La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

CICESE @ 2023. Todos los derechos reservados

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 Nanotecnología

Evaluación de la acumulación mitocondrial de estrógenos sintéticos mito-dirigidos en un modelo in vitro

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

Presenta:

Magdiel Orozco Valdivia

Ensenada, Baja California, México 2023 Tesis defendida por

Magdiel Orozco Valdivia

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Carolina Álvarez Delgado Codirectora de tesis Dra. Kanchan Chauhan Codirectora de tesis

Dr. Aldo Moreno Ulloa

Dra. Paulina Segovia Olvera



Dr. Edgardo Alfredo Sepúlveda Sánchez Hidalgo Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

> Dra. Ana Denise Re Araujo Directora de Estudios de Posgrado

 $\label{eq:copyright} @ 2023, {\rm Todos} ~ {\rm los} ~ {\rm Derechos} ~ {\rm Reservados}, {\rm CICESE} \\ {\rm Prohibida} ~ {\rm su} ~ {\rm reproducción} ~ {\rm parcial} ~ {\rm o} ~ {\rm total} ~ {\rm sin} ~ {\rm la} ~ {\rm autorización} ~ {\rm por} ~ {\rm escrito} ~ {\rm del} ~ {\rm CICESE} \\ \end{array}$

Resumen de la tesis que presenta **Magdiel Orozco Valdivia** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación de Biomedicina y Nanotecnología

Evaluación de la acumulación mitocondrial de estrógenos sintéticos mito-dirigidos en un modelo in vitro

Resumen aprobado por:

Dra. Carolina Álvarez Delgado Codirectora de tesis Dra. Kanchan Chauhan Codirectora de tesis

La mitocondria es un organelo que cumple funciones esenciales en el mantenimiento de las células eucariotas y su disfunción está asociada a la progresión de enfermedades neurodegenerativas, metabólicas y cardiovasculares. Por lo anterior es necesario encontrar tratamientos que mejoren la función mitocondrial. Los estrógenos son hormonas que tienen diversos efectos benéficos sobre las células. Entre estos efectos, se ha observado que las hormonas inciden en la función mitocondrial, por lo que son un potencial tratamiento para las enfermedades asociadas a la disfunción mitocondrial. Una alternativa es mediante los compuestos mito-dirigidos, moléculas con actividad biológica que son acoplados a cationes lipofílicos con la capacidad de acumularse a mayor concentración en la mitocondria respecto a las sustancias no mito-dirigidas. Por lo tanto, se plantea conferir la propiedad acumulativa a los estrógenos mediante el acoplamiento de trifenilfosfonio, un catión lipofílico recurrentemente usado para la generación de mito-dirigidos. Para el presente trabajo se sintetizaron dos estrógenos mito-dirigidos. Este proyecto evalúa la acumulación mitocondrial de los estrógenos mito-dirigidos después de una exposición de estos en un modelo in vitro sensible a estrógenos, comparando su acumulación con la del estrógeno no mito-dirigido. Los resultados indican que los estrógenos mito-dirigidos se acumulan más en las mitocondrias que el estrógeno no mito-dirigido y demuestra que los estrógenos mito-dirigidos tienen capacidad acumulativa, esto permite sentar las bases de un tratamiento hormonal dirigido a las mitocondrias que se pueda aplicar a enfermedades asociadas a la disfunción mitocondrial.

Palabras clave: estrógenos, mito-dirigido, disfunción mitocondrial, acumulación, mitocondria

Abstract of the thesis presented **by Magdiel Orozco Valdivia** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in biomedical innovation and nanotechnology

Evaluation of mitochondrial accumulation of mito-targeted synthetic estrogens on in vitro model

Abstract approved by:

Dra. Carolina Álvarez Delgado Thesis co-director Dra. Kanchan Chauhan Thesis co-director

Mitochondria are essential organelles of eukaryotic cells, and their dysfunction is associated with the onset and development of neurodegenerative, metabolic, and cardiovascular diseases. Thus, it is important to develop treatments to improve mitochondrial function. One of the options are estrogens, these hormones have a protective role in cellular function by participating in the regulation of mitochondrial function, making estrogens candidates to be a potential treatment for diseases related to mitochondrial dysfunction. One of the alternative treatments are mito-targeted molecules, which are biologically active molecules conjugated with lipophilic cations. These mito-targeted molecules can accumulate inside mitochondria more than non-targeted molecules. This project aims to synthesize mito-targeted estrogens by conjugating a lipophilic cation, triphenylphosphonium, to a parent estrogenic compound. Our hypothesis is that these novel molecules will accumulate in the interior of the mitochondria and will have more biological activity than the non-targeted estrogen. We synthesized two mito-targeted estrogens for this project and evaluated the mitochondrial accumulation in an estrogen-sensitive in vitro model, comparing their accumulation to non-targeted estrogens. The results indicate mito-targeted estrogens accumulate in mitochondria more than the non-targeted estrogens, showing that mito-targeted estrogens have an accumulation capacity. This insight will make new treatments for diseases related to mitochondrial dysfunction.

A Eugenio,

Por ser un gran compañero de vida; por celebrar junto a mí las victorias en los días felices y

por darme todo su apoyo y amor incondicional en los días difíciles.

A mi familia,

A mi padre, madre y hermana; por saber soltarme en el momento adecuado, por observar y celebrar

con orgullo mi crecimiento profesional y personal.

A la ciencia,

Que este trabajo aporte su granito de arena al progreso de la humanidad.

Agradecimientos

Quiero agradecer al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) con la beca de manutención núm. 29369, con este apoyo pude entregar mi tiempo y dedicación a esta investigación. Asimismo, agradezco al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) por brindarme las instalaciones y materiales para desarrollarme profesionalmente.

Quiero agradecer a Eugenio, mi esposo, que con sus comentarios y consejos me ayudaron a mejorar la redacción de mi tesis. Siempre teniendo en cuenta la separación de nuestra vida personal y profesional.

A mi familia, por alentarme a seguir adelante con mi trabajo y recordarme de el por qué estoy trabajando en esto.

A la Dra. Carolina Álvarez, por tutorarme con paciencia y amabilidad, por orientarme cuando perdía el objetivo de mi trabajo y por formarme como colega.

A la Dra. Kanchan Chauhan, por brindarme su conocimiento y experiencia con amabilidad en áreas poco exploradas para mí.

Al Dr. Aldo Moreno por su incondicional apoyo y aportación a este trabajo, por orientarme con paciencia y por corregirme cuando era necesario.

A la Dra. Paulina Segovia, por su amabilidad al preguntar dudas que me permitieron explorar la esencia de la biología.

A mis compañeros de laboratorio y amigos (A.K.A. "Mitoteam"), Geovanni e Isaí, por sus innumerables consejos técnicos y personales que fueron esenciales para el desarrollo de mi trabajo. A Monse, la experta en Western Blot, por ayudarme con todas mis dudas acerca de esta técnica indomable. A mis compañeros Rommel, Alan y Paloma que con su experiencia me ayudaron a dominar distintas técnicas utilizadas en este trabajo.

Tabla de contenido

Resumen en español	ii
Resumen en inglés	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Lista de Figuras	viii
Lista de Tablas	xi
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Antecedentes	2
1.1.1 El rol fundamental de la mitocondria en la integridad celular	2
1.1.2 Las hormonas estrógenos y su actividad celular	3
1.1.3 Estrógenos y su función en la mitocondria.	4
1.1.4 Una nueva alternativa, los mito-dirigidos	6
1.1.5 Estrógenos como mito-dirigidos	8
1.2 Justificación	9
1.3 Hipótesis	9
1.4 Objetivos	10
1.4.1 Objetivo general	10
1.4.2 Objetivos específicos	10
Capítulo 2. Metodología	11
2.1 Cultivo de una línea celular sensible a estrógenos	11
2.2 Evaluación de la viabilidad celular de la línea celular sensible a estrógenos mito-dirigidos	s 11
2.3 Detección y cuantificación de los estrógenos mito-dirigidos por LC-MS/MS mediante dilu estándar	ciones 12
2.4 Preparación de las muestras para inyección a LC-MS/MS	13
2.5 Parámetros de adquisición de datos por LC-MS/MS.	13

2.6 Evaluació dirigidos	ón del coeficiente de acumulación de los estrógenos mito-dirigidos respecto a no mito-
2.6.1 Dilu	ciones
2.6.2 Trat	amientos
2.6.3 Frac cito	ccionamiento subcelular para la obtención de las fracciones enriquecidas nucleares, sólicas y mitocondriales tratadas con estrógenos mito-dirigidos
2.6.4 Extr	acción de los estrógenos mito-dirigidos a partir de las fracciones subcelulares 16
2.6.5 Prep date	paración de las muestras para inyección a LC-MS/MS y parámetros de adquisición de os
2.7 Corrobor	ación del fraccionamiento subcelular 17
2.8 Análisis e	estadísticos
Capítulo 3.	Resultados
3.1 Resultade	os de establecimiento de línea celular sensible a estrógenos
3.2 Resultad	os de viabilidad celular de línea celular MCF-7 tratadas con estrógenos mito-dirigidos. 20
3.2.1 Viab	oilidad celular de línea celular MCF-7 expuestas a MitoEE2
3.2.2 Viab	oilidad celular de línea celular MCF-7 expuestas a MitoE2
3.3 Resultado estándar	os de la detección de los estrógenos mito-dirigidos por LC-MS/MS mediante diluciones r
3.4 Resultado de las fra	os preliminares de la extracción e inyección de los estrógenos mito-dirigidos a partir acciones subcelulares
3.5 Resultado mito-diri	os de la evaluación del coeficiente de acumulación mitocondrial de los estrógenos igidos
3.6 Corrobor	ación del fraccionamiento subcelular
Capítulo 4.	Discusión
Capítulo 5.	Conclusiones
Literatura citad	da 43
Anexos	

Lista de figuras

Figura 1. Vías de señalización de los estrógenos en la célula. Modificado de Fuentes & Sylveira, 2019 en Biorender, 20234
Figura 2: Rol de E2 en la mitocondria. Modificado de Shaw, 20215
Figura 3. Estructura de TPP+, su internalización y acumulación en la mitocondria. Modificada de Smith et al. 20037
Figura 4. Estructura de los estrógenos. A) 17α-Etinil estradiol, B) 17β-Estradiol. Imágenes modificadas de 17 β-estradiol y 17 α-etinil estradiol obtenido en NovoPro mediante SMILES canónico, 2023.8
Figura 5. Propuesta de estructura de los estrógenos mito-dirigidos. A) Estrógeno mito-dirigido derivado de EE2: mito-etinil-estradiol o "MitoEE2". B) Estrógeno mito-dirigido derivado de E2: mito- estradiol o "MitoE2"
Figura 6. Fotografía de la línea celular MCF-7 a una confluencia de 40%, A) fotografía a 4X, B) fotografía a 10X
Figura 7. Fotografías a 20X de células MCF-7 expuestas a MitoEE2 a las 12 hrs
Figura 8. Fotografías a 20X de células MCF-7 expuestas a MitoEE2 a las 24 hrs 21
Figura 9. Viabilidad celular (%) de MCF-7 a las 6 hrs de exposición de MitoEE2 a 1, 10 y 100 nM. Viabilidad normalizada con el vehículo. Datos analizados por medio de ANOVA de una vía con prueba Tukey y desviación estándar mostrada
Figura 10. Viabilidad celular de MCF-7 e IC50. A) Viabilidad celular (%) de MCF-7 a las 12 hrs de exposición de MitoEE2 a 1, 10, 100, 250 y 500 nM. B) Inhibición celular (%) e IC50 de MitoEE2 a las 12 hrs. Viabilidad e inhibición normalizada con el vehículo. Datos analizados por medio de ANOVA de una vía con prueba Tukey y desviación estándar mostrada
 Figura 11. A) Viabilidad celular (%) de MCF-7 a las 24 hrs de exposición de MitoEE2 a 1, 10, 100, 250 y 500 nM. B) Inhibición celular (%) e IC50 de MitoEE2 a las 24 hrs. Viabilidad celular e inhibición normalizada con el vehículo. Datos analizados por medio de ANOVA de una vía con prueba Tukey y desviación estándar mostrada.
Figura 12. Viabilidad celular (%) de MCF-7 a las 12 y 24 hrs de exposición de MitoEE2 a 0.1 nM, 0.25 nM, 0.5 nM, 0.75 nM y 1 nM. A) Viabilidad celular (%) a las 12 hrs de exposición B) Viabilidad celular (%) a las 24 hrs de exposición. Viabilidad celular e inhibición normalizada con el vehículo. Datos analizados por medio de ANOVA de una vía con prueba Tukey y desviación estándar mostrada.
Figura 13. Fotografías a 20X de células MCF-7 expuestas a MitoE2 a las 12 hrs

ix

- Figura 15. Viabilidad celular (%) de células MCF-7 expuestas a MitoE2 a 1, 10, 100, 250 y 500 nM. A)
 Viabilidad celular a las 12 hrs. B) Viabilidad celular a las 24 hrs. Datos normalizados con el vehículo. Datos analizados por medio de ANOVA de una vía con prueba Tukey y desviación estándar mostrada.
- Figura 17. Cromatograma representativo utilizado para el análisis de MitoEE2 y EE2D4 en diluciones estándar. A) Cromatograma del ion extraído asociado a MitoEE2 (613.3256 *m/z*) con un tiempo de retención de 8.5 minutos, picos observados a una masa estándar de 0.4 ng, 2 ng y 20 ng. B) Cromatograma del ion extraído asociado a EE2D4 (301.2099 *m/z*) con un tiempo de retención de 7.4 minutos, picos observados a una masa estándar de 0.2 ng y 2 ng. La masa teórica se considera masa experimental.

- Figura 25. Fotografías de las membranas tras la inmunodetección por medio de la técnica Western Blot de células homogenizadas con el homogeneizador Dounce. Fraccionamiento subcelular con detergentes. Membranas reveladas por quimioluminiscencia. A) Fotografía de membrana expuesta al anticuerpo MIC60. B) Fotografía de membrana expuesta al anticuerpo anti-α-Tub. 35

Lista de tablas

Tabla

Tabla 1. Coeficiente de acumulación (CA) de los estrógenos mito-dirigidos resultante
de la normalización del AUC de los compuestos estrogénicos con el AUC de sus IS.
N/A es no aplica debido a que no se detectó MitoE2 por LC-MS/MS en las
repeticiones del experimento
Tabla 2. Tabla de ALIC de compuestos estrogénicos en fracciones mitocondriales y

 La mitocondria es un organelo de vital importancia para la función celular; es la principal encargada del metabolismo energético de toda la célula mediante la respiración celular, mantiene el balance entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y moléculas antioxidantes, participa en la biosíntesis de hormonas y aminoácidos, oxida ácidos grasos, regula la concentración del ion de calcio intracelular y participa en procesos asociados a la apoptosis(Osellame et al., 2012). Siendo la mitocondria esencial para la célula, cuando esta no funciona de manera óptima, existen repercusiones en el funcionamiento celular. El desbalance entre ROS y antioxidantes, así como la baja producción de energía son algunas de las características de la disfunción mitocondrial. En consecuencia, la disfunción mitocondrial está involucrada en la progresión de diversas enfermedades como las neurodegenerativas, metabólicas y cardiovasculares (Jiang et al., 2020). Por lo tanto, se buscan tratamientos que mejoren la función mitocondrial. En este sentido, los estrógenos han demostrado tener un rol protector en las células.

Los estrógenos tienen distintas actividades de acuerdo con su sitio de acción. Se ha observado que tienen actividad nuclear y citosólica, así mismo, se ha observado que tienen actividad en la mitocondria debido a la presencia de receptores de estrógenos en esta (Chen & Yager, 2004). Los estrógenos tienen efectos positivos sobre diversos aspectos de la función mitocondrial, por ejemplo: en la cadena transportadora de electrones (Torres et al., 2018) y en la síntesis de ATP (J. Chen et al., 2003), aumentando la bioenergética mitocondrial y evitando el estrés oxidativo por su regulación de ROS y antioxidantes (Borrás et al., 2010).

Ya que los estrógenos presentan actividad benéfica en la mitocondria, esto los convierte en candidatos a ser utilizadas en tratamientos hormonales para las enfermedades asociadas a la disfunción mitocondrial. Una de las alternativas para lograr esto es mediante la síntesis de mito-dirigidos, sustancias con actividad biológica acopladas a una estructura con afinidad al interior de la mitocondria (Jiang et al., 2020). Una de las estructuras más usadas es el trifenilsfosfonio, un catión lipofílico que aprovecha la carga negativa del interior de la mitocondria para internalizarse y mediante su propiedad lipofílica, atraviesa membranas lipídicas para acumularse en el interior del organelo. Actualmente ya se han generado distintos tipos de mito-dirigidos (Smith et al., 2003). Por lo tanto, surge una propuesta de generar estrógenos mito-dirigidos, sugiriendo que se tendrá actividad exclusiva en la mitocondria y a menor concentración que los estrógenos no mito-dirigidos.

Este proyecto tiene como propósito evaluar la acumulación mitocondrial de los estrógenos sintéticos mitodirigidos en un modelo *in vitro* que sea sensible a estrógenos y se pretende comparar su acumulación con los estrógenos no mito-dirigidos.

1.1 Antecedentes

1.1.1 El rol fundamental de la mitocondria en la integridad celular.

La mitocondria es un organelo de las células eucariotas que tiene un rol fundamental en procesos indispensables para el mantenimiento y supervivencia de la célula(Jiang et al., 2020; Osellame et al., 2012), ya que además de ser la encargada principal de la bioenergética celular mediante la producción de adenosín trifosfato (ATP), la mitocondria se encarga de otras actividades importantes para la célula. Una de ellas es la regulación de ROS, moléculas oxidantes resultantes de la producción de ATP. En consecuencia, la mitocondria regula las concentraciones de ROS mediante la activación de la enzima succinato deshidrogenasa (SOD) (Bhatti et al., 2017; Camello-Almaraz et al., 2006; Kwak et al., 2010). Otra actividad es la captación de calcio, un ion necesario para la comunicación celular y para la regulación de la fosforilación oxidativa. Por otro lado, es un organelo esencial para la esteroidogénesis (Bremer & Miller, 2014; Sreerangaraja Urs et al., 2020), indicando que la mitocondria es clave en los procesos reproductivos (Sreerangaraja Urs et al., 2020) debido a su participación en la producción de hormonas esteroides (Shaw, 2021). También, se ha observado que la mitocondria está involucrada en procesos apoptóticos mediante la vía clásica intrínseca (P. Li et al., 1997), además de participar en la biosíntesis de aminoácidos y ser un organelo determinante para la oxidación de ácidos grasos (Miller, 2013).

La mitocondria es un organelo dinámico, debido a esto se puede alterar su función, y cuando la mitocondria no desempeña sus actividades de manera óptima, su disfunción repercute en la función general de las células. Se ha visto que la baja producción de ATP, la disminución en la abundancia de complejos asociados a la respiración celular, el desbalance entre ROS y antioxidantes, así como la despolarización de sus membranas son características de la disfunción mitocondrial (Bhatti et al., 2017; Jiang et al., 2020; Sreerangaraja Urs et al., 2020). En consecuencia, la disfunción mitocondrial está relacionada en la progresión de distintas enfermedades neurodegenerativas como Parkinson y Alzheimer (Y. Li et al., 2007; Murphy & Smith, 2000); metabólicas como la resistencia a la insulina y diabetes tipo 2

(Kwak et al., 2010); cardiovasculares como la arterosclerosis e hipertensión (Poznyak et al., 2020); así como en el desarrollo de endometriosis (Sreerangaraja Urs et al., 2020).

Debido a que la disfunción mitocondrial está relacionada con el desarrollo y progresión de distintas enfermedades, la mitocondria se ha convertido en un blanco terapéutico (Osellame et al., 2012) y, por ello, se buscan terapias alternativas que beneficien la función mitocondrial. Una de las alternativas es mediante el uso de compuestos bioactivos y, en este caso, los estrógenos han demostrado tener efecto en la actividad mitocondrial, mejorando su función (Klinge, 2008; Velarde, 2013).

1.1.2 Las hormonas estrógenos y su actividad celular.

Los estrógenos se clasifican en tres de acuerdo con su estructura: estriol, estradiol y estrona, siendo el estradiol (E2) el estrógeno más abundante en el cuerpo humano y con gran relevancia a nivel fisiológico durante las edades reproductivas de la mujer (Fuentes & Silveyra, 2019). Pero además de ser esencial para el desarrollo de caracteres sexuales femeninos (Álvarez-Delgado & Cerbón, 2011), se ha observado que presenta actividad en distintos tejidos con efecto en ambos sexos.

Los estrógenos han resultado tener un rol protector en las células (Shaw, 2021; Velarde, 2013), siendo las mujeres premenopáusicas las que exhiben mayor protección celular, debido a las cantidades elevadas de estrógenos que presentan durante su etapa reproductiva (Davis et al., 2015). Durante la menopausia los niveles de estrógenos disminuyen y, con ello, aumenta la prevalencia de enfermedades metabólicas (Stachowiak et al., 2015). En mujeres post-menopáusicas, el uso de estrógenos tiende a mejorar los síntomas vasomotores, disminuir el insomnio, mejorar el rendimiento del sistema músculo esquelético, y disminuir la progresión de enfermedades metabólicas como la diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares (Fait, 2019); sin embargo, el uso de estrógenos ha mostrado presentar ciertas desventajas, como el aumento en la prevalencia de cáncer de mama y de endometrio (Metha et al. 2021). Por ello, es importante conocer las vías de señalización intracelular de los estrógenos, y optimizar las vías que mejoren la función mitocondrial exclusivamente.

Los estrógenos desencadenan distintas actividades dependiendo al tipo de receptor al que se unan (Fuentes & Silveyra, 2019). La vía de señalización nuclear clásica (Fig. 1A), involucra la dimerización de receptores de estrógenos (ER) al unirse con el estrógeno, posteriormente, este complejo se transloca al núcleo y se une a secuencias de ADN conocidas como elementos de respuesta a estrógenos (EREs). En

estas secuencias convergen los elementos para el inicio de la transcripción de genes involucrados en la proliferación y diferenciación celular (Fuentes & Silveyra, 2019). La vía de señalización citosólica clásica (Fig. 1B) se activa mediante el receptor de estrógenos membranal (GPER), este activa proteínas cinasas (MAPKs) que inducen la expresión de genes asociados a la proliferación (Yager & Chen, 2007).



Figura 1. Vías de señalización de los estrógenos en la célula. Modificado de Fuentes & Sylveira, 2019 en Biorender, 2023.

1.1.3 Estrógenos y su función en la mitocondria.

Además de la vía nuclear y citosólica, los estrógenos tienen actividad en la mitocondria (Mattingly et al., 2008; Yager & Chen, 2007). La actividad de los estrógenos en la mitocondria puede darse de manera directa e indirecta En la indirecta, el E2 estimula la expresión del factor de receptor nuclear 1 (NRF1), que a su vez incrementa la transcripción del factor de transcripción mitocondrial 1 (TFAM), este factor se transloca en el ADN mitocondrial (mtADN) y activan la expresión de genes asociados a la respiración celular (Fig. 2A) (Lopez-Sanchez et al., 2015; Mattingly et al., 2008). Otra activación indirecta es por medio de receptores de estrógenos localizados en la membrana celular (Fig. 2B), Nilsen y Brinton (2003) encontraron que el E2 incrementa los niveles de BcL-2, una proteína antiapoptótica que se transloca a la mitocondria y aumenta la permeabilidad de Ca²⁺ en neuronas hipotalámicas de ratas. Por otro lado, se ha observado que

hay participación de E2 de manera directa por la presencia de receptores de estrógenos en la mitocondria (Chen et al., 2004; Yager & Chen, 2007) (Fig. 2C).



Figura 2: Rol de E2 en la mitocondria. Modificado de Shaw, 2021.

Se observó la presencia de receptores a estrógenos tanto alfa (ERα) como beta (ERβ) en mitocondrias de tejido cerebral de ratas hembra (Álvarez-Delgado et al., 2010) y en células MCF-7 (Chen et al., 2004). A su vez, el mtADN contiene secuencias similares a los EREs nucleares y se ha demostrado que tanto los ERα como los ERβ se unen a estas secuencias, incrementando los niveles de ARN mensajero derivado del mtDNA (Yager & Chen, 2007). Esto indica que el E2 está implicado en la función mitocondrial de manera directa (Álvarez-Delgado & Cerbón, 2011; Castracani et al., 2020).

Se ha visto que los efectos de E2 en la mitocondria son diversos: en la biogénesis mitocondrial, en la regulación de la actividad de cadena transportadora de electrones, y en el mantenimiento del equilibrio de ROS y producción de ATP. Existe mayor biogénesis mitocondrial en hepatocitos de ratas hembra que de los machos(Capllonch-Amer et al., 2014; Galmés-Pascual et al., 2017), ya que las hembras presentan mayor concentración de E2 en plasma sanguíneo (Galmés-Pascual et al., 2017). Por otro lado, Torres y colaboradores (2018) observaron que el E2 influye en la actividad de la cadena trasportadora de

electrones, así mismo, Castracani et al. (2020) presenciaron el aumento de la expresión proteica de los complejos I, II, III, IV y V de la línea celular de glioblastoma humano (U87-MG) a una concentración 5 nM de E2. Además, en la línea celular de MCF-7, incrementó la abundancia de transcritos de los complejos I y II bajo la exposición de E2 a 0.3 μ M (Chen et al., 2004).

En el caso de 17αEtinil-Estradiol (EE2), un derivado de sintético del E2, incrementó los niveles de ATP en tejido hepático de ratas Fischer hembras a partir de 1 nM (Chen et al., 2003), demostrando que los estrógenos tienen un rol en la bioenergética mitocondrial. También, se observó que el E2 disminuye la producción de ROS en mitocondrias aisladas de células hepáticas de ratas Wistar a partir de una concentración de 0.2 nM (Borrás et al., 2010), indicando que el E2 reduce el estrés oxidativo en la mitocondria. Asimismo, se ha observado que el E2 está relacionado con la modulación de la microviscosidad de la membrana interna mitocondrial de la línea celular de glioblastoma humano U87-MG a una concentración de 5 nM (Castracani et al., 2020). Además, los estrógenos incrementan la expresión de la proteína Bcl-2, proteína inhibidora de la apoptosis, en células hepáticas de ratas hembra Wistar, bajo la exposición de EE2 a partir de una concentración de 1 nM. (Chen et al., 2003).

Los estrógenos han demostrado tener beneficios en la actividad mitocondrial, por ello, son candidatos para una terapia hormonal para el tratamiento de enfermedades asociadas a la disfunción mitocondrial

1.1.4 Una nueva alternativa, los mito-dirigidos.

Unas de las alternativas para que los estrógenos tengan la capacidad de tener su beneficio en la mitocondria de manera selectiva, es mediante la generación de estrógenos mito-dirigidos. Los mitodirigidos son moléculas con actividad biológica que tienen la capacidad de acumularse en el interior de la mitocondria (Jiang et al., 2020; Smith et al., 2003; Trendeleva et al., 2012), ahí son reducidos y realizan su actividad biológica (Trendeleva et al., 2012). Esta acumulación se logra mediante una etiqueta molecular selectiva que tiene afinidad al interior de la mitocondria, y una de las moléculas más usadas para generar mito-dirigidos es el trifenilfosfonio (TPP+) (Zielonka et al., 2017) (Fig. 2). El TPP+ es un catión lipofílico y su afinidad por la mitocondria se debe al potencial de membrana. Se ha observado que el potencial de la membrana mitocondrial es de 120-180 mV, mientras que el potencial de la membrana celular es de 30-40 mV (Smith et al., 2003; Zielonka et al., 2017), implicando que la mitocondria es más electronegativa respecto al citosol. Esto permite que el TPP+ se acumule en el interior de la mitocondria de 100 a 1000 veces más que en el citosol de acuerdo con la ecuación de Nernst (Smith et al., 2003; Zielonka et al., 2017). El TPP+ incrementa las concentraciones del mito-dirigido respecto al no mito-dirigido varios órdenes de magnitud (Trendeleva et al., 2012). La propiedad lipofílica de TPP+ le permite atravesar las membranas mitocondriales con facilidad (Smith et al. 2003).



Figura 3. Estructura de TPP+, su internalización y acumulación en la mitocondria. Modificada de Smith et al. 2003.

Se ha utilizado al TPP+ para generar distintos tipos de mito-dirigidos: Battogtokh et al. (2018) utilizaron Docetaxel-TPP (DTX-TPP), un mito-dirigido anticancerígeno que demostró, por medio de espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), acumularse en la mitocondria 5.3 veces más respecto al Docetaxel (DTX) no mito-dirigido. Otro mito-dirigido es el MitoQ©, un derivado de la ubiquinona (Q10) acoplado al TPP+ (Jiang et al., 2020; Y. Li et al., 2007). MitoQ© participa en la fosforilación oxidativa y tiene actividad antioxidante. Fink et al. (2009) observaron que MitoQ© aumentó la respiración mitocondrial de la línea celular BAE y disminuyó la concentración de ROS más que la ubiquinona no mito-dirigida a 1 μ M. Actualmente, MitoQ© se encuentra en el mercado siendo un producto alternativo a la Q10. Los mitodirigidos presentan una gran variedad de actividad biológica que depende de su conjugado, por ello, crear estrógenos mito-dirigidos permitirá enriquecer su función benéfica en la mitocondria.

1.1.5 Estrógenos como mito-dirigidos

Los estrógenos comparten similitudes en su estructura. Estas hormonas se componen de 18 carbonos que forman cuatro anillos (Merchenthaler, 2018) y su actividad biológica se debe principalmente al grupo hidroxilo del anillo fenólico A y del grupo hidroxilo alifático del carbono 17 (Cook-Botelho et al., 2017; Merchenthaler, 2018) (Fig. 3). Otra molécula derivada del E2 es el EE2, la cual tiene mayor afinidad por los receptores de estrógenos (Fig. 3B) y tiene mayor actividad biológica respecto al E2 en tejido hepático de rata (Eisenfeld et al., 1976). Actualmente el EE2 es usado como anticonceptivo junto con levonorgestrel, un derivado de la progestina (Rodríguez-Carranza, 2015).



Figura 4. Estructura de los estrógenos. A) 17α-Etinil estradiol, B) 17β-Estradiol. Imágenes modificadas de 17 βestradiol y 17 α-etinil estradiol obtenido en NovoPro mediante SMILES canónico, 2023.

Como se mencionó anteriormente, la función benéfica que tienen en la mitocondria convierte a los estrógenos en candidatos para su síntesis a estrógenos mito-dirigidos. Por tal motivo, este proyecto pretende generar moléculas mito-dirigidas de estrógenos mediante la unión covalente al TPP+ (Fig. 5). Actualmente se han sintetizado dos estrógenos mito-dirigidos en colaboración con la Dra. Kanchan Chauhan y el Dr. Rafael Vazquez-Duhalt en el Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNyN) de la UNAM. Se sintetizó el estrógeno mito-dirigido derivado de EE2, mito-etinil-estradiol o "MitoEE2" (Fig. 5A), y el estrógeno mito-dirigido derivado de E2, mito-estradiol o "MitoE2" (Fig. 5B). Su acoplamiento con el TPP+ le permitirá acumularse en el interior de la mitocondria y aumentará la actividad estrogénica en este

organelo, y para corroborar esto, se evaluará la acumulación mitocondrial de los estrógenos mito-dirigidos respecto a los estrógenos no mito-dirigidos.



Figura 5. Propuesta de estructura de los estrógenos mito-dirigidos. A) Estrógeno mito-dirigido derivado de EE2: mito-etinil-estradiol o "MitoE2". B) Estrógeno mito-dirigido derivado de E2: mito-estradiol o "MitoE2".

1.2 Justificación

La mitocondria tiene un papel fundamental en la bioenergética celular, así como en la regulación de especies reactivas de oxígeno y su disfunción afecta profundamente a la célula, lo cual se ha asociado a diversas enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares y metabólicas. Por lo que se está explotando la idea de generar compuestos mito-dirigidos que mejoren la función mitocondrial para la creación de nuevos tratamientos para enfermedades asociadas a la disfunción mitocondrial. En el caso de los estrógenos, se ha demostrado que pueden mejorar la función mitocondrial a través de la regulación de la actividad transportadora de electrones y la regulación en la concentración de especies reactivas de oxígeno. En este proyecto se pretende generar moléculas de estrógenos mito-dirigidos que tengan actividad biológica selectiva dentro de las mitocondrias y que dicha actividad sea mayor que la de los estrógenos no mito-dirigidos. Estos estrógenos mito-dirigidos se podrán utilizar en un futuro como base de tratamientos dirigidos a las mitocondrias para enfermedades asociadas a la disfunción mitocondrial.

1.3 Hipótesis

Los estrógenos mito-dirigidos se acumularán en las mitocondrias de las células sensibles a estrógenos más que los estrógenos no mito-dirigidos.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Comparar la acumulación de los estrógenos mito-dirigidos en la mitocondria respecto al estradiol no dirigido.

1.4.2 Objetivos específicos

- 1. Establecer un modelo *in vitro* de una línea celular sensible a estrógenos.
- 2. Evaluar la viabilidad celular de la línea celular MCF-7 expuesta a diferentes concentraciones de estrógenos mito-dirigidos y determinar la concentración inhibitoria media.
- 3. Establecer un método de extracción de los estrógenos mito-dirigidos desde fracciones subcelulares para su detección y cuantificación.
- 4. Evaluar la acumulación de los estrógenos mito-dirigidos dentro de mitocondria y compararla con la acumulación del estradiol.

2.1 Cultivo de una línea celular sensible a estrógenos

Se usó como modelo experimental la línea celular de carcinoma de mama MCF-7 debido a que se ha demostrado que expresan receptores a estrógenos mitocondriales (Chen et al. 2004). Las células se cultivaron en cajas Petri de 10 cm de diámetro con 8 mL de medio DMEM de alta glucosa (4.5 g/L) (GibcoTM), suplementado con 10% de suero fetal bovino 10% (BioWestTM) y con 1% de antibiótico/antimicótico (GibcoTM), incubándose a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂. 6 días antes del tratamiento con los estrógenos, las células se pasaron a medio DMEM F-12 con 10% de suero fetal bovino sin hormonas y sin rojo fenol (Biowest, S181F-500) y con 1% de antibiótico/antimicótico (GibcoTM).

2.2 Evaluación de la viabilidad celular de la línea celular sensible a estrógenos mito-dirigidos

Para evaluar la viabilidad celular de la línea celular MCF-7 bajo el tratamiento de los estrógenos mitodirigidos MitoEE2 y MitoE2, se realizó un ensayo de MTS (CellTiter 96[®], Promega). El ensayo se realizó en microplaca de 96 pocillos donde en cada pozo se sembraron 5,000 células en 100 µL de medio DMEM F-12 con 10% de suero fetal bovino sin hormonas (Biowest, S181F-500) y con 1% de antibiótico y antimicótico (Gibco[™]). Las células se dejaron en incubación por 24 horas y posteriormente fueron tratadas con MitoEE2 y MitoE2 (Fig. 4) a 1, 10, 100, 250 y 500 nM. Como control positivo se utilizó (17β-Estradiol, "E2" (Sigma[™])) a 100 nM, ya que a esta concentración muestra el aumento en la expresión de genes asociados a complejos de respiración mitocondrial y de ATP sintasa (Chen et al. 2004). Como control negativo se utilizó medio DMEM F-12 sin estrógenos, así mismo, se utilizó sulfóxido de dimetilo (DMSO) como vehículo ya que los mito-dirigidos está disueltos en este compuesto.

Se expusieron las células a MitoE2 por 12 y 24 hrs a 1, 10, 100, 250 y 500 nM, lo mismo para las células expuestas a MitoEE2 a excepción de un tratamiento adicional de exposición de 1, 10 y 100 nM por 6 hrs. Al terminar el tiempo de exposición, se tomaron fotografías a las células expuestas con tratamientos y posteriormente se colocaron 100 µL de reactivo de Owen y se incubó a 37°C con una atmósfera del 5% de CO₂ durante 1 hora. La solución coloreada se cuantificó midiendo su absorbancia a 590 nm en el lector de microplacas EPOCH y el lector ThermoFisher.

Con el fin de conocer la viabilidad celular a concentraciones menores de 1 nM, se realizó el ensayo MTS con tratamientos de estrógenos mito-dirigidos MitoEE2 y MitoE2 a 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1 nM. Como control positivo se utilizó E2 a 1, 10 y 100 nM. Se expusieron las células por 12 y 24 hrs, realizando el protocolo mencionado anteriormente.

Para conocer la viabilidad celular (%) de acuerdo con los resultados de absorbancia, se aplicó la siguiente fórmula (1).

Viabilidad celular (%) =
$$\frac{Absorbancia de réplica}{Promedio de absorbancias} X 100$$
 (1)

Con el fin de conocer qué concentración inhibe el crecimiento del 50% de la población celular, se obtuvo la inhibición celular (%) (fórmula 2) y de ella, la concentración mínima inhibitoria 50% (IC₅₀) con el programa de Gradhpad Prism 8.0.

Inhibición celular (%) =
$$100 - (\frac{Absorbancia de réplica}{Promedio de absorbancias} x 100)$$
 (2)

2.3 Detección y cuantificación de los estrógenos mito-dirigidos por LC-MS/MS mediante diluciones estándar.

Para conocer si los estrógenos mito-dirigidos son detectados por LC-MS/MS, se realizaron diluciones estándar que consiste en una muestra con una cantidad de masa conocida. En este caso de MitoE2 γ MitoEE2, así como de sus estándares internos (IS por sus siglas en inglés "Internal Standard") siendo los deuterados Estradiol-d2 "E2D2" (Sigma-Aldrich) y 17α-Etinilestradiol-d4 "EE2D4" (Santa-Cruz). Los IS son moléculas con una masa parecida a los compuestos a analizar, en este trabajo los estrógenos mito-dirigidos MitoEE2 y MitoE2, así como E2. Los IS tienen como objetivo ser un punto de control en la detección y cuantificación de los analitos mediante la comparación de la masa/respuesta que arroja el equipo de LC-MS/MS al detectar los estrógenos.

Los compuestos se diluyeron 1 mg en 1 ml de acetonitrilo al 100% grado masas en tubos de 1.5 mL. Se realizaron diluciones a concentraciones de 10, 1, 0.2 y 0.02 ng/ μ L con agua: acetonitrilo (80:20) con 0.1% de ácido fórmico.

2.4 Preparación de las muestras para inyección a LC-MS/MS.

A cada tubo se le añadieron 200 μ L de agua: acetonitrilo (80:20) con 0.1% de ácido fórmico. Las muestras se mezclaron por 60 segundos a temperatura ambiente (22 °C). Las muestras se centrifugaron a 20,817 g por 10 min a 4°C en la centrífuga 5417 R (Eppendorf [®]) para eliminar impurezas. Se recuperó el 80% (160 μ L) de la muestra centrifugada y se transfirió a otro tubo de 0.5 mL. Se transfirieron 20 μ L de muestra a un vial de inyección para inyectar a LC-MS/MS, el resto de la muestra se guardó a -70°C.

Una vez obtenidos los cromatogramas, se minaron los datos de acuerdo con la masa monoisotópica (m/z) de las moléculas ionizadas del analito, obtenidas por la masa exacta y la masa de un protón [M+H] en el programa Agilent Mass Hunter Qualitative Analysis B06.00. La m/z a buscar, de acuerdo con su masa exacta, fue para MitoEE2 613.3256, para MitoE2 fue 589.3235, para E2 fue 273.1848 para E2D2 fue 275.1973 y para EE2D4 fue 301.2099.

2.5 Parámetros de adquisición de datos por LC-MS/MS.

Los parámetros de adquisición de datos están reportados de acuerdo con el trabajo de Meza-Villezcas et al. (2022). Se separaron 2 μ L de cada muestra durante 15 minutos mediante el cromatógrafo líquido Agilent nanoLC 1260 Infinity system (Agilent Technologies) en la columna ZORBAX 80 SB-C18 (75 μ m × 43 mm, 5 μ m C18 con 40 nL de volumen de columna trampa). Para las fases móviles A y B se utilizó agua y acetonitrilo, ambos con 0.1% de ácido fórmico. Las fases móviles se usaron en distintos gradientes a una tasa de flujo de 300 nL/min. Se inició con un gradiente de solución B a 5%, incrementando de manera lineal a 100% en 5 minutos, manteniéndose así por 2 minutos, y se decrementó a 5%, manteniéndose así por 8 minutos hasta inyectar las muestras. Se inyectaron dos muestras blanco (3 μ L de solución A y B a una proporción 95:5) entre cada muestra experimental para limpiar la columna y minimizar el potencial de acarreamiento.

El eluato se depositó en el espectrómetro de masas 6530 Accurate-Mass Q-TOF (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) mediante una interfase de HPLC. Se utilizó una ionización por nanospray en modo positivo.

Los datos del primer espectrómetro (MS1) se adquirieron con las siguientes condiciones: Voltaje de capilaridad de 1850 V; temperatura del gas de 325°C, flujo de gas de 5 L/min; voltaje del skimmer, 65 V; radiofrecuencia del octapolo de 750 V; voltaje del fragmentador, 175 V; tasa de adquisición de espectro, 4 espectros/s sobre un rango de masa entre 10 a 1000 m/z.

Las condiciones del segundo espectrómetro (MS2) fueron: una ventana de aislamiento estrecha (1.3 m/z); el rango de adquisición de espectro fue de 3 espectros; los precursores máximos por ciclo fueron 5 espectros en un rango de masa entre de 50 a 1000 m/z. Se habilitó la opción de exclusión activa, se conFiguró a 2 espectros y se liberó después de 0.1 minutos. La opción de energía de colisión en rampa se usó con un valor de pendiente y compensación de 6 y 4, respectivamente.

Los instrumentos se calibraron de manera externa antes de la adquisición del eluato usando la solución ESI-L low-mix concentration tunning mix-solution (Agilent Technologies) para tener una exactitud de masa del <5ppm en la adquisición de los datos tanto del MS1 como del MS2. La obtención de datos se evaluó constantemente, incluyendo los controles de calidad.

2.6 Evaluación del coeficiente de acumulación de los estrógenos mito-dirigidos respecto a no mito-dirigidos.

2.6.1 Diluciones

Para evaluar el coeficiente de acumulación (CA) de los estrógenos mito-dirigidos MitoEE2 y MitoE2 con respecto a los no-mito-dirigidos (17β-Estradiol, "E2" (Sigma™), se realizaron tratamientos con 100 nM ya que se consideró una cantidad de masa elevada y así tener un rango detectable en el LC-MS/MS .Los tratamientos se hicieron en medio DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle's Minimun Essential Medium) F-12 (Gibco[™]) con 10% de suero fetal bovino sin hormonas (Biowest[™], S181F-500) y con 1% de antibiótico y antimicótico (Gibco[™]).

2.6.2 Tratamientos

Se cultivaron células MCF-7 (pase 11) y se mantuvieron de acuerdo con el protocolo del apartado 2.1. Las células se mantuvieron en este medio hasta llegar a 95% de confluencia. Una vez alcanzada esta confluencia, las células se lavaron con 6 mL de PBS (NaCl 137 mM, KCl 27 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, pH 7.4), por caja y a temperatura ambiente (25 °C). Se colocaron 8 mL por caja de los siguientes compuestos:

- MITOEE2 100 nM
- MITOE2 100 nM
- E2 100 nM
- Medio DMEM F-12 (control negativo)

Las células se expusieron por 1 hora incubándose a 37°C con 5% CO₂ ya que en el trabajo de Battogtokh et al. (2018) observaron acumulación a esa hora.

2.6.3 Fraccionamiento subcelular para la obtención de las fracciones enriquecidas nucleares, citosólicas y mitocondriales tratadas con estrógenos mito-dirigidos

Se removió el medio y las células se lavaron con 6 mL de PBS frío (4°C), enseguida las células se cosecharon con espátula de plástico, colocando las células provenientes de 3 cajas en tubos de 50 mL. Las células se centrifugaron a 193 g por 10 min. a 4°C en la centrífuga 5810 R (Eppendorf®). Se descartó el sobrenadante y se siguió trabajando con el botón celular ("pellet"). Se agregó 1 mL de solución isotónica mitocondrial (HEPES 20 mM, manitol 210 mM, sacarosa 70 mM, pH 7.2, 4°C) a cada pellet y se colocaron en hielo. Los tubos de las células que no pasaron por fraccionamiento subcelular se guardaron a -80 °C hasta el momento de la liofilización.

Las células se lisaron en hielo; para la primera réplica del experimento se utilizó una jeringa de insulina, pasando por el émbolo 35 veces la muestra, para la segunda y tercera réplica se utilizó el homogeneizador de tejido Dounce ajustado de 1 mL (WHEATON®) pasando el pistilo 20 veces por la muestra. El lisado celular se centrifugó a 1500 g a 4°C por 10 minutos y se colectó el sobrenadante en otro tubo de 1.5 mL.

El pellet se resuspendió en 1 mL de solución isotónica mitocondrial y se repitió el proceso de lisado y centrifugado de las células. El sobrenadante de la segunda centrifugación se colectó en otro tubo de 1.5 mL y se mantuvo en hielo. El pellet de la segunda centrifugación ("fracción nuclear") se resuspendió en 200 µL de solución isotónica mitocondrial y se guardó a -80 °C.

El sobrenadante guardado en hielo se centrifugó a 10,000 g a 4°C por 20 min. El sobrenadante de esta centrifugación se guardó como "fracción citosólica" y se pasó a -80°C. El pellet se resuspendió en 500 μ L de buffer de lavado (Tris HCl 10 mM, sacarosa 250 mM, pH 7.4) y se centrifugó a 10,000 g a 4 °C por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet ("fracción mitocondrial") en 500 μ L de solución isotónica mitocondrial. Todas las fracciones se guardaron a -80°C. 24 horas después, las fracciones y células completas ("muestras") se liofilizaron en el colector al vacío (Labconco) a 0.016 mBar a -106 °C por 16 hrs.

2.6.4 Extracción de los estrógenos mito-dirigidos a partir de las fracciones subcelulares

Al terminar de liofilizar las muestras, se realizó el siguiente proceso de extracción de los compuestos: A cada muestra se le agregó 100 ng de IS a una concentración 100 ng diluidos en 5 µL acetonitrilo 100% grado masas cada uno. Para la primera réplica del experimento se agregaron los estándares internos de la siguiente manera:

- EE2D4 a las células completas, fracciones nucleares, mitocondriales y citosólicas expuestas a MitoEE2 100 nM.
- E2D2 a las células completas, fracciones nucleares, mitocondriales y citosólicas expuestas a MitoE2 a 100 nM.
- E2D2 a las células completas, fracciones nucleares, mitocondriales y citosólicas expuestas a E2 a 100 nM.

Tanto E2D2 y EE2D4 a las fracciones nucleares, mitocondriales y citosólicas que no fueron expuestas (control negativo). Para la segunda y tercera réplica del experimento se utilizaron ambos IS en todas las muestras.

Las muestras se mezclaron por 60 segundos en agitación constante a temperatura ambiente (25°C), posteriormente se les agregó 490 μ L de acetonitrilo 100% y se mezclaron por 60 segundos en agitación constante a temperatura ambiente (25°C).

Las muestras se centrifugaron a 20,817 g por 10 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante en otro tubo de 1.5 mL. El pellet se centrifugó nuevamente con el fin de recuperar más acetonitrilo y la mayor cantidad de compuestos estrogénicos posible. Los tubos con sobrenadante se colocaron en SpeedVac Savant RVT400 refrigerated Vapor Trap de ThermoFisher Scientific por 2 horas a 5 ramp para evaporar el acetonitrilo y conservar los compuestos estrogénicos. Los tubos se guardaron a -80°C por 24 hrs.

2.6.5 Preparación de las muestras para inyección a LC-MS/MS y parámetros de adquisición de datos

Las muestras se prepararon de acuerdo con el apartado 2.4 y también se utilizaron los parámetros de adquisición de datos de acuerdo con el apartado 2.5. Posterior a la corrida, se determinó el área bajo la curva (AUC) de los compuestos estrogénicos en las fracciones subcelulares mediante el programa Agilent Mass Hunter Qualitative Analysis. Se obtuvo el AUC de MitoEE2, MitoE2, E2 y sus respectivos IS. El AUC de los compuestos estrogénicos fueron normalizados con sus estándares internos utilizando la siguiente fórmula:

Normalización de AUC =
$$\frac{AUC \ del \ compuesto \ estrogénico}{AUC \ del \ estándar \ interno}$$
(3)

Una vez normalizados los AUC, y con el fin de conocer el coeficiente de acumulación (CA) de los estrógenos mito-dirigidos de la fracción mitocondrial, se realizó la siguiente fórmula:

$$Coeficiente de Acumulación (CA) = \frac{AUC normalizado en fracción mitocondrial}{AUC normalizado en fracción citosólica}$$
(4)

2.7 Corroboración del fraccionamiento subcelular.

Con el fin de conocer si las técnicas de fraccionamiento subcelular generan fracciones mitocondriales, citosólicas y nucleares enriquecidas, se realizó el protocolo de inmunodetección por la técnica de Western

blot para la detección de proteínas exclusivas de cada fracción. Se utilizó Anti-Mitofilina (MIC60) (Abcam^M) y Anti-Citocromo C Oxidasa Subunidad 1 (COX1) (Cell Signaling^M) para la fracción mitocondrial, Anti- α Tubulina (α Tub) (Sigma-Aldrich^M) para la fracción citosólica, y Anti-Histona 1 (H-1) (Santa-Cruz Biotechnology^M) para la fracción nuclear. Como control positivo, se utilizaron células completas, es decir, sin pasar por el protocolo de fraccionamiento subcelular.

Se preparó el gel concentrador al 6% y gel separador al 12%. Se cargaron 50 μL con 60 μg de las proteínas provenientes de las fracciones subcelulares, también se cargaron 5 μL de escalera Amersham[™] ECL[™] Rainbow[™] Marker - Full range (Sigma-Aldrich[™]). Las proteínas se separaron en gel SDS-PAGE a 50 Volts hasta llegar al gel separador y de ahí 100 V por 1 hr. Las proteínas se transfirieron a membrana PDVF por medio de transferencia semi-húmeda a 15 Volts por 1 hr. Las membranas se bloquearon con leche filtrada al 5% por 1 hora a 18°C. Las membranas se incubaron con MIC60 2 μg/mL, α-Tub 4 μg/mL, H-1 0.4 μg/mL por 18 hrs a 16°C en agitación constante. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario Anti-Ratón IgG Peroxidasa (Sigma-Aldrich[™]) 0.2 μg/mL por 1 hora en agitación constante a 16°C. Se revelaron las membranas en el revelador Quemidoc[™] MP Imaging System (BioRad Laboratories©).

Para la corroboración de fraccionamiento subcelular sin usar detergentes en la solución isotónica mitocondrial y de lavado, se cargaron 50 μL con 30 μg de las proteínas provenientes de las fracciones mitocondriales y citosólicas. Se cargaron 7.5 μL de escalera Amersham™ ECL™ Rainbow™ Marker-Full range (Sigma-Aldrich™). Las membranas se bloquearon con albumina fracción V al 10% por 1 hora a 18°C. Las membranas se incubaron con COX1 14 ng/mL y con αTub 4 μg/mL por 18 hrs a 4°C en agitación constante. Posteriormente, a la membrana expuesta con COX1 se incubó con el anticuerpo secundario Anti-Conejo IgG Peroxidasa (Santa-Cruz Biotechnology™) 0.4 μg/mL, a la membrana expuesta con αTub se expuso con el anticuerpo secundario Anti-Ratón IgG Peroxidasa 0.2 μg/mL. Las membranas se revelaron en el revelador Quemidoc™ MP Imaging System.

2.8 Análisis estadísticos.

Para comparar la viabilidad celular (%) de las distintas concentraciones de los estrógenos mito-dirigidos, se realizó un ANOVA de una vía con prueba Tukey para comparación múltiple entre los tratamientos. Para la obtención de IC50 se utilizó análisis de inhibición (%) con regresión no linear. Para comparar el coeficiente de acumulación mitocondrial entre los estrógenos mito-dirigidos respecto al coeficiente del

estrógeno no mito-dirigido se realizó una prueba t de Student. Los análisis estadísticos se realizaron en GradPad Prism 8.0.8.

3.1 Resultados de establecimiento de línea celular sensible a estrógenos.

El crecimiento y mantenimiento de la línea celular MCF-7 se siguió de acuerdo con la sección 2.1. Las fotografías tomadas con microscopio (Fig. 5) muestran la morfología de las células en medio DMEM a 37°C con 5% CO2. Se puede observar la morfología típicamente epitelial de estas células, adheridas a la placa y formando grupos.



Figura 6. Fotografía de la línea celular MCF-7 a una confluencia de 40%, A) fotografía a 4X, B) fotografía a 10X.

3.2 Resultados de viabilidad celular de línea celular MCF-7 tratadas con estrógenos mito-dirigidos.

3.2.1 Viabilidad celular de línea celular MCF-7 expuestas a MitoEE2.

Las fotografías muestran que con los tratamientos con MitoEE2 a las 12 hrs y 24 hrs aparecen vesículas a partir de la concentración de 1 nM (Fig. 7 y 8). Se aprecian prolongaciones celulares y células no adheridas en los tratamientos de MitoEE2 a 100, 250 y 500 nM a las 12 hrs (Fig. 7), mientras que a las 24 hrs se observan a partir de 10 nM en adelante (Fig. 8)



Vehículo

MitoEE21 nM



MitoEE2100 nM

MitoEE2250 nM

MitoEE2500 nM





MitoEE2100 nM

MitoEE2 250 nM

MitoEE2 500 nM

Figura 8. Fotografías a 20X de células MCF-7 expuestas a MitoEE2 a las 24 hrs.

En los resultados del ensayo de MTS, no se observaron cambios significativos en la viabilidad celular en células MCF-7 con los distintos tratamientos de MitoEE2 a las 6 hrs (Fig. 9).



Viabilidad (%) de MitoEE2 a las 6 hrs

Figura 9. Viabilidad celular (%) de MCF-7 a las 6 hrs de exposición de MitoEE2 a 1, 10 y 100 nM. Viabilidad normalizada con el vehículo. Datos analizados por medio de ANOVA de una vía con prueba Tukey y desviación estándar mostrada.

La viabilidad celular se vio afectada con el tratamiento de MitoEE2 a las 12 hrs (Fig. 10). No se observó disminución en la viabilidad celular a 1nM ni a 10 nM, pero sí con los tratamientos a 100, 250 y 500 nM respecto al vehículo (P < 0.0001). Además, se observó una diferencia en la viabilidad celular de células tratadas a 100 nM de MitoEE2 respecto a 100 nM de E2 (P < 0.0001), disminuyendo la viabilidad en células expuestas MitoEE2. Los resultados de inhibición (%) indicaron que la IC₅₀ de MitoEE2 fue de 323 nM (R₂ = 0.9428) a estas horas de exposición.

En el caso del ensayo de MTS de células tratadas con MitoEE2 a las 24 hrs (Fig. 11), la viabilidad celular se mantuvo en las células tratadas con MitoEE2 a 1 nM y se observó un aumento de esta en el tratamiento con MitoEE2 a 10 nM respecto al vehículo (P < 0.0051). Solamente la viabilidad celular disminuyó en las células tratadas a 100, 250 y 500 nM respecto al vehículo (P < 0.0001). Además, se observó una disminución de la viabilidad celular en las células tratadas a 100 nM de MitoEE2 respecto a las tratadas

con 100 nM de E2 (P= 0.0003). Los resultados de inhibición indican que la IC50 de MitoEE2 a las 24 hrs de tratamiento es de 347.9 nM (R₂ = 0.8867).



Figura 10. Viabilidad celular de MCF-7 e IC50. A) Viabilidad celular (%) de MCF-7 a las 12 hrs de exposición de MitoEE2 a 1, 10, 100, 250 y 500 nM. B) Inhibición celular (%) e IC50 de MitoEE2 a las 12 hrs. Viabilidad e inhibición normalizada con el vehículo. Datos analizados por medio de ANOVA de una vía con prueba Tukey y desviación estándar mostrada.



Figura 11. A) Viabilidad celular (%) de MCF-7 a las 24 hrs de exposición de MitoEE2 a 1, 10, 100, 250 y 500 nM. B) Inhibición celular (%) e IC50 de MitoEE2 a las 24 hrs. Viabilidad celular e inhibición normalizada con el vehículo. Datos analizados por medio de ANOVA de una vía con prueba Tukey y desviación estándar mostrada.

En las células tratadas con MitoEE2 a concentraciones de igual y menor a 1 nM (Fig. 12), no se observaron diferencias en la viabilidad celular en los tratamientos de 0.1 nM, 0.25 nM, 0.5 nM y 0.75 nM a las 12 hrs, a excepción de las células tratadas a 1 nM (P=0.0092) (Fig. 12A). En el caso de las células tratadas con MitoEE2 por 24 hrs, no se observaron diferencias en la viabilidad a 0.25 nM, 0.5 nM, 0.75 nM y a 1 nM, a diferencia en la viabilidad en células expuestas a 0.1 nM (P=0.0019) (Fig. 12B).



Figura 12. Viabilidad celular (%) de MCF-7 a las 12 y 24 hrs de exposición de MitoEE2 a 0.1 nM, 0.25 nM, 0.5 nM, 0.75 nM y 1 nM. A) Viabilidad celular (%) a las 12 hrs de exposición B) Viabilidad celular (%) a las 24 hrs de exposición. Viabilidad celular e inhibición normalizada con el vehículo. Datos analizados por medio de ANOVA de una vía con prueba Tukey y desviación estándar mostrada.

3.2.2 Viabilidad celular de línea celular MCF-7 expuestas a MitoE2

Las fotografías muestran los cambios morfológicos con la exposición de MitoE2 a las 12 y 24 hrs (Fig. 13 y 14). Se puede observar la aparición de vesículas intracelulares a partir de la exposición a 1 nM y prolongaciones celulares de la membrana a 500 nM a las 12 hrs (Fig. 13). Igualmente, a las 24 hrs, se observan vesículas intracelulares a partir de 1 nM sin embargo se observan células no adheridas a 250 nM y 500 nM de exposición, además de prolongaciones celulares de la membrana a 500 nM. (Fig. 14).



MitoE2 100 nM

MitoE2 250 nM

MitoE2 500 nM

Figura 13. Fotografías a 20X de células MCF-7 expuestas a MitoE2 a las 12 hrs.



Figura 14. Fotografías A 20X de células MCF-7 expuestas a MitoE2 a las 24 hrs.

En los resultados del ensayo de MTS, la viabilidad celular no tuvo cambios significativos a las 12 y 24 hrs de exposición con MitoE2 en las concentraciones estudiadas (Fig. 15). Además, de acuerdo con los resultados de inhibición celular, no se logró obtener una IC50 ya que en ningún tratamiento disminuyó la viabilidad celular al 50%.



Figura 15. Viabilidad celular (%) de células MCF-7 expuestas a MitoE2 a 1, 10, 100, 250 y 500 nM. A) Viabilidad celular a las 12 hrs. B) Viabilidad celular a las 24 hrs. Datos normalizados con el vehículo. Datos analizados por medio de ANOVA de una vía con prueba Tukey y desviación estándar mostrada.

En los tratamientos de MitoE2 a concentraciones de igual y menor a 1 nM (Fig. 16), se observa que no hay diferencia en la viabilidad celular en los distintos tratamientos a las 12 hrs ni 24 hrs



Figura 16. Viabilidad celular (%) de MCF-7 a las 12 y 24 hrs de exposición de MitoE2 a 0.1 nM, 0.25 nM, 0.5 nM, 0.75 nM y 1 nM. A) Viabilidad celular (%) a las 12 hrs de exposición B) Viabilidad celular (%) a las 24 hrs de exposición. Viabilidad celular e inhibición normalizada con el vehículo. Datos analizados por medio de ANOVA de una vía con prueba Tukey y desviación estándar.

3.3 Resultados de la detección de los estrógenos mito-dirigidos por LC-MS/MS mediante diluciones estándar.

De acuerdo con los resultados del LC-MS/MS, en el cromatograma del ion extraído asociado a MitoEE2 (613. 3256 m/z) y a EE2D4 (301.2099 m/z) se observa la detección de los compuestos en las distintas cantidades de masa estándar inyectadas utilizando la masa teórica como la experimental (Fig. 17).

De acuerdo con los resultados del LC-MS/MS, en el cromatograma del ion extraído asociado a MitoEE2 (613. 3256 *m/z*) y a EE2D4 (301.2099 *m/z*) se observa la detección de los compuestos en las distintas cantidades de masa estándar inyectadas utilizando la masa teórica como la experimental (Fig. 17). El rango de detección varía de acuerdo con la concentración de la muestra y con el tipo de compuesto estudiado. En el caso de MitoEE2, se detectó a 0.4, 2 y 20 ng (Fig. 17A). El deuterado EE2D4, se detectó a 0.2 ng y 2 ng (Fig. 17B).







En el cromatograma del ion extraído asociado a MitoE2 (589.3235 *m/z*) y a E2D2 (275.1973 *m/z*) se observa la detección de los compuestos en las distintas cantidades de masa estándar inyectadas (Fig. 18). El rango de detección varía de acuerdo con la concentración de la muestra y con el tipo de compuesto estudiado. Los datos indican que MitoE2 se detectó a una masa de 0.02, 0.2 y 2 ng (Fig. 18A), el deuterado E2D2 que será usado como IS, se detectó a una masa de 0.2 y 2 ng (Fig.18B).



Figura 18. Cromatograma representativo utilizado para el análisis de MitoE2 y E2D2 en diluciones estándar. A) Cromatograma del ion extraído asociado a MitoE2 (589.3235 *m/z*) con un tiempo de detección de 8.2 minutos, picos observados a una masa estándar de 0.02 ng, 0.2 ng y 2 ng. B) Cromatograma del ion extraído asociado a E2D2 (275.1973 *m/z*) picos observados a una masa estándar de 0.2 ng y 2 ng. La masa teórica se considera masa experimental.

3.4 Resultados preliminares de la extracción e inyección de los estrógenos mito-dirigidos a partir de las fracciones subcelulares.

En el cromatograma representativo de los iones extraídos de los compuestos estrogénicos en fracciones subcelulares (Fig. 19-22), se observa que MitoEE2, MitoE2 y E2 fueron detectados por el equipo (Fig. 19-22), así como sus IS respectivos (Fig. 19-22), indicando que se pudieron extraer y detectar exitosamente los compuestos a partir de una matriz celular. En el cromatograma representativo del ion extraído de MitoEE2 (613. 3256 *m/z*) y de EE2D4 (301.2099 *m/z*) a partir de fracciones subcelulares (Fig. 19) se aprecia la abundancia de MitoEE2 y su IS en fracciones correspondientes a núcleo, citosol y mitocondria. Estas moléculas no fueron detectadas en células completas. En el cromatograma representativo del ion extraído de MitoE2 (589.3235 *m/z*) y de E2D2 (275.1973 *m/z*) a partir de fracciones subcelulares (Fig. 20), se aprecia la abundancia de MitoE2 y su IS en fracciones del núcleo, citosol, mitocondria a excepción de las células completas. En el cromatograma representativo del se excepción de las células completas. En el cromatograma representativo del se reprecia la abundancia de MitoE2 y su IS en fracciones (Fig. 21) se aprecia la abundancia de E2 y su IS en fracciones subcelulares (Fig. 21) se aprecia la abundancia de E2 y su IS en fracciones enriquecidas en núcleo, células completas, citosol y en mitocondria. En el cromatograma representativo de las fracciones subcelulares sin ser expuestas a estrógenos (Fig. 22), se minó la masa monoisotópica relativa de E2 (273.1848 *m/z*) y se puedo determinar la abundancia de E2 en las fracciones del núcleo y mitocondria, no así en la fracción citosóli



Figura 19. Cromatograma representativo utilizado para el análisis de MitoEE2 y EE2D4 en fracciones enriquecidas subcelulares de núcleo, citosol y mitocondria. Cromatograma del ion extraído asociado a MitoEE2 (613.3256 *m/z*) con un tiempo de retención de 8.3 minutos, así como el cromatograma del ion extraído asociado a EE2D4 (de 301.2099 *m/z*) con un tiempo de retención de 7.3 minutos. La masa teórica se considera masa experimental.



Figura 20. Cromatograma representativo utilizado para el análisis de MitoE2 y E2D2 en fracciones enriquecidas subcelulares de núcleo, células completas, citosol y mitocondria. Cromatograma del ion extraído asociado a MitoE2 (589.3235 m/z) con un tiempo de retención de 8.3 minutos Cromatograma del ion extraído asociado a E2D2 (275.1973 m/z) con un tiempo de retención de 7 minutos. La masa teórica se considera masa experimental.



Figura 21. Cromatograma representativo utilizado para el análisis de E2 y E2D2 en fracciones enriquecidas subcelulares de núcleo, citosol, mitocondria y de células completas. Cromatograma del ion extraído asociado a E2 (273.1848 m/z) con un tiempo de retención de 7 minutos. Cromatograma del ion extraído asociado a E2D2 (275.1973 m/z) con un tiempo de retención de 7 minutos. La masa teórica se considera masa experimental.



Figura 22. Cromatograma representativo utilizado para el análisis de E2 endógeno, E2D2 y EE2D4 en fracciones subcelulares enriquecidas en núcleo, células completas, citosol y mitocondria. Cromatograma del ion extraído asociado a E2 (273.1848 *m/z*) con un tiempo de retención de 7 minutos. Cromatograma del ion extraído asociado a E2D2 (275.1973 *m/z*) con un tiempo de retención de 7 minutos. Cromatograma del ion extraído asociado a EE2D4 (301.2099 *m/z*) con un tiempo de retención de 7.2 minutos. La masa teórica se considera masa experimental.

3.5 Resultados de la evaluación del coeficiente de acumulación mitocondrial de los estrógenos mito-dirigidos.

De acuerdo con el objetivo principal de evaluar la acumulación de los estrógenos mito-dirigidos con respecto al estrógeno no mito-dirigido, se realizó la comparación entre el AUC de los compuestos estrogénicos de las fracciones mitocondriales y citosólicas una vez normalizados con sus IS (Anexo A, Tabla 2). En el caso de MitoEE2, se logró cuantificar el AUC de las fracciones citosólicas y mitocondriales (ver Anexo A, Fig. 26) obteniendo un coeficiente de acumulación (CA) de 2.6. Esto indica que hay una mayor acumulación de MitoEE2 en la fracción mitocondrial que en la fracción citosólica (Tabla 1). MitoE2 no logró ser detectado en las repeticiones del experimento (tabla 1) (ver Anexo A, Fig. 27), sin embargo, los resultados preliminares indican que el CA de MitoE2 fue de 3.276, lo que demuestra que MitoE2 se acumula más en la mitocondria respecto al citosol (Tabla 1).

Tabla 1. Coeficiente de acumulación (CA) de los estrógenos mito-dirigidos resultante de la normalización del AUC de los compuestos estrogénicos con el AUC de sus IS. N/A es no aplica debido a que no se detectó MitoE2 por LC-MS/MS en las repeticiones del experimento.

Compuesto	Fracción	Normalización (AUC compuesto	CA	Promedio
expuesto		estrogénico/ AUC IS)		СА
MITOEE2	MITOEE2 Mitocondrial 1.45		3.28	2.57
	Citosólica	0.44		
Mitocondrial 0.16		2.95		
	Citosólica	0.05		
	Mitocondrial	0.03	1.49	
	Citosólica	0.02		
MITOE2	IITOE2 Mitocondrial 0.52		3.28	N/A
	Citosólica	0.09		
E2 Mitocondrial 0.07		0.16	0.29	
	Citosólica	0.42		
	Mitocondrial	0.07	0.61	
	Citosólica	0.11		
	Mitocondrial	0.002	0.10	
	Citosólica	0.02		

Acumulación MitoEE2 vs E2



Figura 23. Coeficiente acumulación mitocondrial (CA) de MitoEE2 respecto a E2. Análisis de T-student con desviación estándar mostrado (* = P 0.0440).

3.6 Corroboración del fraccionamiento subcelular.

En la figura 24 se observan los resultados de la inmunodetección para la corroboración del fraccionamiento subcelular llevada a cabo con jeringa de insulina para el paso de la ruptura celular. La presencia de la proteína MIC60 en la fracción mitocondrial (Fig. 24A) y de la proteína α-Tub en la fracción citosólica (Fig. 24B) indican que estas fracciones están enriquecidas. En el caso de la fracción nuclear, los resultados de las proteínas expuestas al anticuerpo anti-H-1 (Fig. 24C) indican que el anticuerpo tiene inespecificidades y reconoce otras proteínas que no son H-1, por lo tanto, con estos datos, no se puede determinar si la fracción nuclear está realmente enriquecida.



Figura 24. Fotografías de las membranas tras la inmunodetección por medio de la técnica Western Blot de células homogenizadas con jeringa de insulina Fraccionamiento con detergentes. Membranas reveladas por quimioluminiscencia. A) Fotografía de membrana expuesta a MIC60. B) Fotografía de membrana expuesta a α-Tub. C) Fotografía de membrana expuesta a H-1.

En la figura 25 se observan los resultados de la inmunodetección para corroborar el fraccionamiento subcelular llevado a cabo con el homogeneizador Dounce. En los resultados se observa que el anticuerpo anti-MIC60 detecta mitofilina en la fracción mitocondrial (Fig. 25A), indicando que esta fracción está enriquecida (Fig. 25A).

También en los resultados se observa que el anticuerpo anti- α -Tub detecta α -tubulina en la fracción citosólica (Fig. 25B), indicando que esta fracción está enriquecida. En este experimento, la membrana no se expuso al anticuerpo H1 por la inespecificidad observada anteriormente (Fig. 25C). Sin embargo, los resultados de la exposición de la membrana con el anticuerpo anti-MIC60 indican que hay mitofilina en la fracción nuclear, sugiriendo que hay proteínas mitocondriales en la fracción nuclear, lo que significa que esta fracción no está enriquecida con núcleos.



Figura 25. Fotografías de las membranas tras la inmunodetección por medio de la técnica Western Blot de células homogenizadas con el homogeneizador Dounce. Fraccionamiento subcelular con detergentes. Membranas reveladas por quimioluminiscencia. A) Fotografía de membrana expuesta al anticuerpo MIC60. B) Fotografía de membrana expuesta al anticuerpo anti-α-Tub.

En la figura 26 se observan los resultados de la inmunodetección para corroborar el fraccionamiento subcelular sin utilizar detergentes y mediante el método utilizando el homogenizador Dounce. Los resultados indican que el anticuerpo anti- α -Tub detecta α -tubulina en la fracción citosólica (Fig. 26A) indicando que la fracción citosólica está enriquecida. También, la inmunodetección con el anticuerpo anti-COX1 indica que el anticuerpo detecta COX1 en la fracción mitocondrial (Fig. 26B), indicando que la

fracción mitocondrial está enriquecida. En este experimento, se excluyó el uso del anticuerpo H1 por la inespecificidad observada anteriormente (Fig. 24C)



Figura 26. Fotografías de las membranas tras la inmunodetección por medio de la técnica Western blot de células homogenizadas con el homogeneizador Dounce. Fraccionamiento subcelular con soluciones sin detergentes. Membranas reveladas por quimioluminiscencia. A) Fotografía de membrana expuesta a α-Tub. B) Fotografía de membrana expuesta a COX1.

Antes de evaluar la acumulación mitocondrial de los estrógenos mito-dirigidos, es necesario conocer si las células expuestas a estos compuestos son viables para los siguientes experimentos. Para lograr este objetivo, se utilizó la línea celular MCF-7 como modelo *in vitro* sensible a estrógenos y en ésta se evaluó la citotoxicidad de los estrógenos mito-dirigidos. Los resultados de ensayos de MTS indican que los estrógenos mito-dirigidos no disminuyen la viabilidad celular a las concentraciones de 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1 y 10 nM a las distintas horas estudiadas (Fig. 9-16), demostrando que tanto MitoEE2 como MitoE2 son se pueden utilizar para la evaluación de la acumulación mitocondrial a concentraciones de 10 nM y menores.

En el caso del tratamiento con MitoEE2 a las 12 y 24 hrs, la viabilidad celular disminuyó de manera significativa a partir de la concentración de 100 nM (Fig. 10 y 11). Jiang et. al (2020) mencionan que la toxicidad del TPP podría ser un factor que limita su uso; sin embargo, Fink et. al (2009) observaron una disminución de la viabilidad celular a partir 1 μ M de dodecil-TPP en células BAE, mientras que el estudio de Fernandes et al. (2021) demuestra que MitoQ, y SkQ1 disminuyen la viabilidad celular a partir de 3.2 μ M y 1 μ M en las líneas celulares HepG2 y SH-SY5Y, respectivamente. De igual forma, Trandeleva et. al (2012) observaron que la despolarización de la membrana causada por el TPP+ comienza a partir de la concentración de 2.8 μ M. Estos reportes indican que la concentración de TPP+ usada en este trabajo es segura hasta 100 nM.

Por otro lado, los experimentos con diferentes tiempos de tratamiento indican que el TPP+ conjugado a los estrógenos mito-dirigidos no afecta la viabilidad celular. La acumulación de DTX-TPP en la mitocondria comienza a la primera hora de exposición (Battogtokh et al., 2018), mientras que los resultados de los tratamientos de MitoEE2 a las 6 hrs indican que no hay efecto en la viabilidad celular sino a partir a las 12 hrs (Fig. 9, Fig. 10). Esto indica que la acumulación del TPP+ conjugado en los estrógenos mito-dirigidos no afecta la viabilidad celular de las células.

Los resultados de células expuestas a MitoEE2 y a MitoE2 son distintos, siendo las concentraciones de MitoEE2 a 100 nM, 250 nM y 500 nM las que disminuyen la viabilidad celular. De acuerdo con Chou et. al (2020), las concentraciones de E2 a partir de 100 nM son consideradas suprafisiológicas y en su trabajo observaron que, a concentraciones mayores de 100 nM de E2, la viabilidad celular disminuye en células epiteliales endometriales. Además, Chen et al. (2004) demostraron que la concentración de E2 a 100 nM

en MCF-7 aumenta la actividad mitocondrial, mientras que EE2 lo hace a 1 nM. Esta diferencia depende de la afinidad a los receptores de estrógenos, siendo EE2 el más afín respecto a E2 (Blair et al. 2000). Esto sugiere que la disminución en la viabilidad celular de células expuestas a MitoEE2 es debido a las concentraciones suprafisiológicas utilizadas, y que la diferencia en los resultados de viabilidad celular depende del tipo de compuesto bioactivo conjugado al TPP+.

Al observar que los estrógenos mito-dirigidos son viables a concentraciones menores a 10 nM, y que no existe disminución en la viabilidad celular sino hasta las 12 horas de exposición, es posible evaluar la acumulación mitocondrial de los estrógenos mito-dirigidos en esta línea celular. Sin embargo, antes de evaluar su acumulación, es necesario conocer si el equipo de LC-MS/MS detecta los compuestos a distintas concentraciones. Los resultados de las diluciones estándar demuestran que el equipo detecta los estrógenos mito-dirigidos en un amplio rango de masa, desde 0.1 ng hasta 2 ng. Esto nos indica que los estrógenos mito-dirigidos son detectados por el equipo exitosamente.

Los resultados de diluciones estándar indican que estos compuestos son detectados desde 0.1 ng hasta 2 ng (Fig. 17 y 18). Esto quiere decir que, si se exponen las células a MitoEE2 y MitoE2 a 100 nM por 1 hr, la masa de los compuestos sería de 535.84 ng y 543.74 ng respectivamente, permitiendo un rango de detección amplio y seguro cuando se realice la evaluación de acumulación mitocondrial. Se consideró exponer a las células a esta cantidad de masa ya que se desconoce la cantidad de acumulación exacta de un estrógeno mito-dirigido en la mitocondria; esto permite utilizar un rango de concentraciones que van desde la concentración límite de detección inferior del equipo y así tener una ventana amplia de detección de los estrógenos mito-dirigidos cuando se realice su extracción a partir de las fracciones subcelulares.

Los resultados de la abundancia de los estrógenos mito-dirigidos y sus estándares internos indican que el LC-MS/MS detecta estos compuestos extraídos a partir de fracciones subcelulares, demostrando que el método de extracción es exitoso (Fig. 19-22). Anteriormente, se han realizado protocolos de extracción de lípidos mitocondriales en nervio óptico (Jauregui et al., 2023). En este protocolo se realiza un aislamiento mitocondrial a partir de células de nervio óptico de rata, seguido de un método de extracción de lípidos compatible con el equipo LC-MS/MS. Sin embargo, no se había realizado un protocolo de extracción y detección de compuestos estrogénicos a partir de fracciones subcelulares, de tal manera que el protocolo establecido en este trabajo es novedoso para la detección de compuestos estrogénicos por LC-MS/MS a partir de fracciones mitocondriales de la línea celular MCF-7.

En los resultados de detección de estrógenos a partir de fracciones subcelulares, se observa la presencia de E2 en células MCF-7 no expuestas a estrógenos (Fig. 22). La presencia de E2 se debe a la biosíntesis *de novo* de E2 mediante esteroidogénesis (E2 endógeno), en donde los estrógenos son sintetizados a partir del colesterol (Bremer & Miller, 2014). La síntesis de estrógenos suele suceder en las células granulosas del folículo ovárico y en tejido adiposo, sin embargo, se ha visto que las células MCF-7 expresan genes de enzimas asociadas a la conversión de precursores estrogénicos a E2 como la 17β-Hidroxiesteroide deshidrogenasa (Šmuc & Rižner, 2009). Estos resultados nos indican la presencia de E2 endógeno en células MCF-7 debido a la síntesis *de novo*, y de acuerdo con la literatura reportada, no hay protocolo en el cual se haya detectado la presencia de E2 endógeno en la línea celular MCF-7 por medio de LC-MS/MS, siendo la primera vez que es detectado por este método.

En los resultados de detección de los compuestos estrogénicos extraídos a partir de fracciones subcelulares por LC-MS/MS, se observa la presencia de los estrógenos mito-dirigidos en otras fracciones subcelulares que no corresponden a las mitocondriales. Este comportamiento puede deberse a que la concentración utilizada en este trabajo satura a los ER mitocondriales (mtER). Flores-Acosta (2021) demostró que la cantidad de E2 unido a los mtER α es de 0.39 pg/millón de células, mientras que en este trabajo la concentración de estrógenos que se usó en los tratamientos fue de 100 nM, es decir 535.84 ng y 543.74 ng. Esto indica que podría existir una saturación de los receptores mitocondriales y, por lo tanto, los estrógenos mito-dirigidos se unen a ER que no sean mitocondriales. Cabe recordar que, a pesar de que los mito-dirigidos son orientados y acumulados en la matriz mitocondrial, no son moléculas exclusivas de la mitocondria. (Trendeleva et al., 2012) a pesar de tener conjugado el TPP+ que le brinda la capacidad acumulativa, el compuesto bioactivo conjugado puede ser captado por su receptor en otros compartimentos subcelulares. Los receptores a estrógenos (ER) se encuentran en el citosol y, al unirse a su ligando, se dimerizan y se translocan al núcleo (Fig. 1) (Fuentes & Silveyra, 2019). Esto nos indica que la acumulación selectiva de los estrógenos mito-dirigidos se debe al TPP+ y la presencia de estos en otros organelos puede deberse a la saturación de los receptores de estrógenos mitocondriales por las concentraciones suprafisiológicas utilizadas.

Los resultados del coeficiente de acumulación de los estrógenos mito-dirigidos en las fracciones mitocondriales respecto a las citosólicas indican que los estrógenos mito-dirigidos se acumulan más en las fracciones mitocondriales (Tabla 1). Esto es debido a que los estrógenos mito-dirigidos tienen conjugado el TPP+, permitiendo a los estrógenos mito-dirigidos acumularse en el interior de la mitocondria.

Smith et al. (2003) mencionan que, de acuerdo con la ecuación de Nernst, el TPP+ tiene la capacidad acumularse al interior de la mitocondria de 100 a 1000 veces más que en citosol en condiciones estables. En este trabajo, MitoEE2 tiene una CA de 2.57, y el CA de MitoE2 es de 3.27 (Tabla 1), aunque no es la misma magnitud que en la teoría propuesta (Murphy & Smith, 2000; Zielonka et al., 2017), se aprecia una magnitud de acumulación mayor en la mitocondria que en el citosol. Además, la magnitud de acumulación propuesta por Smith et al. (2003) no considera la molécula biológica conjugada, ni su interacción con su receptor. Por lo anterior es necesario evaluar la acumulación mitocondrial de los estrógenos mito-dirigidos para conocer la magnitud de acumulación mitocondrial que presentan.

Comparando el coeficiente de acumulación mitocondrial de MitoEE2 respecto a E2, se encontró que el mito-dirigido tiene una mayor acumulación que la molécula parental (Fig. 23). Esto demuestra que los estrógenos mito-dirigidos tienen una mayor acumulación en la mitocondria con respecto al estrógeno parental. En el trabajo de Battogtokh et al. (2018), la acumulación mitocondrial de DTX-TPP es de 5 veces más respecto al no mito-dirigido, reforzando la participación de TPP para brindar la capacidad acumulativa. Esto indica que los estrógenos mito-dirigidos se acumulan en la mitocondria más que el estrógeno no mito-dirigido debido al TPP conjugado.

El coeficiente de acumulación de E2 es de 0.29 en la fracción mitocondrial respecto al citosol, demostrando que su acumulación no es en la mitocondria (Tabla 1). Esto nos indica que la actividad de E2 se encuentra de manera predominante en el citosol respecto a la mitocondria, Fuentes & Sylveira (2019) hacen una revisión de todas las vías de actividad intracelular del E2, siendo predominante la vía nuclear y la citosólica (Fig. 1). En el caso de la línea celular MCF-7, el E2 tiene actividad en el DNA nuclear asociada a la proliferación celular, por lo tanto, esta vía es la predominante (Liao et al., 2015; Maertens et al., 2017). Eso demuestra que el E2, al no ser un mito-dirigido, se encuentra en otros organelos que no son mitocondriales y al conjugarlo con el TPP+ se le confiere la propiedad acumulativa.

En las repeticiones del experimento de acumulación mitocondrial, MitoE2 no fue detectado por el equipo (anexo A, Fig. 27). En los resultados de diluciones estándar (Fig. 18), la magnitud de respuesta del equipo fue de 10³, mientras que MitoEE2 tuvo una respuesta de 10⁵ en la misma concentración. Esto quiere decir que MitoE2 tiene una respuesta de detección menor que MitoEE2, por lo tanto, si las concentraciones en los experimentos de acumulación son bajas, estas no son detectadas. Esto se debe a que la estructura de E2 y derivados representa un reto en su detección debido su baja afinidad a iones (Won et al., 2023), por lo tanto, la respuesta de detección es baja.

Los resultados de inmunodetección para corroborar el fraccionamiento subcelular indican que la fracción citosólica y la fracción mitocondrial están enriquecidas (Fig. 24-26). El fraccionamiento subcelular utilizando jeringa de insulina (Fig. 24) y el fraccionamiento usando homogeneizador (Fig. 25) mostraron resultados similares. Además, se obtuvo el mismo resultado realizando el fraccionamiento subcelular sin detergentes (Fig. 26) Esto nos permite comparar los el AUC de los estrógenos mito-dirigidos en fracción mitocondrial y citosólica, y obtener el coeficiente de acumulación.

Se puede observar que las fracciones mitocondriales y citosólicas están enriquecidas, sin embargo, no se obtuvieron los mismos resultados para la fracción nuclear, por lo tanto, no es posible comparar la acumulación mitocondrial respecto a la nuclear. Se debe recordar que el fraccionamiento subcelular realizado en este trabajo no es una purificación de organelos, (Pasquali et al., 1999; Pérez-Rodriguez et al., 2020), además, las fracciones nucleares suelen estar acompañadas de debris, mitocondrias y otros complejos proteicos (Huber et al., 2003).

Por lo tanto, existen diferentes tipos de recomendaciones para obtener fracciones nucleares enriquecidas: 1) Se recomienda realizar ensayos de purificación posterior a su fraccionamiento y corroborar los resultados de Western Blot por medio de Microscopía (Huber et al., 2003). 2) El proceso de homogenizado debe de ser adaptado para el tipo de célula (Pérez-Rodriguez et al., 2020). 3) Los resultados de la inmunodetección de proteínas nucleares por medio del anticuerpo Anti-Histona-1 indican que no existe especificidad en la detección y por lo tanto es necesario volver a realizar el ensayo inmunodetección de Western Blot con otro anticuerpo específico de proteína nuclear exclusiva. El objetivo de este trabajo fue conocer si los estrógenos mito-dirigidos se acumulan más en la mitocondria que los estrógenos no mito-dirigidos y para ello se evaluó su acumulación mitocondrial en células sensibles a estrógenos. Se encontró que los estrógenos mito-dirigidos, además de no ser citotóxicos a concentraciones de 0.1 nM a 10 nM, fueron detectados por el equipo LC-MS/MS, siendo la primera vez detectados mediante este método. Se demostró que los estrógenos mito-dirigidos se acumulan más en fracciones mitocondriales respecto a las citosólicas. Y comparando su coeficiente de acumulación mitocondrial respecto al del estrógeno no mito-dirigido, se demostró que los estrógenos mito-dirigidos se acumulan condrial respecto al del estrógeno no mito-dirigido.

Estos resultados demuestran que los estrógenos mito-dirigidos novedosos se acumulan en la mitocondria, cumpliendo el objetivo de ser mito-dirigidos, además de no ser citotóxicos para las células sensibles a estrógenos. Esto permitirá dar paso a estudios de actividad biológica mitocondrial tras un tratamiento con estrógenos mito-dirigidos *in vitro* y sentará las bases de tratamiento hormonal específico para enfermedades asociadas a la disfunción mitocondrial.

Además de dar paso a estudios de actividad biológica mitocondrial, se proponen distintas actividades que pueden enriquecer este proyecto a corto y mediano plazo. Optimizar la extracción de estrógenos mitodirigidos para tener una mayor homogeneidad en su detección. Estandarizar el uso del anticuerpo Anti-COX1 para la detección óptima de proteína COX1. Corroborar el enriquecimiento de fracciones nucleares por medio de un anticuerpo que detecte proteína nuclear y respaldar el enriquecimiento de las fracciones subcelulares mitocondriales, citosólicas y nucleares por medio de microscopía. Comparar el coeficiente de acumulación entre fracciones nucleares y mitocondriales.

- Álvarez-Delgado, C., & Cerbón, M. (2011). Receptores a estrógenos mitocondriales: la señalización hormonal más allá del núcleo. En I. Camacho Arroyo, J. Morales Montor and J. Velázquez Moctezuma (Eds.), Efectos no reproductivos de las hormonas sexuales. UAM-PUIS. (pp. 1-19).
- Álvarez-Delgado, C., Mendoza-Rodríguez, C. A., Picazo, O., & Cerbón, M. (2010). Different expression of α and β mitochondrial estrogen receptors in the aging rat brain: Interaction with respiratory complex V. *Experimental Gerontology*, 45(7-8). <u>https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.01.015</u>
- Battogtokh, G., Gotov, O., Kang, J. H., Cho, J., Jeong, T. H., Chimed, G., & Ko, Y. T. (2018). Triphenylphosphine-docetaxel conjugate-incorporated albumin nanoparticles for cancer treatment. *Nanomedicine*, 13(3). <u>https://doi.org/10.2217/nnm-2017-0274</u>
- Bhatti, J. S., Bhatti, G. K., & Reddy, P. H. (2017). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders: A step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease, 1863*(5). https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.11.010
- Blair, R. M., Fang, H., Branham, W. S., Hass, B. S., Dial, S. L., Moland, C. L., Tong, W., Shi, L., Perkins, R., Sheehan, D.M. (2000). The Estrogen Receptor Relative Binding Affinities of 188 Natural and Xenochemicals: Structural Diversity of Ligands. Toxicological Sciences, 54(1). <u>https://doi.org/10.1093/toxsci/54.1.138</u>
- Borrás, C., Gambini, J., López-Grueso, R., Pallardó, F., & Viña, J. (2010). Direct antioxidant and protective effect of estradiol on isolated mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*, *1802*(1). <u>https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.09.007</u>
- Bremer, A. A., & Miller, W. L. (2014). Regulation of Steroidogenesis. En A. Ulloa-Aguirre & M. Conn (Eds.), *Cellular Endocrinology in Health and Disease*. Elsevier. <u>https://doi.org/10.1016/B978-0-12-</u> <u>408134-5.00013-5</u>
- Camello-Almaraz, C., Gomez-Pinilla, P. J., Pozo, M. J., & Camello, P. J. (2006). Mitochondrial reactive oxygen species and Ca2+ signaling. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 291(5). https://doi.org/10.1152/ajpcell.00217.2006
- Capllonch-Amer, G., Sbert-Roig, M., Galmés-Pascual, B. M., Proenza, A. M., Lladó, I., Gianotti, M., & García-Palmer, F. J. (2014). Estradiol stimulates mitochondrial biogenesis and adiponectin expression in skeletal muscle. *Journal of Endocrinology*, 221(3). <u>https://doi.org/10.1530/JOE-14-0008</u>
- Castracani, C. C., Longhitano, L., Distefano, A., Anfuso, D., Kalampoka, S., La Spina, E., Astuto, M., Avola, R., Caruso, M., Nicolosi, D., Giallongo, C., Tibullo, D., & Volti, G. L. (2020). Role of 17β-Estradiol on Cell Proliferation and Mitochondrial Fitness in Glioblastoma Cells. *Journal of Oncology*, 2020. https://doi.org/10.1155/2020/2314693
- Chen, J., Delannoy, M., Odwin, S., He, P., Trush, M., & Yager, J. (2003). Enhanced Mitochondrial Gene Transcript, ATP, Bcl-2 Protein Levels, and Altered Glutathione Distribution in Ethinyl Estradiol-

Treated Cultured Female Rat Hepatocytes. *Toxicological Sciences*, 75(2). https://doi.org/10.1093/toxsci/kfg183

- Chen, J. Q., Delannoy, M., Cooke, C., & Yager, J. D. (2004). Mitochondrial localization of ERα and ERβ in human MCF7 cells. American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism, 286(6). <u>https://doi.org/10.1152/ajpendo.00508.2003</u>
- Chen, J., & Yager, J. (2004). Estrogen's Effects on Mitochondrial Gene Expression: Mechanisms and Potential Contributions to Estrogen Carcinogenesis. Annals of the New York Academy of Sciences, 1028(1). <u>https://doi.org/10.1196/annals.1322.030</u>
- Chou, C.-H., Chen, S.-U., Chen, C.-D., Shun, C.-T., Wen, W.-F., Tu, Y.-A., & Yang, J.-H. (2020). Mitochondrial Dysfunction Induced by High Estradiol Concentrations in Endometrial Epithelial Cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 105*(1). <u>https://doi.org/10.1210/clinem/dgz015</u>
- Cook-Botelho, J. C., Bachmann, L. M., & French, D. (2017). Steroid hormones. En Nair Hari & Clarke William (Eds.), *Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory*. Elsevier. <u>https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800871-3.00010-9</u>
- Davis, S. R., Lambrinoudaki, I., Lumsden, M., Mishra, G. D., Pal, L., Rees, M., Santoro, N., & Simoncini, T. (2015). Menopause. *Nature Reviews Disease Primers*, 1(1). <u>https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.4</u>
- Eisenfeld, A. J., Aten, R., Weinberger, M., Haselbacher, G., Halpern, K., & Krakoff, L. (1976). Estrogen Receptor in the Mammalian Liver. *Science*, 191(4229). <u>https://doi.org/10.1126/science.175442</u>
- Fait, T. (2019). Menopause hormone therapy: latest developments and clinical practice. *Drugs in Context*, 8. <u>https://doi.org/10.7573/dic.212551</u>
- Fernandes, C., Videira, A. J. C., Veloso, C. D., Benfeito, S., Soares, P., Martins, J. D., Gonçalves, B., Duarte, J. F. S., Santos, A. M. S., Oliveira, P. J., Borges, F., Teixeira, J., & Silva, F. S. G. (2021). Cytotoxicity and Mitochondrial Effects of Phenolic and Quinone-Based Mitochondria-Targeted and Untargeted Antioxidants on Human Neuronal and Hepatic Cell Lines: A Comparative Analysis. *Biomolecules*, 11(11). <u>https://doi.org/10.3390/biom11111605</u>
- Fink, B. D., O'Malley, Y., Dake, B. L., Ross, N. C., Prisinzano, T. E., & Sivitz, W. I. (2009). Mitochondrial Targeted Coenzyme Q, Superoxide, and Fuel Selectivity in Endothelial Cells. *PLOS ONE*, 4(1). <u>https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004250</u>
- Flores-Acosta, G. I. (2021). Análisis de la unión del estradiol a los receptores a estrógenos mitocondriales en células MCF-7. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. <u>https://biblioteca.cicese.mx/catalogo/tesis/ficha.php?id=25875</u>
- Fuentes, N., & Silveyra, P. (2019). Estrogen receptor signaling mechanisms. *Advances in Protein Chemistry* and Structural Biology, 116, 135-170. <u>https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.01.001</u>
- Galmés-Pascual, B. M., Nadal-Casellas, A., Bauza-Thorbrügge, M., Sbert-Roig, M., García-Palmer, F. J., Proenza, A. M., Gianotti, M., & Lladó, I. (2017). 17β-estradiol improves hepatic mitochondrial

biogenesis and function through PGC1B. *Journal of Endocrinology*, 232(2). https://doi.org/10.1530/JOE-16-0350

- Huber, L. A., Pfaller, K., & Vietor, I. (2003). Organelle Proteomics. *Circulation Research*, 92(9). https://doi.org/10.1161/01.RES.0000071748.48338.25
- Jauregui, A. M., Cubero Cortés, Z. M., Meehan, S. D., & Bhattacharya, S. K. (2023). Isolation of Mitochondrial Lipids and Mass Spectrometric Analysis. En S. K. Bhattacharya (Ed.), *Lipidomics. Methods in Molecular Biology.* (Vol. 2625, pp. 1-6). Humana. <u>https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2966-6 1</u>
- Jiang, Q., Yin, J., Chen, J., Ma, X., Wu, M., Liu, G., Yao, K., Tan, B., & Yin, Y. (2020). Mitochondria-Targeted Antioxidants: A Step towards Disease Treatment. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020. https://doi.org/10.1155/2020/8837893
- Klinge, C. M. (2008). Estrogenic control of mitochondrial function and biogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 105(6), 1342-1351. <u>https://doi.org/10.1002/jcb.21936</u>
- Kwak, S. H., Park, K. S., Lee, K.-U., & Lee, H. K. (2010). Mitochondrial metabolism and diabetes. *Journal of Diabetes Investigation*, 1(5). https://doi.org/10.1111/j.2040-1124.2010.00047.x
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., & Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade. *Cell*, *91*(4). <u>https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80434-1</u>
- Li, Y., Zhang, H., Fawcett, J. P., & Tucker, I. G. (2007). Quantitation and metabolism of mitoquinone, a mitochondria-targeted antioxidant, in rat by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21(13). <u>https://doi.org/10.1002/rcm.3048</u>
- Liao, T. L., Tzeng, C. R., Yu, C. L., Wang, Y. P., & Kao, S. H. (2015). Estrogen receptor-β in mitochondria: implications for mitochondrial bioenergetics and tumorigenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1350(1). https://doi.org/10.1111/nyas.12872
- Lopez-Sanchez, M., Shearwood, A.-M., Chia, T., Davies, S., Rackham, O., & Filipovska, A. (2015). Estrogen-Mediated Regulation of Mitochondrial Gene Expression. *Molecular Endocrinology*, 29(1). <u>https://doi.org/10.1210/me.2014-1077</u>
- Maertens, A., Bouhifd, M., Zhao, L., Odwin-DaCosta, S., Kleensang, A., Yager, J. D., & Hartung, T. (2017). Metabolomic network analysis of estrogen-stimulated MCF-7 cells: a comparison of overrepresentation analysis, quantitative enrichment analysis and pathway analysis versus metabolite network analysis. Archives of Toxicology, 91(1). <u>https://doi.org/10.1007/s00204-016-1695-x</u>
- Mattingly, K., Ivanova, M., Riggs, Krista., Wickramasinghe, N., Barch, Margaret., & Klinge, C. (2008). Estradiol Stimulates Transcription of Nuclear Respiratory Factor-1 and Increases Mitochondrial Biogenesis. *Molecular Endocrinology*, 22(3). <u>https://doi.org/10.1210/me.2007-0029</u>
- Merchenthaler, I. (2018). Estrogens. En Skinner Michael K. (Ed.), *Encyclopedia of Reproduction* (2.^a ed.). Elsevier. <u>https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64639-1</u>

- Meza-Villezcas, A., Carballo-Castañeda, R. A., Moreno-Ulloa, A., & Huerta-Saquero, A. (2022). Metabolomic Profiling of the Responses of Planktonic and Biofilm Vibrio cholerae to Silver Nanoparticles. *Antibiotics*, 11(11). <u>https://doi.org/10.3390/antibiotics1111534</u>
- Miller, W. L. (2013). Steroid hormone synthesis in mitochondria. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 379(1-2). <u>https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.04.014</u>
- Murphy, M., & Smith, R. (2000). Drug delivery to mitochondria: the key to mitochondria medicine. *Advanced Drug Delivery Review*, *41*, 235-250.
- Osellame, L. D., Blacker, T. S., & Duchen, M. R. (2012). Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 26(6). https://doi.org/10.1016/j.beem.2012.05.003
- Pasquali, C., Fialka, I., & Huber, L. A. (1999). Subcellular fractionation, electromigration analysis and mapping of organelles. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 722(1-2). https://doi.org/10.1016/S0378-4347(98)00314-4
- Pérez-Rodriguez, S., Ramírez-Lira, M., Wulff, T., Voldbor, B. G., Ramírez, O. T., Trujillo-Roldán, M. A., & Valdez-Cruz, N. A. (2020). Enrichment of microsomes from Chinese hamster ovary cells by subcellular fractionation for its use in proteomic analysis. *PLOS ONE*, 15(8). <u>https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237930</u>
- Poznyak, A. V., Ivanova, E. A., Sobenin, I. A., Yet, S. F., & Orekhov, A. N. (2020). The role of mitochondria in cardiovascular diseases. *Biology*, *9*(6), 1-14. <u>https://doi.org/10.3390/BIOLOGY9060137</u>
- Rodríguez-Carranza, R. (2015). Etinilestradiol y levonorgestrel: anticonceptivos. En McGraw-Hill Interamericana (Ed.), *Vademécum Académico de Medicamentos* (6th ed.). Universidad Nacional Autónoma de México. <u>https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1552§ionid=90370216</u>.
- Shaw, G. A. (2021). Mitochondria as the target for disease related hormonal dysregulation. *Brain, Behavior, & Immunity Health, 18.* <u>https://doi.org/10.1016/j.bbih.2021.100350</u>
- Smith, R. A. J., Porteous, C. M., Gane, A. M., & Murphy, M. P. (2003). Delivery of bioactive molecules to mitochondria in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(9). <u>https://doi.org/10.1073/pnas.0931245100</u>
- Šmuc, T., & Rižner, T. L. (2009). Expression of 17β-hydroxysteroid dehydrogenases and other estrogenmetabolizing enzymes in different cancer cell lines. *Chemico-Biological Interactions*, 178(1-3). <u>https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.10.038</u>
- Sreerangaraja Urs, D. B., Wu, W.-H., Komrskova, K., Postlerova, P., Lin, Y.-F., Tzeng, C.-R., & Kao, S.-H. (2020). Mitochondrial Function in Modulating Human Granulosa Cell Steroidogenesis and Female Fertility. International Journal of Molecular Sciences, 21(10). <u>https://doi.org/10.3390/ijms21103592</u>
- Stachowiak, G., Pertyński, T., & Pertyńska-Marczewska, M. (2015). Metabolic disorders in menopause. *Menopausal Review*, 1. <u>https://doi.org/10.5114/pm.2015.50000</u>

- Torres, M. J., Kew, K. A., Ryan, T. E., Pennington, E. R., Lin, C.-T., 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., & Neufer, P. D. (2018). 17β-Estradiol Directly Lowers Mitochondrial Membrane Microviscosity and Improves Bioenergetic Function in Skeletal Muscle. *Cell Metabolism*, 27(1). <u>https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.10.003</u>
- Trendeleva, T. A., Rogov, A. G., Cherepanov, D. A., Sukhanova, E. I., Il'yasova, T. M., Severina, I. I., & Zvyagilskaya, R. A. (2012). Interaction of tetraphenylphosphonium and dodecyltriphenylphosphonium with lipid membranes and mitochondria. *Biochemistry* (*Moscow*), 77(9). <u>https://doi.org/10.1134/S000629791209009X</u>
- Velarde, M. C. (2013). Pleiotropic actions of estrogen: a mitochondrial matter. *Physiological Genomics*, 45(3). https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00155.2012
- Won, E. J., Yi, A., & Ko, Y. J. (2023). Analytical Performance Evaluation for Estradiol using Liquid Chromatography–
Tandem Mass Spectrometry. Clinical Biochemistry, 113.
https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2023.01.003
- Yager, J. D., & Chen, J. Q. (2007). Mitochondrial estrogen receptors new insights into specific functions. *Trends* in Endocrinology & Metabolism, 18(3), 89-91. <u>https://doi.org/10.1016/j.tem.2007.02.006</u>
- Zielonka, J., Joseph, J., Sikora, A., Hardy, M., Ouari, O., Vasquez-Vivar, J., Cheng, G., Lopez, M., & Kalyanaraman, B. (2017). Mitochondria-Targeted Triphenylphosphonium-Based Compounds: Syntheses, Mechanisms of Action, and Therapeutic and Diagnostic Applications. *Chemical Reviews*, *117*(15). https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00042

Anexos



Anexo A. AUC de los compuestos estrogénicos en fracción mitocondrial y citosólica.

Fracción mitocondrial y citosólica de células expuestas a MitoEE2

Conteo vs. Tiempo de adquisición (min)

Figura 27. Cromatograma representativo utilizado para el análisis del AUC de MitoEE2 en fracciones enriquecidas subcelulares de citosol y mitocondria. Cromatograma del ion extraído asociado a MitoEE2 (613.3256 *m/z*) con un tiempo de retención de 8.3 minutos. La masa teórica se considera masa experimental.



Fracción mitocondrial y citosólica de células expuestas a MitoE2

Conteo vs. Tiempo de adquisición (min)

Figura 28. Cromatograma representativo utilizado para el análisis del AUC de MitoE2 en fracciones enriquecidas subcelulares de citosol y mitocondria. Cromatograma del ion extraído asociado a MitoE2 (589.3235 *m/z*) con un tiempo de retención de 8.2 minutos. La masa teórica se considera masa experimental.



Fracción mitocondrial y citosólica de células expuestas a E2

Conteo vs. Tiempo de adquisición (min)

Figura 29. Cromatograma representativo utilizado para el análisis del AUC de E2 en fracciones enriquecidas subcelulares de citosol y mitocondria. Cromatograma del ion extraído asociado a E2 (273.1848 *m/z*) con un tiempo de retención de 7.2 minutos. La masa teórica se considera masa experimental.

IMENTO	Fracciones expuestas a	AUC MitoEE2	IS	AUC IS	Normalización IS	СА
	MitoEE2					(Mito/Cito)
	Mitocondrial	423357.51	EE2D4	290996.65	1.4	3 78
	Citosólica	214513.09	EE2D4	482964.59	0.4	5.20
	Fracciones expuestas a		16		Normalización IC	СА
	MitoE2		15	AUCIS		(Mito/Cito)
XPEF	Mitocondrial	23398.17	E2D2	44978.3	0.5	5.48
ERE	Citosólica	11293.76	E2D2	119064.95	0.09	
л П	Fracciones expuestas a E2	AUC E2	IS	AUC IS	Normalización IS	CA (Mito/Cito)
	Mitocondria	9921	E2D2	144601.13	0.06	0.16
	Citosol	50594.98	E2D2	120943.93	0.4	
	Fracciones expuestas a		IC		Normalización IS	CA
	MitoEE2		15	AUCIS		(Mito/Cito)
	Mitocondrial	30128.91	E2D2	34051.02	0.15	2 95
			EE2D4	192236.27		
	Citosólica	6124.65	E2D2	42910.31	0.05	2.55
			EE2D4	115155.95	0.05	
NTO	Fracciones expuestas a MitoE2	AUC MitoE2	IS	AUC IS	Normalización IS	CA (Mito/Cito)
RIME	Mitocondrial	N/A	E2D2	N/A	N/A	N/A
EXPE			EE2D4	N/A		
DOE	Citosólica	N/A	E2D2	N/A	N/A	
2			EE2D4	N/A		
	Fracciones expuestas a E2	AUC E2	IS	AUC IS	Normalización IS	CA (Mito/Cito)
	Mitocondrial	9509.47	E2D2	22845.36		
			EE2D4	135879.74	0.07	
	Citosólica	5967.9	E2D2	17977.82	0.11	0.612
			EE2D4	52216.83		
				1		

Tabla 2. Tabla de AUC de compuestos estrogénicos en fracciones mitocondriales y citosólicas. Normalización del AUC de los estrógenos con el AUC de los IS. CA resultante de la comparación de los AUC de los estrógenos en fracciones mitocondriales y citosólicas.

	Fracciones expuestas a	AUC MitoEE2	IS	AUC IS	Normalización IS	CA
	MitoEE2					(Mito/Cito)
	Mitocondrial	23704.53	E2D2	56654.6	0.032	1 49
			EE2D4	736153.91		
	Citosólica	10335.86	E2D2	39713.2	0.022	
			EE2D4	479654.15	0.022	
	Fracciones expuestas a	AUC MitoF2	15		Normalización IS	СА
3ER EXPERIMENTO	MitoE2			Accis		(Mito/Cito)
	Mitocondrial	1578.36	E2D2	41477.81	N/A	N/A
			EE2D4	385229.16		
	Citosólica	N/A	E2D2	48191.14	N/A	
			EE2D4	225365.56		
	Fracciones expuestas a	AUC E2	IS		Normalización IS	CA
	E2					(Mito/Cito)
	Mitocondrial	1106.26	E2D2	49705.84	0.002	
			EE2D4	491221.88		0.096
	Citosólica	5767.8	E2D2	49036.07	0.024	
		0.000	EE2D4	244795.25		