

**Centro de Investigación Científica y de Educación  
Superior de Ensenada, Baja California**



---

**Maestría en Ciencias  
en Ciencias de la Vida  
con orientación en Biomedicina y Bionanotecnología**

---

**Análisis de la unión del estradiol a los receptores a estrógenos  
mitocondriales en células MCF-7**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias

Presenta:

**Gonzalo Isai Flores Acosta**

Ensenada, Baja California, México

2021

Tesis defendida por

**Gonzalo Isai Flores Acosta**

y aprobada por el siguiente Comité

---

Dra. Carolina Álvarez Delgado  
Co-Directora de Tesis

---

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro  
Co-Director de Tesis

Miembros del comité

**Dra. Johanna Bernáldez Sarabia**

**Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez**



---

**Dra. Patricia Juárez Camacho**

Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

---

**Dra. Rufina Hernández Martínez**

Directora de Estudios de Posgrado

*Gonzalo Isai Flores Acosta © 2021*

*Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.*

Resumen de la tesis que presenta **Gonzalo Isai Flores Acosta** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biomedicina y Bionanotecnología.

### **Análisis de la unión del estradiol a los receptores a estrógenos mitocondriales en células MCF-7.**

Resumen aprobado por:

---

Dra. Carolina Álvarez Delgado  
Co-Directora de Tesis

---

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro  
Co-Director de Tesis

La mitocondria es uno de los organelos de mayor interés en biomedicina debido a la variedad de procesos bioquímicos que se llevan a cabo en ella, por ejemplo, la respiración celular; el metabolismo de la glucosa y de los aminoácidos; y la síntesis de moléculas como el ATP, y hormonas como los estrógenos y los andrógenos. Diversos estudios han demostrado que los estrógenos, en especial el estradiol (E2), tienen efectos neuroprotectores y cardioprotectores. La mayoría de los efectos de los estrógenos son mediados por los receptores a estrógenos (ERs). Existen 3 tipos de ERs: el receptor a estrógeno alfa ( $ER\alpha$ ), el receptor a estrógeno beta ( $ER\beta$ ) y el receptor a estrógeno acoplado a proteína G (GPER). Tanto el  $ER\alpha$  como el  $ER\beta$ , y sus respectivas isoformas, han sido localizados en diferentes compartimientos celulares: en el núcleo, citosol, membrana celular y mitocondrias. Diversos estudios han sugerido que los efectos benéficos de los estrógenos se dan a nivel mitocondrial. Se han reportado efectos positivos del E2 sobre la función mitocondrial, tales como el aumento en la producción de ATP, disminución en la cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS), así como en la expresión del ADN mitocondrial (mtDNA). Estas evidencias en conjunto, sugieren que los efectos del E2 son mediados por los receptores a estrógenos mitocondriales (mtERs), sin embargo, este mecanismo no ha sido descrito por completo. Dado que la evidencia sugiere que los efectos del E2 sobre la función mitocondrial pudieran ser mediados por los mtERs, este trabajo tiene como objetivo evaluar la unión del E2 a los mtERs. Para esto se corroboró la presencia de los ERs en la mitocondria y se cuantificó el E2 presente en las mitocondrias y el citosol; así como el E2 unido a los mtER $\alpha$  en condiciones basales y de tratamiento con E2 1 y 100 nM. Además, con estos datos, se estableció por primera vez un método para la cuantificación del E2 unido a mtERs. Estos resultados son de gran importancia para el desarrollo de compuestos mitodirigidos que puedan modular la función mitocondrial y aplicarse en el área biomédica.

**Palabras clave:** estradiol, receptores a estrógenos mitocondriales, función mitocondrial.

Abstract of thesis presented by **Gonzalo Isai Flores Acosta** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in Biomedicine and Bionanotechnology.

### **Analysis of E2 binding to mitochondrial estrogen receptors in MCF-7 cells**

Abstract approve by:

---

Ph.D. Carolina Álvarez Delgado  
Thesis Advisor

---

Ph.D Alexei Fedorovich Licea Navarro  
Thesis Advisor

The mitochondria is one of most important targets in biomedicine. This organelle is the site of a variety of biochemical processes such as cellular respiration, glucose and amino acids metabolism, synthesis of ATP, and synthesis of hormones, e.g., estrogens and androgens. Estrogens, mainly estradiol (E2), has been showed to have protective effects on neurovascular and cardiovascular systems. The majority of these estrogenic effects are mediated by estrogen receptors (ERs). There are three types of ERs: estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ), estrogen receptor beta (ER $\beta$ ), and G protein-coupled estrogen receptor (GPER). ER $\alpha$  and ER $\beta$ , as well as their respective isoforms, have been detected in different cell compartments like the nucleus, cytosol, cell membrane, and mitochondria. Several studies have suggested that beneficial estrogenic effects fall upon mitochondria directly. The positive effect of E2 on mitochondrial function, such as increases in ATP production, decrease in the amount of reactive oxygen species (ROS), and induction of mitochondrial DNA expression have been reported. The evidence suggests E2 effects are mediated by mitochondrial ERs (mtERs). The main objective of this thesis is to evaluate the binding of E2 specifically to mtERs. The presence of ERs in mitochondria was corroborated by Western blot; E2 was quantified in the cytosol and mitochondria; and E2 binding to mtER $\alpha$  in basal and treatment conditions. Most importantly, a protocol for quantifying E2-bound to mtERs was established. These results are essential for the development of a mitochondria-targeted treatment that can modulate mitochondrial function with biomedical applications.

**Key words:** estradiol, mitochondrial estrogen receptors, mitochondrial function.

## Dedicatoria

### **A mi familia**

A mis papás, a mi hermana, mi tía Martha, Marcela, Jesús y a Grace por todo su apoyo, por aguantarme en mis momentos de estrés y por animarme cuando sentía que no podía más. A mis tíos Ramón, Melquiades, César y Dolores y a mi abuelo Gonzalo, hasta el cielo esto va por ustedes.

Y por último, pero no menos importante, **a Dios**.  
No nos soltaste ni a mi ni a mi familia durante todo este proceso lleno de tantos altibajos.

## Agradecimientos

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACyT) por la beca de manutención (902991) otorgada para realizar mis estudios de posgrado.

Al **Centro de Investigación Científica y de Educación Superior** (CICESE), al Posgrado en Ciencias de la Vida y al Departamento de Innovación Biomédica por darme la oportunidad de realizar la maestría y ser parte de su equipo.

A mis Co-Directores: la **Dra. Carolina Álvarez** (mi madre académica) por permitirme ser su alumno, por toda su disposición, por cada enseñanza, por la guía y por involucrarme en este bello mundo de las hormonas; al **Dr. Alexei Licea** por su enseñanza, dirección y oportunidades que me brindó durante este tiempo, estoy profundamente agradecido con ambos.

A mis sinodales: a la **Dra. Carmen Paniagua** por su completa disposición, por su ayuda a mejorar en cada avance y por aceptar ser parte de este proyecto; a la **Dra. Johanna Bernáldez** por siempre compartir su conocimiento, por todas las observaciones para mejorar cada vez más y por enseñarme todo sobre cultivo celular.

A todo el equipo de Laboratorio: A **Karla Cervantes**, mi segunda madre académica, por todas las enseñanzas, observaciones y sugerencias que me ayudaron a llegar a este momento; a **Jahaziel** por siempre ayudarme con mis miles de dudas; a **Salvador** por los ánimos aunque vinieran acompañados con sarcasmo; a **Samantha** por tu ayuda con el equipo de HPLC y por siempre apoyarnos con todo el material.

Al Laboratorio Borbolla: al **QFB. Jose Antonio Borbolla Escobosa** y a todo el equipo, por todo el apoyo material que nos brindó; un agradecimiento especial a mis amigos y colegas **Carla Rivas y Carlos Toledo**, por todo el apoyo que me brindaron, por recibirme por las tardes, por sus mensajes que me hicieron carcajearme y me hicieron despejarme del estrés. A **Alejandra Cárdenas**, tú fuiste quien me motivó a comenzar esta maestría, las gracias van desde los tés dados por las tardes hasta los ánimos dados en época de pandemia. Todos ustedes son parte de toda esta etapa, gracias por todo.

A mis papás, **Gonzalo Flores y Guadalupe Acosta**, gran parte de lo que hago es por y para ustedes, sin su motivación y ánimo no estaría donde estoy ahora, nunca podré expresar lo agradecido que estoy con ustedes. A mi "otro extremo", mi hermana **Alejandra Flores**, porque aun cuando nos hacíamos enojar, sin darse cuenta, siempre me sacaba del hoyo de ansiedad en los que me encontraba. A mi tía **Martha** y a mis primos **Marcela y Jesús**, por todas las tardes de café y cena que me reconfortaban después de un día agotador.

A mis amigos: **Dania, Ramiro, César, Abril y Vane**, que pese a la distancia siempre los tengo en el corazón; a Sarah, por todas las anécdotas compartidas y tus ánimos antes de cada junta para presentar resultados, que nuestra amistad siga por siempre; a **Vero, Alison, Diana, Cindy, Itzae, Sadot y Paloma**, mi ELEPE, y a todo mi grandioso grupo de generación: llegamos a la meta amigos...sí, aún con pandemia pero lo logramos!

## Tabla de Contenido

Resumen en español.....	i
Resumen en inglés.....	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Lista de figuras.....	vi
Lista de tablas.....	vii
<b>Capítulo 1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
1.1 Antecedentes .....	3
1.1.1 Estrógenos.....	3
1.1.2 Receptores a Estrógenos.....	6
1.1.3 Efectos de E2 en la mitocondria.....	11
1.1.4 Los mtERs como posibles mediadores de los efectos de E2 en la mitocondria.....	16
1.2 Justificación .....	17
1.3 Hipótesis.....	18
1.4 Objetivos .....	18
1.4.1 Objetivo General .....	18
1.4.2 Objetivos Específicos.....	18
<b>Capítulo 2. Metodología.....</b>	<b>19</b>
2.1 Cultivo celular y tratamientos con E2 .....	19
2.2 Aislamiento de mitocondrias .....	19
2.3 Obtención de proteínas mitocondriales .....	19
2.4 Corroboración de la localización de ER $\alpha$ en mitocondrias.....	20
2.5 Coinmunoprecipitación de mtERs.....	20
2.6 Cuantificación de E2 por ELISA.....	21
<b>Capítulo 3. Resultados .....</b>	<b>22</b>
3.1 Corroboración de la localización de ER $\alpha$ en la mitocondria .....	22
3.2 Cuantificación de E2 en las fracciones subcelulares .....	23
3.3 Cuantificación del E2 unido a mtER $\alpha$ .....	23

<b>Capítulo 4. Discusión .....</b>	<b>26</b>
<b>Capítulo 5. Conclusiones .....</b>	<b>34</b>
5.1 Perspectivas .....	34
<b>Literatura citada .....</b>	<b>35</b>
<b>Anexo .....</b>	<b>43</b>



## Lista de figuras

Figura		Página
1	Estructura de las isoformas de los ERs.....	9
2	Western blot para la corroboración de la localización subcelular del ER $\alpha$ .....	22
3	Cantidad de E2 en las fracciones subcelulares.....	23
4	Western blot para corroborar la inmunoprecipitación del ER $\alpha$ .....	24
5	Cuantificación del E2 unido a los mtER $\alpha$ .....	24
6	Síntesis y metabolismo del E2.....	28
7	Posible alteración en la cuantificación de E2 por cantidades desiguales de proteína mitocondrial proveniente de células control y tratadas.....	32
8	Protocolo para la cuantificación del E2 unido a mtERs.....	43

## Lista de Tablas

Tabla		Página
1	Concentraciones séricas de E2 en las diferentes etapas en hombres y en mujeres.....	1

## Capítulo 1. Introducción

La mitocondria es uno de los organelos con mayor relevancia clínica en el inicio y progresión de enfermedades metabólicas, neurodegenerativas y cardiovasculares. Su estudio en el ámbito clínico comenzó alrededor del año de 1959 cuando se realizó el primer estudio bioquímico de los compartimientos celulares (Luft, 1995). Entre esos mismos años, también se reportó y describió la primera enfermedad de origen mitocondrial (Enfermedad de Luft) en una mujer de 30 años de edad (Luft, 1995). Alrededor de la década de los 60s, se identificó el DNA mitocondrial (mtDNA) y fue hasta 1981 cuando se secuenció. Estos avances permitieron que en 1988 se detectara la primera mutación en el mtDNA, la cual está relacionada con la neuropatía óptica hereditaria de Leber (Simon y Johns, 1999). Estos hallazgos establecieron a la mitocondria como un blanco terapéutico potencial, además de ser un organelo en el que convergen diversos procesos bioquímicos, como el metabolismo de la glucosa, de los aminoácidos, de los ácidos grasos, y de la urea. Así mismo, participa en procesos como la muerte celular programada, la respiración celular y la síntesis de hormonas esteroides (Arnold et al., 2012).

Las hormonas esteroides se sintetizan principalmente en las gónadas y, en menor grado, en la glándula suprarrenal y en el cerebro. Dentro de este grupo de hormonas, el estradiol (E2) es el estrógeno de mayor abundancia y relevancia fisiopatológica en las mujeres (Epstein et al., 2001). En ellas, las concentraciones séricas de E2 varían de acuerdo a la edad y al ciclo menstrual (Tabla No. 1) (González Hernández, 2014).

Tabla 1.- Concentraciones séricas de E2 en las diferentes etapas en hombres y en mujeres.

Concentraciones Séricas de E2									
	Etapa	pM	nM	pg/mL		Etapa	pM	nM	pg/mL
	Mujeres	<i>Prepuberal</i>	18-220	0.018-0.22		<20	Hombres	<i>Prepuberal</i>	<37
<i>Pubertad</i>		18-1505	0.018-1.505	5-410	<i>Pubertad</i>	<165		<0.165	<45
<i>Folicular</i>		147-1285	0.147-1.285	40-350	<i>Adulto</i>	<206		<0.206	<60
<i>Ovulatoria</i>		550-2753	0.55-2.753	200-750					
<i>Luteínica</i>		110-1652	0.11-1.652	60-200					
<i>Postmenopáusica</i>		<75	<0.075	<20					

Tomado de: González Hernández, 2010.

Los niveles más altos de E2 se encuentran durante la fase ovulatoria, alcanzando la concentración sérica de 2753 pM (750 pg/mL). Por su parte, en los hombres, las concentraciones de E2 no varían y su concentración es mucho menor que en las mujeres (206 pM en la etapa adulta). Una de las acciones biológicas más importantes de los estrógenos es la diferenciación sexual; sin embargo, hay reportes de otras acciones. Por ejemplo, a los estrógenos se les atribuye una acción antioxidante, ya que en modelos

*in vivo* de ratas hembras se observa un mejor balance antioxidante con respecto a los individuos machos (Borrás et al., 2003) y a las hembras ovariectomizadas (OVX) (Borrás et al., 2010). También se han reportado efectos positivos del E2 sobre la función cardiovascular, el sistema nervioso central, el sistema inmunológico, el sistema esquelético, el aparato gastrointestinal, el sistema respiratorio, entre otros (Chen et al., 2009).

Se sabe que la mayoría de los efectos de los estrógenos son mediados por los receptores a estrógenos (ERs) (Álvarez-Delgado y Cerbón, 2011), de los cuales existen los receptores a estrógeno alfa (ER $\alpha$ ) y beta (ER $\beta$ ) (Gupte et al., 2015). Éstos han sido localizados en diferentes regiones celulares, tales como el núcleo (Jia et al., 2015), la membrana celular (Li et al., 2014) y las mitocondrias (Chen et al., 2004a). Son de especial interés los ERs mitocondriales (mtERs) debido a que aún no se ha descrito por completo su funcionalidad en dicho organelo. Se sabe que estos receptores se encuentran en las mitocondrias de diferentes células: el mtER $\beta$  se ha reportado en células de ovarios, útero, espermatozoides, neuronas corticales e hipocampales, cardiomiocitos y en células endoteliales (Solakidi et al., 2005); el mtER $\alpha$  ha sido localizado en células de útero, ovarios y en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 (Guillette et al., 2018).

Así mismo, se ha reportado que el E2 tiene efectos benéficos sobre las mitocondrias, desde su morfología (Paumard et al., 2002) hasta en su función como en la producción de ATP (Liao et al., 2019), sobre la expresión del mtDNA (Chen et al., 2004a) o sobre la producción de especies reactivas a oxígeno (ROS) (Borrás et al., 2010).

Debido a esta amplia gama de efectos del E2, ha habido un gran interés por su estudio en el ámbito clínico. Una de las primeras evidencias sobre los efectos protectores del E2 es el de la neuroprotección por estrógenos: se observó que el tratamiento con los estrógenos protegía a la célula de la apoptosis, proceso que involucra a la mitocondria (Simpkins et al., 2008).

Sin embargo, no está claro el mecanismo por el cual dichas hormonas actúan sobre la mitocondria. Uno de los posibles mecanismos de acción podría ser a través de los mtERs.

En el presente estudio se busca demostrar que la unión de E2 a los mtERs incrementa con el tratamiento con E2 exógeno, proponiendo así una correlación entre dicha unión con la función mitocondrial.

## 1.1 Antecedentes

### 1.1.1 Estrógenos

Los estrógenos son un grupo de hormonas esteroideas conformado por estrona, estriol, y estradiol, siendo este último el de mayor concentración sérica y con mayor actividad biológica. Este grupo de hormonas son sintetizadas principalmente por las células de la teca y de las células de la granulosa localizadas en los ovarios (Schiavon Ermani et al., 2016) y en las células de Leydig de los testículos. También hay síntesis en menor grado en las glándulas suprarrenales, glándulas mamarias (De Almeida Chuffa et al., 2013) y en el cerebro (Barker y Galea, 2009).

La síntesis de los estrógenos está regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas. En el hipotálamo, se secreta de manera pulsátil la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la cual actúa en las células gonadotrópicas de la adenohipófisis liberando a la hormona folículoestimulante (FSH) y a la hormona luteinizante (LH) (Junqueira y Carneiro, 2015). La LH actúa en las células de la teca por medio de receptores acoplados a proteína G, activando a la proteína STARD1, la cual transporta al colesterol a la membrana interna mitocondrial, donde se sintetiza la pregnenolona y la androstendiona por medio de la enzima CYP11A1. La androstendiona difunde a las células de la granulosa y se metaboliza a estrona y E2 por acción de la aromatasa ovárica. La FSH estimula la expresión de la aromatasa ovárica por medio de receptores acoplados a proteína G (Schiavon Ermani et al., 2016). En el caso de los hombres, el E2 es producido a partir de la testosterona por medio de la aromatasa presente en las células de Leydig (De Almeida Chuffa et al., 2013).

#### ***1.1.1.1 Efectos fisiológicos del E2***

Se sabe que el E2 es uno de los responsables del desarrollo de los caracteres sexuales femeninos, así como del comportamiento sexual y del desarrollo y mantenimiento de los órganos sexuales tanto masculinos como femeninos (De Almeida Chuffa et al., 2013). También se sabe que el E2 regula al eje hipotálamo-hipófisis-gónadas por retroalimentación positiva y negativa, ya que inhibe la secreción de FSH y estimula la liberación de LH (Schiavon Ermani et al., 2016); disminuye la resorción ósea al antagonizar la acción de la paratirina, estimula la síntesis de triglicéridos, transcortina, transferrina, de la globulina enlazante de hormonas sexuales (SHBG) y regula los niveles de lipoproteínas: aumenta los niveles de HDL-colesterol y disminuye los de LDL-colesterol (González Hernández, 2014).

Específicamente en las mujeres, el E2 tiene efectos sobre la foliculogénesis (Prossnitz et al., 2008) y, junto con la progesterona, tiene efectos sobre los cilios y en la actividad de la barrera muscular durante el transporte del oocito (De Almeida Chuffa et al., 2013). Por su parte, en los hombres, el E2 se encuentra en altas concentraciones en los testículos, fluidos seminales y en el semen (Hess, 2000). El E2 puede regular el crecimiento de la próstata mediante mecanismos indirectos, mediante la alteración del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, o por mecanismos directos, por medio de la aromatización local de la testosterona hacia E2 (Härkönen y Mäkelä, 2004).

#### ***1.1.1.2 Efectos del E2 en un contexto patológico***

Se ha demostrado que los estrógenos, principalmente el E2, tienen efectos protectores en diversas patologías como las cardiovasculares, neurodegenerativas y metabólicas. Las enfermedades cardiovasculares están asociadas a la disfunción mitocondrial (Ballinger, 2005). Se ha sugerido que estos padecimientos presentan una correlación con los niveles de estrógenos, ya que después de la menopausia se incrementa el riesgo de padecimientos cardiometabólicos (Gourdy et al., 2018). Se ha observado que, en modelos de ratas OVX, hay un incremento en el daño vascular y que en extractos de tejido de corazón de ratas OVX hay un incremento significativo de los marcadores apoptóticos. En este modelo, el tratamiento con E2 redujo tanto el daño vascular como los marcadores apoptóticos (Liou et al., 2010). También se ha sugerido que los efectos cardioprotectores de los estrógenos se deben a que los ERs regulan la producción de antioxidantes. Se tienen reportes de que, en células endoteliales aórticas humanas, el E2 incrementa la producción de la manganeso superóxido dismutasa (MnSOD) por un mecanismo dependiente del ER $\alpha$  (Liu et al., 2014).

Se han reportado diferencias en la expresión de genes entre ratas machos y hembras (Vijay et al., 2015). En las ratas hembras se ha reportado una mayor transcripción de los complejos mitocondriales I y V y de genes asociados con el metabolismo de glucosa y ácidos grasos; mientras que en los machos se ha reportado una mayor expresión en los genes asociados con la vía apoptótica mitocondrial (Vijay et al., 2015). Sin embargo, no está claro cómo pueden estar directamente relacionados los niveles estrógenos con esta diferencia entre hembras y machos.

Así mismo se ha reportado que los estrógenos tienen efectos positivos a nivel mitocondrial (Arnold et al., 2012) en desórdenes neurodegenerativos como el Alzheimer y el Parkinson, enfermedades que se

caracterizan por un deterioro en la función y muerte de neuronas (Johri y Beal, 2012). Se sabe que los pacientes con Alzheimer presentan atrofia en la corteza e hipocampo cerebral, una disminución en el metabolismo de la glucosa y una disminución en la actividad de los complejos mitocondriales I, III y IV, así como un incremento en el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial, producto de las placas  $\beta$ -amiloides y de la proteína Tau (Johri y Beal, 2012; Trimmer et al., 2000). Por otro lado, se sabe que los pacientes con Parkinson presentan una muerte de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra y una disminución en la actividad de los complejos mitocondriales ligada a una disminución en la fosforilación oxidativa (Parker Jr et al., 2009). En neuronas de espina dorsal de ratones tratados con estrógenos, se observó un incremento en los niveles de mRNA de genes de la cadena transportadora de electrones codificados en el núcleo: ND1, CytB, Cox2 y ATP6 (Johann et al., 2010). También se ha reportado que, en mitocondrias de células endoteliales de cerebro, el tratamiento con estrógenos incrementa la expresión de citocromo c y disminuye la producción de ROS (Razmara et al., 2008). Así mismo, se demostró el efecto protector del E2 en células de endotelio cerebral (bEnd.3) después de tratarlas con dicha hormona a 10 nM y someterlas a isquemia, demostrando una mayor resistencia a las condiciones isquémicas en comparación con las células que no fueron tratadas con E2 (Guo et al., 2010).

#### **1.1.1.3 Mecanismo de acción del E2**

Se han descrito dos tipos de mecanismos de acción del E2: uno de ellos es conocido como “mecanismo de acción genómico”, en la que el E2 modula la transcripción de genes blanco. Este mecanismo de acción se caracteriza por suceder en tiempos prologandos (horas o días) y por una serie de eventos consecutivos: inicialmente, los ERs se encuentran inactivados por la unión de proteínas inhibitorias, como la HSP90 (Dhamad et al., 2016); cuando se unen a su ligando, como el E2, estos receptores se activan, luego dimerizan y translocan al núcleo, donde se unen a secuencias específicas del DNA y se unen a factores de transcripción, desencadenando así la expresión de genes específicos (Maggi, 2011). Es importante destacar que hay algunas modificaciones post-traduccionales en los ERs antes y después de unirse al DNA que repercuten en la expresión de los genes. Se sabe que 10 diferentes serinas, treoninas y tirosinas pueden ser fosforiladas y que esta modificación es necesaria para el reclutamiento de factores de transcripción (Maggi, 2011). Ejemplos de genes activados por esta vía son los de keratina 19 (relacionado con la estructura celular), el de angiotensinógeno (relacionado con la regulación de la presión sanguínea) y el de metaloproteinasas (relacionado con proteólisis) (Kian Tee et al., 2004).

El otro mecanismo de acción del E2 es conocido como “no genómico”, en el que la acción es rápida (en segundos o minutos) y es por medio de modificaciones post-traduccionales (Felty y Roy, 2005) o por unión a receptores de membrana (Schwartz et al., 2016). Una de las características de este mecanismo de acción es que está ligado a proteínas de señalización intracelular (Hall et al., 2001). Se ha demostrado que el E2, por medio de este tipo de mecanismo, activa la vía de señalización MAPK y la de PI3K/Akt. Un ejemplo del resultado de la activación de estas vías es el observado en células vasculares, en las que se activó la óxido nítrico sintasa (NOs) (Hall et al., 2001).

### **1.1.2 Receptores a Estrógenos**

La mayoría de los efectos del E2 son mediados por los ERs (Álvarez-Delgado & Cerbón, 2011). Los ERs son proteínas que pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares. Se han descrito tres subtipos: el receptor a estrógenos alfa (ER $\alpha$ ), el receptor a estrógenos beta (ER $\beta$ ) y el receptor a estrógenos acoplado a proteína G (GPER) (Gupte et al., 2015). De este último se ha reportado que puede regular la expresión genética por activación de proteínas que cambian la actividad de los factores de transcripción (Romano y Gorelick, 2018). Los GPER son expresados mayormente en el eje hipotálamo-pituitaria, en hipocampo y en los núcleos autónomos del tallo cerebral (Brailoiu et al., 2007). Se ha demostrado que este tipo de receptor, después de ser activado con E2, tiene acciones proliferativas en las células del tejido reproductivo, mamario, endometrial, ovárico, en los testículos y en el tejido tiroideo. En contraste, se ha demostrado en otros tejidos que la estimulación con E2 inhibe la proliferación celular (Filardo y Thomas, 2012).

#### ***1.1.2.1 Estructura de los Receptores a Estrógenos y su mecanismo de acción***

El ER $\alpha$  es codificado en el gen ESR1, mientras que el ER $\beta$  en el gen ESR2 (Gourdy et al., 2018). Pese a que están codificados por diferentes genes, el ER $\alpha$  y el ER $\beta$  son estructuralmente similares. Ambos receptores están compuestos por seis dominios funcionales nombrados de la A a la F, entre los cuales tienen un 97 % de similitud estructural en el dominio C y un 56% en el dominio E, mientras que en el dominio A-B hay alrededor de un 20 % de similitud estructural (Maggi, 2011). Cada dominio cumple una función específica: los dominios A-B realizan acciones ligando-independientes; el dominio C se une a los elementos de respuesta a estrógenos en el DNA (EREs); el dominio D funciona como bisagra al unir a los dominios C y E,



es una región hidrofílica en la que, aunque haya mutaciones, no se ve afectada la afinidad por la hormona (Green et al., 1987); el dominio E es el dominio de unión al ligando, es decir, está involucrado en las acciones ligando-dependientes.

Como se mencionó anteriormente, los ERs, por medio de su dominio C, se unen a los EREs, los cuales están compuestos por una secuencia de 15 pares de bases: 5'-AGGTCAnnnTGACCT-3' (Klinge, 2008). Estas secuencias fueron identificadas en los genes A1, A2, B1 y B2 de *Xenopus laevis* y gallinas; la expresión de dichos genes está regulada por los estrógenos (Klinge, 2001). Cada monómero de ER se une en el surco mayor del DNA por medio de tres aminoácidos específicos localizados en los dedos de zinc del receptor (Klinge, 2001).

En el citoplasma, los ERs se encuentran unidos a un complejo inhibitorio multiprotéico que los mantiene inactivos (Hall et al., 2001). Hay dos vías de activación para estos receptores: una es en la que el receptor se une a la hormona (ligando-dependiente) y esto produce un cambio estructural en el receptor que favorece su unión al DNA. La otra vía de activación consiste en cambios estructurales en el receptor, como la fosforilación, o por unión a otros componentes que no sean hormonas, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF). Una vez activados, los ERs tienen la capacidad de unirse para formar homodímeros o heterodímeros, los cuales presentan diferente afinidad por los EREs. Por orden de afinidad, el homodímero de ER $\alpha$  es el que presenta mayor afinidad por los EREs, seguido por el heterodímero de ER $\alpha$ /ER $\beta$ , siendo el homodímero de ER $\beta$  el que menor afinidad presenta (Maggi, 2011). En contraste, se ha reportado que los ER también pueden modular la expresión genética sin una unión directa al DNA, esto es por medio de interacciones con otros factores de transcripción como AP1 o SP1 (Gourdy et al., 2018).

### **1.1.2.2 Modificaciones Postraduccionales**

Los ER $\alpha$  y ER $\beta$  tienen modificaciones postraduccionales, tales como acetilación, glucosilación, fosforilación, ubiquitinación entre otras. Estas modificaciones suceden en diferentes compartimentos celulares, entre los cuales se encuentra la mitocondria, organelo en el que se han reportado cinasas activadas por estrógenos (Felty y Roy, 2005).

Dichas modificaciones tienen efectos moduladores en las actividades de ER $\alpha$  y ER $\beta$ . Por ejemplo, la acetilación de ER $\alpha$  en las lisinas 266 y 268 incrementa la afinidad al DNA; mientras que la acetilación de la lisina 302 y 303 inhibe la actividad del ER $\alpha$  (Barone et al., 2010)

Es importante mencionar que estas modificaciones suceden en dominios específicos de los receptores, como por ejemplo la glucosilación del ER $\beta$ , que sucede en los dominios A/B y en LBD. De igual forma, estas modificaciones, aparte de modular la actividad y de ser específicas, también regulan la cantidad de receptores presentes. Un ejemplo de esto es la ubiquitinación, que consiste en la adición de polipéptidos de 76 aminoácidos llamados ubiquitinas, las cuales son señalizadores que inducen la degradación del receptor por complejos citosólicos conocidos como proteosomas (Ascenzi et al., 2006).

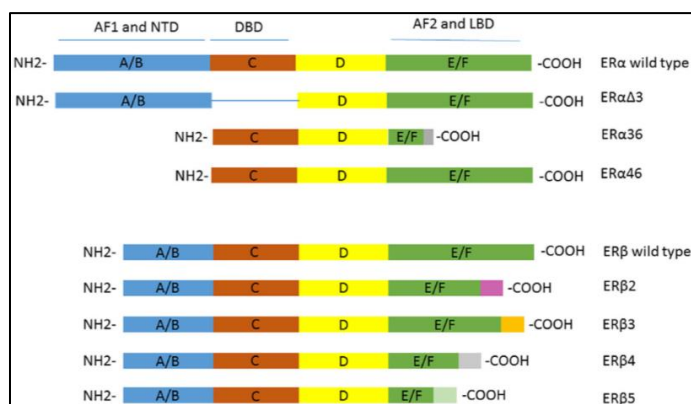
### **1.1.2.3 Distribución celular y subcelular de los Receptores a Estrógenos**

Otro aspecto a resaltar de los ERs es que hay variaciones tejido-específicas (Álvarez-Delgado & Cerbón, 2011) entre machos y hembras. Dilion y colaboradores utilizaron como modelos animales a *Rattus norvegicus* para comparar los niveles de expresión, de diferentes tejidos, entre machos y hembras. Observaron un incremento significativo en la expresión del gen ESR1 (gen que codifica para ER $\alpha$ ) en el tejido renal de los machos en comparación con el de las hembras, mientras que en el tejido gonadal observaron una mayor expresión del gen ESR2 (gen que codifica para ER $\beta$ ) en las hembras en comparación con los machos. Sin embargo, en otros tejidos como el adrenal, aórtico, cardiaco y de hipocampo, no se encontraron diferencias en la expresión de los ERs entre ambos sexos (Hutson et al., 2019).

Los ERs han sido localizados en diversos sitios subcelulares: en el núcleo (Jia et al., 2015), en la membrana celular (Li et al., 2014), en el citosol (Monje y Boland, 2001), en el retículo endoplásmico y en los microsomas (Milanesi et al., 2009), así como en las mitocondrias (Chen et al., 2004a). Como mecanismo de translocación, se ha descrito que la interacción con caveolina-1 es crítica para el movimiento del ER $\alpha$  y del ER $\beta$  hacia la membrana plasmática (Sheldahl et al., 2008). También se ha descrito que la proteína Shc funciona como un transportador del ER $\alpha$  hacia la membrana plasmática (Song et al., 2004). Sin embargo, aún no se han descrito los mecanismos de cómo es que los ERs translocan hacia las mitocondrias. Respecto a los mtERs se sabe que, en las células MCF-7, el mtER $\beta$  se presenta en mayor cantidad que el mtER $\alpha$  (Chen et al., 2004a). Si bien aún no se ha descrito cuál es la función de los mtERs, se ha sugerido que éstos podrían mediar algunos efectos de los estrógenos sobre la función mitocondrial.

### 1.1.2.4 Isoformas de los Receptores a Estrógenos

Se ha reportado que tanto el ER $\alpha$  como ER $\beta$  presentan isoformas como resultado de la edición alternativa (Figura 1). Del ER $\alpha$ , se han reportado 3 isoformas en diferentes modelos tales como los osteoblastos y células de tejido de cáncer de mama: el ER $\alpha\Delta 3$ , que carece del dominio de unión al DNA (no tiene el exón 3); el ER $\alpha\Delta 36$ , que carece tanto del dominio AF-1 y AF-2, el cual tiene reemplazado el aminoácido 138 por una secuencia única de 22 aminoácidos; el ER $\alpha\Delta 46$ , que carece de los aminoácidos 1 al 173, correspondientes al dominio AF-1, siendo esta la primera isoforma en identificarse y caracterizarse como un inhibidor dominante de la actividad de ER $\alpha$  en osteoblastos (Jia et al., 2015). El ER $\alpha 66$  (forma completa) actúa como un factor de transcripción dependiente de ligando (Romano y Gorelick, 2018) y se encuentra localizada en membrana mediante una interacción con caveolina-1, interacción que es dependiente de palmitoilación (Lin et al., 2013). Cuando está acoplado a la membrana, el ER $\alpha 66$  puede activar cascadas de señalización, tales como la vía de ERK, que estimula la proliferación celular, y la activación de las proteínas G $\alpha$ q y G $\alpha$ s, que estimulan la producción de inositol fosfato y la actividad de la adenilato ciclasa (Razandi et al., 1999).



**Figura 1.-** Estructura de las isoformas de los ERs. Se muestran las diferencias de dominios entre cada isoforma. Tomado de (Jia et al., 2015)

Respecto al ER $\beta$ , se han reportado 5 isoformas que difieren en su distribución y actividad. Estas isoformas fueron identificadas en librerías de cDNA de testículos de humano y en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB 435 (Moore et al., 1998). En cuanto a su distribución celular, la isoforma ER $\beta 1$  se encuentra predominantemente en la mitocondria y en menor cantidad en el núcleo; mientras que las isoformas ER $\beta 2$  y ER $\beta 5$  se encuentran en el citosol y en el núcleo de células de lente humana (células nHLE) (Chen et al., 2009). Se sugiere que hay un mecanismo de importación mitocondrial selectivo ya que el ER $\beta 1$  es la única

isoforma que se ha identificado en la mitocondria (Arnold et al., 2012). Referente a la actividad, el ER $\beta$ 1 es la isoforma predominante. No se ha reportado afinidad detectable del ER $\beta$ 2 por el no presenta afinidad por E2, por lo que se sugiere que éste actúa como inhibidor de ER $\alpha$  mediante la inducción de su degradación por formación del heterodímero ER $\alpha$ /ER $\beta$ 2. Las isoformas ER $\beta$ 4 y ER $\beta$ 5 forman dímeros con ER $\beta$ 1 mejorando su activación (Haldosén et al., 2014).

#### ***1.1.2.5 Funciones Biológicas de los Receptores a Estrógenos***

Los ERs están involucrados en varios procesos biológicos. Al ER $\alpha$  se le ha atribuido una mayor importancia en los procesos asociados al desarrollo y función reproductiva (Yang et al., 2004); mientras que al ER $\beta$  se le asocia más a procesos no reproductivos, como efectos protectores en procesos cardiovasculares y neuroprotectores (Chen et al., 2009). Los estudios realizados por Solakidi y colaboradores son un ejemplo de la función específica de cada receptor. Localizaron al ER $\alpha$  y ER $\beta$  en diferentes secciones del espermatozoide, identificando al ER $\alpha$  en la cabeza del espermatozoide, lo que sugiere que cumple un rol crucial en los procesos de fertilización; mientras que al ER $\beta$  se le relacionó con los requerimientos de energía, ya que se le localizó en la zona media del espermatozoide donde hay gran cantidad de mitocondrias (Solakidi et al., 2005).

También se ha reportado un rol importante de los ERs en procesos patológicos como el cáncer. Se tiene conocimiento de que el ER $\alpha$  participa en la proliferación y metástasis de células tumorales, como en el cáncer de mama y cáncer de próstata (Guillette et al., 2018). También se sabe que los ERs presentan modificaciones en su estructura en algunos tipos de cáncer. Se ha reportado la mutación Tyr537Asn en casos de cáncer de mama metastásico (Barone et al., 2010). Dicha mutación elimina a una tirosina implicada en la homodimerización, en la activación y en la regulación de unión a ligandos mediante fosforilación (Barone et al., 2010). Así mismo, algunos subtipos de los ERs participan en algunos tipos de cáncer, tal es el caso de ER $\beta$ 2, el cual tiene una expresión elevada en el cáncer de próstata y se cree que este subtipo promueve la progresión de este tipo de cáncer (Guillette et al., 2018).

### 1.1.3 Efectos de E2 en la mitocondria

El E2 tiene efectos positivos sobre la morfología y función mitocondrial, esto es: la actividad de la cadena respiratoria, la síntesis de ATP y el balance antioxidante.

#### 1.1.3.1 Efectos sobre la morfología mitocondrial

La morfología de las mitocondrias abarca formas esféricas y filamentosas. Se han descrito dos formas mitocondriales en relación a su actividad: la forma “condensada”, observada en mitocondrias con una densa matriz debida a una alta demanda energética, y la forma ortodoxa, mitocondrias con conformación inactiva (Wasilewski y Scorrano, 2009). La morfología mitocondrial depende de varias GTPasas con estructura homóloga a las dinaminas que participan en la fusión (Mfn1 y Mfn2) y en la fisión (Drp1 y Fis1) mitocondrial (Wasilewski y Scorrano, 2009). Así mismo, se ha sugerido que la formación de las crestas mitocondriales podría estar regulada por la ATP sintasa. En estudios realizados en *S. cerevisiae* se mostró que la deficiencia de las subunidades *e* o *g*, los cuales permiten la dimerización de la ATP sintasa, inhibieron la formación de crestas (Paumard et al., 2002).

Se ha sugerido que el E2 podría alterar la morfología mitocondrial mediante modificaciones post-traduccionales necesarios para la activación de la Drp1. En células MCF7 tratadas con E2 10 nM por 24 horas se demostró un aumento significativo en la fosforilación de la Drp1 en la serina 616 (pDrp1<sup>Ser616</sup>) (Oo et al., 2018). También se sugirió que estos efectos podrían ser mediados por el ER $\alpha$ , ya que el pre-tratamiento con ICI182,780 1  $\mu$ M (inhibidor inespecífico) y MPP 10  $\mu$ M (inhibidor específico de ER $\alpha$ ) 2 horas antes del tratamiento con E2, disminuyó significativamente la pDrp1<sup>Ser616</sup> (Oo et al., 2018). Así mismo se observó que las mitocondrias de las células sin tratar con E2 tenían un patrón tubular, mientras que en las tratadas se encontró un mayor número de mitocondrias pequeñas y cortas (Oo et al., 2018). De manera similar, en células de músculo esquelético que no expresan el ER $\alpha$  (MERKO) se observó que las mitocondrias eran grandes, alargadas e hiperfundidas, las características morfológicas relacionadas con estrés mitocondrial (Ribas et al., 2016).

Sin embargo, aún no se ha esclarecido un mecanismo de acción por el cual el E2 modifique la morfología mitocondrial. Se ha propuesto que los complejos E2/ER podrían unirse a los EREs o a factores de transcripción nuclear (e.g. AP-1 o SP-1) regulando así la transcripción de genes mitocondriales, o que los

ERs se unan a los EREs localizados en el mtDNA (mtERE) o a la AP-1 en la mitocondria y tener un efecto en la expresión del mtDNA (Oo et al., 2018).

### ***1.1.3.2 Efectos sobre la cadena respiratoria***

Se ha demostrado que los estrógenos tienen efectos positivos sobre los complejos respiratorios mitocondriales I, II, III, IV y la ATP sintasa (complejo V). Dichos efectos son dependientes de la concentración de estrógenos y dependientes del tejido, es decir, se observan diferentes efectos sobre los complejos respiratorios dependiendo de la concentración de estrógenos y del tipo de tejido. Por ejemplo, en el complejo I (NADH deshidrogenasa), el E2 exógeno a 10  $\mu\text{M}$  inhibe el transporte de electrones en homogenizados de útero, hígado y musculo esquelético de rata.

Por otra parte, en uno de los estudios en el complejo II (succinato deshidrogenasa), en el que utilizan el ácido 3-nitropropiónico para inhibirlo y simular condiciones isquémicas, se demostró que el E2 administrado subcutáneamente a dosis de 1 mg/kg de peso de rata reduce los daños isquémicos en cerebro en ratas OVX (Simpkins et al., 1997).

En cuanto al complejo III (citocromo bc1 reductasa), se ha demostrado que el estrógeno sintético dietilestilbestrol (DES), en concentraciones entre 10  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$ , inhibe este complejo en las mitocondrias aisladas de corazón de vaca (Schulz et al., 1990). Así mismo, el tamoxifeno, un antagonista de los ERs, inhibe a este complejo respiratorio en mitocondrias aisladas de hígado de rata (Tuquet et al., 2000). Debido a que este complejo es uno de los mayores productores de ROS y a que su actividad es regulada por los estrógenos, se tiene la hipótesis de que los estrógenos modulan la formación de ROS mediante la regulación de los complejos respiratorios (Tuquet et al., 2000).

Referente al complejo IV (citocromo c oxidasa), se tienen reportes de que los estrógenos y otros ligandos de los ERs (e.g. tamoxifeno) pueden inhibir o estimular la actividad de este complejo respiratorio. Por ejemplo, el E2 inhibe la actividad del complejo IV en células del tejido adiposo pardo de ratas hembras durante su ciclo estral, periodo en el que el E2 se encuentra en mayor concentración sérica (Mcbennett et al., 1998). En contraste, el tamoxifeno a concentraciones entre 10 y 15  $\mu\text{M}$  estimula la actividad de dicho complejo, mientras que a concentraciones mayores a 50  $\mu\text{M}$ , la actividad enzimática del complejo IV se inhibe en un 50 % (Tuquet et al., 2000). Igualmente, se ha determinado que la actividad del complejo V

(ATP sintasa) puede ser estimulada con tratamientos con E2, sin embargo, los efectos de los estrógenos son diferenciales. Como ejemplo, en aislados mitocondriales de corazón, hígado y cerebro de rata se demostró que el E2 a 13 nM estimula la actividad de la ATP sintasa en un 10 % en el aislado mitocondrial de corazón, pero no en el de hígado o en el de cerebro (Kipp y Ramirez, 2001).

A pesar de la evidencia anterior, no está claro el mecanismo por el cual los estrógenos logran los efectos descritos sobre los complejos respiratorios. Uno de los posibles mecanismos por los cuales el E2 regula la cadena respiratoria es por modificaciones a nivel post-traduccionales, ya que se ha reportado que el E2 incrementa la fosforilación de proteínas mitocondriales, además de que se ha reportado la presencia de cinasas dentro de la mitocondria (Thomson, 2002). También, se ha demostrado que el mtER $\beta$  interactúa con el Complejo V (ATP sintasa), lo cual podría ser otro de los posibles mecanismos por los cuales los estrógenos participan en el balance energético mitocondrial (Álvarez-Delgado et al., 2010).

### **1.1.3.3 Efectos del E2 sobre la producción de ATP**

Uno de los estudios más recientes sobre el efecto del E2 en la síntesis de ATP es la investigación liderada por Liao, en la cual investigan la función de los mtER, específicamente el mtER $\beta$  en células de tejido endometrial. Determinaron que el E2 y el agonista específico de ER $\beta$ , DPN, a 10 nM, incrementan significativamente los niveles de ATP. También observaron que al utilizar el antagonista ICI 182780 a concentraciones entre 5 y 10  $\mu$ M, el contenido de ATP disminuyó significativamente (Liao et al., 2019).

Así mismo, diseñaron dos modelos en los que sobreexpresaron el ER $\beta$  en células de tejido endometriótico: uno de los modelos sobreexpresaba el ER $\beta$  en mitocondria, ya que estaba dirigido, por una secuencia señal, hacia dicho organelo y se le denominó mtsER $\beta$ ; por su parte, en el segundo modelo, se sobreexpresaba el ER $\beta$  sin una secuencia señal que lo dirigiera a una sección de la célula en particular, y se le denominó tER $\beta$ . Con estos modelos observaron que la producción de ATP aumentaba significativamente, el cual sugería una vía de acción ligando-independiente. Sin embargo, la producción de ATP incrementaba aún más cuando trataban a los modelos mtsER $\beta$  y tER $\beta$  con E2 y con el agonista específico de ER $\beta$ , el DPN a 10 nM (Liao et al., 2019).

En cultivos de células humanas de neuroblastoma SK-N-SH se demostró que el pretratamiento con E2 en concentraciones 20-200 nM bloquea la disminución de las concentraciones de ATP inducida por el

tratamiento de 3-NPA 10 mM a las 12 horas de exposición, sugiriendo que los efectos neuroprotectores del E2 podrían estar relacionados directa o indirectamente con la función mitocondrial (J. Wang et al., 2001).

De igual forma, en células epiteliales de lente humano se demostró que el pretratamiento de 2 horas con E2 100 nM – 10  $\mu$ M incrementó significativamente los niveles de ATP de forma dependiente de dosis tras un tratamiento de 90 minutos con peróxido de hidrógeno a 100  $\mu$ M (X. Wang et al., 2003).

Se ha demostrado que mtER $\beta$  interactúa con el complejo V (Álvarez-Delgado et al., 2010) de la cadena respiratoria y que incrementa la actividad del complejo IV (Liao et al., 2019), lo cual sugiere una relación entre el mtER $\beta$  y la producción de ATP. Igualmente se observó que el modelo de sobreexpresión mtsER fue en el que se observaron los más altos niveles de producción de ATP, así como incremento del potencial de membrana ( $\Delta\psi_m$ ) y consumo de oxígeno. El tratamiento con ICI 182780 10 nM colapsó el  $\Delta\psi_m$  y redujo tanto la producción de ATP como el consumo de oxígeno, lo que sugiere al mtER $\beta$  como un modulador metabólico mitocondrial (Liao et al., 2019).

#### ***1.1.3.4 Efectos del E2 sobre la producción de ROS***

La mitocondria es el principal productor de ROS (Feltz y Roy, 2005), lo cual la convierte en un blanco para la regulación del balance oxidante en la célula.

Se ha demostrado que el tratamiento de mitocondrias aisladas con E2 0.2 - 2000 nM reduce significativamente la producción de peróxido de hidrógeno hasta en un 30 %, observando que hay un proceso de saturación, es decir, existe un límite de concentración a la cual se observan dichos efectos, lo cual sugiere que el E2 podría actuar a través de los receptores específicos en la mitocondria (Borrás et al., 2010). En relación con los ERs y la producción de ROS, en los estudios realizados por Liao y colaboradores, se determinó que la producción de ROS disminuye significativamente en las células de tejido endometrial que sobreexpresaban el ER $\beta$  dirigido hacia la mitocondria (mtsER $\beta$ ), así como en aquellas células en las que no se dirigió a un compartimento en específico (tER $\beta$ ). En este mismo trabajo se observó que la producción de ROS disminuyó aún más cuando se trataron a ambos modelos celulares con el DPN a 10 nM. Así mismo, se sugirió que la disminución de la cantidad de ROS está relacionada con la expresión del MnSOD, debido a que la expresión de ésta se regula por ER $\beta$  (Liao et al., 2019).



También es importante mencionar que, aunque la mitocondria es el principal productor de ROS al consumir el 85 % del oxígeno celular, los ROS producidos por mitocondria pueden actuar como segundos mensajeros, ya que su contribución a los niveles de ROS intracelulares no es tan alta para inducir estrés oxidativo (Felty y Roy, 2005). El papel de las ROS como segundos mensajeros está fundamentado en que son moléculas de vida corta, son producidos en respuesta a estímulos, tienen alto grado de difusión y se encuentran presentes en la mayoría de las células (Felty y Roy, 2005).

### ***1.1.3.5 Translocación de los ERs hacia la mitocondria***

En la línea celular de MCF-7 se demostró que los ERs translocan a la mitocondria después del tratamiento con E2 100 nM, incrementando 2.5 veces más la cantidad de ERs en las mitocondrias de las células tratadas en comparación de las no tratadas (Chen et al., 2004a). En este mismo modelo celular se observó que el tratamiento con E2 a diferentes concentraciones (de 1 nM a 1000 nM) y a diferentes intervalos de tiempo (3, 6, 12 y 24 horas), incrementó la unión de las proteínas mitocondriales a los mtEREs (Chen et al., 2004b), con lo que se sugiere que el E2 promueve esa unión.

Debido a que los ERs se localizan tanto en el núcleo como en las mitocondrias, se piensa que el E2 podría contribuir en la comunicación entre ambos organelos, puesto que la expresión del mtDNA depende de la expresión del DNA nuclear. Sin embargo, no está claro si los mtERs son quienes regulan directamente la transcripción del mtDNA o si ésta es mediada a través de la expresión de genes nucleares que están relacionadas con la regulación de la transcripción del mtDNA (Klinge, 2013).

Se ha sugerido que los mtERs participan en los efectos del E2 sobre la mitocondria debido a que en los experimentos donde se utiliza al ICI 182,780 (un antagonista de los ERs) se observa una disminución significativa de dichos efectos. Como ejemplos, en las células MCF-7 el ICI 182,780 disminuyó significativamente la transcripción de CO I y CO II, mientras que en células de endotelio cerebral disminuyó la protección ejercida por el E2 frente a las condiciones isquémicas. Quizá uno de los experimentos que mejor evidencia la participación de los mtERs en los efectos del E2 es el realizado por Chen y colaboradores en el 2004, en el cual demostraron la unión de proteínas mitocondriales de células MCF-7 a los ERE localizados en la zona reguladora (D-loop ERE III) del mtDNA. En dicho experimento, se detectaron ER $\alpha$  y a ER $\beta$  entre las proteínas mitocondriales unidas a los mtEREs. Posterior a esto, emplearon anticuerpos anti ER $\alpha$  y anti ER $\beta$ , para determinar si estos interferían en la unión de los ER $\alpha$  y ER $\beta$  al D-loop ERE III. Se observó

que los anticuerpos sí interferían en la unión de las proteínas mitocondriales a los D-loop ERE III, sugiriendo que, dentro de las proteínas mitocondriales, están los mtERs y que éstos son los que se unen a D-loop ERE III (Chen et al., 2004b).

#### **1.1.3.6 Efectos del E2 sobre el mtDNA**

Se ha reportado el efecto de estrógenos y de los ERs sobre el mtDNA en varios tipos de tejidos y líneas celulares. En un trabajo reciente se demostró que la sobreexpresión del mtER $\beta$  incrementó significativamente la cantidad de los transcritos mitocondriales mt-CO1 (subunidad 1 del complejo IV) y mt-ATP6 (subunidad 6 del complejo V); así mismo, dicha sobreexpresión incrementó la cantidad de los transcritos y proteínas de NRF-1 y TFAM. En este trabajo, se sugiere que el subtipo ER $\beta$  actúa como un regulador del número de copias de mtDNA debido a que se ha demostrado que su sobreexpresión incrementa significativamente la interacción con la polimerasa  $\gamma$ , y que por medio de esta interacción regula la replicación del mtDNA (Liao et al., 2019).

También, en el modelo celular MCF-7, se demostró que el E2 induce la transcripción del mtDNA; esto se demostró después del tratamiento con E2, observando un aumento en los niveles de transcripción de CO I y CO II en comparación de las células que no fueron tratadas con E2 (Chen et al., 2004a).

#### **1.1.4 Los mtERs como posibles mediadores de los efectos de E2 en la mitocondria**

Tomando en cuenta lo anterior, la evidencia en conjunto sugiere que el E2 se une a los mtERs, mediando los efectos en la mitocondria. El mecanismo de acción genómico, en el que el ER se une a su ligando, luego dimeriza y se une al ERE, donde provoca una respuesta transcripcional (Gupte et al., 2015) ha sido descrito en el núcleo y se desconoce si algo similar sucede en la mitocondria. Una de las evidencias más cercanas de la existencia de esta unión son los estudios realizados por Pedram y colaboradores en los que, empleando [ $^3$ H]17 $\beta$ -E2, se demostró que el E2 se une a proteínas mitocondriales en células MCF-7 (Pedram et al., 2006) y los autores sugieren que estas proteínas son los mtERs, sin embargo, esto no se cuantificó y no se demostró experimentalmente la unión específica a los ERs mitocondriales.

La demostración de la unión entre el E2 y los mtERs podría dar lugar al desarrollo de nuevas formas de tratamiento para enfermedades asociadas a la disfunción mitocondrial, o incluso, a tratamientos preventivos. Estas nuevas alternativas consistirían en tratamientos con estrógenos que sean dirigidos exclusivamente a las mitocondrias, i.e., un tratamiento mito-dirigido (Álvarez-Delgado, en proceso), promoviendo su función, como la generación de energía o el balance antioxidante. Un aspecto a destacar de que este tratamiento sea dirigido a los mtERs es que sólo así se obtendrá la estimulación en la función mitocondrial y no los efectos desencadenados por los ERs localizados en el núcleo y en la membrana celular, los cuales están relacionados con la proliferación celular que se ha asociado al proceso de carcinogénesis (Epstein et al., 2001).

De lograrse, esto implicaría un alto impacto a nivel sector salud, ya que las enfermedades que tienen relación con disfunciones mitocondriales aún no están descritas del todo y, en consecuencia, no hay una amplia variedad de tratamientos, por lo que nuevas propuestas de tratamientos implicarían un gran avance.

## **1.2 Justificación**

El E2 tiene un efecto positivo sobre la función mitocondrial, como el aumento de la producción de ATP, la reducción de la producción de ROS, y el aumento en el consumo de oxígeno. Se ha sugerido que estos efectos son mediados específicamente por los mtERs. Sin embargo, hasta la fecha, no se ha demostrado experimentalmente ni existen datos exactos sobre la cantidad de E2 que se une a estos receptores. Es decir, no se sabe cómo es el proceso de activación específica de los mtERs con E2.

La demostración y cuantificación de la activación de los mtERs es un dato esencial para el desarrollo de una terapia mito-dirigida para el tratamiento de enfermedades asociadas a la disfunción mitocondrial, como las enfermedades neurodegenerativas, metabólicas y cardiovasculares; y para atender otras condiciones como la obesidad, el envejecimiento, y el estado post-menopáusico.

### **1.3 Hipótesis**

El E2 endógeno se une a los mtERs y con el tratamiento con E2 exógeno la cantidad de E2 unido a los mtERs aumentará.

### **1.4 Objetivos**

#### **1.4.1 Objetivo General**

Evaluar si el E2 se une a los mtERs y si esto correlaciona positivamente con el tratamiento con E2 exógeno.

#### **1.4.2 Objetivos Específicos**

1. Corroborar la localización subcelular de los receptores a estrógenos en células MCF-7.
2. Determinar la cantidad de E2 en los compartimientos subcelulares (citosol y mitocondrias) en condiciones basales y de tratamiento con E2 exógeno.
3. Evaluar la cantidad de E2 unido a los mtERs en condiciones basales y de tratamiento con E2 exógeno.
4. Establecer un protocolo para la cuantificación del E2 unido a los mtERs en condiciones basales y de tratamiento con E2 exógeno.

## Capítulo 2. Metodología

---

### 2.1 Cultivo celular y tratamientos con E2

Se utilizó la línea celular MCF-7 (HTB-22) de cáncer de mama entre los pasajes 8-11. Se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle's Minimum Essential Medium), el cual contiene 4.5 g/L de glucosa, aminoácidos no esenciales y L-glutamina suplementado con suero fetal bovino (10 %) y antibiótico/antimicótico (1 %). Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera con 5 % de dióxido de carbono. Se cambió el medio de cultivo cada 2 días y se subcultivaron cuando las células estuvieron en un 80 % de confluencia, de acuerdo al protocolo proporcionado por la American Type Culture Collection (ATCC).

Una semana antes del tratamiento celular, las células se cambiaron a medio DMEM/F12 libre de rojo fenol suplementado con 10 % de suero fetal bovino libre de hormonas (Lote No. S17634S181F, Biowest) y con 1 % de antibiótico-antimicótico (Gibco). El tratamiento celular se hizo con E2 (E2758, Lote SLBT2822, Sigma-Aldrich) a las concentraciones de 1 y 100 nM por 12 horas.

### 2.2 Aislamiento de mitocondrias

Se utilizaron células que presentaron un 80 % de confluencia. Las mitocondrias se aislaron con el kit Mitochondrial Isolation Kit for Cultured Cells (No. 89874, Thermo Scientific). Las células se suspendieron y lisaron con reactivos proporcionados por el kit. Las mitocondrias y las fracciones citosólicas se obtuvieron mediante centrifugación diferencial con el equipo Eppendorf Centrifuge 5417R. Todo el procedimiento se hizo a 4°C.

### 2.3 Obtención de proteínas mitocondriales

Las proteínas mitocondriales se obtuvieron de acuerdo al protocolo establecido para la coimmunoprecipitación. Las mitocondrias intactas obtenidas se resuspendieron en buffer de extracción (Buffer IP) (proporcionado por el kit de coimmunoprecipitación) en proporción 1:9 y se incubaron en hielo por 15 minutos para posteriormente centrifugar a 2600 g por 5 minutos a 4 °C y obtener las proteínas

mitocondriales en el sobrenadante. La concentración de proteína se determinó por el método de micro-BCA (Micro BCA™ Protein Assay Kit, No. Lote OE184594, Thermo Scientific).

## 2.4 Corroboración de la localización de ER $\alpha$ en mitocondrias

La localización del ER $\alpha$  en mitocondrias se corroboró mediante Western blot. Se cargaron 25  $\mu$ g de proteína y 5  $\mu$ g de marcador de masa molecular (Amersham™ ECL™ Rainbow™ Marker Full Range. RPN800E). Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis desnaturalizante (SDSD-PAGE). Primero se utilizaron 50 V durante aproximadamente 20 minutos hasta pasar el gel concentrador. Después se cambió a 100 V por aproximadamente 2 horas antes de transferirse a una membrana de PVDF por electrotransferencia en cámara semi húmeda. Luego las membranas se bloquearon a temperatura ambiente por 1 hora con BSA 5% w/v en TBS-Tween 0.1% v/v. Los revelados de membrana se hicieron con los anticuerpos anti-ER $\alpha$  (MC20, sc-542, Santa Cruz; 0.8  $\mu$ g/mL), anti-ER $\beta$  (1531, sc-53494; 0.4  $\mu$ g/mL), cabra anti-ratón IgG-HRP (sc-2005, Santa Cruz; 0.05  $\mu$ g/mL), cabra anti-conejo IgG-HRP (sc-2004, Santa Cruz; 0.04  $\mu$ g/mL), anti-GAPDH (G-9, sc-365062, Santa Cruz; 0.2  $\mu$ g/mL) y anti-mtHSP70 (MA3-028, Thermo Fisher). Las bandas se detectaron mediante un método quimioluminiscente en el equipo ChemiDoc de Bio-Rad.

En el ensayo para corroborar la localización del ER $\alpha$  en la mitocondria, se cargó una muestra de células completas obtenidas con buffer de lisis (25 mM HEPES, 2.5 mM Tris Base, 6 mM KCl, 300 mM NaCl, 1 M Urea, 0.5% IGEPAL, 2 mM DTT) esto con el fin de descartar posibles interferencias con el Buffer IP.

## 2.5 Coimmunoprecipitación de mtERs

La coimmunoprecipitación se realizó de acuerdo al protocolo del kit Dynabeads Co-Immunoprecipitation Kit (No. 14321D; Invitrogen, Thermo Scientific). Se utilizaron como muestras las proteínas mitocondriales obtenidas previamente. Se acoplaron los anticuerpos anti-ER $\alpha$  (MC20, sc-542, Santa Cruz) a las perlas magnéticas en las cantidades recomendadas por protocolo. Las muestras de proteína mitocondrial total se incubaron con 1.5 mg de perlas magnéticas previamente acopladas por 20 minutos a 4 °C. Luego de una serie de lavados, se hizo una elución para la obtención de los mtER $\alpha$  inmunoprecipitados.

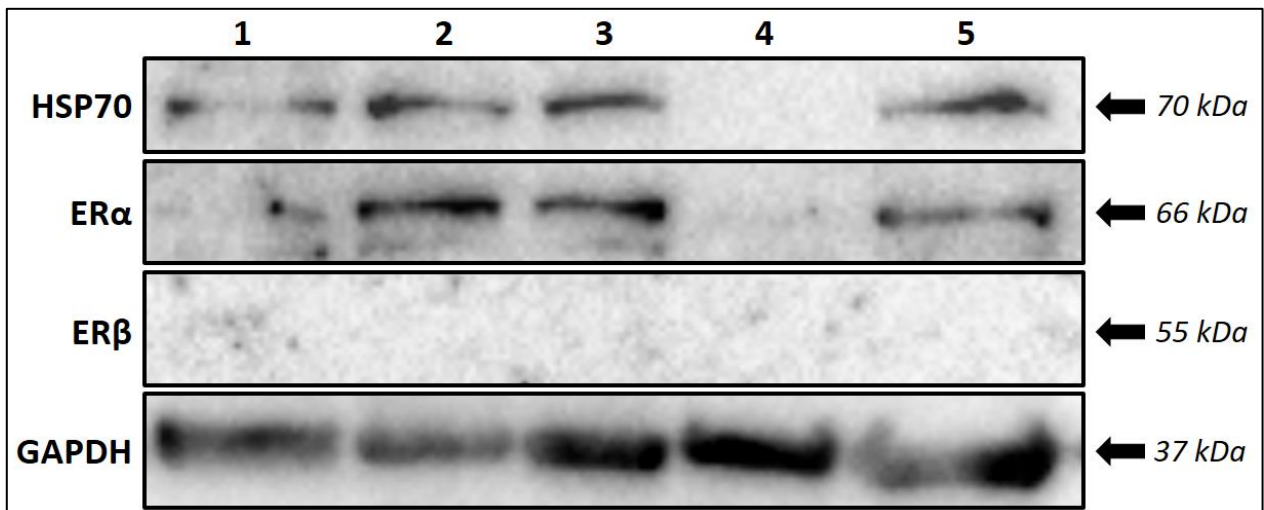
## **2.6 Cuantificación de E2 por ELISA**

Para este ensayo, primero se desnaturalizaron los mtER $\alpha$  co-inmunoprecipitados con calor a 80 °C por 10 minutos con el equipo ThermoStat Plus Eppendorf. Esto último se hizo para favorecer la separación del E2 que tuvieran unido. El E2 se cuantificó con el kit Estradiol (E2) Test System AccuBind (No. 4925-300, Monobind Inc.), el cual consta de microplacas en los que se llevan a cabo los ensayos colorimétricos. Se preparó una curva estándar para la cuantificación de E2. Como controles positivos se utilizaron un suero de paciente femenina y una preparación de E2 1 nM, así como un blanco.

## Capítulo 3. Resultados

### 3.1 Corroboración de la localización de ER $\alpha$ en la mitocondria

Con el anticuerpo anti-ER $\alpha$  se observaron bandas correspondientes a los 66 kDa en los controles positivos y en las fracciones pre-mitocondrial, mitocondrial y una banda difusa en la fracción citosólica. Con este resultado se confirmó que el ER $\alpha$  se localiza en la mitocondria (Figura 2).



**Figura 2.-** Western blot para la corroboración de la localización subcelular del ER $\alpha$ . 1: control de células completas obtenidas con buffer de lisis; 2: control de células completas obtenidas con buffer IP; 3: Fracción pre-mitocondrial; 4: Fracción citosólica; 5: Fracción mitocondrial; los anticuerpos utilizados fueron el anti-HSP70 (MA3-028, Thermo Fisher; 2.14  $\mu$ g), el anti-ER $\alpha$  (MC20, sc-542; 0.8  $\mu$ g), el anti-ER $\beta$  (1531, sc-53494; 0.4  $\mu$ g) y el anti-GAPDH (G-9, sc-365062; 0.8  $\mu$ g).

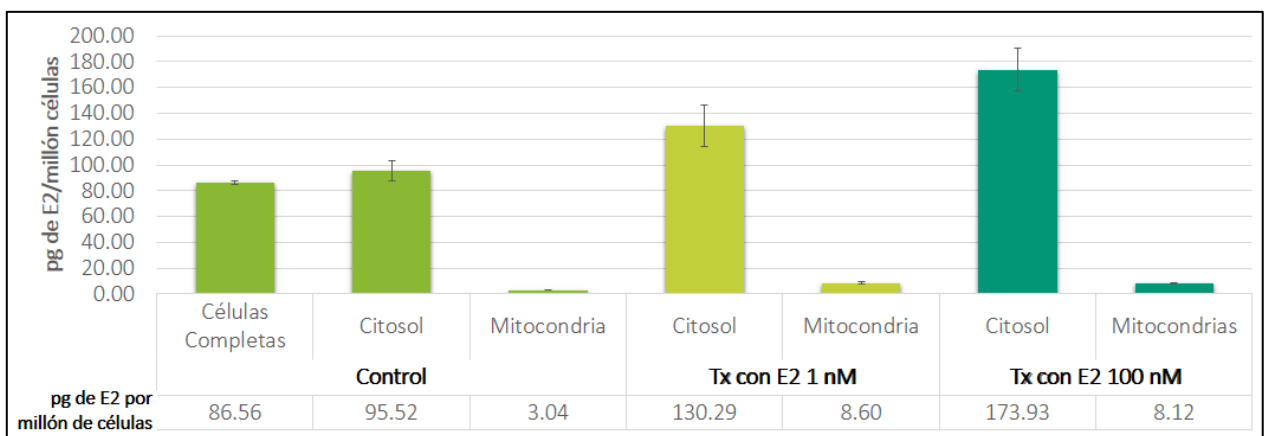
Con el marcador mitocondrial HSP70 se observaron bandas correspondientes a los 70 kDa en los controles positivos, así como en las fracciones pre-mitocondrial y mitocondrial, lo cual indica que las fracciones mitocondriales están enriquecidas y que las fracciones citosólicas están libres de proteína mitocondrial. Por su parte, el marcador citosólico GAPDH se observó en todas las fracciones, incluida la fracción mitocondrial. No se lograron identificar bandas correspondientes a los 55 kDa con el anticuerpo anti-ER $\beta$ . Debido a que no se corroboró la presencia del mtER $\beta$ , los estudios subsecuentes se hicieron con el mtER $\alpha$ .



### 3.2 Cuantificación de E2 en las fracciones subcelulares

Se diseñó un nuevo protocolo para la cuantificación de E2 en las fracciones subcelulares, el cual consistió en obtener las fracciones citosólicas y mitocondriales, las cuales se calentaron a 80 °C para desnaturalizar los receptores a estrógenos.

En la fracción citosólica de células control sin tratamiento se cuantificaron en promedio 95.52 pg de E2/1x10<sup>6</sup> células; mientras que en la fracción mitocondrial se cuantificaron 3.04 pg de E2/1x10<sup>6</sup> células. Estas cantidades reflejan la síntesis basal de E2 (Figura 3).

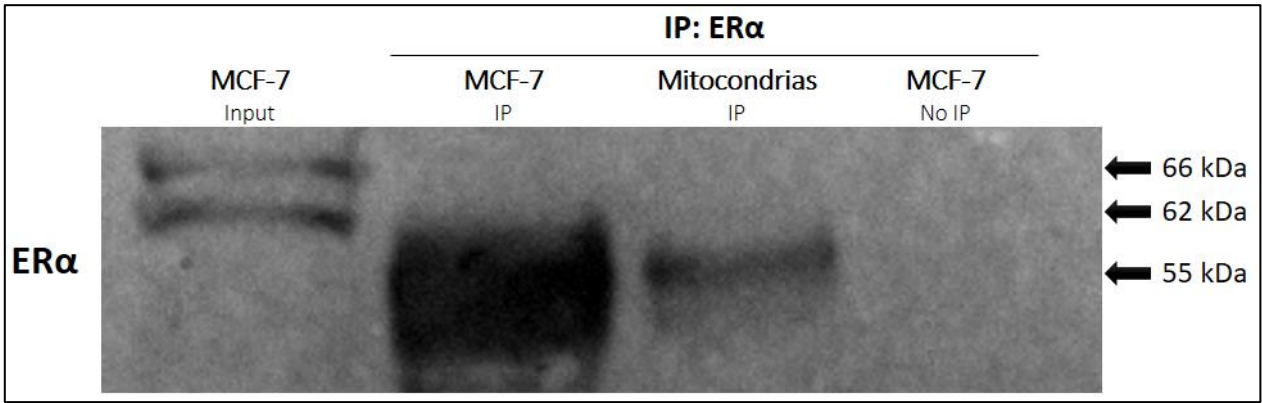


**Figura 3.-** Cantidad de E2 en las fracciones subcelulares.

Por su parte, con el tratamiento con E2 exógeno, el mayor incremento se observó en la fracción citosólica de células tratadas con E2 100 nM, mientras que el incremento en las fracciones mitocondriales fue similar con los tratamientos con E2 1 y 100 nM.

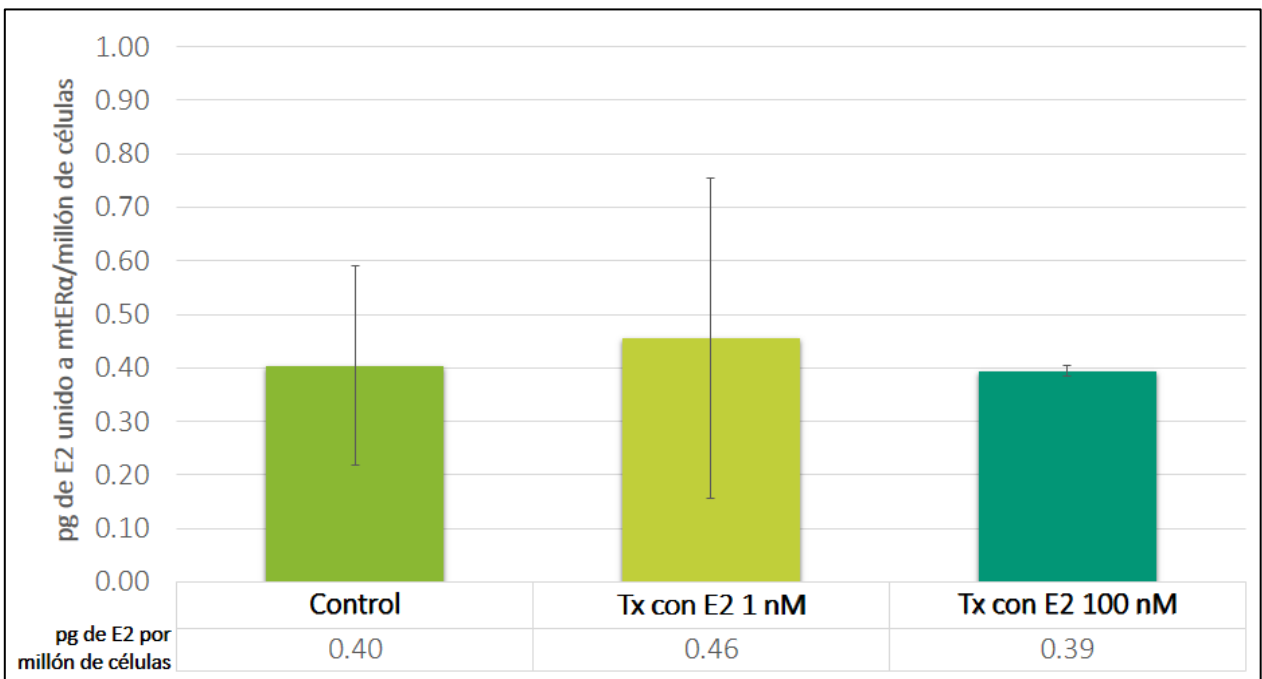
### 3.3 Cuantificación del E2 unido a mtER $\alpha$

Como resultado del establecimiento de un nuevo protocolo para la cuantificación del E2 unido a los mtER $\alpha$ , se aislaron las mitocondrias, se obtuvieron las proteínas mitocondriales y se coimmunoprecipitaron los mtER $\alpha$  para desnaturalizarlos y luego cuantificar el E2 que estuviera unido a éstos; además se corroboró que el sistema de co-inmunoprecipitación con perlas magnéticas sí fuera adecuado para aislar a los ER $\alpha$ .



**Figura 4.-** Western blot para corroborar la inmunoprecipitación del ER $\alpha$ . MCF-7 Input: control de expresión de proteína total sin inmunoprecipitar, proveniente de células completas; MCF-7 IP: control positivo de inmunoprecipitación de proteína total proveniente de células completas; Mitochondrias IP: inmunoprecipitación de proteína mitocondrial proveniente de los aislados mitocondriales; MCF-7 No IP: Control negativo de inmunoprecipitación (perlas magnéticas acopladas con anticuerpo sin proteína proveniente de células completas). Para este Western blot se utilizó el anticuerpo anti-ER $\alpha$  (MC20, sc-542, Santa Cruz; 0.8  $\mu$ g). El mismo anticuerpo se utilizó para la Co-IP.

Se observaron bandas distintas entre el control positivo y las muestras que se inmunoprecipitaron. Mientras que en el control positivo se observaron bandas correspondientes a los 66 y 62 kDa, en las muestras inmunoprecipitadas de células completas y mitocondrias aparecieron bandas de  $\sim$ 55 kDa. Con este ensayo se corroboró que con el sistema de co-inmunoprecipitación sí se logra aislar a los ER $\alpha$ , por lo que se procedió a la cuantificación del E2 unido a éstos.



**Figura 5.-** Cuantificación de E2 unido a los mtER $\alpha$ .

No se observó un incremento del E2 unido al mtER $\alpha$  dependiente de la concentración de E2 exógeno. En general, los tratamientos tuvieron en promedio una concentración de 0.42 pg de E2 por  $1 \times 10^6$  células unido al mtER $\alpha$  (Figura 5).

## Capítulo 4. Discusión

---

Se corroboró la presencia de mtER $\alpha$  por medio de Western blot en las células MCF-7. Dicho receptor ya había sido detectado por Chen y colaboradores por medio de la técnica de microscopía electrónica e Inmunogold (Chen et al., 2004a), y más recientemente en nuestro laboratorio por Western blot, utilizando otro kit de aislamiento y el mismo anticuerpo utilizado en esta tesis (Ferrá Molina, 2016). De igual forma se corroboró el enriquecimiento de la fracción mitocondrial con el marcador HSP70 y se detectó al marcador citosólico GAPDH en esta misma fracción. De acuerdo a la literatura, la enzima GAPDH está ampliamente distribuida en los compartimientos subcelulares, incluyendo el núcleo y la mitocondria, lo cual podría explicar su presencia en la fracción mitocondrial.

Por su parte, no se pudo corroborar la presencia del mtER $\beta$ . Esto posiblemente se debió a que el anticuerpo utilizado (sc-53494, Santa Cruz; 0.4  $\mu$ g) no funcionó correctamente, ya que está bien establecido que la línea celular MCF-7 expresa al ER $\beta$  (Chen et al., 2004a).

Además de las células MCF-7, los mtERs también han sido localizados en otros modelos, tales como hipocampo, corteza cerebral e hipotálamo de ratas (Álvarez-Delgado et al., 2010); células de endometrio (Liao et al., 2019); y células epiteliales de lente humano (Cammarata et al., 2005), por mencionar algunas.

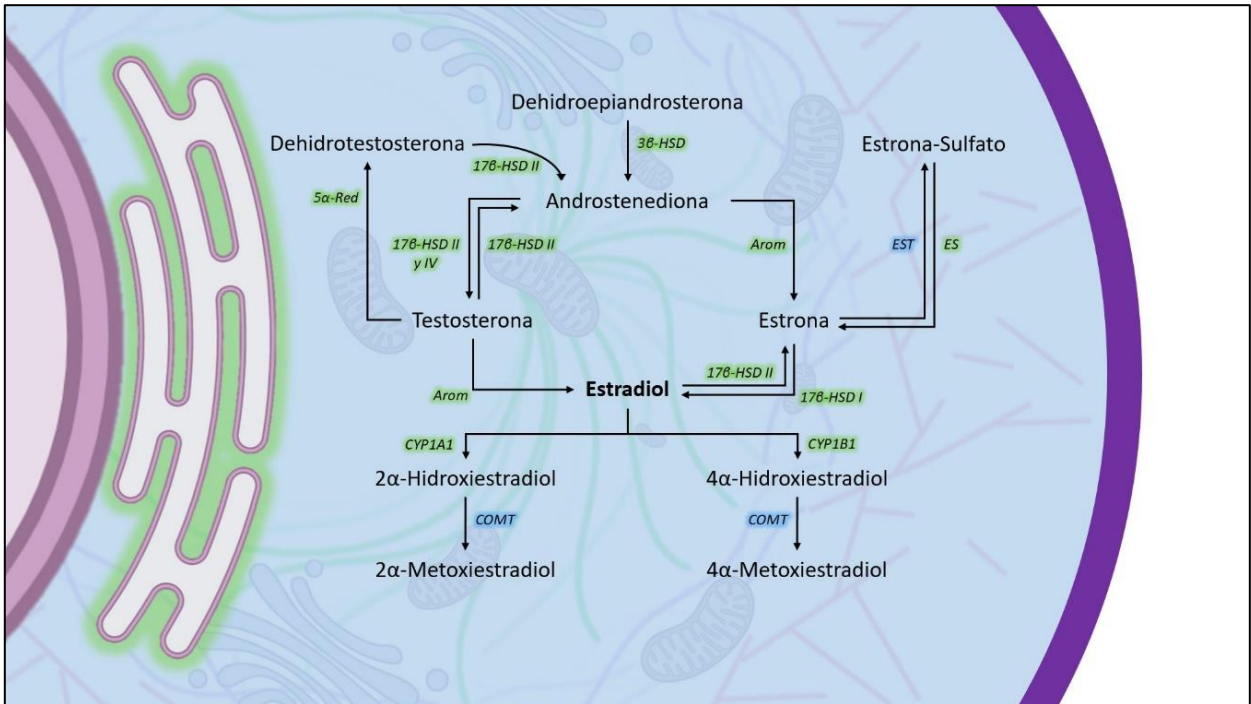
Sin embargo, se ha visto que la distribución y cantidad de los mtERs varía de acuerdo al tipo celular. En las células de epitelio de lente humano sólo se ha detectado el mtER $\beta$  y no el mtER $\alpha$ ; mientras que en nuestro modelo celular, las células de cáncer de mama MCF-7, se han localizado ambos mtERs (Cammarata et al., 2005).

Poco se sabe de cómo es que los ERs translocan a la mitocondria. Una de las formas que se ha propuesto para explicar dicha translocación es su unión con el E2. En estudios realizados por Cammarata y colaboradores se propuso que la unión al E2 podría ser un prerequisite para que el ER $\beta$  transloque a la mitocondria, esto debido a que la isoforma ER $\beta$ 2, la cual no se une al E2, no transloca a la mitocondria; mientras que el ER $\beta$ 1, el cual sí se une al E2, sí transloca a dicho organelo (Cammarata et al., 2005). Además, en estudios realizados por Chen y colaboradores se propuso que la translocación a la mitocondria podría deberse a una péptido-senala mitocondrial localizada en el ER $\beta$ . Sin embargo, en el ER $\alpha$  no se localizó una secuencia como tal (Chen et al., 2004a).

Hasta el momento, se ha estudiado ampliamente el mecanismo de acción genómico de los ERs, en el que el E2 se une a los ERs localizados en el citosol y posteriormente éstos dimerizan y se translocan al núcleo, donde inducen la expresión de genes blanco (Ascenzi et al., 2006). Sin embargo, aún se desconoce si la translocación de los ERs hacia la mitocondria es similar a la translocación hacia el núcleo.

En el presente trabajo, por medio de un inmunoensayo enzimático competitivo, se determinó por primera vez cómo se distribuye el E2 entre las fracciones citosólicas y mitocondriales de células tratadas con E2 a 1 y 100 nM por 12 h, concentraciones y tiempo en las que se induce la translocación de los ERs hacia la mitocondria (Chen et al., 2004a). En células sin tratar, se cuantificaron 86.56 pg de E2/ $1 \times 10^6$  células, cantidad similar a la reportada por Xu y Venestra, quienes cuantificaron 81.6 pg de E2/ $1 \times 10^6$  células por el método de HPLC-MS<sup>2</sup> (Xu y Veenstra, 2012). Este resultado indica que las células MCF-7 utilizadas sintetizan cantidades basales de la hormona y que son un buen modelo para estudiar la activación estrogénica de mtERs.

El E2 es sintetizado mediante las enzimas aromatasa y la 17 $\beta$ -HSD tipo 1, cuyos sustratos son la testosterona y la estrona, respectivamente (Figura 6). En células MCF-7 se ha reportado que la actividad de la aromatasa y la 17 $\beta$ -HSD tipo I mantienen las concentraciones de E2 en niveles suficientes para desencadenar una respuesta estrogénica (Brooks y Thompson, 2005; Harada, 1999). Además, se ha sugerido que la principal vía de síntesis de E2 es por la 17 $\beta$ -HSD tipo 1, ya que su actividad es mayor que la de la aromatasa (Brooks y Thompson, 2005). Los sustratos androgénicos para la síntesis de E2 podrían sintetizarse a partir de la androstenediona, la cual es convertida a testosterona por medio de la 17 $\beta$ -HSD tipo II (Simpson et al., 2000) y quizá en menor grado por la 17 $\beta$ -HSD tipo 5 (Sonne-Hansen y Lykkesfeldt, 2005). Por otro lado, la androstenediona también puede ser convertida a estrona por la aromatasa. De esta manera el E2 se sintetiza en condiciones basales, quedando libre en citosol para luego difundir de manera pasiva hacia otros organelos como la mitocondria.



**Figura 6.-** Síntesis y Metabolismo del E2. El E2 puede ser sintetizado a partir de testosterona o estrona por medio de la aromatasa y 17β-HSD I, respectivamente. De manera similar el E2 puede ser metabolizado a estrona y a sus metabolitos hidroxilados, formas en las que tienen menor actividad. Las enzimas sombreadas en verde se localizan en el retículo endoplásmico, las sombreadas en azul en el citosol.

También se observó que la mayor cantidad de E2 se concentra en la fracción citosólica, tanto en las células control como en las células tratadas con E2 1 y 100 nM. Esto podría deberse a que el E2 sintetizado de manera endógena por enzimas localizadas en el retículo endoplásmico queda libre en el citosol (Hu et al., 2010), y también a que es el primer sitio al que ingresa el E2 exógeno por difusión pasiva para posteriormente distribuirse en los demás compartimientos subcelulares.

Por su parte, en la fracción mitocondrial se observó que la cantidad de E2 incrementó casi tres veces con el tratamiento con E2 1nM; sin embargo, con el tratamiento con E2 100 nM la cantidad de E2 se mantuvo prácticamente igual que con el tratamiento de 1 nM (ver Figura 3). Existen dos posibles explicaciones para esto: la primera es que el E2 cuantificado en las mitocondrias ingresó principalmente unido a los ERs que translocan desde el citosol. Es probable que con el tratamiento con E2 1nM se logren saturar los ERs que translocan a la mitocondria y por ello con el tratamiento con E2 100 nM no se observe mayor cantidad de E2. Cabe mencionar que el incremento de E2 en la mitocondria detectado en el presente trabajo (ver Figura 3) es proporcional al incremento en las cantidades de los mtERs bajo las mismas condiciones

reportados previamente: con el tratamiento con E2 1 nM se observó que los niveles de E2 en la mitocondria incrementaron aproximadamente 2.5 veces con respecto al control, mientras que las cantidades del mtER $\beta$  también incrementaron 2 veces más con respecto al control (Chen et al., 2004a). La segunda explicación sería que, al haber una mayor cantidad de E2 exógeno en la fracción citosólica derivado del tratamiento con E2 100 nM, el metabolismo de esta hormona a otras hormonas como la estrona o a sus metabolitos hidroxilados (e.g. 2 $\alpha$ -hidroxiestradiol) limite la disponibilidad de que el E2 logre ingresar a la mitocondria. La enzima 17 $\beta$ -HSD tipo II se expresa en las células MCF-7 y se encarga de la deshidrogenación del E2, convirtiéndola en estrona, la cual tiene menor actividad estrogénica (Zhang et al., 2019). Así mismo, la aromatasa puede convertir al E2 a testosterona para posteriormente transformarse en dehidrotesterona por acción de la 5 $\alpha$ -reductasa, también expresada en células MCF-7 (Sasano et al., 2008). La dehidrotesterona es un andrógeno no aromatizable, por lo que no se puede revertir su conversión (Macedo et al., 2006). En modelos *in vitro* se ha demostrado que el E2 también puede ser hidroxilado por enzimas de la familia CYP450, la CYP1A1 y CYP1B1, generando los metabolitos 2-hidroxiestradiol y 4-hidroxiestradiol respectivamente, para luego ser metabolizados por las enzimas catecol  $\theta$ -metiltransferasa (COMT) en 2-metoxiestradiol y 4-metoxiestradiol, formas en la que tienen poca o nula afinidad por los ER (Zhu y Conney, 1998). Por lo tanto, las enzimas involucradas en la síntesis y en el metabolismo del E2 podrían también regular las cantidades de dicha hormona en las mitocondrias.

Como parte del protocolo para la cuantificación del E2 unido a los mtER $\alpha$ , primero se corroboró que la técnica de co-inmunoprecipitación sí funcionara para obtener ER $\alpha$  utilizando los aislados mitocondriales obtenidos con el kit "Mitochondrial Isolation Kit for Cultured Cells". Este paso fue muy importante dado que uno de los objetivos de esta tesis fue, precisamente, establecer un protocolo para la cuantificación del E2 unido a mtERs utilizando proteína mitocondrial y no células completas, para lo que está indicado el kit de Co-IP "Dynabeads Co-Immunoprecipitation Kit".

En el análisis por Western blot se observaron bandas correspondientes a los ~55 kDa en las muestras co-inmunoprecipitadas. Dicha banda podría corresponder a una isoforma del ER $\alpha$  presente en la mitocondria, así como en otros compartimientos subcelulares. Esto se apoya en que anteriormente dicha variante también se localizó en fracciones mitocondriales de de hipocampo, corteza e hipotálamo de ratas (Álvarez-Delgado et al., 2010). Sin embargo, también es posible que algún componente del eluyente en el que se obtienen los ER al final de la co-inmunoprecipitación haya alterado la migración de las proteínas durante la electroforesis.

Una vez corroborada la técnica de Co-IP, se procedió a la cuantificación del E2 unido a los mtER $\alpha$ . Para esto, se inmunoprecipitaron los mtER $\alpha$  a partir de volúmenes iguales de proteína mitocondrial total proveniente de células tratadas con E2 1 y 100 nM y no tratadas. Luego se desnaturalizaron para liberar al E2 y poderlo cuantificar. En principio se esperaba que con el tratamiento con E2 exógeno hubiera una mayor cantidad de E2 unido a los mtERs, siendo este un posible mecanismo por el cual el E2 incrementa la producción de ATP (Liao et al., 2019) y el balance antioxidante (Borrás et al., 2010).

En los estudios de Chen, se observó que la cantidad de mtER $\alpha$  y mtER $\beta$  incrementaba significativamente de manera dependiente a la concentración y el tiempo de tratamiento con E2. Específicamente, ellos observaron que las cantidades de mtER $\beta$  incrementaron 2 veces más con el tratamiento con E2 1 nM por 12 horas, mientras que con el tratamiento con E2 100 nM por el mismo tiempo, las cantidades de mtER $\alpha$  y mtER $\beta$  incrementaron 2 y 2.5 veces más, respectivamente (Chen et al., 2004a). En este sentido, se esperaba que hubiera un incremento de E2 unido a los mtER $\alpha$  conforme a los tratamientos con E2 exógeno. Sin embargo, no se observó un aumento en las cantidades de E2 unido a los mtER $\alpha$ . Tanto en condiciones basales como en condiciones de tratamiento con E2 exógeno, se cuantificaron alrededor de 0.40 pg de E2 unido a mtER $\alpha$ /1x10<sup>6</sup> células (ver Figura 5). Estos resultados indican que los mtER $\alpha$  podrían desempeñar principalmente acciones independientes de ligando.

Se ha demostrado que el ER $\alpha$  interactúa con diferentes proteínas mitocondriales en condiciones sin tratamiento con E2 exógeno. Específicamente, se ha reportado que la 17 $\beta$ -HSD Tipo 10, catalizadora de la conversión del E2 a E1, es la única de las once isoformas que se localiza en mitocondria (Jazbutyte et al., 2009). En células HeLa se demostró que el LDB del ER $\alpha$  interactúa con la 17 $\beta$ -HSD tipo 10, siendo esta unión un posible punto de regulación de los niveles de E2 (Jazbutyte et al., 2009). Así mismo, en fracciones mitocondriales de células MCF-7, se demostró que el mtER $\alpha$  interactúa con la ATPsintasa, relacionándolo como una posible vía de regulación bioenergética (Ferrá Molina, 2016). Por su parte, en células MCF-10A, una línea celular epitelial de mama no tumorigénica, se demostró que el ER $\alpha$  interactúa con el MnSOD, una de las enzimas responsables del mantenimiento de O<sub>2</sub><sup>-</sup> mitocondrial, lo que sugiere que esta interacción podría regular el balance antioxidante (Lone et al., 2017). También se ha sugerido que las proteínas de choque térmico (Hsp) podrían estar involucradas en la activación de los ERs. Se sabe que su unión a las Hsp90 las mantiene en un estado inactivo, pero también se ha observado que el ER $\alpha$  se une a Hsp mitocondriales, como la Grp75, a quien se le ha relacionado con la translocación del ER $\alpha$  hacia mitocondria, así como un posible regulador de sus actividades biológicas (Dhamad et al., 2016). Además, se ha demostrado que la Hsp70 mitocondrial interactúa con el mtER $\alpha$  en células MCF-7 (Ferrá Molina, 2016). Por medio de coimmunoprecipitación con purificados mitocondriales, se observó que el mtER $\alpha$



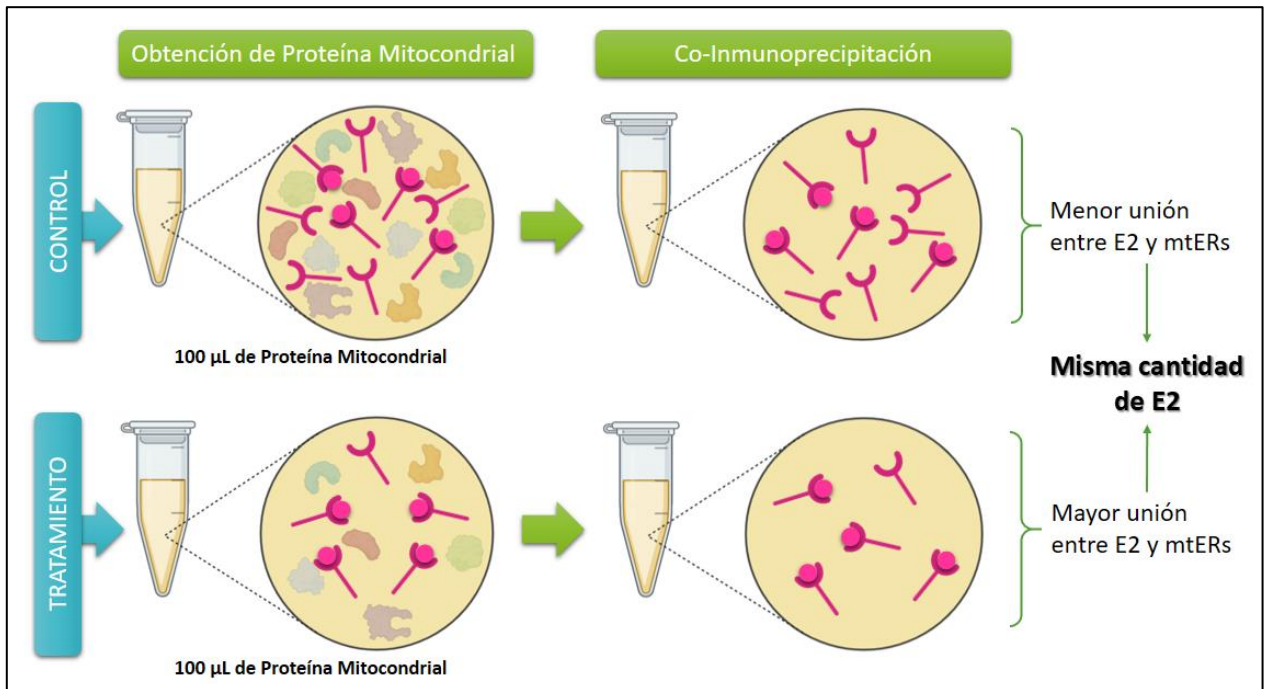
interactúa con la HADHB, una proteína mitocondrial requerida para la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos. Esta interacción podría ser un punto de regulación del metabolismo de lípidos (Zhou et al., 2012). En resumen, es probable que los mtERs, además de tener funciones dependientes de ligando, también desempeñen funciones independientes de ligando por medio de interacciones con otras proteínas.

Por otro lado, nuestros resultados también indican que el E2 presente en la mitocondria permanece en su mayoría libre, es decir, sin unirse a los mtER $\alpha$ . Este E2 en estado libre podría llevar a cabo acciones independientes de receptor. En células de músculo esquelético de ratas ovariectomizadas tratadas con E2 (~1.2  $\mu$ g E2/día), se demostró que la cantidad de dicha hormona incrementó significativamente en la membrana mitocondrial y que dicho aumento modifica la microviscosidad de la misma (Torres et al., 2018). La presencia del E2 se asoció con el incremento de la actividad de los complejos I y III; la fosforilación oxidativa; y la emisión potencial de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hevener et al., 2020).

No obstante, no se descarta que algunas limitantes metodológicas sean la razón por la que no se observó el incremento del E2 unido al mtER $\alpha$ . Como se mencionó anteriormente, la co-inmunoprecipitación de los mtER $\alpha$  se hizo a partir de un mismo volumen de proteína mitocondrial pero, debido a que se obtenía poco volumen de muestra, no se pudo cuantificar la proteína (ver Figura 7). Por lo tanto, es posible que la diferencia en las cantidades de proteína mitocondrial entre las muestras tratadas y no tratadas hayan repercutido directamente en las cantidades de los mtER $\alpha$  inmunoprecipitados y, por ende, también en las cantidades de E2 que tuvieran unido, cuantificando menos E2 aunque hubiera una mayor unión del mismo a los mtER $\alpha$ .

Para descartar que esto esté alterando las cuantificaciones de E2 unido a mtER $\alpha$ , se propone hacer la co-inmunoprecipitación con cantidades iguales de proteína mitocondrial u homogenizar las cantidades de mtER $\alpha$  que se desnaturalizarán para luego cuantificar el E2.

Por último, en el presente trabajo se logró establecer un protocolo para la cuantificación del E2 unido específicamente a los mtERs, sin la interferencia de los ERs citoplasmáticos y nucleares. Este protocolo consistió en la adaptación y ajustes de diferentes métodos establecidos por kits (Anexo A). Primero, con el kit "Mitochondrial Isolation Kit for Cultured Cells" se aislaron las mitocondrias de células tratadas y no tratadas. Esto consistió en lisar las células con un detergente proporcionado por el kit (Reactivo C) y una serie de centrifugaciones. Al final, se obtuvo un precipitado, el cual corresponde a la fracción mitocondrial.



**Figura 7.-** Posible alteración en la cuantificación de E2 por cantidades desiguales de proteína mitocondrial proveniente de células control y tratadas. La co-inmunoprecipitación se hace con volúmenes iguales de proteína mitocondrial, sin embargo no se determinó que fueran cantidades iguales. Dicha diferencia pudo alterar la cuantificación de E2 unido a mtERs.

Las mitocondrias aisladas se lisaron con una solución proporcionada por el kit de co-inmunoprecipitación “Dynabeads Co-Immunoprecipitation Kit” (Buffer IP) para obtener las proteínas mitocondriales. Debido a que el kit de Co-IP indicaba que el buffer IP se añade en proporción 1:9 (por cada mg de células son 9 µL de buffer IP), fue necesario determinar, por diferencia, el peso de la fracción mitocondrial para calcular el volumen de buffer IP con la cual lisar las mitocondrias. Luego de añadir el buffer IP y dejar en hielo 15 minutos, las muestras se centrifugaron a 2600 g por 5 minutos. El sobrenadante contenía las proteínas mitocondriales, a partir de las cuales se co-inmunoprecipitaron los mtER $\alpha$ .

La co-inmunoprecipitación consistió en perlas magnéticas acopladas con anticuerpos anti-ER $\alpha$ , las cuales se incubaron con las proteínas mitocondriales a 4°C durante toda una noche. Durante ese tiempo se permitió la unión de los mtER $\alpha$  a los anticuerpos acoplados a las perlas magnéticas. Luego, mediante una serie de lavados y elución, se obtuvieron los mtER $\alpha$ . En teoría, una porción de los mtER $\alpha$  estaría unida a E2 mientras que la otra no.

Los mtER $\alpha$  se desnaturalizaron a 85°C con el fin de separar el E2 que tuvieran unido. Este paso se hizo para que el E2 estuviera libre y fuera posible cuantificarlo descartando que los mtER $\alpha$  impidieran su detección. El E2 se cuantificó con el kit “Estradiol (E2) Test System AccuBind”. Este kit consistió en placas con estreptavidina adherida. Primero, se añadieron las muestras de E2 unido a mtER $\alpha$  y el reactivo “Estradiol Biotin Reagent”, el cual consiste en IgG anti-E2 acopladas a biotina. La biotina se une fuertemente a la estreptavidina y el E2 de las muestras es reconocido por la IgG anti-E2. Posteriormente se agrega el reactivo “Estradiol Enzyme Reagent”, el cual es E2 conjugado con la enzima HRP, el cual se une a las IgG anti-E2 no unidos a E2 proveniente de muestras. Luego se hacen lavados para remover los excedentes y se añade el sustrato, el cual reacciona con el HRP. Por último, se añade una solución de que detiene la reacción y se determinan absorbancias a 450 nm. La absorbancia es inversamente proporcional a la cantidad de E2 unido a mtER $\alpha$ , es decir, una baja absorbancia indica una mayor cantidad de E2.

Este es el primer protocolo diseñado para la cuantificación de E2 unido específicamente a los mtERs. Así mismo, este protocolo permitió obtener datos que ayuden a caracterizar los efectos del E2 sobre la función mitocondrial.

## Capítulo 5. Conclusiones

---

1. Se corroboró la presencia del ER $\alpha$  en las mitocondrias de células MCF-7 y se cuantificó por primera vez el E2 presente en el citosol y en las mitocondrias de células MCF-7 tratadas y no tratadas con E2 1 y 100 nM por 12 horas.
2. Se observó que con el tratamiento con E2 exógeno a concentraciones cercanas a las fisiológicas (1 nM) las cantidades de E2 incrementan notablemente en la mitocondria. Este resultado es la base para el desarrollo de compuestos mitodirigidos ya que sugiere que, a concentraciones fisiológicas, dichos compuestos ingresarían a las mitocondrias sin necesidad de incrementar las concentraciones de tratamiento, reduciendo potencialmente los costos y eventos adversos.
3. Se cuantificó por primera vez el E2 unido al mtER $\alpha$ , el cual fue de, en promedio, 0.40 pg de E2/1x10<sup>6</sup> células en condiciones control y de tratamiento.
4. se estableció un protocolo para cuantificar el E2 unido a los mtERs. Si bien hay pasos que podrían mejorar el protocolo, este es el primer protocolo diseñado específicamente para este fin.

### 5.1 Perspectivas

1. Determinar la cantidad de E2 unido a los mtER $\alpha$  co-inmunoprecipitados de cantidades iguales de proteína mitocondrial, para descartar interferencia por diferencia en las cantidades de mtER $\alpha$ .
2. Evaluar la unión del E2 al mtER $\beta$  en condiciones basales y de tratamiento con E2 exógeno.
3. Correlacionar los resultados obtenidos con la función mitocondrial tratando a las células con E2 exógeno a las concentraciones en las que se observó una mayor cantidad de dicha hormona en la fracción mitocondrial.

## Literatura citada

---

- Álvarez-Delgado, C. and Cerbón, M. (2011). Receptores a Estrógenos mitocondriales: La señalización hormonal más allá del núcleo. In: I. Camacho Arroyo, J. Morales Montor and J. Velázquez Moctezuma, ed., *Efectos no Reproductivos de Hormonas Esteroides*, 1st ed. Ciudad de México: Sociedad Mexicana de Neuroinmunoendocrinología, pp.1-19.
- Álvarez-Delgado, C., Mendoza-rodríguez, C. A., Picazo, O., Cerbón, M. 2010. Different expression of  $\alpha$  and  $\beta$  mitochondrial estrogen receptors in the aging rat brain : Interaction with respiratory complex V. *Experimental Gerontology*, 45(7–8), 580–585. doi:10.1016/j.exger.2010.01.015
- Arnold, S., Victor, M. B., Beyer, C. 2012. Estrogen and the regulation of mitochondrial structure and function in the brain. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 131(1–2), 2–9. doi:10.1016/j.jsbmb.2012.01.012
- Ascenzi, P., Bocedi, A., Marino, M. 2006. Structure-function relationship of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$ : Impact on human health. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(4), 299–402. doi:10.1016/j.mam.2006.07.001
- Ballinger, S. W. 2005. Mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 38(10), 1278–1295. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2005.02.014
- Barker, J. M., Galea, L. A. M. 2009. Sex and regional differences in estradiol content in the prefrontal cortex, amygdala and hippocampus of adult male and female rats. *General and Comparative Endocrinology*, 164(1), 77–84. doi:10.1016/j.ygcen.2009.05.008
- Barone, I., Brusco, L., Fuqua, S. A. W. 2010. Estrogen receptor mutations and changes in downstream gene expression and signaling. *Clinical Cancer Research*, 16(10), 2702–2708. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-1753
- Borrás, C., Gambini, J., López-Grueso, R., Pallardó, F. V., Viña, J. 2010. Direct antioxidant and protective effect of estradiol on isolated mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1802(1), 205–211. doi:10.1016/j.bbadis.2009.09.007
- Borrás, C., Sastre, J., García-Sala, D., Lloret, A., Pallardó, F. V., Viña, J. 2003. Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(5), 546–552. doi:10.1016/S0891-5849(02)01356-4
- Brailoiu, E., Dun, S. L., Brailoiu, G. C., Mizuo, K., Sklar, L. A., Oprea, T. I., Prossnitz, E. R., Dun, N. J. 2007. Distribution and characterization of estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 in the rat central nervous system. *Journal of Endocrinology*, 193(2), 311–321. doi:10.1677/JOE-07-0017
- Brooks, J. D., Thompson, L. U. 2005. Mammalian lignans and genistein decrease the activities of aromatase and 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in MCF-7 cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 94(5), 461–467. doi:10.1016/j.jsbmb.2005.02.002

- Cammarata, P. R., Flynn, J., Gottipati, S., Chu, S., Dimitrijevic, S., Younes, M., Skliris, G., Murphy, L. C. 2005. Differential expression and comparative subcellular localization of estrogen receptor beta isoforms in virally transformed and normal cultured human lens epithelial cells. *Experimental Eye Research*, 81(2), 165–175. doi:10.1016/j.exer.2005.01.019
- Chen, J. Q., Cammarata, P. R., Baines, C. P., Yager, J. D. 2009. Regulation of mitochondrial respiratory chain biogenesis by estrogens/estrogen receptors and physiological, pathological and pharmacological implications. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1793(10), 1540–1570. doi:10.1016/j.bbamcr.2009.06.001
- Chen, J. Q., Delannoy, M., Cooke, C., Yager, J. D. 2004a. Mitochondrial localization of ER $\alpha$  and ER $\beta$  in human MCF7 cells. *AJP: Endocrinology and Metabolism*, 286(6), E1011–E1022. doi:10.1152/ajpendo.00508.2003
- Chen, J. Q., Esthete, M., Alworth, W. L., Yager, J. D. 2004b. Binding of MCF-7 Cells Mitochondrial Proteins and Recombinant Human Estrogen Receptors  $\alpha$  and  $\beta$  to Human Mitochondrial DNA Estrogen Response Elements. *Journal of Cellular Biochemistry*, 93, 358–373. doi:DOI 10.1002/jcb.20178
- De Almeida Chuffa, L. G., Fioruci-Fontanelli, B. A., Porto-Amorim, E. M., De Arruda Amorim, J. P. 2013. Effects of Estradiol on Male and Female Reproductive Tissues and the Influence of Endocrine Disruptors. En R. Palmeri & S. Grimaudo (Eds.), *Estradiol: Synthesis, Health Effects and Drug Interactions (First Edit)*. Nova Science Publishers: New York. pp. 69–97.
- Dhamad, A. E., Zhou, Z., Zhou, J., Du, Y. 2016. Systematic proteomic identification of the heat shock proteins (Hsp) that interact with estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) and biochemical characterization of the ER $\alpha$ -Hsp70 interaction. *PLoS ONE*, 11(8), 1–19. doi:10.1371/journal.pone.0160312
- Epstein, F. H., Clemons, M., Goss, P. 2001. Estrogen and the risk of Breast Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 344(25), 276–285. de www.nejm.org
- Felty, Q., Roy, D. 2005. Estrogen, mitochondria, and growth of cancer and non-cancer cells. *Journal of Carcinogenesis*, 4, 1–18. doi:10.1186/1477-3163-4-1
- Ferrá Molina, A. 2016. Interacción entre los receptores a estrógenos mitocondriales y la ATP sintasa en células de cáncer de mama. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 47 pp.
- Filardo, E. J., Thomas, P. 2012. Minireview: G protein-coupled estrogen receptor-1, GPER-1: Its mechanism of action and role in female reproductive cancer, renal and vascular physiology. *Endocrinology*, 153(7), 2953–2962. doi:10.1210/en.2012-1061
- González Hernández, Á. 2014. Hormonas Sexuales. En E. Alegre Martínez, I. Monreal Marquiegui, C. Mugueta Uriaque, P. Restituto Aranguibel, & N. Varo Cenarruzabeitia (Eds.), *Principios de Bioquímica Clínica y Patología Molecular (Segunda Ed)*. Elsevier: Barcelona, España. (pp. 253–263).
- Gourdy, P., Guillaume, M., Fontaine, C., Adlanmerini, M., Montagner, A., Laurell, H., Lenfant, F., Arnal, J. F.

2018. Estrogen receptor subcellular localization and cardiometabolism. *Molecular Metabolism*, 15, 56–69. doi:10.1016/j.molmet.2018.05.009
- Green, S., Stack, G., Berry, M., Jin, J. R., Chambon, P. 1987. Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell*, 51, 941–951.
- Guillette, T. C., Jackson, T. W., Belcher, S. M. 2018. Duality of estrogen receptor  $\beta$  action in cancer progression. *Current Opinion in Pharmacology*, 41, 66–73. doi:10.1016/j.coph.2018.05.001
- Guo, J., Krause, D. N., Horne, J., Weiss, J. H., Li, X., Duckles, S. P. 2010. Estrogen-receptor-mediated protection of cerebral endothelial cell viability and mitochondrial function after ischemic insult in vitro. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 30(3), 545–554. doi:10.1038/jcbfm.2009.226
- Gupte, A. A., Pownall, H. J., Hamilton, D. J. 2015. 916585. 2015.
- Haldosén, L. A., Zhao, C., Dahlman-Wright, K. 2014. Estrogen receptor beta in breast cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 382(1), 665–672. doi:10.1016/j.mce.2013.08.005
- Hall, J. M., Couse, J. F., Korach, K. S. 2001. The Multifaceted Mechanisms of Estradiol and Estrogen Receptor Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 276(40), 36869–36872. doi:10.1074/jbc.R100029200
- Harada, N. 1999. Aromatase and intracrinology of estrogen in hormone-dependent tumors. *Oncology*, 57(SUPPL. 2), 7–15. doi:10.1159/000055270
- Härkönen, P. L., Mäkelä, S. I. 2004. Role of estrogens in development of prostate cancer. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 92(4), 297–305. doi:10.1016/j.jsbmb.2004.10.016
- Hess, R. A. 2000. Oestrogen in fluid transport in efferent ducts of the male reproductive tract. *Reviews of Reproduction*, 5(2), 84–92. doi:10.1530/ror.0.0050084
- Hevener, A. L., Ribas, V., Moore, T. M., Zhou, Z. 2020. The Impact of Skeletal Muscle ER $\alpha$  on Mitochondrial Function and Metabolic Health. *Endocrinology (United States)*, 161(2), 1–16. doi:10.1210/endocr/bqz017
- Hu, J., Zhang, Z., Shen, W., Azhar, S. 2010. Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. *Nutrition & Metabolism*, 7(47), 1–25. doi:10.1186/1743-7075-7-47
- Hutson, D. D., Gurralla, R., Ogola, B. O., Zimmerman, M. A., Mostany, R., Satou, R., Lindsey, S. H. 2019. Estrogen receptor profiles across tissues from male and female *Rattus norvegicus*. *Biology of Sex Differences*, 10(1), 1–13. doi:10.1186/s13293-019-0219-9
- Jazbutyte, V., Kehl, F., Neyses, L., Pelzer, T. 2009. Estrogen receptor alpha interacts with 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 10 in mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 384(4), 450–454. doi:10.1016/j.bbrc.2009.04.139

- Jia, M., Dahlman-Wright, K., Gustafsson, J. Å. 2015. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, 29(4), 557–568. doi:10.1016/j.beem.2015.04.008
- Johann, S., Dahm, M., Kipp, M., Beyer, C., Arnold, S. 2010. Oestrogen regulates mitochondrial respiratory chain enzyme transcription in the mouse spinal cord. *Journal of Neuroendocrinology*, 22(8), 926–935. doi:10.1111/j.1365-2826.2010.02006.x
- Johri, A., Beal, M. F. 2012. Mitochondrial Dysfunction in Neurodegenerative Diseases. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 342(3), 619–630.
- Junqueira, L. C., Carneiro, J. 2015. Sistema Endócrino. En *Histología Básica: Texto y Atlas* (Doceava Ed). Editorial Médica Panamericana: Ciudad de México, México. pp. 386–409.
- Kian Tee, M., Rogatsky, I., Tzagarakis-Foster, C., Cvorovic, A., An, J., Christy, R. J., Yamamoto, K. R., Leitman, D. C. 2004. Estradiol and Selective Estrogen Receptor Modulators Differentially Regulate Target Genes with Estrogen Receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Molecular Biology of the Cell*, 15(3), 1262–1272. doi:10.1091/mbc.e03-06-0360
- Kipp, J. L., Ramirez, V. D. 2001. Effect of Estradiol, Diethylstilbestrol, and Resveratrol on F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase Activity from Mitochondrial Preparations of Rat Heart, Liver, and Brain. 15(2), 165–175.
- Klinge, C. M. 2001. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Research*, 29(14), 2905–2919.
- Klinge, C. M. 2008. Estrogenic control of mitochondrial function and biogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 105(6), 1342–1351. doi:10.1002/jcb.21936
- Klinge, C. M. 2013. Estrogenic control of mitochondrial function and biogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 23(5), 223–233. doi:10.1002/jcb.21936.Estrogenic
- Li, L., Wang, Q., Lv, X. 2014. Expression and Localization of Estrogen Receptor in Human Breast Cancer and Its Clinical Significance. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 71, 63–68. doi:10.1007/s12013-014-0163-6
- Liao, T. L., Lee, Y. C., Tzeng, C. R., Wang, Y. P., Chang, H. Y., Lin, Y. F., Kao, S. H. 2019. Mitochondrial translocation of estrogen receptor  $\beta$  affords resistance to oxidative insult-induced apoptosis and contributes to the pathogenesis of endometriosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 134(October 2018), 359–373. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.022
- Lin, A. H. Y., Li, R. W. S., Ho, E. Y. W., Leung, G. P. H., Leung, S. W. S., Vanhoutte, P. M., Man, R. Y. K. 2013. Differential Ligand Binding Affinities of Human Estrogen Receptor- $\alpha$  Isoforms. *PLoS ONE*, 8(4), 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0063199
- Liou, C.-M., Yang, A.-L., Kuo, C.-H., Tin, H., Huang, C.-Y., Lee, S.-D. 2010. Effects of 17 $\beta$ -estradiol on cardiac apoptosis in ovariectomized rats. *Cell biochemistry and function*, 28(6), 521–528.



doi:10.1249/01.mss.0000354641.25598.e1

- Liu, Z., Gou, Y., Zhang, H., Zuo, H., Zhang, H., Liu, Z., Yao, D. 2014. Estradiol improves cardiovascular function through up-regulation of SOD2 on vascular wall. *Redox Biology*, 3, 88–99. doi:10.1016/j.redox.2014.11.001
- Lone, M. U. D., Baghel, K. S., Kanchan, R. K., Shrivastava, R., Malik, S. A., Tewari, B. N., Tripathi, C., Negi, M. P. S., Garg, V. K., Sharma, M., Bhatt, M. L. B., Bhadauria, S. 2017. Physical interaction of estrogen receptor with MnSOD: Implication in mitochondrial O<sub>2</sub>- upregulation and mTORC2 potentiation in estrogen-responsive breast cancer cells. *Oncogene*, 36(13), 1829–1839. doi:10.1038/onc.2016.346
- Luft, R. 1995. The development of mitochondrial medicine. *BBA - Molecular Basis of Disease*, 1271(1), 1–6. doi:10.1016/0925-4439(95)00002-L
- Macedo, L. F., Guo, Z., Tilghman, S. L., Sabnis, G. J., Qiu, Y., Brodie, A. 2006. Role of androgens on MCF-7 breast cancer cell growth and on the inhibitory effect of letrozole. *Cancer Research*, 66(15), 7775–7782. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3984
- Maggi, A. 2011. Liganded and unliganded activation of estrogen receptor and hormone replacement therapies. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1812(8), 1054–1060. doi:10.1016/j.bbadis.2011.05.001
- Mcbennett, S. M., Andrews, J. F., Puerta, M., Rocha, M., Gonza, S. 1998. Changes in cytochrome oxidase activity in brown adipose tissue during oestrous cycle in the rat. *European Journal of Endocrinology*, 139, 433–437.
- Milanesi, L., Vasconsuelo, A., de Boland, A. R., Boland, R. 2009. Expression and subcellular distribution of native estrogen receptor  $\beta$  in murine C2C12 cells and skeletal muscle tissue. *Steroids*, 74(6), 489–497. doi:10.1016/j.steroids.2009.01.005
- Monje, P., Boland, R. 2001. Subcellular distribution of native estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  isoforms in rabbit uterus and ovary. *Journal of Cellular Biochemistry*, 82(3), 467–479. doi:10.1002/jcb.1182
- Moore, J. T., McKee, D. D., Slentz-Kesler, K., Moore, L. B., Jones, S. A., Horne, E. L., Su, J. L., Kliewer, S. A., Lehmann, J. M., Willson, T. M. 1998. Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 247(1), 75–78. doi:10.1006/bbrc.1998.8738
- Oo, P. S., Yamaguchi, Y., Sawaguchi, A., Kyaw, M. T. H., Chojookhuu, N., Ali, M. N., Srisowanna, N., Hino, S. I., Hishikawa, Y. 2018. Estrogen regulates mitochondrial morphology through phosphorylation of dynamin-related protein 1 in MCF7 human breast cancer cells. *Acta Histochemica et Cytochemica*, 51(1), 21–31. doi:10.1267/ahc.17034
- Parker Jr, W. D., Parks, J. K., Swerdlow, R. H. 2009. Complex I Deficiency in Parkinson's Disease Frontal Cortex. *National Institutes Of Health*, 16(434), 215–218.

- Paumard, P., Vaillier, J., Couлары, Â., Schaeffer, J., Soubannier, V., Mueller, D. M., Rago, J., Velours, J. 2002. The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *The EMBO Journal*, 21(3), 221–230. doi:<https://doi.org/10.1093/emboj/21.3.221>
- Pedram, A., Razandi, M., Wallace, D. C., Levin, E. R. 2006. Functional Estrogen Receptors in the Mitochondria of Breast Cancer Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 17(May), 2125–2137. doi:<http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E05-11-1013>
- Prossnitz, E. R., Arterburn, J. B., Smith, H. O., Oprea, T. I., Sklar, L. A., Hathaway, H. J. 2008. Estrogen Signaling through the Transmembrane G Protein–Coupled Receptor GPR30. *Annual Review of Physiology*, 70(1), 165–190. doi:10.1146/annurev.physiol.70.113006.100518
- Razandi, M., Pedram, A., Greene, G. L., Levin, E. R., L, D. E. E. R., Ben, T. 1999. Cell Membrane and Nuclear Estrogen Receptors ( ERs ) Originate from a Single Transcript : Studies of ER  $\alpha$  and ER $\beta$  Expressed in Chinese Hamster Ovary Cells. *Molecular Endocrinology*, 13(2), 307–319. doi:[doi:10.1210/mend.13.2.0239](https://doi.org/10.1210/mend.13.2.0239)
- Razmara, A., Sunday, L., Stirone, C., Wang, X. B., Krause, D. N., Sue, P., Procaccio, V. 2008. Mitochondrial effects of estrogen are mediated by estrogen receptor alpha in brain endothelial cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 325(3), 782–790. doi:10.1124/jpet.107.134072.Mitochondrial
- Ribas, V., Drew, B. G., Zhou, Z., Phun, J., Kalajian, N. Y., Soleymani, T., Daraei, P., Widjaja, K., Wanagat, J., Vallim, T. Q. D. A., Fluitt, A. H., Bensinger, S., Le, T., Radu, C., Whitelegge, J. P., Beaven, S. W., Tontonoz, P., Lusic, A. J., ... Hevener, A. L. 2016. Skeletal muscle action of estrogen receptor  $\alpha$  is critical for the maintenance of mitochondrial function and metabolic homeostasis in females. *Science Translational Medicine*, 8(334), 1–21. doi:10.1126/scitranslmed.aad3815
- Romano, S. N., Gorelick, D. A. 2018. Crosstalk between nuclear and G protein-coupled estrogen receptors. *General and Comparative Endocrinology*, 261, 190–197. doi:10.1016/j.ygcen.2017.04.013
- Sasano, H., Suzuki, T., Miki, Y., Moriya, T. 2008. Intracrinology of estrogens and androgens in breast carcinoma. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 108(3–5), 181–185. doi:10.1016/j.jsbmb.2007.09.012
- Schiavon Ermani, R., Lira Albarrán, S., Larrea Gallo, F. 2016. Ovarios. En J. L. Morales Saavedra (Ed.), *Endocrinología Clínica de Dorantes y Martínez (Quinta Edición)*. Editorial El Manual Moderno: Distrito Federal, México. pp. 713–724.
- Schulz, P., Link, T. A., Chaudhuri, L., Fittier, F. 1990. Role of the Mitochondrial bc1-Complex in the Cytotoxic Action of Diethylstilbestrol-Diphosphate toward Prostatic Carcinoma Cells. *American Association for Cancer Research*, 50, 5008–5013.
- Schwartz, N., Verma, A., Bivens, C. B., Schwartz, Z., Boyan, B. D. 2016. Rapid steroid hormone actions via membrane receptors. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1863(9), 2289–2298. doi:10.1016/j.bbamcr.2016.06.004

- Sheldahl, L., Shapiro, R., Bryant, D., Koerner, I., Dorsa, D. 2008. Estrogen induces rapid translocation of ER $\beta$ , but not ER $\alpha$ , to the neuronal plasma membrane. *Neuroscience*, 15(3), 751–761. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.02.035. Estrogen
- Simon, D. K., Johns, D. R. 1999. Mitochondrial Disorders: Clinical and Genetic Features. *Annual Review of Medicine*, 50(1), 111–127. doi:10.1146/annurev.med.50.1.111
- Simpkins, J. W., Rajakumar, G., Zhang, Y.-Q., Simpkins, C. E., Greenwald, D., Yu, C. J., Bodor, N., Day, A. L. 1997. Estrogens may reduce mortality and ischemic damage caused by middle cerebral artery occlusion in the female rat. *Journal of Neurosurgery*, 87(5), 724–730. doi:10.3171/jns.1997.87.5.0724
- Simpkins, J. W., Yang, S., Sarkar, S. N., Pearce, V. 2008. Estrogen Actions on Mitochondria-Physiological and Pathological Implications. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 13(290), 51–59. doi:10.1016/j.mce.2008.04.013.
- Simpson, E., Rubin, G., Clyne, C., Robertson, K., O'Donnell, L., Jones, M., Davis, S. 2000. The role of local estrogen biosynthesis in males and females. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 11(5), 184–188. doi:10.1016/S1043-2760(00)00254-X
- Solakidi, S., Psarra, A. M. G., Nikolaropoulos, S., Sekeris, C. E. 2005. Estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  (ER $\alpha$  and ER $\beta$ ) and androgen receptor (AR) in human sperm: Localization of ER $\beta$  and AR in mitochondria of the midpiece. *Human Reproduction*, 20(12), 3481–3487. doi:10.1093/humrep/dei267
- Song, R. X., Barnes, C. J., Zhang, Z., Bao, Y., Kumar, R., Santen, R. J. 2004. The role of Shc and insulin-like growth factor 1 receptor in mediating the translocation of estrogen receptor  $\alpha$  to the plasma membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(7), 2076–2081. doi:10.1073/pnas.0308334100
- Sonne-Hansen, K., Lykkesfeldt, A. E. 2005. Endogenous aromatization of testosterone results in growth stimulation of the human MCF-7 breast cancer cell line. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 93(1), 25–34. doi:10.1016/j.jsbmb.2004.11.005
- Thomson, M. 2002. Evidence of undiscovered cell regulatory mechanisms: Phosphoproteins and protein kinases in mitochondria. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59(2), 213–219. doi:10.1007/s00018-002-8417-7
- Torres, M. J., Kew, K. A., Ryan, T. E., Pennington, E. R., Lin, C. Te, Buddo, K. A., Fix, A. M., Smith, C. A., Gilliam, L. A., Karvinen, S., Lowe, D. A., Spangenburg, E. E., Zeczycki, T. N., Shaikh, S. R., Neuffer, P. D. 2018. 17 $\beta$ -Estradiol Directly Lowers Mitochondrial Membrane Microviscosity and Improves Bioenergetic Function in Skeletal Muscle. *Cell Metabolism*, 27(1), 167–179.e7. doi:10.1016/j.cmet.2017.10.003
- Trimmer, P. A., Swerdlow, R. H., Parks, J. K., Keeney, P., Bennett, J. P., Miller, S. W., Davis, R. E., Parker, W. D. 2000. Abnormal Mitochondrial Morphology in Sporadic Parkinson ' s and Alzheimer ' s Disease Cybrid Cell Lines. *Experimental Neurology*, 162(1), 37–50. doi:10.1006/exnr.2000.7333

- Tuquet, C., Dupont, J., Mesneau, A., Roussaux, J. 2000. Effects of tamoxifen on the electron transport chain of isolated rat liver mitochondria. *Cell Biology and Toxicology*, 16(4), 207–219. doi:10.1023/A:1007695308257
- Vijay, V., Han, T., Moland, C. L., Kwekel, J. C., Fuscoe, J. C., Desai, G. 2015. Sexual Dimorphism in the Expression of Mitochondria-Related Genes in Rat Heart at Different Ages. *PLoS ONE*, 10(1), 1–18. doi:10.1371/journal.pone.0117047
- Wang, J., Green, P. S., Simpkins, J. W. 2001. Estradiol protects against ATP depletion , mitochondrial membrane potential decline and the generation of reactive oxygen species induced by 3-nitropropionic acid in SK-N-SH human neuroblastoma cells. *Journal of Neurochemistry*, 77, 804–811.
- Wang, X., Simpkins, J. W., Dykens, J. A., Cammarata, P. R. 2003. Oxidative Damage to Human Lens Epithelial Cells in Culture : Estrogen Protection of Mitochondrial Potential , ATP , and Cell Viability AND. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 44(5), 2067–2075. doi:10.1167/iovs.02-0841
- Wasilewski, M., Scorrano, L. 2009. The changing shape of mitochondrial apoptosis. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 20(6), 287–294. doi:10.1016/j.tem.2009.03.007
- Xu, X., Veenstra, T. D. 2012. Concentration of endogenous estrogens and estrogen metabolites in the NCI-60 human tumor cell lines. *Genome Medicine*, 4(4), BB. doi:10.1186/gm330
- Yang, S.-H., Liu, R., Perez, E. J., Wen, Y., Stevens, S. M., Valencia, T., Brun-Zinkernagel, A.-M., Prokai, L., Will, Y., Dykens, J., Koulen, P., Simpkins, J. W. 2004. Mitochondrial localization of estrogen receptor . *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(12), 4130–4135. doi:10.1073/pnas.0306948101
- Zhang, C. Y., Calvo, E. L., Yang, C. Q., Liu, J., Sang, X. Y., Lin, S. X. 2019. Transcriptome of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 plays both hormone-dependent and hormone-independent roles in MCF-7 breast cancer cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 195(July). doi:10.1016/j.jsbmb.2019.105471
- Zhou, Z., Zhou, J., Du, Y. 2012. Estrogen receptor alpha interacts with mitochondrial protein HADHB and affects beta-oxidation activity. *Molecular and Cellular Proteomics*, 11(7), 1–12. doi:10.1074/mcp.M111.011056
- Zhu, B. T., Conney, A. H. 1998. Is 2-methoxyestradiol an endogenous estrogen metabolite that inhibits mammary carcinogenesis? *Cancer Research*, 58(11), 2269–2277.

Anexo

Anexo A:

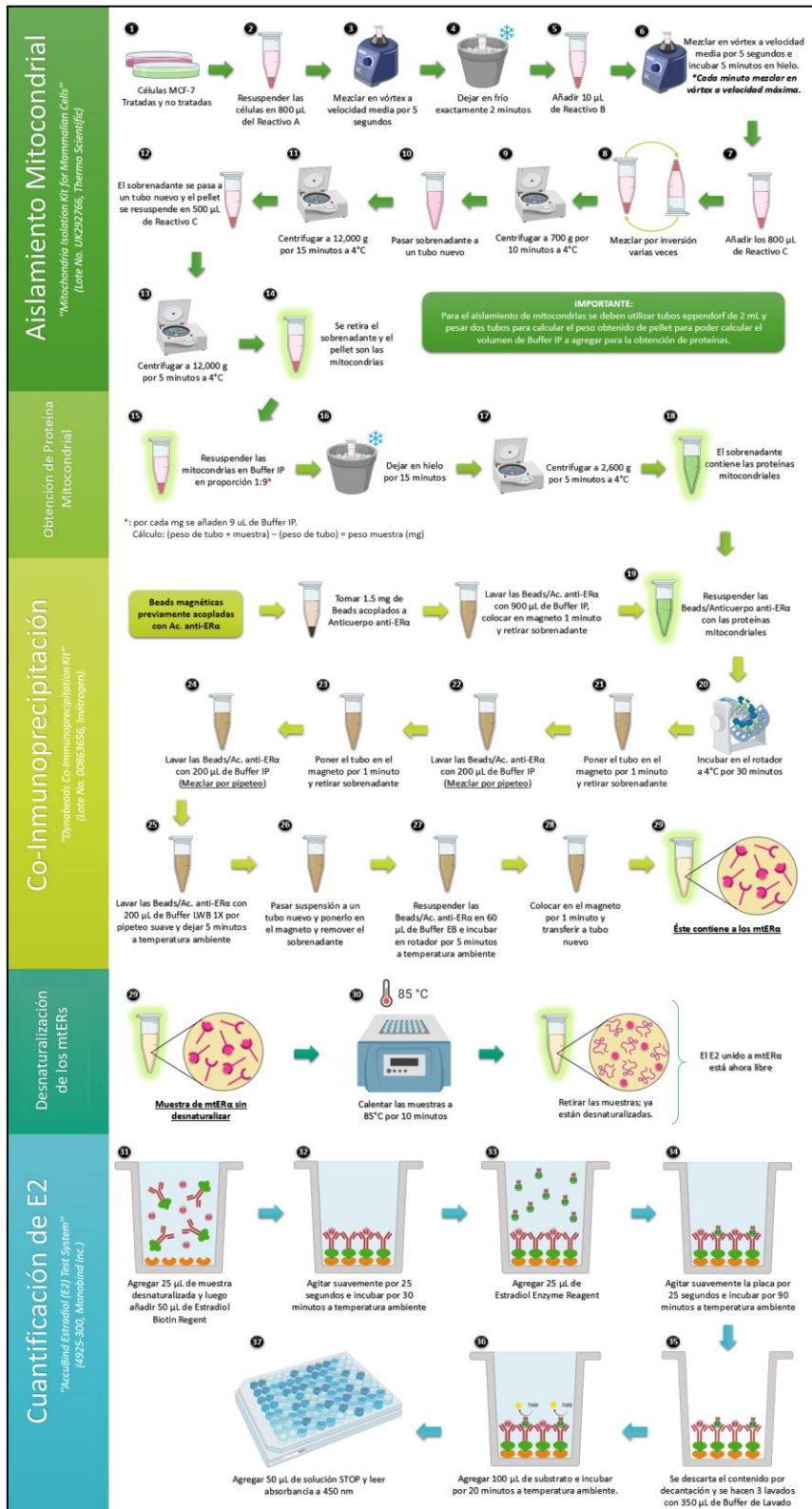


Figura 8. Protocolo para la cuantificación del E2 unido a mtERs.