



FACULTAD DE CIENCIAS

**PROGRAMA DE LICENCIATURA EN CIENCIAS MENCIÓN
BIOLOGÍA O QUÍMICA**

**LA AROMATIZACIÓN DE ESTRÓGENO COMO
MECANISMO PROTECTOR DE LA MUERTE
CELULAR INDUCIDA POR ESTRÉS OXIDATIVO**

**UNIDAD DE INVESTIGACIÓN II PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADO EN CIENCIAS MENCIÓN BIOLOGÍA**

BELEN ELISA RODRIGUEZ RODRIGUEZ

DIRECTOR

PABLO OLIVERO REBOLLEDO

Valparaíso, Chile

2013

INDICE

RESUMEN.....	7
INTRODUCCION.....	8
1. Efecto de ROS sobre el funcionamiento celular:.....	8
2. Rol protector de estrógeno en la muerte celular inducida por estrés oxidativo.	10
3. Producción de estrógenos: Aromatización de andrógenos	11
4. TRPs y la muerte celular por estrés oxidativo:	13
5. Regulación por esteroides de los TRP	16
HIPÓTESIS	19
OBJETIVOS	20
1. Objetivo general.....	20
2. Objetivos específicos	20
MATERIALES Y METODOS.....	21
1. Cultivo Celular:.....	21
2. RT-PCR.....	21
3. Medición de esteroides por RIA.....	22
4. Muerte celular por citometría de flujo.....	23
5. Análisis de Datos	24
RESULTADOS.....	25
1. Expresión de Receptores de Estrógenos: Caracterización de líneas en cultivo.....	25
2. Inducción de Aromatización <i>in vitro</i>	26
3. Efecto de estradiol en la muerte celular en un sistema que expresa de manera heteróloga TRPV1.....	27
3.1 Controles de medición	27
3.2 La capacidad de aromatización protege a las células de la muerte inducida por H ₂ O ₂	28
DISCUSION	32
1. Los andrógenos protegen de la muerte celular oxidativa solo si las células presentan actividad aromatasa.	32

2. La producción de estrógenos in vitro potencia la protección celular de forma paracrina principalmente a través de TRPV1	32
3. La inhibición por capsazepina reduce parcialmente la protección inducida por inducción de aromatización.....	34
4. El efecto protector de lo estrógeno se registra en ausencia de los receptores clásicos de estrógeno como (ER α , ER β y GPR30).	34
CONCLUSION	37
REFERENCIAS	38
ANEXO	44
Anexo A	44
Anexo A1: Protocolo de Extracción de RNA.....	44
Anexo A2: Protocolo de síntesis de cDNA.....	46
Anexo A3: Protocolo de RT-PCR.....	47
Anexo A4: Protocolo de amplificación para RT-PCR.	48
Anexo A5: Preparación de muestras para citometría de flujo.	49
Anexo B: Detalles de soluciones y medios de cultivo celular y estimulación.....	50
Anexo B1: Detalles de soluciones y medios de cultivo celular.....	50
Anexo B2: Detalles de estimulación para la inducción de la aromatización <i>in vitro</i>	51
Anexo B3: Detalles de estimulación del sistema heterólogo con los medios condicionados para la aromatización de testosterona.	52

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representación esquemática de los principales representantes de la red celular antioxidante.	8
Figura 2: Familia de ROS y sus efectos celulares.....	9
Figura 3: Esquema modelo que ilustra la relación entre acciones extranucleares y nucleares de estrógeno en una célula diana.	11
Figura 4: Síntesis de estrógeno a partir de testosterona..	12
Figura 5: Filogenia de los canales TRP.	14
Figura 6: TRPV1 activado por varios estímulos fisicoquímicos.	15
Figura 7: Muerte celular inducida por H ₂ O ₂ en el sistema heterólogo de expresión.....	17
Figura 8: Activación farmacología del canal aumenta la viabilidad celular.....	17
Figura 9: Protección celular inducida por estradiol a través de TRPV1.....	18
Figura 10: Esquema del protocolo de inducción de la aromatización.	23
Figura 11: Picos de excitación y emisión fluorescente en el espectro de luz visible de Rhodamina 123 y Ioduro de Propidio.	24
Figura 12: Caracterización de la expresión de los TRPV1, ERs en el sistema heterólogo mediante PCR.	26
Figura 13: Medición de la aromatización de testosterona a estrógeno..	27
Figura 14: Controles de registro para citometría de flujo..	28
Figura 15: La aromatización de testosterona protege de la muerte celular inducida por H ₂ O ₂ en HeLa parental y HeLa-TRPV1.	30
Figura 16: La protección inducida por los medios condicionados en HeLa-TRPV1 es inhibida por capsazepina.....	361
Figura 17: Esquema del modelo propuesto para la aromatización de estrógeno como mecanismo protector de la muerte celular inducido por estrés oxidativo.....	36

ABREVIATURAS

Bu₂-cAMP: Dibutilil-AMP cíclico

CAP: capsaicina

CPZ: capsazepina

DHEA: Dehidroepiandrosterona

ERK: Extracellular signal-regulated kinases

ERs: Receptores de Estrógenos

GPR30: Receptor acoplado a proteína G 30

IR: Isquemia-Reperfusión

MAPK: Proteína quinasas activadas por mitógenos

OGD: Oxígeno-Glucosa Privación

P/S: Penicilina/Estreptomicina

PBS: Phosphate Buffered Saline

PI: Ioduro de Propidio

PI3-K: Fosfoinositol 3-quinasa

PIP2: Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

PKC. Proteína quinasa C

PMA: Forbol 12-miristato, 13-acetato

PS: Pregnenolona-sulfato

Rho 123: Rhodamina 123

RIA: Radioimmunoassay

ROS: Reactive Oxygen Species

RTK: Receptor Tirosina quinasa

RT-PCR: Revers Transcriptase Polimerase Chain Reaction

SFB: Suero Fetal Bovino

StAR: Steroidogenic Acute Regulatory

TRP: Transient Receptor Potencial

TRPV1: Transient Receptor Potencial Vanilloid 1

RESUMEN

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son un grupo de moléculas provenientes del metabolismo del oxígeno, fundamentales para el funcionamiento celular. La generación descontrolada de ROS es tóxica para las células causando disfunción celular y muerte. Así el fenómeno de estrés oxidativo, es la principal explicación básica de un gran número de enfermedades degenerativas e inflamatorias, en diferentes tejidos. Específicamente en el testículo, el estrés oxidativo induce alteraciones en la función reproductiva, perturbando la espermatogénesis y la producción de hormonas esteroidales. En respuesta a esta agresión los tejidos ejecutan variados cambios en la función celular para mantener la homeostasis y disminuir el daño. Por ejemplo, en tejido reproductivo, estrógenos, y no andrógenos, favorecen la resistencia de la línea germinal en un ambiente oxidativo. La resistencia inducida por estrógeno, es caracterizada como independiente de receptores clásicos y relacionada con la actividad de la membrana. Sin embargo las entidades moleculares involucradas en el mecanismo no han sido completamente dilucidadas. En este contexto, canales catiónicos no selectivos de la familia TRP, son altamente regulados por esteroides. Proponemos a TRPV1 como un receptor ionotrópico de esteroides capaz de responder selectivamente a estrógeno y testosterona siendo un determinante mayor en la mantención de la viabilidad. De este modo, postulamos que la aromatización de andrógenos a estrógenos constituye un mecanismo protector frente al ambiente oxidativo a través de la función regulada de TRPV1. Controlamos la producción local de estrógenos a partir de andrógenos estimulando la capacidad de aromatización mediante activación farmacológica en una línea celular proveniente de espermatozoides, mediante RIA se determinó que la activación farmacológica *in vitro* efectivamente aumenta la cantidad de estrógeno liberado al medio de cultivo celular. Medimos mediante citometría de flujo el efecto en la viabilidad celular de los medios condicionados para la aromatización a estrógeno sobre la muerte inducida por estrés oxidativo, en un modelo que sobreexpresa TRPV1 de manera heteróloga, protegiendo de la muerte celular a aquellas células expresan el canal. Por lo tanto la aromatización a estrógeno puede ser un mecanismo auto y/o paracrino en la protección celular frente a estrés oxidativo mediado por TRPV1.

INTRODUCCION

1. Efecto de ROS sobre el funcionamiento celular:

Las especies reactivas de oxígeno (ROS), son un grupo de moléculas altamente reactivas generadas a nivel celular por el metabolismo del oxígeno. ROS incluye moléculas con uno o más electrones desapareados como el anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (OH^\cdot); y oxidantes no radicales como peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Este último corresponde a la especie reactiva de mayor vida media, y al reaccionar con metales (reacción de Fenton) es capaz de formar el radical hidroxilo, altamente reactivo con componentes celulares (Boonstra & Post, 2004; Finkel & Holbrook, 2000). Las células poseen un sistema de protección antioxidante que involucra enzimas como; la catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa que completan la reducción de estas moléculas en agua (Figura 1). Otras moléculas más pequeñas no enzimáticas, como vitaminas (A, C y D) y algunas hormonas esteroideas funcionan como un complemento a las enzimas antioxidantes, aumentando la capacidad de respuesta celular a incrementos de ROS mediante la reducción de radicales libres (Giorgio, Trinei, Migliaccio, & Pelicci, 2007; Gough & Cotter, 2011)

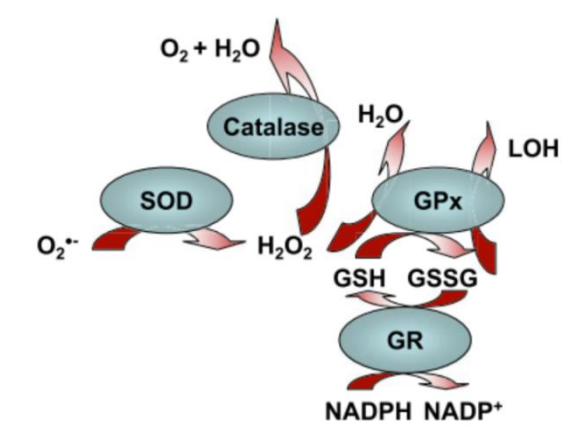


Figura 1: Representación esquemática de los principales representantes de la red celular antioxidante. El anión superóxido (O_2^-) es dismutado por la superóxido dismutasa (SOD), presente en la mitocondria y el citosol. El H_2O_2 producido podría dar lugar a la formación del radical hidroxilo altamente reactivo, este puede ser neutralizado por la catalasa en los peroxisomas y por la glutatión peroxidasa citosólica y mitocondrial (GPx). Esta última enzima elimina el H_2O_2 mediante la oxidación de glutatión (GSH) a GSSG, que luego se reduce a su estado original de por Glutatión reductasa (GR), a expensas de NADPH (Boonstra & Post, 2004).

Como se discutió anteriormente es necesario controlar los diferentes niveles de ROS para regular el estado redox intracelular, y así evitar la oxidación excesiva de los componentes celulares, como proteínas y lípidos entre otros. Las ROS pueden ser generadas por factores internos y/o externos, a bajas concentraciones son segundos mensajeros en procesos como el ciclo celular, activación de factores de crecimiento, regulación de factores de transcripción y modulación de vías de señalización (Figura 2A) como por ejemplo las mediadas por el RTK, PKC y MAPKs (Gough & Cotter, 2011). Sin embargo en dosis moderadas, inducen apoptosis, la cual es caracterizada por una disminución del volumen celular, activación de caspasas, condensación de la cromatina y fragmentación del ADN (Bortner & Cidlowski, 2004). Una producción alta de ROS causa daño irreversible asociado a una muerte celular mediada por un proceso necrótico, caracterizado por un aumento del volumen celular, hinchazón de los organelos, ruptura de la membrana plasmática y pérdida del contenido celular al espacio extracelular (Figura 2B). La muerte por necrosis es el resultado de la excesiva oxidación de determinantes moleculares críticos en la mantención de la homeostasis (Kroemer et al., 2005; Yuan & Kroemer, 2010). El estrés oxidativo es la explicación en un gran número de enfermedades y síndromes degenerativos, como cáncer, daño por isquemia-reperfusión, enfermedades neurodegenerativas y procesos inflamatorios (Boonstra & Post, 2004).

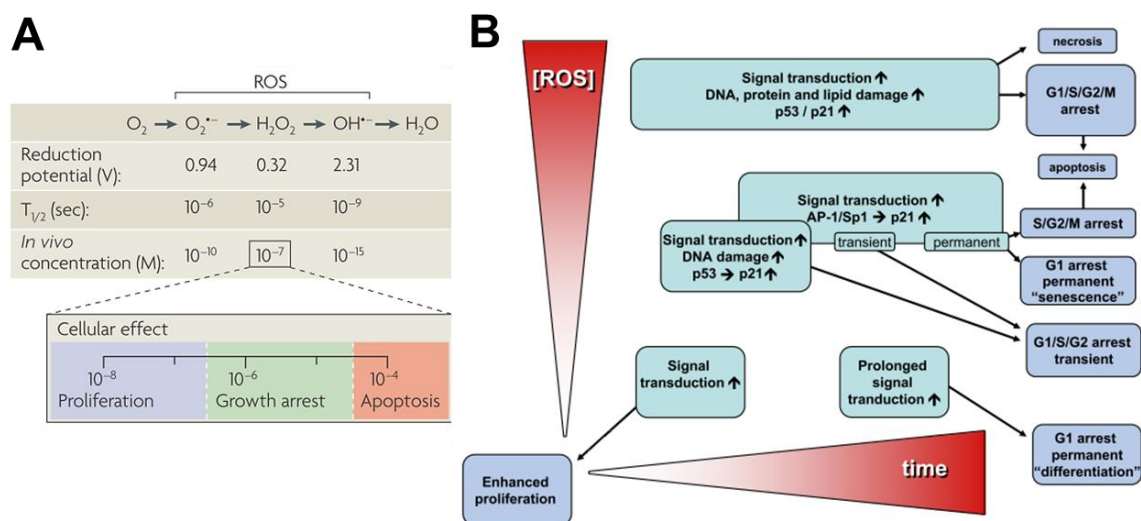


Figura 2: Familia de ROS y sus efectos celulares (A) Vía de reducción de O_2 y especies reactivas del oxígeno biológicamente relevantes. Varios ROS tienen propiedades diferentes, incluyendo el potencial de reducción, la vida media y las concentraciones intracelulares, entre los ROS biológicamente relevantes esta H_2O_2 es la especie con menor reactividad, alta estabilidad y mayor concentración celular, el efecto biológico varía dependiendo de la concentración intracelular

de H₂O₂ (Giorgio et al., 2007) (B) Esquema que representa los variados de efectos que ROS pueden tener en la transducción de señales y la progresión del ciclo celular. Para un determinado tipo de células y el efecto de ROS dependerá de la cantidad y el tiempo de exposición de las células (Boonstra & Post, 2004).

2. Rol protector de estrógeno en la muerte celular inducida por estrés oxidativo.

Las hormonas esteroidales, son sintetizadas en las glándulas adrenales, gónadas, placenta y cerebro (Stocco, Wang, Jo, & Manna, 2005). Específicamente los esteroides, presentan diversos mecanismos de acción con blancos y cinéticas características (Vasconsuelo, Pronsato, Ronda, Boland, & Milanesi, 2011). Así, el clásico mecanismo genómico de largo plazo induce el cambio del patrón de expresión de ciertos genes involucrados en la respuesta. El mecanismo no genómico puede modular la función celular a través de la intervención en vías de señalización en minutos. Sin embargo, los efectos agudos como modulación de canales de iones y/o activación de receptores de membrana pueden favorecer la protección y proliferación celular (Moor et al., 2004; Pentikäinen, Erkkilä, Suomalainen, Parvinen, & Dunkel, 2000; Sarkar et al., 2008).

Los efectos protectores de las hormonas esteroidales, sobre la viabilidad celular, se han caracterizado por vía genómica clásica a través de la unión a sus receptores nucleares los cuales son modulan la transcripción de genes (Fiocchetti, Ascenzi, & Marino, 2012). Por otro lado, las vías no genómicas son independientes de los receptores nucleares, sin embargo, aumentan los niveles de Bcl-2¹ y disminuyen la producción de ROS, atenúan la entrada masiva de calcio y activa varias cascadas de transducción de señales que promueven la sobrevivencia celular (Figura 3) (Nakamagoe et al. 2010; Ozacmak & Sayan 2009; Henriquez & Riquelme 2003; McClean & Nuñez 2008).

Se ha demostrado *in vivo* e *in vitro* que la administración de estrógeno y progesterona tiene un efecto antioxidante, ejerciendo un rol en la protección contra la isquemia cerebral atenuando la muerte neuronal (Ozacmak & Sayan, 2009; X. Wang, 2003). El efecto protector del estrógeno, también es mediado por vías independientes de los receptores clásicos de estrógeno (ER) localizados en el núcleo de las células. Estas vías independientes involucran un mecanismo mitocondrial, la activación de vías de

¹ Bcl-2: proteína de la membrana mitocondrial interna que bloquea la muerte celular apoptótica.

señalización citosólicas y activación directa de receptores de membrana como canales de iones.

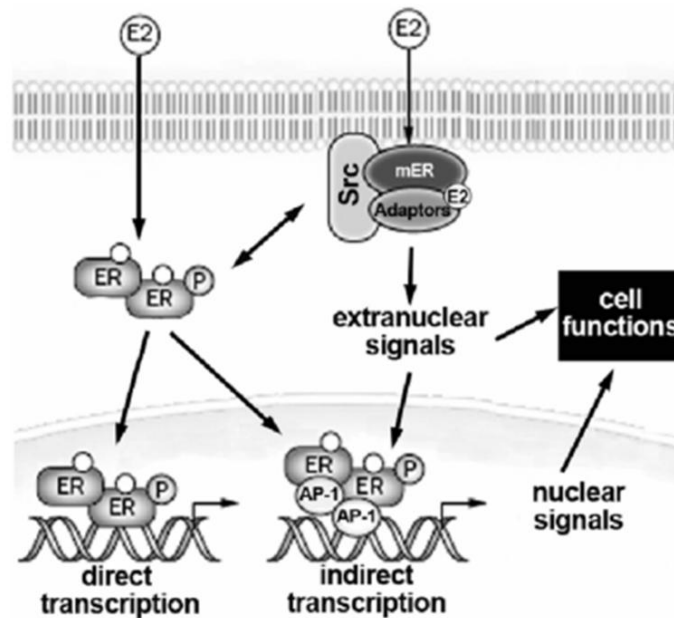


Figura 3: Esquema modelo que ilustra la relación entre acciones extranucleares y nucleares de estrógeno en una célula diana. El efecto de estrógeno se inicia a través de acciones que están mediadas a través de receptores de estrógenos nucleares (ER α y ER β), como miembros de la familia factores de transcripción ligando-regulado, ER modifican el patrón de expresión de genes diana específicos. Estrógeno también ejerce efectos rápidos de membrana mediante la interacción con cualquiera de los receptores de la superficie celular, tales como los receptores del factor de crecimiento y el receptor acoplados a proteínas G (Fiocchetti et al., 2012).

3. Producción de estrógenos: Aromatización de andrógenos

El estrógeno es sintetizado a partir de un molécula de testosterona por la enzima aromatasa citocromo p450 (Figura 4), la cual se localiza en el retículo plasmático (Carreau, De Vienne, & Galeraud-Denis, 2008). Aromatasa se expresa principalmente en ovario, glándulas suprarrenales y testículo (King & Stocco, 2011). En testículo el estrógeno tiene un rol antioxidante, beneficiando la espermatogénesis y manteniendo la sobrevivencia del linaje germinal (Hamden, Silandre, Delalande, Elfeki, & Carreau, 2008). Sin embargo, la producción de estrógeno no se limita a glándulas endocrinas clásicas, sino también a tejidos y tipos celulares como neuronas que producen estrógeno de manera

transitoria, durante el desarrollo y en condiciones celulares adversas de privación de oxígeno y glucosa OGD) o isquemia y reperfusión (Saldanha, Duncan, & Walters, 2009).

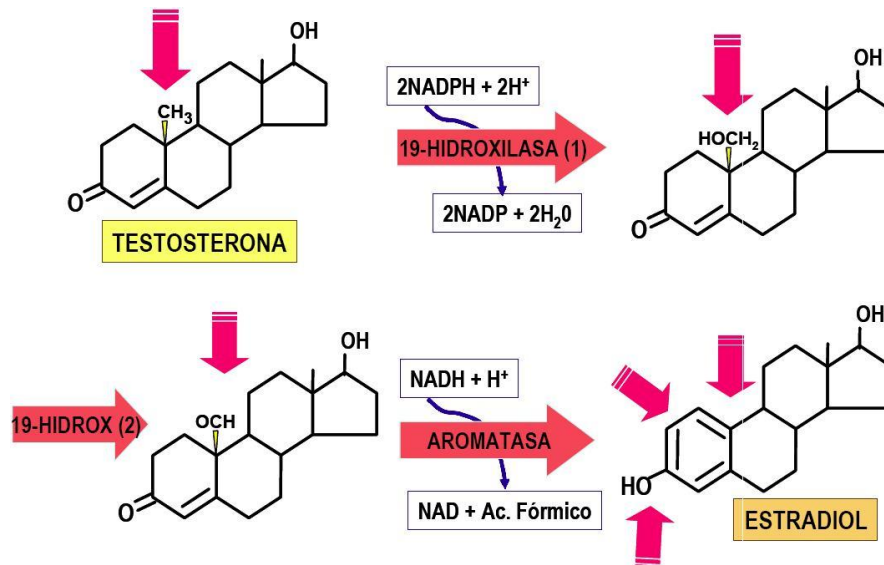


Figura 4: Síntesis de estrógeno a partir de testosterona. El enzima clave en la síntesis de estradiol es la aromatasa, que cataliza tres hidroxilaciones para convertir la testosterona en estrógeno (o la androstenediona en estrona): dos reacciones de hidroxilación del C19, que consume NADPH.H , para dar la forma hidroxilada y aldehídica, respectivamente, y la aromatización propiamente dicha, que consume NADH.H y aromatiza el anillo A, con desprendimiento de ácido fórmico. La última reacción, consistente en la reducción del grupo cetónico en posición 3 ocurre en ausencia de la 3-beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa, que cataliza esta reacción en la síntesis en otros esteroides.

Se ha asociado la producción de estrógenos con procesos tales como el crecimiento celular (en mamas y útero), diferenciación y plasticidad neuronal en el cerebro y en la prevención de la muerte celular en neuronas. Lesiones en neuronas aferentes cerebelares produce un aumento de la expresión de StAR y aromatasa sugiriendo que el daño es un estímulo para la producción de estrógenos (Lavaque, Mayen, Azcoitia, Tena-Sempere, & Garcia-Segura, 2006). En la misma línea, astrocitos de cerebro neonatal de ratas hembras son menos susceptibles al daño por OGD y H_2O_2 , en comparación con astrocitos obtenidos de animales machos. Además la transferencia de los medios de cultivo de astrocitos de animales hembra, a células aisladas de cerebro de macho, confiere protección a la muerte celular inducida por OGD, este efecto es revertido con un inhibidor de la aromatasa, el anastrozol (2,2'-[5-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)-1,3-phenylene]bis(2-methylpropanenitrile). Esto sugiere, que la producción de estrógeno es un proceso necesario para la protección de estas células frente al estrés oxidativo, estableciendo una

diferencia sexual en la protección (Liu, Hurn, Roselli, & Alkayed, 2007). Los datos presentados anteriormente, muestran el importante papel de la aromatasa en respuestas a lesiones oxidativas, aumentando su expresión, y por lo tanto los niveles de estrógeno, el que actúa como una señal paracrina en funciones de protección celular (Azcoitia, Sierra, Veiga, & Garcia-Segura, 2005; Lavaque et al., 2006; Saldanha et al., 2009).

El rol protector de la aromatasa, en neuronas, se asocia a la formación de estrógeno *de novo*, que actúa no solo a través de los receptores clásicos, si no a través efectos directos y rápidos en la membrana (Roselli, 2008). En particular estos efectos en la membrana tienen como blancos moleculares canales iónicos de K^+ , Cl^- y Ca^{2+} . Por ejemplo, estrógeno se une a la subunidad β de K^+ maxi-channel (hSlo) activando la conductancia (Valverde, 1999), sin embargo tiene el efecto contrario inhibiendo el Cl^- Maxi-channel (Henriquez & Riquelme, 2003). Además induce una entrada rápida de Ca^{2+} a través de los canales de calcio tipo L- voltaje dependientes (Sarkar et al., 2008).

4. TRPs y la muerte celular por estrés oxidativo:

Los Receptores de Potencial Transitorio (TRP), están clasificados según sus características estructurales y la homología de secuencia aminoacídica en 7 subfamilias: TRPC (clásicos), TRPV (vanilloides), TRPM (melastatina), TRPA (homólogos de la proteína ANKTM), TRPP (policistina), TRPML (mucolipina) y TRPN (homólogos de la proteína NOMP-C) (Figura 5). Todos presentan una estructura común, son tetrámeros donde la vía de permeación de iones esta localizada en el eje de simetría del canal. Cada monómero consiste de 6 segmentos transmembrana (S1-S6) con el carboxilo y amino terminal ubicados intracelularmente. El S1-S4 confiere la sensibilidad a los diferentes estímulos, mientras que el poro lo componen los dominio S5 y S6 de cada monómero (Clapham, Runnels, Strübing, & Medical, 2001).

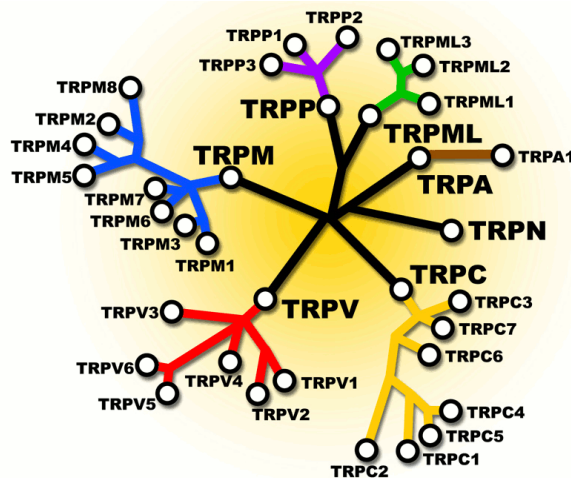


Figura 5: Filogenia de los canales TRP. La filogenia de los canales muestra la relación entre las subfamilia de canales agrupados de acuerdo a la homología de su secuencia. (Latorre, Zaelzer, & Brauchi, 2009)

Esta familia de canales presenta una amplia variedad de mecanismos de activación a diversos estímulos (físicos y ligandos químicos), funcionando como un integrador de señales por asociación con complejos de proteínas de señalización. (Nilius & Owsianik, 2011). Al funcionar como sensores polimodales participan en varios procesos fisiológicos que van desde funciones como transducción del sabor, transducción del dolor, sensación de la temperatura a fibras nerviosas sensoriales, hasta funciones homeostáticas como reabsorción de Ca^{2+} , Mg^{2+} y osmoregulación en tejidos intestinales y riñones, la contracción muscular, el control vasomotor y en procesos de muerte y proliferación celular (Dadon & Minke, 2010; Nilius & Owsianik, 2011; Venkatachalam & Montell, 2007).

TRPV1 es un integrante de la subfamilia TRPV, constituida por 6 miembros (TRPV1-V6), es un canal catiónico no selectivo, permeable a Ca^{2+} y Na^+ , altamente sensible a los cambios de temperatura en el medio por lo que comúnmente es identificado como sensor de calor (Figura 6A). Sin embargo, es activado por múltiples estímulos fisicoquímicos como variaciones de pH, potencial eléctrico y cambios volumen (Figura 6B). Por otra parte el agonista farmacológico clásico del canal es la capsaicina (componente pungente del ají) (M J Caterina et al., 1997; M. J. Caterina, 2000), siendo modulado a su vez por cannabinoides, PIP2 y esteroides como el colesterol (Chávez, Chiu, & Castillo, 2010; Picazo-Juárez et al., 2011; Rohacs, 2009)

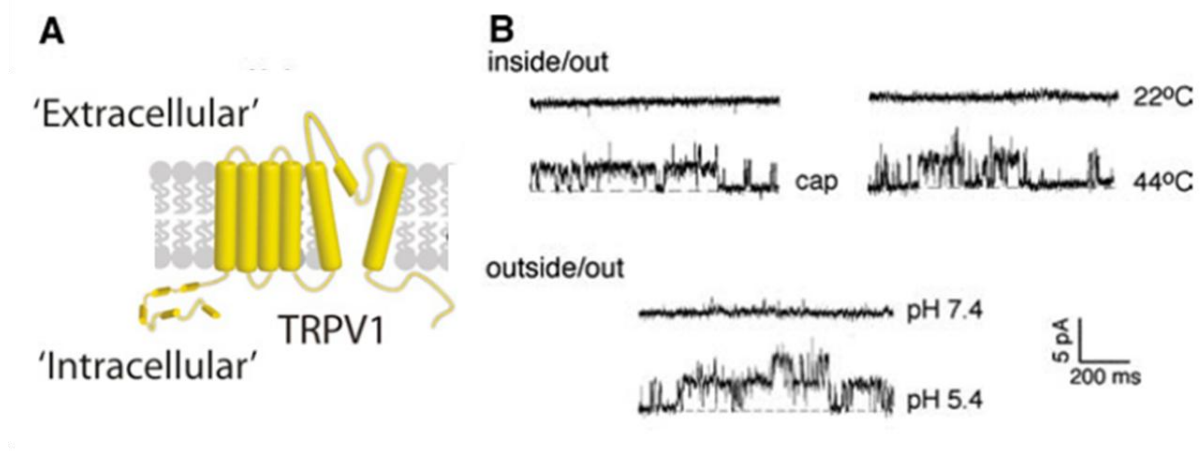


Figura 6: TRPV1 activado por varios estímulos fisicoquímicos. (A) Propuesta de estructura tetramérica de TRPV1 en la membrana plasmática (Cao, Cordero-Morales, Liu, Qin, & Julius, 2013) (B) TRPV1 activado por la capsaicina (CAP, 100 nM), por calor (44 °C) o protones (pH 5,4). (Tominaga & Tominaga, 2005).

Existe una relación directa entre la activación de algunos miembros de la familia de canales TRP y la muerte celular inducida por ROS, principalmente los correspondientes a la subfamilia, TRPC, TRPM y TRPV, estos últimos altamente expresados en línea germinal y neuronas (Li et al., 2010). Por ejemplo, TRPC3 y TRPC6, median la protección inducida por BDNF en neuronas de la zona granulosa del cerebelo (Jia, Zhou, Tai, & Wang, 2007), TRPM2, un canal permeable a Ca^{2+} y activado por H_2O_2 está implicado en la muerte celular, la activación del canal induce una sobrecarga de Ca^{2+} que desencadena muerte de tipo apoptótica (Hecquet & Malik, 2009; Wilkinson, Scragg, Boyle, Nilius, & Peers, 2008). TRPM4, un canal permeable a cationes monovalentes, es activado por altas concentraciones intracelular de Na^+ induciendo muerte celular necrótica mediada por H_2O_2 , la supresión de su expresión protege del daño celular inducido por ROS (Becerra et al., 2011; Launay et al., 2002; Simon et al., 2010). La subfamilia TRPV, también participa en la protección celular a ROS, en procesos de sobrevivencia y muerte celular. Específicamente TRPV5 y TRPV6, modulados por estrógeno, producen un flujo de Ca^{2+} transitorio en células del epitelio intestinal, jugando un rol importante en la homeostasis de Ca^{2+} (Irnatén, Blanchard-Gutton, & Harvey, 2008; Irnatén, Blanchard-Gutton, Praetorius, & Harvey, 2009). TRPV1, también tiene un rol en la protección celular, ratones *knock-out* TRPV1^{-/-} presentan una muerte masiva de la línea germinal frente a incrementos agudos de la temperatura (42°C), indicando que el receptor es necesario

para la protección de la línea germinal ante estrés térmico (Mizrak & Van Dissel-Emiliani, 2008). En el corazón y el pulmón, TRPV1 tiene un rol en la protección ante el estrés oxidativo, ya que la supresión del canal altera la recuperación *post* isquemia-reperusión (IR), mientras que capsaicina atenúa las lesiones producto de la isquemia-reperusión (L. Wang & Wang, 2005; M. Wang, Ji, Wang, Zhao, & Xia, 2012). A su vez, en el cerebro la activación de TRPV1 por capsaicina y anandamida genera una entrada transitoria de Ca^{2+} , la cual produce una desensibilización del canal suficiente induciendo neuroprotección ante los procesos isquémicos (Pegorini et al., 2005).

5. Regulación por esteroides de los TRP

Dentro de los múltiples ligandos que modulan la actividad de los TRPs también se encuentran los esteroides. TRPM3 es activado rápida y reversiblemente por pregnenolona sulfato (PS), induciendo la producción de insulina en las células β del páncreas (Nilius & Voets, 2008; Wagner et al., 2008). TRPC5 exhibe una sensibilidad a esteroides, siendo inhibido por varios metabolitos y estereoisómeros de pregnenolona sulfato (Majeed et al., 2011). La subfamilia de canales TRPV también es regulada por varios esteroides, TRPV5 y V6 son activados por estrógeno, induciendo una entrada transitoria de Ca^{2+} en células T84 de colon y en células renales (Irnaten et al., 2008, 2009).

TRPV1 también es modulado por esteroides, documentándose efectos en la expresión y actividad del canal. Así estrógeno ejerce el clásico efecto genómico a través de los receptores clásico de estrógenos (ER), en células ganglionares de la raíz dorsal, la expresión de TRPV1 se ve drásticamente disminuida en ratones knock-out para ER (Cho & Chaban, 2012). Además en neuronas aferentes del cuello del útero, el estrógeno modula la expresión del canal aumentando la sensibilización por estrógeno. Por otra parte DHEA, pregnenolona y testosterona inhiben corrientes inducidas por capsaicina, mientras que estrógeno potencia las corrientes inducidas por el agonista capsaicina en neuronas de la raíz dorsal (Chen, Chang, & Wu, 2004). Este último efecto opuesto a los que ejercen estos esteroides destaca el rol de la aromatasa en la modulación del canal, aromatizando testosterona a estrógeno y convirtiendo un esteroide inhibidor en un esteroide activador.

Recientemente nuestro laboratorio ha descrito que la expresión de TRPV1 induce resistencia a la muerte celular inducida por H_2O_2 (Figura 7) siendo el efecto potenciado por la activación farmacológica del canal con su agonista clásico capsaicina y revertido por su antagonista capsazepina (Figura 8). También nuestros datos apoyan un efecto de los esteroides sobre la actividad del canal, estrógeno aumenta la viabilidad celular, efecto que es revertido por capsazepina, antagonista del canal, mientras que testosterona no tiene efecto alguno sobre la viabilidad (Figura 9).

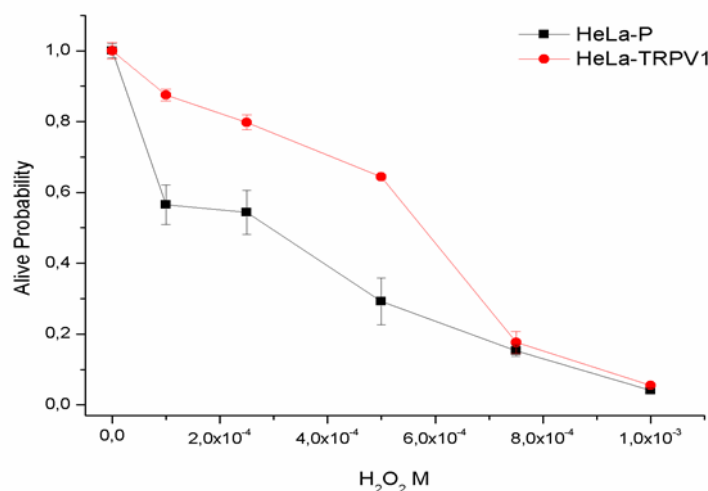


Figura 7: Muerte celular inducida por H_2O_2 en el sistema heterólogo de expresión. Datos obtenidos mediante citometría de flujo. Las células HeLa parental y HeLa-TRPV1 son mantenidas con 1mM de H_2O_2 y medidas a las 24 horas.

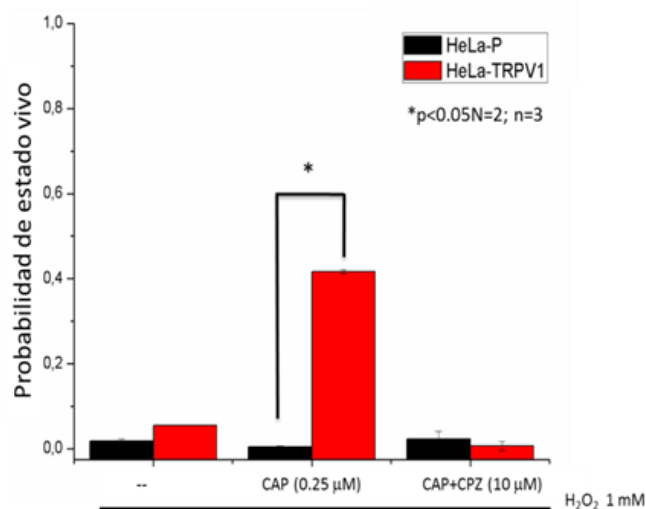


Figura 8: Activación farmacología del canal aumenta la viabilidad celular. La activación con CAP (250nM) aumenta la viabilidad celular en la celular que expresa el canal, efecto revertido por CPZ (10μM).

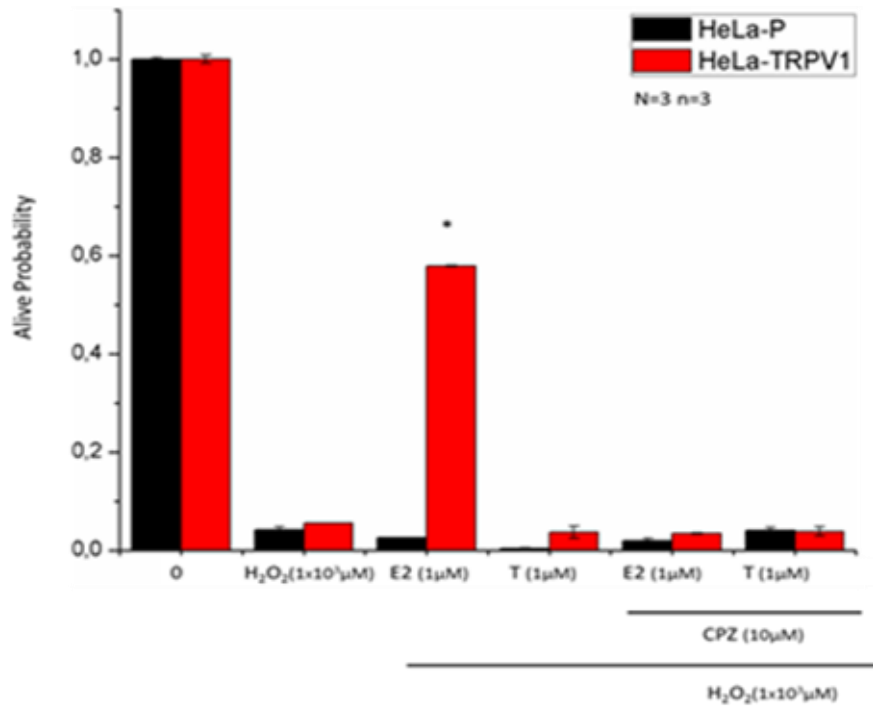


Figura 9: Protección celular inducida por estradiol a través de TRPV1. Estrógeno 1 μM protege de la muerte celular inducida por 1 mM de H₂O₂ efecto revertido por CPZ (10 μM).

La modulación de la expresión y la actividad de los canales TRPs por estrógeno son fundamentales para el proceso de muerte y sobrevivencia celular ante el estrés oxidativo. Por lo tanto la capacidad de aromatización en conjunto con la expresión de TRPV1 pueden constituir un mecanismo endógeno de protección frente a un ambiente oxidativo, estableciendo un nuevo blanco terapéutico para múltiples enfermedades reproductivas y neurodegenerativas.

HIPÓTESIS

La producción de estrógenos induce protección de la muerte celular oxidativa a través de un mecanismo paracrino en células que expresan TRPV1.

OBJETIVOS

1. Objetivo general:

- Proponer a TRPV1 como un receptor ionotrópico diferencialmente modulado por esteroides sexuales como determinante mayor de fenómenos de protección frente al estrés oxidativo.

2. Objetivos específicos:

- Activar la aromatización de andrógeno a estrógeno in vitro.
- Condicionar medios celulares para la inducción de aromatización de testosterona.
- Registrar el efecto de la inducción de aromatización sobre la protección mediada por TRPV1 en la muerte oxidativa.

MATERIALES Y METODOS

1. Cultivo Celular:

Para la realización de los experimentos se utilizaron líneas celulares como modelo experimental. Las células HeLa Parental y GC-2 fueron obtenidas de ATCC (Manassas, VA, USA). Los cultivos celulares utilizados se mantuvieron en todos los casos en condiciones estables de temperatura a 37°C, humedad relativa del 95% y presión de CO₂ 5% en una incubadora convencional. El medio de cultivo fue DMEM (Dulbecco's Modified Eagle medium) suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB) y Penicilina/Estreptomicina (P/S).

El subcultivo de las células se realizó mediante el procedimiento convencional:

- Lavar las células con PBS 1X (PBS, Phosphate buffered saline)
- Añadir tripsina en cantidad suficiente para cubrir la superficie de cultivo.
- Incubar 5 minutos a 37°C
- Recolectar las células
- Centrifugar las células por 5 minutos a 3200 rpm
- Resuspender en el volumen deseado y replaquear.

Transfección estable: las células fueron tranfectadas con DNA:IT-LTI (Mirus Bio LLC, Madison, USA) a razón 1:3 según el protocolo de manufactura. La línea celular HeLa Parental fue tranfectada con el plásmido pcDNA3-TRPV1. 48 horas post-transfección los cultivos fueron seleccionados con G418 800µg/ml.

2. RT-PCR

El total de RNA de las células HeLa Parental, HeLa-TRPV1, GC-2, hipocampo y testículo fue extraído con Trizol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA,USA) según el protocolo de manufactura. La concentración de RNA fue determinada usando la razón de la absorbancia 260/280 nm. La síntesis de cDNA fue realizada con retrotranscriptasa M-MLV (Invitrogen, Carlsbad, CA,USA) según indicaciones de manufactura. Los primer

diseñados para TRPV1 son: Forward: 5' TCCCAGGACTCTGTCTCCAC 3' y Reverse: 5' TCTGGGTCTTTGAACTCGCT 3', para un amplicón de 104 bp; ER α : Forward: 5' TCTGCCAAGGAGACTCGCTACT 3' y Reverse: 5' GGTGCATTGGTTTGTAGCCTGGAC 3' para un amplicón de 153 bp; ER β : Forward: 5'GGTCCTGTGAAGGATGTAAGGC 3' y Reverse: 5' TAACACTTGCGAAGTCGGCAGG 3' para un amplicón de 139 bp; ARO: Forward: 5' CGAAGCAGCAATCCTGAAGGAG 3' y Reverse 5'CCAAGTCCACAACAGGCTGGTA 3' para un amplicón de 134 bp; GPR30: Forward: 5' GCCACATAGTCAACCTTGACAGC 3' y Reverse 5' CGTCTTCTGCTCCACATAGAGC 3' para un amplicón de 113 bp; como control de carga se utilizó la subunidad ribosomal S16: Forward: 5'AGGAGCGATTTGCTGGTGTGGA 3' y Reverse: 5' GCTACCAGGCCTTTGAGATGGA 3' con un amplicón de 102 bp. Las muestras fueron amplificadas usando una temperatura de annealing y concentración de MgCl₂ determinada para cada pareja de primer. La reacción de PCR convencional se realizó usando Master Mix Go Taq (Promega Corp., Wisconsin, USA) que contiene todos los reactivos para la amplificación exceptuando cDNA en un volumen total de 25 μ l por reacción. La reacción de PCR comenzó con 1 ciclo de denaturación a 94°C por 5 min seguido de 40 ciclos de la siguiente forma: denaturación a 94°C por 30 segundos, annealing a 55-63 °C por 30 segundos, extensión a 72°C por 30 segundos. La elongación final fue realizada a 72 °C por 10 min y mantenidas a 4°C. La electroforesis de los productos de RT-PCR y marcador del marcador de peso molecular (New England Biolab, UK) fue realizada en gel de agarosa 2% (Lonza Rockland, ME, USA) y teñida con bromuro de etidio en solución acuosa (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

3. Medición de esteroides por RIA

La línea celular GC-2 fue sembrada en una cantidad de 300000 células en placas de 60mm, 24 hrs después fueron estimuladas con 1 μ M Testosterona, 10nM Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), 50 μ M Dibutyryl-cAMP (Bu₂-cAMP), 50 μ M Letrozol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) en medio fue suplementado con 1%SFB en un volumen final de 2 ml. El medio de cultivo será medido por RIA para estrógeno liberado al medio de cultivo (Figura 13).

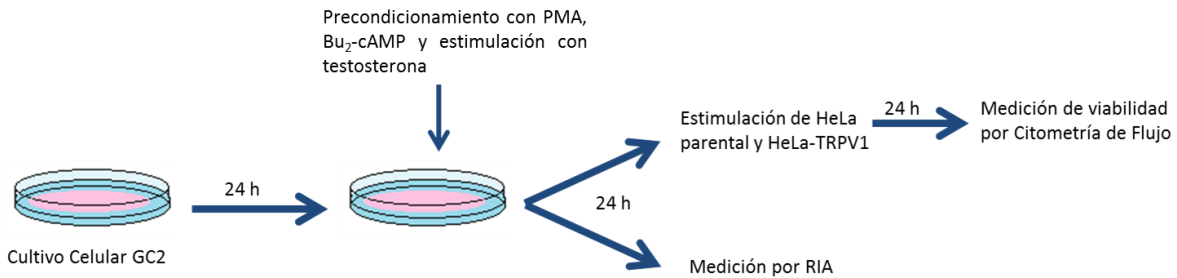


Figura 10: Esquema del protocolo de inducción de la aromatización. 24 horas después de ser sembradas las células en la placa de cultivo son precondicionadas con 10nM PMA, 50µM Bu₂-cAMP, y estimuladas con 1µM Testosterona (T) y 50µM Letrozol (L), en un volumen final de 2 ml, el estímulo es retirado a las 24 horas y 1ml es usado para la estimulación de HeLa parental y HeLa-TRPV1 y 1 ml para la medición por RIA de estradiol liberado al medio.

4. Muerte celular por citometría de flujo

El cultivo celular en el formato experimental (placa de 24 pocillos) fue privado cuando las células se encontraban en 70% de confluencia con DMEM suplementado con 1% SFB+P/S durante 24 horas, posteriormente las células son lavadas con PBS 1X y estimuladas con la condición experimental en DMEM suplementado con 1% BSA+P/S durante 24 horas, posteriormente el cultivo de células fue tripsinizado y recolectado por centrifugación a 3200 rpm por 5 min a 4°C y el pellet es resuspendido en 100 µl Rhodamina 123 (Rhod 123, 0,5 µg/mL) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e incubadas por 15 min a 37°C en oscuridad. Posteriormente son centrifugadas a 3200 rpm por 5 min a 4°C y resuspendidas en 100 µl Ioduro de Propidio (PI, 10 µg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e incubadas por 15 min a temperatura ambiente en oscuridad. Las muestras son medidas por el citómetro FACS systems (FACScalibur, BD, Biosciences, CA, USA) a un mínimo de 10.000 células por muestra. La viabilidad de las células fue analizada según dos parámetros fisiológicos; la función mitocondrial registrada a través de la sonda catiónica que se carga en mitocondrias funcionales Rhodamina 123 (Ex/Em: 511/534nm) aumentado la intensidad de fluorescencia de la célula; y la integridad de la membrana plasmática medida por el intercalante de DNA llamado Ioduro de Propidio (Ex/Em: 536/617nm) que aumentara la su intensidad de fluorescencia cuando interacciona con el DNA (Figura 11).

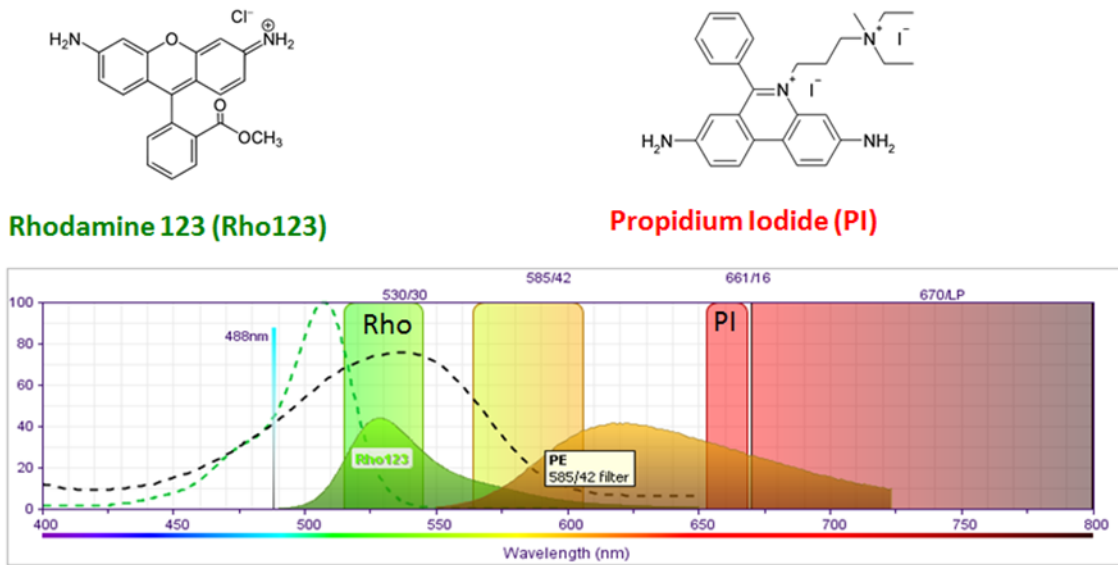


Figura 11: Picos de excitación y emisión fluorescente en el espectro de luz visible de Rhodamina 123 y Ioduro de Propidio. La banda verde y roja indican las propiedades del detector usado para captar la señal de ambas sondas.

5. Análisis de Datos

El análisis de los datos y estudio estadístico se realizara mediante Cyflogic, Origin Pro 8.05, Statgrahics 5.1 y FlowJo haciendo un análisis de varianza para determinar relevancia estadística y procedimiento de comparación múltiple, (test de diferencia estadística mínima de Fisher) con un nivel de confianza >95%.

RESULTADOS

1. Expresión de Receptores de Estrógenos: Caracterización de líneas en cultivo

El producto de la amplificación del cDNA obtenido por transcripción reversa, a partir del ARN extraído de las líneas celular de trabajo muestran que la expresión de TRPV1 solo en la línea celular transfectadas (HeLa-TRPV1), y no en la línea parental (HeLa Parental). Además hemos comprobado que la expresión del canal de la línea derivada de espermatocito secundario (GC-2). Como controles positivos de expresión utilizamos extractos de Testículo (Test) e Hipocampo (Hip), los cuales presentan altos niveles de expresión de TRPV1. A su vez, se determino que la expresión de aromatasa, en la línea celular GC2, y en los controles de testículo e hipocampo.

La línea celular HeLa Parental y HeLa-TRPV1 no muestran expresión de los receptores clásicos de estrógeno ($ER\alpha$ y $ER\beta$), en cambio la línea celular GC-2 y en los controles positivos de tejido como testículo e hipocampo, si presenta la expresión de los receptores. Sin embargo, ninguna de las 3 líneas celulares de trabajo expresa el receptor de estrógeno no clásico (GPR30), como sí lo expresan los controles positivos. Las expresiones de las diferentes proteínas fueron normalizadas con la expresión de la subunidad de 16S del ribosoma (Figura 12).

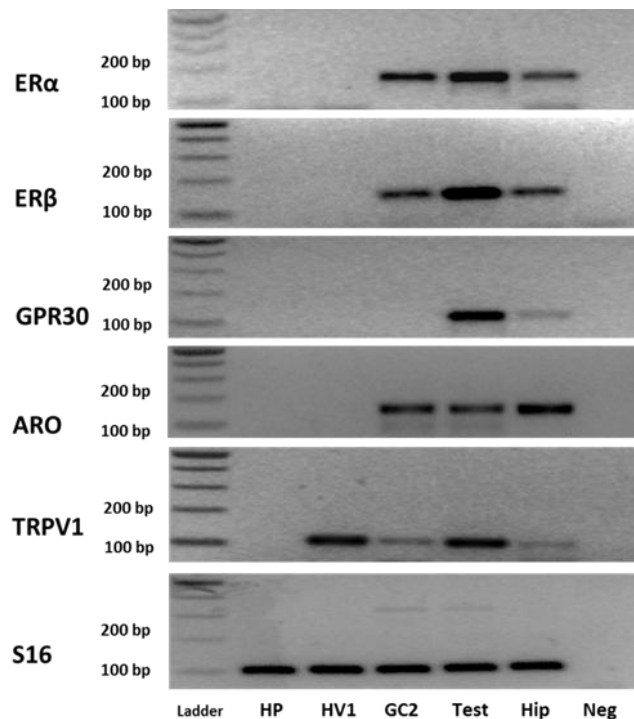


Figura 12: Caracterización de la expresión de los TRPV1, ERs y aromatasa en el sistema heterólogo mediante RT-PCR. Fotografía del gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio, las bandas corresponden a cDNA obtenido a partir de RNA extraído de cultivo celular en aproximadamente 80 % de confluencia y 2 mg del control tejido.

2. Inducción de Aromatización *in vitro*.

La inducción de la aromatización *in vitro* se realizó por la estimulación de la línea celular GC-2, esta línea derivada de espermatozoides expresa aromatasa, por lo tanto es capaz de convertir la testosterona en estrógeno. Para promover la aromatización, las células fueron expuestas durante 24 horas a testosterona, sustrato de aromatasa, además de distintos fármacos, Bu₂-cAMP, análogo de cAMP, activador de proteínas kinasas dependiente de cAMP, PMA, ester de forbol análogo a diacilglicerol (DAG) activador de PKC, estas moléculas son intermediarios en vías de señalización importantes involucradas en la biosíntesis de esteroides. La cantidad de estrógeno liberado al medio de cultivo celular fue inmunodetectado mediante RIA.

Solo la presencia de testosterona aumenta la liberación de estrógeno al medio respecto

de la condición control, si además el cultivo de GC-2 es estimulado con Bu₂-cAMP y PMA el aumento en la cantidad de estrógeno presente en el medio respecto a la condición control es aproximadamente 7 veces. La cantidad de estrógeno en el medio disminuye parcialmente ante el tratamiento del cultivo con letrozol, inhibidor de aromatasa (Figura 13).

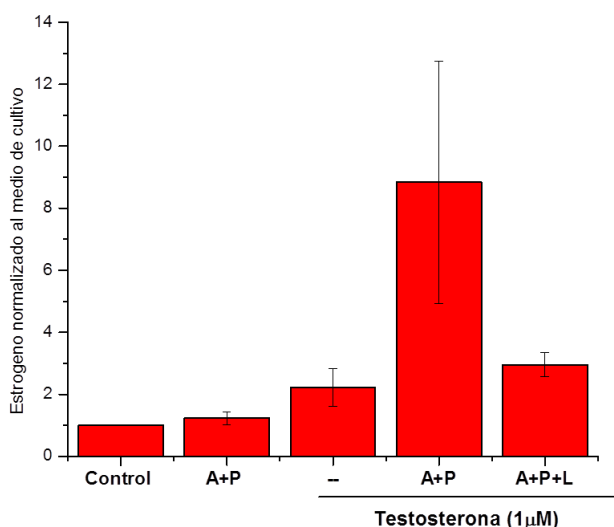


Figura 13: Medición de la aromatización de testosterona a estrógeno. La línea celular GC2 fueron expuestas durante 24 h a testosterona, Bu₂-cAMP, PMA y letrozol en medio suplementado con 1% SFB+P/S. Control, corresponde al cultivo de la línea GC2 solo con medio, A+P medio mas los fármacos Bu₂-cAMP, y PMA. T, el cultivo de GC2 solo con testosterona. A+P+T el medio condicionado Bu₂-cAMP, PMA y testosterona. A+P+T+L, el medio suplementado con Bu₂-cAMP, PMA, testosterona y letrozol.

3. Efecto de estradiol en la muerte celular en un sistema que expresa de manera heteróloga TRPV1.

3.1 Controles de medición

Mediante Citometría de flujo se determino la viabilidad celular utilizando dos parámetros celulares, la función mitocondrial y la permeabilidad de la membrana plasmática, medido por la intensidad de fluorescencia de la sondas Rhodamina 123 y Ioduro de Propidio respectivamente. Definimos una población de células vivas (Control) aquella que presenta alta intensidad de fluorescencia para Rhodamina 123 y baja intensidad de fluorescencia para Ioduro de Propidio, mostrando una célula con su

membrana plasmática intacta y sus mitocondrias funcionales. (Figura 14, A), Una población de células muertas es aquella que perdió la integridad de la membrana plasmática aumentando intensidad de fluorescencia de PI y disminuyendo la intensidad de fluorescencia de Rhod123 ubicándose en el área superior izquierda, esta condición se logra, por ejemplo, tratando las células con 10 μ M de FCCP, un desacoplante de la función mitocondrial durante 24 hrs. (Figura 14, B). En la Figura 14C, corresponde al dot plot representativo de H₂O₂ 1mM, estímulo inductor de muerte en todos los experimentos realizados. La medición a través de estas dos sondas nos permite definir 3 estados celulares, uno que denominaremos vivas (V) que tiene su función mitocondrial y permeabilidad de la membrana plasmática intacta, un segundo estado al que llamaremos muertas (M) con disfunción mitocondrial y membrana permeabilizada, un tercer estado intermedio, vulnerables (Vul), en el cual las células se encuentra con algunos de los 2 parámetros celulares alterado.

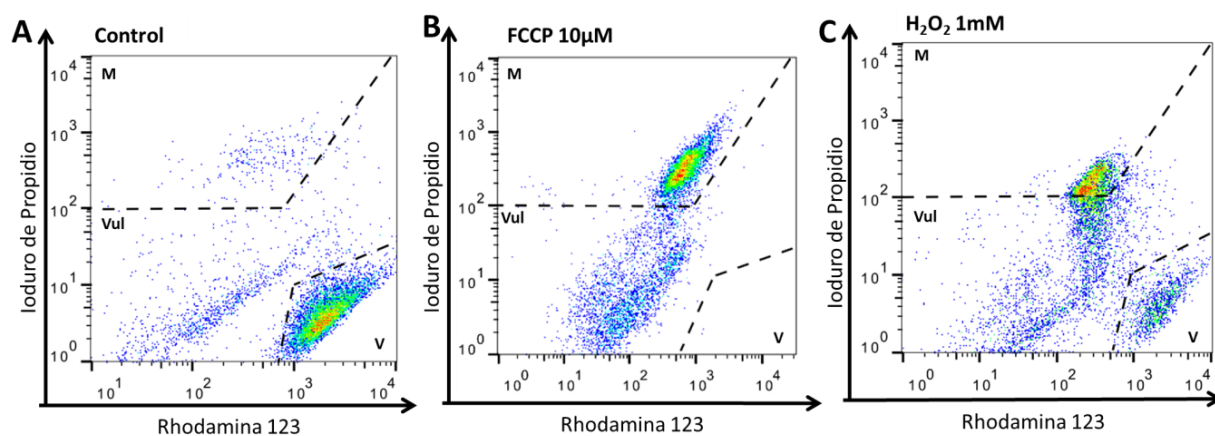


Figura 14: Controles de registro para citometría de flujo. Dot plot de intensidad de fluorescencia para Rho123 y PI, las áreas de alta frecuencia de eventos (alta cantidad de población) corresponde al color rojo y el área de baja frecuencia de eventos (menos cantidad de población) al color azul (A) Control de vivas, Células tratadas con vehículo, (B) Control de muerte, células tratadas con 10 μ M de FCCP por 24 h, (C) H₂O₂ 1mM durante 24 h, estímulo inductor de muerte.

3.2 La capacidad de aromatización protege a las células de la muerte inducida por H₂O₂.

La transferencia de medios condicionados para la aromatización de estrógeno entre la línea celular GC-2 hacia HeLa Parental y HeLa-TRPV1 (Figura 15) induce

protección de la muerte celular inducida por H_2O_2 . Tanto la línea celular HeLa parental y HeLa-TRPV1 aumentan su viabilidad celular respecto al estímulo inductor de muerte (Figura 14C) cuando son tratadas durante 24 horas con el medio condicionado con testosterona (Figura 15A, B), el aumento en la viabilidad es mayor en la línea que sobreexpresa el canal.

El tratamiento con los medios inducidos con Bu_2 -cAMP, PMA y Testosterona, existe un aumento de la viabilidad en ambas líneas celulares siendo mayor la protección en la línea que expresa el TRPV1. Sin embargo la protección ejercida por el medio que contiene letrozol (inhibidor de aromatasa) disminuye en la línea que expresa el canal TRPV1 y no en la línea parental (Figura 15C, D).

La protección ejercida por los medios condicionados se ve parcialmente disminuida por capsazepina. El aumento de la viabilidad entregada por los medios inducidos con testosterona, Bu_2 -cAMP y PMA (medios CT y APT) en presencia de H_2O_2 1mM disminuye si las células son tratadas además con el inhibidor del canal TRPV1 capsazepina (Figura 16).

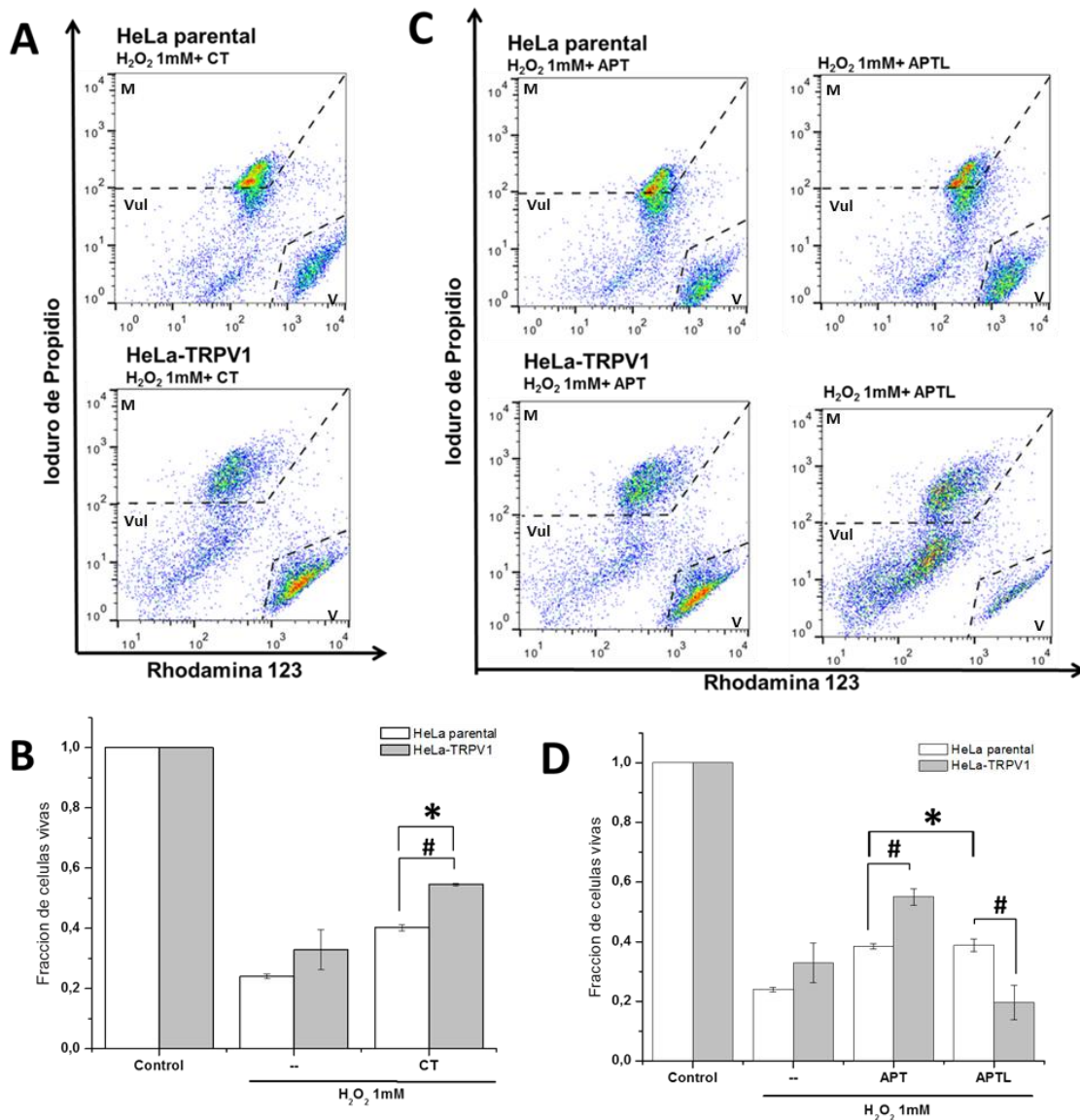


Figura 15: La aromatización de testosterona protege de la muerte celular inducida por H₂O₂ en HeLa parental y HeLa-TRPV1. Los medios son recolectados desde cultivos de células GC-2 estimulas para la aromatización de testosterona a estrógeno y son utilizados para estimular a las líneas HeLa parental y HeLa-TRPV1 durante 24 horas. (A) Dot plot de densidad poblacional para la protección inducida por medio condicionado proveniente de las GC-2 estimuladas con testosterona ante el estímulo inductor de muerte celular H₂O₂ 1mM. (B) Gráfico de fracción de células vivas del medio proveniente de las GC-2 estimuladas con testosterona ante el estímulo inductor de muerte celular H₂O₂ 1mM. (C) Dot plot de densidad poblacional para la protección inducida por medio condicionado proveniente de las GC-2 estimuladas con testosterona, Bu₂-cAMP, PMA y letrozol ante el estímulo inductor de muerte celular H₂O₂ 1mM. (D) Gráfico de fracción de células vivas del medio proveniente de las GC-2 estimuladas con testosterona, Bu₂-cAMP, PMA, letrozol ante el estímulo inductor de muerte celular H₂O₂ 1mM. (*)=distintos de su H₂O₂ en su respectiva línea celular, (#)=distintos entre HeLa parental y HeLa-TRPV1. *,#p<0.05 N=3; n=9.

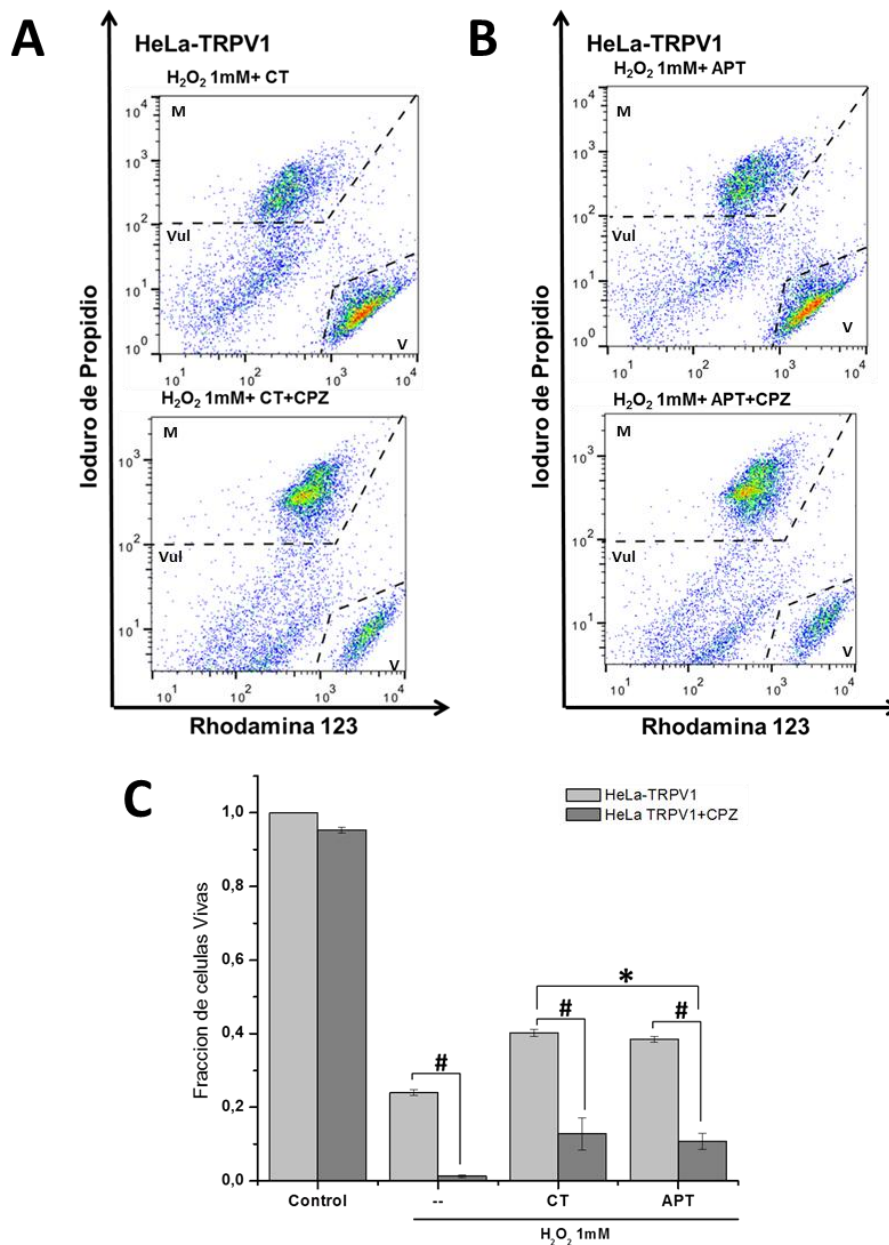


Figura 16: La protección inducida por los medios condicionados en HeLa-TRPV1 es inhibida por capsazepina. Los medios son recolectados desde cultivos de células GC-2 estimuladas para la aromatización de testosterona a estrógeno y son utilizados para estimular a la línea HeLa-TRPV1 durante 24 horas. (A) Dot plot de densidad poblacional para la protección inducida por medio condicionado proveniente de las GC-2 estimuladas con testosterona ante el estímulo inductor de muerte celular H₂O₂ 1mM y en presencia de CPZ 10μM (B) Dot plot de densidad poblacional para la protección inducida por medio condicionado proveniente de las GC-2 estimuladas con testosterona, Bu₂-cAMP y PMA, ante el estímulo de muerte celular H₂O₂ 1mM y en presencia de CPZ 10μM. (C) Gráfico de fracción de células vivas de los medios estimulados con testosterona, Bu₂-cAMP y PMA, ante el estímulo de muerte celular H₂O₂ 1mM y en presencia de CPZ 10μM. (*)=distintos de su H₂O₂ en su respectiva línea celular, (#)=distintos entre HeLa-TRPV1 y HeLa-TRPV1+CPZ. *,#p<0.05 N=2; n=3.

DISCUSION

En este trabajo se ha demostrado que la capacidad de producir estrógenos genera resistencia a la muerte celular oxidativa por un mecanismo mediado a través de TRPV1 de forma paracrina.

1. Los andrógenos protegen de la muerte celular oxidativa solo si las células presentan actividad aromatasa.

Como se ha descrito previamente en nuestro laboratorio, testosterona no protege de la muerte celular oxidativa, sin embargo en este trabajo ha quedado en evidencia que si la célula presenta la capacidad de aromatizar andrógenos es posible que estos andrógenos aumenten la viabilidad celular ante estrés oxidativo solo en la forma de estrógeno, que puede actuar por mecanismos clásicamente conocidos o a través de nuevos blancos moleculares como canales iónicos. En la misma línea de nuestro laboratorio, evidencia muestra que la aromatización de andrógenos participa en varios procesos celulares como diferenciación, plasticidad sináptica y protección celular. En modelos *in vivo* se ha demostrado el aumento espontáneo de la expresión de aromatasa, después una oclusión en la arteria cerebral en el área peri-infartada (Carswell et al., 2005). Específicamente el aumento de la abundancia de aromatasa en respuesta a lesiones aumenta la actividad en el tejido, y por lo tanto, la producción de estradiol local con efectos auto y paracrinos (Azcoitia et al., 2005; Lavaque et al., 2006; Saldanha et al., 2009). El rol protector de aromatasa no es solo a través de los receptores clásicos, si no a través efectos directos y rápidos en la membrana y organelos celulares (Roselli, 2008)

2. La producción de estrógenos in vitro potencia la protección celular de forma paracrina principalmente a través de TRPV1.

En nuestro modelo de expresión heteróloga solo las células que expresan TRPV1 pierden menos su viabilidad frente a H₂O₂. Mas aún, estereoespecíficamente estrógeno y no testosterona potencian el efecto protector. Sin embargo, si el medio que contiene testosterona es condicionado en células con capacidad de aromatización podemos registrar protección celular mediada por TRPV1. Entonces, si existe un sitio de

modulación alostérica común para esteroides, la capacidad de aromatizar testosterona a estrógeno podría transformar el esteroide inhibidor en activador del canal TRPV1. Recientemente se ha descrito en TRPV1 un sitio de unión estereoespecífico en el segmento transmembrana S5 para el colesterol y sus esteroides derivados. Este sitio de unión está en un bolsillo hidrófobo que representa un punto crítico para el acoplamiento alostérico de la apertura y cierre del canal frente a diversas moléculas como PIP2, colesterol y esteroides (Latorre et al., 2009; Picazo-Juárez et al., 2011). Sin embargo, de los esteroides solo el estrógeno es capaz de potenciar la actividad basal de TRPV1 (Chen et al., 2004). Este esteroide posee un anillo aromático que podría interactuar por interacción electrostática con cargas positivas cercanas al sitio de unión. En este contexto, otras moléculas anfipáticas como DHEA pueden inhibir las corrientes inducidas por capsaicina. Consecuentemente, sus estereoisómeros derivados ejercen el efecto opuesto sugiriendo que existe una interacción estereoespecífica que puede modular drásticamente el efecto sobre la actividad del canal.

A través de una línea celular germinal con capacidad de aromatización se condicionaron medios para la producción de estrógeno *in vitro*, el aumento de la cantidad de estrógeno en el medio si solo se estimula con testosterona, en relación a la estimulación con los fármacos que activan vías de señalización que participan en la esteroidogénesis y por consiguiente potenciando la aromatización de esteroides, no se ve reflejado en una diferencia en el aumento de la viabilidad en ambas líneas celulares, lo que podría indicar que no es necesario gran cantidad de estrógeno en el medio para inducir protección celular, ya que el estrógeno puede activar mecanismos de protección, entre ellos vías de señalización que actúan a través de "cross-talk" potenciando la señal de protección celular. Otra forma de explicar este fenómeno puede ser que el aumento en la cantidad de estrógeno liberado al medio no sea suficiente para producir diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad. Por otro lado, otro efecto observado es que letrozol disminuye la cantidad de estrógeno en el medio a través de la inhibición de aromatasa, sin embargo, la inhibición de la enzima no es completa midiéndose aun estrógeno en el medio lo que permite mantener la viabilidad celular en la línea parental, pero no en la que expresa el canal.

3. La inhibición por capsazepina reduce parcialmente la protección inducida por inducción de aromatización.

La protección ejercida por los medios condicionados para la aromatización de testosterona a estrógeno a través del canal TRPV1 se reduce parcialmente si el canal es inhibido por su antagonista, capsazepina. Entonces el aumento de la viabilidad producido por los medios condicionados en la línea celular que expresa el canal esta mediado a través de este, lo que apoya la idea de que el canal podría interactuar con este esteroide como un receptor ionotrópico de estrógeno.

4. El efecto protector de lo estrógeno se registra en ausencia de los receptores clásicos de estrógeno como (ER α , ER β y GPR30).

En un sistema *in vitro* logramos producir endógenamente estradiol a partir de su precursor y determinar la dependencia de la capacidad de aromatización en el proceso. La protección que resulta de tratar las células parentales con los medios inducidos para la aromatización de testosterona puede ser explicada por efectos protectores independientes de TRPV1 (Simpkins, Yi, Yang, & Dykens, 2010).

El aumento de la viabilidad en la línea celular que no expresa en canal y además los receptores de estrógeno ER α , ER β y GPR30, deja en evidencia el efecto protector de este esteroide de manera independiente de las vías clásicas conocidas.

Los efectos protectores de los estrógenos implican mecanismos genómicos, activando la transcripción de genes involucrados en la disminución del daño por estrés oxidativo (Malli et al., 2003). Sin embargo, en la actualidad se conocen nuevos mecanismos no genómicos de protección por estrógenos, que involucran la activación de vías de señalización rápida como MAPK/ERK, PI3-K/Akt y PKC promoviendo la protección celular (Simpkins et al., 2010). Además, estrógeno modula la actividad los canales de Ca²⁺ tipo L potenciando la entrada rápida de Ca²⁺ y la activación de la cascada de señalización Src/ERK regulando la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 y los procesos de permeabilidad mitocondrial de la vía intrínseca de la apoptosis (Wu, Wang, Chen, & Brinton, 2005). Otro efecto directo de estradiol sobre la mitocondria es la captación citosólica de Ca²⁺ por parte de esta, mejorando su capacidad de compartimentalización (Malli et al., 2003). Por lo tanto, el estrógeno estabiliza la función mitocondrial

promoviendo la protección celular mediante una acción antiapoptótica que puede implicar una regulación positiva de Bcl-2 (Simpkins & Dykens, 2008).

Nuestros datos, sugieren que la aromatización de testosterona a estradiol promueve la sobrevivencia celular debido a la modulación de la actividad de TRPV1 (Figura 11). Este efecto será relevante en tejidos altamente diferenciados con capacidad modulada de aromatización y donde se exprese TRPV1 (hipocampo, hipotálamo y células germinales etc). Entonces, estrógeno puede actuar de forma auto y/o paracrina promoviendo mecanismos de protección celular dependiente e independientes de TRPV1 (Figura 17). La interacción directa sobre el canal, producirá un cambio en la señal de Ca^{2+} potenciando la capacidad tamponadora mitocondria crítica en la mantención de la función mitocondrial (Malli et al., 2003; Wu et al., 2005) que asegura la producción de energía y la viabilidad celular.

Comprender el mecanismo por el cual estrógeno y TRPV1 median la protección al estrés oxidativo especialmente en tejidos de alta diferenciación como neuronas del hipocampo y línea germinal, permitirá desarrollar nuevas estrategias de intervención para tejidos en degeneración o en riesgo.

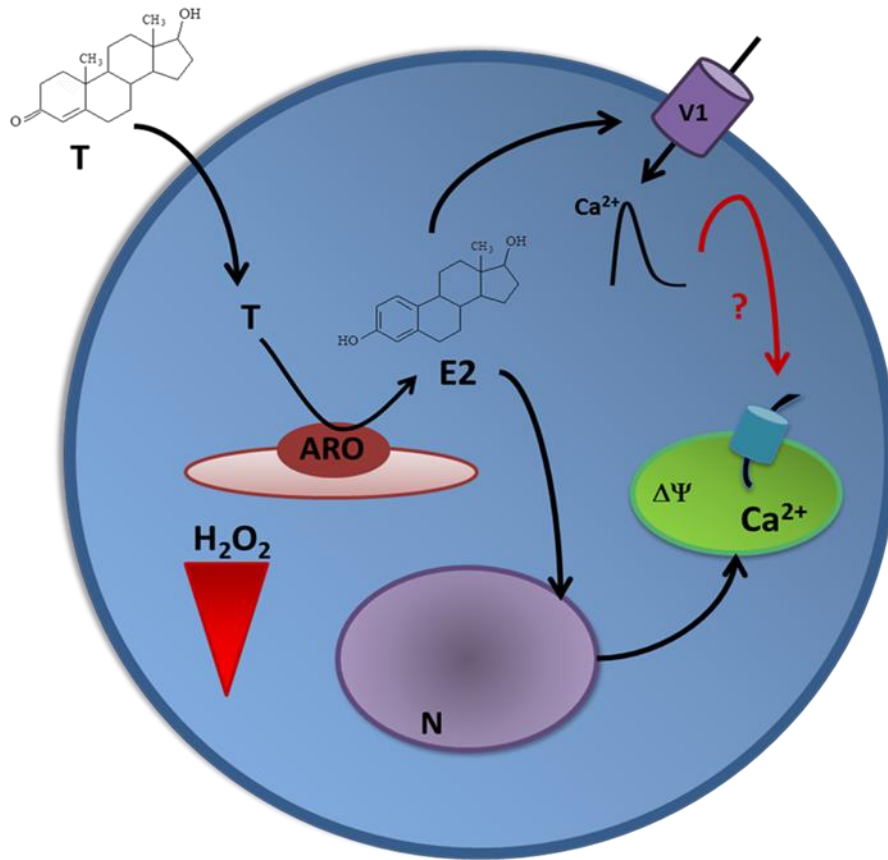


Figura 17: Esquema del modelo propuesto para la aromatización de estrógeno como mecanismo protector de la muerte celular inducida por estrés oxidativo. Estradiol podría inducir protección a través de TRPV1 es una interacción directa sobre el canal, produciendo una entrada transitoria de Ca²⁺ que activa alguna vía de señalización potenciando mecanismos de protección celular manteniendo la funcionalidad de organelos claves en la viabilidad celular como la mitocondria.

CONCLUSION

- La estimulación farmacológica de la actividad de aromatasa *in vitro* induce la producción endógena de estrógeno a partir de testosterona, por lo tanto es posible potenciar un mecanismo a través de la aromatización.
- La utilización de medios condicionados para la producción de estrógeno permite proteger de la muerte celular inducida por H₂O₂ a través de TRPV1 en un efecto independiente de los receptores de estrógeno.

REFERENCIAS

- Azcoitia, I., Sierra, a, Veiga, S., & Garcia-Segura, L. M. (2005). Brain steroidogenesis: emerging therapeutic strategies to prevent neurodegeneration. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 112(1), 171–6. doi:10.1007/s00702-004-0179-y
- Becerra, A., Echeverría, C., Varela, D., Sarmiento, D., Armisén, R., Nuñez-Villena, F., Montecinos, M., et al. (2011). Transient receptor potential melastatin 4 inhibition prevents lipopolysaccharide-induced endothelial cell death. *Cardiovascular research*, 91(4), 677–84. doi:10.1093/cvr/cvr135
- Boonstra, J., & Post, J. A. (2004). Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene*, 337, 1–13. doi:10.1016/j.gene.2004.04.032
- Bortner, C. D., & Cidlowski, J. a. (2004). The role of apoptotic volume decrease and ionic homeostasis in the activation and repression of apoptosis. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 448(3), 313–8. doi:10.1007/s00424-004-1266-5
- Cao, E., Cordero-Morales, J. F., Liu, B., Qin, F., & Julius, D. (2013). TRPV1 Channels Are Intrinsically Heat Sensitive and Negatively Regulated by Phosphoinositide Lipids. *Neuron*, 77(4), 667–79. doi:10.1016/j.neuron.2012.12.016
- Carreau, S., De Vienne, C., & Galeraud-Denis, I. (2008). Aromatase and estrogens in man reproduction: a review and latest advances. *Advances in medical sciences*, 53(2), 139–44. doi:10.2478/v10039-008-0022-z
- Carswell, H. V. O., Dominiczak, a F., Garcia-Segura, L. M., Harada, N., Hutchison, J. B., & Macrae, I. M. (2005). Brain aromatase expression after experimental stroke: topography and time course. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 96(1), 89–91. doi:10.1016/j.jsbmb.2005.02.016
- Caterina, M J, Schumacher, M. a, Tominaga, M., Rosen, T. a, Levine, J. D., & Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389(6653), 816–24. doi:10.1038/39807
- Caterina, M. J. (2000). Impaired Nociception and Pain Sensation in Mice Lacking the Capsaicin Receptor. *Science*, 288(5464), 306–313. doi:10.1126/science.288.5464.306
- Chávez, A. E., Chiu, C. Q., & Castillo, P. E. (2010). TRPV1 activation by endogenous anandamide triggers postsynaptic long-term depression in dentate gyrus. *Nature neuroscience*, 13(12), 1511–8. doi:10.1038/nn.2684

- Chen, S., Chang, T., & Wu, F. (2004). Competitive Inhibition of the Capsaicin Receptor-Mediated Current by Dehydroepiandrosterone in Rat Dorsal Root Ganglion Neurons, *311*(2), 529–536. doi:10.1124/jpet.104.069096.inflammatory
- Cho, T., & Chaban, V. V. (2012, June 20). Expression of P2X3 and TRPV1 receptors in primary sensory neurons from estrogen receptors- α and estrogen receptor- β knockout mice. *Neuroreport*. doi:10.1097/WNR.0b013e328353fabc
- Clapham, D. E., Runnels, L. W., Strübing, C., & Medical, H. H. (2001). The trp ion channel family. *Neuroscience*, *2*(June).
- Dadon, D., & Minke, B. (2010). Cellular functions of transient receptor potential channels. *The international journal of biochemistry & cell biology*, *42*(9), 1430–45. doi:10.1016/j.biocel.2010.04.006
- Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). biology of ageing, *408*(November), 239–247.
- Fiocchetti, M., Ascenzi, P., & Marino, M. (2012). Neuroprotective Effects of 17 β -Estradiol Rely on Estrogen Receptor Membrane Initiated Signals. *Frontiers in Physiology*, *3*(April), 1–10. doi:10.3389/fphys.2012.00073
- Giorgio, M., Trinei, M., Migliaccio, E., & Pelicci, P. G. (2007). Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nature reviews. Molecular cell biology*, *8*(9), 722–8. doi:10.1038/nrm2240
- Gough, D. R., & Cotter, T. G. (2011). Hydrogen peroxide: a Jekyll and Hyde signalling molecule. *Cell death & disease*, *2*(10), e213. doi:10.1038/cddis.2011.96
- Hamden, K., Silandre, D., Delalande, C., Elfeki, A., & Carreau, S. (2008). Protective effects of estrogens and caloric restriction during aging on various rat testis parameters. *Asian journal of andrology*, *10*(6), 837–45. doi:10.1111/j.1745-7262.2008.00430.x
- Hecquet, C. M., & Malik, A. B. (2009). Role of H₂O₂-activated TRPM2 calcium channel in oxidant-induced endothelial injury. *Thrombosis and Haemostasis*, 619–625. doi:10.1160/TH08-10-0641
- Henriquez, M., & Riquelme, G. (2003). 17Beta-Estradiol and Tamoxifen Regulate a Maxi-Chloride Channel From Human Placenta. *The Journal of membrane biology*, *191*(1), 59–68. doi:10.1007/s00232-002-1038-0
- Irnaten, M., Blanchard-Gutton, N., & Harvey, B. J. (2008). Rapid effects of 17beta-estradiol on epithelial TRPV6 Ca²⁺ channel in human T84 colonic cells. *Cell calcium*, *44*(5), 441–52. doi:10.1016/j.ceca.2008.02.007

- Irnaten, M., Blanchard-Gutton, N., Praetorius, J., & Harvey, B. J. (2009). Rapid effects of 17beta-estradiol on TRPV5 epithelial Ca²⁺ channels in rat renal cells. *Steroids*, *74*(8), 642–9. doi:10.1016/j.steroids.2009.02.002
- Jia, Y., Zhou, J., Tai, Y., & Wang, Y. (2007). TRPC channels promote cerebellar granule neuron survival. *Nature neuroscience*, *10*(5), 559–67. doi:10.1038/nn1870
- King, S. R., & Stocco, D. M. (2011). Steroidogenic acute regulatory protein expression in the central nervous system. *Frontiers in endocrinology*, *2*(November), 72. doi:10.3389/fendo.2011.00072
- Kroemer, G., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Peter, M. E., Vaux, D., Vandenabeele, P., Zhivotovsky, B., et al. (2005). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell death and differentiation*, *12 Suppl 2*, 1463–7. doi:10.1038/sj.cdd.4401724
- Latorre, R., Zaelzer, C., & Brauchi, S. (2009). Structure-functional intimacies of transient receptor potential channels. *Quarterly reviews of biophysics*, *42*(3), 201–46. doi:10.1017/S0033583509990072
- Launay, P., Fleig, A., Perraud, A., Scharenberg, A. M., Penner, R., & Kinet, J. (2002). TRPM4 Is a Ca²⁺-Activated Nonselective Cell Membrane Depolarization, *109*, 397–407.
- Lavaque, E., Mayen, A., Azcoitia, I., Tena-Sempere, M., & Garcia-Segura, L. M. (2006). Sex differences, developmental changes, response to injury and cAMP regulation of the mRNA levels of steroidogenic acute regulatory protein, cytochrome p450scc, and aromatase in the olivocerebellar system. *Journal of neurobiology*, *66*(3), 308–18. doi:10.1002/neu.20221
- Li, S., Wang, X., Ye, H., Gao, W., Pu, X., & Yang, Z. (2010). Distribution profiles of transient receptor potential melastatin- and vanilloid-related channels in rat spermatogenic cells and sperm. *Molecular biology reports*, *37*(3), 1287–93. doi:10.1007/s11033-009-9503-9
- Liu, M., Hurn, P. D., Roselli, C. E., & Alkayed, N. J. (2007). Role of P450 aromatase in sex-specific astrocytic cell death. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *27*(1), 135–41. doi:10.1038/sj.jcbfm.9600331
- Majeed, Y., Amer, M. S., Agarwal, a K., McKeown, L., Porter, K. E., O'Regan, D. J., Naylor, J., et al. (2011). Stereo-selective inhibition of transient receptor potential TRPC5 cation channels by neuroactive steroids. *British journal of pharmacology*, *162*(7), 1509–20. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.01136.x
- Malli, R., Frieden, M., Osibow, K., Zoratti, C., Mayer, M., Demaurex, N., & Graier, W. F. (2003). Sustained Ca²⁺ transfer across mitochondria is Essential for mitochondrial

- Ca²⁺ buffering, store-operated Ca²⁺ entry, and Ca²⁺ store refilling. *The Journal of biological chemistry*, 278(45), 44769–79. doi:10.1074/jbc.M302511200
- McClellan, J., & Nuñez, J. L. (2008, March). 17alpha-Estradiol is neuroprotective in male and female rats in a model of early brain injury. *Experimental neurology*. doi:10.1016/j.expneurol.2007.09.027
- Mizrak, S. C., & Van Dissel-Emiliani, F. M. F. (2008). Transient receptor potential vanilloid receptor-1 confers heat resistance to male germ cells. *Fertility and sterility*, 90(4), 1290–3. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.10.081
- Moor, A. N., Gottipati, S., Mallet, R. T., Sun, J., Giblin, F. J., Roque, R., & Cammarata, P. R. (2004). A putative mitochondrial mechanism for antioxidative cytoprotection by 17beta-estradiol. *Experimental eye research*, 78(5), 933–44. doi:10.1016/j.exer.2004.01.001
- Nakamagoe, M., Tabuchi, K., Uemaetomari, I., Nishimura, B., & Hara, A. (2010). Estradiol protects the cochlea against gentamicin ototoxicity through inhibition of the JNK pathway. *Hearing Research*, 261(1-2), 67–74. doi:10.1016/j.heares.2010.01.004
- Nilius, B., & Owsianik, G. (2011). The transient receptor potential family of ion channels. *Genome biology*, 12(3), 218. doi:10.1186/gb-2011-12-3-218
- Nilius, B., & Voets, T. (2008). news and views A TRP channel-steroid marriage, 10(12), 3–4.
- Ozacmak, V. H., & Sayan, H. (2009). The effects of 17beta estradiol, 17alpha estradiol and progesterone on oxidative stress biomarkers in ovariectomized female rat brain subjected to global cerebral ischemia. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 58(6), 909–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19093730>
- Pegorini, S., Braida, D., Verzoni, C., Guerini-Rocco, C., Consalez, G. G., Croci, L., & Sala, M. (2005). Capsaicin exhibits neuroprotective effects in a model of transient global cerebral ischemia in Mongolian gerbils. *British journal of pharmacology*, 144(5), 727–35. doi:10.1038/sj.bjp.0706115
- Pentikäinen, V., Erkkilä, K., Suomalainen, L., Parvinen, M., & Dunkel, L. (2000). Estradiol acts as a germ cell survival factor in the human testis in vitro. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 85(5), 2057–67. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10843196>
- Picazo-Juárez, G., Romero-Suárez, S., Nieto-Posadas, A., Llorente, I., Jara-Oseguera, A., Briggs, M., McIntosh, T. J., et al. (2011). Identification of a binding motif in the S5 helix that confers cholesterol sensitivity to the TRPV1 ion channel. *The Journal of biological chemistry*, 286(28), 24966–76. doi:10.1074/jbc.M111.237537

- Rohacs, T. (2009). Phosphoinositide regulation of non-canonical transient receptor potential channels. *Cell calcium*, 45(6), 554–65. doi:10.1016/j.ceca.2009.03.011
- Roselli, C. E. (2008). BRAIN AROMATASE: ROLES IN REPRODUCTION AND NEUROPROTECTION, 106, 143–150.
- Saldanha, C. J., Duncan, K. a, & Walters, B. J. (2009). Neuroprotective actions of brain aromatase. *Frontiers in neuroendocrinology*, 30(2), 106–18. doi:10.1016/j.yfrne.2009.04.016
- Sarkar, S. N., Huang, R.-Q., Logan, S. M., Yi, K. D., Dillon, G. H., & Simpkins, J. W. (2008). Estrogens directly potentiate neuronal L-type Ca²⁺ channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(39), 15148–53. doi:10.1073/pnas.0802379105
- Simon, F., Leiva-Salcedo, E., Armisén, R., Riveros, A., Cerda, O., Varela, D., Eguiguren, A. L., et al. (2010). Hydrogen peroxide removes TRPM4 current desensitization conferring increased vulnerability to necrotic cell death. *The Journal of biological chemistry*, 285(48), 37150–8. doi:10.1074/jbc.M110.155390
- Simpkins, J. W., & Dykens, J. a. (2008). Mitochondrial mechanisms of estrogen neuroprotection. *Brain research reviews*, 57(2), 421–30. doi:10.1016/j.brainresrev.2007.04.007
- Simpkins, J. W., Yi, K. D., Yang, S.-H., & Dykens, J. a. (2010). Mitochondrial mechanisms of estrogen neuroprotection. *Biochimica et biophysica acta*, 1800(10), 1113–20. doi:10.1016/j.bbagen.2009.11.013
- Stocco, D. M., Wang, X., Jo, Y., & Manna, P. R. (2005). Multiple signaling pathways regulating steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression: more complicated than we thought. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 19(11), 2647–59. doi:10.1210/me.2004-0532
- Tominaga, M., & Tominaga, T. (2005). Structure and function of TRPV1. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 451(1), 143–50. doi:10.1007/s00424-005-1457-8
- Valverde, M. A. (1999). Acute Activation of Maxi-K Channels (hSlo) by Estradiol Binding to the subunit β .pdf.
- Vasconsuelo, A., Pronsato, L., Ronda, A. C., Boland, R., & Milanese, L. (2011). Role of 17 β -estradiol and testosterone in apoptosis. *Steroids*, 76(12), 1223–31. doi:10.1016/j.steroids.2011.08.001
- Venkatachalam, K., & Montell, C. (2007). TRP channels. *Annual review of biochemistry*, 76, 387–417. doi:10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819

- Wagner, T. F. J., Loch, S., Lambert, S., Straub, I., Mannebach, S., Mathar, I., Düfer, M., et al. (2008). Transient receptor potential M3 channels are ionotropic steroid receptors in pancreatic beta cells. *Nature cell biology*, *10*(12), 1421–30. doi:10.1038/ncb1801
- Wang, L., & Wang, D. H. (2005). TRPV1 gene knockout impairs postischemic recovery in isolated perfused heart in mice. *Circulation*, *112*(23), 3617–23. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.556274
- Wang, M., Ji, P., Wang, R., Zhao, L., & Xia, Z. (2012). TRPV1 agonist capsaicin attenuates lung ischemia-reperfusion injury in rabbits. *The Journal of surgical research*, *173*(1), 153–60. doi:10.1016/j.jss.2010.08.053
- Wang, X. (2003). Oxidative Damage to Human Lens Epithelial Cells in Culture: Estrogen Protection of Mitochondrial Potential, ATP, and Cell Viability. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *44*(5), 2067–2075. doi:10.1167/iovs.02-0841
- Wilkinson, J. a, Scragg, J. L., Boyle, J. P., Nilius, B., & Peers, C. (2008). H₂O₂-stimulated Ca²⁺ influx via TRPM2 is not the sole determinant of subsequent cell death. *Pflügers Archiv: European journal of physiology*, *455*(6), 1141–51. doi:10.1007/s00424-007-0384-2
- Wu, T.-W., Wang, J. M., Chen, S., & Brinton, R. D. (2005). 17Beta-estradiol induced Ca²⁺ influx via L-type calcium channels activates the Src/ERK/cyclic-AMP response element binding protein signal pathway and BCL-2 expression in rat hippocampal neurons: a potential initiation mechanism for estrogen-induced neurop. *Neuroscience*, *135*(1), 59–72. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.12.027
- Yuan, J., & Kroemer, G. (2010). Alternative cell death mechanisms in development and beyond. *Genes & development*, *24*(23), 2592–602. doi:10.1101/gad.1984410

ANEXO

Anexo A

Anexo A1: Protocolo de Extracción de RNA

Desde cultivo celular: lavar con PBS 1X frío y colocar en hielo, agregar 1 ml de Trizol, raspar con scarpers y recolectar en tubos de 1,7 ml previamente enfriado en hielo.

Desde tejido: se pesan 2 mg de tejido y agregar 1ml de Trizol, homogenizar con scaper.

Fase de separación:

- Se incuba el homogenizado por 5 min a temperatura ambiente para permitir la completa disociación de los complejos nucleoproteicos
- Agregar 200 µl de cloroformo por cada ml de Trizol
- Homogenizar los tubos de forma manual por 15 seg e incubar a 15 °C por 3 min
- Centrifugar a no mas de 12000g durante 15 min a 4°C
- Después de centrifugar las muestras se separan en una fase orgánica (fenol-cloroformo), una interfase, y una fase acuosa, el RNA se encuentra exclusivamente en la fase acuosa. El volumen de la fase acuosa es alrededor de un 60% del volumen del Trizol.

Precipitación de RNA:

- Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo tratando de no arrastrar la fase organica que contiene el RNA y proteínas
- Agregar 500 µl de isopropanol por cada 1 ml de Trizol y homogenizar
- Incubar la muestra temperatura ambiente durante 10 min.
- Centrifugar a no mas de 12000 g a 4°C durante 15 min

Lavado de RNA:

- Remover el sobrenadante y lavar el precipitado con 1ml de Etanol 75%-DEPC por cada 1ml de Trizol.
- Centrifugar la mezcla a no mas de 7500 g por 5 min a 4 °C

Resuspender RNA

- Dejar evaporar el Etanol 75%-DEPC
- Una vez seco el tubo resuspender el RNA en H₂O-DEPC

Cuantificación de RNA

- La cuantificación involucra la razón $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ y $\frac{A_{260}}{A_{230}}$
- El blanco utilizado es agua, se toman 2 μ l de la muestra y agregar 198 μ l de H₂O y se mide la absorbancia a 260, 280 y 230 nm.
- El cálculo de la concentración se realiza con la siguiente ecuación:

$$c \left(\frac{\mu g}{ml} \right) = \frac{A_{260}}{A_{280}} \times 4000$$

Anexo A2: Protocolo de síntesis de cDNA.

1. Agregar 1 μ l de oligo dT
2. Agregar 1 μ l de dNTP mix 10 μ M
3. Agregar 2 μ g de RNA y ajustar el volumen hasta 12 μ l
4. Incubar a 65°C durante 5 min
5. Agregar 4 μ l de Buffer First-strand
6. Agregar 2 μ l de DTT 0.1M
7. Incubar a 37°C durante 2 min
8. Agregar 1 μ l de la enzima M-MLV y mezclar por pipeteo
9. Incubar a 37°C durante 50 min
10. Inactivar a 70°C durante 15 min
11. Guardar a 4°C

Anexo A3: Protocolo de RT-PCR.

*Volumen ajustado para 1 reacción en un volumen final de 25 μ l

- Agregar 5 μ l de Buffer GoTaq 5X
- Agregar 1 μ l Primer Forward 10 μ M
- Agregar 1 μ l de Primer reverse 10 μ M
- Agregar 0,5 μ l de mix dNTPs 10 μ M
- Agregar el volumen de $MgCl_2$ determinado para cada pareja de primer
- Agregar 0,1 μ l de la enzima GoTaq(5U/ μ l)
- Ajustar el volumen con H₂O para un volumen final de 25 μ l

Anexo A4: Protocolo de amplificación para RT-PCR.

- Denaturación inicial de 94°C durante 5 minutos,
- 40 ciclos que incluyen:
 1. Denaturación a 94°C por 30 segundos,
 2. Alineamiento a 55-63 °C por 30 segundos,
 3. Extensión 72°C por 30 segundos.
- La extensión final se realizó a 72 °C por 10 minutos y enfriamiento 4°C.

La electroforesis de los productos de PCR junto con la escalera de ADN (Biolab) fueron cargados en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (Merck)

Tabla 1: Lista de Primer utilizados en la caracterización de las líneas de cultivo. Lista de primer con su respectiva secuencia, concentración de MgCl₂, temperatura de alineamiento y amplicón determinado *in silico*

Primer	Secuencia	Temperatura (°C)	Conc. MgCl ₂ (mM)	Amplicón* (bp)
TRPV1	F: 5' TCCCAGGACTCTGTCTCCAC 3' R: 5' TCTGGGTCTTTGAACTCGCT 3'	55	2	104
ERα	F: 5' TCTGCCAAGGAGACTCGCTACT 3' R: 5' GGTGCATTGGTTTGTAGCCTGGAC 3'	56	2	153
ERβ	F: 5' GGCCTGTGAAGGATGTAAGGC 3' R: 5' TAACACTTGCGAAGTCGGCAGG 3'	56	2	139
GPR30	F: 5' GCCACATAGTCAACCTTGCAGC 3' R: 5' CGTCTTCTGCTCCACATAGAGC 3'	56	2	113
ARO	F: 5' CGAAGCAGCAATCCTGAAGGAG 3' R: 5' CCAAGTCCACAACAGGCTGGTA 3'	63	0,5	134
S16	F: 5' AGGAGCGATTTGCTGGTGTGGA 3' R: 5' GCTACCAGGCCTTTGAGATGGA 3'	58	2	102

**in silico*

Anexo A5: Preparación de muestras para citometría de flujo.

1. Recolectar el medio de cada pocillo en tubos de 1,7 ml
2. Tripsinizar las células de los pocillos con 100µl de Tripsina 1X (Thermo Scientific) durante 5 min a 37°C.
3. Neutralizar la tripsina con 400µl de PBS 1X suplementado con 10% HS y recolectar en los tubos de 1,7 ml
4. Centrifugar durante 5 min a 3200 rpm a 4°C
5. Eliminar sobrenadante y resuspender con 100 µl de PBS 1X + Rho123 0,5µg/ml y equilibrar a 37°C durante 20 min.
6. Centrifugar durante 5 min a 3200 rpm a 4°C.
7. Eliminar sobrenadante y resuspender en 100 µl de PBS 1X + PI 10µg/ml y equilibrar a temperatura ambiente y en oscuridad durante 15 min
8. Diluir con 400µl de PBS 1X libre de sonda.
9. Medir inmediatamente en el citómetro.

Anexo B: Detalles de soluciones y medios de cultivo celular y estimulación

Anexo B1: Detalles de soluciones y medios de cultivo celular.

DMEM High glucosa: se disuelven 13,4 g/L de DMEM y 3,7 g NaHCO_3 en 1 lt de agua destilada estéril, ajustar al pH a 7,2 y esterilizar por filtración

PBS 10X: diluir 87,9 g de NaCl, 2,74 g de KH_2PO_4 y 11,35 g de Na_2HPO_4 en 1 lt de agua destilada con agitación. Ajustar el pH a 7.2.

Medio de crecimiento: DMEM High glucosa (Dulbecco Modified Medium, Biological Industries) + 10% Suero Bovino Fetal + P/S 1X (Thermo Scientific)

Medio de Deprivación: DMEM High glucosa (Dulbecco Modified Medium, Biological Industries) + 1% Suero Bovino Fetal + P/S al 1% (Thermo Scientific).

Medio de Estimulación: DMEM High glucosa (Dulbecco Modified Medium, Biological Industries) + Albumina de suero bovino al 1% (Winkler) + P/S 1x (Thermo Scientific).

Anexo B2: Detalles de estimulación para la inducción de la aromatización *in vitro*.

Las células son sembradas en placas de 60 mm, 24 horas después son lavadas con PBS 1X estéril precondicionadas con los fármacos y testosterona en medio suplementado con 1% SFB

Control: 2ml de Medio de privación

A+P: 2ml de Medio de privación + 2 μ l Bu₂-cAMP 50mM + 2 μ l de PMA 10 μ M

C+T: 2ml de Medio de privación + 2 μ l testosterona 1mM

A+P+T: 2ml de Medio de privación + 2 μ l Bu₂-cAMP 50mM + 2 μ l de PMA 10 μ M + 2 μ l testosterona 1mM

A+P+T+L: 2ml de Medio de privación + 2 μ l Bu₂-cAMP 50mM + 2 μ l de PMA 10 μ M + 2 μ l testosterona 1mM + 2 μ l letrozol 50 mM

Anexo B3: Detalles de estimulación del sistema heterólogo con los medios condicionados para la aromatización de testosterona.

Las células son sembradas en una placa de 24 pocillos^(*), son deprivadas en aproximadamente 70% de confluencia y estimuladas como se detalla a continuación:

Controles de medición:

Control de vivas: 100 µl de medio de estimulación

Control de muerte: 90 µl de medio de estimulación y 10 µl FCCP 100 µM

Inductor de muerte: 90 µl de medio de estimulación + 10 µl de H₂O₂ 10 mM

Protección por medio condicionado:

C+T: 90 µl de medio condicionado + 10 µl de H₂O₂ 10 mM

A+P+T: 90 µl de medio condicionado + 10 µl de H₂O₂ 10 mM

A+P+T+L. 90 µl de medio condicionado + 10 µl de H₂O₂ 10 mM

Inhibición de la protección inducida por el medio condicionado:

Control de vivas + CPZ: 100 µl de medio de estimulación + 10 µl CPZ 100 µM

Control de muerte + CPZ: 90 µl de medio de estimulación y 10 µl FCCP 100 µM + 10 µl CPZ 100 µM

Inductor de muerte + CPZ: 90 µl de medio de estimulación + 10 µl de H₂O₂ 10 mM + 10 µl CPZ 100 µM

CT + CPZ: 90 µl de medio condicionado + 10 µl de H₂O₂ 10 mM + 10 µl CPZ 100 µM

APT + CPZ: 90 µl de medio condicionado + 10 µl de H₂O₂ 10 mM + 10 µl CPZ 100 µM

(*)Cada placa permite hacer cada estímulo por triplicado (n=3)