly y Levin, 2001].



**Mecanismos de acción del 17β-estradiol:** a la izquierda se esquematiza el mecanismo genómico de acción de la hormona: el 17β-estradiol difunde pasivamente al interior celular y se une a su receptor localizado en el citoplasma o en el núcleo; el complejo hormona-receptor se dimeriza y se asocia a determinadas secuencias del ADN para inducir la transcripción de genes específicos. A la derecha se esquematiza el mecanismo no genómico: la hormona puede unirse a receptores localizados en la membrana plasmática, en el citosol asociados a complejos de señalización y también puede transactivar otros tipos de receptores. La traducción de la señal puede culminar en la regulación de la expresión génica.

### **c. Integración de las acciones no genómicas y genómicas**

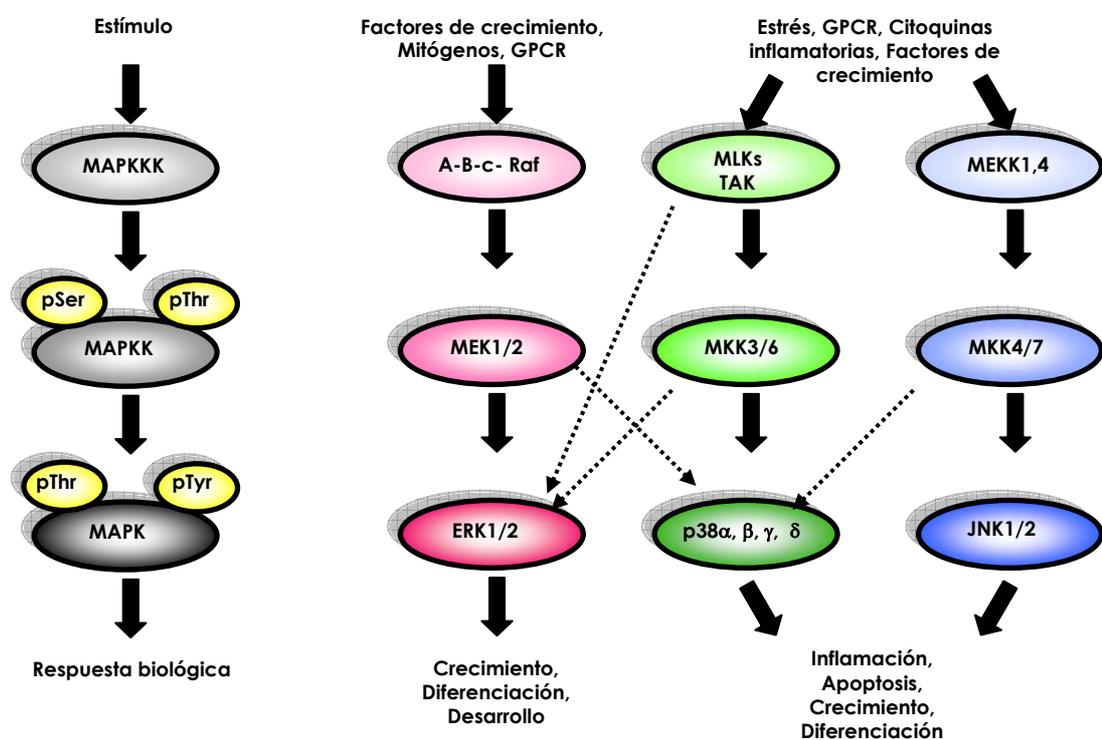
Las dos acciones del 17 $\beta$ -estradiol descritas anteriormente, no están mediadas por mecanismos totalmente independientes, existe una convergencia entre ambos regulada por la hormona. Debido a que los receptores estrogénicos están localizados en varios sitios dentro de la célula (núcleo, membrana plasmática, citosol, mitocondria, retículo endoplasmático y Golgi), el 17 $\beta$ -estradiol induce un proceso complejo de acciones tanto genómicas como no genómicas, resultando en una respuesta final tal como proliferación o supervivencia celular [Levin, 2005; Marino *et al.*, 2006].

### **3. Proteínas quinasas activadas por mitógenos**

Las cascadas metabólicas de las proteínas quinasas activadas por mitógenos, comúnmente llamadas MAPKs, constituyen uno de los sistemas de señalización más significativos involucrados en el control de diversos procesos biológicos tales como embriogénesis, diferenciación, proliferación, y muerte celular [Pearson *et al.*, 2001]. Las MAPKs son una familia de serina/treonina quinasas siendo las más estudiadas las quinasas de regulación extracelular 1 y 2 (ERK1/2), el grupo de las p38 MAPK (p38 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , y  $\delta$ ) y las quinasas amino terminales c-Jun ó proteínas quinasas activadas por estrés, JNK1, 2 y 3/SAPK [Kyriakis y Avruch, 2001]. Recientemente se han identificado otras MAPKs, v.g. ERK3, ERK5/MAPK gigante 1 (BMK1) y ERK7, que poseen distintas funciones y modos de regulación [Raman *et al.*, 2007; Turjanski *et al.*, 2007]. Cada una de las MAPKs consiste en una cascada de al menos tres proteínas quinasas [Lewis *et al.*, 1998] e incluye la fosforilación secuencial de una MAPK quinasa quinasa

---

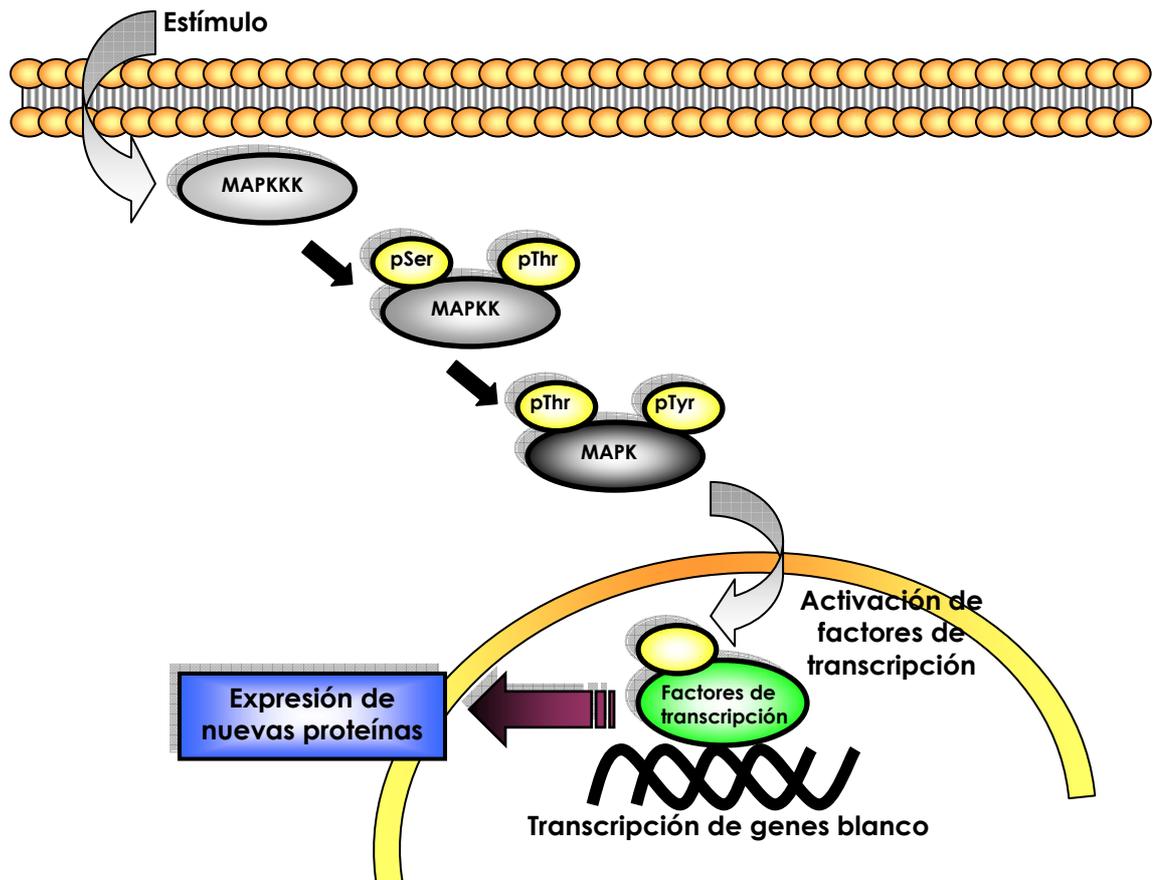
(MAPKKK) específica y una MAPK quinasa (MAPKK), la cual activa a una MAPK efectora, existiendo múltiples interacciones entre las diferentes vías. La estimulación de las MAPKs ocurre por fosforilación dual en residuos conservados de treonina (Thr) y tirosina (Tyr). Estos sitios de fosforilación están separados por un único aminoácido, Thr-X-Tyr, el que determina los diferentes grupos dentro de las MAPKs [Pearson *et al.*, 2001].



**Vías de señalización de las MAPKs.** Resumen esquemático de la cascada de tres proteínas quinasa de cada una de las principales subfamilias MAPKs. Se indican diferentes estímulos que pueden activarlas, así como algunas de las respuestas biológicas que inducen. GPCR: Receptores acoplados a proteínas G.

Luego de su activación, las MAPKs translocan al núcleo donde reconocen, se unen y activan proteínas nucleares, que en último término regulan la expresión génica [Gonzalez *et al.*, 1993; Lenormand *et al.*, 1998]. El

mecanismo más ampliamente utilizado por las MAPKs para regular la expresión génica es la fosforilación de factores de transcripción [Ofir *et al.*, 1990; Minden *et al.*, 1994; Livingstone *et al.*, 1995]. De importancia, recientemente se ha reportado la translocación de las MAPKs activas a mitocondrias [Alonso *et al.*, 2004].



**Regulación de la expresión génica por las MAPKs.** Las MAPKs activadas translocan al núcleo donde fosforilan y activan a factores de transcripción que regulan la expresión de determinados genes.

Se ha establecido que otras cascadas de señalización intervienen con la de las MAPKs permitiendo integrar y/o amplificar la señal que llega a las células [Waskiewicz *et al.*, 1997; Lewis *et al.*, 1998].

### III. MUERTE CELULAR

Se ha evidenciado que, dependiendo del tipo celular, el 17 $\beta$ -estradiol puede favorecer la supervivencia o alternativamente inducir la muerte en diferentes tejidos [Choi *et al.*, 2001; Okasha *et al.*, 2001]. En relación a las células musculares esqueléticas, previamente se mencionó que existen evidencias indicando que el 17 $\beta$ -estradiol sería un promotor de supervivencia [Persky *et al.*, 2000; Tiidus, 2005, Vasconsuelo *et al.*, 2008].

Los dos tipos de muerte celular más estudiados son la necrosis y la apoptosis. La primera tiene un carácter patológico que se inicia tras la injuria del tejido, ocurre cuando la agresión supera la capacidad de la célula para regenerarse y es una muerte "accidental". Mientras que la apoptosis, es un proceso fisiológico regulado genéticamente cumpliendo un rol importante durante el desarrollo embrionario y en la etapa adulta.

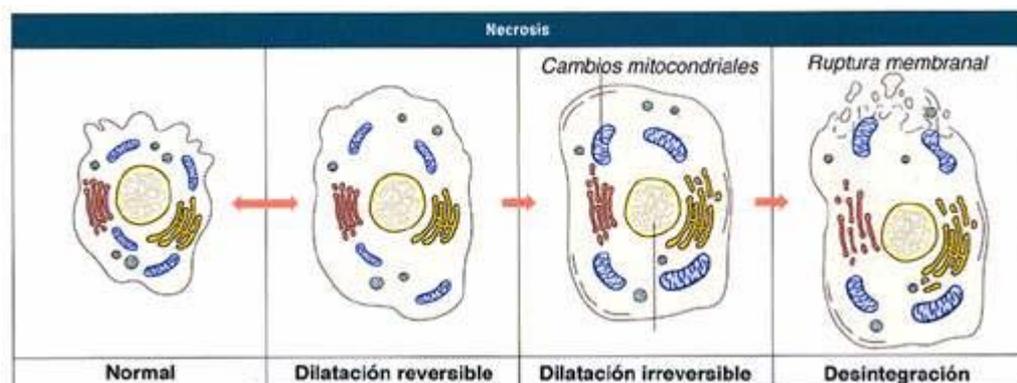
#### 1. Necrosis

Este término deriva del griego *nekrosis* (muerte) y define un proceso que se desencadena frente a un daño o disfunción celular aguda, en respuesta a condiciones de estrés severas o después de la exposición a agentes tóxicos. Es un mecanismo relativamente pasivo asociado a una rápida depleción celular de ATP.

Durante la necrosis, la permeabilidad de la membrana plasmática se altera y se establece un flujo anormal de iones (principalmente Ca<sup>2+</sup>) hacia el

---

interior, que va acompañado de la entrada pasiva de agua. El volumen celular aumenta (tumefacción) y algunas rutas metabólicas se alteran debido a las nuevas concentraciones iónicas que se establecen. Así, una mayor concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  inhibe la producción de ATP, a la vez que estimula la síntesis de algunas enzimas proteolíticas. La cromatina nuclear pierde su conformación original formando pequeños agregados. Algunos orgánulos membranosos, como el retículo endoplasmático o las mitocondrias, se dilatan por la entrada de agua, los ribosomas se desorganizan y los lisosomas se rompen. Durante la etapa final, los orgánulos estallan, la membrana plasmática y la envoltura nuclear se fragmentan y el contenido intracelular se vierte al exterior, promoviendo una respuesta inflamatoria. Las células fagocíticas que acuden al tejido ingieren y degradan estos restos. Posteriormente, la salida del contenido celular es la responsable de la extensión del fenómeno necrótico, ya que las células adyacentes son afectadas, directamente, o de modo indirecto por la reacción inflamatoria [Clarke, 1990; Golstein y Kroemer, 2007].

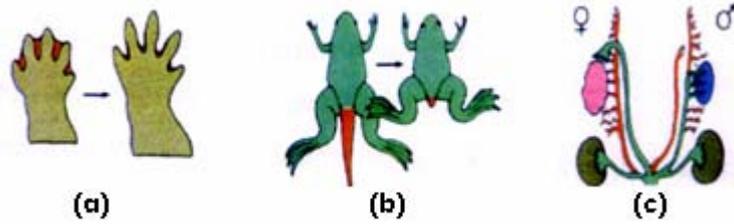


**Necrosis:** esquema de los cambios morfológicos de una célula en proceso de necrosis. Dibujo extraído de María Cascales Agosto, Anal. Real. Acad. Nal. Farm., 2003.

## 2. Apoptosis

El término apoptosis se utiliza como sinónimo de muerte celular programada (PCD) significando que la célula tiene la capacidad de poner en marcha un programa suicida en respuesta a determinados estímulos. La apoptosis es un proceso fundamental para el desarrollo y mantenimiento de la homeostasis de los tejidos. Actúa como mecanismo de regulación del tamaño de las poblaciones celulares [Raff *et al.*, 1992] y en la remoción de las células no deseables y potencialmente peligrosas en el organismo, tales como las que han sido infectadas por virus [Vaux *et al.*, 1994] y células tumorales [Williams, 1991].

Este proceso fue estudiado por primera vez por Vogt en 1842 en la metamorfosis de los anfibios. El término muerte celular programada fue inicialmente utilizado para describir la muerte celular que ocurría en lugares y momentos predecibles durante el desarrollo [Lockshin y Williams 1964]. En 1972, Kerr *et al.* unificaron en un solo concepto lo que varios autores observaban como muerte celular programada, y que era diferente de la necrosis. Primeramente a este fenómeno lo denominaron contracción o encogimiento de la necrosis y luego se adoptó el término "apoptosis", del griego *apop*, caída de las hojas de los árboles, para enfatizar el papel de este tipo de muerte celular en el recambio normal de los tejidos [Kerr *et al.*, 1972].



**Rol de la apoptosis en el desarrollo:** se grafican algunos ejemplos de fenómenos apoptóticos involucrados en **(a)** la reabsorción de las membranas interdigitales, **(b)** la eliminación de células no deseadas en la metamorfosis de los anfibios **(c)** la involución de los tejidos que crecen cíclicamente estimulados por factores de crecimiento y hormonas, y dejan de serlo periódicamente o definitivamente. Dibujo extraído de Jacobson *et al.*, 1997.

El programa apoptótico se caracteriza por la sucesión de los siguientes eventos:

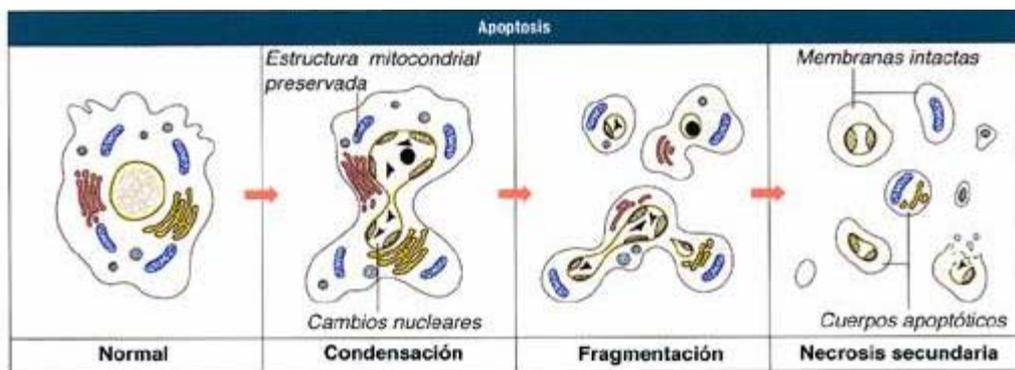
a) en una fase inicial, la célula individual pierde el contacto con las células que la rodean, la cromatina nuclear se condensa y fragmenta, permaneciendo la envoltura nuclear intacta. El volumen citoplasmático disminuye por pérdida de agua y condensación de las proteínas, pero la mayoría de los orgánulos celulares no sufren alteraciones.

b) la segunda etapa del proceso se caracteriza por la deformación de la membrana plasmática, que acaba fragmentándose y englobando material nuclear y/o citoplasmático morfológicamente intacto, son los llamados cuerpos apoptóticos.

c) en la fase final, los cuerpos apoptóticos son rápidamente reconocidos y fagocitados por células circundantes y macrófagos presentes en el tejido. Debido a este eficaz mecanismo de eliminación de las células

apoptóticas, no se produce respuesta inflamatoria. A diferencia de la necrosis, no hay ruptura de la célula que muere, ni sus restos se vierten al exterior. El reconocimiento para la fagocitosis, está mediado por la interacción de glucoproteínas alteradas expuestas en la membrana plasmática que rodea los cuerpos apoptóticos y los receptores de membrana de las células fagocíticas.

Todo este proceso requiere de ATP y es muy rápido, puede completarse en unas horas y, como se describió, ocurre sin pérdidas de material intracelular, daños secundarios a células adyacentes o reacción inflamatoria del tejido.



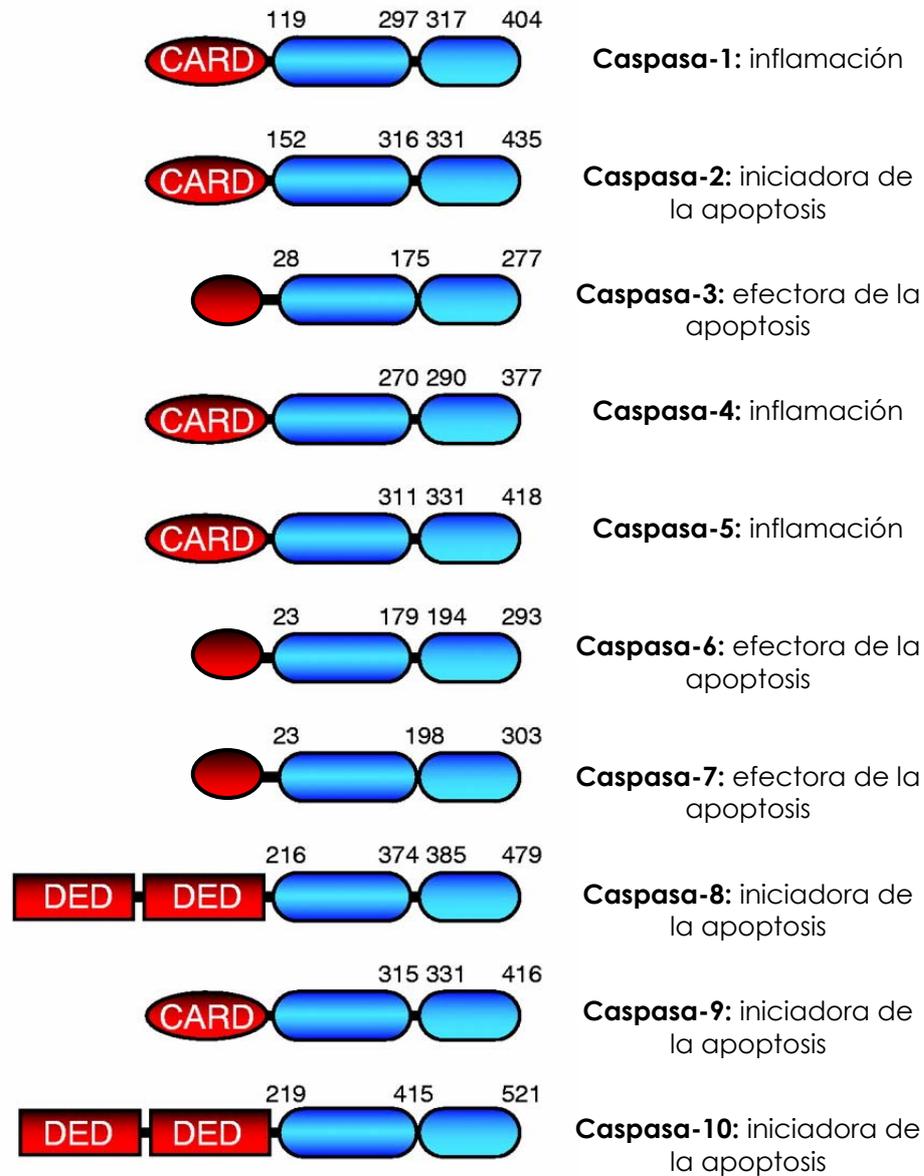
**Apoptosis:** Esquema de los cambios morfológicos de una célula en proceso de apoptosis. Dibujo extraído de María Cascales Angosto, Anal. Real Acad. Nal. Farm., 2003.

### 3. Inducción de la apoptosis y vías implicadas

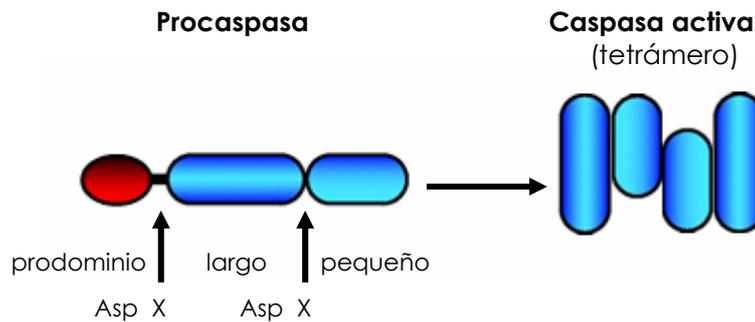
En general, la apoptosis puede desencadenarse por dos vías (extrínseca e intrínseca) que conducen en última instancia a la activación de las caspasas.

### **a. Las caspasas**

Dentro de la maquinaria que lleva a cabo el programa de apoptosis, los miembros ejecutores de este proceso son una serie de proteasas denominadas caspasas. Las caspasas forman una familia de cisteína-aspartato-proteasas que fragmentan sus sustratos de forma muy específica. Esta familia de proteasas, en humanos está compuesta al menos por 11 miembros. Las caspasas están presentes en el citosol como proenzimas de 30-50 kDa, formadas por un prodominio y dos subunidades separadas generalmente por una región que será eliminada al activarse. Se conocen dos tipos de caspasas, las iniciadoras y las efectoras o ejecutoras. Las iniciadoras (caspasas 2, 8, 9, 10) poseen grandes prodominios y regiones de interacción proteica, se encuentran al inicio de la cascada apoptótica, activándose en respuesta a señales de estrés, daño celular o muerte, para entonces proteolizar y activar a las caspasas efectoras (caspasas 3, 6, 7). Las caspasas efectoras poseen prodominios cortos y son activadas predominantemente por otras caspasas. Éstas, proteolizan otros sustratos que conducen finalmente a la muerte de la célula por apoptosis [Nuñez *et al.*, 1998; Thornberry y Lazebnik, 1998].



**Estructura y función de las caspasas:** esquema de las caspasas con sus dominios, sitios de corte, y funciones biológicas. Cada procaspasa consiste de un dominio largo y un dominio corto. CARD: dominio de reclutamiento de caspasas, DED: dominio efector de muerte.

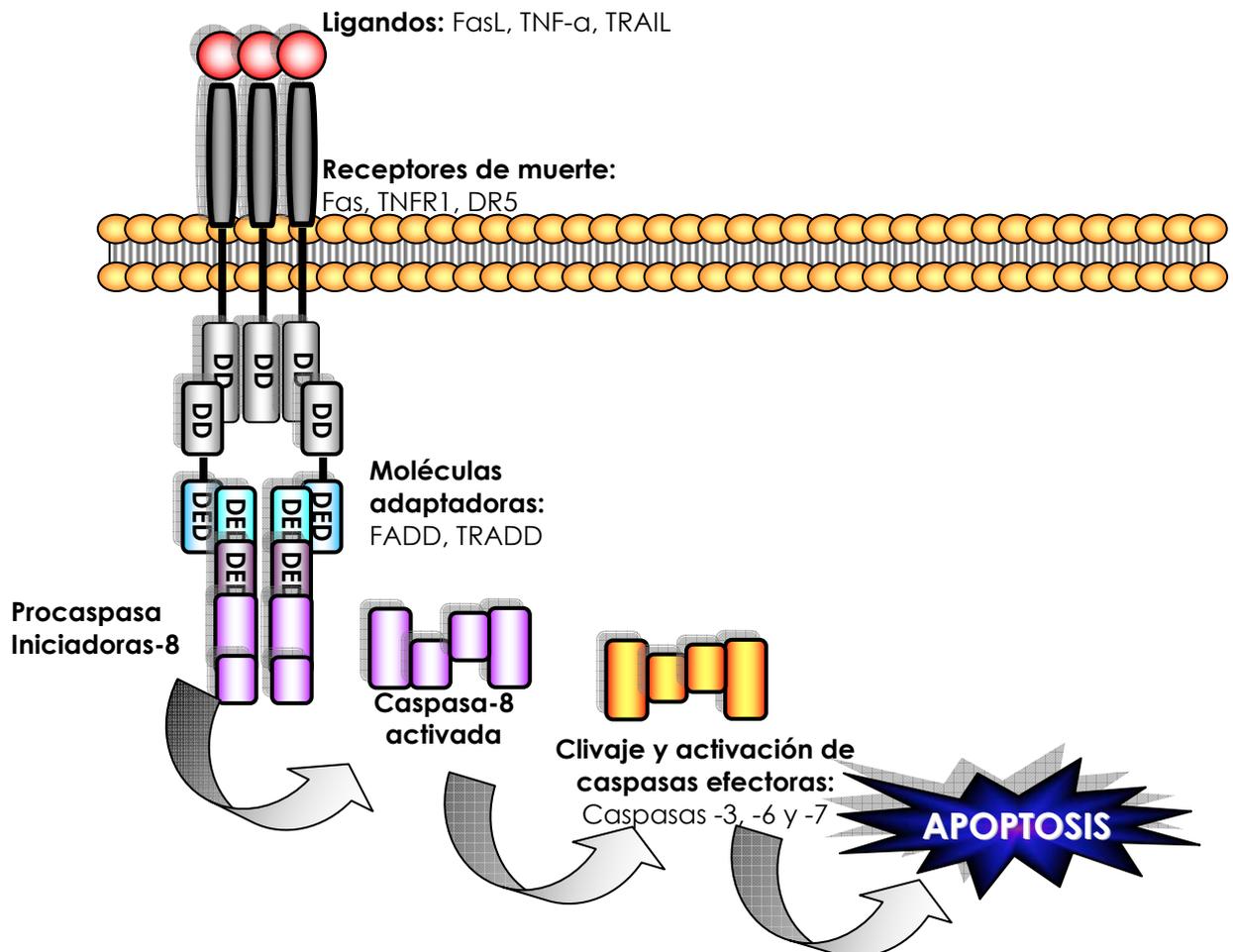


**Activación de las caspasas:** La procaspasa es inactiva y una vez que sufre dos roturas proteolíticas en residuos aspárticos, se separan las tres subunidades. La subunidad grande y la pequeña forman un heterodímero por unión de sus sitios activos. Luego se unen dos heterodímeros formando el tetrámero que da origen a la caspasa activa.

### b. Vía extrínseca

Participan los llamados “receptores de muerte” que se encuentran en la superficie celular y transmiten las señales apoptóticas luego de la interacción con ligandos externos específicos. Los receptores de muerte pertenecen a la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) e incluyen a TNFR-1, Fas/CD95 y los receptores TRAIL DR-4 y DR-5 [Ashkenazi, 2002]. Todos los miembros de la familia TNFR tienen subdominios extracelulares ricos en cisteína, los cuales permiten reconocer los ligandos con especificidad, resultando en la trimerización y activación del receptor de muerte respectivo [Idriss y Naismith, 2000]. La señalización subsiguiente es mediada por el dominio citoplasmático del receptor, que contiene una secuencia conservada denominada dominio de muerte (DD), y por moléculas adaptadoras tales como FADD o TRADD que poseen sus propios dominios DD; los cuales son reclutados por los DD de los receptores de muerte activados, formando un complejo de señalización de

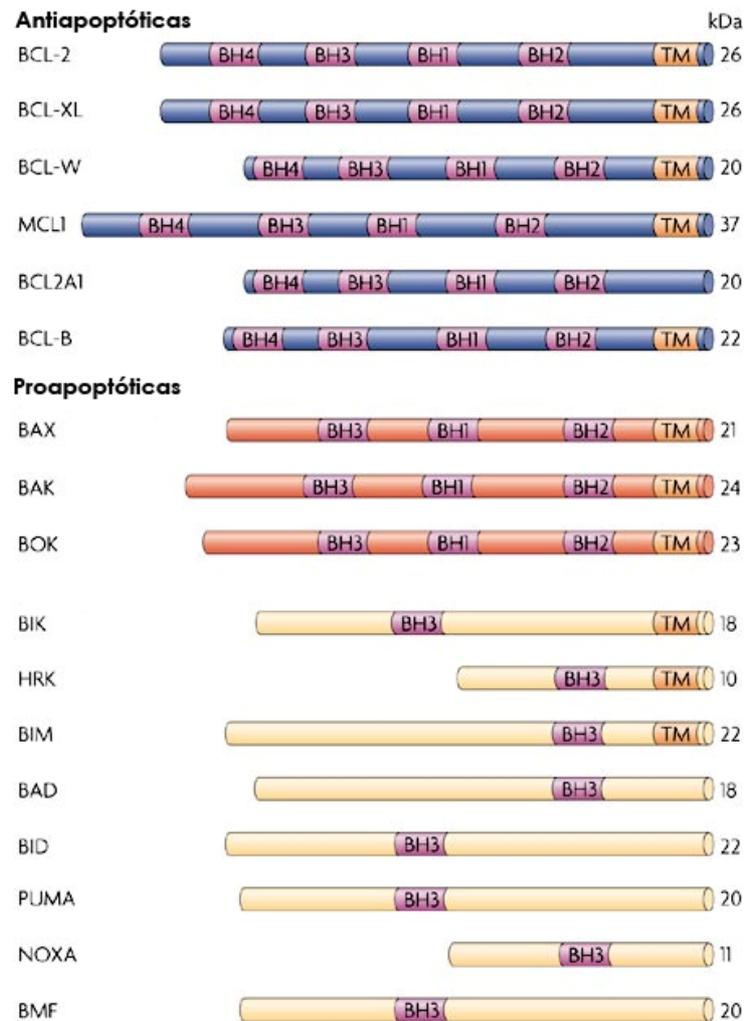
muerte (DISC). Además de estos DD, las moléculas adaptadoras también contienen un dominio efector de muerte (DED) el cual a través de la interacción DED-DED secuestra varias moléculas de procaspasa-8. Esto aumenta la concentración local de zimógeno y, en estas condiciones, la baja e intrínseca actividad proteasa de la procaspasa-8 es suficiente para permitir que varias moléculas de proenzima se corten mutuamente y se activen unas a otras. De esta manera la caspasa-8 activada cliva a las caspasas efectoras las cuales van a actuar sobre sustratos específicos.



**Vía extrínseca de la apoptosis:** Esquema de la activación del proceso apoptótico mediado por receptores de muerte.

### c. Mecanismo intrínseco

La mitocondria juega un rol central en la integración, amplificación y propagación de las señales de muerte que provienen del interior celular, tales como daño en el ADN, estrés oxidativo y señales inducidas por drogas quimioterapéuticas [Kaufmann y Earnshaw, 2000; Wang, 2001]. Este mecanismo está regulado principalmente por los miembros de la familia Bcl-2 (que incluye proteínas anti y proapoptóticas) de los cuales algunos actúan sobre los procesos de permeabilización mitocondrial.

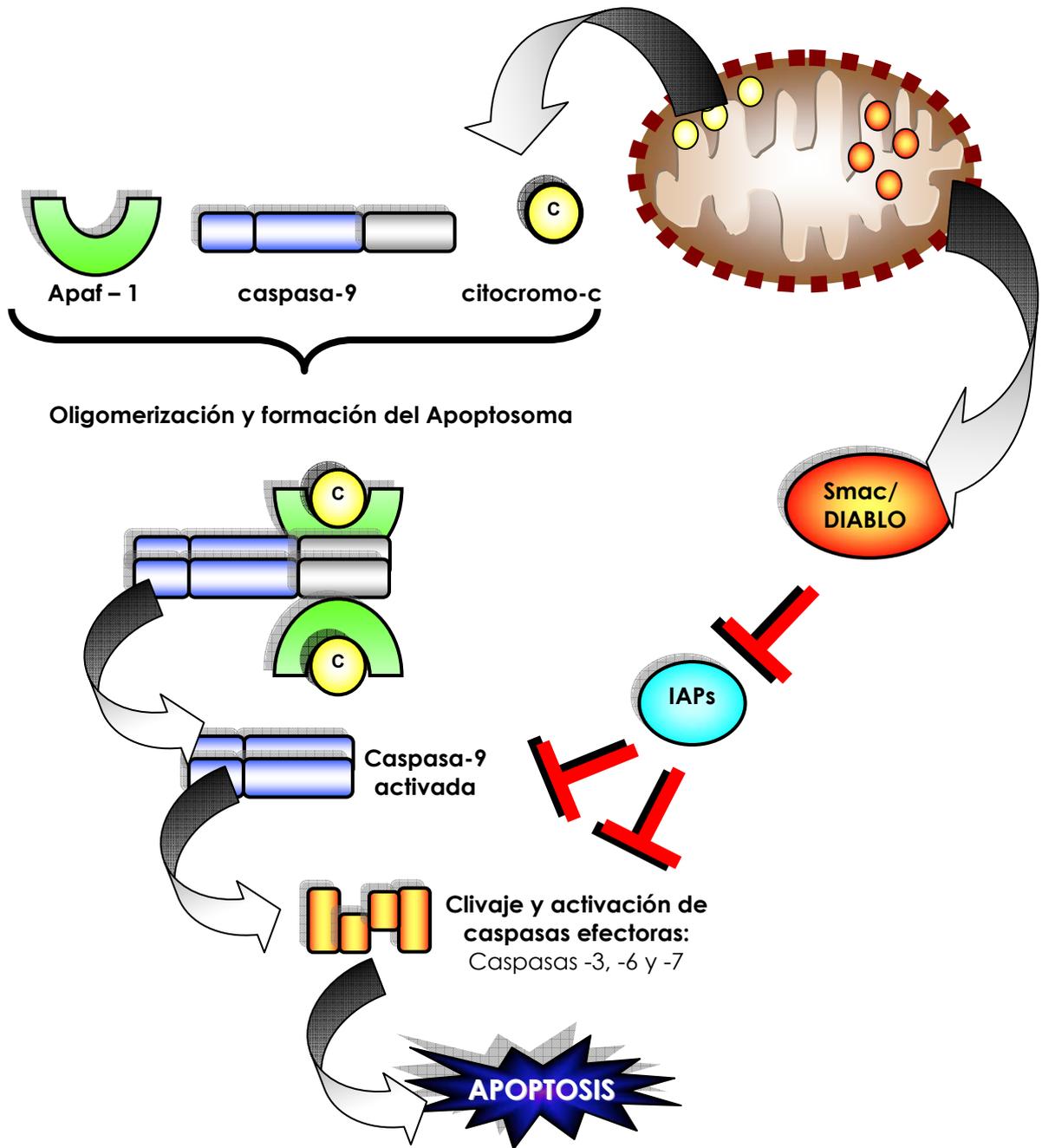


**Familia Bcl-2:** se esquematizan los miembros antiapoptóticos y proapoptóticos de la familia Bcl-2. BH: dominios homólogos. TM: dominios transmembrana.

Las mitocondrias poseen un potencial de membrana, el cual genera una distribución asimétrica de protones y otros iones en ambas caras de la membrana interna de la organela, dando lugar a un gradiente electroquímico. En un proceso apoptótico mediado por las mitocondrias se pierde este potencial de membrana, aumentando la permeabilidad y facilitando la liberación de proteínas desde esta organela al citosol. Dicho mecanismo, es un evento muy temprano que se produce por la apertura de un gran canal llamado poro de transición de permeabilidad (PT) mitocondrial. PT está formado por proteínas de la membrana interna, como el translocador de nucleótidos adenina (ANT), y de la membrana externa, como la porina o canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC). Tanto las caspasas como los miembros de la familia Bcl-2 facilitan su apertura permanente [Yuan y Yankner, 2000].

Uno de los componentes liberados desde la mitocondria es el citocromo-c que se une a la proteína adaptadora Apaf-1, y en forma dependiente del ATP oligomeriza ensamblando el apoptosoma, complejo que dispara la activación de la caspasa-9 [Acehan *et al.*, 2002]. La caspasa-9 activada inicia una cascada de activación de caspasas efectoras, entre las que se incluye a la caspasa-3, resultando en la muerte celular [Slee *et al.*, 1999]. Entre otros factores, también se libera de la mitocondria la proteína proapoptótica Smac/DIABLO, la cual a su vez, induce la activación de las caspasas al inhibir las proteínas inhibitorias de la apoptosis (IAPs) [Shiozaki y Shi, 2004].

---



**Mecanismo intrínseco de la apoptosis:** se esquematiza la activación del proceso apoptótico que involucra a la mitocondria.

Paralelamente a estos procesos, ocurre un desacople en la cadena de transporte de electrones y la detención del metabolismo energético. De esta manera, se pierde la homeostasis bioquímica de la célula, causando un cese de la síntesis de ATP. Además, moléculas como NADH, NADPH y glutatión son oxidadas aumentando la generación de especies reactivas al oxígeno (ROS), lo que causa oxidación de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos [Marchetti *et al.*, 1997; Kroemer *et al.*, 1999].

#### **d. Integración de las vías extrínseca e intrínseca**

En algunas circunstancias, la señal de apoptosis proveniente de los receptores de muerte no genera un grado de activación de caspasas lo suficientemente alto como para ejecutar la muerte celular. En tal caso, la señal es amplificada con la activación de la vía intrínseca. La conexión entre estas dos vías se da a nivel de la caspasa-8, la cual actúa sobre un miembro de la superfamilia de Bcl-2 llamado Bid. Esta proteína clivada por la caspasa-8 se transforma en tBid y transloca a la mitocondria. tBid, en la mitocondria, actúa conjuntamente con los miembros proapoptóticos de Bcl-2, Bax y Bak, e induce la liberación de citocromo-c y otros factores proapoptóticos mitocondriales al citoplasma [Luo *et al.*, 1998].

---

# OBJETIVOS

## OBJETIVOS

Considerando que el  $17\beta$ -estradiol ejerce una función importante en la fisiología del músculo esquelético y que se desconocen en gran parte los mecanismos moleculares que median la acción de la hormona en este tejido, en el trabajo de tesis se plantearon los siguientes objetivos:

1. Investigar la participación de los miembros de la familia de las MAPKs en la traducción de la señal del  $17\beta$ -estradiol en células musculares esqueléticas.

- Caracterizar los efectos rápidos inducidos por dosis fisiológicas del  $17\beta$ -estradiol sobre ERK1/2 y p38 MAPK en la fase proliferativa de la línea celular de músculo esquelético de ratón C2C12.

- Estudiar la activación de los factores de transcripción CREB y Elk-1 y la modulación de la expresión de los genes tempranos c-Fos y c-Jun por el  $17\beta$ -estradiol, y la participación de las MAPKs en este mecanismo.

- Elucidar si las proteínas PKC y Src están involucradas *upstream* a las vías de ERK1/2 y p38 MAPK en la respuesta al  $17\beta$ -estradiol.

- Identificar la participación de los receptores estrogénicos ( $ER\alpha$  y  $ER\beta$ ) en la fosforilación de las MAPKs por  $17\beta$ -estradiol.

2. Investigar el rol de ERK1/2 y p38 MAPK en los efectos protectivos del 17 $\beta$ -estradiol en células musculares esqueléticas expuestas a un inductor de apoptosis (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>):

- Estudiar los cambios morfológicos (organización de la actina, disposición de las mitocondrias y morfología nuclear) y funcionales en la línea de músculo esquelético C2C12, en condiciones apoptóticas y en presencia de 17 $\beta$ -estradiol. Establecer la implicancia de las vías de ERK1/2 y p38 MAPK.

- Determinar la participación de ERK1/2 y p38 MAPK en la regulación de la activación de Akt y Bad por el 17 $\beta$ -estradiol.

- Investigar los efectos del 17 $\beta$ -estradiol sobre la integridad de la membrana mitocondrial y liberación de Smac/DIABLO así como la contribución de ERK1/2 y p38 MAPK en este mecanismo.

- Estudiar el efecto de los inhibidores de ERK1/2 y p38 MAPK en la acción del 17 $\beta$ -estradiol sobre el clivaje de caspasa-3 y PARP.

3. Estudiar el efecto del 17 $\beta$ -estradiol sobre la localización mitocondrial de ERK1/2.

---

# METODOLOGÍA

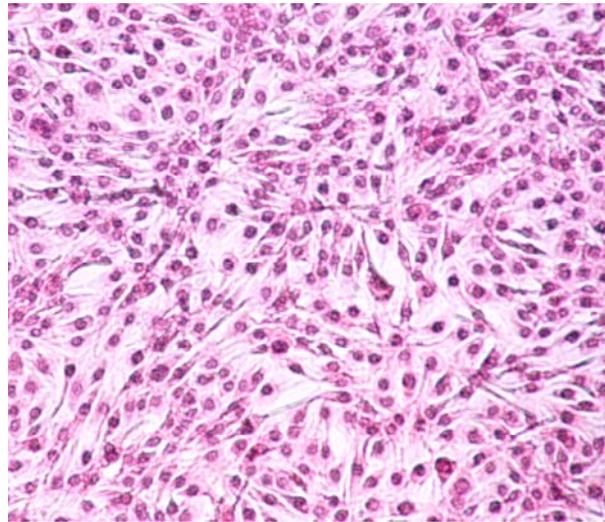
## **1. La línea celular C2C12 en estado proliferativo como modelo de células mioblásticas**

La biogénesis del músculo esquelético es un proceso complejo y tiene lugar desde las primeras semanas del desarrollo embrional. Las células mesenquimales totipotenciales originan una población de células fusiformes mononucleadas llamadas mioblastos, las cuales son precursores de las células musculares contráctiles. Durante la diferenciación muscular, éstas se fusionan progresivamente para formar el sincitio plurinuclear, dando origen a miotubos que van cambiando sus características morfo-funcionales hacia 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 de 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]. En condiciones particulares, tales como denevarción, estrés por ejercicio físico, daño muscular y otros, estas células proliferan, se diferencian, y se fusionan para formar fibras que reparan el daño del tejido muscular [Morgan y Partridge, 2003].

Para estudiar los efectos del  $17\beta$ -estradiol sobre las células musculares esqueléticas, se eligió la línea celular de músculo esquelético murino C2C12. Éstas son derivadas de células satélites, siendo un subclon de los mioblastos C2 [Yaffe y Saxel, 1977]. Se cultivan *in vitro* adheridas al fondo de una placa de vidrio o material plástico, donde crecen formando una monocapa y

---

espontáneamente se diferencian al remover el suero del medio de cultivo [Blau *et al.*, 1983]. Las células C2C12 en estado cíclico (proliferación) 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].



**Microfotografía mostrando la morfología típica de las células C2C12 en estado proliferativo al 100% de confluencia.** Estas células son poligonales, con núcleos prominentes. Tinción con Hematoxilina-Eosina. Magnificación 10X.

## **2. Cultivos celulares**

### **a. Cultivos de células C2C12**

Las células C2C12 se sembraron a una densidad de 10.000 células/cm<sup>2</sup> y se cultivaron en monocapa a 37°C bajo atmósfera húmeda de 94,5% aire/ 5,5% CO<sub>2</sub> en medio de cultivo DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco) sin rojo fenol, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor, 1% de antimicótico (nistatina) y 2% de antibiótico (estreptomina – penicilina). Luego de 48 horas en cultivo (70 - 80% confluencia), las células fueron usadas para los correspondientes tratamientos.

### **b. Cultivos primarios de músculo esquelético de ratón**

Con la finalidad de validar los resultados obtenidos en células de la línea C2C12, se utilizaron ratones neonatos (4 - 5 días) para aislar mioblastos según técnicas previamente descritas [Vazquez y de Boland, 1996]. El músculo soleus fue disectado y las células se disociaron por agitación en una solución salina conteniendo 0,15 % de tripsina a 37°C bajo atmósfera humidificada de 95% aire y 5% CO<sub>2</sub> durante 30 minutos. Esta suspensión celular se colocó en placas de petri y se dejó reposar durante 30 minutos para separar los fibroblastos por adhesión diferencial al vidrio. Los mioblastos en suspensión se recuperaron por centrifugación a 500 rpm (800 x g) durante 5 minutos y se cultivaron en DMEM suplementado con 10% SFB, 1% antimicótico (nistatina) y 2% antibiótico (estreptomina – penicilina) hasta alcanzar un 70 - 80% de confluencia.

Para realizar estudios usando la técnica de inmunocitoquímica, las células se sembraron y cultivaron sobre cubreobjetos de vidrio, bajo las mismas condiciones descritas previamente.

### **3. Evaluación de la viabilidad celular por tinción con Azul Tripán**

El método de exclusión de Azul Tripán se basa en el principio de que sólo las células no viables incorporan el colorante [Paul J., 1975]. Esta tinción permite, además, una adecuada visualización de la morfología e integridad celular. Se tomaron 0,1 ml de la suspensión de mioblastos y se mezclaron con 0,1 ml de una solución 0,4 % (p/v) de Azul Tripán (factor de dilución 1:2). Con esta mezcla, se cargó un hemocitómetro de Neubauer y se procedió al conteo de las células no teñidas (viables) por observación en un microscopio óptico. Se calculó la cantidad de células por ml de suspensión de acuerdo a la siguiente fórmula:

Nro. Cél./ml = promedio de cél. contadas/cuadrante x factor de dilución x  $10^4$

### **4. Tratamiento de los mioblastos**

**a-** Para evaluar los efectos no genómicos del  $17\beta$ -estradiol, las células se lavaron con buffer PBS (en g/L: NaCl 8; KCl 0,2;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,24;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1,44; pH: 7,2-7,4) y se incubaron en medio de cultivo sin SFB por 30 minutos. La ausencia de suero permite estabilizar las células en un estado basal. Durante esta pre-incubación de 30 minutos, se procedió al agregado de inhibidores específicos

en los casos que correspondiera; y luego, las células se trataron con 17 $\beta$ -estradiol o vehículo (en medio libre de suero), como se detalla en la sección de Resultados. En todos los casos, los tratamientos se realizaron a 37°C bajo atmósfera húmeda de 94,5% aire/ 5,5% CO<sub>2</sub>.

**b-** Para estudiar los efectos antiapoptóticos del 17 $\beta$ -estradiol, las células fueron lavadas como se describió anteriormente y a continuación se incubaron con DMEM sin suero y sin rojo fenol durante 30 minutos. Durante esta preincubación, en los casos que correspondiera, se procedió al agregado de los inhibidores específicos de ERK1/2 (U0126 10  $\mu$ M) y de p38 MAPK (SB203580 (20  $\mu$ M). Luego, las células fueron estimuladas con 17 $\beta$ -estradiol 10<sup>-8</sup>M o vehículo (isopropanol 0,001%) en presencia o ausencia de los inhibidores durante 45 minutos. A continuación, para inducir apoptosis, las células fueron expuestas a 0,5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 2 - 3 horas. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ha sido ampliamente usado como inductor de apoptosis, incluso para la línea celular de músculo esquelético C2C12 [Jiang *et al.*, 2005]. Todos los tratamientos se realizaron a 37°C bajo atmósfera húmeda de 94,5% aire / 5,5% CO<sub>2</sub>.

## **5. Procesamiento de las muestras para ensayos de *Western Blot***

Luego de los distintos tratamientos, se aspiró el medio e inmediatamente, se lisaron las células a 4°C en buffer Tris HCl 50 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, KCl 3 mM, EDTA 1 mM, Tween-20 1%, Nonidet P-40 1%, aprotinina 20  $\mu$ g/ml, leupeptina 20  $\mu$ g/ml, PMSF 1 mM, NaF 25 mM y Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM. Los

---

lisados se colectaron en tubos *ependorfs* dejándolos en reposo sobre hielo por 10 minutos, luego se agitaron en *vórtex* 45 segundos y se mantuvieron en hielo 10 minutos adicionales. Para descartar restos celulares, los lisados se centrifugaron a 14.000 x g durante 15 minutos a 4°C. Del sobrenadante obtenido se tomaron alícuotas donde se cuantificaron las proteínas por el método de Bradford [Bradford, 1976]. Seguidamente, cantidades equivalentes de proteínas totales de los lisados fueron diluidas con buffer muestra de electroforesis 6X (0,125 M Tris-HCl pH 6,8, 4% SDS, 20% glicerol, 2% 2-METOH, 0,002% azul de bromofenol), y se calentaron en baño de agua a ebullición durante 5 minutos.

## **6. Electroforesis en geles de poliacrilamida**

Las muestras obtenidas anteriormente, se separaron por electroforesis sembrando 30 µg proteína/calle en geles de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) discontinuos (gel de *stacking*: 4% acrilamida, gel de separación: 10% acrilamida) según la técnica de Laemmli [Laemmli, 1970]. En paralelo, se sembraron marcadores coloreados de peso molecular conocido. Los geles se corrieron a voltaje constante (100 voltios) en buffer de corrida (Tris 25 mM pH 8,8, glicina 195 mM, 0,1% SDS).

## 7. Ensayos de *Western-Blot*

Luego de la corrida electroforética, los geles se estabilizaron 5 minutos en buffer Towbin de transferencia (Tris 0,25 M pH 8,3, glicina 0,192 M, 20% metanol) [Towbin *et al.*, 1979] y las proteínas fueron electrotransferidas desde los geles a membranas de polivinilideno difluoruro (PVDF) (Inmobilon-P, 0,45  $\mu\text{m}$ , Millipore Corporation) en una cámara semi seca (Semi-Dry Blotter, Sigma) a 125 mA por gel durante 2 horas, manteniendo las membranas y los geles embebidos en buffer Towbin. Seguidamente, las membranas fueron incubadas 1 hora a temperatura ambiente en buffer TBS-T (Tris 50 mM pH 7,4; NaCl 200 mM; 0,1% Tween-20) conteniendo 5% de leche descremada en polvo para bloquear sitios de ligando inespecíficos. Luego se incubaron toda la noche a 4°C con una dilución apropiada de anticuerpo primario (en TBS-T o PBS-T con 1 - 5 % de leche ó BSA, según especificaciones del anticuerpo empleado). Al otro día, las membranas fueron lavadas una vez durante 15 minutos y dos veces por 5 minutos con TBS-T o PBS-T. Posteriormente, fueron incubadas con la dilución apropiada del anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa (anti globulina de la especie animal correspondiente al anticuerpo primario usado) en TBS-T o PBS-T 1 - 5 % de leche. Finalmente, las membranas se lavaron como se indicó anteriormente y se incubaron con un kit comercial de quimioluminiscencia (ECL). La detección de los complejos inmunes se llevó a cabo exponiendo las membranas a placas radiográficas Kodak BioMax Light film durante intervalos de tiempo variables. Las bandas presentes en las placas fueron digitalizadas densitométricamente (utilizando un densitómetro de imágenes modelo GS-700 de Bio-Rad) a 600 lbi y la cuantificación de las

---

bandas se realizó con el *software Molecular Analysis* de BIO-RAD. Los datos fueron tabulados en planillas de Excel para la construcción de los gráficos correspondientes.

Para determinar cambios en la fosforilación de las MAPKs se emplearon: un anticuerpo monoclonal dirigido contra los residuos treonina 202 y tirosina 204 fosforilados de ERK1/2; un anticuerpo policlonal que reconoce la fosforilación dual de p38 MAPK (isoformas  $\alpha$  y  $\beta$ ) en treonina 180 y tirosina 182. Como control de siembra se utilizó un anticuerpo monoclonal que reconoce los niveles endógenos de actina. Los demás anticuerpos primarios empleados en este trabajo de tesis se detallan en la sección de Resultados.

## **8. Extracción (por lavado) de los anticuerpos en las membranas:**

### ***Stripping***

La remoción completa de anticuerpos primarios y secundarios de las membranas se realizó incubando las mismas en buffer *stripping* (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8; 2% SDS y  $\beta$ -mercaptoetanol 50 mM) a 55°C durante 30 minutos con agitación constante. A continuación, las membranas se lavaron con TBS-T (1% Tween-20) por 10 minutos y se bloquearon como se indicó anteriormente. Luego de este procedimiento, las membranas quedaron en condiciones para ser incubadas con otros anticuerpos de interés.

## **9. Inmunocitoquímica**

Las células crecidas sobre cubreobjetos fueron fijadas con metanol a -20°C durante 30 minutos. Los sitios de ligado no específicos se bloquearon con 5% BSA en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación. Posteriormente, las muestras fueron incubadas durante toda la noche a 4°C en PBS conteniendo 1 – 5 % de BSA, con la dilución apropiada de anticuerpo primario empleado en cada experimento. Luego de 3 lavados con PBS durante 15 minutos, las muestras se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados a TRITC, FITC o Alexa488 (1:200) según el anticuerpo primario empleado, por 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se efectuaron 3 lavados de 15 minutos adicionales con PBS para eliminar el exceso de anticuerpo secundario y las muestras se montaron con glicerol 9 % sobre un portaobjetos para ser examinadas por microscopía de fluorescencia o confocal.

## **10. Microscopía**

### **a. Microscopía de fluorescencia**

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 capturadas utilizando una cámara digital acoplada al microscopio.

### **b. Microscopía Confocal**

A diferencia de la microscopía convencional, en la cual el espécimen es totalmente iluminado, la microscopía confocal permite eliminar la información que se encuentra fuera de foco. Solamente la luz dentro del plano focal es detectada, siendo la imagen obtenida de alta calidad. Se utilizó un microscopio confocal Leica TCS SP2 AOBS. El software que se utilizó para procesar las imágenes fue *Software LCS* (Leica Confocal Software) version 2.61.

## **11. Fraccionamiento subcelular**

Luego de los tratamientos adecuados, se aspiró el medio de cultivo e inmediatamente, las células se homogenizaron a 4°C en buffer TES (pH=7.4, 50 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 250 mM sacarosa, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 20 µg/ml leupeptina, 20 µg/ml aprotinina, y 20 µg/ml de inhibidor de tripsina) usando un homogenizador manual de vidrio y teflón. El proceso de centrifugación diferencial para obtener las distintas fracciones, se realizó a 4°C en una centrífuga Sorvall. La primera velocidad a 500 rpm (100 x g) durante 5 minutos permitió sedimentar y eliminar los restos celulares. El sobrenadante obtenido, se sometió a una centrifugación de 2.500 rpm (600 x g) durante 15 minutos para obtener el sedimento correspondiente a la fracción enriquecida en núcleos. Se separa el sobrenadante para realizar una posterior centrifugación a 10.000 rpm (8.000 x g) durante 30 minutos, obteniéndose el sedimento correspondiente a la fracción enriquecida en mitocondrias. El sobrenadante remanente se denominó sobrenadante posmitocondrial y corresponde al citosol con

microsomos. Se realizaron dos lavados de cada fracción resuspendiendo los sedimentos en buffer TES y realizando centrifugaciones a 10.000 rpm (8.000 x g) durante 30 min. Por *Western Blot* se determinó la contaminación nuclear en las fracciones mitocondrial y sobrenadante posmitocondrial usando un anticuerpo contra lamin-B, una proteína marcador nuclear.

## **12. Bloqueo de la expresión de ER $\alpha$ y ER $\beta$ : transfección con siRNA (pequeño ARN de interferencia)**

Para realizar la transfección de los siRNA específicos se utilizó un kit comercial de New England Biolabs. Las células crecidas en monocapa hasta una confluencia de 40 - 60% en DMEM suplementado con 10% SFB se transfectaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, en medio DMEM sin suero se mezclaron el reactivo de transfección TransPass con 13 nM de siRNA-ER $\alpha$  o siRNA-ER $\beta$  (mezcla de transfección) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, el medio de cultivo de las células fue aspirado y reemplazado con la mezcla de transfección. De esta manera, se incubaron las células durante 4 horas a 37°C. Seguidamente, se adicionó medio DMEM suplementado con 10% SFB y se realizó una incubación adicional de 24 hs a 37°C.

### **13. Medición de la integridad de la membrana mitocondrial**

Se evaluó la integridad de la membrana mitocondrial usando 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 fueron homogenizadas en buffer TES a 4°C. Los homogenados celulares fueron sometidos a una centrifugación de 10.000 rpm (8.000 x g) durante 30 minutos y a 4°C para sedimentar los núcleos, mitocondrias intactas y restos celulares. Del sobrenadante obtenido, se tomaron alícuotas para determinar proteínas y la actividad de citocromo-c oxidasa. Una alícuota correspondiente a 2 µg de proteína fue agregada a un buffer conteniendo 10 mM Tris-HCl pH: 7.0 y 120 mM KCl. Para realizar el ensayo enzimático se adicionó a las muestras obtenidas anteriormente, 50 µl de sustrato (ferrocitocromo c reducido 0,22 mM) y luego se midieron los cambios en la absorbancia a 550 nm durante 1 minuto. Los resultados fueron expresados como % de mitocondrias con membrana mitocondrial dañada.

### **14. Tinción de las mitocondrias**

#### **a. 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 tiñéndola de un color azul-verdoso (estado oxidado). No obstante, dicha tinción en el citoplasma 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 se retiró el medio de cultivo y las células fueron incubadas a 37°C con una dilución 1:2 de Verde Jano 0,1% en DMEM sin suero durante 30 minutos. Posteriormente, se realizó el análisis microscópico de las células viables capturando imágenes con una cámara digital acoplada al microscopio.

#### **b. *Mitotracker***

El *Mitotracker* es un colorante catiónico, lipofílico, fluorescente y específico de la mitocondria. El potencial negativo de dicha organela permite que el colorante ingrese formando uniones covalentes con las proteínas mitocondriales uniéndose en forma específica. Las células crecidas sobre cubreobjetos fueron incubadas en medio DMEM sin suero con *Mitotracker* a una concentración final de 1  $\mu\text{mol/L}$  durante 30 minutos a 37°C. En oscuridad, las células fueron lavadas con PBS durante 15 minutos y fijadas con metanol a -20 °C durante 30 min. Los cubreobjetos fueron montados con glicerol 9 %. Finalmente las muestras fueron analizadas por microscopía de fluorescencia o microscopía confocal como se describió anteriormente.

### **15. Tinción de núcleos con DAPI**

El colorante DAPI (4',6-Diamidino-2-fenil indol diclorhidrato) selectivamente se une al ADN de doble hebra y fue utilizado para estudiar la morfología nuclear e identificar las células apoptóticas. Luego de los

correspondientes tratamientos, las células fueron fijadas para microscopía como se describió previamente. A continuación, los cubreobjetos 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 se lavaron tres veces con PBS, 15 minutos cada vez. Finalmente, los cubreobjetos fueron montados en portaobjetos de vidrio con glicerol 9 % y examinados por microscopía de fluorescencia. Las células apoptóticas fueron identificadas por condensación y/o fragmentación del núcleo.

## **16. Análisis estadísticos**

La significancia estadística de los datos obtenidos se evaluó mediante el test-t de Student [Snedecor y Cochran, 1967] considerándose significativos valores de probabilidad por debajo de 0,05 ( $p < 0,05$ ). Los datos cuantitativos se expresan como el promedio  $\pm$  desvío estándar (DE) de por lo menos tres experimentos independientes.

---

# RESULTADOS

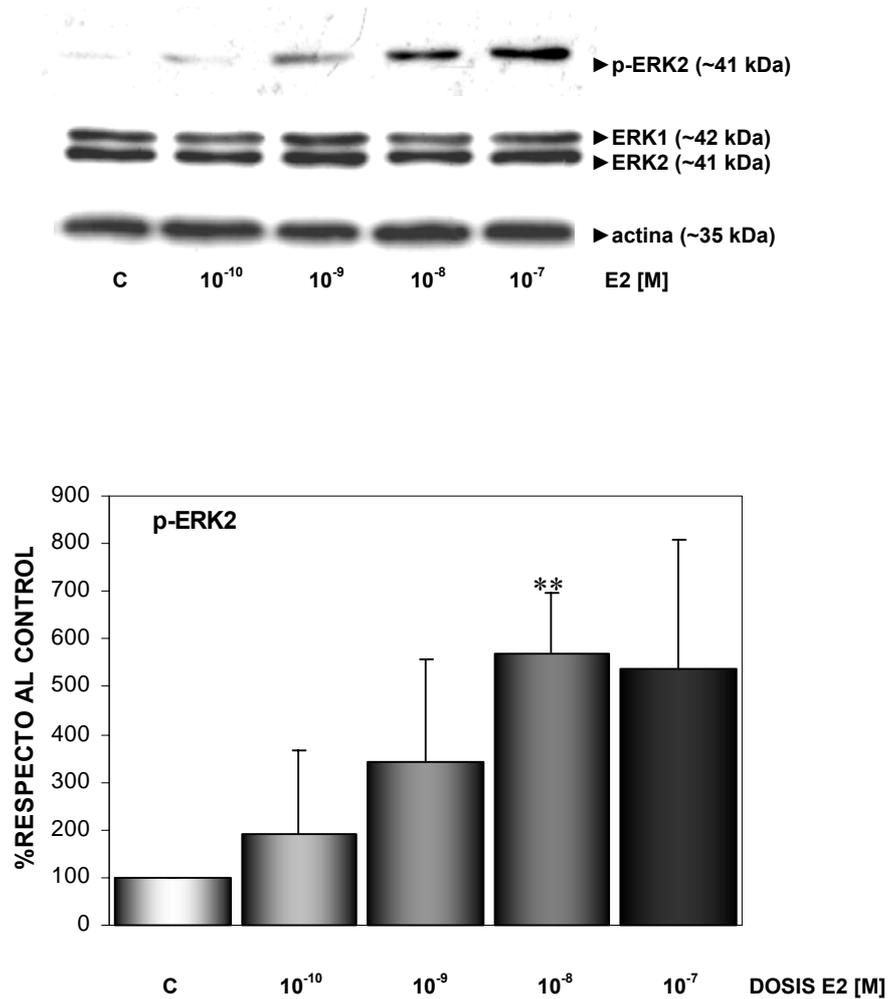
## **I. MODULACIÓN DE LAS PROTEÍNAS QUINASAS ACTIVADAS POR MITÓGENOS (MAPKs) ERK1/2 Y p38 MAPK POR 17β-ESTRADIOL EN CÉLULAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS**

Como se ha mencionado previamente, el 17β-estradiol ejerce parte de sus efectos biológicos a través de la regulación de genes. Este esteroide también desencadena efectos rápidos modulando la actividad de una gran variedad de vías de señalización intracelulares, entre ellas las MAPKs. La activación de ERK1/2 y p38 MAPK inducida por el 17β-estradiol ha sido reportada en varios tipos celulares [Vilatoba *et al.*, 2005; McMillan *et al.*, 2006; Marino *et al.*, 2006]. Sin embargo, la regulación de ambas MAPKs por la hormona y su significado funcional en células musculares esqueléticas aún no se ha investigado. En consecuencia, uno de los objetivos de esta tesis fue caracterizar parte de los efectos rápidos del 17β-estradiol sobre ERK1/2 y p38 MAPK utilizando como modelo experimental la línea celular de músculo esquelético murino C2C12.

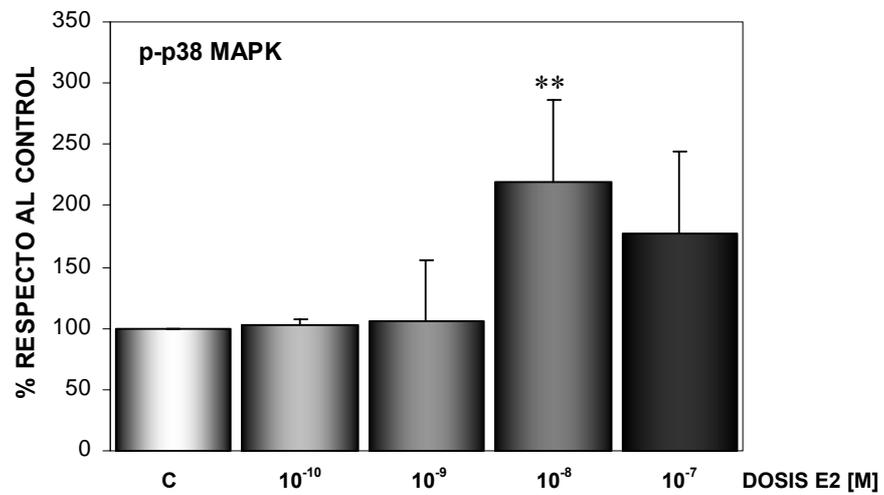
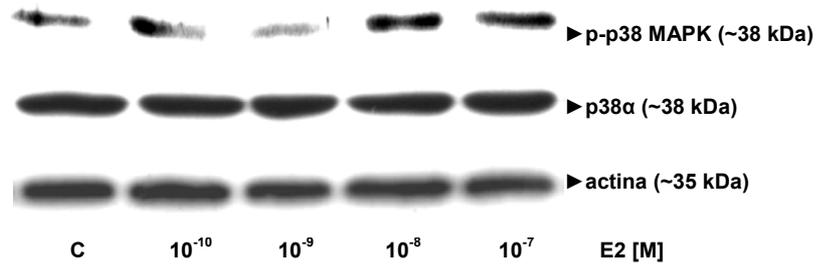
### **1. Estudio dosis-respuesta de la fosforilación de ERK1/2 y p38 MAPK inducida por 17β-estradiol**

En primer término, se investigaron los cambios en la activación de ERK1/2 y p38 MAPK en función de diferentes concentraciones de la hormona. Para ello, las células C2C12 fueron tratadas con 17β-estradiol  $10^{-10}$  M –  $10^{-7}$  M o con su vehículo (isopropanol 0,001 %) durante 15 minutos. Con las muestras obtenidas, se realizaron análisis de *Western Blot* empleando anticuerpos

específicos que reconocen solo las formas activas (dualmente fosforiladas) de ambas MAPKs. En las **Figuras 1 y 2** se observa que el estradiol indujo la activación de ERK2 y de p38 MAPK respectivamente, en forma dependiente de la dosis. Esta respuesta fue máxima a la concentración fisiológica  $10^{-8}$  M de la hormona. También se observa que si bien se expresan tanto ERK1 como ERK2 en las células musculares, el  $17\beta$ -estradiol estimuló solamente la fosforilación de ERK2. La magnitud del efecto de la hormona fue siempre superior para ERK2 que para p38 MAPK (el aumento promedio de la fosforilación de ERK2 fue de ~450% respecto al control, mientras que para p38 MAPK fue de ~150%). Como no se observaron cambios en los niveles proteicos de las formas totales de ambas MAPKs, se concluye que la hormona no afecta la expresión/estabilidad de estas quinasas en el tiempo ensayado.

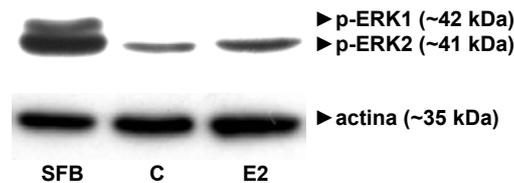


**Figura 1:** Estudio dosis-respuesta del efecto del 17β-estradiol sobre la fosforilación de ERK2 a 15 minutos de tratamiento. Las células C2C12 fueron incubadas durante 15 minutos con distintas concentraciones de 17β-estradiol (E2) (10<sup>-10</sup>M – 10<sup>-7</sup>M) o su vehículo (C: isopropanol 0,001%). Los ensayos de *Western Blot* se realizaron como se describió en Metodología usando un anticuerpo específico contra la forma dualmente fosforilada/activa de ERK1/2 (Thr202/Tyr204). Se muestran los niveles de actina como control de equivalencia de siembra en cada condición. Los *blots* obtenidos fueron cuantificados por densitometría. Los resultados se expresan como % de estímulo respecto al control (promedio ± DE, n=3), \*\*p<0,01.



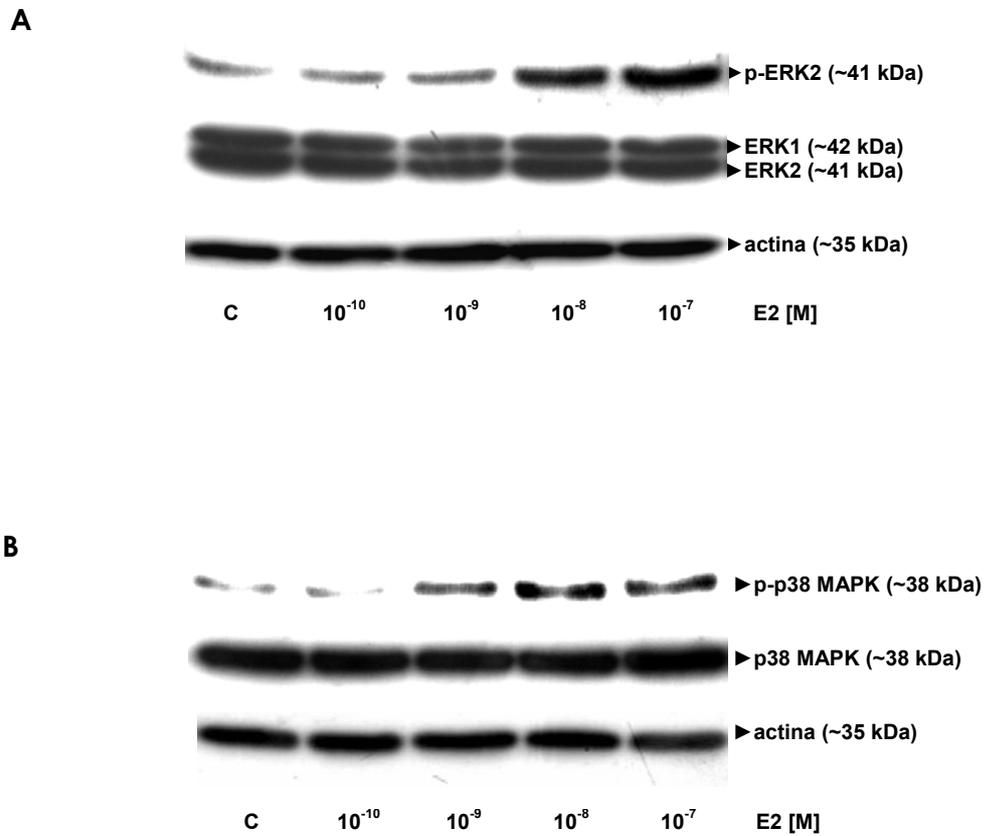
**Figura 2:** Estudio dosis-respuesta del efecto del 17β-estradiol sobre la fosforilación de p38 MAPK a 15 minutos de tratamiento. Las células C2C12 fueron incubadas durante 15 minutos con distintas concentraciones de 17β-estradiol (E2) (10<sup>-10</sup>M – 10<sup>-7</sup>M) o su vehículo (C: isopropanol 0,001%). Los ensayos de *Western Blot* se realizaron como se describió en Metodología usando un anticuerpo específico contra la forma dualmente fosforilada/activa de p38 MAPK (Thr180/Tyr182). Se muestran los niveles de actina como control de equivalencia de siembra en cada condición. Los *blots* obtenidos fueron cuantificados por densitometría. Los resultados se expresan como % de estímulo respecto al control (promedio ± DE, n=3), \*\*p<0,01.

Para confirmar que la hormona induce la fosforilación de ERK2 y no de ERK1, y verificar que ambas isoformas de ERK se pueden activar en nuestro modelo experimental, se utilizó SFB 10 %, el cual, se ha reportado, induce la activación tanto de ERK1 como de ERK2 en células de músculo liso [Song *et al.*, 2002]. Para ello las células fueron incubadas con SFB 10% o 17 $\beta$ -estradiol por 15 minutos. Posteriormente, se realizaron ensayos de *Western Blot* utilizando el anticuerpo específico anti-fosfo-ERK1/2. Como se muestra en la **Figura 3**, el SFB 10% indujo la fosforilación de las dos isoformas de ERK, mientras que la hormona sólo provocó la activación de ERK2.



**Figura 3: Activación de ERK1/2 por SFB 10 %.** Las células C2C12 fueron incubadas durante 15 minutos con SFB 10% (SFB), 17 $\beta$ -estradiol 10<sup>-8</sup>M (E2) o su vehículo (C: isopropanol 0,001%). Los ensayos de *Western Blot* se realizaron como se describió en Metodología usando un anticuerpo específico contra la forma dualmente fosforilada/activa de ERK1/2 (Thr202/Tyr204). Se muestran los niveles de actina como control de equivalencia de siembra en cada condición. Los *blots* son representativos de al menos tres experimentos independientes.

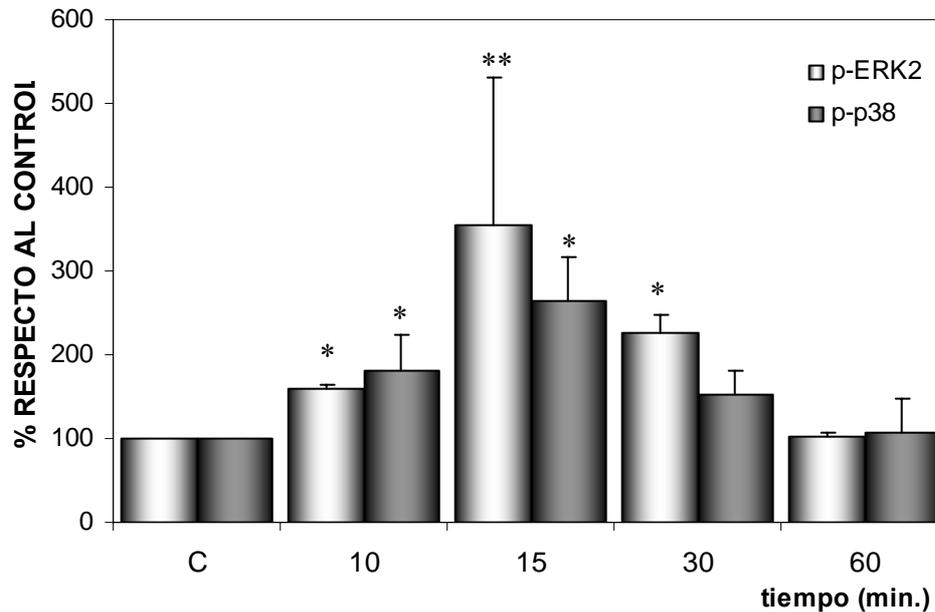
El ensayo dosis-respuesta anteriormente realizado fue repetido utilizando un tiempo de incubación de 30 minutos. Como se puede observar en la **Figura 4**, este tratamiento generó un patrón de fosforilación de ERK2 y p38 MAPK similar al descrito en el estudio para 15 minutos de incubación con el 17 $\beta$ -estradiol.



**Figura 4:** Estudio dosis-respuesta del efecto del 17 $\beta$ -estradiol sobre la fosforilación de ERK2 y p38 MAPK a 30 minutos de tratamiento. Las células C2C12 fueron incubadas durante 30 minutos con distintas concentraciones de 17 $\beta$ -estradiol (E2) ( $10^{-10}$ M –  $10^{-7}$ M) o su vehículo (C: isopropanol 0,001%). Los ensayos de *Western Blot* se realizaron como se describió en Metodología usando anticuerpos específicos contra las formas dualmente fosforiladas/activas de **(A)** ERK1/2 (Thr202/Tyr204) y **(B)** p38 MAPK (Thr180/Tyr182). Se muestran los niveles de actina como control de equivalencia de siembra en cada condición.

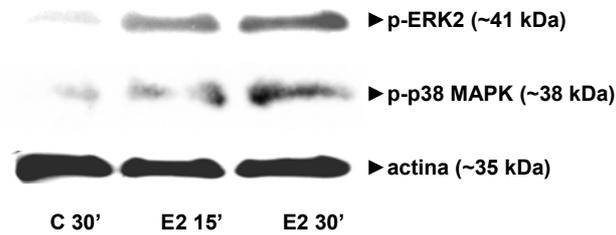
## 2. Estudio tiempo-respuesta del efecto del 17 $\beta$ -estradiol sobre la fosforilación de ERK2 y p38 MAPK

Habiendo determinado la dosis de la hormona que induce la mayor activación de ERK2 y p38 MAPK, posteriormente se evaluó el perfil temporal de fosforilación de ambas MAPKs por el 17 $\beta$ -estradiol. Con este fin, las células C2C12 fueron incubadas con la hormona ( $10^{-8}$  M) o su vehículo durante diferentes períodos de tiempo (10 a 60 minutos) y posteriormente se efectuaron ensayos de *Western Blot* con los anticuerpos específicos anti-fosfo-ERK1/2 y anti-fosfo-p38 MAPK. En la **Figura 5** se observa que la fosforilación máxima para ambas MAPKs se alcanzó a los 15 minutos de tratamiento con 17 $\beta$ -estradiol. La hormona también promovió la fosforilación de ERK2 y p38 MAPK a los 10 minutos, aunque el estímulo fue menor que el detectado a los 15 minutos. Lo mismo se observó para la fosforilación de ambas MAPKs a 30 minutos de exposición al estrógeno. Nuevamente, se observó que el grado de la fosforilación inducido por 17 $\beta$ -estradiol fue mayor para ERK2 que para p38 MAPK. A 60 minutos, la hormona no provocó cambios significativos y la fosforilación de ambas MAPKs retornó a valores basales.



**Figura 5: Perfil temporal de la fosforilación de ERK2 y p38 MAPK dependiente del 17 $\beta$ -estradiol.** Las células C2C12 fueron tratadas con 17 $\beta$ -estradiol 10<sup>-8</sup>M (E2) o su vehículo (C: isopropanol 0.001%) durante varios intervalos de tiempo (10 - 60 min.). Los análisis de *Western Blot* se realizaron como se describió en Metodología usando anticuerpos específicos contra las formas dualmente fosforiladas/activas de ERK1/2 (Thr202/Tyr204) y p38 MAPK (Thr180/Tyr182). Los *blots* obtenidos fueron cuantificados por densitometría y expresados como % de estímulo respecto al control de cada tiempo ensayado (promedio  $\pm$  DE, n=3), \*p<0,05, \*\*p<0,01.

Complementariamente se utilizaron células musculares esqueléticas provenientes de cultivo primario de ratón en las que se evaluó la fosforilación de ERK1/2 y p38 MAPK inducida por la hormona. Para ello, las células fueron incubadas con 17 $\beta$ -estradiol 10<sup>-8</sup>M durante 15 y 30 minutos y se realizaron ensayos de *Western Blot* utilizando anticuerpos específicos. Como se observa en la **Figura 6**, la hormona estimuló la fosforilación de ERK2 y p38 MAPK a los tiempos ensayados, reproduciendo los resultados obtenidos en la línea C2C12.



**Figura 6:** Fosforilación de ERK2 y p38 MAPK en cultivo primario de músculo esquelético de ratón. Las células musculares esqueléticas de cultivo primario de ratón fueron obtenidas según se detalla en Metodología. **C 30'**: isopropanol 0,001% 30 min., **E2 15'**: 17β-estradiol 10<sup>-8</sup>M 15 min., **E2 30'**: 17β-estradiol 10<sup>-8</sup>M 30 min. Los ensayos de *Western Blot* se realizaron con anticuerpos específicos contra las formas dualmente fosforiladas/activas de ERK1/2 (Thr202/Tyr204) y p38 MAPK (Thr180/Tyr182). Se muestran los niveles de actina como control de equivalencia de siembra en cada condición.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se decidió utilizar células C2C12 estimuladas con 17β-estradiol 10<sup>-8</sup>M durante 15 minutos para las sucesivas investigaciones sobre los efectos no genómicos de la hormona.

## II. EVENTOS *DOWNSTREAM* A LA ACTIVACIÓN DE ERK2 Y p38 MAPK POR 17 $\beta$ -ESTRADIOL

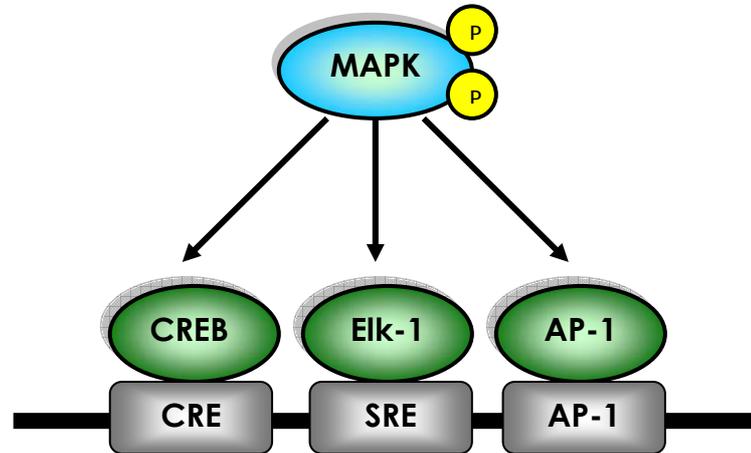
El mecanismo más conocido por el cual las MAPKs regulan la expresión génica es mediante la fosforilación de factores de transcripción, entre los que se encuentran CREB, Elk-1 y AP-1 [Karin *et al.*, 1995; Bébien *et al.*, 2003; Turjanski *et al.*, 2007].

CREB (proteína de unión al elemento de respuesta del AMPc) es un factor de transcripción que modula la expresión de genes blanco luego de ser activado por fosforilación en el residuo serina 133 (Ser133) [Iwamoto *et al.*, 2005].

El factor de transcripción Elk-1 forma parte de un complejo ternario que se une a los elementos de respuesta al suero (SRE) y media la regulación génica por el suero y por factores de crecimiento [Marais *et al.*, 1993; Kortenjann *et al.*, 1994; Price *et al.*, 1995]. Elk-1 es fosforilado en serina/treonina y esta adición de fosfato, particularmente en la serina 383 (Ser383), es crítica para su activación [Yang *et al.*, 1999; Buchwalter *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2008].

Respecto del factor de transcripción AP-1 (proteína activadora-1) se ha determinado que es un homo o heterodímero formado por miembros de las familias Jun (c-Jun, JunB y JunD) y de la familia Fos (c-Fos, FosB, Fra-1 y Fra-2) o miembros de la familia ATF-2 (factor de transcripción activador-2). La activación del complejo AP-1 dependiente de las MAPKs, se induce por modulación de la expresión, por fosforilación o por un aumento de la

estabilidad de sus subunidades [Musti *et al.*, 1997; Gangnuss *et al.*, 2004; Eriksson *et al.*, 2007].



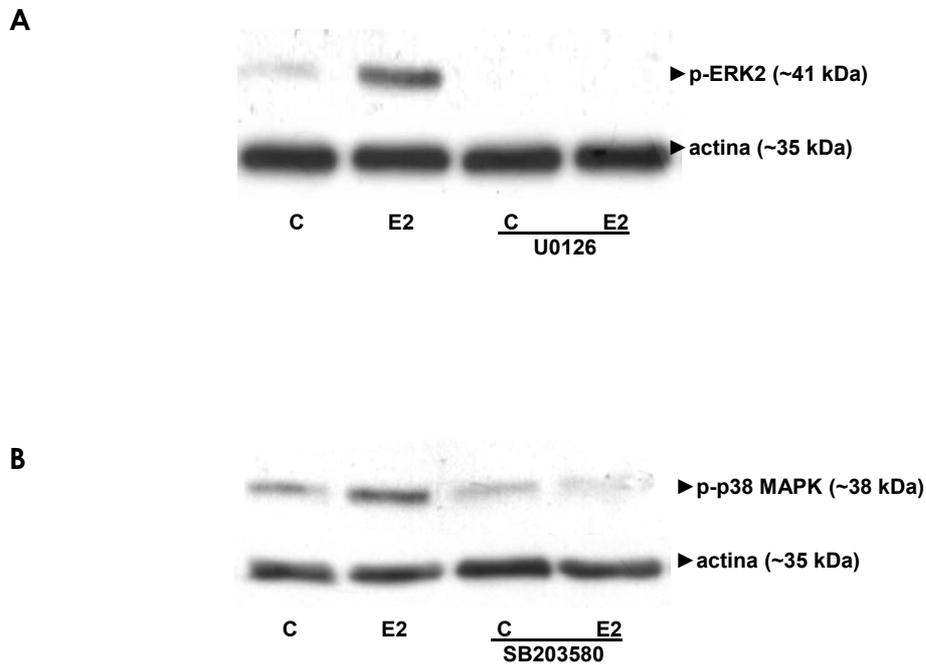
**Activación de factores de transcripción por las MAPKs.** Las vías de señalización de las MAPKs pueden concluir en la activación de varios factores de transcripción tales como CREB, Elk-1 y AP-1, los cuales modulan la transcripción de genes blanco.

Puesto que el  $17\beta$ -estradiol induce la activación de ERK2 y p38 MAPK en las células C2C12, se investigaron los efectos de la hormona sobre la fosforilación de los factores de transcripción CREB y Elk-1, y sobre los niveles proteicos de c-Fos y c-Jun. Conjuntamente, se evaluó la contribución de las MAPKs en dichos eventos, mediante el uso de inhibidores específicos.

## 1. Inhibición por compuestos farmacológicos de la activación de ERK2 y p38 MAPK por 17 $\beta$ -estradiol

La actividad de ERK2 se suprimió utilizando el compuesto U0126 que es un inhibidor no competitivo de la MAPKK *upstream* de ERK1/2, MEK1/2 [Favata *et al.*, 1998; DeSilva *et al.*, 1998]; y la de p38 MAPK se inhibió con el compuesto SB203580 que bloquea específicamente la actividad de p38 $\alpha$  y p38 $\beta$  por competir con el ATP en su sitio de unión, mientras que no tiene efectos sobre p38 $\gamma$  y p38 $\delta$  [Henry *et al.*, 1998].

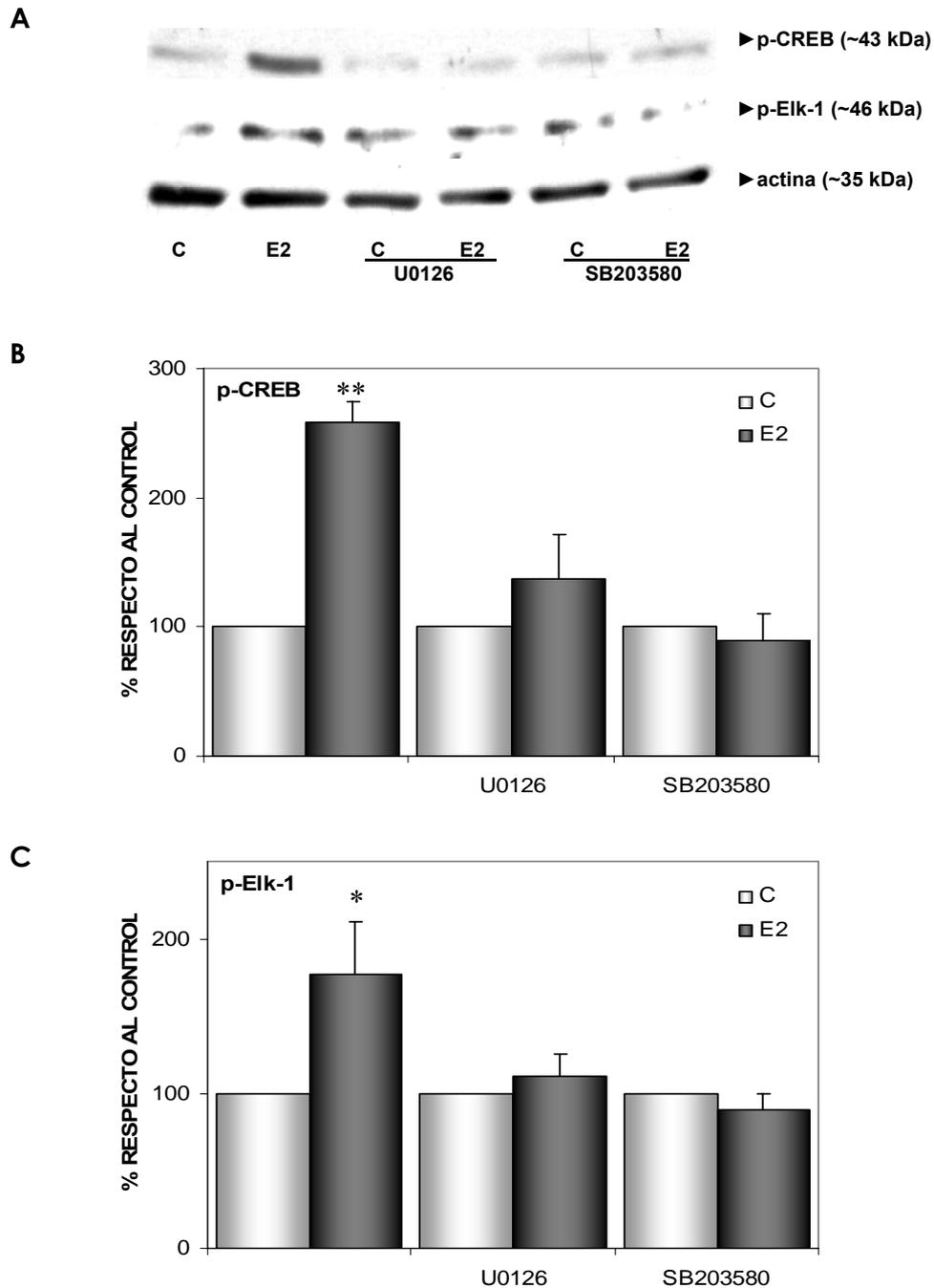
Con el fin de inhibir ERK2 y p38 MAPK en las células C2C12, los cultivos fueron preincubados durante 30 minutos en medio sin suero con U0126 (10  $\mu$ M) o SB203580 (20  $\mu$ M) respectivamente, y luego tratados con la hormona en presencia o ausencia de estos compuestos durante 15 minutos. Los tiempos y dosis empleados para ambos inhibidores, corresponden a las condiciones óptimas en células musculares [Lawlor *et al.*, 2000; Qing *et al.*, 2006]. Seguidamente, por ensayos de *Western Blot*, se observaron los cambios en la fosforilación de ERK2 y p38 MAPK. La **Figura 7** muestra el grado de inhibición de la activación por el estrógeno de ERK2 y p38 MAPK obtenido con U0126 y SB203580, respectivamente.



**Figura 7:** Efecto inhibitorio de U0126 y de SB203580 sobre la fosforilación de ERK2 y p38 MAPK por estrógeno, respectivamente. Las células C2C12 fueron tratadas con  $17\beta$ -estradiol  $10^{-8}$ M (E2) o su vehículo (C: isopropanol 0,001%) durante 15 minutos en presencia o ausencia de **(A)** U0126  $10 \mu\text{M}$  o **(B)** SB203580  $20 \mu\text{M}$ . Se realizaron ensayos de *Western Blot* como se describió en Metodología usando anticuerpos específicos contra las formas fosforiladas/activas de **(A)** ERK1/2 (Thr202/Tyr204) y **(B)** p38 MAPK (Thr180/Tyr182). Se muestran los niveles de actina como control de equivalencia de siembra en cada condición. Los *blots* son representativos de al menos tres experimentos independientes.

## 2. Rol de las MAPKs en el efecto del 17 $\beta$ -estradiol sobre la fosforilación de CREB y Elk-1

Con el objetivo de investigar cambios en la fosforilación de CREB y Elk-1 en respuesta a la hormona y evaluar la participación de las MAPKs en este evento, las células fueron preincubadas como se describió anteriormente, y luego estimuladas durante 15 minutos con 17 $\beta$ -estradiol en presencia o ausencia de U0126 y SB203580. Se llevaron a cabo ensayos de *Western Blot* utilizando como anticuerpos primarios anti-fosfo-CREB (Ser133) o anti-fosfo-Elk-1 (Ser383). Como se observa en la **Figura 8**, el 17 $\beta$ -estradiol aumentó la fosforilación de CREB y de Elk-1. El uso de U0126 y SB203580 permitió establecer que ERK2 y p38 MAPK, respectivamente, median la activación de dichos factores de transcripción inducida por la hormona, ya que la inhibición de ambas MAPKs suprimió la fosforilación de de CREB y Elk-1 promovida por el 17 $\beta$ -estradiol.

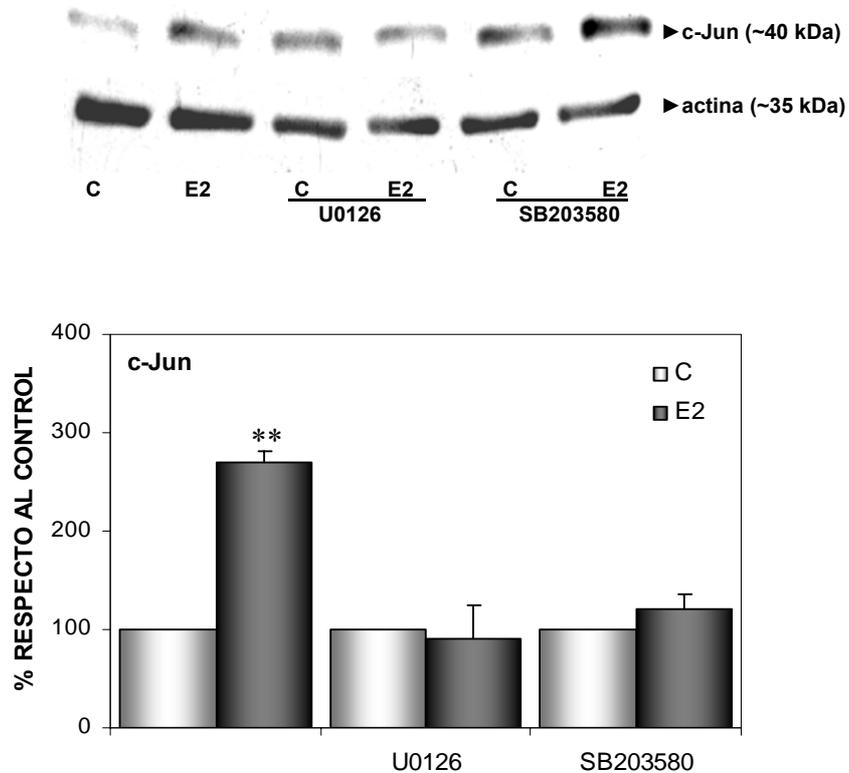


**Figura 8: Rol de ERK2 y p38 MAPK en la fosforilación de CREB y Elk-1 inducida por 17 $\beta$ -estradiol.** Las células C2C12 fueron tratadas con 17 $\beta$ -estradiol 10<sup>-8</sup>M (E2) o su vehículo (C: isopropanol 0,001%) durante 15 minutos en presencia o ausencia de U0126 10  $\mu$ M o SB203580 20  $\mu$ M. **(A)** Análisis de *Western Blot* usando anticuerpos específicos contra las formas fosforiladas de CREB (Ser133) y Elk-1 (Ser383); se muestran los niveles de actina como control de equivalencia de siembra en cada condición. **(B y C)** Cuantificación por densitometría de los *blots* obtenidos a partir de tres experimentos independientes. Los resultados se expresan como % de estímulo respecto de cada control (promedio  $\pm$  DE), \*\*p<0,01; \*p<0,05.

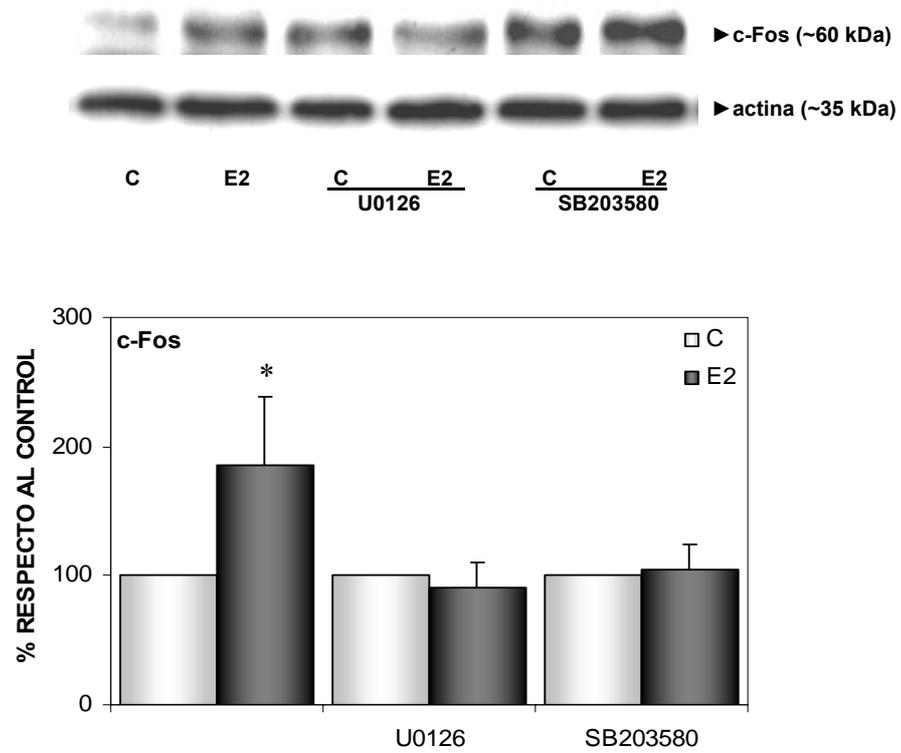
### 3. Modulación de las oncoproteínas c-Fos y c-Jun por 17 $\beta$ -estradiol.

#### Participación de MAPKs

Con el propósito de explorar cambios en los niveles proteicos de c-Fos y c-Jun inducidos por la hormona y averiguar el rol de las MAPKs en este evento, se efectuaron experimentos reproduciendo las condiciones anteriores. Los niveles de expresión de ambos genes tempranos se analizaron por ensayos de *Western Blot* utilizando anticuerpos específicos que reaccionan con las formas totales de c-Fos y c-Jun. Como se muestra en las **Figuras 9 y 10**, el 17 $\beta$ -estradiol aumentó significativamente los niveles de ambas oncoproteínas. Además, la inhibición de ERK2 y p38 MAPK por U0126 y SB203580, respectivamente, disminuyó el efecto de la hormona, sugiriendo la participación de ambas MAPKs en el mecanismo de inducción de c-Fos y c-Jun.



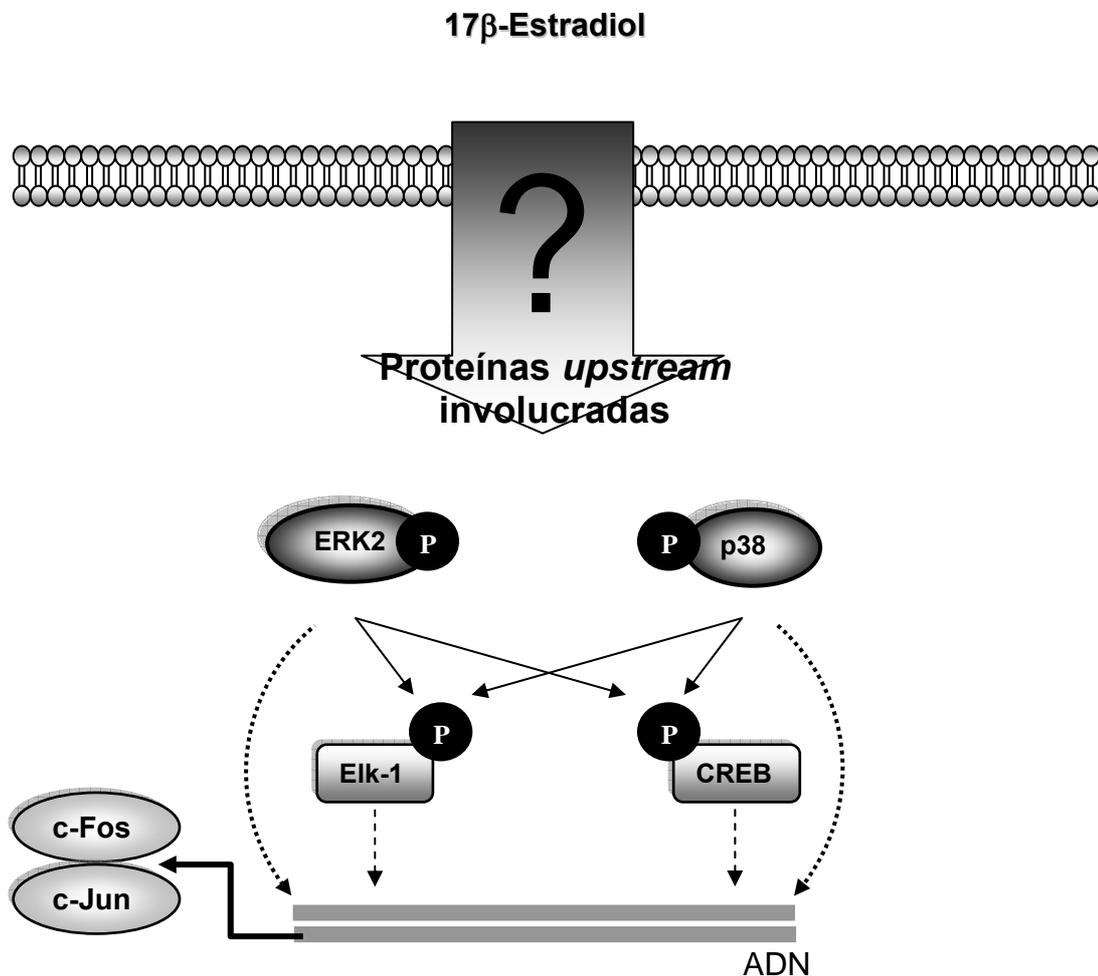
**Figura 9: Rol de ERK2 y p38 MAPK en el aumento de niveles de c-Jun inducido por 17 $\beta$ -estradiol.** Las células C2C12 fueron tratadas con 17 $\beta$ -estradiol 10<sup>-8</sup>M (E2) o su vehículo (C: isopropanol 0,001%) durante 15 minutos en presencia o ausencia de U0126 10  $\mu$ M o SB203580 20  $\mu$ M. Los ensayos de *Western Blot* se realizaron como se describió en Metodología con un anticuerpo específico contra la forma total de c-Jun. Se muestran los niveles de actina como control de equivalencia de siembra en cada condición. Los *blots* obtenidos fueron cuantificados por densitometría. Los resultados se expresan como % de estímulo respecto de cada control (promedio  $\pm$  DE, n=3), \*\*p<0,01.



**Figura 10: Rol de ERK2 y p38 MAPK en el aumento de los niveles de c-Fos inducido por 17 $\beta$ -estradiol.** Las células C2C12 fueron tratadas con 17 $\beta$ -estradiol 10<sup>-8</sup>M (E2) o su vehículo (C: isopropanol 0,001%) durante 15 minutos en presencia o ausencia de U0126 10  $\mu$ M o SB203580 20  $\mu$ M. Los ensayos de *Western Blot* se realizaron como se describió en Metodología con un anticuerpo específico contra la forma total de c-Fos. Se muestran los niveles de actina como control de equivalencia de siembra en cada condición. Los *blots* obtenidos fueron cuantificados por densitometría. Los resultados se expresan como % de estímulo respecto de cada control (promedio  $\pm$  DE, n=3), \*p<0,05.

Los datos hasta ahora descriptos indican que, en células de músculo esquelético, el 17 $\beta$ -estradiol induce la activación de ERK2 y p38 MAPK, y que estas vías participan en la subsiguiente fosforilación de los factores de transcripción CREB y Elk-1 y en el aumento de los niveles proteicos de las oncoproteínas c-Fos y c-Jun.

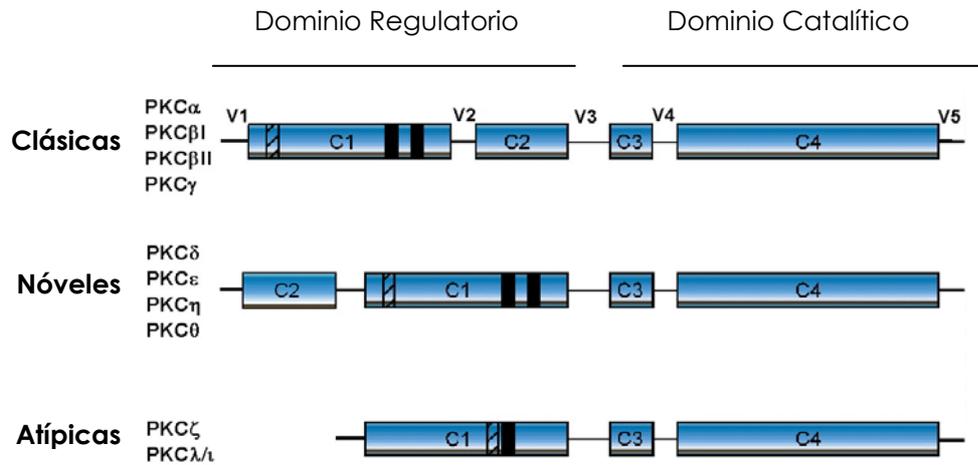
A continuación se investigaron proteínas *upstream* que podrían estar implicadas en el mecanismo mencionado arriba.



### III. MODULACIÓN DE PROTEÍNAS *UPSTREAM* EN LA ACTIVACIÓN DE LAS MAPKs POR 17 $\beta$ -ESTRADIOL

Existen varias proteínas individuales y formando complejos proteicos que pueden participar *upstream* en las vías de señalización de las MAPKs [Pearson *et al.*, 2001]. El trabajo de tesis focalizó en el estudio de la contribución de la proteína quinasa C (PKC) y la tirosina quinasa citosólica no receptora Src en la activación de ERK2 y p38 MAPK inducida por el 17 $\beta$ -estradiol.

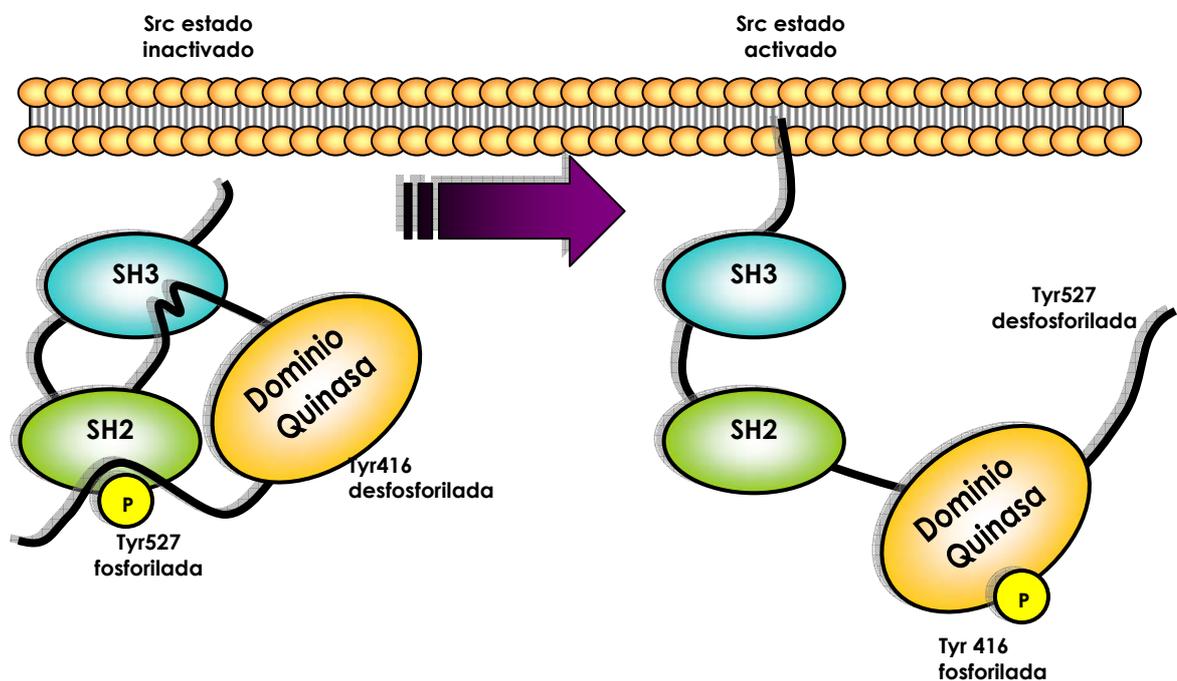
PKC es una familia de serina/treonina quinasas cuyos miembros están clasificados en tres grupos: las PKCs clásicas, que son enzimas dependientes del calcio y activadas por fosfatidilserina (PS), diacilglicerol (DAG) y ésteres de forbol (TPA o PMA); las PKC noveles, reportadas como independientes del calcio pero también reguladas por PS, DAG y TPA; y el grupo formado por las PKC atípicas que son independientes de calcio y no requieren de PS, DAG o TPA para su activación [Parker y Murray-Rust, 2004]. Existen evidencias mostrando que distintos miembros de la familia PKC desempeñan un rol central mediando respuestas como proliferación y diferenciación celular, apoptosis, expresión de genes y contracción muscular [Toker, 1998].



**Estructura y clasificación de las proteínas quinasas C:** se esquematizan las estructuras de las distintas PKCs. C1-C4: regiones conservadas. V1 – V5: regiones variables.

Respecto de la familia de proteínas tirosina quinasas Src (que incluye entre otras a c-Src, Lyn, Fyn, Yes y Lck) es importante destacar su rol en la regulación del crecimiento y diferenciación de células eucariotas [Thomas y Brugge, 1997]. La activación de Src es determinada por cambios en el *status* de fosforilación de dos residuos claves de tirosina (Tyr). La fosforilación en tirosina 527 (Tyr527) en el extremo carboxilo-terminal de Src modula negativamente su actividad quinasas. Este estado de inactivación implica la interacción del extremo carboxilo-terminal fosforilado con el dominio SH2 de Src, manteniendo a la proteína en una configuración espacial replegada sobre sí misma, en la cual el dominio quinasas es inaccesible. La activación de Src requiere, en un primer paso, la remoción del fosfato de Tyr527 lo que

induce un cambio conformacional en toda la molécula, que le permite exponer su sitio catalítico y anclarse en forma temporal a la membrana plasmática. Posteriormente, sufre autofosforilación de tirosina 416 (Tyr416) evento necesario para la completa activación de esta quinasa [Brown y Cooper, 1996; Martin, 2001].

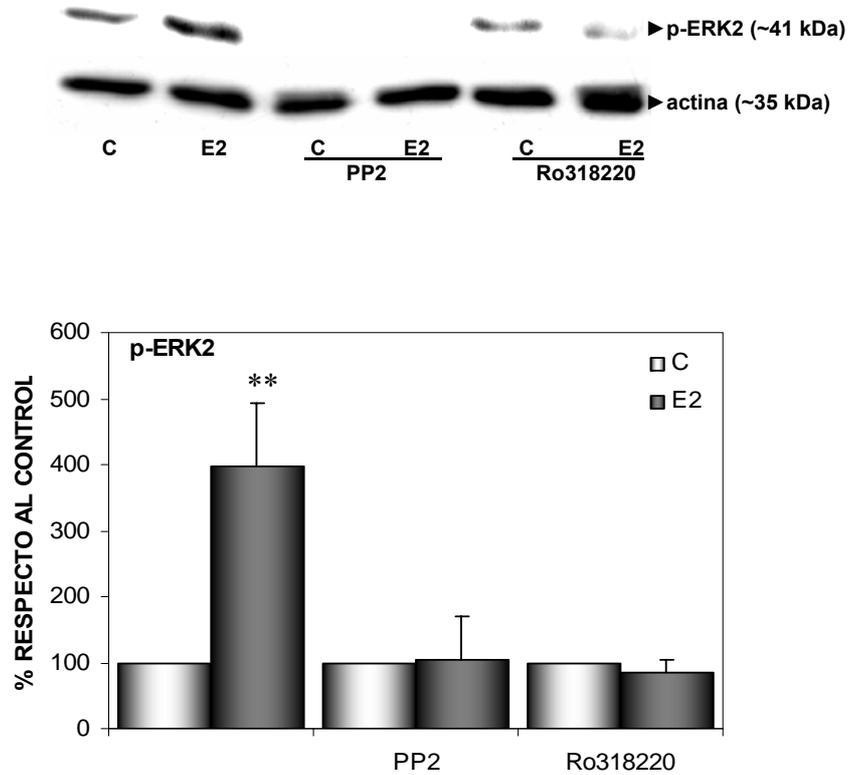


**Proceso de activación de Src:** La proteína tirosina quinasa no receptora Src, en su estado inactivo, posee una conformación replegada con su residuo Tyr527 fosforilado e interaccionando con el dominio SH2. Luego de un estímulo apropiado, la proteína sufre una desfosforilación de dicha tirosina que la conduce a una forma tridimensional abierta exponiendo el dominio quinasa. Esta conformación permite que la proteína se inserte en la membrana plasmática. La autofosforilación en Tyr416 completa el estado de activación de esta quinasa.

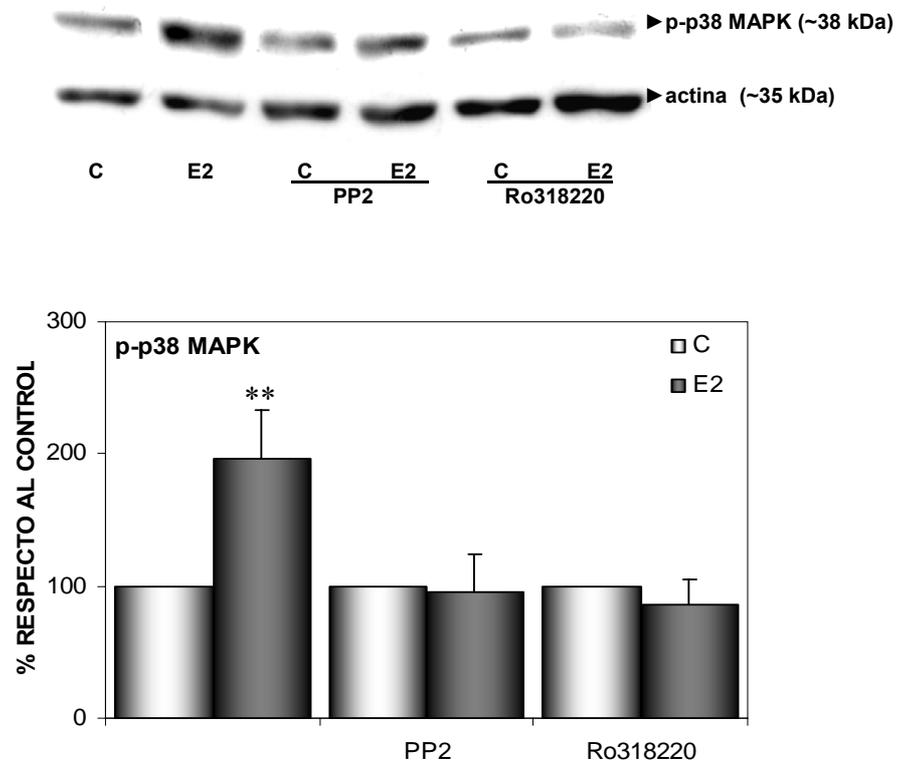
## 1. Participación de Src y PKC en la activación de las MAPKs inducida por 17 $\beta$ -estradiol

Con la finalidad de investigar la participación de miembros de las familias Src y PKC en la activación de ERK2 y p38 MAPK inducida por la hormona, se eligieron inhibidores farmacológicos específicos. Se utilizó el compuesto PP2, que es un supresor efectivo de la activación de las tirosina quinasas Src [Hanke *et al.*, 1996; Niu y Lawrence, 1997; Karni *et al.*, 2003] y el compuesto Ro318220, que es un inhibidor selectivo de todos los miembros de la familia PKC hasta ahora reportados [Keller y Niggli, 1993].

De forma análoga a los ensayos previamente realizados, las células fueron preincubadas durante 30 minutos con PP2 25  $\mu$ M y Ro318220 5  $\mu$ M y luego estimuladas con 17 $\beta$ -estradiol en presencia o ausencia de dichos compuestos. Las concentraciones de los inhibidores utilizadas fueron reportadas como dosis efectivas para suprimir la activación de Src y PKC respectivamente, en células musculares [Markoua *et al.*, 2004; Du *et al.*, 2004]. A continuación, las muestras obtenidas fueron sujetas a análisis de *Western Blot* para investigar cambios en la fosforilación de ERK2 y p38 MAPK. En las **Figura 11** y **12** respectivamente, se observa que PP2 bloqueó por completo la fosforilación de ERK2 y disminuyó significativamente la fosforilación de p38 MAPK inducidas por la hormona. Adicionalmente, Ro318220 redujo tanto la fosforilación de ERK2 como la de p38 MAPK estimuladas por el estrógeno. De estos resultados, se sugiere que miembros de las familias Src y PKC son componentes claves *upstream* en la activación de las MAPKs por 17 $\beta$ -estradiol.



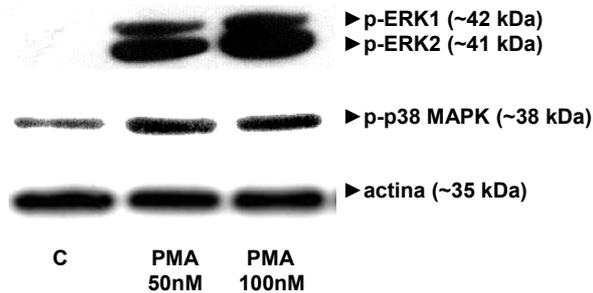
**Figura 11: Rol de Src y PKC en la fosforilación de ERK2 inducida por 17 $\beta$ -estradiol.** Las células C2C12 fueron tratadas con 17 $\beta$ -estradiol 10<sup>-8</sup>M (E2) o su vehículo (C: isopropanol 0,001%) durante 15 minutos en presencia o ausencia de PP2 25  $\mu$ M o Ro318220 5  $\mu$ M. Se realizaron análisis de *Western Blot* como se describió en Metodología usando un anticuerpo específico contra la forma dualmente fosforilada/activa de ERK1/2 (Thr202/Tyr204). Se muestran los niveles de actina como control de equivalencia de siembra en cada condición. Los *blots* obtenidos fueron cuantificados por densitometría. Los resultados se expresan como % de estímulo respecto de cada control (promedio  $\pm$  DE, n=3), \*\*p<0,01.



**Figura 12: Rol de Src y PKC en la fosforilación de p38 MAPK inducida por 17 $\beta$ -estradiol.** Las células C2C12 fueron tratadas con 17 $\beta$ -estradiol 10<sup>-8</sup>M (E2) o su vehículo (C: isopropanol 0,001%) durante 15 minutos en presencia o ausencia de PP2 25  $\mu$ M o Ro318220 5  $\mu$ M. Se realizaron análisis de *Western Blot* como se describió en Metodología usando un anticuerpo específico contra la forma dualmente fosforilada/activa de p38 MAPK (Thr180/Tyr182). Se muestran los niveles de actina como control de equivalencia de siembra en cada condición. Los *blots* obtenidos fueron cuantificados por densitometría. Los resultados se expresan como % de estímulo respecto de cada control (promedio  $\pm$  DE, n=3), \*\*p<0,01.

## 2. Activación de PKC y Src

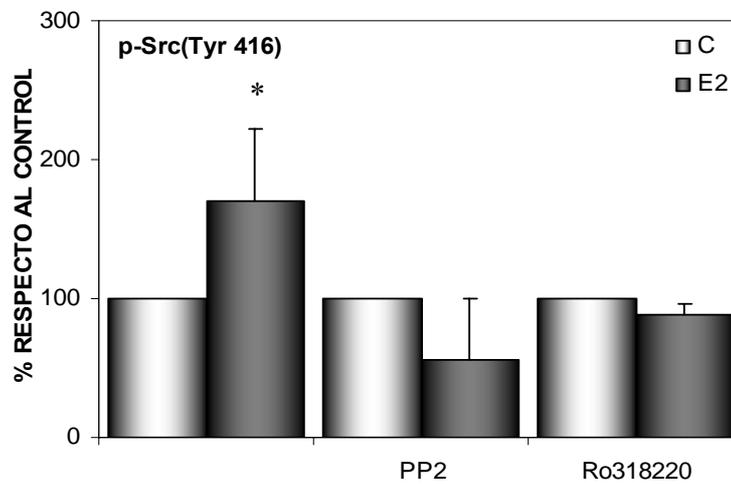
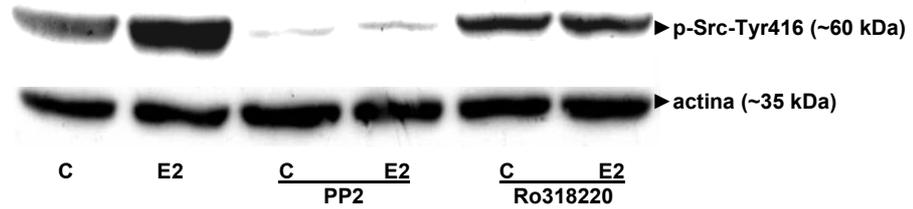
Ha sido reportado que los ésteres de forbol activan a miembros de la familia PKC en forma dependiente de la dosis y del tiempo en varios sistemas celulares, inclusive en la línea celular C2C12 [Wang *et al.*, 2006]. El compuesto PMA (12-miristato-13-acetato), alternativamente llamado TPA (12-O-tetradecanoiforbol-13-acetato), es un éster de forbol que activa específicamente a las PKC clásicas y noveles por mimetizar al diacilglicerol que es su ligando activador endógeno [Murphy *et al.*, 1999]. A continuación, se investigó si la activación de PKC por PMA conducía a la fosforilación de las MAPKs en las células C2C12. Para ello, los cultivos celulares se incubaron con PMA (50 nM y 100 nM) por 15 minutos y posteriormente se determinó por *Western Blot* la activación de ERK1/2 y p38 MAPK. Las concentraciones usadas de PMA han sido reportadas como concentraciones efectivas de este compuesto para activar a PKC en células musculares [Wang *et al.*, 2006]. Los resultados presentados en la **Figura 13** indican que el PMA indujo un fuerte aumento tanto de la fosforilación de ERK1 como de ERK2 y, en menor medida promovió la fosforilación de p38 MAPK. Estos datos sugieren que alguna/s isoforma/s de las PKC clásicas o noveles está/n involucrada/s en la activación de ambas MAPKs.



**Figura 13: Activación de ERK1/2 y p38 MAPK por PMA.** Las células C2C12 fueron tratadas con PMA (50 o 100 nM) o su vehículo (C: etanol 0,001%) durante 15 minutos. Los ensayos de *Western Blot* se realizaron como se describió en Metodología usando los anticuerpos específicos contra las formas dualmente fosforiladas/activas de ERK1/2 (Thr202/Tyr204) y de p38 MAPK (Thr180/Tyr182). Se muestran los niveles de actina como control de equivalencia de siembra en cada condición.

Considerando que los estudios previos con PP2 evidenciaron la participación de miembros de la familia Src en los efectos del 17 $\beta$ -estradiol sobre las vías ERK2 y p38 MAPK, se investigó la activación de dicha proteína, estudiando los cambios en la fosforilación en la Tyr416. Simultáneamente, se investigó si PKC es necesaria para activar a Src, ya que existe información demostrando que PKC interviene en la estimulación de la proteína tirosina fosfatasa  $\alpha$  (PTP $\alpha$ ), la cual una vez activada, desfosforila a Src en Tyr527 [Brandt *et al*, 2003]. Para ello, las células fueron estimuladas con 17 $\beta$ -estradiol utilizando los compuestos PP2 (25  $\mu$ M) y Ro318220 (5  $\mu$ M) para inhibir a Src y PKC, respectivamente. Las muestras obtenidas fueron analizadas por *Western Blot*

usando un anticuerpo contra la forma fosforilada de Src en Tyr416. La **Figura 14** muestra que en las células C2C12, la hormona estimuló significativamente la activación de Src y que PP2 (25  $\mu$ M) efectivamente inhibió los efectos del estrógeno. De relevancia, estos resultados demostraron que el 17 $\beta$ -estradiol no fue capaz de promover la autofosforilación de Src (Tyr416) en presencia del compuesto Ro318820, sugiriendo que PKC está implicada en este proceso.

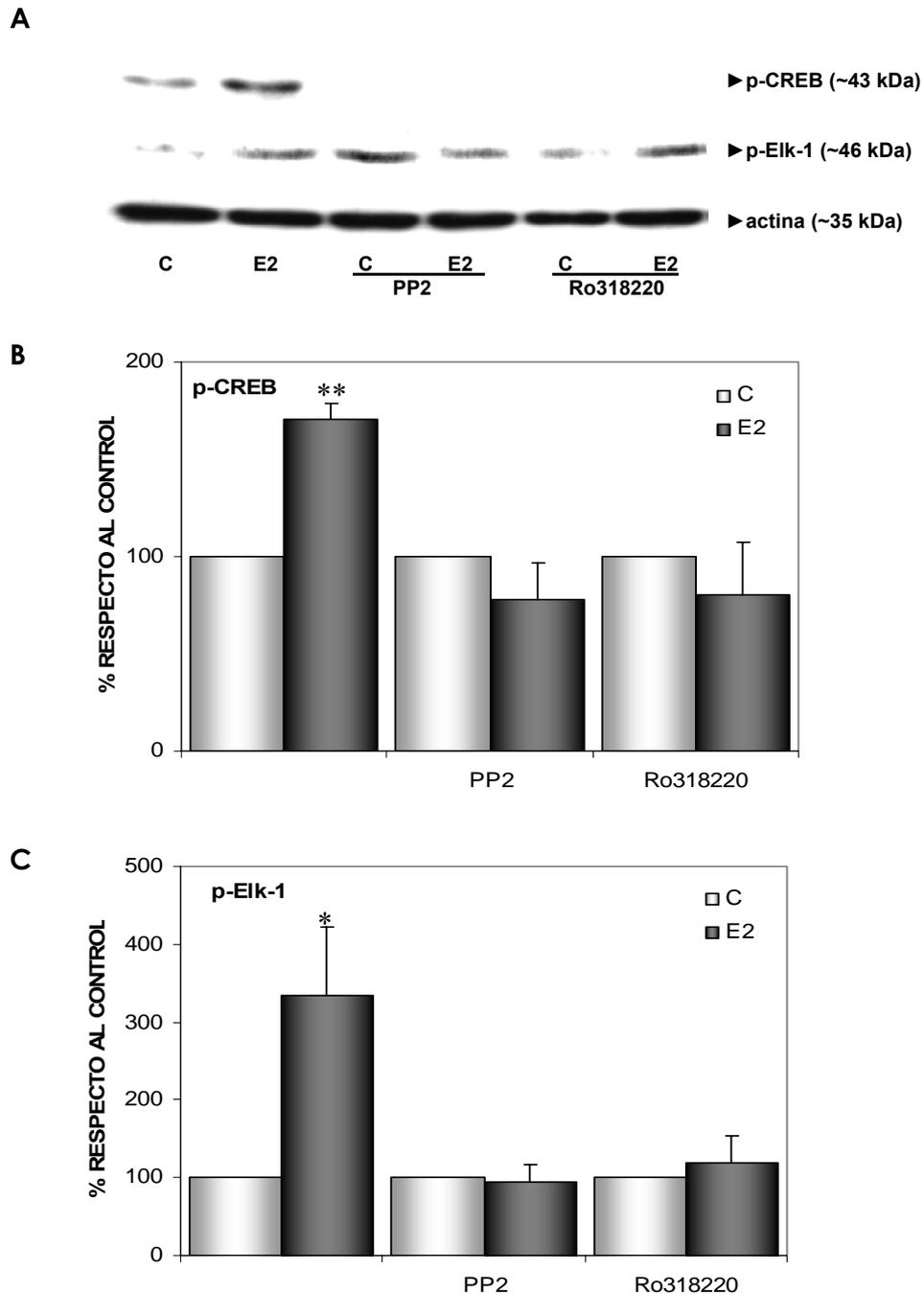


**Figura 14: Rol de PKC en la activación de Src por 17β-estradiol.**

Las células fueron tratadas con 17β-estradiol (E2)  $10^{-8}M$  o su vehículo (C: isopropanol 0,001%) durante 15 minutos en presencia o ausencia de PP2 25  $\mu M$  o Ro318220 5  $\mu M$ . Se realizaron análisis de *Western Blot* como se describió en Metodología usando un anticuerpo específico contra la forma fosforilada de Src en Tyr416. Se muestran los niveles de actina como control de equivalencia de siembra en cada condición. Los *blots* obtenidos fueron cuantificados por densitometría. Los resultados se expresan como % de estímulo respecto de cada control (promedio  $\pm$  DE, n=3), \*p<0,05.

### 3. Rol de Src y PKC en la fosforilación de CREB y Elk-1 por 17 $\beta$ -estradiol

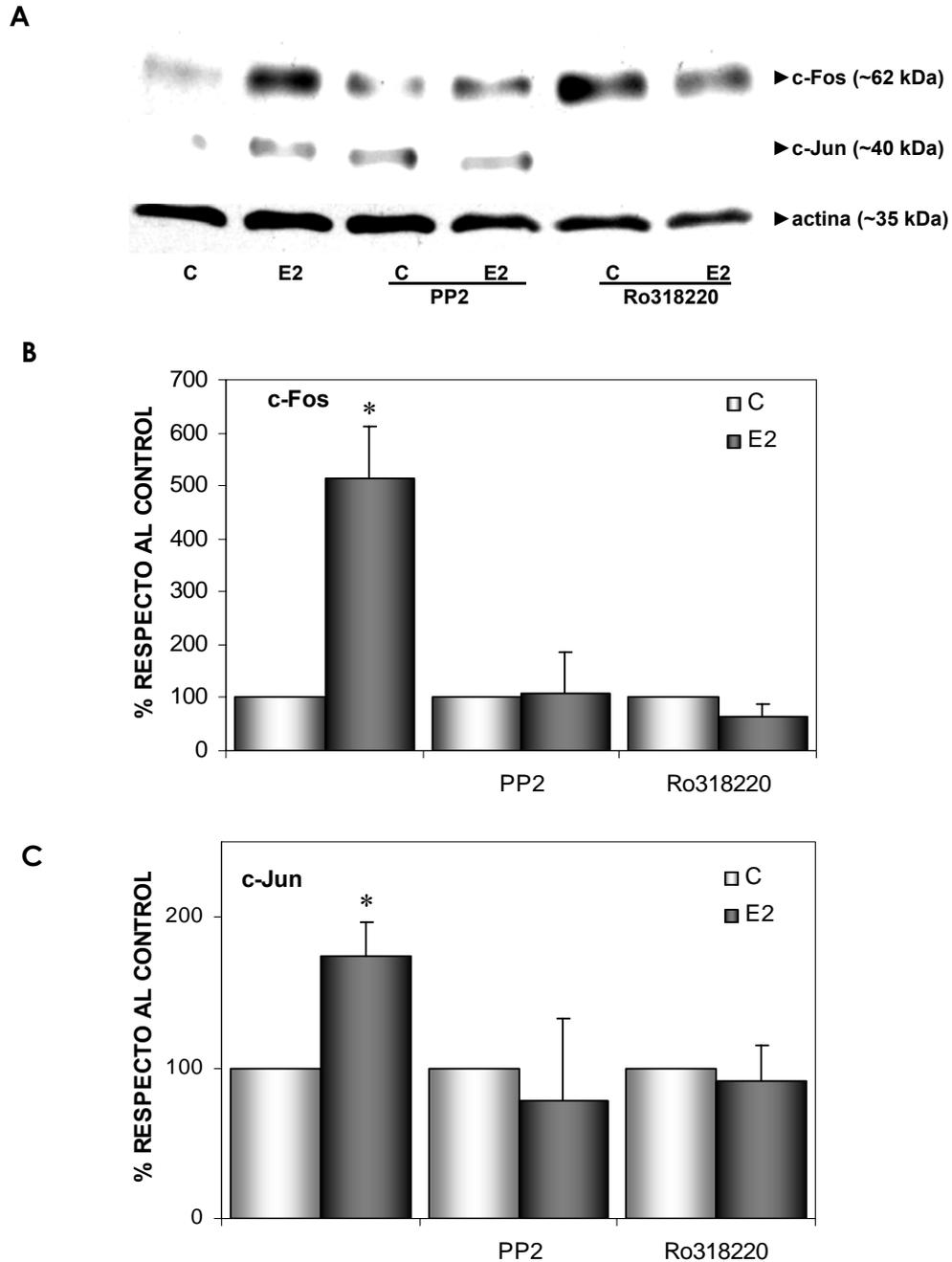
Los resultados descritos hasta el momento muestran que el 17 $\beta$ -estradiol, en forma dependiente de PKC y Src, induce la activación de ERK2 y p38 MAPK; éstas a su vez, promueven la fosforilación de los factores de transcripción CREB y Elk-1 y el aumento de los niveles de c-Fos y c-Jun. Se consideró pertinente entonces, evaluar la participación de PKC y Src en la fosforilación de los factores de transcripción CREB y Elk-1 por la hormona. Las células fueron tratadas con 17 $\beta$ -estradiol y con los inhibidores de Src y PKC anteriormente utilizados. Luego del tratamiento, se realizaron ensayos de *Western Blot* usando anti-fosfo-CREB (Ser133) o anti-fosfo-Elk-1 (Ser383). Como era de esperar, los resultados en la **Figura 15** muestran que la fosforilación de ambos factores de transcripción en respuesta al 17 $\beta$ -estradiol, fue dependiente de la activación de Src y PKC.



**Figura 15: Rol de PKC y Src en la fosforilación de CREB y Elk-1 inducida por 17 $\beta$ -estradiol.** Las células C2C12 fueron estimuladas con 17 $\beta$ -estradiol 10<sup>-8</sup>M (E2) o su vehículo (C: isopropanol 0,001%) durante 15 minutos en presencia o ausencia de PP2 25 $\mu$ M o Ro318220 5  $\mu$ M. **(A)** Análisis de *Western Blot* usando anticuerpos específicos contra las formas fosforiladas de CREB (Ser133) y Elk-1 (Ser383); se muestran los niveles de actina como control de equivalencia de siembra en cada condición. **(B y C)** Cuantificación por densitometría de los *blots* obtenidos a partir de tres experimentos independientes. Los resultados se expresan como % de estímulo respecto de cada control (promedio  $\pm$  DE), \*\*p<0,01; \*p<0,05.

#### **4. Participación de Src y PKC en la inducción de las oncoproteínas c-Fos y c-Jun por 17 $\beta$ -estradiol**

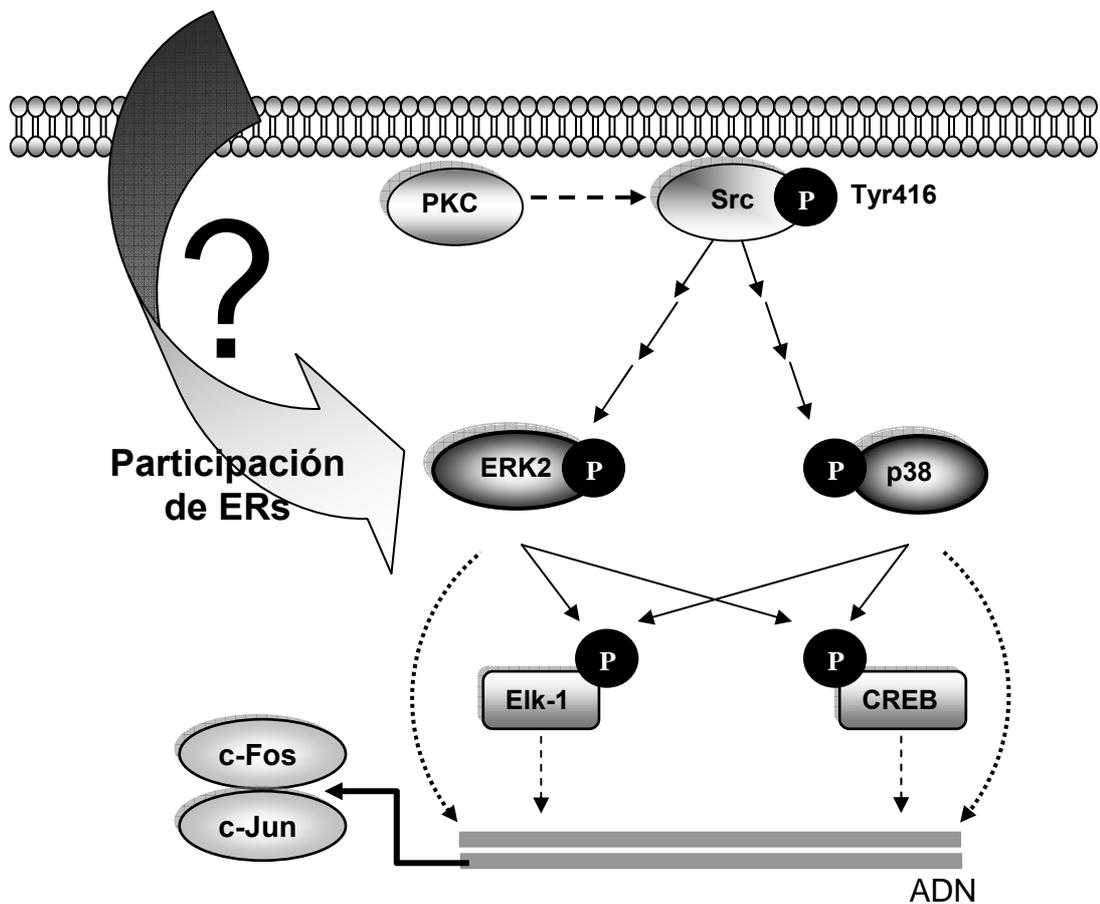
Análogamente al estudio anterior, se investigó la implicancia de Src y PKC en la regulación de los niveles proteicos de las oncoproteínas c-Fos y c-Jun por la hormona. Las células fueron expuestas a PP2 y Ro318820 y luego tratadas con 17 $\beta$ -estradiol o su vehículo en presencia o ausencia de dichos inhibidores. Los niveles de c-Fos y c-Jun se evaluaron por ensayos de *Western Blot* con anticuerpos específicos. De acuerdo a lo esperado, la **Figura 16** muestra que el estrógeno no fue capaz de aumentar los niveles de c-Fos y c-Jun en presencia de PP2 o Ro318220, evidenciando que Src y PKC respectivamente, participan en la inducción de estas oncoproteínas por la hormona.



**Figura 16: Rol de Src y PKC en la inducción de c-Fos y c-Jun por 17 $\beta$ -estradiol.** Las células C2C12 fueron tratadas con 17 $\beta$ -estradiol 10<sup>-8</sup>M o su vehículo (C: isopropanol 0,001%) durante 15 minutos en presencia o ausencia de PP2 25  $\mu$ M o Ro318220 5  $\mu$ M. **(A)** Análisis de *Western Blot* usando anticuerpos específicos contra las formas totales de c-Fos y c-Jun; se muestran los niveles de actina como control de equivalencia de siembra en cada condición. **(B y C)** Cuantificación por densitometría de los *blots* obtenidos a partir de tres experimentos independientes. Los resultados se expresan como % de estímulo respecto de cada control (promedio  $\pm$  DE), \* $p$ <0,05.

A partir del análisis de los resultados anteriores en su conjunto, se amplía la representación esquemática del mecanismo de acción rápida del  $17\beta$ -estradiol en células de músculo esquelético, planteando la participación de los receptores estrogénicos (ERs) en los efectos no genómicos de la hormona.

### $17\beta$ -Estradiol



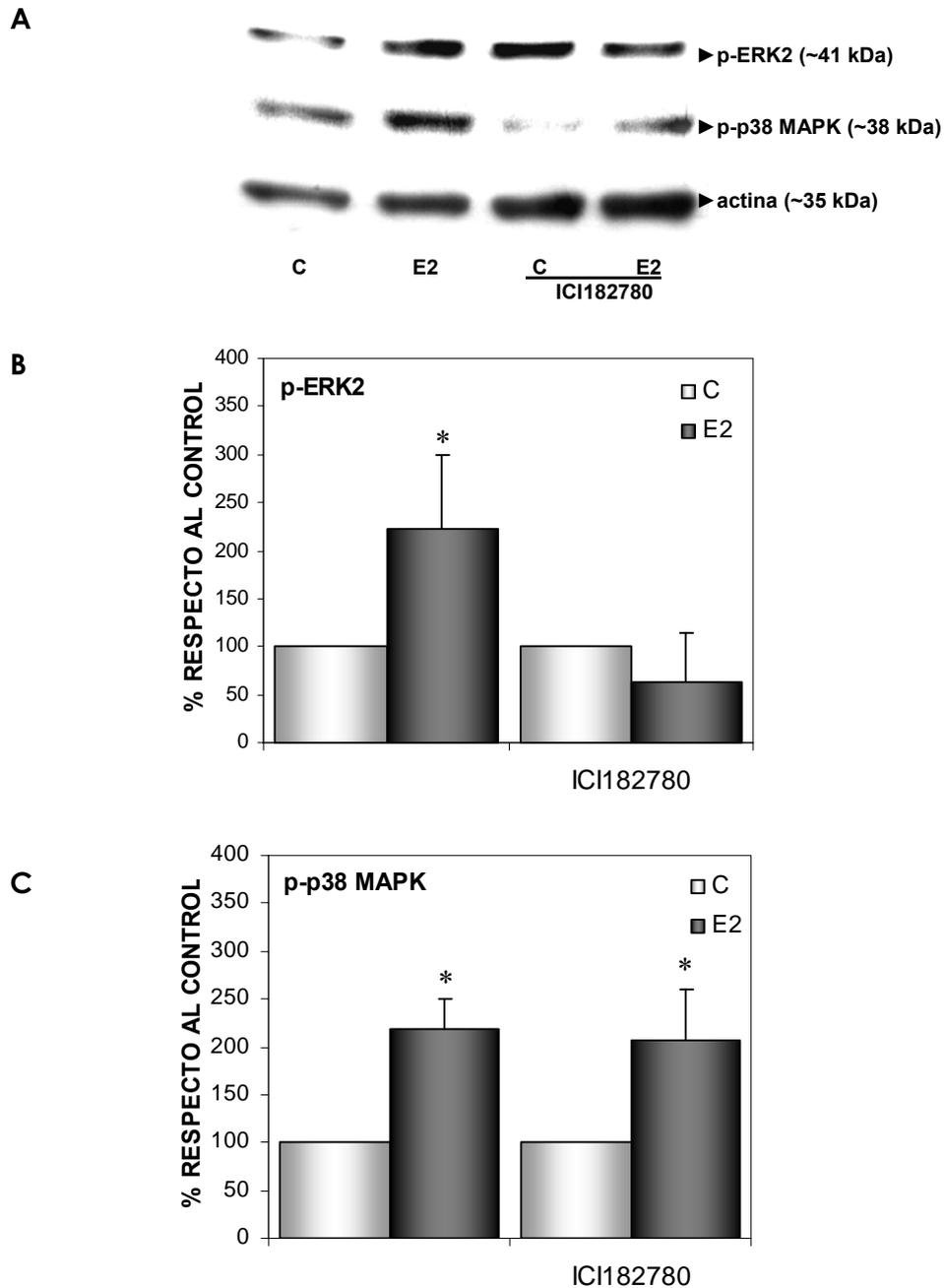
#### **IV. IMPLICANCIA DE LOS RECEPTORES ESTROGÉNICOS EN LA ACTIVACIÓN DE LAS MAPKs POR 17 $\beta$ -ESTRADIOL**

Como se mencionó en la Introducción, varios estudios sobre los efectos rápidos del 17 $\beta$ -estradiol sugieren que éstos se inician a nivel de la membrana plasmática. Así, existen evidencias sobre una subpoblación del ER clásico que localiza en la superficie celular y media diversas acciones de esta hormona [Chambliss *et al.*, 2002]. No obstante, también se han implicado complejos de señalización intracelulares activados a través del ER por el 17 $\beta$ -estradiol y a receptores de membrana nóveles (ERm) no relacionados a los receptores clásicos [Watson *et al.*, 1999; Segars y Driggers, 2002; Levin, 2005; Pedram *et al.*, 2007].

##### **1. Efectos del compuesto ICI182780 sobre la fosforilación de las MAPKs inducida por 17 $\beta$ -estradiol**

Para evaluar la participación de los ERs en la activación de las MAPKs por el 17 $\beta$ -estradiol, inicialmente se utilizó el compuesto ICI182780. Éste, es un 7 $\alpha$ -alquilsulfinilo análogo del 17 $\beta$ -estradiol, y actúa como antagonista específico uniéndose tanto a ER $\alpha$  como a ER $\beta$  [Hall y McDonnell, 1999]. Previo al tratamiento hormonal, los cultivos celulares fueron preincubados 1 hora con ICI182780 1  $\mu$ M por ser el tiempo y la dosis efectiva utilizada en las células C2C12 [Vasconsuelo *et al.*, 2008]. A continuación, las células fueron estimuladas con 17 $\beta$ -estradiol 10<sup>-8</sup>M durante 15 minutos en presencia o ausencia de dicho antagonista. Finalizados los tratamientos, se evaluó la

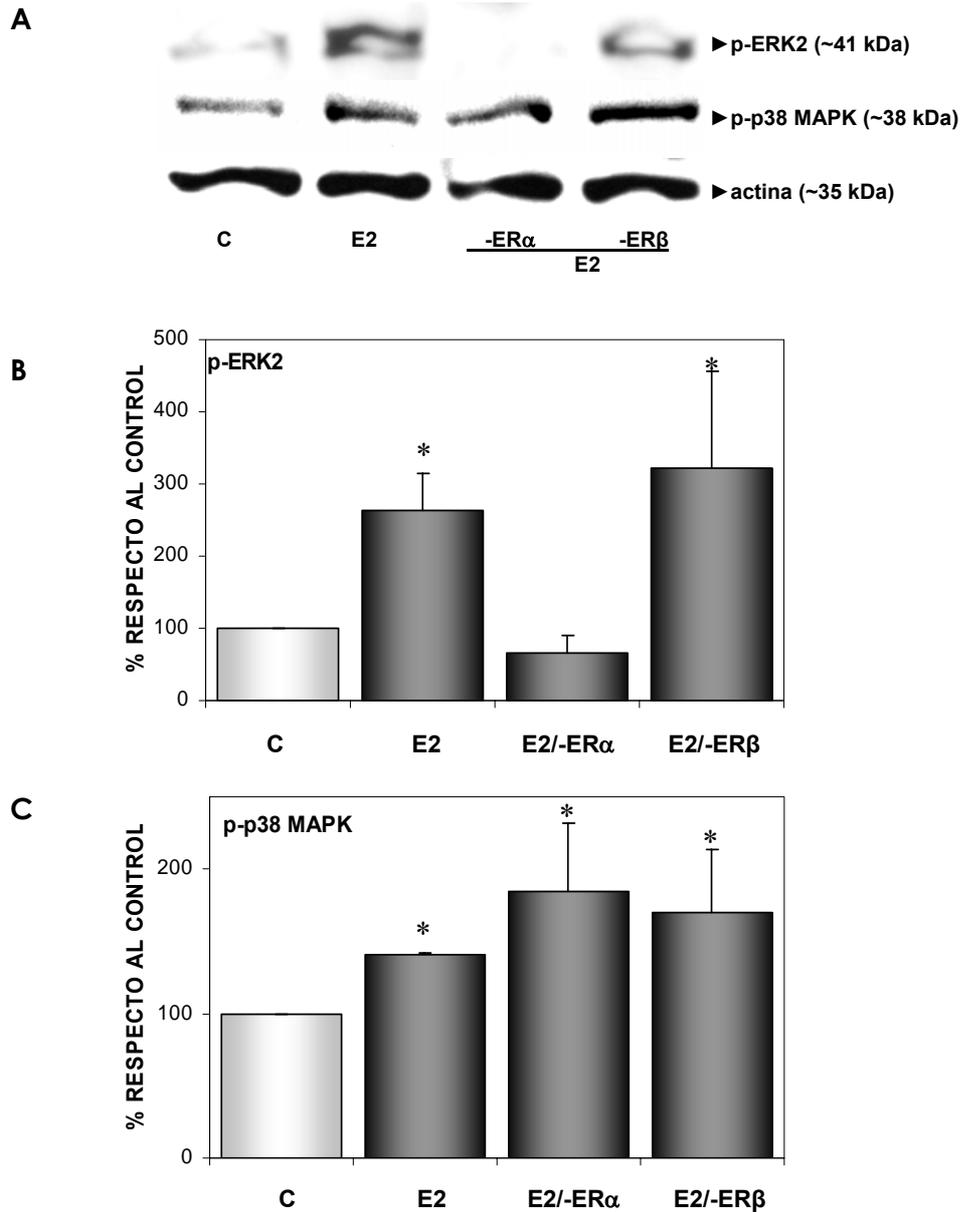
fosforilación de ERK2 y p38 MAPK mediante ensayos de *Western Blot*. Los resultados presentados en la **Figura 17** muestran que, en células preincubadas con ICI182780, la hormona no promovió la fosforilación de ERK2 sobre el control pero si la de p38 MAPK, sugiriendo que los receptores estrogénicos median la activación de ERK2 y que la fosforilación de la otra quinasa es independiente de dichos receptores.



**Figura 17:** El antiestrógeno ICI182780 inhibe la fosforilación de ERK2 y no la de p38 MAPK inducida por 17 $\beta$ -estradiol. Las células C2C12 fueron tratadas con 17 $\beta$ -estradiol 10<sup>-8</sup>M (E2) o su vehículo (C: isopropanol 0,001%) durante 15 minutos en presencia o ausencia de ICI182780 1  $\mu$ M. **(A)** Análisis de *Western Blot* como se describió en Metodología usando los anticuerpos específicos contra las formas dualmente fosforiladas/activas de ERK1/2 (Thr202/Tyr204) y p38 MAPK (Thr180/Tyr182); se muestran los niveles de actina como control de equivalencia de siembra en cada condición. **(B y C)** Cuantificación por densitometría de los *blots* obtenidos a partir de tres experimentos independientes. Los resultados se expresan como % de estímulo respecto de cada control (promedio  $\pm$  DE), \*p<0,05.

## 2. Efecto del silenciamiento de la expresión de ER $\alpha$ y ER $\beta$ sobre la activación de ERK2 y p38 MAPK por 17 $\beta$ -estradiol

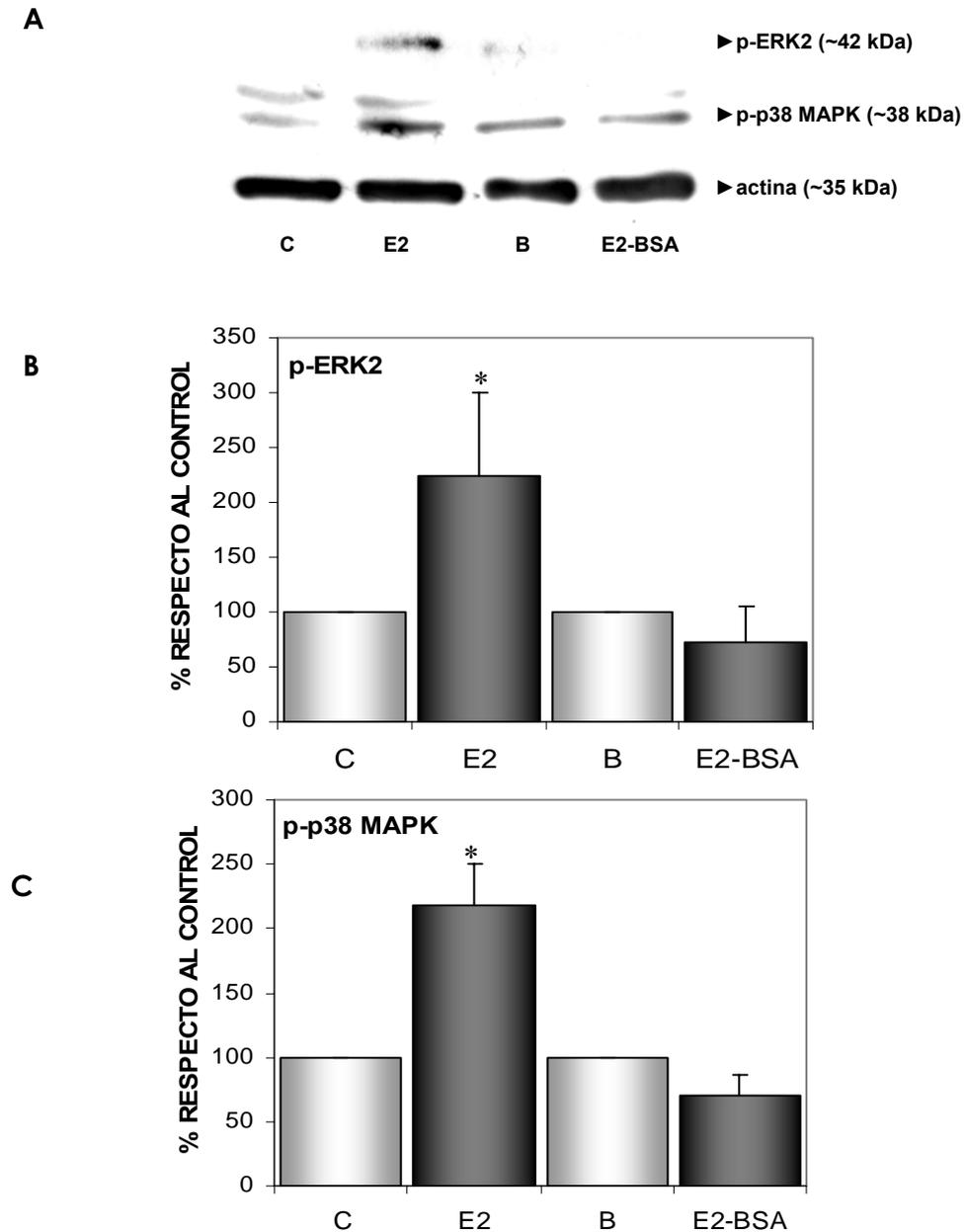
Con el fin de confirmar el rol de los receptores estrogénicos y evaluar la contribución de cada isoforma del receptor en la activación de las MAPKs por la hormona, se realizaron experimentos bloqueando la expresión de ER $\alpha$  y ER $\beta$ . Para ello, los cultivos celulares fueron transfectados con siRNAs (pequeños ARNs de interferencia) específicos, utilizando condiciones experimentales ya optimizadas en nuestro laboratorio [Vasconsuelo *et al.*, 2008]. A continuación, se evaluaron los efectos del 17 $\beta$ -estradiol sobre la fosforilación de ERK2 y p38 MAPK mediante ensayos de *Western Blot*. Los resultados de la **Figura 18** muestran que la activación de ERK2 por el estrógeno no se produjo cuando se abolió la expresión de ER $\alpha$ . Sin embargo, la hormona indujo la fosforilación de dicha quinasa aún al estar suprimido el ER $\beta$ . Por otro lado, la activación de p38 MAPK inducida por el 17 $\beta$ -estradiol no se modificó en las células donde se bloqueó la expresión de cada uno de los receptores. Estos resultados evidencian, que la activación de ERK2 por la hormona es mediada por ER $\alpha$  y no por ER $\beta$ , y además confirman que ninguno de estos receptores participa en la fosforilación de p38 MAPK.



**Figura 18:** Efectos del bloqueo de la expresión de ER $\alpha$  y ER $\beta$  sobre la fosforilación de ERK2 y p38 MAPK inducida por 17 $\beta$ -estradiol. Las células C2C12 fueron transfectadas con siRNA-ER $\alpha$  (-ER $\alpha$ ) o siRNA-ER $\beta$  (-ER $\beta$ ) durante 24 hs. y posteriormente tratadas con 17 $\beta$ -estradiol 10<sup>-8</sup>M (E2) o su vehículo (C: isopropanol 0,001%) durante 15 minutos como se describió en Metodología. **(A)** Análisis de *Western Blot* usando anticuerpos específicos contra las formas dualmente fosforiladas/activas de ERK1/2 (Thr202/Tyr204) y p38 MAPK (Thr180/Tyr182); se muestran los niveles de actina como control de equivalencia de siembra en cada condición. **(B y C)** Cuantificación por densitometría de los *blots* obtenidos a partir de tres experimentos independientes. Los resultados se expresan como % de estímulo respecto al control (promedio  $\pm$  DE), \*p<0,05.

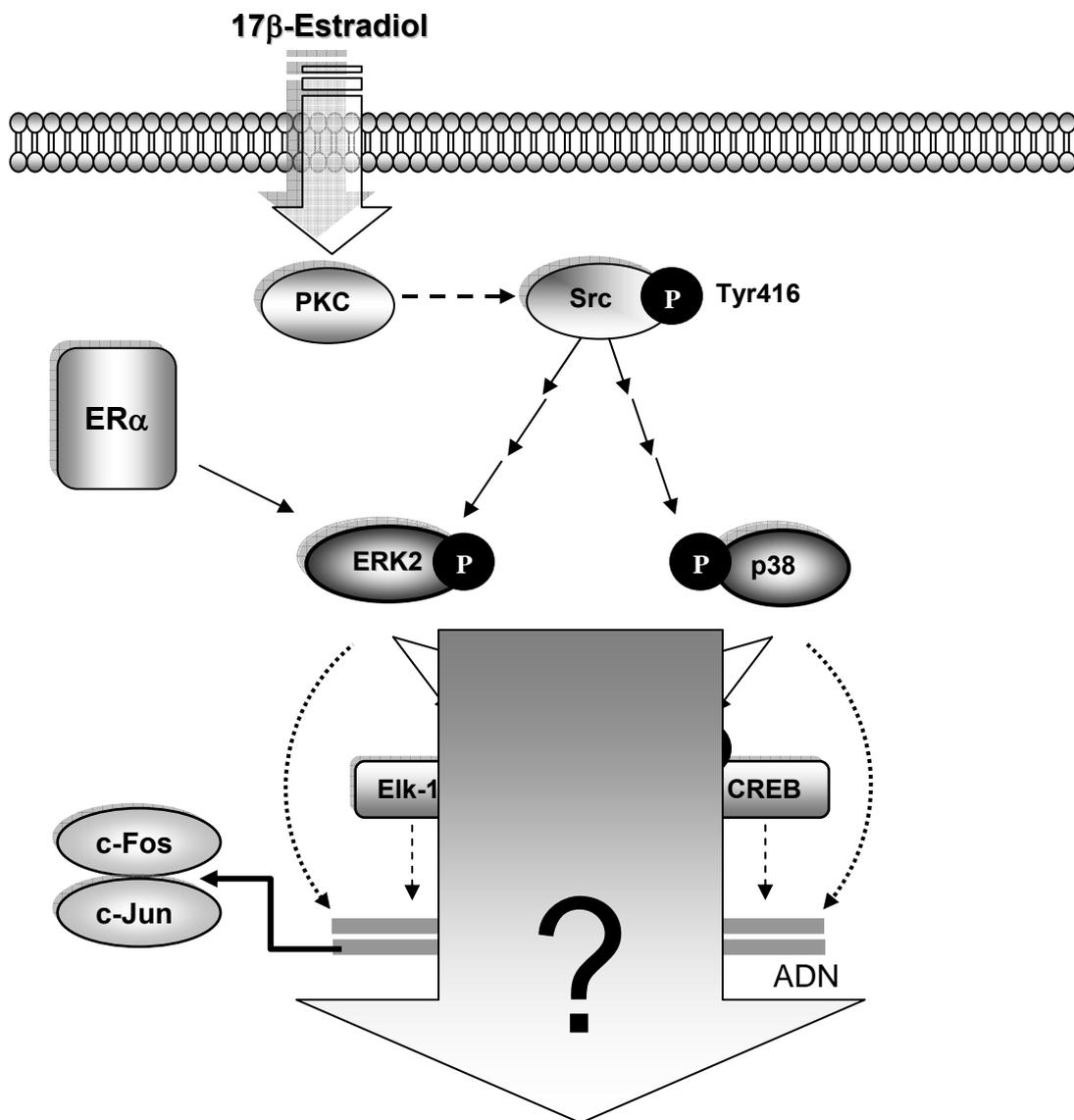
### 3. E2-BSA y fosforilación de las MAPKs

En el sistema experimental utilizado en este trabajo de tesis, se demostró recientemente que los receptores estrogénicos no se encuentran localizados a nivel de la membrana plasmática [Milanesi *et al.*, 2008]. Para estudiar si el 17 $\beta$ -estradiol induce la activación de las MAPKs a través de otros receptores/proteínas que se encuentran en la superficie celular, se utilizó el 17 $\beta$ -estradiol conjugado a albúmina sérica (E2-BSA), que no puede atravesar la membrana plasmática. Este compuesto fue preparado según reportes de Stevis *et al.*, para eliminar las trazas de 17 $\beta$ -estradiol libre [Stevis *et al.*, 1999]. Posteriormente, las células fueron tratadas con 17 $\beta$ -estradiol 10<sup>-8</sup>M o E2-BSA 10<sup>-8</sup>M durante 15 minutos y la fosforilación de ERK2 y p38 MAPK se detectó por *Western Blot*. Los resultados obtenidos en la **Figura 19** muestran que el estímulo de las células con E2-BSA no aumentó significativamente la fosforilación de ERK2 ni de p38 MAPK, sugiriendo que es necesario que la hormona atraviese la barrera de la membrana plasmática antes de ejercer su efecto sobre las MAPKs.



**Figura 19: Efectos del E2-BSA sobre la fosforilación de ERK1/2 y p38 MAPK.** Las células C2C12 fueron tratadas con  $17\beta$ -estradiol  $10^{-8}$ M (E2) y su vehículo (C: isopropanol 0,001%); o E2-BSA  $10^{-8}$ M (E2-BSA) y su vehículo (B: buffer de dilución) durante 15 minutos. **(A)** Análisis de *Western Blot* usando anticuerpos específicos contra las formas dualmente fosforiladas/activas de ERK1/2 (Thr202/Tyr204) y de p38 MAPK (Thr180/Tyr182); se muestran los niveles de actina como control de equivalencia de siembra en cada condición. **(B y C)** Cuantificación por densitometría de los *blots* obtenidos a partir de tres experimentos independientes. Los resultados se expresan como % de estímulo respecto de cada control (promedio  $\pm$  DE), \* $p < 0,05$ .

Muchas evidencias implican a las vías ERK1/2 y p38 MAPK como promotoras de acciones mitogénicas. Sin embargo, existen estudios donde las MAPKs se han asociado con procesos de supervivencia celular. Conociendo que el 17 $\beta$ -estradiol ejerce un rol protector frente al daño oxidativo en las células musculares esqueléticas, durante el desarrollo de este trabajo de tesis surgió como interrogante si ERK2 y p38 MAPK participaban en los efectos antiapoptóticos de la hormona.



### Rol de las MAPKs en los efectos antiapoptóticos del E2

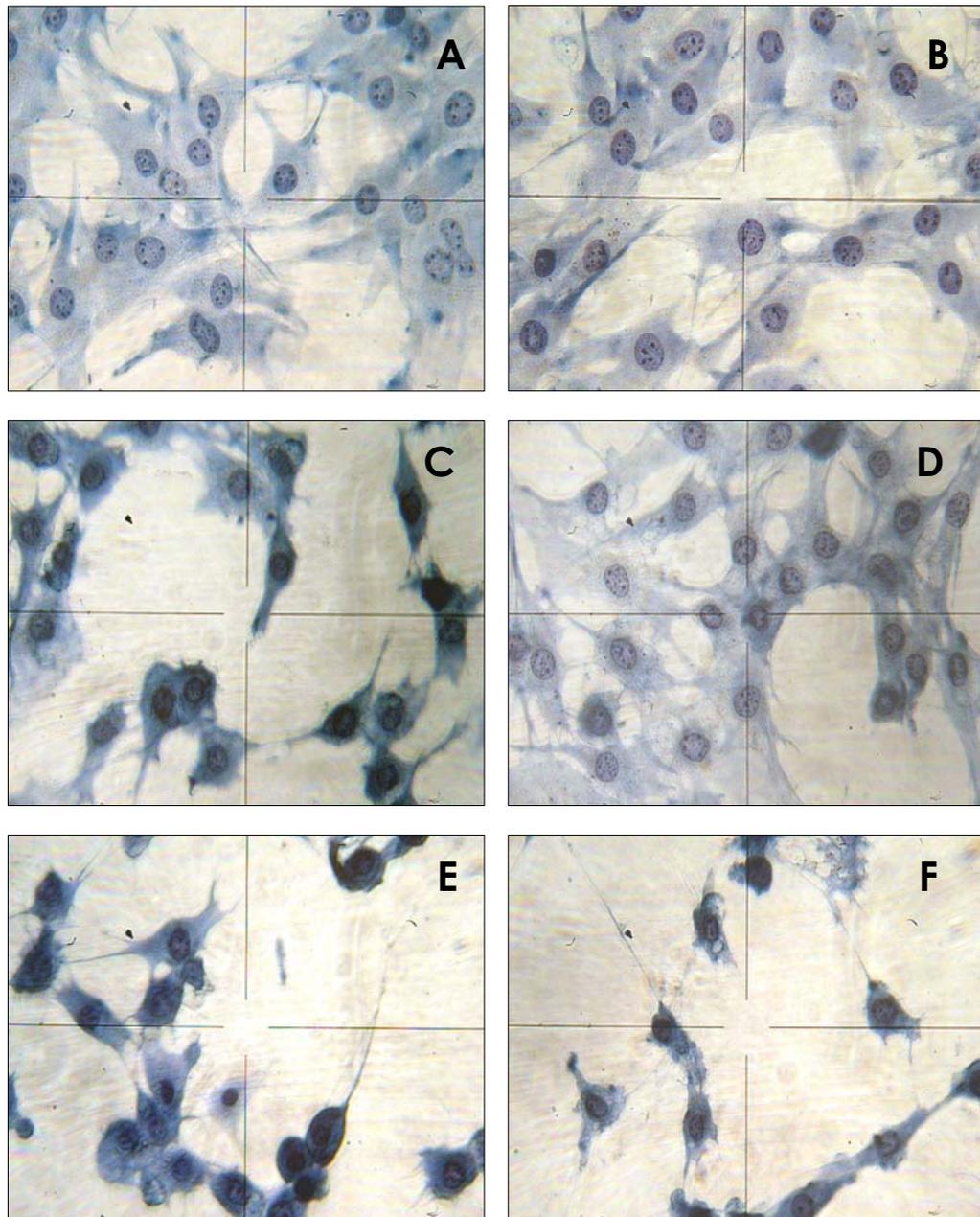
## **V. ROL DE ERK2 y p38 MAPK EN LOS EFECTOS ANTIAPOPTÓTICOS DEL 17 $\beta$ -ESTRADIOL EN CÉLULAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS**

El 17 $\beta$ -estradiol puede inducir la supervivencia celular o la apoptosis dependiendo del tipo celular [Choi *et al.*, 2001; Okasha *et al.*, 2001; Florian y Magder, 2008; Seli *et al.*, 2007]. Se ha reportado que esta hormona ejerce un rol protector en el músculo soleus [Persky *et al.*, 2000; Tiidus, 2005]. De particular importancia, en nuestro laboratorio se ha demostrado que el estrógeno protege a las células musculares C2C12 de la apoptosis inducida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [Vasconsuelo *et al.*, 2008]. Además, varios estudios indican que las vías MAPKs modulan eventos apoptóticos [Wada y Penninger, 2004; Alexaki *et al.*, 2006]. Por ello, resultó de interés, evaluar la implicancia de la activación de ERK2 y p38 MAPK evidenciada en este trabajo de tesis, en los efectos protectivos del 17 $\beta$ -estradiol, reportados en las células de músculo esquelético C2C12.

En todos los estudios que se describen a continuación, para investigar el rol de ERK2 y p38 MAPK en los efectos antiapoptóticos del 17 $\beta$ -estradiol, se realizaron los siguientes tratamientos. Las células musculares fueron incubadas con 17 $\beta$ -estradiol 10<sup>-8</sup> M, en presencia o ausencia de los inhibidores de ERK1/2 (U0126 10  $\mu$ M) y p38 MAPK (SB203580 20  $\mu$ M), o con su vehículo isopropanol. Luego, se indujo apoptosis exponiendo los cultivos a una concentración 0,5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> según se describió en Metodología.

## **1. Participación de ERK2 y p38 MAPK en los efectos antiapoptóticos del 17 $\beta$ -estradiol: cambios funcionales y morfológicos**

Primeramente se evaluaron cambios funcionales de las mitocondrias realizando coloraciones supravitales de los cultivos celulares con Verde Jano. Luego de los tratamientos adecuados, se tomaron fotografías de las distintas condiciones. Las imágenes obtenidas en la **Figura 20** muestran que las células expuestas al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (panel C) exhibieron una coloración azul-verdosa más intensa en el citoplasma que las células control (panel A) o las tratadas con 17 $\beta$ -estradiol solamente (panel B). Este resultado indica que la ruptura mitocondrial debida al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (panel D), ya que el 17 $\beta$ -estradiol contrarrestó el daño oxidativo. Sin embargo, la inhibición de ERK2 o p38 MAPK en las células expuestas al 17 $\beta$ -estradiol y al inductor de la apoptosis, provocó la oxidación del Verde Jano en el citoplasma indicando disfunción mitocondrial (paneles E y F). Estos resultados sugieren que ambas MAPKs median los efectos protectivos de la hormona frente al daño celular causado por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en células musculares.

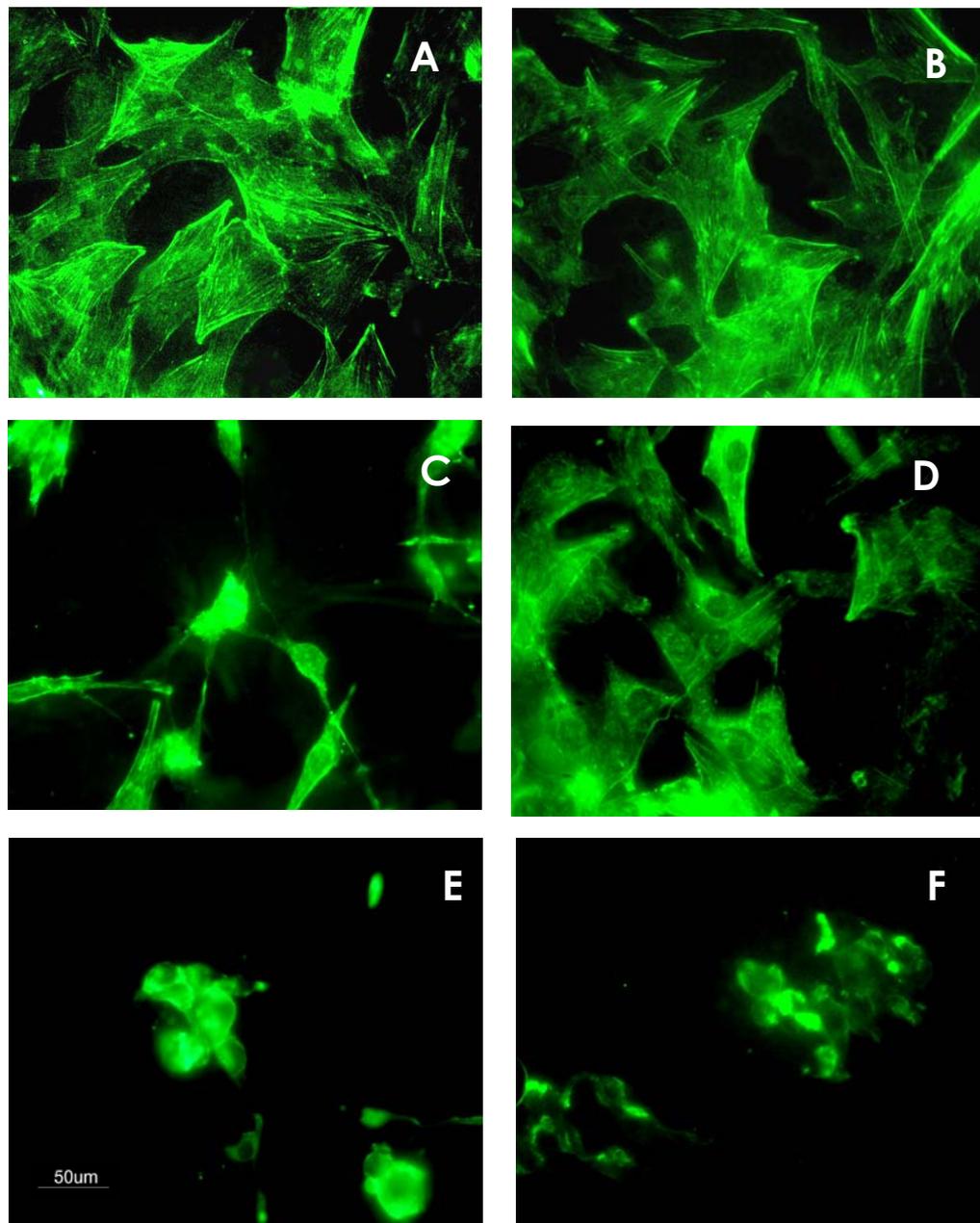


**Figura 20: Rol de ERK2 y p38 MAPK en los efectos protectivos del 17β-estradiol de la función mitocondrial. A:** isopropanol 0,001%; **B:** 17β-estradiol 10<sup>-8</sup>M; **C:** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM; **D:** 17β-estradiol 10<sup>-8</sup>M + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM; **E:** 17β-estradiol 10<sup>-8</sup>M + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM + SB203580 20 μM; **F:** 17β-estradiol 10<sup>-8</sup>M + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM + U0126 10 μM. Se realizaron tinciones con Verde Jano como se describió en Metodología. Se muestran imágenes representativas de al menos tres experimentos independientes. Magnificación 40X.

A continuación se evaluaron los cambios morfológicos y estructurales de las células C2C12 expuestas al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 17β-estradiol, así como la contribución de las MAPKs en los efectos protectivos de la hormona. Específicamente, se estudiaron modificaciones en la disposición de actina, localización de las mitocondrias y características del núcleo.

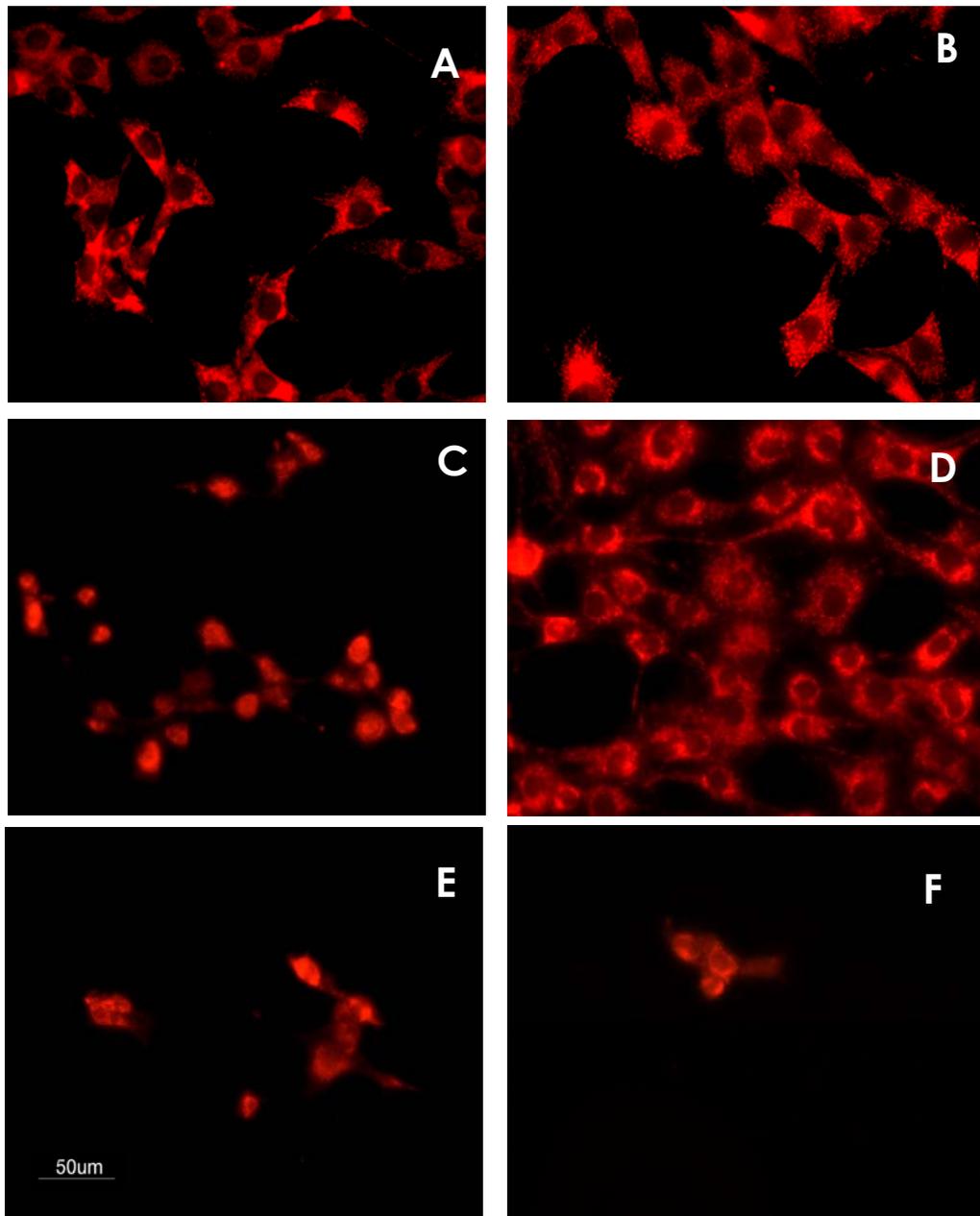
La actina es una proteína monomérica (actina G) del citoesqueleto que se polimeriza formando filamentos (actina F) [Theriot, 1997]. En condiciones apoptóticas, se produce la fragmentación de estos filamentos que resulta en una disminución de la adhesión celular y contactos intercelulares, cambios en la superficie de la célula y reducción del volumen celular.

Para estudiar las alteraciones en el citoesqueleto, luego de los tratamientos, se realizaron ensayos de inmunocitoquímica, utilizando un anticuerpo que reconoce específicamente a la actina. Las imágenes obtenidas en la **Figura 21** muestran la disposición característica de la actina formando los filamentos en células en su estado basal (panel A) y tratadas con la hormona (panel B). Cuando las células fueron tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se observó desorganización del citoesqueleto (panel C). La adición del 17β-estradiol previo a la inducción del daño oxidativo, provocó el re-establecimiento de las condiciones control y tratado con la hormona (panel D). De interés, la disrupción de los filamentos de actina no fue revertida por el estrógeno en las células expuestas conjuntamente con los inhibidores de las MAPKs (U0126 o SB203580), el 17β-estradiol y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (paneles E y F).



**Figura 21: Rol de ERK2 y p38 MAPK en los efectos antiapoptóticos del 17β-estradiol. Estructura del citoesqueleto.** **A:** isopropanol 0,001%; **B:** 17β-estradiol 10<sup>-8</sup>M; **C:** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM; **D:** 17β-estradiol 10<sup>-8</sup>M + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM; **E:** 17β-estradiol 10<sup>-8</sup>M + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM + SB203580 20 µM; **F:** 17β-estradiol 10<sup>-8</sup>M + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM + U0126 10 µM. Se realizaron ensayos de inmunocitoquímica usando un anticuerpo que reconoce a la actina. Magnificación 40X.

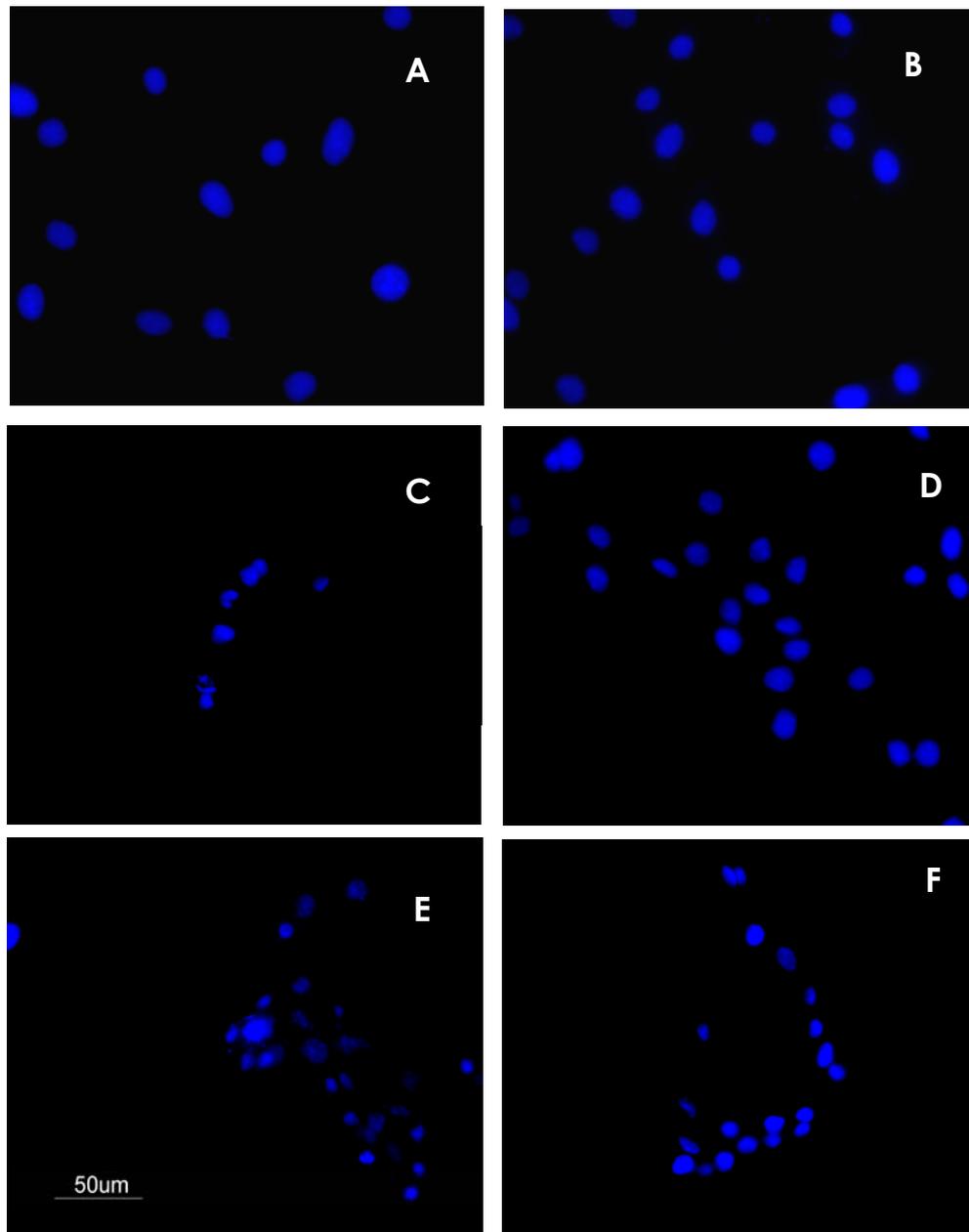
Durante el proceso apoptótico, las mitocondrias sufren cambios estructurales y también de localización. Las anomalías frecuentemente observadas incluyen una reducción en el tamaño mitocondrial (con aumento en la densidad de su matriz), proceso conocido como “picnosis” mitocondrial, y agrupamiento de estas organelas en la zona perinuclear [Desagher y Martinou, 2000; Vasconsuelo *et al.*, 2008]. Para evaluar estas modificaciones, se realizó una tinción mitocondrial utilizando el colorante fluorescente específico *Mitotracker*. Las imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia en la **Figura 22**, muestran que las mitocondrias de las células expuestas al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (panel C) se observaron próximas o en el núcleo, perdiendo su localización característica de distribución citoplasmática en células control y tratadas con la hormona (panel A y B). Esta alteración fue revertida por preincubación de las células con 17β-estradiol (panel D). Cuando los cultivos fueron expuestos a los inhibidores de ERK1/2 y p38 MAPK, la hormona y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, las mitocondrias mostraron la localización observada en las células apoptóticas, congregándose en la zona nuclear (panel E y F).



**Figura 22:** Rol de ERK2 y p38 MAPK en los efectos antiapoptóticos del 17β-estradiol. Disposición mitocondrial. **A:** isopropanol 0,001%; **B:** 17β-estradiol 10<sup>-8</sup>M; **C:** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM; **D:** 17β-estradiol 10<sup>-8</sup>M + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM; **E:** 17β-estradiol 10<sup>-8</sup>M + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM + SB203580 20 µM; **F:** 17β-estradiol 10<sup>-8</sup>M + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM + U0126 10 µM. Se realizaron tinciones fluorescentes mitocondriales con *Mitotracker*. Se muestran imágenes representativas de al menos tres experimentos independientes. Magnificación 40X.

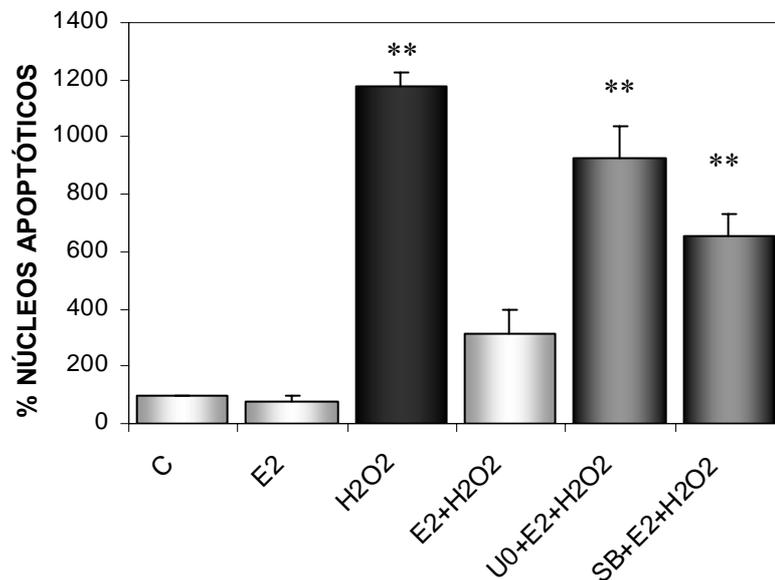
El aspecto del núcleo en una célula apoptótica es característico. Aunque existen variaciones entre los distintos tipos celulares, en general, durante la apoptosis se produce un aumento en la densidad de la cromatina, que comienza formando cúmulos alrededor de la envoltura nuclear y termina dando lugar a una o varias esferas densas. Dicha modificación en el material genético se produce por la ruptura de la lámina nuclear, estructura que se encuentra bajo la envoltura nuclear, y que participa en su estabilidad [Burke, 2001; Gruenbaum *et al.*, 2000]. Estos cambios van acompañados de una reducción del tamaño del núcleo, alteración conocida como "picnosis" nuclear.

Seguidamente se estudió la morfología nuclear en las distintas condiciones utilizando el marcador fluorescente DAPI. Las imágenes en la **Figura 23** muestran los núcleos redondeados intactos de las células control (panel A) y tratadas con el  $17\beta$ -estradiol (panel B). Los cultivos celulares expuestos al  $H_2O_2$  exhibieron núcleos picnóticos y en algunos casos se evidenció la fragmentación del mismo (panel C). Este efecto no se observó en las células incubadas previamente con la hormona y expuestas luego al  $H_2O_2$ , las cuales presentaron morfología nuclear inalterada (panel D). Los cultivos tratados además con los inhibidores de ERK1/2 y p38 MAPK, presentaron núcleos apoptóticos característicos (paneles E y F).



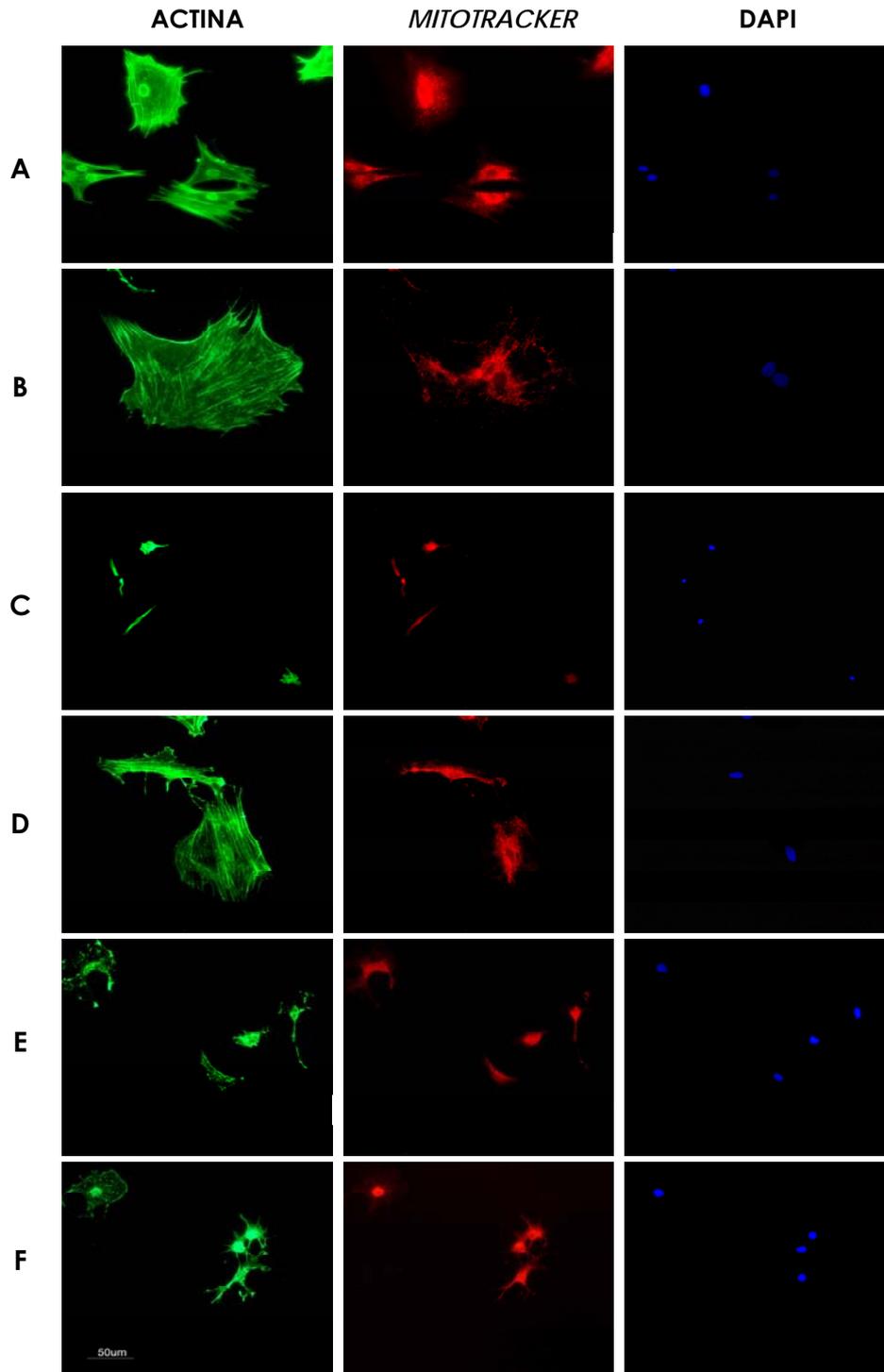
**Figura 23:** Rol de ERK2 y p38 MAPK en los efectos antiapoptóticos del 17β-estradiol. Características del núcleo. **A:** isopropanol 0,001%; **B:** 17β-estradiol 10<sup>-8</sup>M; **C:** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM; **D:** 17β-estradiol 10<sup>-8</sup>M + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM; **E:** 17β-estradiol 10<sup>-8</sup>M + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM + SB203580 20 μM; **F:** 17β-estradiol 10<sup>-8</sup>M + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM + U0126 10 μM. Se realizaron tinciones nucleares con DAPI. Se muestran imágenes representativas de tres experimentos independientes. Magnificación 40X.

Paralelamente al análisis de los cambios morfológicos nucleares descritos, se identificaron y cuantificaron los núcleos apoptóticos por microscopía de fluorescencia, observándose siempre más de 10 campos por condición experimental. Se considera que el porcentaje de núcleos picnóticos/fragmentados presentes es proporcional al grado de apoptosis celular. La **Figura 24** muestra que la preincubación de las células con  $17\beta$ -estradiol disminuye significativamente el porcentaje de núcleos apoptóticos. Al inhibir las vías ERK2 y p38 MAPK la hormona no logró prevenir el daño nuclear causado por el  $H_2O_2$ . Cuando las células fueron preincubadas con el inhibidor de ERK1/2, previo al tratamiento con estrógeno, se observó mayor cantidad de núcleos apoptóticos que al utilizar el inhibidor de p38 MAPK. Esto sugiere que ERK2 tendría un mayor grado de participación en la prevención de la apoptosis ejercida por la hormona.



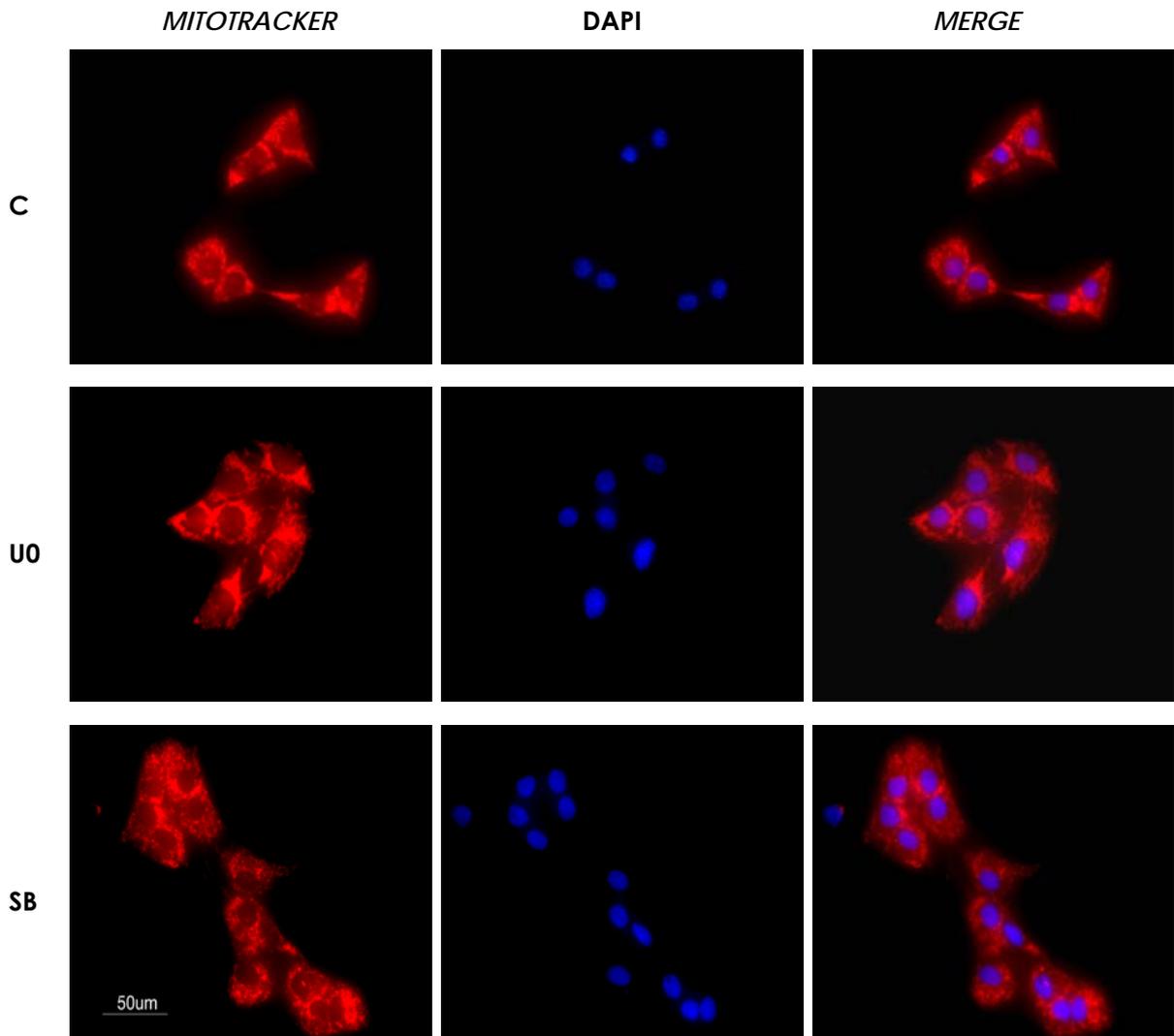
**Figura 24:** Cuantificación de núcleos apoptóticos. Rol de ERK2 y p38 MAPK en los efectos protectivos del 17 $\beta$ -estradiol. Las células C2C12 fueron tratadas con 17 $\beta$ -estradiol 10<sup>-8</sup>M (E2) o su vehículo (C: isopropanol 0,001%), en presencia o ausencia de U0126 10  $\mu$ M (U0) o SB203580 20  $\mu$ M (SB). Luego fueron expuestas al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM (H2O2). Posteriormente se realizaron tinciones con DAPI como se describió en Metodología para cuantificar los núcleos por microscopía. Los resultados de tres experimentos independientes se expresan como % de núcleos apoptóticos respecto al control (promedio  $\pm$  DE, n=3), \*\* p<0,01.

Las investigaciones realizadas sobre los cambios estructurales del citoesqueleto, mitocondrias y núcleos (figuras 21, 22 y 23), fueron repetidas usando células provenientes de cultivo primario de músculo esquelético murino, obteniéndose resultados comparables (**Figura 25**).



**Figura 25:** Rol de ERK2 y p38 MAPK en los efectos antiapoptóticos del 17β-estradiol en células de cultivo primario. Características del citoesqueleto, mitocondrias y núcleos. **A:** isopropanol 0,001%; **B:** 17β-estradiol 10<sup>-8</sup>M; **C:** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM; **D:** 17β-estradiol 10<sup>-8</sup>M + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM; **E:** 17β-estradiol 10<sup>-8</sup>M + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM + SB203580 20 µM; **F:** 17β-estradiol 10<sup>-8</sup>M + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM + U0126 10 µM. Se realizaron ensayos de inmunocitoquímica usando el anticuerpo anti-actina (fluorescencia verde), tinciones con Mitotracker, para las mitocondrias (fluorescencia roja) y DAPI para los núcleos (fluorescencia azul). Magnificación 40X.

Si bien el uso de U0126 y SB203580 resultó ser una herramienta eficaz para inhibir ERK2 y p38 MAPK, respectivamente, se consideró de importancia descartar la posibilidad de que estos inhibidores fueran inductores de apoptosis *per se* en los cultivos celulares. Para ello, se evaluó el efecto de cada uno de ellos sobre la estructura de las mitocondrias y núcleos. Las células C2C12 se incubaron con U0126 10  $\mu\text{M}$  o SB203580 20  $\mu\text{M}$  durante 5 - 6 horas y posteriormente fueron teñidas con *Mitotracker* y DAPI. Las imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia en la **Figura 26**, muestran que las células expuestas a cada uno de los inhibidores, no exhibieron cambios morfológicos mitocondriales y nucleares en comparación con las células control. Estos datos permiten concluir que las concentraciones usadas de U0126 10  $\mu\text{M}$  y SB203580 20  $\mu\text{M}$  no afectan la viabilidad celular en los tiempos experimentales ensayados.



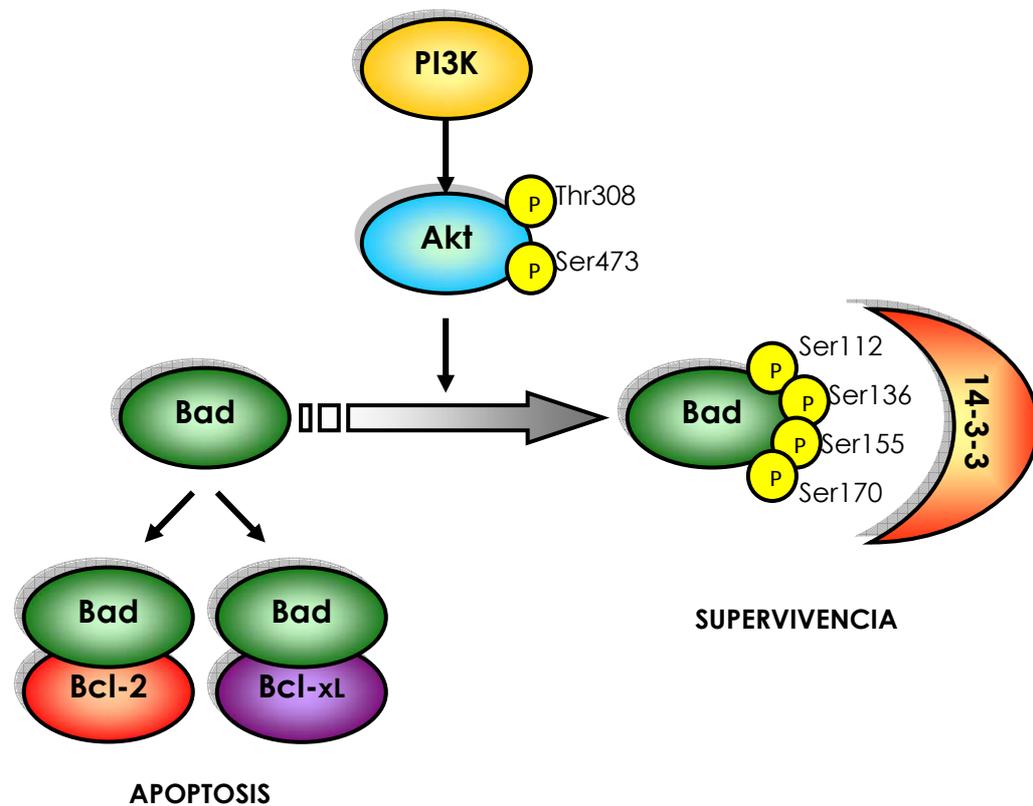
**Figura 26: Efectos del U0126 y SB203580 sobre la morfología celular:** las células C2C12 fueron incubadas en medio sin suero (**C**) y en presencia de U0126 10  $\mu$ M (**U0**) o SB203580 20  $\mu$ M (**SB**) durante 5 - 6 hs. Posteriormente se realizaron tinciones fluorescentes con *Mitotracker* (fluorescencia roja) y DAPI (fluorescencia azul) como se describió en Metodología. El *merge* es la superposición exacta de las fotografías. Se muestran imágenes representativas de tres experimentos independientes. Magnificación 40X.

Los resultados de esta sección, indican que las células expuestas al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presentan desorganización de la actina, cambios en la disposición de las mitocondrias (congregándose alrededor del núcleo) y núcleos picnóticos/fragmentados. Estas características fueron prevenidas al preincubar las células con el 17β-estradiol. De interés, en presencia de los inhibidores de las MAPKs, la hormona no logró revertir el efecto provocado por el inductor de apoptosis. Por lo tanto se evidencia que las vías ERK2 y p38 MAPK están involucradas en las acciones antiapoptóticas del 17β-estradiol en las células de músculo esquelético.

## **2. Roles de ERK2 y p38 MAPK en eventos metabólicos de supervivencia activados por 17β-estradiol**

Una vez determinado que ERK2 y p38 MAPK participan en los efectos protectivos del 17β-estradiol contra la apoptosis, el siguiente paso fue determinar algunos mecanismos moleculares implicados en este proceso, estudiando cambios en la fosforilación de Akt y Bad.

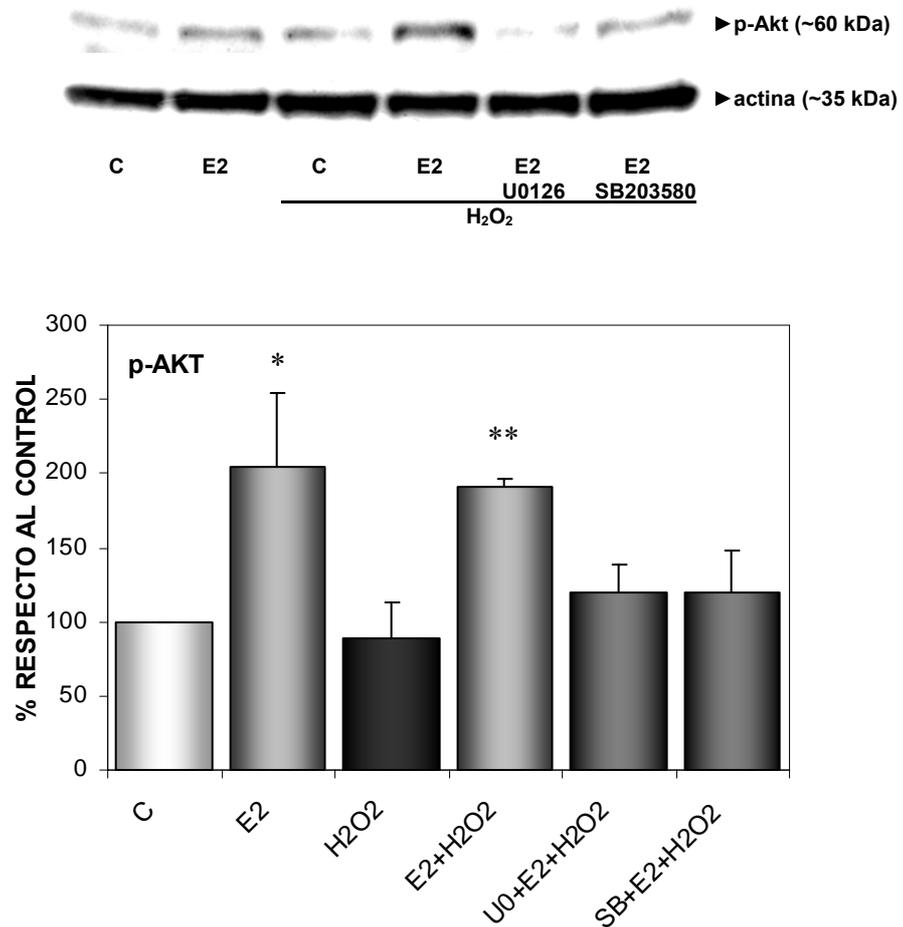
Bad es un miembro proapoptótico de la familia Bcl-2 que, cuando está fosforilada en sus cuatro residuos serina (112, 136, 155 y 170), se encuentra formando un complejo inactivo con la chaperona 14-3-3. Frente a un estímulo apoptótico, Bad es desfosforilado disociándose de 14-3-3 y transloca a la membrana mitocondrial donde se dimeriza con Bcl-XL o Bcl-2, para inducir la apoptosis [Yang et al., 1995, Zha *et al.*, 1996; Lizcano *et al.*, 2000]. Existen varios caminos de señalización que conducen a la fosforilación e inactivación de Bad, uno de ellos es la vía de PI3K/Akt [Downward, 2004].



**Inactivación de Bad:** la función de la molécula proapoptótica Bad es regulada por fosforilación en cuatro residuos serinas (-112, -136, -155, -170). La fosforilación de estos sitios resulta en la pérdida de la habilidad de la proteína para asociarse con otras proteínas proapoptóticas y promover la apoptosis. De esta manera Bad queda inactivada y secuestrada en el citoplasma por la proteína 14-3-3.

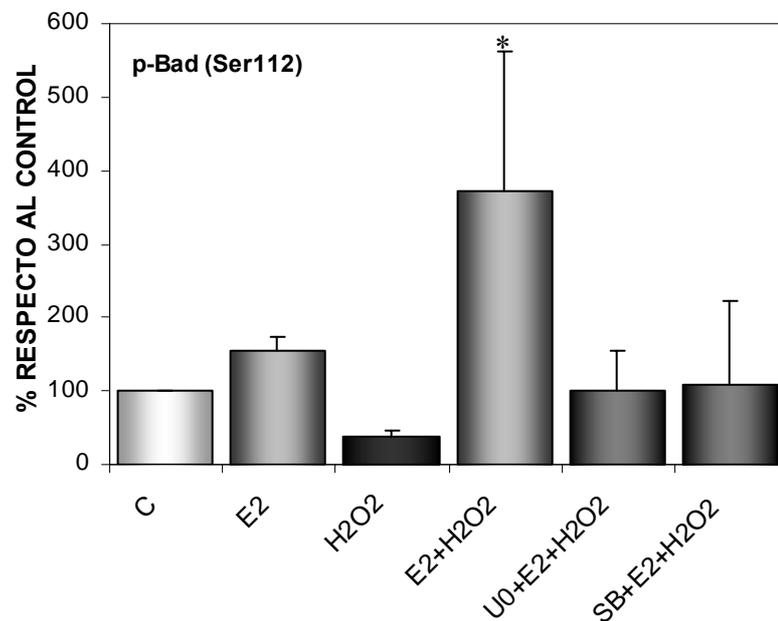
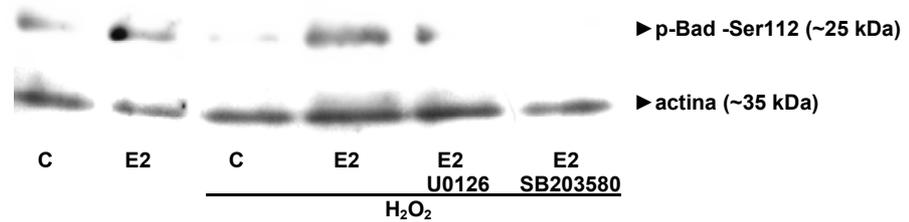
En nuestro laboratorio, se ha demostrado que el  $17\beta$ -estradiol activa la vía PI3K/AKT, la que conduce a la fosforilación de Bad en serina 136 (Ser136), inhibiendo de este modo la apoptosis inducida por el  $H_2O_2$  en las células C2C12 [Vasconsuelo *et al.*, 2008]. Por ello resultó de interés estudiar la participación de las MAPKs en la fosforilación de Akt promovida por la hormona a través de ensayos de *Western Blot*. Los resultados en la **Figura 27** muestran la activación Akt por la hormona en ausencia y presencia de  $H_2O_2$ ,

reportada anteriormente [Vasconsuelo *et al.*, 2008]. Cuando las células se preincubaron con el inhibidor de ERK1/2 (U0126), la fosforilación de Akt fue suprimida, indicando que la activación de ERK2 es necesaria en este evento. Por otro lado, cuando las células fueron preincubadas con el inhibidor de p38 MAPK (SB203580), se observó una disminución en la fosforilación de Akt inducida por la hormona.



**Figura 27: Rol de ERK2 y p38 MAPK en la fosforilación de Akt inducida por 17 $\beta$ -estradiol.** Las células C2C12 fueron tratadas con 17 $\beta$ -estradiol 10<sup>-8</sup>M (E2) o su vehículo (C: isopropanol 0,001%), en presencia o ausencia de U0126 10  $\mu$ M (U0) o SB203580 20  $\mu$ M (SB). Luego fueron expuestas al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Los ensayos de *Western Blot* se realizaron como se describió en Metodología usando un anticuerpo específico contra la forma fosforilada de Akt (Ser473). Se muestran los niveles de actina como control de equivalencia de siembra en cada condición. Los *blots* obtenidos fueron cuantificados por densitometría. Los resultados se expresan como % de estímulo respecto al control (promedio  $\pm$  DE, n=3), \*p<0,05.

Se ha reportado que Bad puede ser fosforilada en serina 112 (Ser112) por activación de la vía ERK1/2 [Fang *et al.*, 1999; Shimamura *et al.*, 2000]. Por ello a continuación, se investigó la implicancia de las MAPKs en la fosforilación de Bad (Ser112) inducida por el 17 $\beta$ -estradiol. Se realizaron análisis de *Western Blot* con un anticuerpo específico anti-fosfo-Bad (Ser112). En la **Figura 28** se observa que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indujo la desfosforilación en la serina 112 (activación) de la proteína proapoptótica Bad. La exposición de las células a la hormona, previa al tratamiento con el inductor de la apoptosis, aumentó la fosforilación de dicha proteína inactivándola. Estos resultados concuerdan con observaciones previas sobre la fosforilación de Bad en Ser136 [Vasconsuelo *et al.*, 2008]. Al estar presentes los inhibidores de las MAPKs en condiciones apoptóticas, no se observó la fosforilación de Bad dependiente de la hormona, sugiriendo que ERK2 y p38 MAPK participan en la inactivación (fosforilación) de Bad en Ser112 como parte de los efectos protectivos del 17 $\beta$ -estradiol.

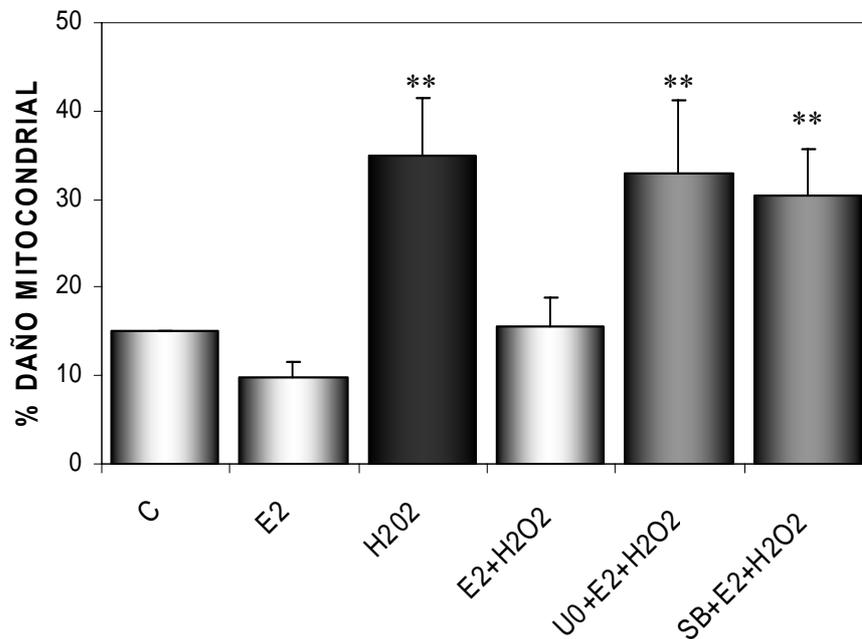


**Figura 28: Rol de ERK2 y p38 MAPK en la fosforilación de Bad por 17 $\beta$ -estradiol.** Las células C2C12 fueron tratadas con 17 $\beta$ -estradiol 10<sup>-8</sup>M (E2) o su vehículo (C: isopropanol 0,001%), en presencia o ausencia de U0126 10  $\mu$ M (U0) o SB203580 20  $\mu$ M (SB). Luego fueron expuestas al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Los ensayos *Western Blot* se realizaron como se describió en Metodología usando un anticuerpo específico contra la forma fosforilada de Bad en Ser112. Se muestran los niveles de actina como control de equivalencia de siembra en cada condición. Los *blots* obtenidos fueron cuantificados por densitometría. Los resultados se expresan como % de estímulo respecto al control (promedio  $\pm$  DE), \*p<0,05.

### **3. Contribución de ERK2 y p38 MAPK en los efectos protectivos del 17 $\beta$ -estradiol en la integridad de la membrana mitocondrial.**

Como se indica en la Introducción, en la vía intrínseca de la apoptosis las señales de muerte conducen a alteraciones/pérdida de la permeabilidad de la membrana mitocondrial, con la subsiguiente liberación de factores proapoptóticos, entre ellos el citocromo-c [Liu *et al.*, 1996] y Smac/DIABLO [Shiozaki y Shi, 2004].

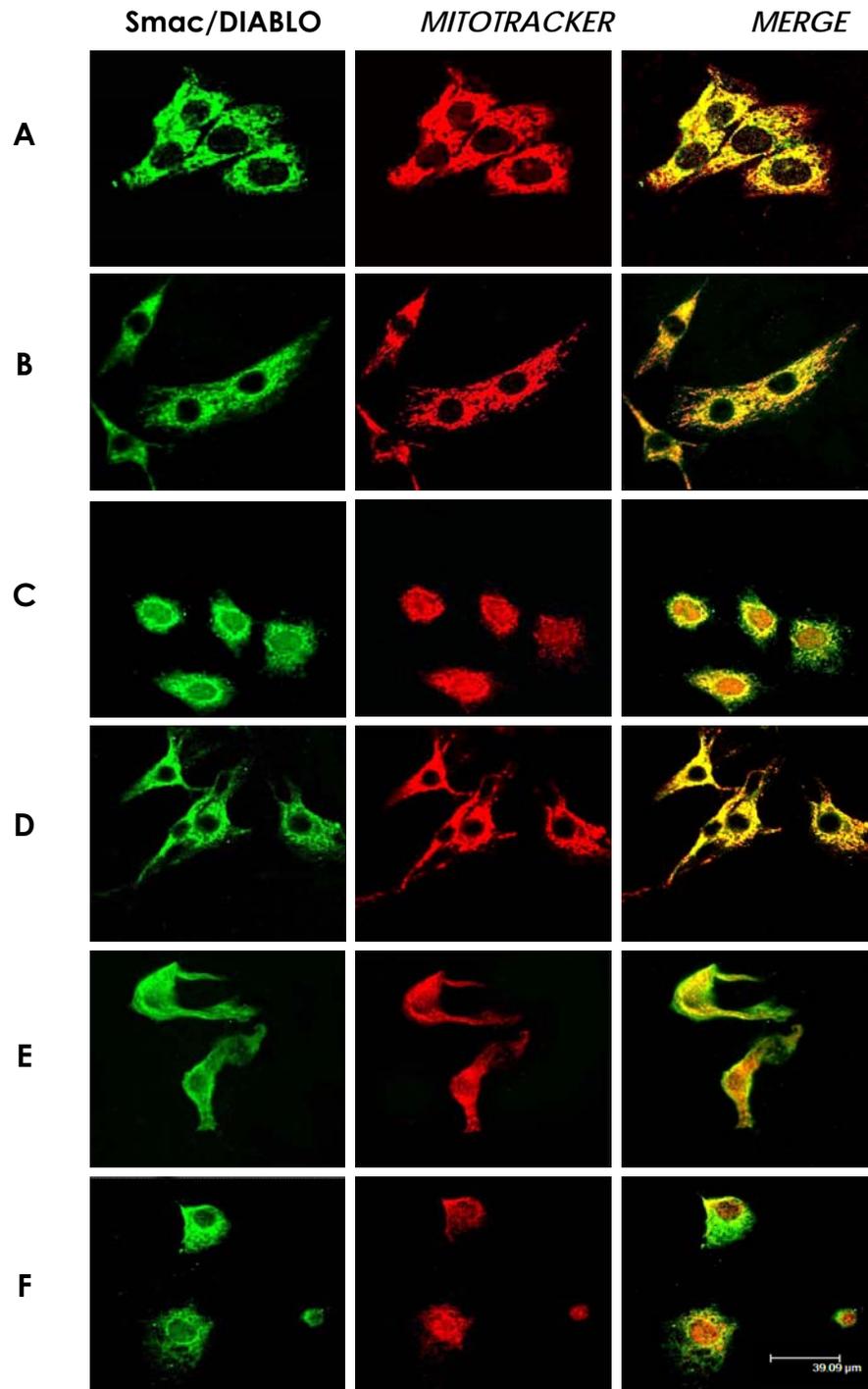
En nuestro laboratorio se demostró que el 17 $\beta$ -estradiol inhibe la ruptura mitocondrial, lo que impide la liberación del citocromo-c [Vasconsuelo *et al.*, 2008]. En consecuencia, se investigó la participación de ERK2 y p38 MAPK en la integridad de la membrana mitocondrial promovida por la hormona. Esto se desarrolló aislando la fracción citosólica y midiendo la actividad de la citocromo c oxidasa, enzima específica de la mitocondria, como se describe en Metodología. La **Figura 29** muestra que las células expuestas al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presentaron un mayor porcentaje de daño mitocondrial, siendo este efecto revertido cuando fueron preincubadas con el 17 $\beta$ -estradiol y luego expuestas al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, como se reportó anteriormente [Vasconsuelo *et al.*, 2008]. Sin embargo en presencia de los inhibidores de las MAPKs (U0126 o SB203580), el tratamiento previo con la hormona, no logró proteger la integridad mitocondrial afectada por el agente apoptótico. Estos resultados indican que ERK2 y p38 MAPK participan en la protección del 17 $\beta$ -estradiol frente al daño de la membrana mitocondrial causado por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Figura 29:** Rol de ERK2 y p38 MAPK en la protección de la integridad de la membrana mitocondrial por  $17\beta$ -estradiol. Las células C2C12 fueron tratadas con  $17\beta$ -estradiol  $10^{-8}$ M (E2) o su vehículo (C: isopropanol 0,001%), en presencia o ausencia de U0126  $10\ \mu\text{M}$  (U0) o SB203580  $20\ \mu\text{M}$  (SB). Luego fueron expuestas al  $\text{H}_2\text{O}_2$   $0,5\ \text{mM}$  (H2O2). Posteriormente se realizaron ensayos para medir la integridad de la membrana mitocondrial como se describió en Metodología. Los resultados obtenidos a partir de tres experimentos independientes se expresan como % de daño mitocondrial. (Promedio  $\pm$  DE,  $n=3$ ), \*\* $p<0,01$ .

Para obtener información adicional acerca de la integridad de la membrana mitocondrial, se investigó la localización de Smac/DIABLO, otra proteína exclusivamente mitocondrial. Para ello, se realizaron estudios de inmunocitoquímica usando un anticuerpo que reacciona específicamente contra Smac/DIABLO (fluorescencia color verde), conjuntamente a la marcación de las mitocondrias con *Mitotracker* (fluorescencia roja). Como se observa en las imágenes obtenidas por microscopía confocal en la **Figura 30**,

en el control (panel A) y en células tratadas con la hormona (panel B), Smac/DIABLO se localizó exclusivamente dentro de la mitocondria, evidenciado por la mezcla de imágenes que resulta en color amarillo (*merge*). La exposición de las células al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, promovió la liberación de Smac/DIABLO al citosol (panel C), efecto que fue revertido en las células preincubadas con el 17β-estradiol (panel D). Cuando se inhibieron las vías MAPKs, antes del tratamiento de las células con 17β-estradiol y luego H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la hormona no previno la liberación de la proteína proapoptótica mencionada (paneles E y F). Estos datos confirman que el 17β-estradiol protege la integridad de la membrana mitocondrial, lo que inhibe la salida de Smac/DIABLO inducida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a través de un mecanismo dependiente de la activación de ERK2 y p38 MAPK.

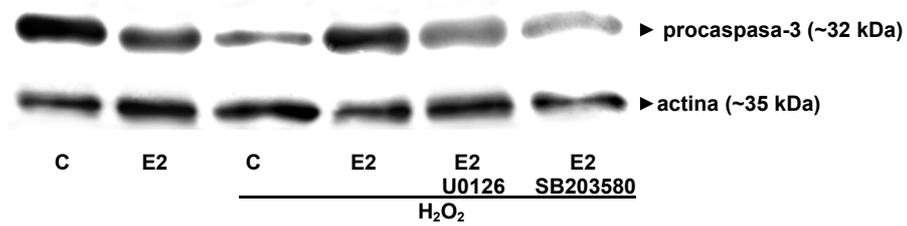


**Figura 30:** Rol de ERK2 y p38 MAPK en la inhibición de la liberación de Smac/DIABLO mitocondrial por 17 $\beta$ -estradiol. **A:** isopropanol 0,001%; **B:** 17 $\beta$ -estradiol 10<sup>-8</sup>M; **C:** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM; **D:** 17 $\beta$ -estradiol 10<sup>-8</sup>M + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM; **E:** 17 $\beta$ -estradiol 10<sup>-8</sup>M + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM + SB203580 20  $\mu$ M; **F:** 17 $\beta$ -estradiol 10<sup>-8</sup>M + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM + U0126 10  $\mu$ M. Se realizaron ensayos de inmunocitoquímica con un anticuerpo que reconoce a Smac/DIABLO (fluorescencia verde) y se tiñeron las mitocondrias con Mitotracker (fluorescencia roja). El *merge* es la superposición exacta de imágenes, donde el color amarillo resulta de la mezcla de la fluorescencia verde y roja. Magnificación 63X.

#### 4. Participación de ERK2 y p38 MAPK en los efectos protectivos del 17 $\beta$ -estradiol: clivaje de caspasa-3 y PARP

Otro rasgo distintivo del proceso apoptótico es la activación de la caspasa-3 que es una de las proteínas claves en la ejecución de la muerte celular. Para ser activada, esta proteasa requiere un clivaje proteolítico de su zimógeno inactivo (32 kDa) [Fernandes-Alnemri *et al.*, 1994; Liu *et al.* 1996] y posteriormente la caspasa-3 es responsable de la proteólisis específica de diversas proteínas, tales como la poli ADP-ribosa polimerasa (PARP) [Oliver *et al.*, 1999].

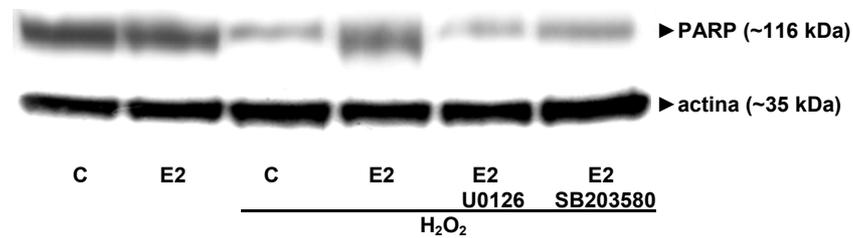
Para evaluar la activación de la caspasa-3 se realizaron ensayos de *Western Blot* con un anticuerpo que reconoce tanto la proenzima (32 kDa) como la forma clivada de la caspasa-3 activa (17 kDa). Los resultados de la **Figura 31** muestran que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disminuyó los niveles proteicos del zimógeno, lo que indicaría su clivaje y por lo tanto activación de caspasa-3. Sin embargo, no se visualizó el fragmento clivado de 17 kDa. El pretratamiento de las células con 17 $\beta$ -estradiol mostró cantidades de procaspasa-3 similares al control y al tratamiento con la hormona. Al exponer los cultivos celulares a la hormona, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y los inhibidores de las MAPKs (U0126 o SB203580), el 17 $\beta$ -estradiol no logró prevenir el clivaje del zimógeno. Estos resultados sugieren que la activación de ERK2 y p38 MAPK es necesaria como parte del mecanismo que utilizaría la hormona para inhibir el clivaje de procaspasa-3 inducida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Figura 31: El 17 $\beta$ -estradiol inhibe el clivaje de la procaspasa-3 en forma dependiente de ERK2 y p38 MAPK.** Las células C2C12 fueron tratadas con 17 $\beta$ -estradiol 10<sup>-8</sup>M (E2) o su vehículo (C: isopropanol 0,001%), en presencia o ausencia de U0126 10  $\mu$ M o SB203580 20  $\mu$ M. Luego fueron expuestas al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM. Los ensayos *Western Blot* se realizaron como se describió en Metodología usando un anticuerpo que reconoce la procaspasa-3. Se muestran los niveles de actina como control de equivalencia de siembra en cada condición.

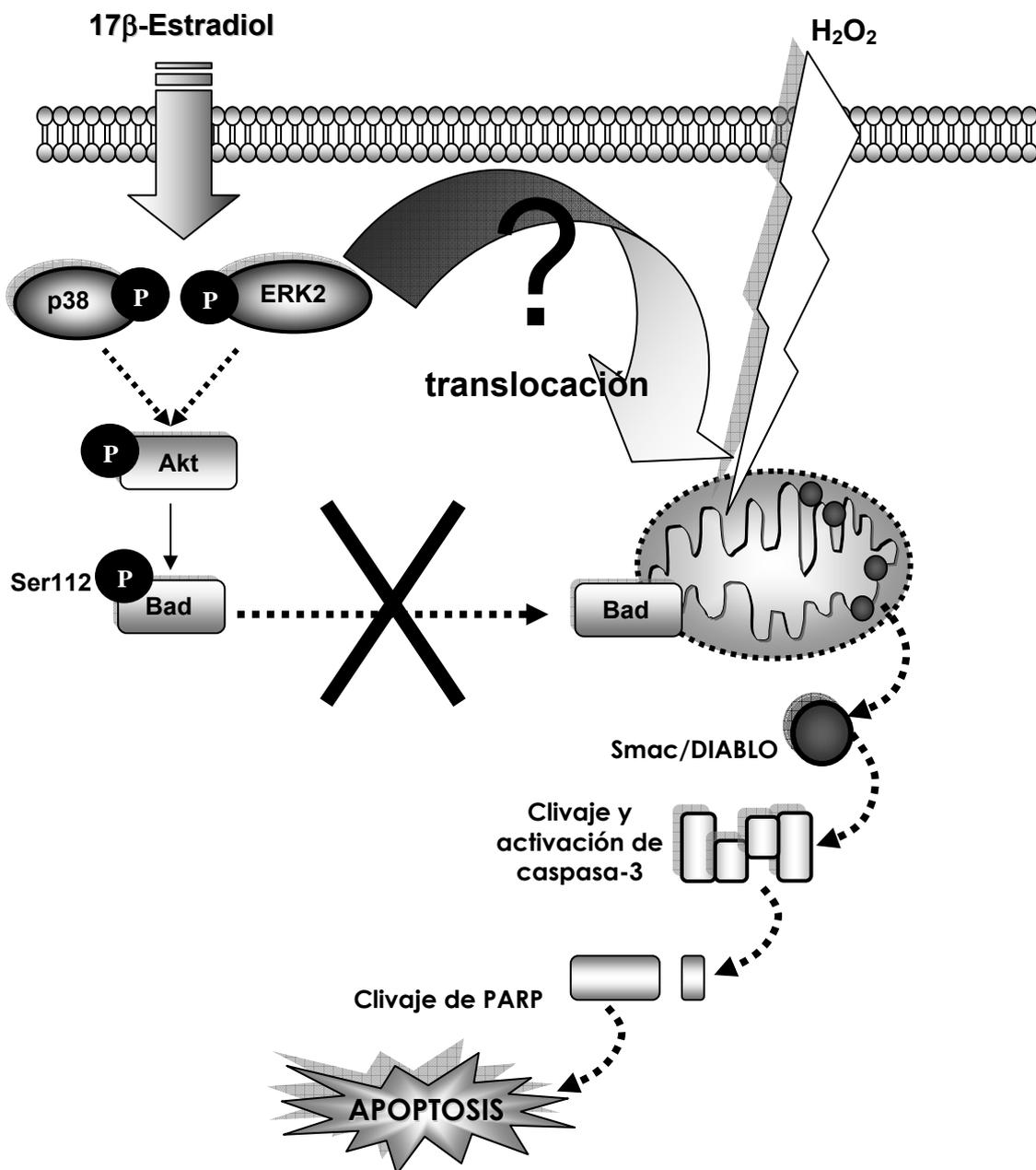
Respecto de PARP, se conoce que es una enzima nuclear de 116 kDa, sustrato de la caspasa-3, y que está implicada en la reparación del ADN. Como parte del proceso apoptótico, la caspasa-3 cliva a PARP inactivándola, obteniéndose un fragmento de 89 kDa y otro de 24 kDa [Oliver *et al.*, 1999]. Por lo tanto otra manera de evaluar la activación de la caspasa-3 consistió en estudiar el clivaje de PARP mediante ensayos de *Western Blot* usando un anticuerpo que reconoce la forma intacta de PARP y ambos fragmentos clivados. La **Figura 32** muestra que PARP se encontró inalterada en la condición control y con la adición del 17 $\beta$ -estradiol. El tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mostró una disminución relativa de PARP, sugiriendo la proteólisis de esta enzima. Nuevamente, con los anticuerpos utilizados no fue posible reconocer los fragmentos clivados. Al preincubar las células con la hormona antes del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se observó a PARP intacta como en las condiciones

controles. Estos resultados ratifican los reportados anteriormente en nuestro laboratorio [Vasconsuelo *et al.*, 2008]. En contraste, cuando los cultivos celulares fueron incubados con la hormona, el inductor de la apoptosis y además los compuestos U0126 y SB203580, los niveles de PARP intacta se observaron disminuídos. Estos datos sugieren que la activación de ERK2 y p38 MAPK por el 17 $\beta$ -estradiol previene el clivaje de PARP inducido por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



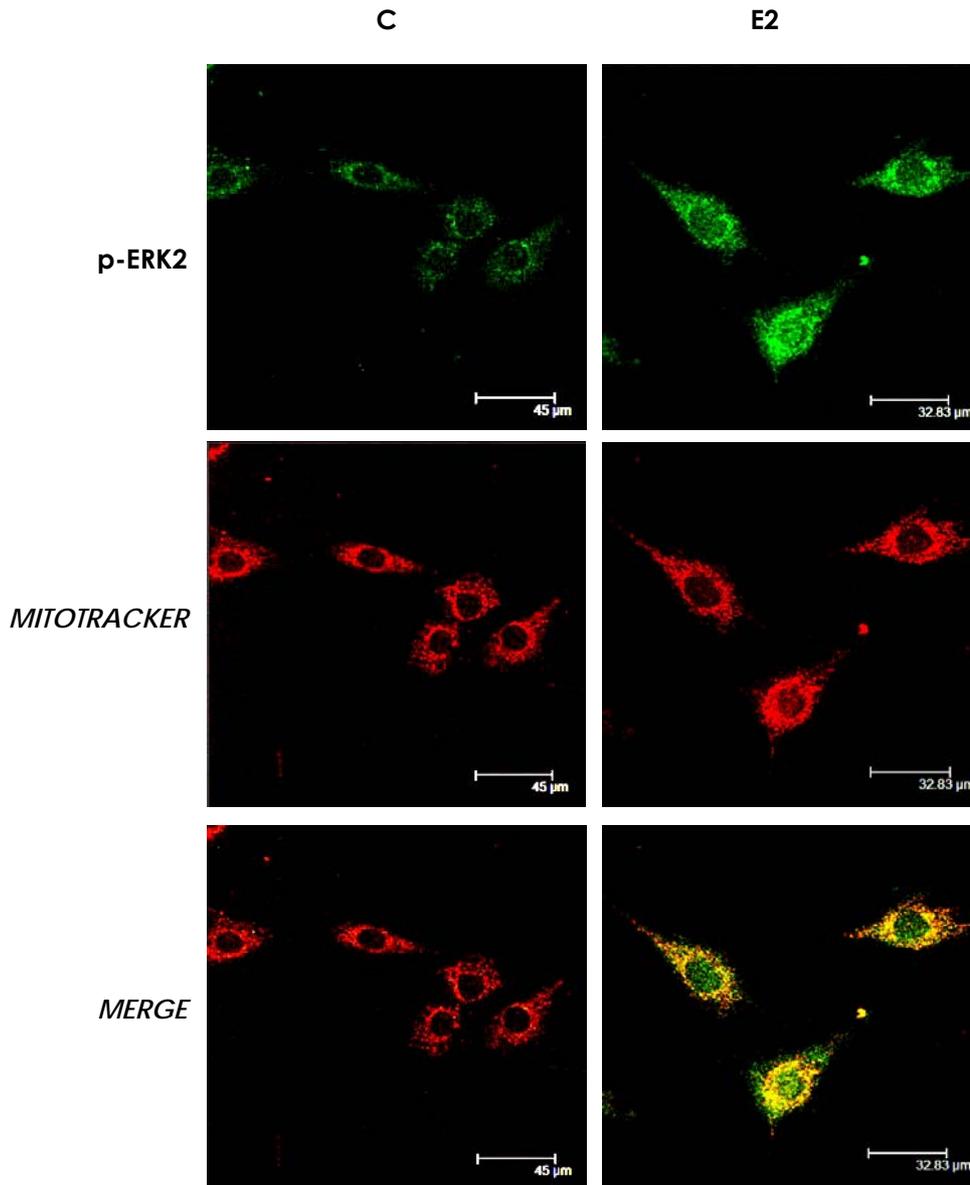
**Figura 32:** El 17 $\beta$ -estradiol inhibe el clivaje de PARP involucrando a ERK2 y p38 MAPK: Las células C2C12 fueron tratadas con 17 $\beta$ -estradiol 10<sup>-8</sup>M (E2) o su vehículo (C: isopropanol 0,001%), en presencia o ausencia de U0126 10  $\mu$ M o SB203580 20  $\mu$ M. Luego fueron expuestas al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM. Los ensayos de *Western Blot* se realizaron como se describió en Metodología usando un anticuerpo que reacciona con PARP. Se muestran los niveles de actina como control de equivalencia de siembra en cada condición.

Esta sección de resultados (V), profundiza la información obtenida anteriormente en nuestro laboratorio, postulando la participación de ERK2 y p38 MAPK como parte del mecanismo por el cual el 17 $\beta$ -estradiol ejerce su rol protector en las células musculares esqueléticas. Esto condujo a investigar, la posible relación entre la activación de las MAPKs mencionadas y la mitocondria, como principal organela implicada en los fenómenos apoptóticos.



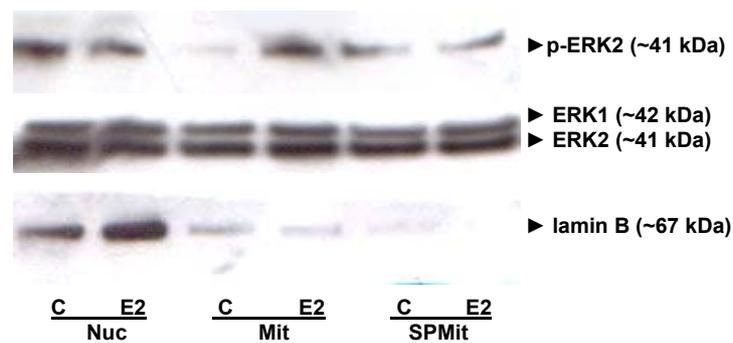
## VI. TRANSLOCACIÓN DE ERK2 A MITOCONDRIAS INDUCIDA POR 17 $\beta$ -ESTRADIOL EN CÉLULAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS

Se ha reportado que ERK1/2 ejerce un rol antiapoptótico interaccionando con Bcl-2 e induciendo su fosforilación en la mitocondria [Tamura *et al.*, 2004]. Además, se ha demostrado en células cardíacas que ERK1/2 forma complejos de señalización en la mitocondria dirigiendo la inactivación de Bad [Baines *et al.*, 2002]. En base a estas evidencias, se estudiaron los cambios de la localización de ERK2 promovidos por el 17 $\beta$ -estradiol. Primeramente, se investigó la ubicación intracelular de ERK2 luego de ser activada por la hormona. Para ello, las células fueron incubadas con el marcador fluorescente rojo *Mitotracker* y posteriormente tratadas con el 17 $\beta$ -estradiol. A continuación se realizaron ensayos de inmunocitoquímica donde se visualizó la forma fosforilada de ERK1/2 con fluorescencia verde. Las imágenes obtenidas por microscopía confocal en la **Figura 33** demuestran que ERK2 es activada por la hormona (como previamente se estudió por *Western Blot*) y de relevancia, la superposición de fluorescencias (*merge*, amarillo) sugiere una localización predominantemente mitocondrial para la forma activa de ERK2.



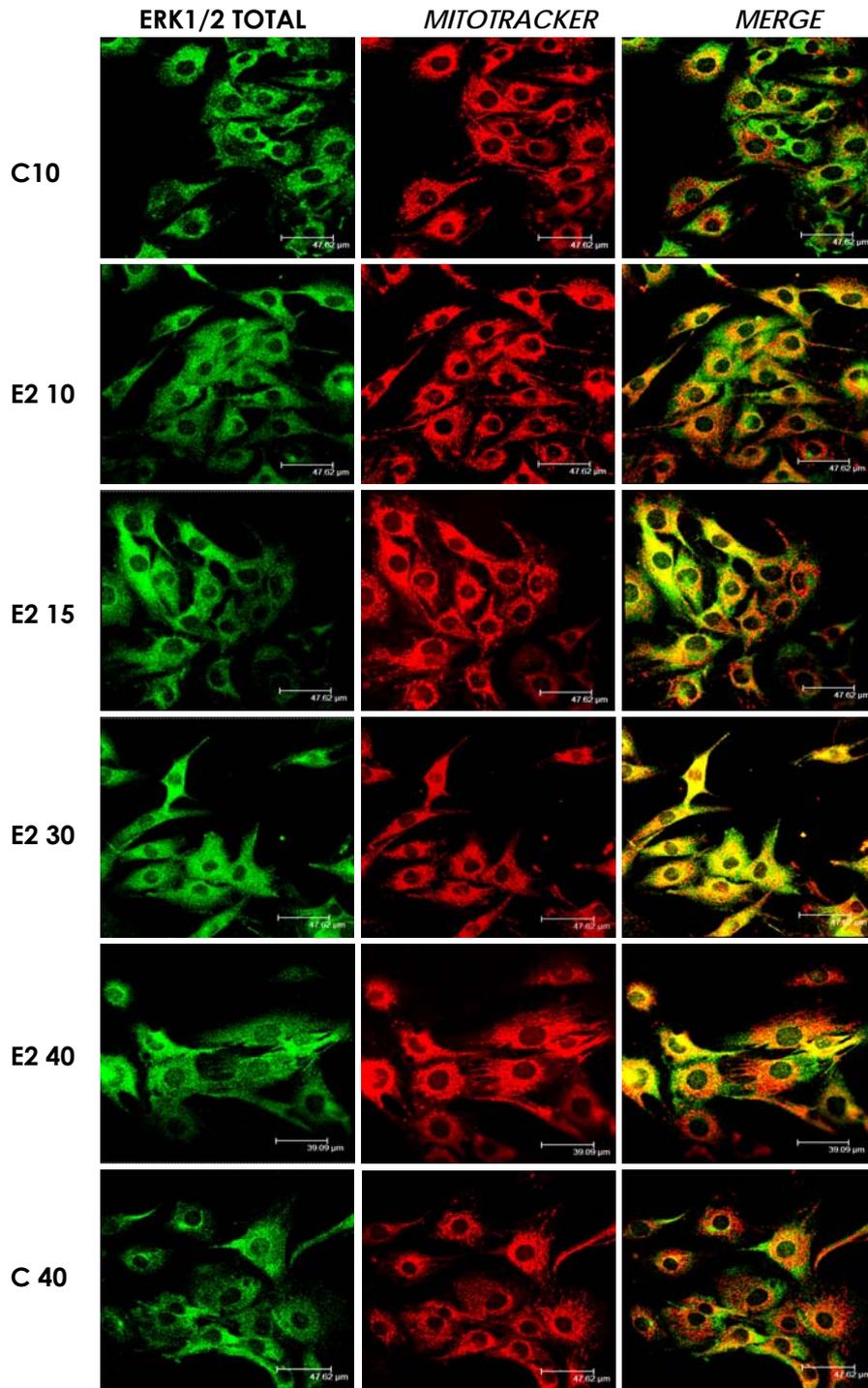
**Figura 33: Localización mitocondrial de fosfo-ERK2 inducida por 17β-estradiol.** Las células C2C12 fueron teñidas con Mitotracker (fluorescencia roja) como se describió en *Metodología*. Posteriormente fueron tratadas con 17β-estradiol  $10^{-8}$ M (E2) o su vehículo (C: isopropanol 0,001%) durante 15 min. A continuación se realizaron ensayos de inmunocitoquímica con un anticuerpo específico contra la forma dualmente fosforilada/activa de ERK1/2 (Thr202/Tyr204) (fluorescencia verde). El *merge* es la superposición exacta de imágenes, donde el color amarillo resulta de la mezcla de las fluorescencias verde y roja. Magnificación 63X.

Con el objetivo de confirmar la localización mitocondrial de ERK2 en su forma activa, se realizó un fraccionamiento subcelular posterior al tratamiento de las células con  $17\beta$ -estradiol. Las fracciones obtenidas fueron analizadas por *Western Blot* usando un anticuerpo específico contra la forma activa de ERK1/2. Los resultados en la **Figura 34** muestran un aumento de fosfo-ERK2 en mitocondria promovido por la hormona. Estos resultados coinciden con los ensayos de inmunocitoquímica demostrando una localización mitocondrial de ERK2 activada por  $17\beta$ -estradiol.



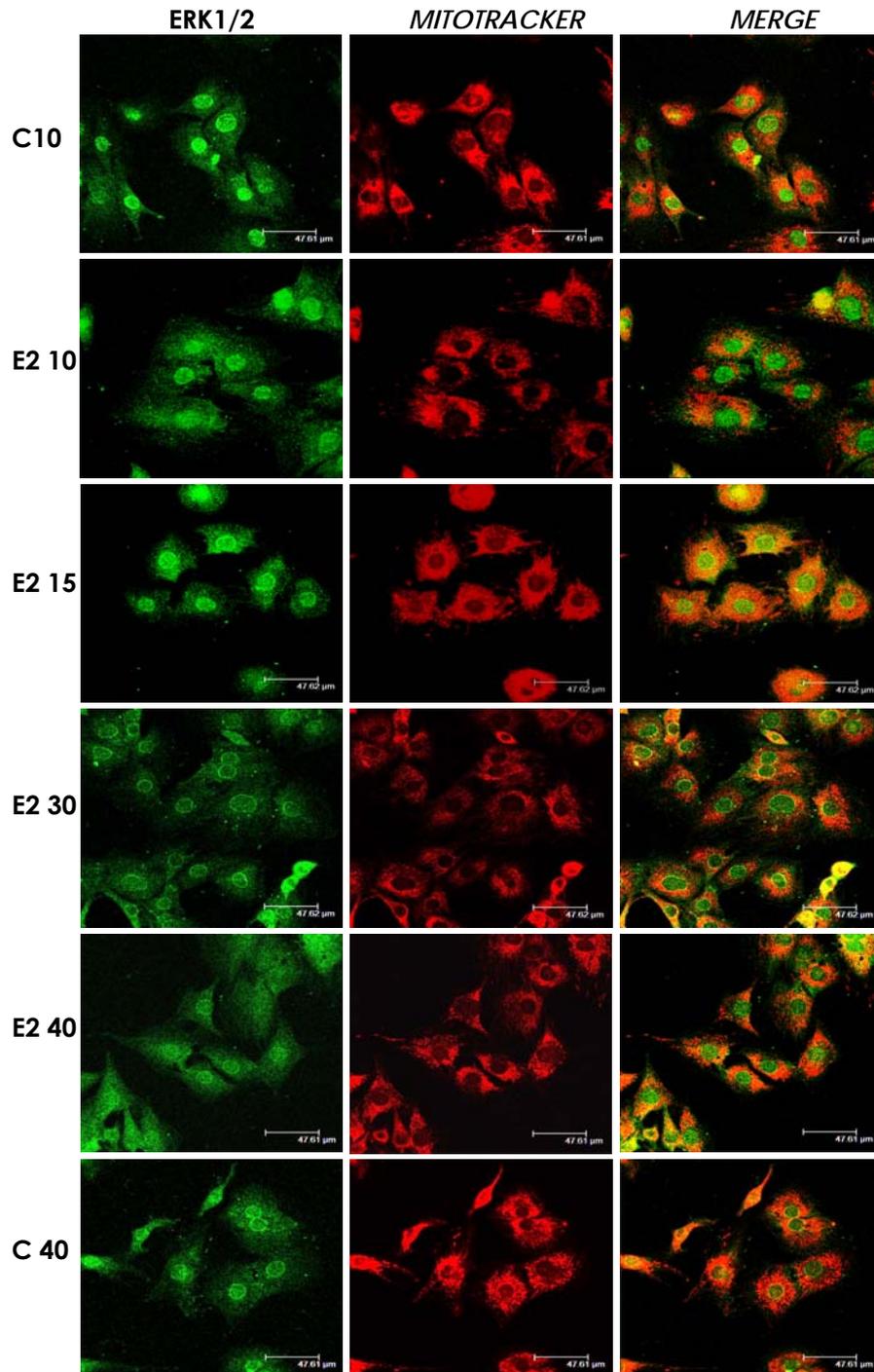
**Figura 34: Localización mitocondrial de ERK2 activa inducida por  $17\beta$ -estradiol.** Las células C2C12 fueron tratadas con  $17\beta$ -estradiol  $10^{-8}$ M (E2), o su vehículo (C: isopropanol 0,001%) durante 15 min. Posteriormente se realizó un fraccionamiento subcelular como se describió en Metodología. Nuc, fracción enriquecida en núcleos; Mit, fracción enriquecida en mitocondrias, SPMit, sobrenadante posmitocondrial. Los ensayos de Western Blot se realizaron usando anticuerpos anti-fosfo-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), anti-ERK1/2 total y anti-lamin B.

Los resultados anteriormente descritos no permiten establecer si el 17 $\beta$ -estradiol promueve la fosforilación de ERK2 en el interior de la mitocondria, o bien, si la hormona induce una movilización de la quinasa activa a dicha organela. Por lo tanto, se estudió la localización de ERK1/2 total (fosforilada y no fosforilada) para evaluar una posible translocación de ERK2 a mitocondria. Para ello, las células fueron expuestas al 17 $\beta$ -estradiol durante varios intervalos de tiempo (10 a 40 minutos). Se realizaron ensayos de inmunocitoquímica usando *Mitotracker* como marcador mitocondrial (fluorescencia roja) y un anticuerpo que reconoce la forma total de ERK1/2. Las imágenes obtenidas por microscopía confocal en la **Figura 35** no evidencian cambios en los niveles de ERK1/2 a ninguno de los tiempos ensayados (fluorescencia verde). Sin embargo, se observan diferencias en el grado de localización mitocondrial de ERK1/2 (*merge*, amarillo). Específicamente, la hormona aumentó la cantidad de ERK1/2 en dicha organela en forma dependiente del tiempo, hasta los 30 minutos. A los 40 minutos, el 17 $\beta$ -estradiol no provocó cambios significativos en la localización de ERK1/2. Estos resultados sugieren una posible translocación de ERK1/2 a mitocondrias.



**Figura 35:** Cambios en el grado de localización mitocondrial de ERK1/2 inducidos por  $17\beta$ -estradiol a distintos tiempos. Las células C2C12 fueron tratadas con  $17\beta$ -estradiol  $10^{-8}$ M (E2) o su vehículo (C: isopropanol 0,001%) a distintos tiempos como se indican en la figura (10 - 40 min). Posteriormente, se realizaron tinciones mitocondriales con *Mitotracker* (fluorescencia roja) y ensayos de inmunocitoquímica, como se describió en Metodología usando anti-ERK1/2 total (fluorescencia verde). El *merge* es la superposición exacta de imágenes, donde el color amarillo resulta de la mezcla de la fluorescencia verde y roja. Magnificación 63X.

La translocación de las MAPKs puede darse por varios mecanismos dependiendo de qué MAP quinasa se trate, uno de estos procesos puede ser a través de la activación y la subsecuente dimerización de la proteína [Pearson *et al.*, 2001]. Por lo tanto, habiendo revelado la presencia de ERK2 activa (fosforilada) en mitocondrias y además, evidenciado una posible migración de ERK1/2 a estas organelas inducida por el 17 $\beta$ -estradiol, se estudió si la fosforilación de dicha quinasa por la hormona es necesaria para su translocación a mitocondrias. Para ello, las células fueron preincubadas con U0126 10  $\mu$ M, inhibidor de la activación de ERK1/2, por 30 minutos y luego tratadas con 17 $\beta$ -estradiol durante los mismos intervalos de tiempo estudiados anteriormente (de 10 a 40 minutos). En forma análoga al ensayo anterior se evaluó la localización de ERK1/2 total. Como se observa en la **Figura 36** (*merge*), en presencia del inhibidor, la hormona no fue capaz de aumentar la ubicación de ERK1/2 en mitocondrias en ninguno de los tiempos estudiados, sugiriendo que la fosforilación es un requisito para que la quinasa transloque a dicha organela.



**Figura 36:** La presencia de U0126 inhibe la translocación de ERK1/2 a mitocondrias inducida por  $17\beta$ -estradiol. Las células C2C12 fueron tratadas con  $17\beta$ -estradiol  $10^{-8}$ M o su vehículo (C: isopropanol 0,001%) en presencia de U0126 10  $\mu$ M, a distintos tiempos como se indican en la figura (10 - 40 min). Posteriormente se realizaron tinciones mitocondriales con *Mitotracker* (fluorescencia roja) y ensayos de inmunocitoquímica como se describió en Metodología usando anti-ERK1/2 total (fluorescencia verde). El *merge* es la superposición exacta de imágenes, donde el color amarillo resulta de la mezcla de la fluorescencia verde y roja. Magnificación 63X.

---

# DISCUSIÓN

Los estrógenos son hormonas esteroideas que ejercen acciones tróficas en el músculo esquelético [Dionne *et al.*, 2000]. Se ha reportado que las patologías degenerativas de este tejido observadas en mujeres menopáusicas, son debidas a la ausencia de estrógenos, los que al ser administrados, promueven el crecimiento y la recuperación del tejido muscular [Warren *et al.*, 1996; Kadi *et al.*, 2002]. El 17 $\beta$ -estradiol es un estrógeno que se une a receptores selectivos localizados en varios órganos y tejidos. Específicamente, ha sido reportada la expresión de receptores estrogénicos (ERs) en el músculo esquelético de rata y humano [Lemoine *et al.*, 2002, Wiik *et al.*, 2005] y, de especial importancia, la presencia de estos receptores ya evidenciada en la línea celular de músculo esquelético murino C2C12 [Kahlert *et al.*, 1997] fue corroborada en nuestro laboratorio, demostrándose la existencia de ER $\alpha$  y ER $\beta$  en estas células [Milanesi *et al.*, 2008; Milanesi *et al.*, *enviado*]. Sin embargo, no se conocen aún los mecanismos moleculares por los cuales la hormona ejerce su función en el tejido muscular. Esto motivó a plantear, en el presente trabajo de tesis, el estudio de las vías de señalización intracelulares involucradas en la acción del 17 $\beta$ -estradiol en células musculares esqueléticas, así también como sus posibles implicancias fisiológicas.

El 17 $\beta$ -estradiol actúa en células diana a través de un mecanismo genómico modulando la expresión génica [Klein-Hitpass *et al.*, 1986] y además, ejerce acciones rápidas no-genómicas regulando diversas vías de transducción de señales [Nemere y Farach-Carson, 1998; Kelly y Levin, 2001], entre las que se encuentran las cascadas de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) [Driggers y Segars, 2002; Hammes y Levin, 2007]. La caracterización de los efectos rápidos del 17 $\beta$ -estradiol en las células C2C12 se abordó evaluando la activación por fosforilación de las MAP quinasas ERK1/2 y p38 MAPK. Las investigaciones realizadas demuestran que la hormona induce, en forma dependiente del tiempo y de la dosis, la fosforilación de ERK2 y p38 MAPK, observándose la mayor estimulación de ambas MAPKs a una concentración fisiológica de 17 $\beta$ -estradiol de 10<sup>-8</sup>M durante 15 minutos de tratamiento. En concordancia con estos resultados, dentro de las acciones rápidas ejercidas por el estrógeno a concentraciones fisiológicas, se ha reportado la activación de ERK1/2 y p38 MAPK en cardiomiocitos [Nuedling *et al.*, 1999] y en células endoteliales aórticas [Geraldts *et al.*, 2002]. Además, en la tesis se demuestra que el 17 $\beta$ -estradiol induce la fosforilación de ERK2 y p38 MAPK en cultivos primarios de músculo esquelético de ratón, evidenciando que la respuesta celular a la hormona no es un efecto propio de la línea celular C2C12. Distintivamente, si bien las células C2C12 muestran por ensayos de *Western Blot* la expresión equivalente de las dos isoformas de ERK (ERK1 y ERK2), los resultados obtenidos evidencian que el estrógeno no es capaz de estimular la fosforilación de ERK1 en los tiempos y dosis ensayados. Observaciones previas demuestran que, aunque ERK1 y ERK2 son proteínas que comparten aproximadamente un 85% de homología [Pearson *et al.*, 2001],

---

según el estímulo, se activan selectivamente mediando distintas respuestas [Lloyd, 2006; Sturgill, 2008]. De interés, se han descrito diferentes roles para ERK1 y ERK2 durante el proceso de diferenciación en las células C2C12 [Li y Johnson, 2006], lo que nos permite sugerir que la activación de ERK2 (y no de ERK1) por el 17 $\beta$ -estradiol podría condicionar a las células a generar una respuesta específica.

Una de las acciones más conocidas que ejercen las MAPKs luego de ser estimuladas, es regular la actividad de una gran cantidad de factores de transcripción, entre los que se encuentran CREB, Elk-1 y AP-1 [Karin *et al.*, 1995; Bébien *et al.*, 2003; Gangnuss *et al.*, 2004; Turjanski *et al.*, 2007]. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que el 17 $\beta$ -estradiol promueve rápidamente la activación de CREB y Elk-1. El uso de los inhibidores de ERK1/2 y p38 MAPK, U0126 y SB203580 respectivamente, involucran la participación de ERK2 y p38 MAPK en este mecanismo. Análogamente, estudios realizados en células de colon han demostrado que la hormona activa rápidamente dichos factores de transcripción vía las MAPKs [Hennessy *et al.*, 2005]. Respecto del factor de transcripción AP-1, éste es un complejo dimérico formado por subunidades de Fos, Jun o ATF-2 que se unen a un sitio común en el ADN para mediar la transcripción de determinados genes. La actividad de este factor puede regularse a través de un aumento en la expresión, estabilidad o fosforilación de sus subunidades, eventos en los que se ha reportado la participación de las vías MAPKs [Karin *et al.*, 1997; Musti *et al.*, 1997; Gangnuss *et al.*, 2004; Eriksson *et al.*, 2007]. En células C2C12 se ha evidenciado que el

---

17 $\beta$ -estradiol induce la oncoproteína c-Fos [Kahlert *et al.*, 1997], sin embargo se desconocen los mecanismos moleculares involucrados en este evento. Esta tesis, aporta evidencias demostrando la participación de ERK2 y p38 MAPK en la modulación positiva de los niveles proteicos de c-Fos y c-Jun, aunque no se determina si esta regulación es a través de un aumento en su expresión y/o estabilidad. En relación a estos resultados, se ha demostrado que el 17 $\beta$ -estradiol estimula conjuntamente la expresión de estas oncoproteínas en distintos tipos celulares [García *et al.*, 2000; Okada *et al.*, 2004]. Además, se han efectuado investigaciones que implican a CREB y Elk-1 en la modulación de c-Fos y c-Jun, debido a que sus oncogenes poseen elementos de respuesta para dichos factores de transcripción [Piechaczyk y Blanchard, 1994; Xing *et al.*, 1998; Zhong *et al.*, 2007; Harrison *et al.*, 2004]. Por ello, visto que el 17 $\beta$ -estradiol regula tanto la fosforilación de CREB y Elk-1 como los niveles proteicos de c-Fos y c-Jun, a través de ERK2 y p38 MAPK, las investigaciones realizadas no aclaran si el 17 $\beta$ -estradiol promueve la activación en paralelo de los factores de transcripción CREB, Elk-1 y AP-1 (c-Fos/c-Jun) en forma dependiente de las MAPKs, o si la hormona induce la activación de CREB y Elk-1 vía las MAPKs, y, estos factores de transcripción son los que en forma directa, regulan la expresión de c-Fos y c-Jun.

Posteriormente se investigaron algunas de las proteínas que podrían estar involucradas *upstream* en la activación de ERK2 y p38 MAPK inducida por

---

el 17 $\beta$ -estradiol. Se ha demostrado que miembros de las familias PKC y Src son componentes claves en la modulación de las cascadas MAPKs en diferentes tejidos [Dos Santos *et al.*, 2002; Armstrong, 2004]. Por ello, resultó de interés evaluar si Src y PKC operan como moduladores en la activación de ERK2 y p38 MAPK promovida por el 17 $\beta$ -estradiol en las células C2C12. El compuesto PP2, un inhibidor selectivo de los miembros de la familia Src, bloqueó por completo tanto la fosforilación de ERK2 basal como la inducida por la hormona, involucrando fuertemente a esta familia de tirosinas quinasas citosólicas en la estimulación de ERK2 dependiente del estrógeno. En forma análoga, p38 MAPK no fue fosforilada por la hormona en presencia de PP2, implicando también a miembros de Src como reguladores positivos en la cascada de activación de p38 MAPK. De importancia, los resultados obtenidos muestran que el 17 $\beta$ -estradiol activa Src, evidenciada por fosforilación en Tyr416. De acuerdo con estas observaciones, se ha demostrado la participación de Src en la activación de ERK1/2 y p38 MAPK en células de músculo liso [Touyz *et al.*, 2001]. Con respecto a PKC, en nuestro laboratorio se ha estudiado detalladamente su rol en la modulación de ERK1/2 en células musculares de ave estimuladas con 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$  [Capiati *et al.*, 2000; Morelli *et al.*, 2001]. En el presente estudio, los ensayos con Ro318220, un inhibidor específico de todos los miembros de la familia PKC, demuestran que esta proteína quinasa es necesaria en la activación de ERK2 y p38 MAPK por la hormona, como se ha reportado en otros tipos celulares [Keshamouni *et al.*, 2002; Boyan y Schwartz, 2004]. Además, el compuesto PMA, un éster de forbol, activó marcadamente ERK1 y ERK2 y en menor magnitud p38 MAPK, lo que corroboró el rol de PKC en la activación de estas vías mitogénicas en las células C2C12. Se requiere

elucidar cuál o cuáles isoforma/s de PKC regulan positivamente las vías MAPKs en las células C2C12. Cabe destacar que, en esta línea celular, se ha demostrado la expresión de PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ , PKC $\delta$ , PKC $\theta$ , PKC $\eta$  y PKC $\zeta$  [Czifra *et al.*, 2006]. Por otro lado, el uso de Ro318220, permitió determinar la participación de miembros de la familia PKC en la fosforilación y activación de Src inducida por el estrógeno. Del mismo modo, en células osteoblásticas fue demostrado el requerimiento de PKC en la estimulación de Src por ATP [Katz *et al.*, 2006]. En concordancia con estos resultados, existen reportes demostrando que PKC es un elemento clave en la regulación de la actividad de la proteína tirosina fosfatasa (PTP) $\alpha$ , la cual estimula directamente a Src mediante desfosforilación de su residuo Tyr527 [Brandt *et al.*, 2003]. Más aún, recientemente en nuestro laboratorio, se ha establecido el rol de dicha fosfatasa en la activación de Src dependiente de PKC en las células C2C12 estimuladas con 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$  [Buitrago y Boland, *enviado*]. Investigaciones adicionales son necesarias para establecer el rol de PTP $\alpha$  en la señalización del 17 $\beta$ -estradiol en dichas células.

Con la finalidad de profundizar sobre el rol de Src y PKC, también se investigó la intervención de estas quinasas en la fosforilación de los factores de transcripción CREB y Elk-1 así como en la inducción de c-Fos y c-Jun por la hormona. Como era de esperar, la activación de CREB y Elk-1 y el aumento de los niveles proteicos de c-Fos y c-Jun promovidos por el estrógeno, resultaron ser también dependientes de Src y PKC. Estos resultados concuerdan con observaciones previas en las que se ha demostrado en neuronas la participación de estas dos proteínas *upstream* a la fosforilación de CREB dependiente de las ERKs [Kawasaki *et al.*, 2004]. El rol de PKC en la activación

---

de Elk-1 también ha sido reportado en diferentes tipos celulares [Brändlin *et al.*, 2002]. Además, se ha evidenciado la implicancia de Src en la regulación de los miembros de AP-1 en células óseas [Granet *et al.*, 2002] y de PKC en el aumento de expresión de los proto-oncogenes *c-fos* y *c-jun* en células hepáticas [Jen-Kun Lin, 2004].

Recientemente, se ha demostrado la participación de los receptores estrogénicos en varias de las acciones rápidas del 17 $\beta$ -estradiol. Específicamente, en células endoteliales, se ha reportado que las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  de los receptores estrogénicos están involucradas en la activación de las vías MAPKs por el 17 $\beta$ -estradiol [Klinge *et al.*, 2005]. Por lo tanto, resultó de interés establecer la contribución de estos receptores en la estimulación de ERK2 y p38 MAPK por la hormona en las células musculares esqueléticas. Los resultados obtenidos utilizando el compuesto ICI182780, un antagonista específico de dichos receptores, sugieren la participación de los receptores estrogénicos en la activación de ERK2 pero no de p38 MAPK por el 17 $\beta$ -estradiol. Esta observación fue confirmada al silenciar la expresión de ER $\alpha$  y abolir por completo la fosforilación de ERK2 pero no la de p38 MAPK inducida por la hormona. En relación a estos resultados, varios reportes demuestran que la activación de la vía ERK1/2 por el 17 $\beta$ -estradiol es mediada por ER $\alpha$  en diferentes tipos celulares [Cheng *et al.*, 2008; Miñano *et al.*, 2008]. En contraste, el bloqueo de la expresión de ER $\beta$  con el siRNA específico no provocó cambios significativos en la fosforilación de ambas MAPKs dependiente del estrógeno, evidenciando que este receptor no está involucrado en los eventos

---

moleculares anteriormente mencionados. Los resultados que muestran al ER $\alpha$  como parte del mecanismo de activación de ERK2 y no de p38 MAPK, sugieren una activación diferencial de ambas MAPKs por el 17 $\beta$ -estradiol. Tentativamente se podría especular que la hormona promueve por un lado la activación de ERK2 vía ER $\alpha$  y por el otro, en menor grado, de otras proteínas receptoras como GPR30 o EGFR [Filardo, 2002], las que conducirían a la fosforilación de p38 MAPK. De esta manera p38 MAPK posteriormente estimularía a los receptores estrogénicos [Lee y Bai, 2002; Driggers y Segars, 2002]. Se requiere evidencia experimental para sustentar esta interpretación.

El 17 $\beta$ -estradiol conjugado a BSA, es un compuesto impermeable a la membrana plasmática que ha sido utilizado para estudiar la acción de la hormona a nivel de la superficie celular. Si bien está reportado que las células C2C12 no expresan ERs en la membrana plasmática [Milanesi *et al.*, 2008], en esta tesis se evaluó la posible participación de otros receptores localizados en la superficie celular que mediarían la activación no genómica de las MAPKs por la hormona. Los resultados obtenidos, coincidentes con las evidencias reportadas por Milanesi *et al.*, sugieren que la estimulación de las MAPKs por el 17 $\beta$ -estradiol no involucra receptores presentes en la membrana plasmática, ya que el 17 $\beta$ -estradiol conjugado a BSA no indujo un aumento significativo en la fosforilación de ERK2 o de p38 MAPK. La activación de ERK2 dependiente de ER $\alpha$  guarda relación con el hecho de que en las células C2C12 el ER $\alpha$  se localiza en citosol, mitocondrias, retículo endoplasmático y corpúsculo de Golgi [Milanesi *et al.*, 2008]. Son necesarios experimentos adicionales para determinar si el ER $\alpha$  interviene además en la regulación de la actividad de

---

PKC, Src, CREB, Elk-1, y en la modulación de los niveles proteicos de c-Fos y c-Jun en respuesta a la hormona.

De los resultados discutidos, surge el interrogante sobre cuál es la función de estos mecanismos de señalización desencadenados por el 17 $\beta$ -estradiol en las células musculares esqueléticas. Se ha demostrado que las cascadas de señalización rápidas, no genómicas, inducidas por el 17 $\beta$ -estradiol regulan diversos procesos tales como diferenciación, proliferación, e incluso la muerte celular [Castoria *et al.*, 1999; Razandi *et al.*, 2000; Manolagas y Kousteni, 2001; Acconcia y Marino, 2003]. Particularmente, las vías MAPKs son claves en la modulación de los procesos anteriormente mencionados [Pearson *et al.*, 2001]. Específicamente, la activación de la vía ERK1/2 ha sido relacionada con la supervivencia celular en respuesta a factores mitogénicos, mientras que la activación de p38 MAPK ha sido asociada con la promoción de la muerte celular programada [Wada y Penninger, 2004]. Por otro lado, en nuestro laboratorio se comprobó que el 17 $\beta$ -estradiol protege a las células musculares esqueléticas de la apoptosis causada por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [Vasconsuelo *et al.*, 2008]. Es por ello que en la tesis se estudió la participación de las vías MAPKs en los efectos antiapoptóticos del 17 $\beta$ -estradiol en células C2C12.

Los resultados presentados en este trabajo, aportan evidencias demostrando la contribución de ERK2 y p38 MAPK en los efectos protectivos de la hormona frente a la apoptosis inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El 17 $\beta$ -estradiol, en presencia de los inhibidores de ERK1/2 y p38 MAPK, U0126 y SB203580 respectivamente, no logró prevenir los cambios celulares característicos que se

---

observan en el proceso de apoptosis en cuanto a desorganización de la actina, cambios en la disposición mitocondrial y condensación nuclear. En concordancia con estos resultados, se ha observado en células neuronales que ERK1/2 y p38 MAPK median los efectos antiapoptóticos de la hormona [Alexaki *et al.*, 2006]. Las investigaciones realizadas también demuestran que el 17 $\beta$ -estradiol a través de la MAPKs previene los cambios morfológicos apoptóticos causados por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en cultivos primarios de músculo esquelético de ratón, indicando nuevamente que la respuesta de la línea C2C12 a la hormona es propia de células musculares nativas. Adicionalmente, Vasconsuelo *et al.*, reportaron en células C2C12 que el 17 $\beta$ -estradiol ejerce sus efectos protectivos a través de la vía PI3K/Akt/Bad [Vasconsuelo *et al.*, 2008]. En base a estas evidencias, se estudió si la activación de las MAPKs por la hormona guardaba relación con este mecanismo. Los resultados obtenidos sugieren la participación de ERK2 y en menor medida la de p38 MAPK en la fosforilación de Akt. De acuerdo con estas observaciones, en células hepáticas se ha comprobado que la activación de Akt es modulada por el estrógeno vía ERK1/2 [Marino *et al.*, 2003]. Por otro lado, el 17 $\beta$ -estradiol indujo la inactivación de Bad por fosforilación en Ser112 involucrando a ERK2 y p38 MAPK. Coincidentemente, en células mamarias se ha reportado que el 17 $\beta$ -estradiol ejerce un rol antiapoptótico a través de la fosforilación de Bad (Ser112) dependiente de ERK1/2 [Fernando y Wimalasena, 2004]. Además, estudios recientes demuestran que el EGF suprime la apoptosis mediante un mecanismo que incluye la fosforilación de Bad dependiente de p38 MAPK [Humphrey *et al.*, 2008].

---

Este trabajo de tesis aporta evidencias que señalan a la mitocondria como una organela moduladora de la acción protectora del 17 $\beta$ -estradiol en las células musculares esqueléticas. Precisamente, la mitocondria es considerada como un punto importante en la regulación de los eventos apoptóticos [Desagher y Martimou, 2000; Lu *et al.*, 2007]. Los resultados obtenidos sugieren que la hormona preserva la integridad de la membrana mitocondrial inhibiendo la liberación de la proteína proapoptótica Smac/DIABLO inducida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y que en este mecanismo participan ERK2 y p38 MAPK. Estas observaciones se apoyan con el hecho de que las mitocondrias de las células C2C12 son *targets* del 17 $\beta$ -estradiol, por expresar receptores estrogénicos [Milanesi *et al.*, 2008]. Análogamente, en células neuronales se ha observado que dichas organelas poseen un rol central en los efectos protectivos del estrógeno [Simpkins *et al.*, 2005]. De relevancia, se observó que la estimulación de las células C2C12 con 17 $\beta$ -estradiol induce rápidamente la translocación de ERK2 activa a mitocondrias. Resultados similares se han reportado para células neuronales [Alonso *et al.*, 2004]. Sustentando la hipótesis de que ERK2 activada por el 17 $\beta$ -estradiol translocaría a dicha organela para ejercer un rol protector, Tamura *et al.*, demuestran una interacción entre ERK1/2 y Bcl-2 en la mitocondria ejerciendo efectos antiapoptóticos [Tamura *et al.*, 2004]. De interés, se ha evidenciado que ERK forma complejos de señalización con PKC en mitocondrias de células cardíacas promoviendo efectos protectivos, en parte, a través de la fosforilación e inactivación de Bad [Baines *et al.*, 2002].

Otro evento establecido perteneciente a la apoptosis es el clivaje de la procaspasa-3, la cual a su vez, actúa sobre sustratos específicos entre los que

---

se encuentra PARP [Decker y Muller, 2002]. De las investigaciones llevadas a cabo en la tesis, emergen resultados sugiriendo que el tratamiento previo de las células musculares con el  $17\beta$ -estradiol, revierte el clivaje de la procaspasa-3 y de PARP inducido por el  $H_2O_2$ , a través de un mecanismo dependiente de la activación de ERK2 y p38 MAPK.

El hecho que en estos estudios se observó una mayor participación de ERK2 que de p38 MAPK mediando los efectos protectivos del  $17\beta$ -estradiol, en conjunto con los resultados inicialmente obtenidos sobre los efectos no-genómicos de la hormona, apoya la hipótesis de que el  $17\beta$ -estradiol promovería una activación diferencial de ambas MAPKs en células musculares esqueléticas. Otra posible explicación se relaciona con el uso del compuesto SB203580 que inhibe específicamente a la p38 $\alpha$  y p38 $\beta$ . Estudios recientes realizados en células cardíacas, revelan una modulación selectiva sobre las isoformas mencionadas de p38, mediando los efectos antiapoptóticos del estrógeno. Específicamente, la acción protectora de la hormona ocurre por activación de PI3K/AKT/p38 $\beta$  y, simultáneamente por modulación negativa de p38 $\alpha$ , que está implicada en la progresión de la apoptosis [Kim *et al.*, 2006; Bassi *et al.*, 2008]. Estudios posteriores a esta tesis, buscarán elucidar el rol de cada isoforma de p38 MAPK en los efectos protectivos del  $17\beta$ -estradiol en las células musculares esqueléticas.

Finalmente, los resultados presentados en este trabajo y los conocimientos acerca de la implicancia del 17 $\beta$ -estradiol en la fisiología del tejido muscular, sugieren que la hormona podría contribuir significativamente en la supervivencia de los mioblastos satélites existentes sobre las fibras del músculo esquelético. Estos eventos ocurrirían a través de un mecanismo que involucra la activación no genómica de ERK2 y p38 MAPK. Es más, se ha reportado que la apoptosis ejerce un control sobre la proporción relativa de mioblastos y miotubos en dicho tejido [Sandri y Carraro, 1999; Marzetti y Leeuwenburg, 2006]. Elucidar los mecanismos moleculares involucrados en la acción protectora del 17 $\beta$ -estradiol, podría ser de relevancia en el desarrollo de terapias para la prevención y tratamiento de la sarcopenia asociada a una desregulación de los niveles de estrógenos, como en el caso de la menopausia.

---

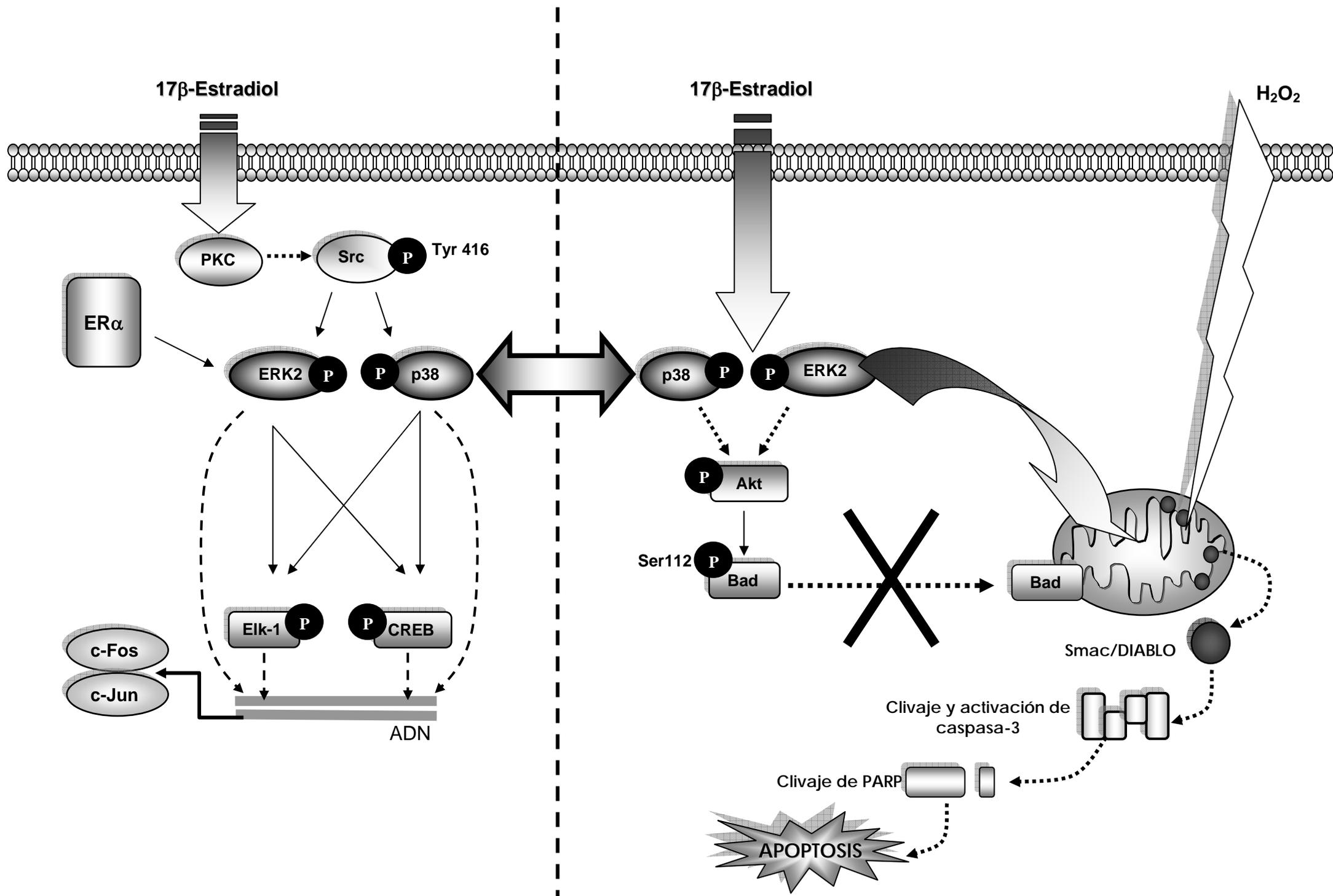
# CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este trabajo de tesis, contribuyen a caracterizar el rol de miembros de la familia MAPKs en la traducción de la señal del 17 $\beta$ -estradiol en células musculares esqueléticas. Asimismo aportan información adicional sobre el mecanismo por el cual la hormona ejerce su rol antiapoptótico en dichas células.

Específicamente, los datos obtenidos en la línea celular de músculo esquelético de ratón C2C12 permiten concluir:

- ✓ La estimulación de las células con el 17 $\beta$ -estradiol incrementa la fosforilación de ERK2 y p38 MAPK en forma dependiente de la dosis y del tiempo de tratamiento.
  - ✓ La hormona induce la fosforilación de los factores de transcripción CREB y Elk-1 a través de ERK2 y p38 MAPK.
  - ✓ ERK2 y p38 MAPK median los niveles proteicos de c-Fos y c-Jun inducidos por el 17 $\beta$ -estradiol.
  - ✓ Las quinasas PKC y Src participan *upstream* a la activación de ERK2 y p38 MAPK por el estrógeno y también contribuyen en la fosforilación de CREB y Elk-1, y en la modulación de c-Fos y c-Jun en respuesta a la hormona.
  - ✓ El 17 $\beta$ -estradiol regula la activación de Src, con la participación de PKC en este evento.
-

- ✓ La hormona estimula ERK2 en forma dependiente de ER $\alpha$ . En cambio, la fosforilación de p38 MAPK es un mecanismo independiente de receptores estrogénicos.
  
- ✓ La activación de ERK2 y p38 MAPK promovida por el 17 $\beta$ -estradiol no involucra receptores localizados en la membrana plasmática.
  
- ✓ ERK2 y p38 MAPK son parte del mecanismo por el cual la hormona ejerce su efecto antiapoptótico en células musculares expuestas al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
  
- ✓ Se sugiere que el 17 $\beta$ -estradiol induce la translocación de ERK2 activada principalmente a la mitocondria.



---

# REFERENCIAS

- Acconcia F, Marino M. Synergism between genomic and non genomic estrogen action mechanisms. *IUBMB Life*; 55:145-150, 2003.
- Acehan D, Jiang X, Morgan D, Heuser J, Wang X, Akey C. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell*; 9:423-432, 2002.
- Alexaki VI, Charalampopoulos I, Kampa M, Nifli AP, Hatzoglou A, Gravanis A, Castanas E. Activation of membrane estrogen receptors induce pro-survival kinases. *J Steroid Biochem Mol Biol*; 98:07-110, 2006.
- Allen E, Doisy E. An ovarian hormone. Preliminary report on its localization, extraction and partial purification, and action in test animals. *JAMA*; 250:2681-2683, 1923.
- Alonso M, Melani M, Converso D, Jaitovich A, Paz C, Carreras MC, Medina JH, Poderoso JJ. Mitochondrial extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2) are modulated during brain development. *J Neurochem*, 89:248-256, 2004.
- Armstrong S. Protein kinase activation and myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res*; 61:427-36, 2004.
- Aschheim S. Weitere Untersuchungen ueber Hormone und Schwangerschaft. Das Vorkommen der Hormone im Harn der Schwangeren. *Archive für Gynaekologie*; 132: 179-183, 1927.
- Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumor-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer*; 2:420-430, 2002.
- Bachmann G. Menopausal vasomotor symptoms: a review of causes, effects and evidence-based treatment options. *J Reprod Med*; 50:155-165, 2005.
- Baines C, Zhang J, Wang G, Zheng Y, Xiu J, Cardwell E, Bolli R, Ping P. Mitochondrial PKCepsilon and MAPK form signaling modules in the murine heart: enhanced mitochondrial PKCepsilon-MAPK interactions and differential MAPK activation in PKCepsilon-induced cardioprotection. *Circ Res*; 90:390-397, 2002.
- Bassi R, Heads R, Marber M, James J. Targeting p38-MAPK in the ischaemic heart: kill or cure? *Curr Opin Pharm*; 8:141-146, 2008.
- Bébién M, Salinas S, Becamel C, Richard V, Linares L, Hipskind RA. Immediate-early gene induction by the stresses anisomycin and arsenite in human osteosarcoma cells involves MAPK cascade signaling to Elk-1, CREB and SRF. *Oncogene*; 22:1836-1847, 2003.

- 
- Blau H, Chiu C, Webster C. Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons. *Cell*; 32:1171-80, 1983.
- Boyan B, Schwartz Z. Rapid vitamin D-dependent PKC signaling shares features with estrogen-dependent PKC signaling in cartilage and bone. *Steroids*; 69: 591-7, 2004.
- Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*; 72:248-54, 1976.
- Brändlin I, Hübner S, Eiseler T, Martinez-Moya M, Horschinek A, Hausser A, Link G, Rupp S, Storz P, Pfizenmaier K, Johannes F. Protein kinase C (PKC)eta-mediated PKC mu activation modulates ERK and JNK signal pathways, *J Biol Chem*; 277: 6490-6, 2002.
- Brandt D, Goerke A, Heuer M, Gimona M, Leitges M, Kremmer E, Lammers R, Haller H, Mischak H. Protein kinase C delta induces Src kinase activity via activation of the protein tyrosine phosphatase PTP alpha; *J Biol Chem*. 278:34073-34078, 2003.
- Brown M, Cooper JA. Regulation, substrates and functions of src. *Biochim Biophys Acta*; 1287:121-149, 1996.
- Buchwalter G, Gross C, Wasyluk B. Ets ternary complex transcription factors. *Gene*; 324:1-14, 2005.
- Buitrago C, Boland R. Role of PTP $\alpha$  in the activation of ERK1/2 and p38 MAPK in mammalian skeletal muscle cells by 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$  vitamin D $_3$ . *Enviado*.
- Burke B. Lamins and apoptosis: a two-way street? *J Cell Biol*; 153:5-7, 2001.
- Butenandt A. 'Progynon', a crystalline female sex hormone. *Naturwissenschaften*; 17:879, 1929.
- Capiati D, Vazquez G, Tellez Iñón MT, Boland R. Role of protein kinase C in 1,25(OH) $_2$ -vitamin D $_3$  modulation of intracellular calcium during development of skeletal muscle cells in culture. *J Cell Biochem*; 77:200-212, 2000.
- Castoria G, Barone M, Di Domenico M, Bilancio A, Ametrano D, Migliaccio A, Auricchio F. Non-transcriptional action of oestradiol and progestin triggers DNA synthesis. *EMBO J*; 18(9):2500-2510, 1999.
- Chambliss K, Yuhanna I, Anderson R, Mendelsohn ME, Shaul P. ERbeta has ongenomic action in caveolae. *Mol Endocrinol*; 16: 938-46, 2002.
-

- Cheng B, Song J, Zou Y, Wang Q, Lei Y, Zhu C, Hu C. Responses of vascular smooth muscle cells to estrogen are dependent on balance between ERK and p38 MAPK pathway activities. *Int J Cardiol*, en prensa, 2008.
- Choi K, Kang S, Tai C, Auersperg N, Leung P. Estradiol up-regulates antiapoptotic Bcl-2 messenger ribonucleic acid and protein in tumorigenic ovarian surface epithelium cells. *Endocrinology*; 142:2351-2360, 2001.
- Cholerton B, Gleason C, Baker L, Asthana S. Estrogen and Alzheimer's disease: the story so far. *Drugs Aging*; 19:405-427, 2002.
- Clarke P. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl)*; 181:195-213, 1990.
- Cooper R, Tajbakhsh S, Mouly V, Cossu G, Buckingham M, Butler-Browne G. In vivo satellite cell activation via Myf5 and MyoD in regenerating mouse skeletal muscle. *J Cell Sci*; 112:2895-2901, 1999.
- Czifra G, Tóth I, Marincsák R, Juhász I, Kovács I, Acs P, Kovács L, Blumberg PM, Bíró T. Insulin-like growth factor-I-coupled mitogenic signaling in primary cultured human skeletal muscle cells and in C2C12 myoblasts. A central role of protein kinase C $\delta$ . *Cell Signal*; 18:1461-1472, 2006.
- Dahlberg E. Characterization of the cytosolic estrogen receptor in rat skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta*; 717:65-75, 1982.
- Decker P, Muller S. Modulating poly (ADP-ribose) polymerase activity: potential for the prevention and therapy of pathogenic situations involving DNA damage and oxidative stress. *Curr Pharm Biotechnol*; 3:275-283, 2002.
- Desagher S, Martinou J. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol*; 10:369-77, 2000.
- DeSilva D, Jones E, Favata M, Jaffee B, Magolda R, Trzaskos J, Scherle P. Inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase blocks T cell proliferation but does not induce or prevent anergy. *J Immunol*; 160:4175-4181, 1998.
- Dionne I, Kinaman K, Poehlman E. Sarcopenia and muscle function during menopause and hormone-replacement therapy. *J Nutr Health Aging*; 4: 156-161, 2000.
- Doisy E, Veler C, Thayer S. The preparation of the crystalline ovarian hormone from the urine of pregnant women. *Journal of Biological Chemistry*; 86:499-509, 1930.

- Dos Santos EG, Dieudonne MN, Pecquery R, Le Moal V, Giudicelli Y, Lacasa D. Rapid nongenomic E2 effects on p42/p44 MAPK, activator protein-1, and cAMP response element binding protein in rat white adipocytes. *Endocrinology*; 143:930-940, 2002.
- Downward J. PI-3kinase, Akt and cell survival. *Semin Cell Dev Biol*; 15: 177-182, 2004
- Driggers P, Segars J. Estrogen action and cytoplasmic signaling pathways. Part II: the role of growth factors and phosphorylation in estrogen signaling. *Trends Endocrinol Metab*; 13:422-427, 2002.
- Du X, Gao Z, Lau C, Chiu S, Tse H, Baumgarten C and Li G. Differential Effects of Tyrosine Kinase Inhibitors on Volume-sensitive Chloride Current in Human Atrial Myocytes. Evidence for Dual Regulation by Src and EGFR Kinases. *JGP*, Volume 123, Number 4, 427-439, 2004.
- Duax W, Swenson D, Strong P, Korach K, McLachlan J, Metzler M. Molecular structures of metabolites and analogues of diethylstilbestrol and their relationship to receptor binding and biological activity. *Mol Pharmacol*; 26:520-525, 1984.
- Dubey R, Jackson E. Estrogen-induced cardiorenal protection: potential cellular, biochemical, and molecular mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol*; 280:365-388, 2001.
- Dykens J, Moos W, Howell N. Development of 17alpha-estradiol as a neuroprotective therapeutic agent: rationale and results from a phase I clinical study. *Ann N Y Acad Sci*; 1052:116-135, 2005.
- Eriksson M, Taskinen M, Leppä S. Mitogen activated protein kinase-dependent activation of c-Jun and c-Fos is required for neuronal differentiation but not for growth and stress response in PC12 cells. *J Cell Physiol*; 210:538-48, 2007.
- Ernster L, Schatz G. Mitochondria: a historical review. *J Cell Biol*; 91:227-255, 1981.
- Falkenstein E, Tillmann H, Christ M, Feuring M, Wehling M. Multiple actions of steroid hormones - a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev*; 52:513-556, 2000.
- Fang X, Yu S, Eder A, Mao M, Bast R, Boyd D, Mills G. Regulation of Bad phosphorylation at serine 112 by the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway. *Oncology* 18:6635-6640, 1999.
- Favata M, Horiuchi K, Manos EJ, Daulerio A, Stradley D, Feeser W, Van Dyk D, Pitts W, Earl R, Hobbs F, Copeland R, Magolda R, Scherle P, Trzaskos J. Identification of a

- novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem*; 273:18623-18632, 1998.
- Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *J Biol Chem*; 269:30761-4, 1994.
- Fernando R, Wimalasena J. Estradiol abrogates apoptosis in breast cancer cell through inactivation of Bad: ras-dependent non-genomic pathways requiring signaling through ERK and Akt. *Mol Biol Cell*; 7:3266-3284, 2004.
- Filardo E. Epidermal growth factor receptor (EGFR) transactivation by estrogen via the G-protein-coupled receptor, GPR30: a novel signaling pathway with potential significance for breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*; 80:231-238, 2002.
- Filardo EJ, Thomas P. GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release. *Trends Endocrinol Metab*; 16:362-367, 2005.
- Florian M, Magder S. Estrogen decreases TNF-alpha and oxidized LDL induced apoptosis in endothelial cells. *Steroids*; 73:47-58, 2008.
- Gambacciani M, Vacca F. Postmenopausal osteoporosis and hormone replacement therapy. *Minerva Med*; 95:507-520, 2004.
- Gangnuss S, Cowin AJ, Daehn I, Hatzirodos N, Rothnagel J, Varelias A, Rayner T. Regulation of MAPK activation, AP-1 transcription factor expression and keratinocyte differentiation in wounded fetal skin. *J Invest Dermatol*; 122:791-804, 2004.
- Garcia E, Lacasa D, Giudicelli Y. Estradiol stimulation of c-fos and c-jun expressions and activator protein-1 deoxyribonucleic acid binding activity in rat white adipocyte. *Endocrinology*; 141:2837-2846, 2000.
- Geraldes P, Sirois M, Bernatchez P, Tanguay J. Estrogen regulation of endothelial and smooth muscle cell migration and proliferation: role of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 22:1585-1590, 2002.
- Glenmark B, Nilsson M, Gao H, Gustafsson J, Dahlman-Wright K, Westerblad H. Difference in skeletal muscle function in males vs. females: role of estrogen receptor-beta. *Am J Physiol Endocrinol Metab*; 287:1125-1131, 2004.
- Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci*; 32:37-43, 2007.

- Gonzalez F, Seth A, Raden D, Bowman D, Fay F, Davis R. Serum-induced translocation of mitogen-activated protein kinase to the cell surface ruffling membrane and the nucleus. *J Cell Biol*; 122:1089-1101, 1993.
- Granet C, Vico A, Alexandre C, Lafage-Proust M. MAP and src kinases control the induction of AP-1 members in response to changes in mechanical environment in osteoblastic cells. *Cell Signal*; 14:679-688, 2002.
- Gruber H, Puzanov I, Bennett M, Kumar V, Gordon B. Alterations in osteoclast morphology following long-term 17beta-estradiol administration in the mouse. *BMC Cell Biol*; 2:3, 2001.
- Gruenbaum Y, Wilson K, Harel A, Goldberg M, Cohen M. Review: nuclear lamins-- structural proteins with fundamental functions. *J Struct Biol*; 129:313-323, 2000.
- Hall J, McDonnell D. The estrogen receptor  $\beta$ -isoform (ER $\beta$ ) of the human estrogen receptor modulates ER $\alpha$  transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinol*; 140:5566-5578, 1999.
- Hammes S, Levin E. Extranuclear steroid receptors: nature and actions. *Endocr Rev*; 28:726-41, 2007.
- Hanke J, Gardner J, Dow R, Changelian P, Brissette W, Weringer E, Pollok B, Connelly P. Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J Biol Chem*; 271:695-701, 1996.
- Harrison J, Sugden P, Clerk A. Endothelin-1 promotes phosphorylation of CREB transcription factor in primary cultures of neonatal rat cardiac myocytes: implications for the regulation of c-jun expression. *Biochim Biophys Acta*; 1644:17-25, 2004.
- Hennessy B, Harvey B, Healy V. 17beta-Estradiol rapidly stimulates c-fos expression via the MAPK pathway in T84 cells. *Mol Cell Endocrinol*; 229:39-47, 2005.
- Henry J, Rupert K, Dodd J, Turchi I, Wadsworth S, Cavender D, Schafer P, Siekierka J. Potent inhibitors of the MAP kinase p38. *Bioorg Med Chem Lett*; 8:3335-3340, 1998.
- Humphrey R, Sonnenberg-Hirche C, Smith S, Hu C, Barton A, Sadovsky Y, Nelson D. Epidermal growth factor abrogates hypoxia-induced apoptosis in cultured human trophoblasts through phosphorylation of BAD Serine 112. *Endocrinology*; 149:2131-2137, 2008.

- Idriss H, Naismith J. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech*; 50:184-195, 2000.
- Iwamoto T; Mamiya N, Masushige S, Kida Satoshi. PLCy2 Activates CREB-dependent Transcription in PC12 Cells through phosphorylation of CREB at Serine 133. *Cytotechnology*, 1-3: 107-116(10), 2005.
- Jacobson M, Weill M, Raff M. Programmed cell death in animal development. *Cell*; 88: 347-354, 1997.
- Jen-Kun Lin. Suppression of Protein Kinase C and Nuclear Oncogene Expression as Possible Action Mechanisms of Cancer Chemoprevention by Curcumin. *Arch Pharm Res*; 27: 683-692, 2004.
- Jensen E, Jacobson H. Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Recent Prog Horm Res*; 18:387-414, 1962.
- Jiang B, Xiao W, Shi Y, Liu M, Xiao X. Role of Smac/DIABLO in hydrogen peroxide-induced apoptosis in C2C12 myogenic cells. *Free Radic Biol Med*; 39:658-667, 2005.
- Joffe H, Soares C, Cohen L. Assessment and treatment of hot flushes and menopausal mood disturbance. *Psychiatr Clin North Am*; 26:563-580, 2003.
- Jordan V, Mittal S, Gosden B, Koch R, Lieberman M. Structure-activity relationships of estrogens. *Environ Health Perspect*; 61:97-110, 1985.
- Juul A. The effects of oestrogens on linear bone growth. *Hum Reprod Update*; 7:303-313, 2001.
- Kadi F, Karlsson C, Larsson B, Eriksson J, Larval M, Billig H, Jonsdottir I. The effects of physical activity and estrogen treatment on rat fast and slow skeletal muscles following ovariectomy. *J Muscle Res Cell Motil*; 23:335-339, 2002.
- Kahlert S, Grohé C, Karas R, Löbbert K, Neyses L, Vetter H. Effects of estrogen on skeletal myoblast growth. *Biochem Biophys Res Commun*; 232: 373-8, 1997.
- Kardos A, Casadei B. Hormone replacement therapy and ischaemic heart disease among postmenopausal women. *J Cardiovasc Risk*; 6:105-112, 1999.
- Karin M, Liu Z, Zandi E. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol*; 9:240-246, 1997.
- Karin M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem*; 270:16483-16486, 1995.

- Karni R, Mizrahi S, Reiss-Sklan E, Gazit A, Livnah O, Levitzki A. The pp60c-Src inhibitor PP1 is non-competitive against ATP. *FEBS Lett*; 537:47-52, 2003.
- Katz S, Boland R, Santillán G. Modulation of ERK 1/2 and p38 MAPK signaling pathways by ATP in osteoblasts: involvement of mechanical stress-activated calcium influx, PKC and Src activation.; *Int J Biochem Cell Biol.* ;38: 2082-91, 2006.
- Kaufmann S, Earnshaw W. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res*; 256:42-49, 2000.
- Kawasaki Y, Kohno T, Zhuang Z, Brenner G, Wang H, Van Der Meer C, Befort K, Woolf C, Ji R. Ionotropic and metabotropic receptors, protein kinase A, protein kinase C, and Src contribute to C-fiber-induced ERK activation and cAMP response element-binding protein phosphorylation in dorsal horn neurons, leading to central sensitization. *J Neurosci*; 24: 8310-21, 2004.
- Keller H, Niggli V. The PKC-inhibitor Ro 31-8220 selectively suppresses PMA- and diacylglycerol-induced fluid pinocytosis and actin polymerization in PMNs. *Biochem Biophys Res Commun*; 194:1111-1116, 1993.
- Kelly M, Levin E. Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metab*; 12:152-156, 2001.
- Kerr J, Wyllie A, Currie A. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*; 26:239-257, 1972.
- Keshamouni V, Mattingly R, Reddy K. Mechanism of 17-beta-estradiol-induced Erk1/2 activation in breast cancer cells. A role for ERK1/2 and PKC-delta. *J Biol Chem*; 277:22558-22565, 2002.
- Kim J, Pedram A, Razandi M, Levin E. Estrogen prevents cardiomyocyte apoptosis through inhibition of reactive oxygen species and differential regulation of p38 kinase isoforms. *J Biol Chem*; 10; 281:6760-6767. 2006.
- Klein-Hitpass L, Schorpp M, Wagner U, Ryffel G. An estrogen-responsive element derived from the 5' flanking region of the *Xenopus vitellogenin A2* gene functions in transfected human cells. *Cell*; 46:1053-1061, 1986.
- Klinge C, Blankenship K, Risinger K, Bhatnagar S, Noisin E, Sumanasekera W, Zhao L, Brey D, Keynton R. Resveratrol and estradiol rapidly activate MAPK signaling through estrogen receptors alpha and beta in endothelial cells. *J Biol Chem*; 280:7460-7468, 2005.

- Kölsch H, Rao M. Neuroprotective effects of estradiol-17beta: implications for psychiatric disorders. *Arch Womens Ment Health*; 5:105-110, 2002.
- Korach K. Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptor. *Science*; 266:1524-527, 1994.
- Korenman S. Menopausal endocrinology and management. *Arch Intern*; 142:1131-136, 1982.
- Kortenjann M, Thomae O, Shaw PE. Inhibition of v-raf-dependent c-fos expression and transformation by a kinase-defective mutant of the mitogen-activated protein kinase Erk2. *Mol Cell Biol*; 14:4815-4824, 1994.
- Kroemer G. Mitochondrial control of apoptosis: an overview. *Biochem Soc Symp*; 66:1-15, 1999.
- Kuiper G, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson J. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci*; 93:5925-5930, 1996.
- Kyriakis J, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev*; 81:807-869, 2001.
- Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 227:680-685, 1970.
- Laqueur E, Dingemans E, Kober S. Crystalline 'Menformon'. *Nature*; 126:90, 1930.
- Lawlor M, Feng X, Everding D, Sieger K, Stewart C, Rotwein P. Dual Control of Muscle Cell Survival by Distinct Growth Factor-Regulated Signaling Pathways *Molecular and Cellular Biology*; 20: 3256-3265, 2000.
- Lawson M, Purslow P. Differentiation of myoblasts in serum-free media: effects of modified media are cell line-specific. *Cells Tissues Organs*; 167:130-137, 2000.
- Lazarow A, Cooperstein S. Studies on the mechanism of Janus green B staining of mitochondria. *Exp Cell Res*; 5:56-69, 1953.
- Leder B, LeBlanc K, Schoenfeld D, Eastell R, Finkelstein J. Differential effects of androgens and estrogens on bone turnover in normal men. *J Clin Endocrinol Metab*; 88:204-210, 2003.
- Lee H, Bai W. Regulation of estrogen receptor nuclear export by ligand-induced and p38-mediated receptor phosphorylation. *Mol Cell Biol*; 22:5835-5845, 2002.

- Lemoine S, Granier P, Tiffoche C, Berthon P, Thieulant M, Carré F, Delamarche P. Effect of endurance training on oestrogen receptor alpha expression in different rat skeletal muscle type. *Acta Physiol Scand*; 175: 211-7, 2002.
- Lenormand P, Brondello J, Brunet A, Pouysségur J. Growth factor-induced p42/p44 MAPK nuclear translocation and retention requires both MAPK activation and neosynthesis of nuclear anchoring proteins. *J Cell Biol*; 142:625-633, 1998.
- Levin E. Cellular Functions of the Plasma Membrane Estrogen Receptor. *Trends Endocrinol Metab*; 10:374-377, 1999.
- Levin E. Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol Endocrinol*; 19:1951-1959, 2005.
- Lewis T, Shapiro P, Ahn N. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res*; 74:49-139, 1998.
- Li J, Johnson S. ERK2 is required for efficient terminal differentiation of skeletal myoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*; 345:1425-1433, 2006.
- Liu X, Kim C, Pohl J, Wang X. Purification and characterization of an interleukin-1beta-converting enzyme family protease that activates cysteine protease P32 (CPP32). *J Biol Chem*; 271:13371-13376, 1996.
- Livingstone C, Patel G, Jones N. ATF-2 contains a phosphorylation-dependent transcriptional activation domain. *EMBO J*; 14:1785-1797, 1995.
- Lizcano J, Morrice N, Cohen P. Regulation of Bad by cAMP-dependent protein kinase is mediated via phosphorylation of a novel site, Ser155. *Biochem J*; 349: 547-557, 2000.
- Lloyd A. Distinct functions for ERKs? *J Biol*; 5:13, 2006.
- Lockshin R, Williams C. Programmed cell death. II. Endocrine pontetation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkmths. *J Insect Physiol*; 10:643, 1964.
- Loewe S, Lange F. Der Gehalt des Frauenharnes an brunsterzeugenden Stoffen in Abhaengigkeit vom ovariellen Zyklus. *Klinische Wochenschrift*; 5:1038-1039, 1926.
- Lu A, Frink M, Choudhry M, Hubbard W, Rue L, Bland K, Chaudry I. Mitochondria play an important role in 17 $\beta$ -estradiol attenuation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced rat endothelial cell apoptosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*; 292:585-593, 2007.

- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*; 94:481-490, 1998.
- MacCorquodale D, Thayer S, Doisy E. Isolation of the principle oestrogenic substance of liquor folliculi. *J Biol Chem*; 115: 435-448, 1936.
- Mangelsdorf D, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans R. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*; 83:835-839, 1995.
- Manolagas S, Kousteni S. Perspective: nonreproductive sites of action of reproductive hormones. *Endocrinology*; 142:2200-2204, 2001.
- Marais R, Wynne J, Treisman R. The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. *Cell*; 73:381-393, 1993.
- Marchetti P, Decaudin D, Macho A, Zamzami N, Hirsch T, Susin S, Kroemer G. Redox regulation of apoptosis: impact of thiol oxidation status on mitochondrial function. *Eur J Immunol*; 27:289-296, 1997.
- Marino M, Acconcia F, Trentalance A. Biphasic estradiol-induced AKT phosphorylation is modulated by PTEN via MAP kinase in HepG2 cells. *Mol Biol Cell*; 14:2583-2591, 2003.
- Marino M, Galluzzo P, Ascenzi P. Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Curr Genomics*; 7:497-508, 2006.
- Markoua T, Hadzopoulou-Cladaras M and Lazou A. Phenylephrine induces activation of CREB in adult rat cardiac myocytes through MSK1 and PKA signaling pathways. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 37: 1001-1011, 2004.
- Marriam G. The chemistry of oestrin: III. An improved method of the preparation and the isolation of active crystalline material. *Biochemical Journal*; 24:435-445, 1930.
- Martin S. The hunting of c-Src. *Nature reviews*; 2: 467-476, 2001.
- Marzetti E., Leeuwenburgh C. Skeletal muscle apoptosis, sarcopenia and frailty at old age. *Exp Gerontol*, 41: 1234-1238, 2006.
- McClung J, Davis J, Wilson M, Goldsmith E, Carson J. Estrogen status and skeletal muscle recovery from disuse atrophy. *J Appl Physiol*; 100:2012-2023, 2006.

- McMillan J, Fatehi-Sedeh S, Sylvia V, Bingham V, Zhong M, Boyan B, Schwartz Z. Sex-specific regulation of growth plate chondrocytes by estrogen is via multiple MAP kinase signaling pathways. *Biochim Biophys Acta*; 1763:381-392, 2006.
- Milanesi L, Russo de Boland A, Boland R; Expression and localization of estrogen receptor alpha in the C2C12 murine skeletal muscle cell line. *J Cell Biochem*; 104:1254-73, 2008.
- Milanesi L, Vasconsuelo A, Boland R; Expression and subcellular distribution of native estrogen receptor beta in murine C2C12 cells and skeletal muscle. *Enviado*
- Miñano A, Xifró X, Pérez V, Barneda-Zahonero B, Saura C, Rodríguez-Alvarez J. Estradiol facilitates neurite maintenance by a Src/Ras/ERK signalling pathway. *Mol Cell Neurosci*, 2008. *En prensa*.
- Minden A, Lin A, Smeal T, Dérijard B, Cobb M, Davis R, Karin M. c-Jun N-terminal phosphorylation correlates with activation of the JNK subgroup but not the ERK subgroup of mitogen-activated protein kinases. *Mol Cell Biol*; 14:6683-6688, 1994.
- Moran A, Nelson S, Landisch R, Warren G, Lowe D. Estradiol replacement reverses ovariectomy-induced muscle contractile and myosin dysfunction in mature female mice. *J Appl Physiol*; 102:1387-1393, 2007.
- Morelli S, Buitrago C, Boland R, de Boland A. The stimulation of MAP kinase by 1,25(OH)(2)-vitamin D(3) in skeletal muscle cells is mediated by protein kinase C and calcium. *Mol Cell Endocrinol*; 173:41-52, 2001.
- Morgan J, Partridge T. Muscle satellite cells. *Int J Biochem Cell Biol*; 35:1151-1156, 2003.
- Murphy T, Prountzos C, Kotsonis P, Iannazzo L, Majewski H. Structural determinants of phorbol ester binding in synaptosomes: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Eur J Pharmacol*; 381:77-84, 1999.
- Musti A, Treier M, Bohmann D. Reduced ubiquitin-dependent degradation of c-Jun after phosphorylation by MAP kinases. *Science*; 275:400-402, 1997.
- Nemere I, Farach-Carson M. Membrane receptors for steroid hormones: a case for specific cell surface binding sites for vitamin D metabolites and estrogens. *Biochem Biophys Res Commun*; 248:443-449, 1998.
- Neugarten J, Ghossein C, Silbiger S. Estradiol inhibits mesangial cell-mediated oxidation of low-density lipoprotein. *J Lab Clin Med*; 126:385-391, 1995.

- Niu J, Lawrence D. Nonphosphorylatable tyrosine surrogates. Implications for protein kinase inhibitor design. *J Biol Chem*; 272:1493-1499, 1997.
- Norman A, Litwak. *Hormones*. Academic Press Inc; cap 2:50-59, 1987.
- Nuedling S, Kahlert S, Loebbert K, Meyer R, Vetter H, Grohé C. Differential effects of 17beta-estradiol on mitogen-activated protein kinase pathways in rat cardiomyocytes. *FEBS Lett*; 454: 271-6, 1999.
- Nuñez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene*; 17:3237-3245, 1998.
- Ofir R, Dwarki V, Rashid D, Verma IM. Phosphorylation of the C terminus of Fos protein is required for transcriptional transrepression of the c-fos promoter. *Nature*; 348:80-82, 1990.
- Ogilvie M, Yu X, Nicolas-Metral V, Pulido S, Liu C, Ruegg U, Noguchi C. Erythropoietin stimulates proliferation and interferes with differentiation of myoblasts. *J Biol Chem*; 275:39754-61, 2000.
- Okada A, Ohta Y, Brody S, Iguchi T. Epithelial c-jun and c-fos are temporally and spatially regulated by estradiol during neonatal rat oviduct differentiation. *J Endocrinol*; 182:219-227, 2004.
- Okasha S, Ryu S, Do, McKallip R, Nagarkatti M, Nagarkatti P. Evidence for estradiol-induced apoptosis and dysregulated T cell maturation in the thymus. *Toxicol*; 163:49-62, 2001.
- Oliver F, de la Rubia G, Rolli V, Ruiz-Ruiz M, de Murcia G, Murcia JM. Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant. *J Biol Chem*; 273:33533-3353, 1998.
- Parker PJ, Murray-Rust J. PKC at a glance. *J Cell Sci*; 117:131-132, 2004.
- Paul J. *Cell and Tissue Culture*. 5ta Ed. p46. Churchill Livingstone. New York, 1975.
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev*; 22:153-183, 2001.
- Pedram A, Razandi M, Sainson RC, Kim JK, Hughes CC, Levin ER. A conserved mechanism for steroid receptor translocation to the plasma membrane. *J Biol Chem*; 282:22278-22288, 2007.

- Peeyananjarassri K, Baber R. Effects of low-dose hormone therapy on menopausal symptoms, bone mineral density, endometrium, and the cardiovascular system: a review of randomized clinical trials. *Climacteric*; 8:13-23, 2005.
- Persky A, Green P, Stubley L, Howell C, Zaulyanov L, Brazeau G, Simpkins J. Protective effect of estrogens against oxidative damage to heart and skeletal muscle in vivo and in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med*; 223:59-66, 2000.
- Piechaczyk M, Blanchard JM. c-fos proto-oncogene regulation and function. *Crit Rev Oncol Hematol*; 17:93-131, 1994.
- Pietras RJ, Nemere I, Szego CM. Steroid hormone receptors in target cell membranes. *Endocrine*; 14:417-427, 2001.
- Price MA, Rogers AE, Treisman R. Comparative analysis of the ternary complex factors Elk-1, SAP-1a and SAP-2 (ERP/NET). *EMBO J*; 14:2589-2601, 1995.
- Prossnitz E, Arterburn J, Smith H, Oprea T, Sklar L, Hathaway H. Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. *Annu Rev Physiol*; 70:165-190, 2008.
- Qing L, Harrington, Jackson H, Morin N, Rounds S. Transforming Growth Factor- $\beta$ 1-Induced Endothelial Barrier Dysfunction Involves SMAD2-Dependent p38 Activation and Subsequent RhoA Activation . *J Appl Physiol*; 101:135-184, 2006.
- Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. *Nature*; 356:397-400, 1992.
- Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*; 26:3100-3112, 2007.
- Razandi M, Pedram A, Levin ER. Plasma membrane estrogen receptors signal to antiapoptosis in breast cancer. *Mol Endocrinol*; 14:1434-1447, 2000.
- Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science*; 307:1625-1630, 2005.
- Rochette-Egly C. Nuclear receptors: integration of multiple signalling pathways through phosphorylation. *Cell Signal*; 15:355-366, 2003.
- Sandri M, Carraro U. Apoptosis of skeletal muscles during development and disease. *Int J Biochem Cell Biol*; 31:1373-90, 1999.
- Schroepfer GF Jr. Sterol Biosynthesis. *Annu Rev Biochem*; 42: 555-586, 1982.

- Segars J, Driggers P. Estrogen action and cytoplasmic signaling cascades. Part I: membrane-associated signaling complexes. *Trends Endocrinol Metab*; 13:349-354, 2002.
- Seli E, Guzeloglu-Kayisli O, Kayisli UA, Kizilay G, Arici A. Estrogen increases apoptosis in the arterial wall in a murine atherosclerosis model. *Fertil Steril*; 88:1190-1196, 2007.
- Shimamura A, Ballif BA, Richards SA, Blenis J. Rsk1 mediates a MEK-MAP kinase cell survival signal. *Curr Biol*; 10: 127-135, 2000.
- Shiozaki E, Shi Y. Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology. *Trends Biochem Sci*; 29:486-494, 2004.
- Simpkins JW, Wang J, Wang X, Perez E, Prokai L, Dykens JA. Mitochondria play a central role in estrogen-induced neuroprotection. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*; 4:69-83, 2005.
- Sitnick M, Foley AM, Brown M, Spangenburg EE. Ovariectomy prevents the recovery of atrophied gastrocnemius skeletal muscle mass. *J Appl Physiol*; 100:286-293, 2006.
- Slee E, Harte M, Kluck R, Wolf B, Casiano C, Newmeyer D, Wang H, Reed J, Nicholson D, Alnemri E, Green D, Martin S. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol*; 144:281-292, 1999.
- Snedecor G and Cochran W. *Statistical methods*. The Iowa State University Press, Iowa, 1967.
- Song R, Mahidhara R, Liu F, Ning W, Otterbein L, Choi A. Carbon monoxide inhibits human airway smooth muscle cell proliferation via mitogen-activated protein kinase pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 27:603-10, 2002.
- Stevis P, Deecher D, Suhadolnik L, Mallis L, Frail D. Differential effects of estradiol and estradiol-BSA conjugates. *Endocrinology*; 140:5455-5458, 1999.
- Sturgill T. MAP kinase: it's been longer than fifteen minutes. *Biochem Biophys Res Commun*; 371:1-4, 2008.
- Subbiah M. Estrogen replacement therapy and cardioprotection: mechanisms and controversies. *Braz J Med Biol Res*; 35:271-276, 2002.
- Tamura Y, Simizu S, Osada H. The phosphorylation status and anti-apoptotic activity of Bcl-2 are regulated by ERK and protein phosphatase 2A on the mitochondria. *FEBS Lett*; 569:249-255, 2004.

- Theriot J. Accelerating on a Treadmill: ADF/Cofilin Promotes Rapid Actin Filament Turnover in the Dynamic Cytoskeleton. *J Cell Biol*; 136: 1165–1168, 1997.
- Thomas SM, Brugge JS. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol*; 13:513-609, 1997.
- Thompson EB, Kumar R. DNA binding of nuclear hormone receptors influences their structure and function. *Biochem Biophys Res Commun*; 306:1-4, 2003.
- Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*; 281:1312-1316, 1998.
- Tiidus P. Can oestrogen influence skeletal muscle damage, inflammation, and repair? *Br J Sports Med*; 39:251-3, 2005.
- Toft D, Gorski J. A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 55:1574-1581, 1966.
- Toker A. Signaling through protein kinase C. *Front Biosci*; 3:1134-1147, 1998.
- Toran-Allerand C, Guan X, MacLusky N, Horvath T, Diano S, Singh M, Connolly, E, Nethrapalli I, Tinnikov A. ER-X: a novel, plasma membrane-associated, putative estrogen receptor that is regulated during development and after ischemic brain injury. *J Neurosci*; 22: 8391-8401, 2002.
- Touyz RM, He G, El Mabrouk M, Diep Q, Mardigyan V, Schiffrin EL. Differential activation of extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 and p38 mitogen activated-protein kinase by AT1 receptors in vascular smooth muscle cells from Wistar-Kyoto rats and spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.*; 19:553-559, 2001.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 76:4350-4354, 1979.
- Turjanski A, Vaqué J, Gutkind J. MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene*; 26:3240-3253, 2007.
- Van Voorhis BJ. Genitourinary symptoms in the menopausal transition. *Am J Med*; 118 Suppl; 12:47-53, 2005.
- Vasconsuelo A, Milanesi L, Boland R. 17Beta-estradiol abrogates apoptosis in murine skeletal muscle cells through estrogen receptors: role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Endocrinol*; 196:385-397, 2008.

- Vaux D, Haecker G, Strasser A. An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell*; 76:777-779, 1994.
- Vazquez G, de Boland AR. Involvement of protein kinase C in the modulation of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub>-induced 45Ca<sup>2+</sup> uptake in rat and chick cultured myoblasts. *Biochim Biophys Acta*; 1310:157-162, 1996.
- Vilatoba M, Eckstein C, Bilbao G, Frennete L, Eckhoff DE, Contreras JL. 17 $\beta$ -estradiol differentially activates mitogen-activated protein-kinases and improves survival following reperfusion injury of reduced-size liver in mice. *Transplant Proc*; 37:399-403, 2005.
- Wada T, Penninger J. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene*; 23:2838-2849, 2004.
- Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*; 15:2922-2933, 2001.
- Wang Y, Biswas G, Prabu SK, Avadhani NG. Modulation of mitochondrial metabolic function by phorbol 12-myristate 13-acetate through increased mitochondrial translocation of protein kinase Calpha in C2C12 myocytes. *Biochem Pharmacol*; 72:881-892, 2006.
- Warren GL, Lowe DA, Inman CL, Orr OM, Hogan HA, Bloomfield SA, Armstrong RB. Estradiol effect on anterior crural muscles-tibial bone relationship and susceptibility to injury. *J Appl Physiol*; 80:660-665, 1996.
- Waskiewicz AJ, Flynn A, Proud CG, Cooper JA. Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *EMBO J*; 16:1909-1920, 1997.
- Watson CS, Campbell CH, Gametchu B. Membrane oestrogen receptors on rat pituitary tumour cells: immuno-identification and responses to oestradiol and oenoestrogens. *Exp Physiol*; 84:1013-1022, 1999.
- Weigel NL. Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. *Biochem J*; 319:657-667, 1996.
- Wiik A, Ekman M, Morgan G, Johansson O, Jansson E, Esbjörnsson M. Oestrogen receptor beta is present in both muscle fibres and endothelial cells within human skeletal muscle tissue. *Histochem Cell Biol*; 124: 161-165, 2005.
- Williams GT. Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. *Cell*; 65:1097-1098, 1991.

- Xing S, Furminger TL, Tong Q, Jhiang SM. Signal transduction pathways activated by RET oncoproteins in PC12 pheochromocytoma cells. *J Biol Chem*; 273:4909-4914, 1998.
- Yaffe D, Saxel O. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature*; 270:725-727, 1977.
- Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-xl and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell*; 80: 285-291, 1995.
- Yang S-H, Shore P, Willingham N, Lakey JH, Sharrocks AD. The mechanism of phosphorylation-inducible activation of the ETS-domain transcription factor Elk-1. *EMBO J*; 18:5666-5674, 1999.
- Yoshida N, Yoshida S, Koishi K, Masuda K, Nabeshima Y. Cell heterogeneity upon myogenic differentiation: down-regulation of MyoD and Myf-5 generates 'reserve cells'. *J Cell Sci*; 111:769-79, 1998.
- Yuan J, Yankner B. Apoptosis in the nervous system. *Nature*; 407:802-809, 2000.
- Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell*; 87:619-628, 1996.
- Zhang HM, Li L, Papadopoulou N, Hodgson G, Evans E, Galbraith M, Dear M, Vouglis S, Saxton J, Shaw PE. Mitogen-induced recruitment of ERK and MSK to SRE promoter complexes by ternary complex factor Elk-1. *Nucleic Acids Res*; 36:2594-2607, 2008.
- Zhong S, Fromm J, Johnson DL. TBP is differentially regulated by c-Jun N-terminal kinase1 (JNK1) and JNK2 through Elk-1, controlling c-Jun expression and cell proliferation. *Mol Cell Biol*; 27:54-64, 2007.

---

# **PUBLICACIONES ORIGINADAS**

**Publicaciones originadas a partir de este trabajo de tesis**

\* Buitrago C, **Ronda A. C.**, de Boland A and Boland R. "MAP KINASES p38 AND JNK ARE ACTIVATED BY THE STEROID HORMONE  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  IN THE C2C12 MUSCLE CELL LINE". *Journal of Cellular Biochemistry* 97: 698-708, 2006.

\* **Ana C. Ronda**, Claudia Buitrago, Andrea Colicheo, Ana R. de Boland, Emilio Roldán, Ricardo Boland. ACTIVATION OF MAPKS BY  $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -VITAMIN  $\text{D}_3$  AND  $17\beta$ -ESTRADIOL IN SKELETAL MUSCLE CELLS LEADS TO PHOSPHORYLATION OF ELK-1 AND CREB TRANSCRIPTION FACTORS. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 103: 462-466, 2007.

\* Ricardo Boland, Andrea Vasconsuelo, Lorena Milanesi, **Ana C. Ronda**, Ana R. de Boland. " $17\beta$ -ESTRADIOL SIGNALLING IN SKELETAL MUSCLE CELLS AND ITS RELATIONSHIP TO APOPTOSIS". *Steroids* 73: 859-863, 2008.

\* **Ana C. Ronda**, Claudia Buitrago, Ricardo Boland. " $17\beta$ -ESTRADIOL INDUCES THE EXPRESSION OF c-FOS AND c-JUN ONCOPROTEINS THROUGH PKC/c-Src/MAPK SIGNALING PATHWAYS IN SKELETAL MUSCLE CELLS". Enviado para publicación a la revista *Hormone Metabolic Research*.

\* **Ana C. Ronda**, Andrea Vasconsuelo, Ricardo Boland. " $17\beta$ -ESTRADIOL ABROGATES APOPTOSIS INVOLVING ERK1/2 AND P38 MAPK IN SKELETAL MUSCLE CELLS". Manuscrito en preparación.

\* **Ana C. Ronda**, Andrea Vasconsuelo, Ricardo Boland. "ROLE OF ESTROGEN RECEPTORS ON ACTIVATION OF MAPKs BY  $17\beta$ -ESTRADIOL IN SKELETAL MUSCLE CELLS". Manuscrito en preparación.