



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



**FACULTAD DE QUÍMICA
PROGRAMA DE MAestrÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOQUÍMICAS**

**PATRÓN DE EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES A
ESTRÓGENOS MITOCONDRIALES EN EL CEREBRO
DE RATA DURANTE EL ENVEJECIMIENTO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)**

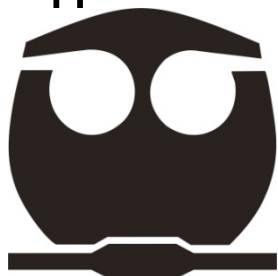
P R E S E N T A

M en C. CAROLINA ÁLVAREZ DELGADO

TUTOR: DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES

MÉXICO D.F.

Mayo 2011





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta 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 titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, el Dr. Marco A. Cerbón, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio; por fomentar la creatividad científica; por guiarme y dirigir este trabajo. Pero sobre todo por compartir su experiencia como investigador.

A la Dra. Adriana Mendoza, por la ayuda técnica en la realización de este trabajo y por el apoyo en la redacción del artículo.

A los miembros de mi Comité Tutoral: Dra. Xóchitl Pérez Martínez y Dr. Julio Morán Andrade, por las revisiones que, semestre a semestre, ayudaron a enriquecer este trabajo.

A los miembros del Jurado de Examen de Grado: Dr. Diego González Halphen, Dr. Ignacio Camacho Arroyo, Dra. Clorinda Arias Álvarez, Dra. Xóchitl Pérez Martínez y Dr. Rolando Hernández Muñoz. Por el tiempo invertido en la cuidadosa revisión de esta tesis. Gracias por sus observaciones y comentarios.

A la M.V.Z. Lucía Macías Rosales y al M en C. Luciano Mendoza Garcés, por el apoyo en el cuidado y manipulación de los animales experimentales utilizados en este estudio.

Al Posgrado en Ciencias Bioquímicas, la Facultad de Química y la UNAM, por darme la oportunidad de realizar mis estudios de doctorado e iniciar una carrera en la investigación.

A la UNAM, por el apoyo económico para la realización de esta investigación, a través del PAPIIT IN219710.

Al CONACyT, por el apoyo económico otorgado durante mis estudios de doctorado a través de la Beca de Apoyos Integrales para la formación de Doctores en Ciencias, registro CVU 170200; y por el financiamiento otorgado para la realización de este proyecto, registro 80338.

DEDICATORIAS

A mi familia:

Mis padres, porque todo lo bueno de mí lo heredé o lo aprendí de ustedes. Gracias por enseñarme la honestidad en el trabajo, la armonía en lo cotidiano y la belleza en la naturaleza.

A mi abuelita, por ser una mujer ejemplar; a Paulo, por mostrarme que la ciencia y el arte coexisten; a *La Corchea*, Amor y Diego, por poner puntos y comas, hogar, café y pasteles, siempre que fue necesario.

A Luciano, porque "*God only knows what I'd be without you*". Gracias por ser mi científico de cabecera (los midi-chlorians han dicho "adelante").

A mis amigos:

A Ale, mi mejor amiga de cerca y de lejos. Por ser mi espejo y entenderme sin necesidad de explicaciones.

A Natty, por compartir la ciencia entre risas, cafés y vinos tintos. ¡Nos vemos en la serendipia!

A *jpk*, por cuidarme como a una hermana.

A mis compañeros del Laboratorio 206, por compartir una etapa increíble. Especialmente a Moni, por amar la bioquímica tan contagiosamente; a Paqui, por hacerme reír tanto que olvidaba el cansancio; y a Nacho, por ser una gran amigo (al infinito) y un excelente técnico en computadoras. A los "alumnitos" del lab (*Vega et al.*): están al 100%, bienvenidos a la ciencia.

Por último, quisiera dedicar este espacio a las pequeñas ratas Wistar que se utilizaron para realizar este trabajo: porque gracias a ellas entendemos mucho más de nuestra propia naturaleza.

"Nature writes astonishingly complicated prose"

Jonah Lehrer

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	4-6
2. ANTECEDENTES.....	7-20
2.1 Envejecimiento, estrógenos y función mitocondrial.....	7-9
2.2 Receptores a estrógenos	9-13
2.3 Isoformas de los receptores a estrógenos en el cerebro de la rata	13-15
2.4 Efectos estrogénicos sobre la mitocondria	15-17
2.5 Receptores a estrógenos mitocondriales	17-20
3. JUSTIFICACIÓN	21-22
4. HIPÓTESIS.....	23
5. OBJETIVOS	24
5.1 Objetivo General	24
5.2 Objetivos Particulares	24
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	25-28
6.1 Animales	25
6.2 Fraccionamiento Subcelular.....	25-26
6.3 Co-inmunoprecipitación.....	26-27
6.4 Western blot	27-28
6.5 Análisis estadístico	28

7. RESULTADOS	29-41
7.1 Variantes de ER α y ER β mitocondriales en el cerebro.....	29-31
7.2 Nivel de expresión y localización de los receptores a estrógenos mitocondriales	31-33
7.3 Complejos de ER β , ER β mitocondrial y ATP sintasa.....	33-37
7.4 Análisis computacional de péptidos de localización mitocondrial en ER α y ER β	38-41
8. DISCUSIÓN	42-52
9. CONCLUSIONES	53
10. PERSPECTIVAS	54-55
11. REFERENCIAS	56-64
12. ANEXOS	65-66
Anexo 1: <i>Different expression of alpha and beta mitochondrial estrogen receptors in the aging rat brain. Interaction with respiratory complex V</i>	65
Anexo 2: <i>Receptores a estrógenos mitocondriales: la señalización hormonal más allá del núcleo</i>	66

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, los humanos tenemos una expectativa de vida considerablemente mayor que hace cien años. En México, la esperanza de vida es de 76 años (INEGI, 2011) y a nivel mundial, se espera que el número de individuos de 65 años o más aumente en los próximos años (WHO, 2011). Esto resulta en una población mundial compuesta por un gran número de personas de la tercera edad. Por esto, es importante conocer los mecanismos que llevan a un envejecimiento “sano” (evitar el inicio y la progresión de enfermedades neurodegenerativas, cuyo principal factor de riesgo es la edad). En la medida en la que se conozcan los elementos involucrados en los procesos del envejecimiento se podrán implementar estrategias de prevención y tratamiento para mejorar la calidad de vida de este sector de la población.

Con el envejecimiento, el cerebro sufre cambios estructurales y metabólicos que, en conjunto, pueden llevar a un déficit en ciertos tipos de memoria y aprendizaje, e.g., memoria declarativa episódica y aprendizaje espacial (Erickson y Barnes 2003). Estos cambios son particularmente evidentes en las mujeres, que con la menopausia sufren una disminución en la concentración de estrógenos. Además, mientras la esperanza de vida aumenta, la edad promedio de la pre-menopausia es la misma, lo que resulta en un aumento del número de mujeres que viven en este estado post-menopáusico.

Existe evidencia que sugiere que el cese de las fluctuaciones cíclicas de estrógenos es una de las causas importantes del déficit cognoscitivo observado en mujeres postmenopáusicas (Boulware et al. 2011).

Las alteraciones funcionales y estructurales del cerebro envejecido tienen un componente molecular que, en muchos casos, incide en la función mitocondrial. Por ejemplo, se ha demostrado que, en varios modelos, las neuronas de individuos viejos presentan una mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), una disminución de la síntesis de ATP, una disminución de la actividad de los complejos respiratorios mitocondriales (Boveris y Navarro 2008), deficiencias en la transferencia de electrones (Nilsen y Diaz Brinton 2003) y desregulaciones en las concentraciones de calcio intracelular (Nilsen y Diaz Brinton 2003).

Muchas de estas alteraciones mitocondriales pueden ser prevenidas con estradiol (E_2) (Simpkins y Dykens 2008), que actúa principalmente a través de dos receptores a estrógenos (ERs).

Los receptores a estrógenos (ER) son proteínas que inicialmente se describieron como factores de transcripción nucleares y como mediadores de los efectos del E_2 . Aunque en un principio se les asoció con procesos meramente reproductivos (e.g., regulación de la proliferación y la muerte celular en el útero; aparición de la conducta reproductiva), recientemente se ha establecido que sus funciones van más allá de los procesos asociados a la reproducción (Weiser et al. 2008).

Una de las nuevas funciones que se les ha atribuido a los ERs es su participación en el mantenimiento de la función mitocondrial. Varios investigadores han reportado el efecto benéfico del E_2 sobre la actividad mitocondrial en el cerebro (Chen et al. 2009). Estos resultados concuerdan con la detección de receptores a estrógenos dentro de las mitocondrias (mtERs) de diversos tejidos y tipos celulares (Chen et al. 2005). Incluso se ha llegado a sugerir que los efectos estrogénicos en la mitocondria son regulados por los mtERs.

En el presente trabajo hemos abordado el tema de los mtERs en un contexto fisiológico y farmacológico de envejecimiento del cerebro *in vivo*. Por primera vez se cuantificaron los niveles de acumulación de estos receptores mitocondriales en áreas del cerebro importantes en los procesos cognoscitivos (hipocampo y corteza cerebral) y reproductivos (hipotálamo). Además, se estudió a los mtERs desde un punto de vista funcional, demostrando las asociaciones de estos receptores con la ATP sintasa, una de las enzimas fundamentales de la respiración celular.

Los resultados de este trabajo apoyan la idea de que los ERs participan en la regulación de la actividad mitocondrial a través del E_2 a lo largo de la vida. Como en otros estudios, se sugiere que los mtERs modulan los efectos estrogénicos directamente dentro de la mitocondria.

RESUMEN

Generalmente, el envejecimiento del cerebro está asociado a la disminución de la capacidad cognitiva. Esta disminución es particularmente notable en hembras que han llegado a la senescencia reproductiva, que se caracteriza por el cese de la secreción de hormonas esteroides, como el estradiol (E_2). El E_2 tiene efectos neuroprotectores bien establecidos. La relación entre el envejecimiento del cerebro y la disminución de las concentraciones de E_2 se puede explicar en parte por la disfunción mitocondrial, que también está asociada al envejecimiento. La mayoría de los efectos neuroprotectores del E_2 son mediados por los receptores a estrógenos ($ER\alpha$ y $ER\beta$) y muchos investigadores han reportado que estos efectos convergen en la mitocondria. Recientemente, ambos receptores se han localizado en las mitocondrias de diversos tejidos y tipos celulares y se ha propuesto que participan en el mantenimiento de la estructura y función mitocondriales.

En este estudio, se analizaron la localización subcelular, las variantes, los niveles de expresión e interacciones proteína-proteína de los receptores a estrógenos mitocondriales (mtERs) en el cerebro de ratas jóvenes y viejas. Mediante experimentos de Western blot y co-inmunoprecipitación en dos modelos, fisiológico y farmacológico, se demostró que: 1) $ER\alpha$ y $ER\beta$ se localizan en las mitocondrias del hipocampo, la corteza y el hipotálamo de ratas de 3 y 18 meses de edad; 2) los mtERs se expresan como variantes en las tres áreas estudiadas; 3) el nivel de acumulación de los mtERs no se altera con la edad; 4) $ER\beta$, pero no $ER\alpha$, forma complejos con la ATP sintasa mitocondrial independientemente de la edad y de las concentraciones de E_2 . Estos resultados sugieren que mtER α y mtER β tienen funciones específicas en diferentes áreas del cerebro y que ambos son necesarios para mantener la función mitocondrial a lo largo de la vida.

ABSTRACT

The aging process in the brain is generally associated with a decline of cognitive function that is particularly evident in reproductively senescent females which have essentially ceased to produce and secrete steroid hormones, mainly estradiol (E_2). E_2 has well established neuroprotective effects; the link between brain aging and the decrease of E_2 concentrations can be explained, in part, in the context of mitochondrial dysfunction, which has also been consistently associated with aging. Most of the neuroprotective effects of E_2 are mediated by estrogen receptors, mainly $ER\alpha$ and $ER\beta$; and many of these effects converge on the mitochondrion. Recently, both ERs have been detected in the mitochondria of a myriad of tissues and cells and it has been suggested that these mitochondrial ERs (mtERs) may be associated with the conservation of the mitochondrion's structure and function.

In the present thesis we analyzed the subcellular localization, variants, protein content and protein-protein interactions of mtERs in young and aged rat brains. By Western blot and co-immunoprecipitation experiments we demonstrated that 1) $ER\alpha$ and $ER\beta$ are localized in hippocampal, cortical and hypothalamic mitochondria of young (3 months old) and aged (18 months old) rats; 2) both mtERs are expressed as variants in the three brain areas studied; 3) the protein content of both mtERs is not significantly altered by aging; 4) $ER\beta$ and mt $ER\beta$, but not $ER\alpha$, were detected as protein complexes with the mitochondrial ATP synthase (complex V), in an age- and E_2 -independent manner.

These results suggest that mt $ER\alpha$ and mt $ER\beta$ have important and specific functions in different brain areas and that both may be necessary elements of the mitochondrial structure and function throughout life.

2. ANTECEDENTES

2.1 ENVEJECIMIENTO, ESTRÓGENOS Y FUNCIÓN MITOCONDRIAL

Generalmente, el envejecimiento normal del cerebro está asociado a cambios estructurales, funcionales y neuroquímicos (Thakur y Sharma 2006). Por ejemplo, se ha reportado un aumento del 20% en la cantidad de células de la microglía (astrocitos) en el CA1 del hipocampo de ratones hembra adultas (13-14 meses de edad) y viejas (20-24 meses de edad) en comparación con ratones hembra jóvenes (3-4 meses de edad) (Mouton et al. 2002). En esta misma región del hipocampo, se reportó una disminución en la densidad de espinas dendríticas de ratas macho viejas (20-24 meses de edad) en comparación con ratas jóvenes (3-5 meses de edad) (Markham et al. 2005). En otras áreas del cerebro también se pueden observar cambios asociados al envejecimiento: en macacos viejos (19 años de edad) se detectó un decremento en las corrientes post-sinápticas de la corteza pre-frontal cuando se compararon con las corrientes post-sinápticas en la corteza de macacos jóvenes (12 años de edad) (Luebke et al. 2004). En esta misma área y modelo se reportó que, aunque no existe una pérdida de neuronas, sí hay una disminución dependiente de la edad en el número de sinapsis. (Peters et al. 2008).

Estos cambios no son iguales en las diferentes áreas del cerebro, i.e., los procesos de la memoria y el aprendizaje mediados por el hipocampo y la corteza son particularmente susceptibles a alterarse con la edad (Conrad y Bimonte-Nelson 2010).

Algunos de estos cambios en el cerebro pueden ser regulados por hormonas esteroides, como el estradiol (E_2), producidas tanto en las gónadas como en el cerebro (Zwain y Yen 1999, Adams et al. 2001, Adams y Morrison 2003). El E_2 puede regular la función cerebral a través de diferentes aspectos. Entre los efectos del E_2 sobre el cerebro se encuentran: 1) El aumento de la expresión de los transportadores de glucosa (GLUT-3 y GLUT-4), lo que se relaciona con la eficiencia metabólica (Alonso et al. 2008); 2) el aumento de la expresión de la triptófano hidroxilasa (TPH2) y la disminución de la expresión de la enzima que degrada a la serotonina (MAO-A), lo que se asocia a una mejor función de las neuronas serotoninérgicas (Bethea et al. 2009); 3) el mantenimiento de la homeostasis del calcio intracelular, lo que se

ha relacionado con la supervivencia neuronal (Brewer et al. 2006) y el aumento en el número de sinapsis y dendritas en el hipocampo (Zhao et al. 2005).

Actualmente se considera que el E₂ es un factor neuroprotector (García-Segura y Balthazart 2009) porque puede proteger al cerebro contra el daño, e.g., excitotóxico (Brewer et al. 2006) e isquémico (Dubal et al. 1999). Además, se le considera un factor neurotrófico porque promueve la supervivencia neuronal a través de diversos mecanismos, por ejemplo, regulando el metabolismo de la glucosa (Brinton 2008), las concentraciones intracelulares de calcio (Zhao y Brinton 2007b) e induciendo la activación de CREB (Zhao et al. 2005).

Un aspecto importante que se debe tomar en cuenta es que la síntesis de estrógenos disminuye con el envejecimiento (Foster 2011). Esta disminución en la concentración sérica de estrógenos participa en la disfunción hipotalámica que provoca el cese de los ciclos reproductivos en las hembras y se ha relacionado con la progresión de algunas afecciones neurodegenerativas como las enfermedades de Parkinson y Alzheimer (Azcoitia et al. 2005). La baja concentración de estrógenos también se asocia a cambios funcionales en el cerebro, como la disminución de la actividad metabólica (Alonso et al. 2008) y el decaimiento de ciertos tipos de memoria (e.g., declarativa) (Foster 2011).

Por otra parte, el envejecimiento se asocia a cambios en la función mitocondrial, como la disminución de la producción de ATP (Navarro y Boveris 2007) y del transporte de electrones a través de la cadena de transporte mitocondrial (Boveris y Navarro 2008); la disminución del potencial de membrana (Boveris y Navarro 2008); la pérdida de la regulación de las concentraciones intracelulares de calcio (Brown et al. 2004) y la disminución de la capacidad de reparar el daño al DNA mitocondrial (mtDNA) (Gredilla et al. 2010). Además, en algunos casos de neurodegeneración, la función mitocondrial también se ve afectada, como en el caso de las mitocondrias hipocámpales de personas con Alzheimer que presentan una actividad de la citocromo c oxidasa (COX) significativamente menor que sujetos sanos de la misma edad (Bosetti et al. 2002). Por lo anterior, se puede considerar a la mitocondria como un organelo que participa ampliamente en los procesos de

envejecimiento y neurodegeneración (Singh et al. 2006, Simpkins y Dykens 2008).

2.2 RECEPTORES A ESTRÓGENOS

La mayoría de los efectos del E₂ son mediados por los receptores a estrógenos (ER). Estas proteínas pertenecen a la superfamilia de los receptores nucleares y su mecanismo de acción clásico (genómico), como factores de transcripción, se ha descrito ampliamente. En mamíferos, se han caracterizado dos subtipos de ERs que están codificados en diferentes genes nucleares: *Esr1* codifica al subtipo ER α (~61-67 KDa) y *Esr2* a ER β (~50-56 KDa) (Shughrue et al. 1997, Kumar et al. 2010) (Fig. 1). La estructura de las proteínas ER α y ER β está muy bien conservada entre los mamíferos, e.g., los ER α y ER β de humano (hER α y hER β) tienen 87% y 88% de identidad con los ER α y ER β de la rata (datos obtenidos de un alineamiento de la secuencia de aminoácidos).

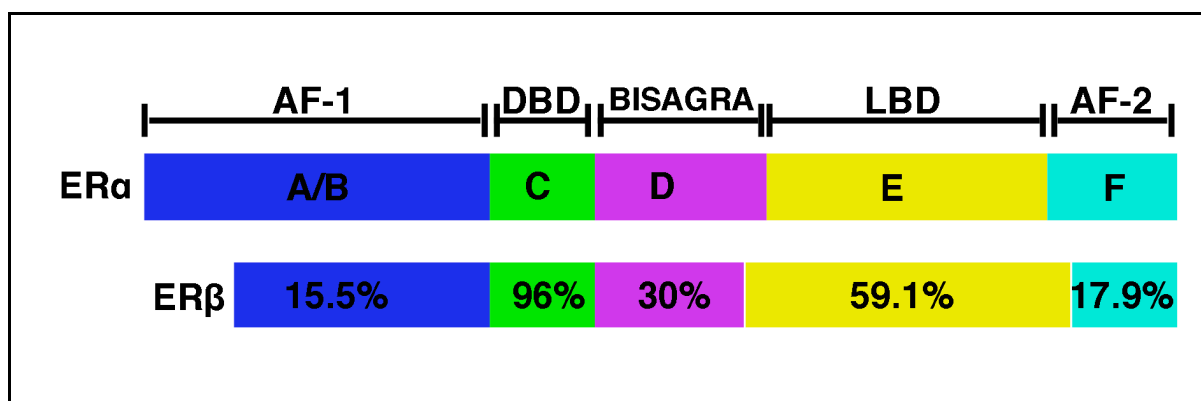


Figura 1. Representación esquemática de las estructuras proteínicas de ER α y ER β de humano. Las letras (A-F) indican los diferentes dominios funcionales de las proteínas. A/B: Función de activación 1 (AF-1); C: Dominio de unión al DNA (DBD); D: región tipo bisagra; E: dominio de unión al ligando (LBD); F: Función de activación 2 (AF-2). Los porcentajes indican el grado de identidad de cada dominio entre ER α y ER β .

El análisis de la distribución y niveles de expresión de los ERs en el cerebro es de particular interés ya que se ha establecido que el E₂ tiene propiedades neuroprotectoras en el sistema nervioso central y la mayoría de

estos efectos son mediados por ER α y/o ER β (De Nicola et al. 2009, García-Segura y Balthazart 2009).

A pesar de que los ERs se describieron inicialmente como factores de transcripción nucleares, estudios recientes han demostrado que los dos receptores también participan en procesos celulares fuera del núcleo. Además de localizarse en el núcleo, ambos ERs se han encontrado en las membranas celulares de oligodendrocitos (Hirahara et al. 2009) y de células tumorales de pituitaria (Norfleet et al. 1999). Al unirse a su ligando, estos receptores membranales pueden iniciar cascadas de señalización estrogénica que incluyen las vías de las cinasas MAPK y PI3K, entre otras (Hirahara et al. 2009); de esta manera, los ERs membranales contribuyen a la regulación de los efectos no genómicos del E₂ en el cerebro.

Más recientemente, tanto ER α como ER β se han detectado en las mitocondrias de diferentes tejidos y tipos celulares como ovario y útero de conejo (Monje y Boland 2001); células de carcinoma mamario HCC-1569 y MCF-7 y células de hepatocarcinoma HepG2 (Chen y Yager 2004, Chen et al. 2004a); cardiomiocitos y neuronas de rata, células hipocampales HT-22 y corazón humano (Yang et al. 2004); células de cristalino humano HLE-B3 (Cammarata et al. 2004); hipocampo y capilares cerebrales de rata (Milner et al. 2005, Stirone et al. 2005); cristalino humano (Flynn et al. 2008); la línea celular de músculo esquelético murino C2C12 (Milanesi et al. 2009) y células bronquiales de humano (Ivanova et al. 2009).

La aportación de estos mtERs a la señalización estrogénica es un área de investigación reciente y aún no se ha establecido inequívocamente cuál es su función dentro de la mitocondria. En las secciones 2.4 y 2.5 de los antecedentes de este trabajo se describen algunas de las evidencias que apoyan la importancia de los mtERs en la función mitocondrial.

Los ERs son proteínas reguladas en gran medida por su ligando. Tanto la localización subcelular como la expresión de los ERs puede ser regulada por el E₂ (Sharma y Thakur 2006). De hecho, se ha demostrado que algunos ERs pueden translocarse a diferentes sitios subcelulares ante el estímulo del E₂. Por ejemplo, el E₂ induce la translocación de ER α a la membrana celular (Song et al. 2004) y tanto ER α como ER β se localizan en

las mitocondrias de células MCF-7 de manera E₂-dependiente (Chen y Yager 2004).

El nivel de expresión de los ERs y su afinidad por el E₂ cambian a lo largo de la vida. Esto puede provocar que la sensibilidad al E₂ disminuya conforme avanza la edad (Yamaguchi-Shima y Yuri 2007). Dado que se ha establecido que los ERs participan en la neuroprotección, existe un gran interés en describir detalladamente los patrones y niveles de expresión de estas proteínas en el cerebro (Thakur y Sharma 2006).

Los estudios acerca de la expresión de los ERs datan desde la década de 1970, cuando se describió su disminución en el cerebro de ratas viejas (Kanungo et al. 1975). A partir de entonces se han realizado muchas investigaciones enfocadas al estudio de los cambios de expresión de los ERs a lo largo del envejecimiento. De manera general se puede decir que durante el envejecimiento en el cerebro de los roedores hay alteraciones en la expresión de los ERs, tanto a nivel del mRNA como de la proteína (Funabashi et al. 2000, Adams et al. 2002, Wilson et al. 2002, Adams y Morrison 2003, Chakraborty et al. 2003a, Chakraborty et al. 2003b, Mehra et al. 2005, Sharma y Thakur 2006). Estos cambios se pueden asociar a la disfunción de ciertas áreas del cerebro involucradas en la memoria y la cognición (García-Segura y Balthazart 2009). Los trabajos en los que se analizan estos cambios muestran resultados muy diversos que dependen del modelo, los núcleos cerebrales y el tipo de molécula (mRNA o proteína) en los que se estudien.

Entre el hipocampo (CA1) de ratas de ~4 (jóvenes) y ~23 meses (viejas) se demostró que hay una reducción del 50% de espinas dendríticas ER α -positivas en las ratas viejas (Adams et al. 2002). En las áreas CA1 y CA3 del hipocampo se comprobó que el número de células ER α - y ER β -positivas disminuye de los 10 a los ~24 meses y que en el hipocampo total la expresión de ambos ERs disminuye entre ratas de 10 y ~24 meses (Mehra et al. 2005).

En la corteza cerebral total de ratones de 6 y 16 meses se demostró que la expresión de ER β disminuye significativamente con la edad, pero la expresión de ER α se mantiene esencialmente igual (Sharma y Thakur 2006).

En contraste con lo anterior, en la corteza (isocortex; estrato piramidal IV-VI) de ratas de 3, 11 y 19 meses se encontró que los niveles de mRNA de ER β no cambian con la edad (Wilson et al. 2002).

Por último, en el hipotálamo de ratas de ~4, ~12 y ~26 meses, se encontró que el número de células ER β -positivas disminuye, y el número de células ER α -positivas aumenta en el núcleo paraventricular anteroventral (AVPV). En el núcleo principal de la *stria terminalis* (pBST), el número de células ER β -inmunoreactivas se mantiene igual (Chakraborty et al. 2003a, Chakraborty et al. 2003b). Otros investigadores demostraron que en el núcleo preóptico periventricular (POA) el mRNA de ER α disminuye en ratas viejas (~24 meses) en comparación con ratas adultas (~12 meses) y jóvenes (~4 meses). En el mismo estudio se comprobó que el mRNA de ER β disminuye en el núcleo supraóptico (SON) de ratas adultas (~12 meses) y viejas (~26 meses) al compararlo con el de ratas jóvenes (~4 meses) (Wilson et al. 2002).

Como se puede ver, la información sobre los cambios en la expresión de los ERs durante el envejecimiento se limita a describir, cualitativa o cuantitativamente, la expresión “global” de los ERs, es decir, no existe información acerca de cómo cambian los niveles y patrones de expresión de los receptores a estrógenos mitocondriales (mtERs), que podrían participar directamente en la respuesta de la mitocondria al E₂. En la sección 2.4 de este trabajo se describe la evidencia que existe sobre los efectos del E₂ sobre la mitocondria y la posible participación de los mtERs en estos efectos.

2.3 ISOFORMAS DE ERs EN EL CEREBRO DE LA RATA

Los dos subtipos de ERs descritos tienen una distribución tisular particular. La función de estos receptores también es diferencial: a ER α se le ha atribuido un papel más enfocado a la reproducción (e.g., proliferación de los tejidos uterinos), mientras que a ER β se le atribuyen más funciones asociadas al sistema nervioso central (e.g., ansiolítico) (Weiser et al. 2008).

ER β se encuentra ampliamente expresado en el cerebro de la rata (Gustafsson 1999, Chung et al. 2007). Aunque ER α y ER β son muy similares estructuralmente en el dominio de unión al DNA (DBD, 96% de identidad),

sus diferentes afinidades por el ligando (56%) los hacen tener respuestas muy variadas ante el E₂ (Weiser et al. 2008).

La gran variedad de efectos del E₂ también depende de la expresión de isoformas que resultan de la edición alternativa del pre-mRNA de ER α y ER β . La expresión diferencial y localización subcelular de estas isoformas es muy importante en la respuesta al E₂ dado que cada isoforma tiene diferente estructura, patrón de translocación, actividad transcripcional y afinidad por el E₂ (Petersen et al. 1998, Chung et al. 2007, Irwin et al. 2008, Weiser et al. 2008, Ishii et al. 2010).

Las isoformas de ER β son particularmente interesantes en la señalización por E₂ en el cerebro, dado que es el subtipo que más se expresa en este tejido. Hasta la fecha se han descrito 5 isoformas de ER β en el cerebro de la rata: ER β_1 , ER β_2 , ER $\beta_1\delta_3$, ER $\beta_1\delta_4$ y ER $\beta_2\delta_3$ (Weiser et al. 2008, Ishii et al. 2010). Los cDNAs de ER β_2 y ER $\beta_2\delta_3$ tienen una inserción de 54 pb entre los exones 5 y 6 que se traduce en 18 aminoácidos extras en el dominio de unión al ligando (LBD) (Maruyama et al. 1998). ER $\beta_1\delta_3$ y ER $\beta_2\delta_3$ presentan una ablación de 39 aminoácidos en el exón 3 que corresponde al extremo carboxilo del DBD. ER $\beta_1\delta_4$ no tiene el exón 4 que es parte del LBD y contiene la secuencia de localización nuclear (NLS), por lo que esta isoforma no se une al E₂ y se localiza en el citoplasma (Price et al. 2000).

El mRNA para la isoforma ER β_1 es el más abundante de las cinco isoformas en el cerebro de rata. En general, los mRNAs de las isoformas β_2 se expresan menos que las β_1 . Sin embargo, el nivel de expresión de las isoformas también es dependiente del tejido y el modelo de estudio, e.g., la isoforma ER $\beta_1\delta_4$ es muy abundante en el hipocampo de la rata, donde las otras isoformas se expresan poco (Price et al. 2000, Weiser et al. 2008).

2.4 EFECTOS ESTROGÉNICOS SOBRE LA MITOCONDRIA

Las mitocondrias son organelos que participan en los procesos de envejecimiento y neurodegeneración (Razmara et al. 2007) y pueden ser consideradas como blancos importantes en la neuroprotección dependiente de hormonas. La preservación de la función mitocondrial es un aspecto importante en la neuroprotección dependiente de hormonas y se ha

propuesto que la respuesta de la mitocondria al E₂ podría estar directamente regulada por mtERs y no necesariamente implicar un mecanismo de transcripción nuclear (Borras et al. 2010).

Varios grupos de investigación han reportado que algunos efectos del E₂ convergen en diferentes puntos de la función mitocondrial, e.g., la expresión de Bcl-2 y la capacidad de secuestrar calcio (Harms et al. 2001, Nilsen y Diaz Brinton 2003), la eficiencia respiratoria (Jones y Brewer 2009) y la capacidad antioxidante (Borras et al. 2010). Desde entonces, el efecto directo de las hormonas esteroides sobre estos diferentes aspectos de la función mitocondrial se ha estudiado más a fondo (Jones y Brewer 2009). Por ejemplo, se sabe que en neuronas corticales e hipocampales algunas rutas de transducción de señales activadas por estrógenos inciden directamente en la mitocondria promoviendo la fosforilación oxidativa y la síntesis de ATP (Brinton 2008). Además, recientemente se comprobó que el E₂ es protector en mitocondrias aisladas, libres de componentes citoplasmáticos, y que esta protección es dependiente de la dosis, lo que sugiere que el E₂ actúa a través de mtERs (Borras et al. 2010).

Diversos estudios indican que tanto la actividad de la COX como la expresión del mRNA de sus subunidades I, II y III son reguladas positivamente por el E₂ (Bettini y Maggi 1992, Hsieh et al. 2006a, Yager y Chen 2007). Además, en estudios *in vivo* se ha demostrado que la progesterona (P₄) y el E₂ incrementan la capacidad oxidativa de las mitocondrias de cerebro al promover la actividad de COX, inducir la expresión de la subunidad α del complejo V (F₀F₁-ATPasa, F₀F₁-ATP sintasa o ATP sintasa), reducir la producción de peróxidos y regular los niveles de antioxidantes en la célula (Nilsen et al. 2007, Irwin et al. 2008, Shi y Xu 2008).

Los efectos del E₂ y la P₄ sobre la ATP sintasa son particularmente interesantes dado que esta enzima es la fuente principal de energía de la célula y también tiene la capacidad de hidrolizar ATP, regulando el balance energético general (Oster y Wang 1999, 2000). De acuerdo con lo anterior, se ha demostrado que el E₂ inhibe la actividad de hidrólisis de ATP de la F₀F₁-ATPasa (Zheng y Ramírez 1999b).

Los efectos del E₂ sobre la ATP sintasa son importantes porque afectan directamente el metabolismo energético de la célula y pueden ser

parcialmente explicados por la unión de hormonas a la proteína que confiere sensibilidad a la oligomicina (OSCP). Esta pequeña proteína es parte de la ATP sintasa y se requiere para que el gradiente de protones y la síntesis de ATP estén perfectamente acoplados (Zheng y Ramírez 1999a). La unión del E_2 a la OSCP podría participar en la inhibición de la actividad de ATPasa de la F_0F_1 -ATPasa y ayudar a mantener las concentraciones de ATP en la célula.

Por otra parte, la función mitocondrial no sólo se define por la composición enzimática, sino que también depende de la estructura supramolecular de la cadena respiratoria mitocondrial (MRC) en supercomplejos llamados respirosomas. En este contexto, se ha sugerido que la eficiencia respiratoria de las mitocondrias se ve favorecida cuando se forman estos complejos multienzimáticos (D'Aurelio et al. 2006).

Por otro lado, el estado monomérico, dimérico u oligomérico de la ATP sintasa participa directamente en la estructura de las crestas mitocondriales y en la eficiencia respiratoria (Seelert et al. 2009, Wagner et al. 2009).

Los estrógenos también tienen efectos positivos sobre la ultraestructura mitocondrial, e.g., se ha comprobado que el E_2 favorece la formación de crestas bien definidas; el aumento del número de mitocondrias por célula; la preservación de las membranas internas (MIM) y las membranas externas (MEM) mitocondriales; la preservación del área de la matriz mitocondrial y la actividad de la MRC (complejos I y IV) (Chen et al. 2005).

Estos antecedentes hacen evidente que existe una relación entre la arquitectura mitocondrial y la eficiencia respiratoria. Sin embargo, aunque se ha sugerido en algunos trabajos (Chen et al. 2005), no se ha comprobado si esta relación es mediada por mtERs.

2.5 RECEPTORES A ESTRÓGENOS MITOCONDRIALES

Varios reportes indican que la disminución de la eficiencia mitocondrial observada en individuos viejos (Sas et al. 2007) puede prevenirse con E_2 (Nilsen y Brinton 2004, Duckles et al. 2006, Simpkins y Dykens 2008). Por lo anterior resulta de gran importancia estudiar la expresión de los mtERs en tejido nervioso de individuos de diferentes edades.

Aunque ambos ERs regulan los efectos del E₂, sus diferencias estructurales les confieren actividades biológicas diferentes (Gustafsson 1999). Además, se ha demostrado que los ERs tienen diferente localización subcelular, i.e., ER β , a diferencia de ER α , es una proteína principalmente extranuclear (e.g., mitocondrial) (Yang et al. 2004, Yang et al. 2009) por lo que se ha sugerido que puede tener funciones más allá de la activación de la transcripción nuclear.

Específicamente, ER β se ha detectado en las mitocondrias de diferentes tipos celulares (Yang et al. 2004, Chen et al. 2004a, Herrick et al. 2006) y se ha encontrado que el subtipo humano de ER β (hER β) tiene una secuencia interna (aminoácidos 220-270) que podría funcionar como una señal interna de localización mitocondrial (Chen et al. 2004a). Es por esto que los estudios sobre los efectos estrogénicos en la mitocondria mediados por ERs se han enfocado más en ER β que en ER α .

Se ha sugerido que ER β puede funcionar como un componente estructural de la mitocondria, con la capacidad de modular la transcripción de genes codificados en el mtDNA y modificar el potencial de membrana mitocondrial (Chen et al. 2005, Yang et al. 2009).

Hasta la fecha, existen muchos datos experimentales que ubican tanto a ER α como a ER β en la mitocondria y que sugieren la participación de ER β en la conservación de la estructura mitocondrial. Sin embargo, aún no existen pruebas de los mecanismos por los cuales los ERs son transportados a este organelo.

Uno de los mecanismos mejor descritos para la importación de proteínas hacia la mitocondria es en el que las pre-proteínas citoplasmáticas son reconocidas mediante una pre-secuencia en el NH-terminal. Estas pre-secuencias son péptidos (10-80 aminoácidos con la capacidad de formar hélices anfipáticas) que funcionan como señales de importación (mTPS); también se les llama "señales de importación a la matriz" (MTS) porque, en ausencia de otras señales de importación (e.g., señales para el ensamblaje en la MIM) pueden dirigir a las pre-proteínas hacia la matriz mitocondrial (Neupert y Herrmann 2007).

En general, las mTPSs son reconocidas por los receptores de las translocasas de la MEM (complejos TOM) que participan en la translocación de las proteínas a través de la MEM y hacia el espacio intermembranal (IMS). El ensamblaje de las proteínas dentro de la mitocondria es facilitado por dos translocasas de la MIM: TIM22 y TIM23.

TIM23 participa en el transporte de todos los precursores que se localizan en la matriz mitocondrial y también en la relocalización de muchas pre-proteínas del IMS y la MIM. Los receptores de TIM23 reconocen pre-proteínas con mTPSs (Ahmed y Fisher 2009).

TIM22 participa en la translocación de pre-proteínas con señales de localización internas y las dirige hacia la MIM para su ensamblaje como proteínas transmembranales (Lithgow 2000, Baker et al. 2007, Neupert y Herrmann 2007, Ahmed y Fisher 2009).

Sin embargo, este esquema clásico de importación no explica la translocación de muchas otras proteínas mitocondriales. Aproximadamente 30% de las proteínas que se localizan en la mitocondria no contienen señales clásicas para su transporte hacia la mitocondria (Diekert et al. 1999, Mokranjac y Neupert 2009). Para este tipo de proteínas se han propuesto mecanismos alternativos o combinados de localización mitocondrial. Por ejemplo, se ha demostrado que las chaperonas Heat-shock protein-70 y -90 (HSP70 y HSP90) pueden formar complejos citoplasmáticos con pre-proteínas que después se unen a la subunidad Tom70 del complejo TOM, formando un supercomplejo proteínico (chaperonas/TOM) que participa en la translocación de las pre-proteínas hacia la mitocondria (Young et al. 2003, Li et al. 2009) y otros compartimentos subcelulares (Ngosuwan et al. 2003).

Otros mecanismos alternativos o complementarios de translocación incluyen a las modificaciones post-traduccionales (e.g., fosforilación y miristoilación), que marcan a las pre-proteínas para su relocalización subcelular (Zha et al. 2000); y a la importación co-traducciona (Ahmed et al. 2006, Ahmed y Fisher 2009). En este último mecanismo, el mRNA traduccionalmente activo debe aproximarse a la MEM e interactuar con factores citoplasmáticos como el complejo asociado al polipéptido naciente (NAC). En la importación co-traducciona también son importantes los llamados "códigos postales" en el mRNA, que son secuencias en el extremo

3'-UTR del mRNA que forman estructuras tipo horquilla (Ahmed y Fisher 2009).

A pesar de que los mecanismos de importación mitocondrial se han estudiado por más de tres décadas, no existe una regla general para todas las proteínas que deben integrarse a la mitocondria y nuevos mecanismos se siguen descubriendo hasta la fecha.

3. JUSTIFICACIÓN

Una característica importante del envejecimiento del cerebro es que en muchos casos la función y morfología mitocondrial en las neuronas disminuye con la edad. Esta disfunción se debe en parte a la disminución de la actividad de los complejos I y IV respiratorios, la disipación del potencial de membrana mitocondrial, la disminución de la síntesis de ATP y a alteraciones en la cadena de transporte de electrones (Navarro y Boveris 2004, Boveris y Navarro 2008).

Se ha reportado que el E₂ puede prevenir algunos de los cambios estructurales, funcionales y neuroquímicos que el cerebro sufre durante el envejecimiento (Thakur y Sharma 2006). Además de las vías clásicas activadas por E₂ (e.g., MAPK, PI3K), esta hormona puede mejorar la función mitocondrial y, por lo tanto, actuar como un factor neuroprotector en el cerebro (Brinton 2008).

La mayoría de los efectos benéficos del E₂ son mediados por los ERs (ER α y ER β), cuya expresión también se modifica durante el envejecimiento. Sin embargo, los estudios en los que se cuantifica la expresión de los ERs arrojan resultados diferentes: en algunos casos se reportan aumentos (Chakraborty et al. 2003a), en otros decrementos (Mehra et al. 2005) y en otros estudios no se detectan cambios (Chakraborty et al. 2003b) en la expresión de estos receptores.

Por otra parte, la reciente localización mitocondrial de ambos ERs ha llevado a varios grupos de investigación a buscar vías de señalización estrogénica dentro de la mitocondria, para explicar los efectos del E₂ a nivel mitocondrial. Existen reportes en los que se demuestra que los mtERs participan en la transcripción de genes mitocondriales (Chen et al. 2005) y otros trabajos en los que se sugiere que los efectos antioxidantes del E₂ podrían estar mediados por mtERs (Borras et al. 2010). Sin embargo, la participación directa y la función de los mtERs en el cerebro aún no se esclarecen.

Hasta la fecha, la mayoría de los estudios sobre la expresión y localización subcelular de los ERs se han llevado a cabo en modelos *in vitro* y sólo existe un trabajo previo en el que se explora la localización subcelular de

ER β en tejido cerebral *in vivo* (Milner et al. 2005). Además de su localización subcelular, es importante determinar si la acumulación de los mtERs se modifica con el envejecimiento, lo que podría afectar la capacidad de respuesta al E₂ en individuos de edad avanzada. Los resultados de este estudio serán los primeros en aportar información sobre los niveles de acumulación y el patrón de localización de los ERs en la mitocondria de animales de diferentes edades.

Los antecedentes sugieren que podría existir una relación entre el envejecimiento en el cerebro y 1) la localización de ERs en la mitocondria; 2) el nivel de acumulación de los mtERs y 3) la capacidad de estos receptores mitocondriales de regular la señalización estrogénica. En este estudio, se determinará la existencia de interacciones entre los ERs y proteínas mitocondriales, lo que representa una primera aproximación a la funcionalidad de estos receptores dentro de la mitocondria.

4. HIPÓTESIS

El envejecimiento del cerebro se ha asociado a la disfunción mitocondrial, así como a alteraciones en el nivel total de expresión de los ERs. La disfunción mitocondrial puede prevenirse con el E₂ a través de mecanismos mediados por los ERs y algunos aspectos de la función mitocondrial son regulados directamente por los mtERs. Dado que la función mitocondrial y el contenido total de los ERs se modifican con la edad, se espera que el nivel de expresión y la funcionalidad de los mtERs también cambien durante el envejecimiento.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar el tipo de variantes, el nivel de expresión e interacciones proteínicas de los mtERs en el cerebro de la rata durante el envejecimiento.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

5.2.1 En un modelo fisiológico de envejecimiento del cerebro (corteza, hipocampo e hipotálamo) con ratas hembras de 3 y 18 meses de edad:

- Estudiar la localización subcelular (mitocondria y citoplasma) de ER α y ER β .
- Cuantificar los niveles de acumulación de las proteínas mtER α y mtER β .
- Analizar la expresión de variantes de mtER α y mtER β .
- Comparar los niveles de expresión de las variantes de mtER α y mtER β .

5.2.2 En un modelo fisiológico de envejecimiento (cerebro completo y mitocondrias de cerebro completo) con ratas hembras de 3, 5 y 18 meses de edad:

- Demostrar las interacciones entre los ERs totales y la ATP sintasa mitocondrial y/o las interacciones entre los mtERs y la ATP sintasa mitocondrial.
- Comparar las interacciones ERs-ATP sintasa y mtERs-ATP sintasa en las diferentes edades.

5.2.3 En el modelo fisiológico de envejecimiento y en un modelo farmacológico (ratas de 3 meses OVX y OVX-tratadas con E₂; ratas de 18 meses OVX desde los 3 meses de edad):

- Demostrar el efecto del E₂ en las interacciones ERs-ATP sintasa.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 ANIMALES

Para el modelo fisiológico de envejecimiento se utilizaron ratas hembra Wistar de dos edades: adultas jóvenes (3-4 meses) y adultas viejas (16-18 meses). Para el modelo farmacológico en individuos jóvenes se utilizaron ratas ovariectomizadas bilateralmente (OVX) a los 3 meses de edad a las que se les administró E₂ (30 µg/Kg) vía subcutánea, 2 semanas post-ovariectomía y 24 horas antes de ser sacrificadas. Para el modelo farmacológico en animales viejos, se utilizaron ratas de 18 meses (OVX a los 3 meses de edad). Las ratas jóvenes fueron sacrificadas en la etapa de diestro 1 (D1) después de haber presentado al menos 4 ciclos regulares de 4 días (el ciclo estral se monitoreó mediante el análisis de los frotis vaginales tomados diariamente). Las ratas viejas presentaron irregularidades en el ciclo, i.e., citología vaginal típica de la etapa del diestro, por mínimo 10 días consecutivos y fueron sacrificadas en dicha etapa. Las ratas OVX jóvenes se sacrificaron 24 horas después del tratamiento con E₂ y las ratas OVX viejas se sacrificaron a los 18 meses de edad (15 meses post-ovariectomía).

Para todos los modelos, las ratas jóvenes se mantuvieron en grupos de cinco ratas por caja, mientras que las viejas se alojaron en grupos de dos ratas por caja. Todas las ratas se mantuvieron con agua y alimento *ad libitum* con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. Para el sacrificio, todos los animales fueron anestesiados profundamente con éter y decapitados rápidamente. Inmediatamente después se disecaron los tejidos de interés sobre una cama de hielo.

6.2 FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR.

Todos los pasos del fraccionamiento subcelular y centrifugaciones se efectuaron a 4°C, siguiendo un protocolo modificado para el aislamiento de mitocondrias de cerebro (Bosetti et al. 2002). El hipocampo, la corteza y el hipotálamo de 3-4 ratas se procesaron juntos. El tejido se homogenizó en 1 ml de amortiguador de aislamiento para mitocondrias (manitol 210 mM, sacarosa 70 mM, EDTA 1 mM, HEPES 10 mM, 0.5 mg/ml de albúmina deslipidada e inhibidores de proteasas de Roche; pH 7.5) en un

homogenizador Kontes (pistilo 22) con 20 pases lentos. El homogenizado se centrifugó a 1000 g por 10 min. El sobrenadante se desechó y la pastilla se volvió a resuspender en 1 ml de amortiguador de aislamiento mediante 10 pases lentos en el homogenizador. La suspensión se volvió a centrifugar a 1000 g por 10 min. El sobrenadante se descartó y la pastilla se resuspendió con micropipeta en 1 ml de amortiguador de aislamiento. El homogenizado se centrifugó una última vez a 1000 g por 10 min. El sobrenadante se centrifugó a 15,000 g por 32 min para obtener la fracción mitocondrial (pastilla) y la fracción citosólica (sobrenadante). La pastilla mitocondrial se lavó en amortiguador de lavado para mitocondrias (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, sacarosa 250 mM e inhibidores de proteasas de Roche; pH 7.5) mediante resuspensión con micropipeta. La suspensión se centrifugó a 15,000 g por 32 min. La pastilla mitocondrial se resuspendió en 150-200 μ l de amortiguador de lavado. Ambas fracciones se guardaron a -70°C para su análisis posterior.

6.3 CO-INMUNOPRECIPITACIÓN (CoIP) DE PROTEÍNAS

Todos los pasos y centrifugaciones de la CoIP se realizaron a 4°C . Todos los anticuerpos y la proteína A/G-Agarosa utilizados en la CoIP fueron de la marca Santa Cruz. Se utilizaron ratas en diestro de 3, 5 y 18 meses de edad; ratas OVX de 3 y 18 meses y ratas OVX de 3 meses tratadas con 30 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de E_2 . El cerebro completo (sin cerebelo) se procesó en 2 ml de amortiguador de precipitación NP-40 (Tris HCl 50 mM, NaCl 150 mM, NP-40 1% v/v, inhibidores de proteasas de Roche) o RIPA (PBS IX, NP-40 1% v/v, desoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1%, inhibidores de proteasas de Roche) en un homogenizador de vidrio (Kontes) y posteriormente con una jeringa 21G. Se consideraron controles de expresión de $\text{ER}\alpha$ y $\text{ER}\beta$ (útero, ovario y cerebro completos homogenizados en un Polytron con 1 ml de amortiguador NP-40 o RIPA). Adicionalmente, se aislaron las mitocondrias de cerebro completo de ratas de 3 y 18 meses de edad como se indica en la sección 6.2. La proteína de cerebro completo se obtuvo por centrifugación a 12,500 rpm por 15 min a 4°C . Se disolvieron 0.5-1 mg de proteína total o mitocondrial de cerebro en RIPA, se agregaron 2 μg de anticuerpo anti- $\text{F}_1\text{-ATP}$ sintasa (A-8), anti- $\text{ER}\beta$ (1531) o anti- $\text{ER}\alpha$ (MC-20) y las muestras se dejaron agitando a

4°C por 2 h. En este punto se consideraron controles negativos de ColP (0.5-1 mg de proteína sin los anticuerpos correspondientes). Posteriormente, se agregaron 20 µl de Proteína A/G-Agarosa-PLUS a todas las muestras y se dejaron toda la noche en agitación a 4°C. Las muestras se centrifugaron a 1000 g por 2-5 min y se retiró el sobrenadante. La pastilla se lavó 4 veces con 500 µl de RIPA y los inmunocomplejos se desnaturalizaron en 40 µl de amortiguador Laemmli 2x (SDS 4%, azul de bromofenol 0.2%, β-mercaptoetanol 10%, glicerol 20% y Tris HCl 150 mM; pH 6.8). Las muestras se conservaron a -20°C hasta su análisis por Western blot.

6.4 WESTERN BLOT

Para los experimentos de expresión con inmunoprecipitados, se cargaron 10-20 µl de inmunocomplejos de cada grupo y 10-20 µg de los controles de expresión (útero, ovario, cerebro). Para las muestras de fraccionamiento subcelular se cargaron 10 µg de las fracciones mitocondrial (MIT) y citosólica (CIT) y 10 µg de los controles de expresión (útero, ovario, corteza cerebral, hipocampo o hipotálamo de rata en diestro). Las proteínas y los inmunocomplejos se transfirieron con una cámara de transferencia semi-húmeda (BioRad) a una membrana de PVDF (Millipore); las membranas se bloquearon por 30 min con leche 10% w/v en TBS-Tween 0.1% v/v y el Western blot se realizó con los anticuerpos de Santa Cruz anti-ER α (MC-20; 0.8 µg/ml), anti-ER β (1531; 0.4 µg/ml), anti-F₁-ATP sintasa (A-8; 0.2 µg/ml), cabra anti-ratón IgG-HRP (sc-2005; 0.05 µg/ml) y cabra anti-conejo IgG-HRP (sc-2004; 0.04 µg/ml). Los anticuerpos anti-mHSP70 (Affinity BioReagents. MA3-028; 2.32 µg/ml) y anti-NeuN (Millipore. MAB-377; 5 µg/ml) se utilizaron como marcadores mitocondriales y nucleares, respectivamente. Las bandas de expresión se visualizaron con un sistema ECL quimioluminiscente (Millipore). El análisis de la intensidad de bandas se hizo con el programa para densitometría Kodak ID 3.6.1.

6.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los valores de intensidad de banda se expresaron como el promedio \pm el error estándar. Las diferencias estadísticamente significativas entre grupos

se analizaron utilizando las pruebas *t* de Student no pareada y ANOVA de una vía con análisis *post hoc* de Tukey. Los análisis se realizaron en el programa Prism 4.0 (GraphPad).

7. RESULTADOS

7.1 ER α Y ER β SE DETECTARON COMO VARIANTES CON UNA DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR ESPECÍFICA EN EL HIPOCAMPO, LA CORTEZA Y EL HIPOTÁLAMO DE RATAS DE 3 Y 18 MESES

La expresión de las proteínas ER α y ER β se analizó en las fracciones mitocondriales y citosólicas del hipocampo, la corteza y el hipotálamo de ratas de 3 y 18 meses para comparar los patrones de expresión de proteína y detectar los posibles cambios asociados con la edad. Las áreas cerebrales fueron elegidas con base en sus alteraciones asociadas al envejecimiento reportadas previamente (Wilson et al. 2002, Chakraborty et al. 2003b, Boveris y Navarro 2008).

En la fracción mitocondrial de todas las áreas cerebrales, ER α se detectó como dos variantes de 55 y 61 KDa en los dos grupos de edad (Fig. 2 A-C, paneles superiores, carriles 4-5). ER β se encontró como dos variantes mitocondriales de 52 y 63 KDa en la corteza y el hipotálamo, mientras que en el hipocampo sólo se detectó la variante de 52 KDa (Fig. 2 A-C, paneles centrales, carriles 4-5).

En el mismo modelo se analizaron las variantes citosólicas de ambos ERs. Estas variantes se distribuyen de manera diferente a los mtERs. El ER α citosólico se detectó principalmente como una proteína de ~55 KDa en las tres áreas cerebrales estudiadas. En el citosol del hipocampo, ER β se encontró como una proteína de ~63 KDa, aparentemente menos abundante que la forma mitocondrial de 52 KDa. La variante citosólica de ER β en la corteza y el hipotálamo se detectó a ~63 KDa y aparentemente es más abundante que las variantes mitocondriales (Fig. 2 A-C, paneles superiores y centrales, carriles 6-7).

En la Tabla I se hace una comparación de las masas moleculares entre áreas, edades y subtipos de los ERs detectados en las mitocondrias y el citosol. Como se puede ver, las mismas variantes se expresan entre los dos grupos de edad.

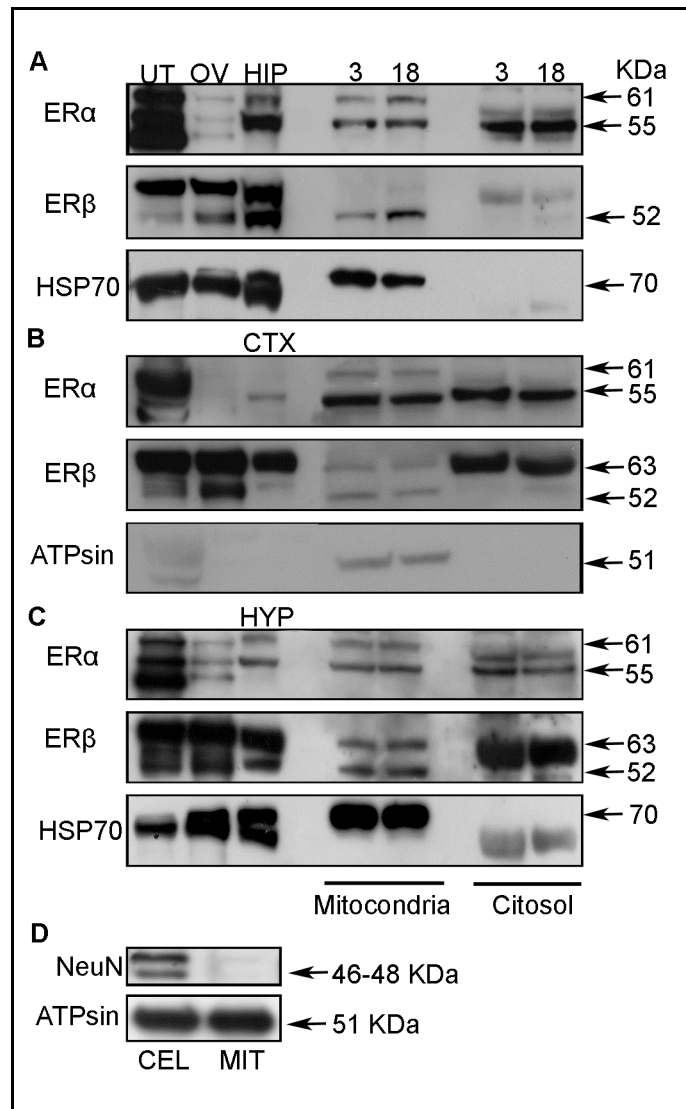


Figura 2. Localización subcelular y patrón de expresión de las variantes de ER α y ER β en el cerebro de rata. Expresión de proteína analizada por Western blot en el hipocampo (A), la corteza (B) y el hipotálamo (C) de ratas jóvenes (3 m) y viejas (18 m). A-C. (todos los paneles): Carriles 1 y 2 son controles positivos de expresión para ER α y ER β , respectivamente. Se cargaron 10 μ g de proteína total de útero (UT) u ovario (OV). El carril 3 es un control positivo para la presencia de ERs en cada área cerebral. Se cargaron 10 μ g de proteína de hipocampo (HIP), corteza (CTX) o hipotálamo (HYP). A-C: Expresión de ER α (panel superior) y ER β (panel central) en las fracciones mitocondrial (carriles 4 y 5) y citosólica (carriles 6 y 7). Para estas fracciones se cargaron 20 μ g de proteína. A-C. (paneles inferiores): Heat-Shock Protein-70 mitocondrial (HSP70) o F₁-ATP sintasa (ATPsin) se utilizaron como marcadores de aislamiento y carga mitocondrial. La edad de las ratas se indica en la parte superior de la figura: 3 = 3 meses, 18 = 18 meses. La masa molecular de los mtERs se indica con flechas. La figura representa el resultado de 4 experimentos independientes. D. Control de aislamiento de mitocondrias de cerebro. Se muestra la ausencia del marcador nuclear (NeuN) en la fracción mitocondrial (MIT) y su presencia en el lisado total de cerebro (CEL).

Todos los controles positivos se tomaron de una rata joven en D1.

Tabla I. Masas moleculares de los ERs

		MITOCONDRIAS		CITOSOL	
EDAD	ÁREA	mtER α (KDa)	mtER β (KDa)	ER α (KDa)	ER β (KDa)
3m	HIP	61 y 55	52	55	63
18m	HIP	61 y 55	52	55	63
3m	CTX	61 y 55	63 y 52	55	63
18m	CTX	61 y 55	63 y 52	55	63
3m	HYP	61 y 55	63 y 52	55	63
18m	HYP	61 y 55	63 y 52	55	63

En la Tabla I se comparan las masas moleculares calculadas de las variantes mitocondriales y citosólicas de ER α y ER β detectadas en diferentes áreas del cerebro de ratas de 3 y 18 meses de edad.

7.2 LAS VARIANTES DE mtER α Y mtER β PRESENTAN UNA DISTRIBUCIÓN ÁREA-ESPECÍFICA Y SU NIVEL DE ACUMULACIÓN EN LA MITOCONDRIA NO CAMBIA DURANTE EL ENVEJECIMIENTO

Los niveles de expresión y la distribución de las dos variantes detectadas para mtER α y mtER β se compararon entre los dos grupos de edad con el fin de evidenciar los cambios relacionados con el envejecimiento. Se encontró que los niveles de acumulación de proteína de las variantes de los mtERs permanecen esencialmente iguales entre los dos grupos de edad, en las tres áreas cerebrales estudiadas (Fig. 2 A-C, paneles superior y central, carriles 4 vs. 5 y Fig. 3 A-D).

Además, se analizó la distribución por área de las variantes de ambos mtERs. Se encontraron diferencias significativas en la expresión de la variante de 55 KDa de mtER α y de la variante de 63 KDa de mtER β , entre áreas cerebrales de ratas de la misma edad (Fig. 3 B y C). La variante de 63 KDa de mtER β es prácticamente indetectable en el hipocampo (Fig. 2 A, panel central y Fig. 3 C).

Para visualizar claramente las diferencias en el nivel de acumulación de los mtERs entre las áreas cerebrales se hizo un análisis de los mtERs totales, sumando la acumulación relativa de las dos variantes de cada subtipo. Este análisis demuestra que mtER α total se localiza a niveles significativamente más altos que mtER β total en el hipocampo y la corteza de ratas de 3 meses y en la corteza de ratas de 18 meses (Fig. 4 A y B). En

cambio, los niveles de acumulación de mtER α y mtER β totales son esencialmente iguales en el hipotálamo de ratas de las dos edades (Fig. 4 C).

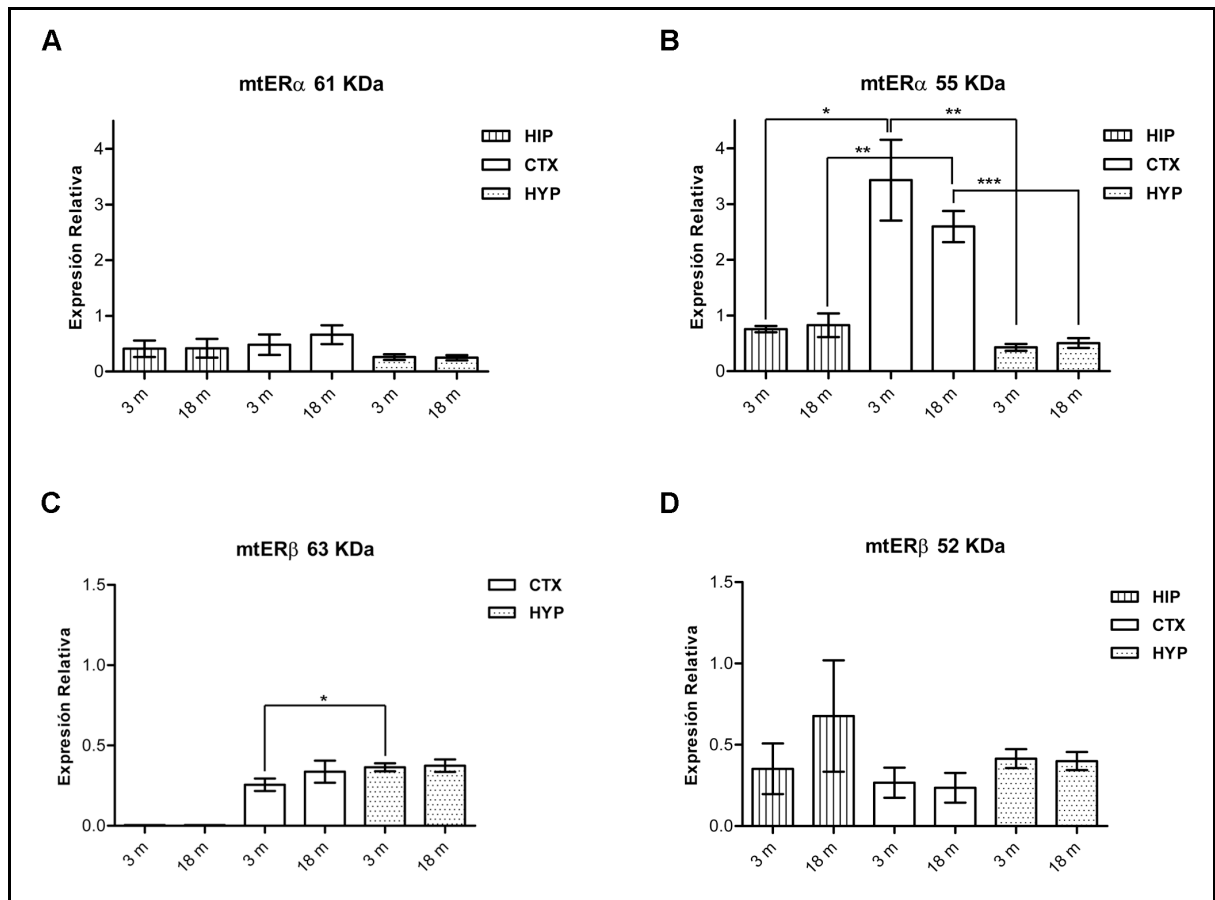


Figura 3. Nivel de acumulación y distribución por área y por edad de las variantes de mtER α y mtER β . Las gráficas representan los resultados del análisis densitométrico de las variantes mitocondriales de ER α y ER β y su nivel de acumulación en el hipocampo (HIP), la corteza (CTX) y el hipotálamo (HYP) de ratas jóvenes y viejas (3 m y 18 m). La expresión relativa (eje Y) de cada variante se calculó como la proporción entre el nivel de acumulación de las variantes de mtERs y su respectivo marcador mitocondrial (HSP70 o ATPsin). Las diferencias significativas entre áreas se indican con asteriscos (* P < 0.05; ** P < 0.005; *** P < 0.0005). Los datos son el promedio de 4 experimentos independientes.

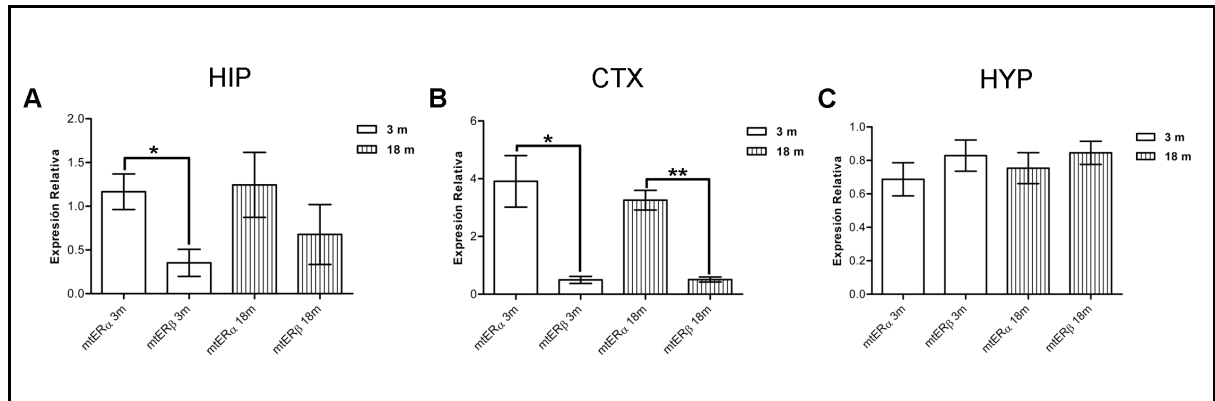


Figura 4. Comparación entre los niveles de acumulación de mtER α y mtER β totales en diferentes áreas cerebrales. Las gráficas representan los resultados de la suma del análisis densitométrico de las dos variantes de cada mtER (mtER α total y mtER β total). En el eje Y se muestra la expresión relativa, calculada como la suma de la acumulación de las variantes entre la expresión de los controles de carga (HSP70 o ATPsin). Las diferencias significativas en el nivel de acumulación entre mtERs se indican con asteriscos (* $P < 0.05$; ** $P < 0.005$). Los datos son el promedio de 4 experimentos independientes.

7.3 ER β Y LA ATP SINTASA FORMAN COMPLEJOS EN EL CEREBRO DE LA RATA DE MANERA E₂-Y EDAD-INDEPENDIENTE

Con el fin de comenzar a explorar las funciones de los mtERs en el cerebro, se diseñaron experimentos de CoIP en los que se analizaron las interacciones de estos receptores con la ATP sintasa. Se eligió comenzar a trabajar con esta enzima dado que su expresión y actividad son reguladas por el E₂ (Nilsen et al. 2007, Irwin et al. 2008). Además, se sabe que una de las proteínas que forman a la ATP sintasa, la OSCP, tiene capacidad de unirse al E₂, por lo que pensamos que esta unión podría darse a través de los mtERs (Zheng y Ramírez 1999a).

Se encontró que ER β , pero no ER α , coprecipita con la ATP sintasa en el cerebro de ratas jóvenes (3 y 5 meses) y viejas (18 meses) intactas (Fig. 5 y Fig. 6 A y B). Además, el complejo ER β -ATP sintasa también se detectó cuando se hicieron los experimentos de CoIP con proteína mitocondrial de cerebro de ratas de 3 y 18 meses. Esto indica que la interacción con la ATP sintasa se localiza específicamente en la mitocondria (Fig. 6 C).

Posteriormente, para investigar si la interacción entre ER β y ATP sintasa depende de la presencia de E₂, se realizó la CoIP en dos modelos farmacológicos: 1) ratas jóvenes OVX y ratas OVX tratadas por 24 h con 30

$\mu\text{g}/\text{Kg}$ de E_2 ; 2) ratas de 18 meses OVX a las 3 meses de edad ($\text{OVX}_{18\text{m}}$). Los resultados muestran que el complejo entre $\text{ER}\beta$ y ATP sintasa está presente tanto en las ratas OVX como en las tratadas con E_2 (Fig. 7 A, panel superior). Los valores de intensidad de banda se analizaron entre las ratas jóvenes OVX y las tratadas con E_2 y se encontró que la cantidad de complejo $\text{ER}\beta$ -ATP sintasa es esencialmente igual entre los dos grupos (valores de intensidad neta de 211 y 222 para OVX y E_2 , respectivamente).

Adicionalmente, el complejo $\text{ER}\beta$ -ATP sintasa también se detectó en el cerebro de ratas OVX de 18 meses (Fig. 7 B, panel superior).

Para corroborar que las interacciones entre $\text{ER}\beta$ - y $\text{mtER}\beta$ -ATP sintasa son específicas, en todos los modelos se realizaron Western blots para la detección de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), una proteína principalmente citoplasmática con escasas probabilidades de interactuar con la ATP sintasa mitocondrial (Figs. 6 B-C y 7 A-B, paneles inferiores). Como se muestra en las figuras 6 y 7, la GAPDH sólo se detecta en los controles positivos de expresión (Figs. 6 B-C y 7 A-B, paneles inferiores, carriles 1-3) y no en complejo con la ATP sintasa.

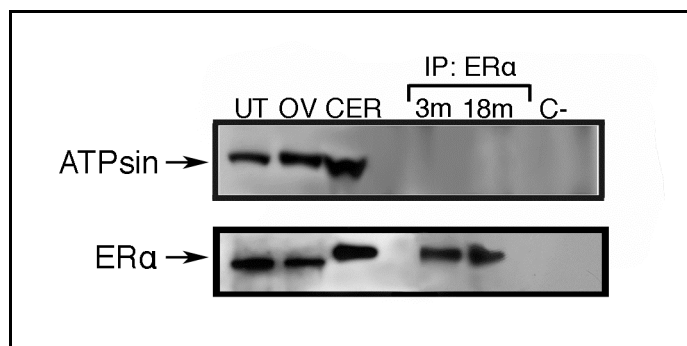


Figura 5. Interacciones entre $\text{ER}\alpha$ y ATP sintasa. Ausencia del complejo $\text{ER}\alpha$ -ATP sintasa en ratas de 3 (3m) y 18 (18m) meses de edad. IP $\text{ER}\alpha$: inmunoprecipitación de $\text{ER}\alpha$ en 500 μg de proteína total de cerebro. C-: control negativo (sin anticuerpo). ATPsin y $\text{ER}\alpha$: detección de la expresión de ATP sintasa y $\text{ER}\alpha$ por Western blot. La imagen es el resultado representativo de tres experimentos independientes.

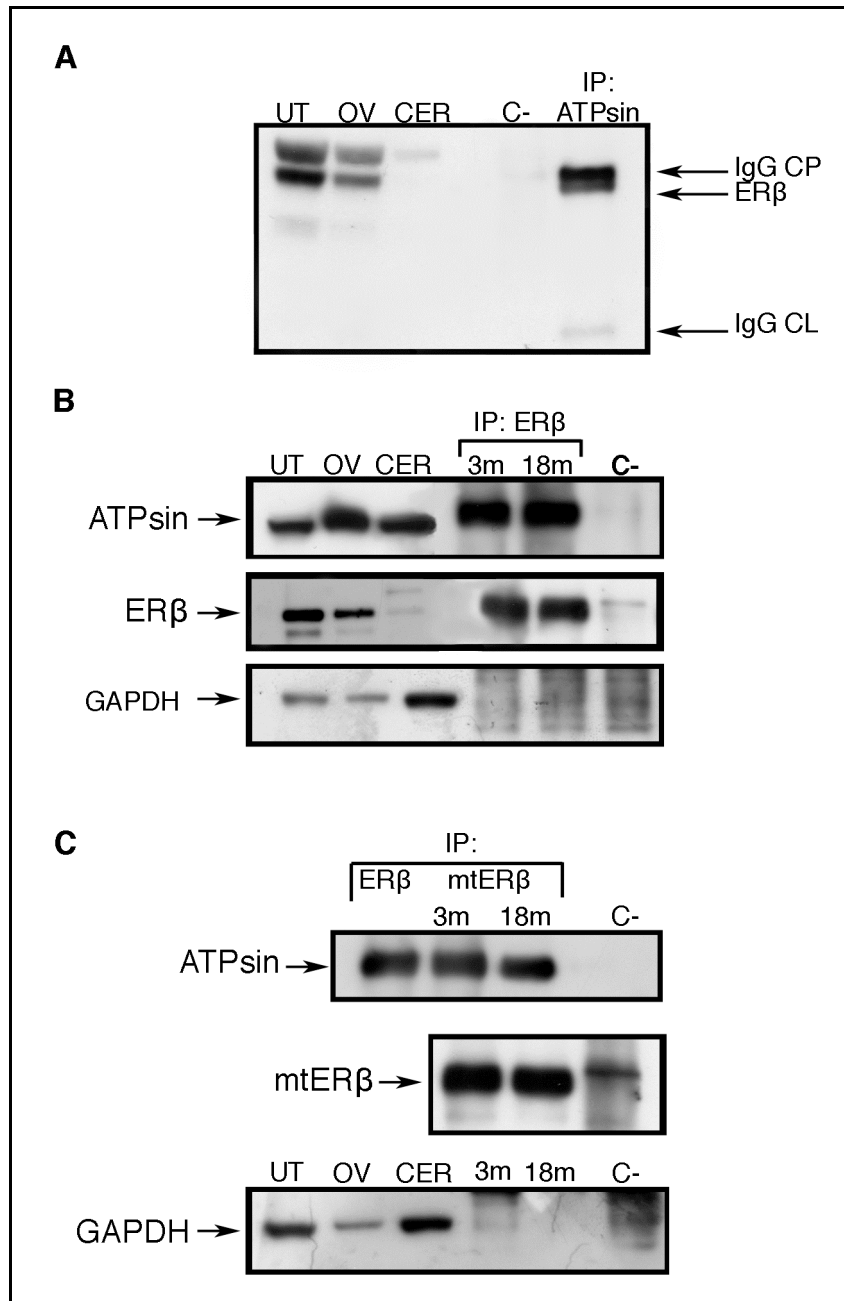


Figura 6. Interacciones entre ERβ y ATP sintasa. Todas las CoIPs se realizaron con 0.5-1 mg de proteína total o mitocondrial de cerebro completo. La figura representa los resultados de al menos tres experimentos independientes. A. Ratas de 5 meses. C-: control negativo (sin proteína). Inmunoprecipitación (IP) ATPsin: IP de ATP sintasa. Se muestran las cadenas pesada (IgG CP) y ligera (IgG CL) del anticuerpo anti-ATPsin. B. IP ERβ: IP de ERβ total. C: Panel superior, carril 1: control positivo de inmunoprecipitación (ERβ). Carriles 2 y 3: IP de mtERβ. A-C. Carriles 1-3. Controles de expresión (UT= útero, OV= ovario, CER= cerebro; 10-20 μg de proteína). ATPsin y ERβ: detección de ATP sintasa y ER por Western blot. B y C: Ratas de 3 (3m) y 18 (18m) meses de edad. Panel superior. ATPsin indica el complejo entre ERβ o mtERβ y ATP sintasa. C-: control negativo (sin anticuerpo). Paneles inferiores. Control de especificidad de la interacción ERβ- y mtERβ-ATPsin. GAPDH: Western blot para detección de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

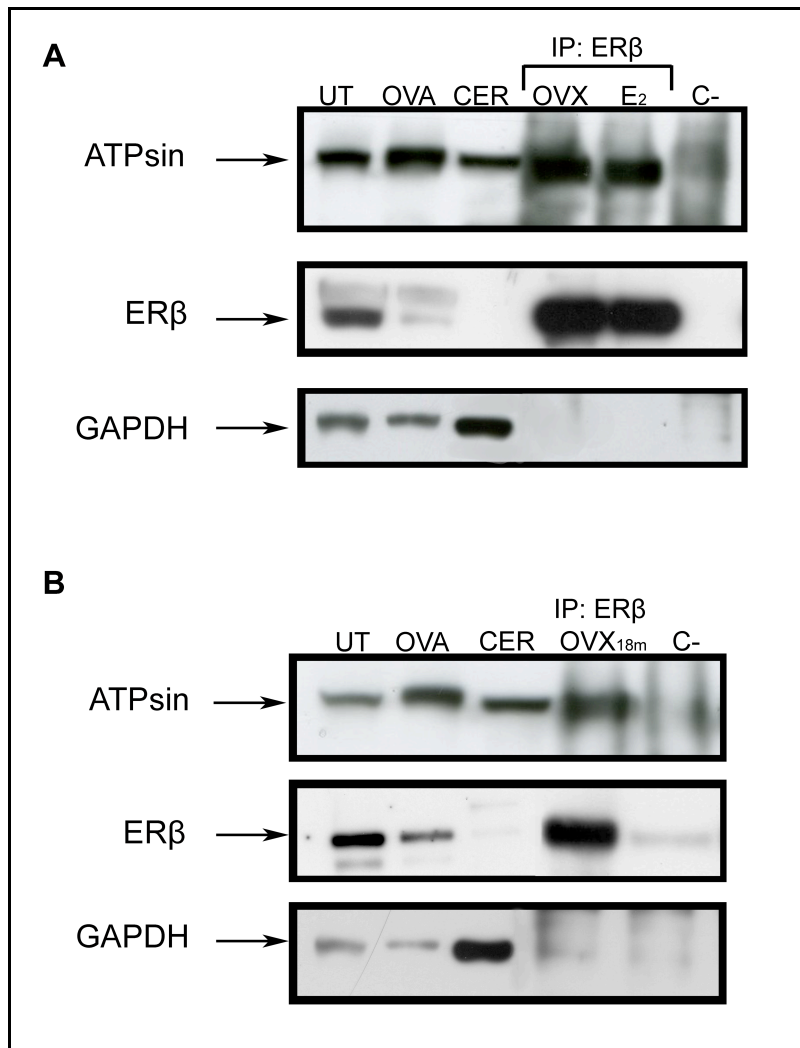


Figura 7. Efecto del E₂ en la formación de complejos entre ERβ y ATP sintasa. La figura representa 3 experimentos independientes de CoIP entre ERβ y ATP-sintasa en lisados de proteína total de cerebro (0.5-1 mg de proteína). A: ratas jóvenes (3 meses) OVX u OVX y tratadas con 30 μg/Kg de E₂. B: ratas viejas (18m = 18 meses de edad) OVX desde los 3 meses de edad. A y B: carriles 1 y 2 son controles de expresión para ERα y ERβ, respectivamente (UT y OVA, 10-20 μg). Carril 3: proteína de cerebro (10-20 μg). C-: control negativo (sin anticuerpo). IP:ERβ: inmunoprecipitación de ERβ y detección de ATP sintasa (ATPsin). Paneles inferiores: control de especificidad de la interacción ERβ-ATPsin. GAPDH: Western blot para detección de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

7.4 ANÁLISIS COMPUTACIONAL PARA LA IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIAS DE LOCALIZACIÓN MITOCONDRIAL Y ANÁLISIS DE LOS PERFILES DE HIDROFOBICIDAD DE ER α Y ER β

Los resultados de este trabajo indican que ER α y ER β se localizan en el citoplasma y las mitocondrias del cerebro. Además, mtER β forma complejos con la ATP sintasa mitocondrial, que es una enzima con una parte transmembranal (F₀) de la MIM y una parte catalítica (F₁) localizada en la matriz mitocondrial. Para comenzar a explorar el mecanismo por el cual los mtERs se translocan a la mitocondria se utilizaron programas de predicción de secuencias de localización mitocondrial y programas para el cálculo de perfiles de hidrofobicidad y probabilidad de formación de α -hélices.

Para ER β de rata (NP036886.1) se encontró una posible pre-secuencia en el NH-terminal (MTFYSPAVMNYSVPGSTSNLDGGPVRL), utilizando el programa MitoProt II-v1.101 (Claros y Vincens 1996). Sin embargo, la probabilidad de exportación hacia la mitocondria es baja (0.1594) cuando se compara con la probabilidad de otras proteínas codificadas en genes nucleares y que se translocan a la mitocondria e.g., Atp5b (NP599191.1) con una probabilidad de exportación de 0.9192 (Tabla II). Sin embargo, con el programa SignalP 3.0 (Bendtsen et al. 2004) no se encontró ninguna posible pre-secuencia en ER β (Tabla II).

Para ER α de rata (NP036821.1) no se encontraron posibles pre-secuencias con ninguno de los dos programas (Tabla II).

Para el cálculo de los perfiles de hidrofobicidad y la predicción de las estructuras secundarias se utilizaron los programas SOSUI (Hirokawa et al. 1998) y TopPred (von Heijne 1992), respectivamente.

Los perfiles de hidrofobicidad ($\langle H \rangle$) en TopPred se basan en la escala de hidrofobicidad de Goldman-Engelman-Steitz (GES). Esta escala considera a los segmentos con $\langle H \rangle \geq 1.5$ como “muy hidrofóbicos” y a los segmentos con $\langle H \rangle \leq 0.7$ como “muy hidrofílicos”. La escala GES considera el rango de $0.8 \leq \langle H \rangle \leq 1.4$. como una “hidrofobicidad intermedia”, ya que en este intervalo se encuentran los picos de hidrofobicidad tanto de proteínas solubles como intermembranales (Gavel y von Heijne 1992).

La hidrofobicidad promedio calculada con el programa SOSUI se basa en el “Índice de Hidropatía de Kyte y Doolittle”, en el que se considera a los aminoácidos o regiones con valores positivos como hidrofóbicos y a los negativos como hidrofílicos (Kyte y Doolittle 1982).

El análisis *in silico* de las secuencias de aminoácidos de ER α y ER β muestra que ambas son proteínas con una hidrofobicidad promedio baja ($\langle H \rangle \leq 0.7$) (Tabla II) y que no tienen altas probabilidades de formar hélices transmembranales (Fig. 8). Los datos de hidrofobicidad y probabilidad de formación de hélices de ER α y ER β se compararon con los de la proteína Atp6, una proteína que forma parte de la porción transmembranal (F₀) de la ATP sintasa. Atp6 presenta una hidrofobicidad promedio alta ($\langle H \rangle \geq 1.5$) y 5 hélices transmembranales (Fig. 8).

Este análisis *in silico* en conjunto sugiere que tanto ER α como ER β son proteínas solubles, sin probabilidades de formar estructuras hidrofóbicas que pudieran insertarse en las membranas mitocondriales.

Tabla II. Comparación de las predicciones estructurales para los ERs y subunidades de la ATP sintasa

PROGRAMA	PREDICCIÓN	PROTEÍNA		
		ER α	ER β	Atp5b
MitoProt	Pre-secuencia	NP	MTFYSPAVMNYSVP GSTSNLDGGPVRL	MLSLVGRVASASASGALR GLNPLAAPQAHLRLRTAPA GVHPARDY
	Sitio de corte	NP	28	47
	Probabilidad de exportación	0.042	0.159	0.919
SignalP	Probabilidad de péptido señal	0.064	0.002	0.911
				Atp6
SOSUI	Hidrofobicidad ^a	-0.362	-0.242	0.969
TopPred	No. de hélices ^b	1	0	5

En la Tabla II se muestran las probabilidades de la presencia de pre-secuencias, sitios de corte y péptidos-señales, así como la probabilidad de exportación hacia la mitocondria, calculadas con los programas MitoProt II-v1.101 y SignalP 3.0. También se muestra el promedio de hidrofobicidad y el número de hélices transmembranales calculados con los programas SOSUI y TopPred, respectivamente. Los resultados de MitoProt y SignalP se compararon con la proteína Atp5b de rata (subunidad β de la F₁-ATP sintasa), que tiene una pre-secuencia bien conocida y se sabe que es exportada a la mitocondria. Los cálculos de SOSUI y TopPred se compararon con los valores de hidrofobicidad y número de hélices transmembranales de la proteína Atp6 de rata (subunidad 6 de la F₀-ATP sintasa), que tiene hélices transmembranales y se localiza en la MIM. ^aValores de hidrofobicidad promedio calculados con base en la escala de Kyte-Doolittle (valores positivos = segmentos hidrofóbicos; valores negativos = segmentos hidrofílicos). ^bNúmero de hélices transmembranales calculado con base en la escala de hidrofobicidad de GES descrita en el texto.

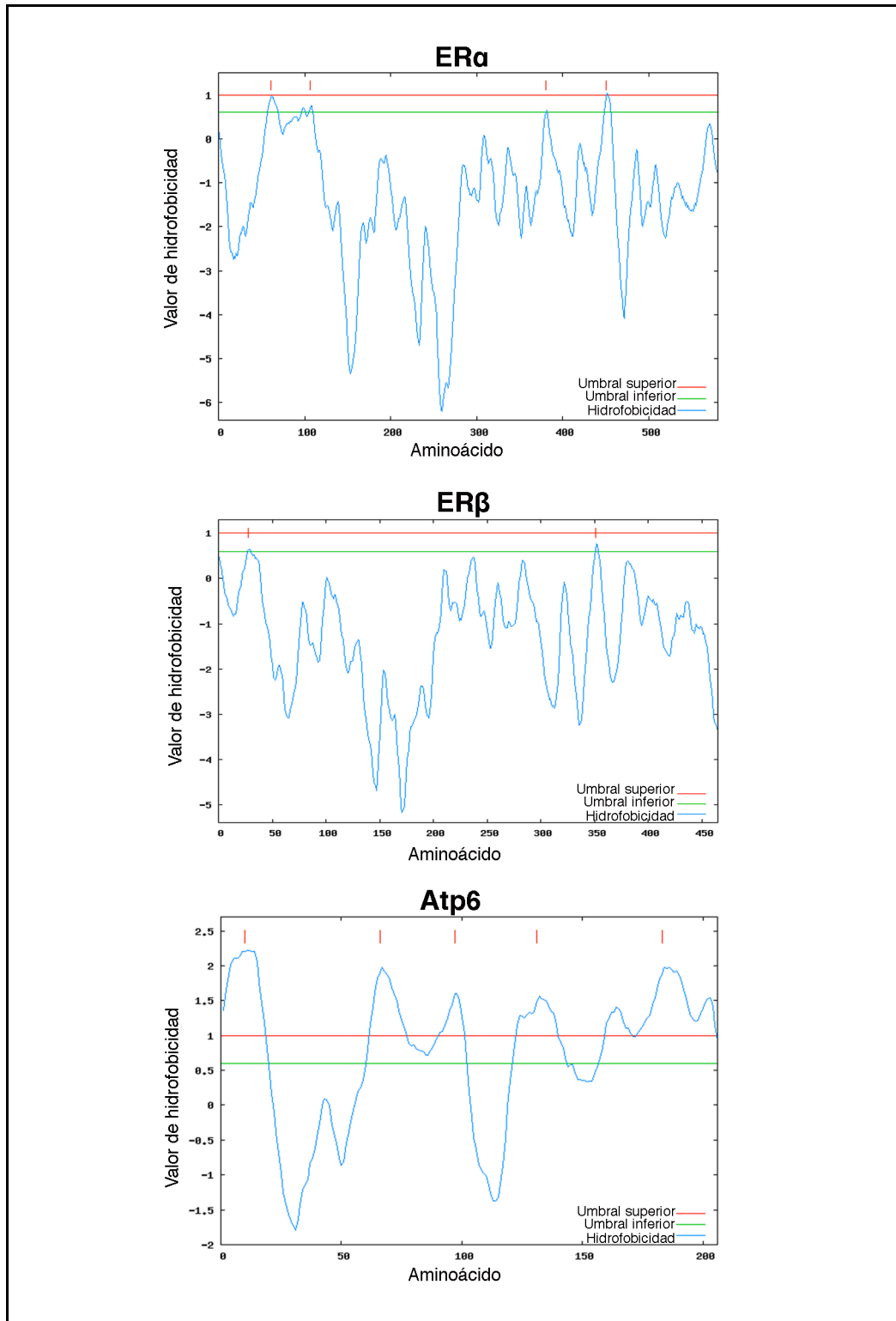


Figura 8. Perfiles de hidrofobicidad. En las gráficas se muestran los valores de hidrofobicidad calculados con el programa TopPred, basándose en la escala de GES descrita en el texto. Cuando los valores de hidrofobicidad sobrepasan el umbral inferior, se considera que se podría formar una hélice; si se encuentran o sobrepasan el umbral superior, se considera que con certeza existe una hélice transmembranal.

8. DISCUSIÓN

Desde hace más de una década, existen evidencias sobre los efectos estrogénicos en la estructura y función mitocondrial (Chen et al. 2005). A partir de entonces, muchos grupos de investigación han reportado la localización mitocondrial de ER α y ER β en diversos tejidos y tipos celulares (Monje y Boland 2001, Chen y Yager 2004, Yang et al. 2004, Chen et al. 2004a, Milner et al. 2005, Stirone et al. 2005, Duckles et al. 2006, Pedram et al. 2006, Milner et al. 2008, Ivanova et al. 2009, Milanesi et al. 2009, Yang et al. 2009).

En este estudio se demostró que tanto ER α como ER β se localizan en las mitocondrias del hipocampo, la corteza y el hipotálamo de ratas jóvenes y viejas, lo que concuerda con los reportes previos en tejido nervioso (Milner et al. 2005). Sin embargo, la mayoría de los reportes anteriores se realizaron en modelos celulares y, hasta la fecha, los mtERs han sido poco estudiados *in vivo* (Monje y Boland 2001, Milner et al. 2005, Stirone et al. 2005). El presente estudio es el primero en el cual se demuestra la presencia de ambos mtERs en la corteza cerebral y el hipotálamo en tejido obtenido *in vivo*. Además, los resultados de este trabajo confirman los trabajos anteriores en los que se reporta la presencia de mtERs en el hipocampo de rata (Milner et al. 2005).

Los mtERs de las tres áreas cerebrales estudiadas se detectaron como variantes, con masas moleculares diferentes. En otros estudios, ambos ERs se han detectado como isoformas en el cerebro y otros tejidos, como útero y ovario, tanto en humano como en roedores. Estas isoformas son el producto de la edición alternativa del pre-mRNA de los genes *Esr1* y *Esr2*. En el cerebro de la rata se ha demostrado que existen cinco isoformas para ER β . Para ER α , son pocos los estudios que han reportado la presencia de isoformas en el cerebro de la rata (Ishii et al. 2010). Sin embargo, se han reportado múltiples isoformas de ER α en el cerebro y otros tejidos humanos (Ishunina et al. 2007, Ishunina y Swaab 2008, Weiser et al. 2008, Taylor et al. 2010).

Es probable que las variantes de los ERs detectadas en este estudio sean isoformas con la capacidad de translocarse a la mitocondria. Reportes

previos muestran que las isoformas tienen una distribución diferencial tanto dentro de la célula como en distintos tejidos. Por ejemplo, ER β_1 y ER β_2 se expresan casi al mismo nivel en el hipocampo, donde la isoforma ER $\beta_1\delta_4$ es particularmente abundante (Price et al. 2000).

La masa molecular calculada para las variantes que se detectaron en este estudio se aproxima a la masa molecular esperada para las isoformas de los ERs. Entre estas variantes destacan las proteínas mtER β -52 KDa y mtER α -55 y 61 KDa del hipocampo. La primera se detectó como una proteína de ~52 KDa (Tabla I) que se aproxima a la masa molecular esperada para la isoforma ER β_1 (485 aminoácidos, ~53 KDa). Para mtER α se calcularon masas moleculares aproximadas de 55 y 61 KDa para las dos variantes encontradas (Tabla I); estas masas corresponden a las de otras proteínas (~55-60 KDa) con capacidad de unión al E₂ que han sido reportadas previamente en experimentos de fraccionamiento subcelular en útero de conejo (Monje y Boland 2001).

En este trabajo también se demostró la presencia de una variante de ER β de ~63 KDa que es aparentemente más abundante en el citosol que en las mitocondrias de las tres áreas cerebrales estudiadas y fue la variante de ER β con mayor masa molecular detectada (Fig. 2). La variante ER β -63 KDa no se detectó en las mitocondrias del hipocampo, pero sí en las de la corteza y el hipotálamo (Fig. 2 y Tabla I). La masa molecular calculada para esta variante no corresponde a la masa esperada para la isoforma ER β_2 , que es la isoforma con mayor masa molecular (~55 KDa) que se ha reportado hasta la fecha en el cerebro (Weiser et al. 2008). Sin embargo, existen dos estudios en los que se encontraron variantes de ER β de 63.9 KDa (Xia et al. 2000) y 60 KDa (Yang et al. 2004), en una biblioteca de cDNA de ovario de pez gato y en mitocondrias de corazón humano, respectivamente. Esto sugiere que la variante ER β -63 KDa podría ser otra isoforma de ER β no descrita aún en el cerebro.

Evidentemente, son necesarios experimentos con mRNA para confirmar la presencia de las isoformas de ER α y ER β en las mitocondrias del cerebro. El estudio de la expresión de estas isoformas ayudaría a explicar algunas de las diferencias en el daño observado entre distintas áreas

cerebrales durante el envejecimiento y también a entender mejor los mecanismos de neuroprotección por E₂ (Chung et al. 2007, García-Segura y Balthazart 2009).

El efecto del nivel de acumulación de los mtERs en la mitocondria durante el envejecimiento no se ha descrito. El presente trabajo es el primer reporte en el que se estudian estos niveles en el contexto de la edad. En él, se demostró que el nivel de acumulación de los mtERs se mantiene durante el envejecimiento (Fig. 3). Los reportes previos sobre la expresión global (en toda la célula) de los ERs en diferentes áreas cerebrales muestran resultados muy diversos. Mientras que en ciertas áreas (AVPV del hipotálamo e hipocampo) se observa una disminución en ER α y/o ER β , en otras áreas (VMN del hipotálamo) se detecta un aumento y en algunas otras (pBST, MPN y ARH del hipotálamo; corteza) no se observan cambios (Adams et al. 2002, Wilson et al. 2002, Chakraborty et al. 2003a, Chakraborty et al. 2003b, Mehra et al. 2005, Sharma y Thakur 2006). Estos antecedentes muestran que la regulación estrogénica a través de los ERs es específica de cada área cerebral. Los datos presentados en este estudio apoyan esta noción, ya que los niveles de mtERs, aunque se mantuvieron esencialmente constantes con la edad, sí presentaron variaciones con respecto al área del cerebro en la que se detectaron (Fig. 4).

Estudios previos han demostrado que en muchos casos el envejecimiento en el cerebro se traduce en una disminución de las capacidades cognitivas. En este contexto, se ha sugerido que el tratamiento con E₂ podría revertir muchos de los efectos del envejecimiento sobre las capacidades cerebrales (Wilson et al. 2002). Sin embargo, si el E₂ tuviera este efecto en todos los casos, la terapia de reemplazo hormonal resolvería gran parte de los estragos de la edad sobre el cerebro, y se sabe que este no es siempre el caso (Brinton 2004, Zhao y Brinton 2007a).

La idea general con respecto a la capacidad de respuesta al E₂ a lo largo de la vida es que el cerebro de individuos viejos no responde igual al E₂ porque no se expresan la misma cantidad de ERs y porque los mecanismos compensatorios que protegen la función mitocondrial se ven atenuados con el envejecimiento (Adams et al. 2002, Adams y Morrison 2003, Shi y Xu 2008). Con respecto a esto, en el presente estudio se detectaron mtERs en

animales jóvenes y viejos, lo que podría sugerir que son elementos necesarios para la función mitocondrial y que no sólo funcionan como receptores de E₂ y mediadores en la neuroprotección por hormonas (Dubal et al. 1999, Dubal et al. 2006).

En el contexto de la regulación de la función mitocondrial por E₂ (Chen y Yager 2004, Hsieh et al. 2006a, Nilsen et al. 2007, Irwin et al. 2008), los mtERs podrían ser proteínas importantes que modulan la respuesta al E₂ a lo largo de la vida.

En este trabajo también se demostró que las variantes de ambos mtERs se distribuyen diferencialmente en las tres áreas cerebrales estudiadas. Específicamente, para mtER α -55 KDa y mtER β -63 KDa existen diferencias significativas en los niveles de acumulación por área (Fig. 4).

Con respecto a los mtERs totales, los datos sugieren que los subtipos podrían participar en funciones cerebrales diferentes, ya que se demostró que en las ratas jóvenes mtER α es el subtipo más abundante en el hipocampo y la corteza, así como en la corteza de las ratas viejas. Es interesante que en este estudio se detectara a mtER α como la variante más abundante en la corteza (ratas de 3 y 18 meses) y en el hipocampo (3 meses) (Fig. 4). Esto contrasta con datos previos que muestran la predominancia de ER β -total sobre ER α -total en la corteza (Gustafsson 1999). Es posible que esto se deba a un efecto de enmascaramiento de la presencia de ERs en la mitocondria, dado que se ha reportado que mtER α y mtER β representan el 10% y el 18% de la cantidad de ERs totales, respectivamente (Chen et al. 2004a).

Por otra parte, se ha demostrado que la función y la estructura mitocondrial están relacionadas con la estabilidad de los supercomplejos de la MRC (Schäfer et al. 2006). La arquitectura mitocondrial también se ve alterada en el envejecimiento. De hecho, hay una disminución en la proporción de supercomplejos y de ATP sintasa intacta en mitocondrias corticales de ratas viejas. Sin embargo, se ha demostrado que el decremento en el monómero de la ATP sintasa coincide con un aumento en la cantidad de oligómeros de la misma enzima (Seelert et al. 2009, Frenzel et al. 2010). El hecho de que la estructura mitocondrial también se altere con la edad

correlaciona con los fallos en la función mitocondrial asociados al envejecimiento (Navarro y Boveris 2007, Sas et al. 2007, Jones y Brewer 2009).

En un estudio reciente, Borrás, et al. (2010) reportaron que los efectos antioxidantes y protectores del E₂ sobre la mitocondria no necesariamente son dependientes de la presencia de factores citoplasmáticos, e.g., en mitocondrias aisladas y purificadas de cerebro de rata, el tratamiento con E₂ (0.2 nM) tiene un efecto antioxidante y previene la salida del citocromo c de la mitocondria. Los mismos autores sugieren que los efectos del E₂ actúan de manera directa sobre la mitocondria, posiblemente a través de mtERs (Borras et al. 2010).

Se ha demostrado que el estado de oligomerización de la ATP sintasa es otro de los aspectos importantes para mantener la eficiencia respiratoria (Frenzel et al. 2010) y se ha sugerido que los mtERs podrían ser los mediadores directos de los efectos estrogénicos sobre la mitocondria (Borras et al. 2010). En este contexto, nuestros resultados sobre la formación del complejo mtERβ-ATP sintasa (Fig. 6) son importantes ya que sugieren otra vía posible por la cual el E₂ podría modular la actividad de la ATP sintasa, i.e., a través de la unión E₂-mtERβ-ATP sintasa. Sin embargo, es necesario comprobar la capacidad de unión al E₂ de los mtERs descritos en este estudio.

También se demostró que la ATP sintasa forma complejos específicamente con ERβ, pero no con ERα, en ratas de 3 y 18 meses (Figs. 5 y 6). Lo anterior coincide con otros estudios en los que se detectó ERβ, pero no ERα, en las mitocondrias de diversos tipos celulares (Psarra y Sekeris 2008). De hecho, mtERα se ha detectado en pocos tejidos en comparación con los que presentan mtERβ, e.g., útero y ovario de conejo, células MCF-7 y tejido vascular cerebral de rata (Monje y Boland 2001, Stirone et al. 2005, Klinge 2008). Es importante destacar que en este estudio se demostró la localización de ERα en tejido nervioso por primera vez en un modelo *in vivo*. A pesar de su clara localización mitocondrial, mtERα no interactúa con la ATP sintasa, lo que sugiere que ambos mtERs tienen funciones distintas dentro de la mitocondria.

La demostración de que mtER β forma complejos con la ATP sintasa de ratas jóvenes y viejas sugiere que este receptor podría regular la estabilidad y/o función de la ATP sintasa y concuerda con la noción de que este receptor participa en el mantenimiento de la función mitocondrial durante toda la vida. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que otros factores mitocondriales se alteran con la edad (Frenzel et al. 2010) y la funcionalidad del complejo también dependerá del estado general de la mitocondria.

Para evidenciar el efecto del E₂ sobre los complejos ER β -ATP sintasa, se hicieron experimentos de CoIP en ratas jóvenes OVX tratadas con 30 μ g/Kg de E₂ y en ratas viejas OVX. Previamente se ha demostrado que este esquema de tratamiento con E₂ induce diferentes aspectos de la función mitocondrial, e.g., la expresión de las subunidades α y β de la ATP sintasa y el aumento de la actividad respiratoria mitocondrial (Nilsen et al. 2007, Irwin et al. 2008). Con estos experimentos se demostró que los complejos ER β -ATP sintasa no son dependientes de la presencia de E₂ y se detectan aún en ratas privadas de E₂ por 15 meses (Fig. 7).

El presente es el primer trabajo en el que se demuestra la asociación entre ER β y la ATP sintasa. El hecho de que ER β , pero no ER α , co-precipita con esta enzima puede tomarse como una evidencia de la diferencia de funciones entre mtER α y mtER β . Aunque aún no se sabe cuál es exactamente la función de la asociación ER β -ATP sintasa, nuestros resultados concuerdan con esta nueva idea en la que ER β es un factor importante en la mitocondria, independientemente de su papel como receptor a estrógenos (Yang et al. 2009).

Con respecto a la localización intramitocondrial de los mtERs, se ha demostrado que muchas proteínas mitocondriales tienen señales de localización mitocondrial en el NH-terminal (pre-secuencias; mTPS) o secuencias internas que las dirigen a la mitocondria donde son reconocidas por el complejo TOM de la MEM. En general, las pre-proteínas mitocondriales son sintetizadas en el citoplasma; aquéllas con mTPSs son reconocidas por el receptor Tom20 y aquéllas con secuencias internas son reconocidas por el receptor Tom70 (Baker et al. 2007, Li et al. 2009). Sin embargo, aproximadamente la mitad de las proteínas mitocondriales no tienen mTPSs

escindibles y tienen secuencias internas de localización las cuales hasta la fecha han sido poco caracterizadas (Mokranjac y Neupert 2009).

El presente trabajo y estudios previos han demostrado que tanto ER α como ER β se encuentran en las mitocondrias de diversos tejidos y tipos celulares. Sin embargo, sólo un reporte demuestra experimentalmente que ambos mtERs se localizan específicamente en la matriz mitocondrial de células MCF-7 y que el hER β tiene una región interna de aminoácidos básicos (aminoácidos 220-270) que podría funcionar como una mTPS (Chen et al. 2004a).

Contrario a lo reportado por Chen, et al. (2004a), al someter las secuencias completas de ER α y ER β a diferentes programas de predicción no se encontró suficiente evidencia que indique la presencia de mTPSs, α -hélices o pre-secuencias que sugieran un mecanismo clásico de importación mitocondrial. Sin embargo, se conocen otras proteínas mitocondriales que no son importadas de la manera clásica, i.e., no tienen pre-secuencias o tienen mTPSs atípicas (Lithgow 2000). Por ejemplo, se sabe que además de participar en la estabilidad y plegamiento correcto de muchas proteínas, las HSP-70 y -90 están involucradas en la translocación de pre-proteínas mitocondriales mediante la interacción con Tom70/71 (Aumais et al. 1997, Bouhouche-Chatelier et al. 2001, Li et al. 2009).

Los datos del presente trabajo sugieren que mtER α y mtER β son proteínas solubles de la matriz mitocondrial que se translocan a la mitocondria por un mecanismo que no involucra mTPSs. Tomando en cuenta los reportes en los que las HSP70/90 facilitan la translocación de pre-proteínas mitocondriales (Young et al. 2003, Li et al. 2009), se propone que la poza citosólica de ERs no unidos a ligando se encuentran en complejos con HSP70/90. Posteriormente, este complejo ER-HSP70/90 podría reubicarse en la MEM, ser reconocido por Tom70 e iniciar el proceso de internación en la mitocondria. Una vez dentro de la mitocondria, los mtERs tendrían que ser translocados a la matriz mitocondrial (asumiendo que son proteínas solubles). La ruta clásica para proteínas de la matriz mitocondrial es mediada por TIM23. El otro translocador de la MIM, TIM22, se asocia a la importación de proteínas que se insertan en la MIM (Schmidt et al. 2010). Aunque

generalmente se ha aceptado que TIM23 transloca pre-proteínas con mTPSs (Neupert y Herrmann 2007), se propone que esta translocasa podría ser la que regula la entrada de los mtERs a la matriz mitocondrial, dado que se piensa que estos receptores no son proteínas transmembranales de la MIM (Fig. 9).

Por otra parte, previamente se ha demostrado que ER α y ER β pueden existir como proteínas asociadas a la membrana celular (mERs). Estos mERs se originan de los mismos genes que los ERs nucleares (*Esr1* y *Esr2*) (Razandi et al. 1999), por lo que se piensa que las características estructurales de las proteínas deben ser iguales a las de los ERs encontrados en el núcleo. Aún así, sólo una parte de estos ERs se transloca a la membrana celular. Se ha demostrado que una de las características estructurales determinantes para que ER α se transloque a la membrana celular es la presencia de una serina en la posición 522 dentro del LBD que le permite asociarse a la caveolina 1 (Razandi et al. 2003). En un trabajo más reciente de los mismos autores, se comprobó que la Hsp27, otra chaperona citoplasmática, es necesaria para que ER α se transloque a la membrana celular (Razandi et al. 2010). Estos antecedentes indican que la asociación con proteínas citoplasmáticas es una forma de regular el tránsito de ERs dentro de la célula.

Tomando en cuenta lo anterior, es posible que la asociación de los mtERs a proteínas citoplasmáticas (e.g., HSP-70/90) les confiera la capacidad de translocarse a la mitocondria. Sin embargo, la localización intramitocondrial de los mtERs en el cerebro deberá estudiarse experimentalmente para comprobar estas hipótesis.

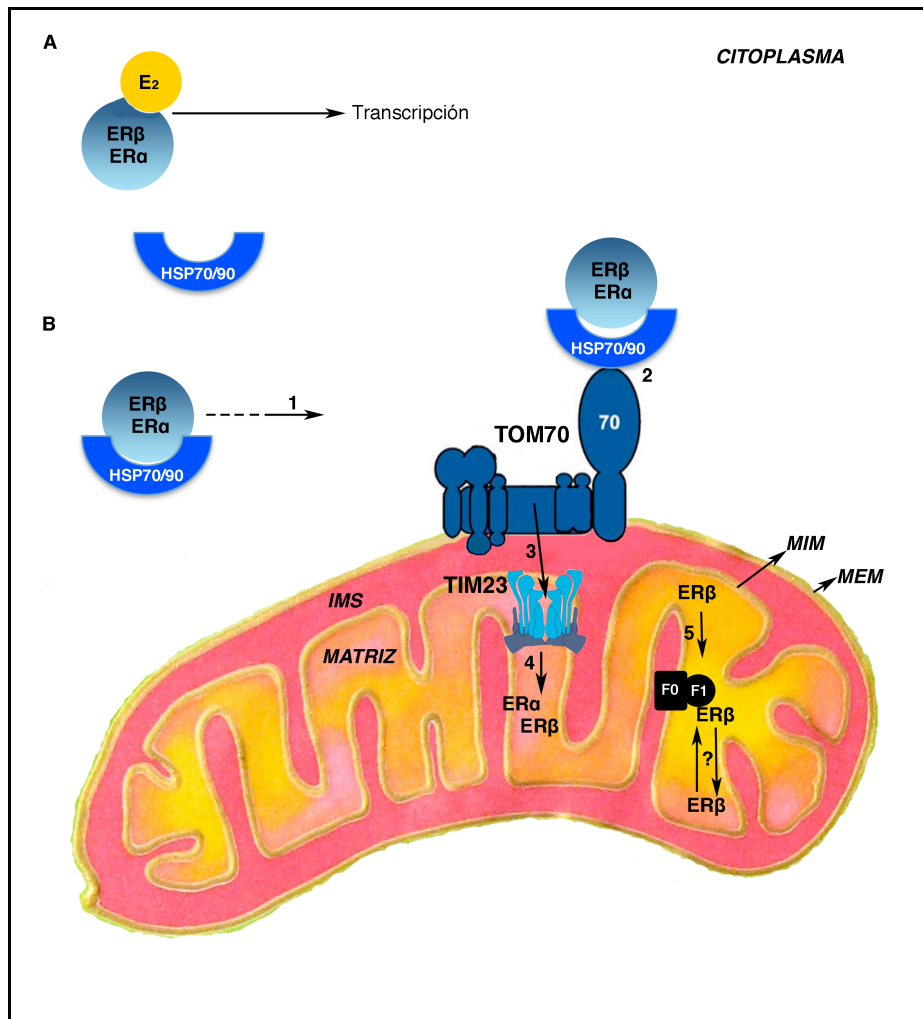


Figura 9. Modelo de importación mitocondrial para mtER α y mtER β . A. En presencia de E_2 , los complejos de chaperonas citosólicas HSP70/90 se disocian de los ERs y éstos se activan y regulan la transcripción de genes blanco. B. En ausencia de E_2 , 1) el complejo de chaperonas-ERs se mantiene y se relocaliza en la membrana externa mitocondrial (MEM); 2) el complejo HSP70/90 transfiere los ERs al receptor Tom70; 3) los ERs son translocados a través del poro Tom40 y entran al espacio intermembranal (IMS). 4) Los ERs son transportados por TIM23 a través de la MIM y hacia la matriz mitocondrial. 5) Una vez en la matriz, ER β se asocia a la ATP sintasa. ? = Procesos no descritos hasta la fecha. Imagen del complejo TOM70 modificada de Mokranjac y Neupert, 2009. Imagen del complejo TIM23 modificada de Neupert y Herrmann, 2007. La imagen de la mitocondria fue modificada a partir de "Mitochondria in action", por Odra Noel.

En este estudio se demostró que la edad no tiene efectos significativos sobre la cantidad de mtERs en el cerebro. Además, el complejo mtER β -ATP sintasa se forma independientemente de la presencia del E₂ y de la edad. Estos resultados sugieren que la cantidad de ERs que se transloca a la mitocondria no depende totalmente del ligando y que posiblemente la poza de ERs destinada a translocarse a la mitocondria sea constante y dependa de otros factores.

Estos resultados contrastan con el trabajo de Chen y Yager (2004) en el que se demuestra que la presencia de mtER α y mtER β en la mitocondria es dependiente de la concentración de E₂. Sin embargo, las diferencias entre los datos se pueden deber a que ellos utilizan células tumorales (MCF-7 y HepG2) para sus estudios y los datos de este estudio fueron obtenidos a partir de muestras de tejidos de animales durante la vida y en condiciones fisiológicas.

9. CONCLUSIÓN

Se demostró que diferentes variantes de ER α y ER β se localizan en las mitocondrias del hipocampo, la corteza y el hipotálamo de la rata. El nivel de expresión de estas variantes no se altera significativamente con la edad. Además, se encontró que ER β y mtER β , pero no ER α , forman complejos con la ATP sintasa mitocondrial independientemente de la edad y de la presencia del E₂.

10. PERSPECTIVAS

El estudio de los efectos de la señalización estrogénica sobre la mitocondria es un tema relativamente nuevo en el que se ha reportado consistentemente la localización mitocondrial de los receptores a estrógenos; pero aún se desconocen sus funciones como elemento estructural en la mitocondria.

No se conocen los mecanismos por los cuales los ERs son transportados a las mitocondrias del cerebro, por lo que en un futuro será necesario estudiar su localización intramitocondrial y determinar los mecanismos involucrados en la translocación.

Mediante CoIP se puede comenzar a explorar la presencia de los mtERs en la matriz mitocondrial, por ejemplo, coprecipitando a los ERs con proteínas específicas de este compartimento (e.g., mHSP-70). Después, la acumulación de mtERs en la matriz se puede confirmar mediante microscopía electrónica e inmunogold (Chen et al. 2004a).

La disposición de los mtERs dentro de la mitocondria también se puede estudiar mediante el tratamiento de los aislados mitocondriales con sales y carbonato de sodio. Posteriormente, por centrifugación diferencial, los componentes proteínicos de las membranas internas y externas de la mitocondria se pueden separar y diferenciar por Western blot (Pon 2007).

Es importante saber cuáles son los elementos estructurales esenciales para la translocación de los ERs a la mitocondria. Una manera de estudiarlos es la mutagénesis dirigida para identificar la relación entre la estructura y la capacidad de translocación. Se comenzaría por sustituir aminoácidos importantes para la translocación a la membrana celular (Razandi et al. 2003) y después estos ERs mutantes se podrían subclonar a vectores que expresen proteína verde fluorescente, con el fin de observar cuáles mutantes tienen la capacidad de translocarse a la mitocondria y cuáles la pierden.

En este estudio se demostró que mtER β , pero no mtER α , forma un complejo con la ATP sintasa. Es importante determinar las características estructurales que le permiten a mtER β unirse a esta enzima y cuáles subunidades (reguladora o catalítica) están participando directamente en el complejo. Para esto se podría purificar el ER β de cerebro y posteriormente

realizar experimentos de entrecruzamiento (“cross-linking”) que permitieran visualizar las interacciones entre ER β y las diferentes subunidades de la ATP sintasa. Esta técnica ya se ha utilizado para estudiar las interacciones entre las diferentes subunidades de la ATP sintasa (Cano-Estrada et al. 2010).

Por último, se sabe que la mitocondria está directamente involucrada con el inicio y progresión de muchas enfermedades humanas del metabolismo (e.g., diabetes) y neurodegenerativas (e.g., enfermedad de Alzheimer y de Parkinson). Si la actividad mitocondrial es hormonalmente regulada a través de los mtERs, será necesario estudiar a los mtERs en humanos con diferentes patologías metabólicas y neurodegenerativas y empezar a establecer una relación entre los niveles de acumulación de los mtERs y la incidencia de estas enfermedades. Para comenzar a estudiar la importancia de los mtERs en humano, primero se debe analizar el contenido de los mtERs por Western blot en tejidos humanos (post mortem). Se empezaría por analizar la acumulación de mtERs en tejidos que son directamente afectados por enfermedades metabólicas y neurodegenerativas (e.g., hígado, cerebro, páncreas).

11. REFERENCIAS

1. Adams MM, Morrison JH. 2003 Estrogen and the aging hippocampal synapse. *Cereb Cortex*; 13: 1271-1275.
2. Adams MM, Shah RA, Janssen WG, Morrison JH. 2001 Different modes of hippocampal plasticity in response to estrogen in young and aged female rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 98: 8071-8076.
3. Adams MM, Fink SE, Shah RA, Janssen WG, Hayashi S, Milner TA, McEwen BS, Morrison JH. 2002 Estrogen and aging affect the subcellular distribution of estrogen receptor-alpha in the hippocampus of female rats. *J Neurosci*; 22: 3608-3614.
4. Ahmed AU, Fisher PR. 2009 Import of nuclear-encoded mitochondrial proteins: a cotranslational perspective. *Int Rev Cell Mol Biol*; 273: 49-68.
5. Ahmed AU, Beech PL, Lay ST, Gilson PR, Fisher PR. 2006 Import-associated translational inhibition: novel in vivo evidence for cotranslational protein import into *Dictyostelium discoideum* mitochondria. *Eukaryot Cell*; 5: 1314-1327.
6. Alonso A, Moreno M, Ordonez P, Fernandez R, Perez C, Diaz F, Navarro A, Tolivia J, Gonzalez C. 2008 Chronic estradiol treatment improves brain homeostasis during aging in female rats. *Endocrinology*; 149: 57-72.
7. Aumais JP, Lee HS, Lin R, White JH. 1997 Selective interaction of hsp90 with an estrogen receptor ligand-binding domain containing a point mutation. *J Biol Chem*; 272: 12229-12235.
8. Azcoitia I, Sierra A, Veiga S, Garcia-Segura LM. 2005 Brain steroidogenesis: emerging therapeutic strategies to prevent neurodegeneration. *J Neural Transm*; 112: 171-176.
9. Baker MJ, Frazier AE, Gulbis JM, Ryan MT. 2007 Mitochondrial protein-import machinery: correlating structure with function. *Trends Cell Biol*; 17: 456-464.
10. Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S. 2004 Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol*; 340: 783-795.
11. Bethea CL, Reddy AP, Tokuyama Y, Henderson JA, Lima FB. 2009 Protective actions of ovarian hormones in the serotonin system of macaques. *Front Neuroendocrinol*; 30: 212-238.

- 12.** Bettini E, Maggi A. 1992 Estrogen induction of cytochrome c oxidase subunit III in rat hippocampus. *J Neurochem*; 58: 1923-1929.
- 13.** Borrás C, Gambini J, Lopez-Grueso R, Pallardo FV, Vina J. 2010 Direct antioxidant and protective effect of estradiol on isolated mitochondria. *Biochim Biophys Acta*; 1802: 205-211.
- 14.** Bosetti F, Brizzi F, Barogi S, Mancuso M, Siciliano G, Tendi EA, Murri L, Rapoport SI, Solaini G. 2002 Cytochrome c oxidase and mitochondrial F1F0-ATPase (ATP synthase) activities in platelets and brain from patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*; 23: 371-376.
- 15.** Bouhouche-Chatelier L, Chadli A, Catelli MG. 2001 The N-terminal adenosine triphosphate binding domain of Hsp90 is necessary and sufficient for interaction with estrogen receptor. *Cell Stress Chaperones*; 6: 297-305.
- 16.** Boulware MI, Kent BA, Frick KM. 2011 The Impact of Age-Related Ovarian Hormone Loss on Cognitive and Neural Function. *Curr Top Behav Neurosci*.
- 17.** Boveris A, Navarro A. 2008 Brain mitochondrial dysfunction in aging. *IUBMB Life*; 60: 308-314.
- 18.** Brewer GJ, Reichensperger JD, Brinton RD. 2006 Prevention of age-related dysregulation of calcium dynamics by estrogen in neurons. *Neurobiol Aging*; 27: 306-317.
- 19.** Brinton RD. 2004 Requirements of a brain selective estrogen: advances and remaining challenges for developing a NeuroSERM. *J Alzheimers Dis*; 6: S27-35.
- 20.** Brinton RD. 2008 Estrogen regulation of glucose metabolism and mitochondrial function: therapeutic implications for prevention of Alzheimer's disease. *Adv Drug Deliv Rev*; 60: 1504-1511.
- 21.** Brown MR, Geddes JW, Sullivan PG. 2004 Brain region-specific, age-related, alterations in mitochondrial responses to elevated calcium. *J Bioenerg Biomembr*; 36: 401-406.
- 22.** Cammarata PR, Chu S, Moor A, Wang Z, Yang SH, Simpkins JW. 2004 Subcellular distribution of native estrogen receptor alpha and beta subtypes in cultured human lens epithelial cells. *Exp Eye Res*; 78: 861-871.

- 23.** Cano-Estrada A, et al. 2010 Subunit-subunit interactions and overall topology of the dimeric mitochondrial ATP synthase of *Polytomella* sp. *Biochim Biophys Acta*; 1797: 1439-1448.
- 24.** Chakraborty TR, Ng L, Gore AC. 2003b Age-related changes in estrogen receptor beta in rat hypothalamus: a quantitative analysis. *Endocrinology*; 144: 4164-4171.
- 25.** Chakraborty TR, Hof PR, Ng L, Gore AC. 2003a Stereologic analysis of estrogen receptor alpha (ER alpha) expression in rat hypothalamus and its regulation by aging and estrogen. *J Comp Neurol*; 466: 409-421.
- 26.** Chen JQ, Yager JD. 2004 Estrogen's effects on mitochondrial gene expression: mechanisms and potential contributions to estrogen carcinogenesis. *Ann N Y Acad Sci*; 1028: 258-272.
- 27.** Chen JQ, Yager JD, Russo J. 2005 Regulation of mitochondrial respiratory chain structure and function by estrogens/estrogen receptors and potential physiological/pathophysiological implications. *Biochim Biophys Acta*; 1746: 1-17.
- 28.** Chen JQ, Delannoy M, Cooke C, Yager JD. 2004a Mitochondrial localization of ERalpha and ERbeta in human MCF7 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*; 286: E1011-1022.
- 29.** Chen JQ, Cammarata PR, Baines CP, Yager JD. 2009 Regulation of mitochondrial respiratory chain biogenesis by estrogens/estrogen receptors and physiological, pathological and pharmacological implications. *Biochim Biophys Acta*; 1793: 1540-1570.
- 30.** Chung WC, Pak TR, Suzuki S, Pouliot WA, Andersen ME, Handa RJ. 2007 Detection and localization of an estrogen receptor beta splice variant protein (ERbeta2) in the adult female rat forebrain and midbrain regions. *J Comp Neurol*; 505: 249-267.
- 31.** Claros MG, Vincens P. 1996 Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem*; 241: 779-786.
- 32.** Conrad CD, Bimonte-Nelson HA. 2010 Impact of the hypothalamic-pituitary-adrenal/gonadal axes on trajectory of age-related cognitive decline. *Prog Brain Res*; 182: 31-76.

- 33.** D'Aurelio M, Gajewski CD, Lenaz G, Manfredi G. 2006 Respiratory chain supercomplexes set the threshold for respiration defects in human mtDNA mutant cybrids. *Hum Mol Genet*; 15: 2157-2169.
- 34.** De Nicola AF, Pietranera L, Beauquis J, Ferrini MG, Saravia FE. 2009 Steroid protection in aging and age-associated diseases. *Exp Gerontol*; 44: 34-40.
- 35.** Diekert K, Kispal G, Guiard B, Lill R. 1999 An internal targeting signal directing proteins into the mitochondrial intermembrane space. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 96: 11752-11757.
- 36.** Dubal DB, Shughrue PJ, Wilson ME, Merchenthaler I, Wise PM. 1999 Estradiol modulates bcl-2 in cerebral ischemia: a potential role for estrogen receptors. *J Neurosci*; 19: 6385-6393.
- 37.** Dubal DB, et al. 2006 Differential modulation of estrogen receptors (ERs) in ischemic brain injury: a role for ERalpha in estradiol-mediated protection against delayed cell death. *Endocrinology*; 147: 3076-3084.
- 38.** Duckles SP, Krause DN, Stirone C, Procaccio V. 2006 Estrogen and mitochondria: a new paradigm for vascular protection? *Mol Interv*; 6: 26-35.
- 39.** Erickson CA, Barnes CA. 2003 The neurobiology of memory changes in normal aging. *Exp Gerontol*; 38: 61-69.
- 40.** Flynn JM, Dimitrijevic SD, Younes M, Skliris G, Murphy LC, Cammarata PR. 2008 Role of wild-type estrogen receptor-beta in mitochondrial cytoprotection of cultured normal male and female human lens epithelial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*; 295: E637-647.
- 41.** Foster TC. 2011 Role of estrogen receptor alpha and beta expression and signaling on cognitive function during aging. *Hippocampus*.
- 42.** Frenzel M, Rommelspacher H, Sugawa MD, Dencher NA. 2010 Ageing alters the supramolecular architecture of OxPhos complexes in rat brain cortex. *Exp Gerontol*; 45: 563-572.
- 43.** Funabashi T, Kleopoulos SP, Brooks PJ, Kimura F, Pfaff DW, Shinohara K, Mobbs CV. 2000 Changes in estrogenic regulation of estrogen receptor alpha mRNA and progesterone receptor mRNA in the female rat hypothalamus during aging: an in situ hybridization study. *Neurosci Res*; 38: 85-92.

44. García-Segura LM, Balthazart J. 2009 Steroids and neuroprotection: New advances. *Front Neuroendocrinol*; 30: v-ix.
45. Gavel Y, von Heijne G. 1992 The distribution of charged amino acids in mitochondrial inner-membrane proteins suggests different modes of membrane integration for nuclearly and mitochondrially encoded proteins. *Eur J Biochem*; 205: 1207-1215.
46. Gredilla R, Garm C, Holm R, Bohr VA, Stevnsner T. 2010 Differential age-related changes in mitochondrial DNA repair activities in mouse brain regions. *Neurobiol Aging*; 31: 993-1002.
47. Gustafsson JA. 1999 Estrogen receptor beta--a new dimension in estrogen mechanism of action. *J Endocrinol*; 163: 379-383.
48. Harms C, et al. 2001 Differential mechanisms of neuroprotection by 17 beta-estradiol in apoptotic versus necrotic neurodegeneration. *J Neurosci*; 21: 2600-2609.
49. Herrick SP, Waters EM, Drake CT, McEwen BS, Milner TA. 2006 Extranuclear estrogen receptor beta immunoreactivity is on doublecortin-containing cells in the adult and neonatal rat dentate gyrus. *Brain Res*; 1121: 46-58.
50. Hirahara Y, Matsuda K, Gao W, Arvanitis DN, Kawata M, Boggs JM. 2009 The localization and non-genomic function of the membrane-associated estrogen receptor in oligodendrocytes. *Glia*; 57: 153-165.
51. Hirokawa T, Boon-Chieng S, Mitaku S. 1998 SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics*; 14: 378-379.
52. Hsieh YC, Yu HP, Suzuki T, Choudhry MA, Schwacha MG, Bland KI, Chaudry IH. 2006a Upregulation of mitochondrial respiratory complex IV by estrogen receptor-beta is critical for inhibiting mitochondrial apoptotic signaling and restoring cardiac functions following trauma-hemorrhage. *J Mol Cell Cardiol*; 41: 511-521.
53. Irwin RW, Yao J, Hamilton RT, Cadenas E, Brinton RD, Nilsen J. 2008 Progesterone and estrogen regulate oxidative metabolism in brain mitochondria. *Endocrinology*; 149: 3167-3175.
54. Ishii H, Kobayashi M, Sakuma Y. 2010 Alternative promoter usage and alternative splicing of the rat estrogen receptor alpha gene generate

numerous mRNA variants with distinct 5'-ends. *J Steroid Biochem Mol Biol*; 118: 59-69.

55. Ishunina TA, Swaab DF. 2008 Age-dependent ERalpha MB1 splice variant expression in discrete areas of the human brain. *Neurobiol Aging*; 29: 1177-1189.

56. Ishunina TA, Fischer DF, Swaab DF. 2007 Estrogen receptor alpha and its splice variants in the hippocampus in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*; 28: 1670-1681.

57. Ivanova MM, Mazhawidza W, Dougherty SM, Minna JD, Klinge CM. 2009 Activity and intracellular location of estrogen receptors alpha and beta in human bronchial epithelial cells. *Mol Cell Endocrinol*; 305: 12-21.

58. Jones TT, Brewer GJ. 2009 Critical age-related loss of cofactors of neuron cytochrome C oxidase reversed by estrogen. *Exp Neurol*; 215: 212-219.

59. Kanungo MS, Patnaik SK, Koul O. 1975 Decrease in 17beta-oestradiol receptor in brain of ageing rats. *Nature*; 253: 366-367.

60. Klinge CM. 2008 Estrogenic control of mitochondrial function and biogenesis. *J Cell Biochem*; 105: 1342-1351.

61. Kumar S, Lata K, Mukhopadhyay S, Mukherjee TK. 2010 Role of estrogen receptors in pro-oxidative and anti-oxidative actions of estrogens: a perspective. *Biochim Biophys Acta*; 1800: 1127-1135.

62. Kyte J, Doolittle RF. 1982 A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*; 157: 105-132.

63. Li J, Qian X, Hu J, Sha B. 2009 Molecular chaperone Hsp70/Hsp90 prepares the mitochondrial outer membrane translocon receptor Tom71 for preprotein loading. *J Biol Chem*; 284: 23852-23859.

64. Lithgow T. 2000 Targeting of proteins to mitochondria. *FEBS Lett*; 476: 22-26.

65. Luebke JI, Chang YM, Moore TL, Rosene DL. 2004 Normal aging results in decreased synaptic excitation and increased synaptic inhibition of layer 2/3 pyramidal cells in the monkey prefrontal cortex. *Neuroscience*; 125: 277-288.

66. Markham JA, McKian KP, Stroup TS, Juraska JM. 2005 Sexually dimorphic aging of dendritic morphology in CA1 of hippocampus. *Hippocampus*; 15: 97-103.

- 67.** Maruyama K, Endoh H, Sasaki-Iwaoka H, Kanou H, Shimaya E, Hashimoto S, Kato S, Kawashima H. 1998 A novel isoform of rat estrogen receptor beta with 18 amino acid insertion in the ligand binding domain as a putative dominant negative regular of estrogen action. *Biochem Biophys Res Commun*; 246: 142-147.
- 68.** Mehra RD, Sharma K, Nyakas C, Vij U. 2005 Estrogen receptor alpha and beta immunoreactive neurons in normal adult and aged female rat hippocampus: a qualitative and quantitative study. *Brain Res*; 1056: 22-35.
- 69.** Milanese L, Vasconsuelo A, de Boland AR, Boland R. 2009 Expression and subcellular distribution of native estrogen receptor beta in murine C2C12 cells and skeletal muscle tissue. *Steroids*; 74: 489-497.
- 70.** Milner TA, Lubbers LS, Alves SE, McEwen BS. 2008 Nuclear and extranuclear estrogen binding sites in the rat forebrain and autonomic medullary areas. *Endocrinology*; 149: 3306-3312.
- 71.** Milner TA, Ayoola K, Drake CT, Herrick SP, Tabori NE, McEwen BS, Warriar S, Alves SE. 2005 Ultrastructural localization of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat hippocampal formation. *J Comp Neurol*; 491: 81-95.
- 72.** Mokranjac D, Neupert W. 2009 Thirty years of protein translocation into mitochondria: unexpectedly complex and still puzzling. *Biochim Biophys Acta*; 1793: 33-41.
- 73.** Monje P, Boland R. 2001 Subcellular distribution of native estrogen receptor alpha and beta isoforms in rabbit uterus and ovary. *J Cell Biochem*; 82: 467-479.
- 74.** Mouton PR, Long JM, Lei DL, Howard V, Jucker M, Calhoun ME, Ingram DK. 2002 Age and gender effects on microglia and astrocyte numbers in brains of mice. *Brain Res*; 956: 30-35.
- 75.** Navarro A, Boveris A. 2004 Rat brain and liver mitochondria develop oxidative stress and lose enzymatic activities on aging. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*; 287: R1244-1249.
- 76.** Navarro A, Boveris A. 2007 The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am J Physiol Cell Physiol*; 292: C670-686.
- 77.** Neupert W, Herrmann JM. 2007 Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem*; 76: 723-749.

- 78.** Ngosuwan J, Wang NM, Fung KL, Chirico WJ. 2003 Roles of cytosolic Hsp70 and Hsp40 molecular chaperones in post-translational translocation of presecretory proteins into the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*; 278: 7034-7042.
- 79.** Nilsen J, Diaz Brinton R. 2003 Mechanism of estrogen-mediated neuroprotection: regulation of mitochondrial calcium and Bcl-2 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 100: 2842-2847.
- 80.** Nilsen J, Brinton RD. 2004 Mitochondria as therapeutic targets of estrogen action in the central nervous system. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*; 3: 297-313.
- 81.** Nilsen J, Irwin RW, Gallaher TK, Brinton RD. 2007 Estradiol in vivo regulation of brain mitochondrial proteome. *J Neurosci*; 27: 14069-14077.
- 82.** Norfleet AM, Thomas ML, Gametchu B, Watson CS. 1999 Estrogen receptor-alpha detected on the plasma membrane of aldehyde-fixed GH3/B6/F10 rat pituitary tumor cells by enzyme-linked immunocytochemistry. *Endocrinology*; 140: 3805-3814.
- 83.** Oster G, Wang H. 1999 ATP synthase: two motors, two fuels. *Structure*; 7: R67-72.
- 84.** Oster G, Wang H. 2000 Reverse engineering a protein: the mechanochemistry of ATP synthase. *Biochim Biophys Acta*; 1458: 482-510.
- 85.** Pedram A, Razandi M, Wallace DC, Levin ER. 2006 Functional estrogen receptors in the mitochondria of breast cancer cells. *Mol Biol Cell*; 17: 2125-2137.
- 86.** Peters A, Sethares C, Luebke JI. 2008 Synapses are lost during aging in the primate prefrontal cortex. *Neuroscience*; 152: 970-981.
- 87.** Petersen DN, Tkalcevic GT, Koza-Taylor PH, Turi TG, Brown TA. 1998 Identification of estrogen receptor beta2, a functional variant of estrogen receptor beta expressed in normal rat tissues. *Endocrinology*; 139: 1082-1092.
- 88.** Pon LA. 2007. *Mitochondria*. New York: Elsevier.
- 89.** Price RH, Jr., Lorenzon N, Handa RJ. 2000 Differential expression of estrogen receptor beta splice variants in rat brain: identification and characterization of a novel variant missing exon 4. *Brain Res Mol Brain Res*; 80: 260-268.

- 90.** Psarra AM, Sekeris CE. 2008 Steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria. *IUBMB Life*; 60: 210-223.
- 91.** Razandi M, Pedram A, Levin ER. 2010 Heat shock protein 27 is required for sex steroid receptor trafficking to and functioning at the plasma membrane. *Mol Cell Biol*; 30: 3249-3261.
- 92.** Razandi M, Pedram A, Greene GL, Levin ER. 1999 Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol Endocrinol*; 13: 307-319.
- 93.** Razandi M, Alton G, Pedram A, Ghonshani S, Webb P, Levin ER. 2003 Identification of a structural determinant necessary for the localization and function of estrogen receptor alpha at the plasma membrane. *Mol Cell Biol*; 23: 1633-1646.
- 94.** Razmara A, Duckles SP, Krause DN, Procaccio V. 2007 Estrogen suppresses brain mitochondrial oxidative stress in female and male rats. *Brain Res*; 1176: 71-81.
- 95.** Sas K, Robotka H, Toldi J, Vecsei L. 2007 Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *J Neurol Sci*; 257: 221-239.
- 96.** Schäfer E, Seelert H, Reifschneider NH, Krause F, Dencher NA, Vonck J. 2006 Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem*; 281: 15370-15375.
- 97.** Schmidt O, Pfanner N, Meisinger C. 2010 Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 11: 655-667.
- 98.** Seelert H, et al. 2009 From protons to OXPHOS supercomplexes and Alzheimer's disease: structure-dynamics-function relationships of energy-transducing membranes. *Biochim Biophys Acta*; 1787: 657-671.
- 99.** Sharma PK, Thakur MK. 2006 Expression of estrogen receptor (ER) alpha and beta in mouse cerebral cortex: effect of age, sex and gonadal steroids. *Neurobiol Aging*; 27: 880-887.
- 100.** Shi C, Xu J. 2008 Increased vulnerability of brain to estrogen withdrawal-induced mitochondrial dysfunction with aging. *J Bioenerg Biomembr*; 40: 625-630.

- 101.** Shughrue P, Scrimo P, Lane M, Askew R, Merchenthaler I. 1997 The distribution of estrogen receptor-beta mRNA in forebrain regions of the estrogen receptor-alpha knockout mouse. *Endocrinology*; 138: 5649-5652.
- 102.** Simpkins JW, Dykens JA. 2008 Mitochondrial mechanisms of estrogen neuroprotection. *Brain Res Rev*; 57: 421-430.
- 103.** Singh M, Dykens JA, Simpkins JW. 2006 Novel mechanisms for estrogen-induced neuroprotection. *Exp Biol Med (Maywood)*; 231: 514-521.
- 104.** Song RX, Barnes CJ, Zhang Z, Bao Y, Kumar R, Santen RJ. 2004 The role of Shc and insulin-like growth factor 1 receptor in mediating the translocation of estrogen receptor alpha to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 101: 2076-2081.
- 105.** Stirone C, Duckles SP, Krause DN, Procaccio V. 2005 Estrogen increases mitochondrial efficiency and reduces oxidative stress in cerebral blood vessels. *Mol Pharmacol*; 68: 959-965.
- 106.** Taylor SE, Martin-Hirsch PL, Martin FL. 2010 Oestrogen receptor splice variants in the pathogenesis of disease. *Cancer Lett*; 288: 133-148.
- 107.** Thakur MK, Sharma PK. 2006 Aging of brain: role of estrogen. *Neurochem Res*; 31: 1389-1398.
- 108.** von Heijne G. 1992 Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J Mol Biol*; 225: 487-494.
- 109.** Wagner K, Rehling P, Sanjuan Szklarz LK, Taylor RD, Pfanner N, van der Laan M. 2009 Mitochondrial F1Fo-ATP synthase: the small subunits e and g associate with monomeric complexes to trigger dimerization. *J Mol Biol*; 392: 855-861.
- 110.** Weiser MJ, Foradori CD, Handa RJ. 2008 Estrogen receptor beta in the brain: from form to function. *Brain Res Rev*; 57: 309-320.
- 111.** Wilson ME, Rosewell KL, Kashon ML, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Wise PM. 2002 Age differentially influences estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) gene expression in specific regions of the rat brain. *Mech Ageing Dev*; 123: 593-601.
- 112.** Xia Z, Gale WL, Chang X, Langenau D, Patino R, Maule AG, Densmore LD. 2000 Phylogenetic sequence analysis, recombinant expression, and tissue distribution of a channel catfish estrogen receptor beta. *Gen Comp Endocrinol*; 118: 139-149.

- 113.** Yager JD, Chen JQ. 2007 Mitochondrial estrogen receptors--new insights into specific functions. *Trends Endocrinol Metab*; 18: 89-91.
- 114.** Yamaguchi-Shima N, Yuri K. 2007 Age-related changes in the expression of ER-beta mRNA in the female rat brain. *Brain Res*; 1155: 34-41.
- 115.** Yang SH, Sarkar SN, Liu R, Perez EJ, Wang X, Wen Y, Yan LJ, Simpkins JW. 2009 Estrogen receptor beta as a mitochondrial vulnerability factor. *J Biol Chem*; 284: 9540-9548.
- 116.** Yang SH, et al. 2004 Mitochondrial localization of estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 101: 4130-4135.
- 117.** Young JC, Hoogenraad NJ, Hartl FU. 2003 Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. *Cell*; 112: 41-50.
- 118.** Zha J, Weiler S, Oh KJ, Wei MC, Korsmeyer SJ. 2000 Posttranslational N-myristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis. *Science*; 290: 1761-1765.
- 119.** Zhao L, Brinton RD. 2007a WHI and WHIMS follow-up and human studies of soy isoflavones on cognition. *Expert Rev Neurother*; 7: 1549-1564.
- 120.** Zhao L, Brinton RD. 2007b Estrogen receptor alpha and beta differentially regulate intracellular Ca(2+) dynamics leading to ERK phosphorylation and estrogen neuroprotection in hippocampal neurons. *Brain Res*; 1172: 48-59.
- 121.** Zhao L, Chen S, Ming Wang J, Brinton RD. 2005 17beta-estradiol induces Ca²⁺ influx, dendritic and nuclear Ca²⁺ rise and subsequent cyclic AMP response element-binding protein activation in hippocampal neurons: a potential initiation mechanism for estrogen neurotrophism. *Neuroscience*; 132: 299-311.
- 122.** Zheng J, Ramírez VD. 1999a Purification and identification of an estrogen binding protein from rat brain: oligomycin sensitivity-conferring protein (OSCP), a subunit of mitochondrial F₀F₁-ATP synthase/ATPase. *J Steroid Biochem Mol Biol*; 68: 65-75.
- 123.** Zheng J, Ramírez VD. 1999b Rapid inhibition of rat brain mitochondrial proton F₀F₁-ATPase activity by estrogens: comparison with Na⁺, K⁺ -ATPase of porcine cortex. *Eur J Pharmacol*; 368: 95-102.

124. Zwain IH, Yen SS. 1999 Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology*; 140: 3843-3852.

ABREVIATURAS

ARH: núcleo arcuato del hipotálamo
AVPV: núcleo paraventricular anteroventral del hipotálamo
CA1 y CA3: *cornu ammonis* 1 y 3 del hipocampo
COX: citocromo c oxidasa
DBD: dominio de unión al DNA
ER α y ER β : receptor a estrógenos alfa y beta
FOF1-ATP sintasa: complejo V de la fosforilación oxidativa; ATPasa mitocondrial
HSP70/90: proteínas de choque térmico 70 o 90
IMS: espacio intermembranal de la mitocondria
LBD: dominio de unión al ligando
MEM: membrana externa mitocondrial
mHSP70: proteína mitocondrial de choque térmico 70
MIM: membrana interna mitocondrial
MPN: núcleo preóptico medial del hipotálamo
MRC: cadena respiratoria mitocondrial
mtER: receptor a estrógenos mitocondrial
mTPS: secuencia peptídica de localización mitocondrial
NLS: secuencia de localización nuclear
OSCP: proteína que confiere sensibilidad a la oligomicina
pBST: núcleo principal de la estría terminal
POA: área preóptica del hipotálamo
SON: núcleo supraóptico del hipotálamo
TIM: translocasa de la membrana interna mitocondrial
TOM: translocasa de la membrana externa mitocondrial
VMN: núcleo ventromedial del hipotálamo

ANEXO 1

- Parte de los resultados de este trabajo se publicaron en la revista *Experimental Gerontology* en el artículo: Álvarez-Delgado, C., et al (2010) *Different expression of α and β mitochondrial estrogen receptors in the aging rat brain: Interaction with respiratory complex V*. *Exp Gerontol* 45(7-8):580-5.

Experimental Gerontology 45 (2010) 580–585



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Gerontology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/expgero



Different expression of α and β mitochondrial estrogen receptors in the aging rat brain: Interaction with respiratory complex V

Carolina Álvarez-Delgado^a, C. Adriana Mendoza-Rodríguez^a, Ofir Picazo^b, Marco Cerbón^{a,*}

^aFacultad de Química, Departamento de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., Mexico

^bEscuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, México D.F., Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 October 2009

Received in revised form 11 January 2010

Accepted 14 January 2010

Available online 22 January 2010

Keywords:

Mitochondrial estrogen receptors

Rat brain

Aging

Complex V

Neuroprotection

mtER α

mtER β

ABSTRACT

Recent evidence suggests that hormonal effects on mitochondria could be mediated by mitochondrial estrogen receptors (mtERs). These receptors are new candidates for the beneficial estrogenic effects on mitochondria in different physiological conditions. The aim of this investigation was to study mtER expression during brain aging. We analyzed mtER α and mtER β expression in cortical, hippocampal and hypothalamic mitochondria of young adult (3 months) and aged (18 months) female Wistar rats by Western blot. In addition, we explored the interaction of mtER β with respiratory complex V by using coimmunoprecipitation assays. The results show that mtER α and mtER β are present in young and aged brain mitochondria. We also demonstrate that mtERs are expressed as variants and have a brain region specific distribution. The predominant mtER variants detected were of 61 and 55 kDa for mtER α and of 63 and 52 kDa for mtER β . However, we did not observe differences in the mtER α or β content between the two age groups studied. Additionally, we show that mtER β interacts with complex V.

The overall results demonstrate that there is a differential expression of mtER α and mtER β variants in different brain areas, indicating that they may participate in different functions in the brain during aging.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

ANEXO 2

- Capítulo: Álvarez-Delgado, C. y Cerbón, M. *Receptores a estrógenos mitocondriales: la señalización hormonal más allá del núcleo*. En: Efectos no reproductivos de las hormonas sexuales. Editores: Camacho-Arroyo, I. y Morales-Montor, J. Editorial UAM-PUIS. México 2011. ISBN 978-607-477-438-2.

Álvarez-Delgado C y Cerbón MA

1

Receptores a estrógenos mitocondriales: la señalización hormonal más allá del núcleo

Álvarez-Delgado C. y Cerbón MA.

RESUMEN

El estradiol (E_2) es una hormona esteroide cuyos efectos van más allá de la reproducción. Específicamente, se ha demostrado que esta hormona participa en procesos tan variados que van desde la regulación de la función cardíaca hasta la neuroprotección. El E_2 ejerce la mayoría de sus efectos a través de los receptores a estrógenos (ER) α y β (ER α y ER β). Los ERs se localizan en el núcleo, la membrana celular y la mitocondria (mtER). Su reciente localización mitocondrial ha sido de gran importancia ya que concuerda con las observaciones previas de que muchos efectos del E_2 inciden en la mitocondria, manteniendo su estructura y función. El estudio de los mtERs es importante en el contexto fisiológico, ya que ahora se sabe que son indispensables para mantener la estructura y función de la mitocondria y para regular los efectos protectores del E_2 sobre este organelo. Además, muchas enfermedades (i.e., enfermedades mitocondriales) se caracterizan por una disfunción mitocondrial heredada, por lo que es evidente que el estudio de los mtERs también aportará nuevas estrategias para su tratamiento.



Different expression of α and β mitochondrial estrogen receptors in the aging rat brain: Interaction with respiratory complex V

Carolina Álvarez-Delgado^a, C. Adriana Mendoza-Rodríguez^a, Ofir Picazo^b, Marco Cerbón^{a,*}

^aFacultad de Química, Departamento de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., Mexico

^bEscuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, México D.F., Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 October 2009

Received in revised form 11 January 2010

Accepted 14 January 2010

Available online 22 January 2010

Keywords:

Mitochondrial estrogen receptors

Rat brain

Aging

Complex V

Neuroprotection

mtER α

mtER β

ABSTRACT

Recent evidence suggests that hormonal effects on mitochondria could be mediated by mitochondrial estrogen receptors (mtERs). These receptors are new candidates for the beneficial estrogenic effects on mitochondria in different physiological conditions. The aim of this investigation was to study mtER expression during brain aging. We analyzed mtER α and mtER β expression in cortical, hippocampal and hypothalamic mitochondria of young adult (3 months) and aged (18 months) female Wistar rats by Western blot. In addition, we explored the interaction of mtER β with respiratory complex V by using coimmunoprecipitation assays. The results show that mtER α and mtER β are present in young and aged brain mitochondria. We also demonstrate that mtERs are expressed as variants and have a brain region specific distribution. The predominant mtER variants detected were of 61 and 55 kDa for mtER α and of 63 and 52 kDa for mtER β . However, we did not observe differences in the mtER α or β content between the two age groups studied. Additionally, we show that mtER β interacts with complex V.

The overall results demonstrate that there is a differential expression of mtER α and mtER β variants in different brain areas, indicating that they may participate in different functions in the brain during aging.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Steroid hormones have long been recognized as positive regulators of brain function (De Nicola et al., 2009; García-Segura and Balthazart, 2009). Specifically, estradiol (E₂) has been found to exert profound neurotrophic and neuroprotective effects in the brain (Rev. in Bethea et al., 2009; Jones and Brewer, 2009) through the action of two estrogen receptor (ER) subtypes: ER α and ER β (Dubal et al., 1999, 2006). These ERs are encoded in different genes and have been described in the nucleus (nERs), cell membrane (mERs) and, recently, in the mitochondria (mtERs) of different cell types (Monje and Boland, 2001; Chen and Yager, 2004; Yang et al., 2004, 2009; Milner et al., 2005; Stirone et al., 2005; Duckles et al., 2006; Ivanova et al., 2009; Milanesi et al., 2009).

Adding to the complexity of E₂-signaling, each ER subtype has different isoforms that result from alternative exon splicing. These variants have been found in various rodent and human tissues and cell lines (Petersen et al., 1998; Cammarata et al., 2004; Leung et al., 2006; Chung et al., 2007; Flynn et al., 2008; Ishunina and Swaab, 2008, 2009). The differential expression and subcellular

localization of these splicing variants is highly significant in the E₂-signaling diversity given that each isoform has a different structure, trafficking patterns, transactivation capacities and E₂ binding affinities (Chung et al., 2007; Irwin et al., 2008; Rev. in Weiser et al., 2008).

During normal female aging, the brain undergoes many structural and chemical changes that are linked to the reduction of circulating levels of endogenous E₂, decreased sensitivity to E₂ and changes in the synthesis of neurosteroids (Yamaguchi-Shima and Yuri, 2007; De Nicola et al., 2009; Pawluski et al., 2009). Accumulating evidence shows that aging also alters ER expression in the rodent brain (Adams et al., 2002; Wilson et al., 2002; Chakraborty et al., 2003a, 2003b; Mehra et al., 2005; Sharma and Thakur, 2006). These changes in ER expression are thought to be associated with the impaired function of important brain areas governing memory and cognition (García-Segura and Balthazart, 2009). The neuronal damage upon these brain regions is characterized by an age dependent programmed cell death that is exacerbated in different neuropathologies (Portera-Cailliau et al., 1995; Cregan et al., 2002).

It has been reported that the susceptibility to neuronal damage increases with age (Brewer et al., 2006) and has been related to the neurons' bioenergetic status, which is directly linked to the mitochondrial function (Sas et al., 2007). Mitochondrial function can be defined as the mitochondrion's capacity to manage intracellular calcium concentrations, produce energy by oxidative phosphorylation,

* Corresponding author. Address: Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, Ciudad Universitaria, Circuito interior s/n, Coyoacán 04510, México D.F., México. Tel./fax: +52 55 5622 3820.

E-mail address: mcerbon85@yahoo.com.mx (M. Cerbón).

regulate reactive oxygen species and control the fate of the cell. Furthermore, mitochondrial function depends on the supramolecular architecture of the mitochondrial respiratory chain (MRC), e.g., complex V can form dimers and oligomers (Seelert et al., 2009). It is not surprising that mitochondrial function also declines with age (Sas et al., 2007; Navarro et al., 2008; Jones and Brewer, 2009) and that mitochondrial failure is directly associated to the onset and progression of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's and Parkinson's (Brinton, 2004; Sas et al., 2007). Thus, an altered mitochondrial function could be one of the main causes for the susceptibility of the aged brain.

Since mitochondria are key elements in aging and neurodegeneration (Krause et al., 2004; Razmara et al., 2007), these organelles can be considered important targets in the neuroprotection by steroid hormones. Indeed, many studies have reported *in vitro* and *in vivo* neuroprotective effects of E_2 that converge upon different aspects of the mitochondrial function (Dubal et al., 1999; Harms et al., 2001; Nilsen et al., 2007; Zhao and Brinton, 2007). The direct effects of steroid hormones on mitochondrial function have since been further studied (Jones and Brewer, 2009). For example, it has been reported that, *in vitro*, the mRNA expression of mitochondrial DNA encoded cytochrome *c* oxidase subunit III (COX III) is stimulated by E_2 (Bettini and Maggi, 1992). Additionally, the transcription of mitochondrial DNA encoded COX I and COX II, and the activity of the COX holoenzyme are also positively regulated by E_2 (Chen and Yager, 2004; Hsieh et al., 2006). *In vivo*, progesterone (P_4) and E_2 enhance the overall oxidative capacity of whole brain mitochondria by increasing COX activity, promoting the expression of the nuclear DNA encoded alpha subunit of complex V, reducing peroxide production and balancing the antioxidant levels in the cell (Nilsen et al., 2007; Irwin et al., 2008). Also, it has been reported that E_2 inhibits the ATPase (ATP hydrolysis) of complex V (Zheng and Ramirez, 1999).

The effects of P_4 and E_2 on the expression and activity of complex V are particularly interesting given that this enzyme represents the principal source of energy in the cell and directly impacts mitochondrial function and cellular energy metabolism (Rev. in Oster and Wang, 1999, 2000). Interestingly, recent evidence suggests that the hormonal effects on mitochondria could be mediated by steroid receptor signaling initiated directly in the mitochondria or by the mtERs (Chen and Yager, 2004; Yang et al., 2004; Stirone et al., 2005; García-Segura and Balthazart, 2009). In spite of all these important findings, the exact molecular mechanism underlying the participation of mtERs in the preservation of mitochondrial function remains unknown.

The aim of this study was to analyze the mitochondrial content of ER α and ER β variants in different brain regions of both young and aged female rats, with focus in the interaction of these variants with mitochondrial respiratory complexes.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Young adult (3–5 months old) and aged (18 months old) female Wistar rats were maintained in a 12 h light, 12 h dark cycle with access to food and water *ad libitum*. Young adult rats were kept in groups of five and aged rats were housed in pairs. The estrous cycle was monitored daily by the microscopic analysis of vaginal smears. Young rats that had at least four regular cycles of 4 days were sacrificed in metestrus stage (D1). Aged rats that had irregular cycles for more than ten consecutive days were sacrificed when the vaginal cytology was diestrus like.

The Institutional Animal Care and Use Committees of the Faculty of Chemistry at the National Autonomous University of Mex-

ico approved all experimental protocols. Animals were handled in accordance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the Official Mexican Guide of the Ministry of Agriculture (SAGARPA NOM-062-Z00-1999) published in 2001. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

2.2. Brain tissue preparation

Rats were deeply anesthetized with ether and decapitated between 10 and 13 h. The hippocampus, cortex and hypothalamus were quickly dissected out over ice and tissue from 3 to 4 animals was pooled in cold isotonic buffer for mitochondria (pH 7.5) (210 mM mannitol, 70 mM sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM HEPES, 0.5 mg/mL lipid-free albumin and complete protease inhibitor cocktail (Roche, Basel, Switzerland)) for subcellular fractionation.

2.3. Subcellular fractionation of rat brain tissues

All steps of the subcellular fractionation procedure and centrifugations were performed at 4 °C. All centrifugation steps were made in a GS-15R centrifuge with a F2402H rotor (Beckman Coulter, Fullerton, USA). Hippocampal, cortical and hypothalamic pools were homogenized in 1 mL of isotonic buffer for mitochondria with 20 strokes of a tissue grinder (Pestle 22) (Kontes, Düsseldorf, Germany). The homogenate was centrifuged for 10 min at 1000g. The supernatant was discarded and the pellet was re-homogenized with 10 strokes of the tissue grinder in 1 mL of isotonic buffer for mitochondria. This suspension was centrifuged for 10 min at 1000g, the supernatant was discarded and the pellet was resuspended in isotonic buffer for mitochondria. The homogenate was centrifuged for a third time for 10 min at 1000g and the remaining supernatant was centrifuged for 32 min at 15,000g. This last centrifugation yielded a mitochondrial pellet and a cytosolic supernatant. The mitochondrial pellet was washed in mitochondrial washing buffer (pH 7.5) (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 250 mM sucrose and complete protease inhibitor cocktail (Roche)) and centrifuged for 32 min at 15,000g. Finally, the mitochondrial pellet was resuspended in 150–200 μ L of mitochondrial washing buffer. The mitochondrial and cytosolic fractions were stored at –70 °C until they were used for Western blot.

2.4. Protein coimmunoprecipitation

All coimmunoprecipitation (CoIP) steps and centrifugations were performed at 4 °C in a GS-15R centrifuge with a F2402H rotor (Beckman Coulter). All primary and secondary antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA). For CoIP, 3, 5 and 18 months old rats were used in Diestrus. Whole brain (except cerebellum, which has a unique cellular structure) was quickly dissected out and homogenized with a tissue grinder (Kontes) in 2 mL of immunoprecipitation buffer NP-40 (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% (v/v) NP-40 and complete protease inhibitor cocktail (Roche)) or RIPA (1 \times PBS pH 7.4, 1% (v/v) NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS and protease inhibitor cocktail (Roche)). The suspension was further homogenized with a 21G syringe. Whole cell brain protein was obtained by centrifugation at 12,500 rpm for 15 min. In parallel, whole brain mitochondria were isolated from 3 to 18 months old rats and mitochondrial protein was obtained as described in Section 2.3. Five-hundred microgram of mitochondrial protein were used for the CoIP experiments described below and 1 mg of whole cell brain protein was diluted in RIPA and precleared with 0.25 μ g of normal mouse IgG (Dako, Carpinteria, USA). CoIP was performed as described by the antibodies manufacturer (Santa Cruz Biotechnology). Briefly, whole cell or mitochondrial protein was

incubated for 2 h with 2 μ g of primary antibody for F₁-ATPase (A-8; sc-74549) or ER β (1531; sc-53494). Twenty microliter of Protein A/G-Agarose (Santa Cruz Biotechnology) was added and samples were incubated overnight in a rotating device. The pellet was recovered by centrifugation at 3000 rpm for 2 min and washed 3–4 times with RIPA buffer. After the final wash, immune complexes were denatured by boiling in 40 μ L 2 \times Laemmli sample buffer (4% SDS, 20% glycerol, 10% β -mercaptoethanol, 0.004% bromophenol blue, 125 mM Tris-HCl) and resolved in 8% or 10% polyacrylamide gels. Electrophoresis and Western blot were performed as described in Section 2.5 with 0.1 μ g/mL anti-ER β (1531; sc-53494).

2.5. Protein expression (Western blot)

Whole cell, cytosolic and mitochondrial protein concentration was determined by the Bradford method (Bradford, 1976). Western blot analysis was performed as previously described (Towbin et al., 1979). Briefly, whole cell, mitochondrial and cytosolic proteins were separated in 8% or 10% polyacrylamide gels, electrotransferred to a PVDF membrane (Immobilon-P, Millipore, Billerica, USA) and probed with the following primary antibodies from Santa Cruz Biotechnology: 0.8 μ g/mL anti-ER α (MC-20; sc-542), 0.4 μ g/mL anti-ER β (1531; sc-53494) and 0.2 μ g/mL anti-F₁-ATP-synthase (F₁-ATPase or F₁-ATPsyn) (A-8; sc-74549). Anti-HSP70 (MA3-028) (Affinity BioReagents, Golden, USA) was used at 2.32 μ g/mL for the detection of the mitochondrial heat-shock protein-70. The detection of HSP70 and F₁-ATPsyn was used as a subcellular fractionation control. NeuN (MAB-377) (Millipore, Billerica, USA) was used at 5 μ g/mL as a nuclear marker. The secondary antibody used was 0.00005 μ g/mL goat-anti-mouse IgG-HRP (sc-2005, Santa Cruz Biotechnology). All antibodies were diluted in TBS-0.1% Tween (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Protein bands were detected by the ECL chemiluminiscent kit (Amersham Biosciences, Fairfield, USA).

2.6. Statistical analysis

Values were expressed as means \pm standard error. Statistically significant differences ($P < 0.05$) between groups were evaluated using Student's *t*-test. (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA).

3. Results

3.1. ER α and ER β are present in young and aged rat brain mitochondria and have different subcellular distributions and variant expression

ER α and ER β protein expression was analyzed in hippocampal, cortical and hypothalamic mitochondria and cytosol from the two age groups to compare the patterns of protein expression and detect the possible changes associated with age. In mitochondria, ER α was detected as two variants of 55 and 61 KDa in young and aged brains (Fig. 1A–C, upper panel, lanes 4–5). ER β was present as two mitochondrial variants of 52 and 63 KDa in cortex and hypothalamus, while in hippocampal mitochondria only the 52 KDa variant was detected (Fig. 1A–C, middle panel, lanes 4–5).

In parallel with mtERs we assessed the cytosolic variants for both ERs. These were distributed differently than their mitochondrial counterparts. Cytosolic ER α was present as a ~55 KDa variant in the three brain areas studied. Cytosolic ER β was detected as a ~52 KDa variant in the hippocampus and appeared to be less abundant than the mitochondrial form. The cytosolic variant for ER β found in cortex and hypothalamus was a ~63 KDa protein that

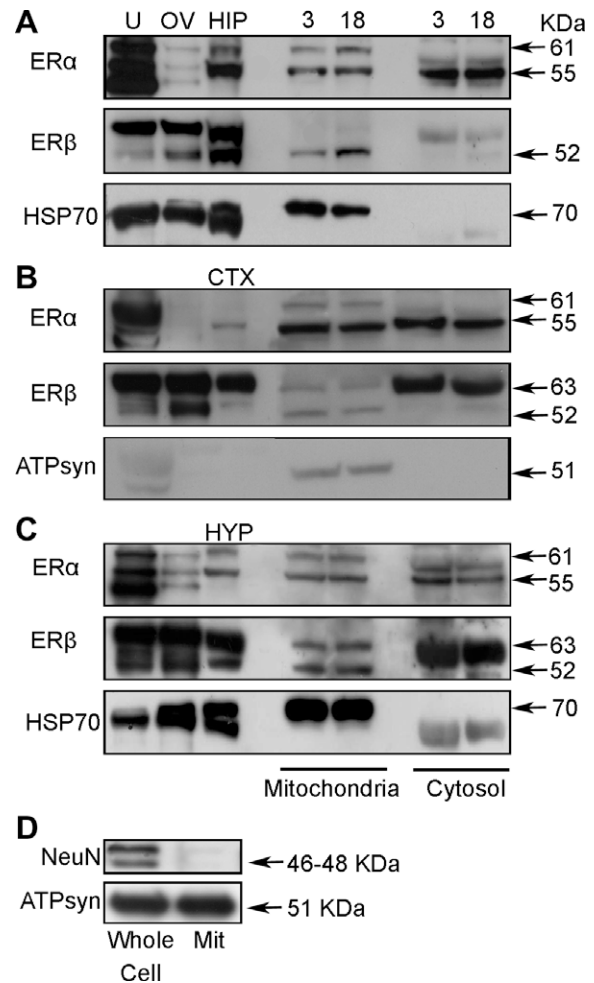


Fig. 1. ERs are expressed as different variants in the mitochondria of distinct brain areas. Protein expression was analyzed by Western blot in the (A) hippocampus, (B) cortex and (C) hypothalamus of young adult (3 months) and aged (18 months) female Wistar Rats. (A–C, all panels) Lanes 1 and 2 are positive controls for ER α and ER β expression, respectively. 10 μ g of total uterine (U) or ovarian (OV) protein of a young rat in D1 were loaded. Lane 3: positive control for ER presence. 10 μ g of hippocampal (HIP), cortical (CTX) or hypothalamic (HYP) protein of a D1 rat were loaded. (A–C) ER α (upper panel) and ER β (middle panel) protein expression in the mitochondrial (lanes 4 and 5) and cytosolic (lanes 6 and 7) fractions. For these fractions, 20 μ g of protein were loaded. Molecular weight for mtERs is shown in the right side of each panel. (A–C, lower panels) HSP70 (A and C) and F₁-ATPsyn (B) were used as mitochondrial loading and isolation markers. Age of rats in months is indicated by the numbers on top: 3 = 3 months; 18 = 18 months. Images are representative of four independent experiments. D: Isolation controls for brain mitochondria. Whole brain cell lysate (whole cell) and isolated brain mitochondria (Mit) from a representative experiment are shown. NeuN: nuclear DNA binding protein. ATPsyn: ATP synthase.

was apparently more abundant than the mitochondrial variants (Fig. 1A–C, upper and middle panel, lanes 6–7).

3.2. mtER α and mtER β variants are unaltered during aging

mtER α and mtER β variants from young and aged rats were compared to detect possible age related changes in the quantity of protein. The levels of mtER variants remained the same between the young and aged groups in the three brain areas studied (Fig. 1A–C, upper and middle panels, lanes 4 vs. 5 and Fig. 2A–F).

It is interesting to mention that the 63 KDa mtER β variant was detected at low levels in the hippocampus (Fig. 1A, middle panel and Fig. 2B) and that mtER α was present at higher levels than mtER β in the cortex (Fig. 2C and D).

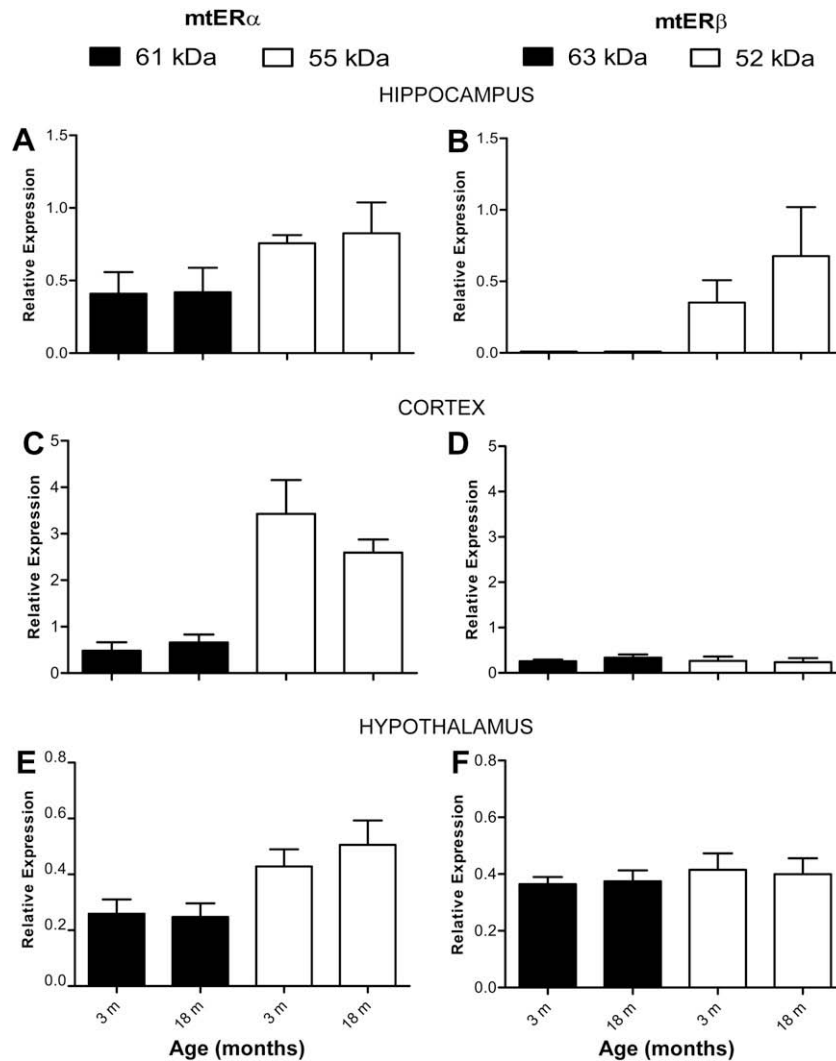


Fig. 2. Densitometric analysis of the mitochondrial variants of ER α and ER β in young and aged rats. The relative expression of mtER α and mtER β were calculated as the ratio between mtER expression and their respective mitochondrial marker expression (HSP70 or F₁-ATPsyn). No statistically significant differences in the protein expression of mtER α or β were found between the two age groups tested. (A and B) hippocampus; (C and D) cortex; (E and F) hypothalamus. Data are the mean of four independent experiments.

3.3. Mitochondrial ER β is associated with respiratory complex V throughout aging

To investigate the association of mtER β with MRC proteins, we performed a series of coimmunoprecipitation studies with whole cell and mitochondrial proteins obtained from young adult (3 and 5 months old) and aged (18 months old) rats. Data from these experiments can be observed in Fig. 3A–C, where it is evident that complex V coimmunoprecipitates with ER β . Whole brain protein from a 5 month old rat was used to precipitate ATP synthase and show its association with ER β . We also show the expected band sizes for ER β in the positive controls obtained from uterine, ovarian and brain protein from a 5 month old rat (Fig. 3A).

To corroborate the presence of the ER β /ATP synthase complexes in the context of aging, we used whole brain protein from 3 to 18 months old rats to precipitate ER β and detect ATP synthase by Western blot. Fig. 3B shows that the immunocomplex of ER β and ATP synthase does not change during aging.

Finally, we performed the immunoprecipitation with isolated mitochondrial protein from 3 to 18 months old rats. As can be seen in Fig. 3C, the mtER β /ATP synthase complex was detected in both

the young adult and the aged rats. These data further confirm that mtER β is interacting with ATP synthase.

4. Discussion

The main findings from this study were: (1) ER α and ER β were found in the mitochondria of hippocampus, cortex and hypothalamus. (2) The levels of mtER expression were sustained throughout aging. (3) The mtERs were detected as different variants in both age groups. (4) mtER β interacts with respiratory complex V in young adult and aged rats.

The observation that both ERs were found in the mitochondria of hippocampus, cortex and hypothalamus is in line with previous reports of their localization in mitochondria of a wide variety of cancer cell lines and primary cultures. Nevertheless, mtERs have been scarcely studied in vivo (Monje and Boland, 2001; Rev. in Chen et al., 2009). To our knowledge, this is the first report in which mitochondrial ERs have been localized in brain tissue.

The content of mtERs was sustained throughout aging (Fig. 2). Previous reports of whole cell ER expression in different brain

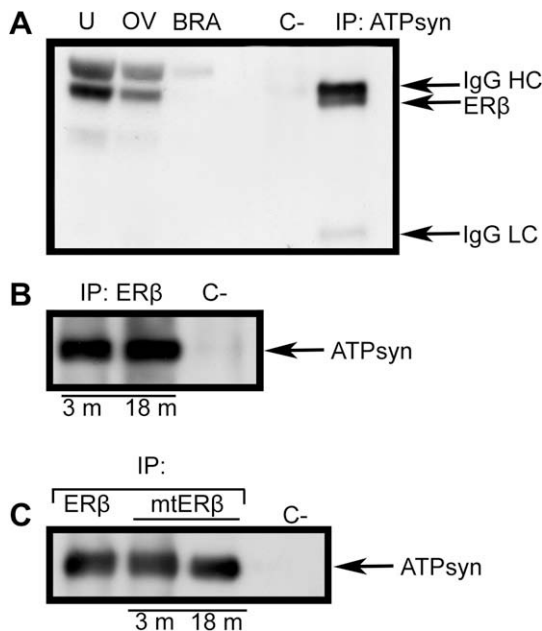


Fig. 3. Mitochondrial ER β associates with complex V in young adult and aged rats. The interaction between mtER β and complex V was studied in three age groups by immunoprecipitation (IP) of complex V (ATPsyn) or ER β and protein detection of ER β or complex V by Western blot (WB). (A) Whole cell protein from young adult rats (5 months old) was used for IP of complex V and detection of ER β (IP: ATPsyn). Positive controls for ER expression are indicated as uterus (U), ovary (OV), and whole brain (BRA). Bands corresponding to ER β and Heavy (IgG HC) or Light (IgG LC) Chains for the ATPsyn antibody are indicated by arrows. (B) Whole cell protein from young adult and aged rats (3 and 18 months old, respectively) was used for IP of ER β and detection of complex V (IP: ER β). (C) Brain mitochondrial protein from young adult and aged rats (3 and 18 months old) was used for IP of mtER β and detection of complex V (IP: mtER β , lanes 2–3). A positive control for the IP in whole cell protein is shown (IP: ER β , lane 1). For B and C, detection of complex V is indicated by arrows (ATPsyn). Negative controls (without antibody) are shown (C) for all experiments. The results are representative of three independent experiments.

areas yielded diverse results. While in some brain areas (anteroventral periventricular nucleus (AVPN) of the hypothalamus and whole hippocampus) a decrease in ER α and/or ER β is observed during aging, in other areas an increase is observed (ventromedial nucleus (VMN) of the hypothalamus), and in others no differences are detected (bed nucleus of the stria terminalis (BST), medial preoptic nucleus (MPN) and the arcuate nucleus (ARH) of the hypothalamus; cortex) (Adams et al., 2002; Wilson et al., 2002; Chakraborty et al., 2003a,b; Mehra et al., 2005; Sharma and Thakur, 2006). The present data support the notion of a complex regulation of ERs during aging in different brain areas. The finding that mtERs are present in mitochondria regardless of age suggests that they are necessary elements for correct mitochondrial function and not only as receptors for E₂-signaling and mediators of hormonal neuroprotection (Dubal et al., 1999, 2006). In the context of E₂ modulation of mitochondrial enzymes and overall mitochondrial function (Chen and Yager, 2004; Hsieh et al., 2006; Nilsen et al., 2007; Irwin et al., 2008), mtERs appear to be key proteins as suggested by their sustained expression in both age groups.

We found different protein variants for both mtERs in the brain areas studied. These variants may be the result of alternative exon splicing (Rev. in Weiser et al., 2008). In this line, it has been reported that differential isoform expression can alter the ER mediated transcriptional regulation (Chung et al., 2007). Also, it has been demonstrated that E₂ affinity varies with different isoform expression (Rev. in Weiser et al., 2008) and this can modulate the E₂ responsiveness of different tissues. In this study, we demonstrated that mtER α and mtER β variants are expressed at different levels in a region specific manner (Figs. 1 and 2). If the mtER vari-

ants are in fact ER isoforms, these results could help explain the differential regional damage observed in brain aging and provide a better understanding of the mechanisms of neuroprotection by E₂ (García-Segura and Balthazart, 2009). mtER isoforms and their function remain unclear and experiments at our laboratory are currently assessing this question.

It has been demonstrated that mitochondrial structure and function are related to the stability of MRC supercomplexes (Schäfer et al., 2006), that have been shown to be altered during aging (Seelert et al., 2009). Additionally, the decline in the proportion of supramolecular complexes and the reduction of the intact form of complex V in rat cortical mitochondria have also been demonstrated (Seelert et al., 2009) along with the well established age related mitochondrial failure in rodent models (Sas et al., 2007; Jones and Brewer, 2009; Navarro et al., 2008). Data from this study provides information on the subcellular localization of ER α and ER β in the context of non pathologic aging and show that mtERs are present in the mitochondria of both young and aged animals. Importantly, in the present study we demonstrated that mtER β interacts with complex V in young adult and aged rats. This supports the notion for the participation of mtERs in the maintenance of mitochondrial structure and stability throughout aging. However, the exact molecular mechanism by which mtERs are involved in E₂ mediated mitochondrial pathways remains an important field of study and needs further investigations.

In conclusion, we demonstrated that ER α and ER β variants are differentially localized in the mitochondria of different brain areas. Interestingly, their expression is not altered with aging. Finally, the interaction of mtER β with complex V supports a new notion for estrogenic participation in the mitochondrial energetic balance during aging.

Acknowledgments

This work was supported by grants from PAPIIT, PAIP, UNAM, CONACyT, COFAA and SIP-IPN. CAD has a fellowship from CONACyT.

References

- Adams, M.M., Fink, S.E., Shah, R.A., Janssen, W.G., Hayashi, S., Milner, T.A., McEwen, B.S., Morrison, J.H., 2002. Estrogen and aging affect the subcellular distribution of estrogen receptor- α in the hippocampus of female rats. *J. Neurosci.* 22 (9), 3608–3614.
- Bethae, C.L., Reddy, A.P., Tokuyama, Y., Henderson, J.A., Lima, F.B., 2009. Protective actions of ovarian hormones in the serotonin system of macaques: review article. *Front. Neuroendocrinol.* 30 (2), 212–238.
- Bettini, E., Maggi, A., 1992. Estrogen induction of cytochrome c oxidase subunit III in rat hippocampus. *J. Neurochem.* 58 (5), 1923–1929.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Brewer, G.J., Reichensperger, J.D., Brinton, R.D., 2006. Prevention of age-related dysregulation of calcium dynamics by estrogen in neurons. *Neurobiol. Aging* 27 (2), 306–317.
- Brinton, R.D., 2004. Requirements of a brain selective estrogen: advances and remaining challenges for developing a NeuroSERM. *J. Alzheimers Dis.* 6 (Suppl. 6), S27–S35.
- Cammarata, P.R., Chu, S., Moor, A., Wang, Z., Yang, S.H., Simpkins, J.W., 2004. Subcellular distribution of native estrogen receptor alpha and beta subtypes in cultured human lens epithelial cells. *Exp. Eye Res.* 78 (4), 861–871.
- Chakraborty, T.R., Ng, L., Gore, A.C., 2003a. Age-related changes in estrogen receptor beta in rat hypothalamus: a quantitative analysis. *Endocrinology* 144 (9), 4164–4171.
- Chakraborty, T.R., Hof, P.R., Ng, L., Gore, A.C., 2003b. Stereologic analysis of estrogen receptor alpha (ER α) expression in rat hypothalamus and its regulation by aging and estrogen. *J. Comp. Neurol.* 466 (3), 409–421.
- Chen, J.-Q., Yager, J.D., 2004. Estrogen's effects on mitochondrial gene expression: mechanisms and potential contributions to estrogen carcinogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1028, 258–272.
- Chen, J.-Q., Cammarata, P.R., Baines, C.P., Yager, J.D., 2009. Regulation of mitochondrial respiratory chain biogenesis by estrogens/estrogen receptors and physiological, pathological and pharmacological implications. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 1540–1570.

- Chung, W.C., Pak, T.R., Suzuki, S., Pouliot, W.A., Andersen, M.E., Handa, R.J., 2007. Detection and localization of an estrogen receptor beta splice variant protein (ERbeta2) in the adult female rat forebrain and midbrain. *Brain Res* 1120 (1–2), 249–267.
- Cregan, S.P., Fortin, A., MacLaurin, J.G., Callaghan, S.M., Cecconi, F., Yu, S.W., Dawson, T.M., Dawson, V.L., Park, D.F., Kroemer, G., Slack, R.S., 2002. Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. *J. Cell Biol.* 158 (3), 507–517.
- De Nicola, A.F., Pietranera, L., Beauquis, J., Ferrini, M.G., Saravia, F.E., 2009. Steroid protection in aging and age-associated diseases. *Exp. Gerontol.* 44, 34–40.
- Dubal, D.B., Shughrue, P.J., Wilson, M.E., Merchenthaler, I., Wise, P.M., 1999. Estradiol modulates bcl-2 in cerebral ischemia: a potential role for estrogen receptors. *J. Neurosci.* 19 (15), 6385–6393.
- Dubal, D.B., Rau, S.W., Shughrue, P.J., Zhu, H., Yu, J., Cashion, A.B., Suzuki, S., Gerhold, L.M., Bottner, M.B., Dubal, S.B., Merchenthaler, I., Kindy, M.S., Wise, P.M., 2006. Differential modulation of estrogen receptors (ERs) in ischemic brain injury: a role for ERalpha in estradiol-mediated protection against delayed cell death. *Endocrinology* 147 (6), 3076–3084.
- Duckles, S.P., Krause, D.N., Stirone, C., Procaccio, V., 2006. Estrogen and mitochondria: a new paradigm for vascular protection? *Mol. Interv.* 6 (1), 26–35.
- Flynn, J.M., Dimitrijevic, S.D., Younes, M., Skliris, G., Murphy, L.C., Cammarata, P.R., 2008. Role of wild-type estrogen receptor- β in mitochondrial cytoprotection of cultured normal male and female human lens epithelial cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295 (3), E637–E647.
- García-Segura, L.M., Balthazart, J., 2009. Steroids and neuroprotection: new advances. *Front. Neuroendocrinol.* 30 (2), v–ix.
- Harms, C., Lautenschlager, M., Bergk, A., Katchanov, J., Freyer, D., Kapinya, K., Herwig, U., Megow, D., Dirnagl, U., Weber, J.R., Hörtnagl, H., 2001. Differential mechanisms of neuroprotection by 17 beta-estradiol in apoptotic versus necrotic neurodegeneration. *J. Neurosci.* 21 (8), 2600–2609.
- Hsieh, Y.C., Yu, H.P., Suzuki, T., Choudhry, M.A., Schwacha, M.G., Bland, K.I., Chaudry, I.H., 2006. Upregulation of mitochondrial respiratory complex IV by estrogen receptor-beta is critical for inhibiting mitochondrial apoptotic signaling and restoring cardiac functions following trauma-hemorrhage. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 41 (3), 511–521.
- Irwin, R.W., Yao, J., Hamilton, R.T., Cadenas, E., Brinton, R.D., Nilsen, J., 2008. Progesterone and estrogen regulate oxidative metabolism in brain mitochondria. *Endocrinology* 149 (6), 3167–3175.
- Ishunina, T.A., Swaab, D.F., 2008. Age-dependent ERalpha MB1 splice variant expression in discrete areas of the human brain. *Neurobiol. Aging* 29 (8), 1177–1189.
- Ishunina, T.A., Swaab, D.F., 2009. Hippocampal estrogen receptor-alpha splice variant TADD1 in the human brain in aging and Alzheimer's disease. *Neuroendocrinology* 89 (2), 187–199.
- Ivanova, M.M., Mazhawidza, W., Dougherty, S.M., Minna, J.D., Klinge, C.M., 2009. Activity and intracellular location of estrogen receptors alpha and beta in human bronchial epithelial cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 305 (1–2), 12–21.
- Jones, T.T., Brewer, G.J., 2009. Critical age-related loss of cofactors of neuron cytochrome C oxidase reversed by estrogen. *Exp. Neurol.* 215 (2), 212–219.
- Krause, F., Scheckhuber, C.Q., Werner, A., Rexroth, S., Reifschneider, N.H., Dencher, N.A., Osiewicz, H., 2004. Supramolecular organization of cytochrome c oxidase and alternative oxidase-dependent respiratory chains in the filamentous fungus *Podospira anserina*. *J. Biol. Chem.* 279 (25), 26453–26461.
- Leung, Y.K., Mak, P., Hassan, S., Ho, S.M., 2006. Estrogen receptor (ER)-beta isoforms: a key to understanding ER-beta signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103 (35), 13162–13167.
- Mehra, R.D., Sharma, K., Nyakas, C., Vij, U., 2005. Estrogen receptor alpha and beta immunoreactive neurons in normal adult and aged female rat hippocampus: a qualitative and quantitative study. *Brain Res.* 1056 (1), 22–35.
- Milanesi, L., Vasconsuelo, A., de Boland, A.R., Boland, R., 2009. Expression and subcellular distribution of native estrogen receptor beta in murine C2C12 cells and skeletal muscle tissue. *Steroids* 74 (6), 489–497.
- Milner, T.A., Ayoola, K., Drake, C.T., Herrick, S.P., Tabori, N.E., McEwen, B.S., Warrior, S., Alves, S.E., 2005. Ultrastructural localization of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat hippocampal formation. *J. Comp. Neurol.* 491 (2), 81–95.
- Monje, P., Boland, R., 2001. Subcellular distribution of native estrogen receptor α and β isoforms in rabbit uterus and ovary. *J. Cell. Biochem.* 82, 467–479.
- Navarro, A., López-Cepero, J.M., Bández, M.J., Sánchez-Pino, M.J., Gómez, C., Cadenas, E., Boveris, A., 2008. Hippocampal mitochondrial dysfunction in rat aging. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 294 (2), R501–R509.
- Nilsen, J., Irwin, R.W., Gallaher, T.K., Brinton, R.D., 2007. Estradiol in vivo regulation of brain mitochondrial proteome. *J. Neurosci.* 27 (51), 14069–14077.
- Oster, G., Wang, H., 1999. ATP synthase: two motors, two fuels: minireview. *Structure* 7 (4), R67–R72.
- Oster, G., Wang, H., 2000. Reverse engineering a protein: the mechanochemistry of ATP synthase: review article. *Biochim. Biophys. Acta* 1458 (2–3), 482–510.
- Pawluski, J.L., Brummelte, S., Barha, C.K., Crozier, T.M., Galea, L.A., 2009. Effects of steroid hormones on neurogenesis in the hippocampus of the adult female rodent during the estrous cycle, pregnancy, lactation and aging. *Front. Neuroendocrinol.* 30 (3), 343–357.
- Petersen, D.N., Tkalcovic, G.T., Koza-Taylor, P.H., Turi, T.G., Brown, T.A., 1998. Identification of estrogen receptor β_2 , a functional variant of estrogen receptor β expressed in normal rat tissues. *Endocrinology* 139 (3), 1082–1092.
- Portera-Cailliau, C., Hedreen, J.C., Price, D.L., Koliatsos, V.E., 1995. Evidence for apoptotic cell death in Huntington disease and excitotoxic animal models. *J. Neurosci.* 15 (5 Pt 2), 3775–3787.
- Razmara, A., Duckles, S.P., Krause, D.N., Procaccio, V., 2007. Estrogen suppresses brain mitochondrial oxidative stress in female and male rats. *Brain Res.* 1176, 71–81.
- Sas, K., Robotka, H., Toldi, J., Vécsei, L., 2007. Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *J. Neurosci.* 27 (1–2), 221–239.
- Schäfer, E., Seelert, H., Reifschneider, N.H., Krause, F., Dencher, N.A., Vonk, J., 2006. Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes. *J. Biol. Chem.* 281 (22), 15370–15375.
- Seelert, H., Dani, D.N., Dante, S., Hauß, T., Krause, F., Schäfer, E., Frenzel, M., Poetsch, A., Rexroth, S., Shwaßmann, H.J., Suhai, T., Vonck, J., Dencher, N.A., 2009. From protons to OXPHOS supercomplexes and Alzheimer's disease: structure-dynamics-function relationships of energy-transducing membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1787, 657–671.
- Sharma, P.K., Thakur, M.K., 2006. Expression of estrogen receptor (ER) alpha and beta in mouse cerebral cortex: effect of age, sex and gonadal steroids. *Neurobiol. Aging* 27 (6), 880–887.
- Stirone, C., Duckles, S.P., Krause, D.N., Procaccio, V., 2005. Estrogen increases mitochondrial efficiency and reduces oxidative stress in cerebral blood vessels. *Mol. Pharmacol.* 68 (4), 959–965.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 4350–4354.
- Weiser, M.J., Foradori, C.D., Handa, R.J., 2008. Estrogen receptor beta in the brain: from form to function: review article. *Brain Res.* 57, 309–320.
- Wilson, M.E., Rosewell, K.L., Kashon, M.L., Shughrue, P.J., Merchenthaler, I., Wise, P.M., 2002. Age differentially influences estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) gene expression in specific regions of the rat brain. *Mech. Ageing Dev* 123 (6), 593–601.
- Yamaguchi-Shima, N., Yuri, K., 2007. Age-related changes in the expression of ER-beta mRNA in the female rat brain. *Brain Res.* 1155, 34–41.
- Yang, S.H., Liu, R., Perez, E.J., Wen, Y., Stevens Jr., S.M., Valencia, T., Brun-Zinkernagel, A.M., Prokai, L., Will, Y., Dykens, J., Koulen, P., Simpkins, J.W., 2004. Mitochondrial localization of estrogen receptor beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (12), 4130–4135.
- Yang, S.H., Sarkar, S.N., Liu, R., Perez, E.J., Wang, X., Wen, Y., Yan, L.J., Simpkins, J.W., 2009. Estrogen receptor beta as a mitochondrial vulnerability factor. *J. Biol. Chem.* 284 (14), 9540–9548.
- Zhao, L., Brinton, R.D., 2007. Estrogen receptor alpha and beta differentially regulate intracellular Ca(2+) dynamics leading to ERK phosphorylation and estrogen neuroprotection in hippocampal neurons. *Brain Res.* 1172, 48–59.
- Zheng, J., Ramirez, V.D., 1999. Rapid inhibition of rat brain mitochondrial proton FOF1-ATPase activity by estrogens: comparison with Na⁺, K⁺-ATPase of porcine cortex. *Eur. J. Pharmacol.* 368 (1), 95–102.

Receptores a estrógenos mitocondriales: la señalización hormonal más allá del núcleo

Álvarez-Delgado C. y Cerbón MA.

RESUMEN

El estradiol (E_2) es una hormona esteroide cuyos efectos van más allá de la reproducción. Específicamente, se ha demostrado que esta hormona participa en procesos tan variados que van desde la regulación de la función cardíaca hasta la neuroprotección. El E_2 ejerce la mayoría de sus efectos a través de los receptores a estrógenos (ER) α y β (ER α y ER β). Los ERs se localizan en el núcleo, la membrana celular y la mitocondria (mtER). Su reciente localización mitocondrial ha sido de gran importancia ya que concuerda con las observaciones previas de que muchos efectos del E_2 inciden en la mitocondria, manteniendo su estructura y función. El estudio de los mtERs es importante en el contexto fisiológico, ya que ahora se sabe que son indispensables para mantener la estructura y función de la mitocondria y para regular los efectos protectores del E_2 sobre este organelo. Además, muchas enfermedades (i.e., enfermedades mitocondriales) se caracterizan por una disfunción mitocondrial heredada, por lo que es evidente que el estudio de los mtERs también aportará nuevas estrategias para su tratamiento.

INTRODUCCIÓN

Las últimas décadas en el estudio de las hormonas esteroides han dejado claro que éstas son moléculas pleiotrópicas y participan no sólo en la regulación de la reproducción, sino en diversos procesos fisiológicos. Gran parte de la investigación sobre los efectos no reproductivos de las hormonas esteroides se ha enfocado en el estradiol (E_2). En general, varios grupos de investigación han demostrado que el E_2 tiene un efecto positivo sobre la estructura y/o función ósea, cardíaca, muscular, endotelial, vascular y cerebral (Wise, et al., 2001; Stirone, et al., 2005; Hsieh, et al., 2006a, 2006b; Hertrampf, et al., 2008;

Vasconsuelo, et al., 2008; Bethea, et al., 2009; García-Segura y Balthazart, 2009), entre otros tejidos.

Los efectos del E₂ sobre el cerebro han sido de especial interés en el contexto fisiológico y patológico, e.g., su participación y capacidad neuroprotectora en procesos como el envejecimiento, la lactancia y las enfermedades neurodegenerativas.

Los mecanismos exactos por los cuales el E₂ ejerce sus efectos neuroprotectores aún no se han descrito en su totalidad. Sin embargo, ahora se sabe que el E₂ es una señal intracelular importante con la capacidad de activar cascadas de señalización (vía de las cinasas MAPK, la ruta PI3K y vías asociadas a los receptores acoplados a proteínas G, entre otras) (Brinton, 2008); regular las concentraciones intracelulares de calcio (Brewer, et al., 2006); modular el balance de proteínas pro- y anti-apoptóticas (Nilsen y Brinton, 2003; Zhao y Brinton, 2007); mejorar el estatus de oxidación celular (Borrás, et al., 2003) e incluso influir en el metabolismo de la glucosa (Brinton, 2008 y Simpkins, et al., 2009). Estos efectos son particularmente importantes en el cerebro, que está constituido por tejido postmitótico y de alto gasto energético (20% de la glucosa y el oxígeno totales se consumen en este órgano) en el que la regulación de las concentraciones de calcio es esencial para la neurotransmisión y el balance entre sobrevivencia y muerte (Bolaños, et al., 2009).

La mayoría de los efectos biológicos del E₂ son mediados por dos subtipos de receptores a estrógenos (ER) codificados en diferentes genes: el receptor a estrógenos alfa y el beta (ER α y ER β). Ambos receptores se han localizado en el núcleo, membranas celulares (Moore y Evans, 1999) y, más recientemente, se han detectado en las mitocondrias (mtER) de diferentes tejidos y tipos celulares (Monje y Boland, 2001; Chen y Yager, 2004; Chen, et al. 2004a; Yang, et al., 2004; Milner, et al., 2005; Stirone, et al., 2005; Duckles, et al., 2006; Pedram, et al., 2006; Ivanova, et al., 2009; Milanesi, et al., 2009; Yang, et al., 2009; Álvarez-Delgado, et al., 2010).

Más recientemente, ha llamado la atención el hecho de que varios de los efectos neuroprotectores del E₂ inciden en la mitocondria. Este organelo está implicado en muchos de los eventos celulares: produce la mayoría del ATP mediante la fosforilación oxidativa (Chen, et al., 2009); funciona como un regulador de calcio intracelular (Brewer, et al., 2006); controla el balance de la muerte celular a través de la permeabilización de su membrana externa y del balance de diferentes proteínas pro- y anti-apoptóticas (Pradelli, et al., 2010); es el sitio donde se produce la mayor cantidad de especies reactivas de oxígeno (Lee y Wei, 2007) y donde se lleva a cabo la esteroidogénesis (Hu, et al., 2010). Además, la mitocondria tiene su propio DNA (mtDNA) en el que se encuentran

codificadas trece proteínas que forman parte de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM); dos moléculas de rRNA y 22 moléculas de tRNA. Sin embargo, para la estructura funcional de la CRM son necesarios diversos factores y proteínas, la mayoría de los cuales están codificados en el DNA nuclear (nDNA) (Falkenberg, et al. 2007). Teniendo en cuenta lo anterior, podemos pensar en la mitocondria y el núcleo como organelos interdependientes de cuya cooperación resulta el ensamblaje final de la CRM, indispensable para todas las funciones celulares.

Existe una clara relación entre los efectos estrogénicos a nivel celular y el estatus mitocondrial. Básicamente, se ha comprobado que el E₂ promueve la función mitocondrial en todos sus aspectos: producción de ATP, síntesis de proteínas de la CRM y capacidad de tolerar diferentes daños (Chen, et al., 2005). La reciente localización de los ERs en la mitocondria de diferentes tejidos y tipos celulares apoya esta nueva idea de que los efectos estrogénicos en la mitocondria pueden estar modulados por los mtERs y se suma al complejo mapa de la señalización hormonal.

A lo largo de este capítulo, se presentan las evidencias y avances de la investigación sobre los mtERs en diferentes modelos tanto *in vivo* como *in vitro*, así como los datos experimentales que llevaron a su descubrimiento.

EL E₂ Y SUS EFECTOS SOBRE LA MITOCONDRIA

En general, se ha demostrado que tanto en modelos *in vivo* como en aislados mitocondriales, el E₂ induce la eficiencia respiratoria y el balance antioxidante. En muchos casos, la actividad del E₂ es mediada por ERs (Chen, et al., 2004b).

Con respecto al balance antioxidante, la participación del E₂ tomó mucha importancia después de la observación de que, comúnmente, las hembras viven más que los machos. Esta diferencia en la expectativa de vida llevó a distintos grupos de investigación a estudiar la participación de las hormonas sexuales en la longevidad. En modelos *in vivo* se ha demostrado que las mitocondrias de macho producen casi el doble de H₂O₂ y a la vez tienen menos defensas antioxidantes, i.e., menor actividad de la glutatión-peroxidasa y la Mn-superóxido-dismutasa. Estas diferencias en el estatus de oxidación se deben en parte a la presencia del E₂, lo que explicaría el mejor balance antioxidante en las hembras. Además, se comprobó que el E₂ actúa directamente a nivel mitocondrial, promoviendo las defensas antioxidantes, sin la participación de componentes citoplasmáticos (Borrás, et al., 2003, 2009; Nilsen, et al., 2007). Con respecto a los efectos del E₂ sobre la mitocondria, muchos

estudios sugieren que son los propios mtERs los que pueden mediar la respuesta a la hormona, lo que explicaría sus efectos aún en aislados puros mitocondriales libres de citosol (Psarra y Sekeris, 2008).

La eficiencia respiratoria resulta del acoplamiento de diferentes factores y actividades, e.g., la expresión y ensamblaje de proteínas de la CRM, la actividad de las enzimas respiratorias (complejos I, II, III, IV y V ó ATP sintasa), el acoplamiento del gradiente de protones con la actividad de la ATP sintasa y la arquitectura supramolecular de los complejos respiratorios. Los resultados de diferentes estudios indican que el E₂ puede mejorar la función mitocondrial en estos diferentes aspectos, indicando la importancia de esta hormona en el mantenimiento del balance bioenergético de la célula (Chen, et al., 2009).

BLANCOS MITOCONDRIALES DEL E₂

El E₂ es capaz de inducir efectos sobre la morfología y función mitocondrial actuando sobre las proteínas de la CRM, el mtDNA y las membranas mitocondriales.

Uno de los blancos estrogénicos más importantes es la ATP sintasa. El E₂ tiene un efecto positivo sobre la síntesis de ATP mediante la inducción de la expresión y actividad de esta enzima. Específicamente, se demostró que en mitocondrias de cerebro de rata tratadas con E₂ aumenta la expresión de las subunidades α , β y γ de la porción catalítica (F1-ATP sintasa) de la holoenzima (Nilsen, et al., 2007; Irwin, et al., 2008). De esta manera, el E₂ puede influenciar la capacidad de síntesis de la ATP sintasa y promover el balance energético de la célula. La actividad de la holoenzima resulta de la coordinación entre la síntesis e hidrólisis de ATP, es por esto que la ATP sintasa tiene proteínas reguladoras. Una de ellas, la proteína de sensibilidad a la oligomicina (OSCP), forma parte del brazo periférico de la ATP sintasa. El E₂ puede unirse a esta proteína y modular la actividad de hidrólisis de la ATP sintasa, lo que se traduciría en mayores concentraciones de ATP, que es necesario para la mayoría de las funciones celulares (Zheng y Ramírez, 1999a,b).

La arquitectura supramolecular y estabilidad de los complejos respiratorios son aspectos muy importantes en la eficiencia de la CRM. De hecho, ahora se sabe que en las mitocondrias de organismos y de tejidos muy diversos (cerebro, hígado, músculo cardíaco y esquelético) las formas funcionales de la mayoría de los complejos de la CRM (complejos I-V) son dímeros u oligómeros (e.g., supercomplejos I₂, I₁III₂, I₁III₂IV₀₋₄, y dímeros/oligómeros de la ATP sintasa) que facilitan la transferencia de electrones y, por lo tanto, la síntesis de ATP (Schäfer, et

Otro de los blancos mitocondriales del E_2 es el mtDNA. La modulación de la transcripción y traducción del mtDNA por E_2 se ha observado *in vivo* e *in vitro*, lo que indica que es un mecanismo activo en condiciones fisiológicas. La regulación estrogénica del mtDNA es un punto importante ya que la expresión de los genes mitocondriales es indispensable para el ensamblaje de la CRM. De los trece genes mitocondriales que codifican proteínas, se ha demostrado que el E_2 (1-300 nM) induce la transcripción de ND1 (subunidad I de la NADH:ubiquinona oxidoreductasa, complejo I), COI, COII y COIII (subunidades I, II y III de la citocromo c oxidasa, complejo IV) (Figura 1) (Bettini y Maggi, 1992; Chen, et al., 2004, 2007; Hsieh, et al., 2006a; Chen, et al., 2005). Además, algunos de los efectos del E_2 sobre la transcripción del mtDNA son inhibidos por el compuesto anti-estrogénico ICI 182 780 (Fulvestrant), lo que indica que están regulados por los ERs (Chen y Yager, 2004). El anti-estrógeno Fulvestrant actúa como un antagonista puro, bloqueando la actividad transcripcional de ambos ERs, impidiendo su translocación al núcleo y promoviendo su degradación (Howell, 2006). En este sentido, es interesante que el Fulvestrant también bloquee los efectos estrogénicos sobre el mtDNA, lo que sugiere un mecanismo de acción similar al de la transcripción nuclear. De acuerdo con lo anterior y basándose en los estudios de transcripción del mtDNA, se demostró la presencia de elementos de respuesta a estrógenos (ERE) en la región reguladora (D-loop) del mtDNA de humano y de roedor (mtERE) (Figura 1); además de la unión de $ER\alpha$ y $ER\beta$ a estos mtEREs (Demonacos, et al., 1996; Chen, et al., 2004).

El mtDNA se transcribe y produce un mRNA policistrónico que tiene toda la información para producir las trece subunidades mitocondriales de la CRM, además de los rRNAs y tRNAs mitocondriales. La transcripción del mtDNA parte de un origen para la cadena pesada y otro origen para la cadena ligera, ambos localizados en el D-loop (Figura 1) (Falkenberg, et al., 2007). Teniendo en cuenta lo anterior, podríamos pensar que el E_2 tiene la capacidad de activar la transcripción de todos los genes mitocondriales, mediante la unión de los ERs al mtDNA. Sin embargo, al parecer éste no es el caso: al menos se conoce un trabajo en el que tanto el E_2 como un agonista específico de $ER\beta$ (diarilpropionitrilo; DPN) inducen la transcripción de COI y COII, pero no de ND2 (subunidad II de la NADH:ubiquinona oxidoreductasa, complejo I) (Hsieh, et al., 2006a), lo que indica que la regulación de la transcripción del mtDNA no sólo se da a través de los mtEREs. Además, una vez que el mRNA mitocondrial se ha producido, existen mecanismos de regulación de la traducción mitocondrial que determinan qué tanto se expresará como proteína funcional cada uno de los genes, por lo que los efectos del E_2 sobre el mtDNA son sólo el inicio de la serie de

modificaciones que podemos ver en la morfología y función mitocondriales.

Por otra parte, los efectos del E₂ sobre el mtDNA no explican todas las modificaciones mitocondriales observadas ante el tratamiento con la hormona, i.e., los efectos sobre el balance antioxidante, regulados en parte por genes codificados en el nDNA, que también son regulados positivamente por el E₂ (Stirone, et al., 2005; O'Lone, et al., 2007).

Por lo tanto, para entender de una manera global los efectos estrogénicos sobre la mitocondria, es necesario tomar en cuenta que tanto la morfología como la función mitocondriales son el resultado de la coordinación núcleo-mitocondria y que ambos organelos son blancos reconocidos del E₂.

LOS RECEPTORES A ESTRÓGENOS MITOCONDRIALES (mtER) SE ENCUENTRAN EN DIVERSOS TEJIDOS Y MEDIAN LOS EFECTOS DEL E₂ SOBRE LA MITOCONDRIA

La participación del E₂ sobre la morfología y función mitocondrial se ha demostrado consistentemente en diferentes modelos y los resultados sugieren que la hormona podría actuar directamente en la mitocondria, independientemente de factores nucleares o citoplásmicos. De acuerdo con esto, se han localizado ambos subtipos de ER en las mitocondrias de diferentes tejidos y tipos celulares (Tabla 1).

Los primeros indicios de la acción estrogénica sobre la mitocondria se encuentran en experimentos en los que se muestra la unión del E₂ a membranas y proteínas mitocondriales (Grossman, et al., 1989; Zheng y Ramírez, 1999a; Monje y Boland, 2001). Estos estudios llevaron a la búsqueda de mtERs y proteínas mitocondriales con unión al E₂. Desde entonces, el descubrimiento y la caracterización de los mtERs por diversas técnicas (immunogold, inmunocitoquímica, microscopía confocal y electrónica, fraccionamiento subcelular y Western blot) han ido en aumento.

El primer reporte sobre la localización de los ERs en mitocondria lo presentaron Monje y Boland (2001) en un modelo *in vivo*, al demostrar que ER α y ER β se encuentran en las mitocondrias de útero y ovario de conejo y se distribuyen de manera diferencial en otros compartimentos subcelulares, i.e., se detectó mayor cantidad de mtER α y mtER β en útero en comparación con ovario, donde la localización subcelular de ambos ERs es predominantemente citosólica o nuclear.

Posteriormente, Chen, et al. profundizaron en la investigación de los mtERs y su relación con los efectos estrogénicos sobre la mitocondria en las líneas tumorales MCF-7 (carcinoma mamario) y HepG2 (hepatocarcinoma). A partir de los reportes del grupo de Chen, la mayoría

de los estudios sobre mtERs se han enfocado en diferentes modelos de cáncer, sobre todo en células tumorales dependientes de estrógenos.

Tabla 1: Localización mitocondrial de ER α y ER β

Autores	Año	Tejido/Tipo Celular	mtERα	mtERβ	Técnicas
Monje y Boland	2001	Útero y Ovario de conejo	X	X	FS, WB
Chen, et al; Chen y Yager	2004	MCF-7 y HepG2	X	X	FS, WB, MC, IG
Yang, et al.	2004	Cardiomiocitos y neuronas de rata; HT-22		X	FS, WB, MC, MF, ICQ, MALDI-TOF/MS
Cammarata, et al.	2004	HLE-B3		X	FS, WB, MC
Milner, et al.	2005	Hipocampo de rata		X	ICQ, IG, ME
Stirone, et al.	2005	Capilares cerebrales de rata	X		FS, WB, MC
Pedram, et al.	2006	MCF-7; HCC-1569	X	X	FS, WB, MC
Flynn, et al.	2007	Cristalino humano		X	MC
Milanesi, et al.	2008	C2C12	X	X	FS, WB, MC
Ivanova, et al.	2009	Células bronquiales de humano	X	X	MC
Álvarez-Delgado, et al.	2010	Hipocampo, corteza e hipotálamo de rata	X	X	FS, WB, IP

Tabla 1. Se resume la evidencia de la localización mitocondrial de ER α y ER β en diversos tejidos y líneas celulares. FS: Fraccionamiento subcelular; WB: Western blot; MC: microscopía confocal; ME: microscopía electrónica; MF; microscopía de fluorescencia; IG: Immunogold; ICQ: inmunocitoquímica; MALDI-TOF/MS: desorción/ionización láser asistida por matriz/espectrometría de masas; IP: inmunoprecipitación. Las líneas celulares se describen en el texto. X= mtER localizado en cada caso.

En MCF-7 y HepG2 se demostró la presencia de mtER α y mtER β en la matriz mitocondrial (Chen, et al., 2004a), donde también se encuentra el mtDNA. Además, se comprobó que tanto las proteínas mitocondriales de MCF-7 como los ERs recombinantes de humano pueden unirse específicamente a mtEREs (Chen, et al., 2004b; Chen y Yager, 2004). La localización intramitocondrial de los mtERs y la unión específica a los mtEREs concuerdan con la noción de que los propios mtERs podrían regular la transcripción del mtDNA y muchos de los

efectos estrogénicos sobre la mitocondria. Adicionalmente, se comprobó que en las líneas de carcinoma mamario MCF-7 y HCC-1569, mtER α y mtER β son receptores funcionales y median los efectos protectores del E₂ sobre la mitocondria (Pedram, et al., 2006).

Hasta la fecha, también se ha reportado la localización mitocondrial de ER α y ER β en la línea celular de músculo esquelético murino C2C12 y en la línea de células epiteliales bronquiales de humano HBEC2-KT (Milanesi, et al., 2008, 2009; Ivanova, et al., 2009).

De acuerdo con la localización predominantemente mitocondrial de ER β en útero de conejo (Monje y Boland, 2001), diferentes grupos han detectado a ER β en las mitocondrias de neuronas y cardiomiocitos de rata, y las líneas celulares HT-22 (hipocampo murino) y HLE-B3 (cristalino humano) (Cammarata, et al., 2004; Yang, et al., 2004). Además, se ha comprobado que la localización subcelular de ER β depende de la isoforma expresada (Cammarata, et al., 2005; Flynn, et al., 2008). Esto significa que la distribución subcelular de ER β puede estar regulada desde el nivel de la edición del pre-mRNA.

A pesar de todas estas investigaciones que demuestran la presencia de mtERs en diferentes líneas celulares y tumorales, existen pocos estudios en los que se comprueba la localización mitocondrial de los receptores en condiciones fisiológicas e *in vivo*. Además del reporte inicial de Monje y Boland (2001), se ha localizado a mtER α en capilares cerebrales de rata (Stirone, et al., 2005) y a mtER β en el hipocampo de rata (Milner, et al., 2005, 2008), así como a ambos mtERs en el hipocampo, corteza e hipotálamo de ratas de diferentes edades (Álvarez-Delgado, et al., 2010).

ER β Y SU PARTICIPACIÓN EN LA FUNCIÓN Y ESTRUCTURA MITOCONDRIAL

ER α y ER β tienen funciones biológicas específicas, e.g., a ER β se le asocia con la modulación de la respuesta estrogénica durante la depresión y la ansiedad, la respuesta al E₂ en tejidos ER α -negativos y la regulación de la actividad de ER α (Kuiper, et al., 1996; Gustafsson, 1999; Wang, et al., 2001; O'Lone, et al., 2007; Morani, et al., 2008).

Aunque ambos receptores se han detectado en las mitocondrias de diversos tejidos, la distribución y cantidad de los mtERs es variable (Monje y Boland, 2001; Álvarez-Delgado, et al., 2010), por lo que podrían regular de manera diferencial la función mitocondrial de manera tejido-específica. Además, los ERs comparten poca homología (18%) en el dominio de interacción A/B, por lo que pueden asociarse a diferentes proteínas y producir respuestas muy distintas (Morani, et al., 2008). Todo esto indica que los mtERs participan en diferentes procesos dentro de la

mitocondria. De acuerdo con esta idea, y dado que generalmente el ER que se asocia a la mitocondria es ER β , muchos de los trabajos sobre mtERs se han enfocado en estudiar solamente a mtER β .

ER β tiene efectos específicos sobre el potencial de membrana mitocondrial y la resistencia al estrés oxidativo. Por ejemplo, el *knockdown* (siER β) de ER β en células hipocámpales resulta en una mayor tolerancia al daño por H₂O₂ y en la disminución del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$). Es interesante que el fenotipo que resulta del siER β es similar al cambio observado cuando las células *wild type* (wt) son tratadas con E₂, e.g., hay un aumento del 50% en la actividad de la citocromo-c oxidasa (COX) en las células wt tratadas con E₂ y en las células siER β (Yang, et al., 2009). Esto podría significar que ER β tiene una función que es “bloqueada” al unirse a su ligando.

En plaquetas de ratones *knock-out* para ER β (β ERKO), se observó una disminución en el potencial energético al compararse con las plaquetas de ratones wt (Jayachandran, et al., 2010). Estos trabajos demuestran que ER β participa en el mantenimiento del $\Delta\psi_m$ y, por lo tanto, también está involucrado en el metabolismo energético mitocondrial. Además, recientemente se demostró que mtER β forma complejos con la ATP-sintasa mitocondrial (Álvarez-Delgado, et al., 2010) de manera E₂-independiente (Álvarez-Delgado, et al., en preparación), lo que sugiere que este receptor también podría modular la estabilidad o la actividad de la enzima.

La información acerca de los efectos directos de mtER β en la función mitocondrial es escasa, pero a partir de estos últimos estudios se puede concluir que ER β , independientemente de su unión al E₂, está involucrado en la regulación de la función mitocondrial y podría ser una proteína estructural, además de un receptor de E₂.

IMPLICACIONES FISIOPATOLÓGICAS DE LOS mtERs

Las enfermedades mitocondriales son aquéllas que resultan de la disfunción mitocondrial. La disfunción mitocondrial está asociada a enfermedades tan variadas como cáncer, infertilidad, diabetes, fallos hepáticos y renales, sordera, ceguera y afecciones crónico-degenerativas como el Parkinson y el Alzheimer. Además, a la mitocondria se le ha atribuido un papel principal en procesos fisiológicos como el envejecimiento (i.e., la mitocondria es el “reloj del envejecimiento”), la muerte celular programada y la regulación de la tasa metabólica (Mitochondria Research Society, E.U. <http://mitoresearch.org>). Estas enfermedades generalmente son transmitidas genéticamente por

herencia materna, pero la sintomatología también puede ser esporádica o inducida por el ambiente. El mtDNA tiene una tasa de mutación muy alta que resulta en tres tipos de alteraciones: mutaciones recientes de la línea germinal que producen enfermedades mitocondriales; mutaciones evolutivamente antiguas que producen adaptaciones a las diferentes demandas energéticas; mutaciones somáticas que se acumulan con la edad y son la base del envejecimiento (Wallace, 2010). En general, el conjunto de enfermedades mitocondriales tienen en común el fallo bioenergético que con frecuencia resulta ser letal (Wallace y Fan, 2010), por lo que representan un problema de salud importante.

Específicamente, se ha visto que muchas enfermedades transmitidas genéticamente comparten mutaciones en genes mitocondriales que codifican diferentes componentes de la CRM. Por ejemplo, diferentes mutaciones en los genes que codifican las subunidades de la enzima COX están relacionadas con diversos fenotipos clínicos, e.g., miopatías, cardiomiopatías, acidosis láctica infantil y fallo multisistémico. El mtDNA codifica las tres subunidades catalíticas de COX (Cox I, Cox II y Cox III) (Shoubridge, 2001) y su transcripción puede ser regulada a través de los mtERs (Chen, et al., 2005). Por lo tanto, la actividad de los mtERs tiene implicaciones en la progresión de estas enfermedades.

La idea de que el E₂ mantiene la función mitocondrial actuando a través de los mtERs se apoya en los estudios descritos en este capítulo; de éstos, los trabajos de Flynn (2007) y Chen (2004 y 2005) representan la evidencia más clara de que los efectos del E₂ sobre la mitocondria son mediados necesariamente por los mtERs. En este contexto, la caracterización de los mtERs será indispensable para entender las enfermedades mitocondriales y proponer nuevas estrategias para su tratamiento.

CONCLUSIONES

Los mtERs son elementos esenciales en las vías de señalización del E₂. Estos receptores son ubicuos y su presencia es indispensable para mantener la estructura y función mitocondrial. Además, su actividad es imprescindible en la regulación de los efectos protectores del E₂ en la mitocondria.

El estudio de los mtERs ha avanzado mucho en los diez años desde su descubrimiento. Sin embargo, para poder caracterizarlos como componentes mitocondriales quedan muchas preguntas por contestar, por ejemplo: 1) ¿cómo se translocan los ERs a la mitocondria?; 2) ¿cómo se regulan los niveles de ERs en los diferentes compartimentos subcelulares?; 3) ¿qué función tiene el complejo de mtER β -ATP sintasa?;

4) ¿cómo se regula la transcripción de los genes mitocondriales a través de los mtEREs? (Figura 2). La información que resulte de estos estudios ayudará a formular nuevas estrategias para el tratamiento de muchas enfermedades (e.g. cáncer, y afecciones mitocondriales) y para establecer con detalle las bases moleculares del envejecimiento y la neurodegeneración.

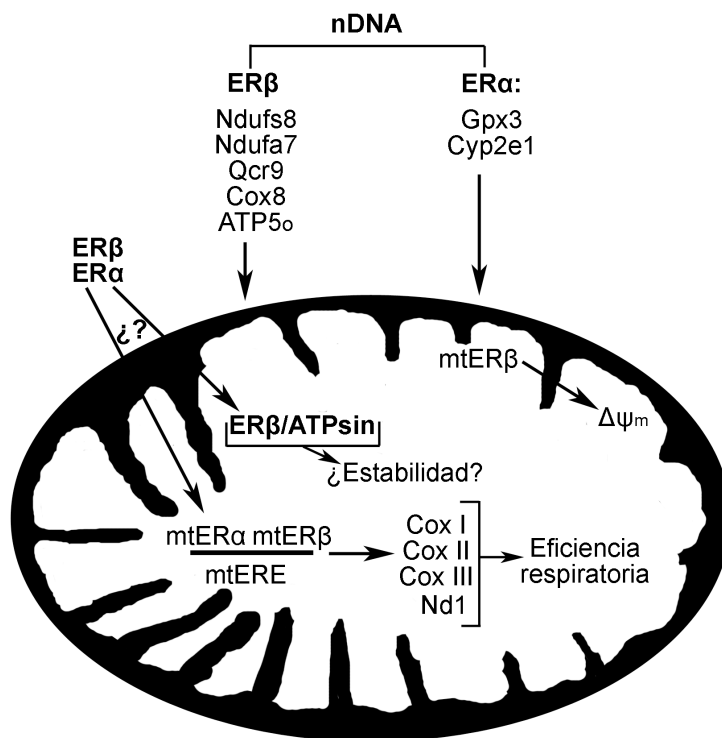


Figura 2. Resumen gráfico de las funciones y efectos de los mtERs. nDNA: genes nucleares regulados por E₂ a través de los ERs y que promueven la función mitocondrial. Ndufa7 y Ndufs8: subunidades 7 y 8 de la NADH:ubiquinona oxidoreductasa; Qcr9: subunidad 9 de la ubiquinol:citocromo c reductasa; Cox8: subunidad 8 de la citocromo c oxidasa; ATP5_o: subunidad 0 de la F₁-ATP sintasa mitocondrial; Gpx3, glutatión-peroxidasa 3; Cyp2e1, polipéptido del citocromo P450. En el mtDNA: Cox I-III, subunidades I-III de la citocromo c oxidasa (mtDNA); Nd1: subunidad 1 de la NADH:ubiquinona oxidoreductasa. ERβ/ATPsin: complejo formado entre ERβ y la ATP sintasa mitocondrial. Los signos de interrogación indican procesos incompletamente descritos hasta la fecha.

REFERENCIAS

1. Álvarez-Delgado C, Mendoza-Rodríguez CA, Picazo O, Cerbón M. 2010. Different expression of alpha and beta mitochondrial estrogen receptors in the aging rat brain: interaction with respiratory complex V. *Exp Gerontol*; 45: 580-585.
2. Bethea CL, Reddy AP, Tokuyama Y, Henderson JA, Lima FB. 2009. Protective actions of ovarian hormones in the serotonin system of macaques. *Front Neuroendocrinol*; 30: 212-238.
3. Bettini E, Maggi A. 1992. Estrogen induction of cytochrome c oxidase subunit III in rat hippocampus. *J Neurochem*; 58: 1923-1929.
4. Bolaños JP, Almeida A, Moncada S. 2009. Glycolysis: a bioenergetic or a survival pathway? *Trends Biochem Sci*; 35: 145-149.
5. Borrás C, Sastre J, García-Sala D, Lloret A, Pallardó FV, Vina J. 2003. Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radic Biol Med*; 34: 546-552.
6. Brewer GJ, Reichensperger JD, Brinton RD. 2006. Prevention of age-related dysregulation of calcium dynamics by estrogen in neurons. *Neurobiol Aging*; 27: 306-317.
7. Brinton RD. 2008. Estrogen regulation of glucose metabolism and mitochondrial function: therapeutic implications for prevention of Alzheimer's disease. *Adv Drug Deliv Rev*; 60: 1504-1511.
8. Cammarata PR, Chu S, Moor A, Wang Z, Yang SH, Simpkins JW. 2004. Subcellular distribution of native estrogen receptor alpha and beta subtypes in cultured human lens epithelial cells. *Exp Eye Res*; 78: 861-871.
9. Cammarata PR, Flynn J, Gottipati S, Chu S, Dimitrijevic S, Younes M, Skliris G, Murphy LC. 2005. Differential expression and comparative subcellular localization of estrogen receptor beta isoforms in virally transformed and normal cultured human lens epithelial cells. *Exp Eye Res*; 81: 165-175.

10. Chen JQ, Yager JD. 2004. Estrogen's effects on mitochondrial gene expression: mechanisms and potential contributions to estrogen carcinogenesis. *Ann N Y Acad Sci*; 1028: 258-272.
11. Chen JQ, Delannoy M, Cooke C, Yager JD. 2004a. Mitochondrial localization of ERalpha and ERbeta in human MCF7 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*; 286: E1011-1022.
12. Chen JQ, Eshete M, Alworth WL, Yager JD. 2004b. Binding of MCF-7 cell mitochondrial proteins and recombinant human estrogen receptors alpha and beta to human mitochondrial DNA estrogen response elements. *J Cell Biochem*; 93: 358-373.
13. Chen JQ, Yager JD, Russo J. 2005. Regulation of mitochondrial respiratory chain structure and function by estrogens/estrogen receptors and potential physiological/pathophysiological implications. *Biochim Biophys Acta*; 1746: 1-17.
14. Chen JQ, Russo PA, Cooke C, Russo IH, Russo J. 2007. ERbeta shifts from mitochondria to nucleus during estrogen-induced neoplastic transformation of human breast epithelial cells and is involved in estrogen-induced synthesis of mitochondrial respiratory chain proteins. *Biochim Biophys Acta*; 1773: 1732-1746.
15. Chen JQ, Cammarata PR, Baines CP, Yager JD. 2009. Regulation of mitochondrial respiratory chain biogenesis by estrogens/estrogen receptors and physiological, pathological and pharmacological implications. *Biochim Biophys Acta*; 1793: 1540-1570.
16. Demonacos CV, Karayanni N, Hatzoglou E, Tsiriyiotis C, Spandidos DA, Sekeris CE. 1996. Mitochondrial genes as sites of primary action of steroid hormones. *Steroids*; 61: 226-232.
17. Dencher NA, Frenzel M, Reifschneider NH, Sugawa M, Krause F. 2007. Proteome alterations in rat mitochondria caused by aging. *Ann N Y Acad Sci*; 1100: 291-298.
18. Duckles SP, Krause DN, Stirone C, Procaccio V. 2006. Estrogen and mitochondria: a new paradigm for vascular protection? *Mol Interv*; 6: 26-35.

19. Falkenberg M, Larsson NG, Gustafsson CM. 2007. DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. *Annu Rev Biochem*; 76: 679-699.
20. Flynn JM, Dimitrijevic SD, Younes M, Skliris G, Murphy LC, Cammarata PR. 2008. Role of wild-type estrogen receptor-beta in mitochondrial cytoprotection of cultured normal male and female human lens epithelial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*; 295: E637-647.
21. Frenzel M, Rommelspacher H, Sugawa MD, Dencher NA. 2010. Ageing alters the supramolecular architecture of OxPhos complexes in rat brain cortex. *Exp Gerontol*; 45: 563-572.
22. García-Segura LM, Balthazart J. 2009. Steroids and neuroprotection: New advances. *Front Neuroendocrinol*; 30: v-ix.
23. Grossman A, Oppenheim J, Grondin G, St Jean P, Beaudoin AR. 1989. Immunocytochemical localization of the [3H]estradiol-binding protein in rat pancreatic acinar cells. *Endocrinology*; 124: 2857-2866.
24. Gustafsson JA. 1999. Estrogen receptor beta--a new dimension in estrogen mechanism of action. *J Endocrinol*; 163: 379-383.
25. Hertrampf T, Schleipen B, Velders M, Laudenbach U, Fritzemeier KH, Diel P. 2008. Estrogen receptor subtype-specific effects on markers of bone homeostasis. *Mol Cell Endocrinol*; 291: 104-108.
26. Howell A. 2006. Pure oestrogen antagonists for the treatment of advanced breast cancer. *Endocr Relat Cancer*; 13: 689-706.
27. Hsieh YC, Yu HP, Suzuki T, Choudhry MA, Schwacha MG, Bland KI, Chaudry IH. 2006a. Upregulation of mitochondrial respiratory complex IV by estrogen receptor-beta is critical for inhibiting mitochondrial apoptotic signaling and restoring cardiac functions following trauma-hemorrhage. *J Mol Cell Cardiol*; 41: 511-521.
28. Hsieh YC, Choudhry MA, Yu HP, Shimizu T, Yang S, Suzuki T, Chen J, Bland KI, Chaudry IH. 2006b. Inhibition of cardiac PGC-1alpha expression abolishes ERbeta agonist-mediated cardioprotection following trauma-hemorrhage. *FASEB J*; 20: 1109-1117.
29. Hu J, Zhang Z, Shen WJ, Azhar S. 2010. Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. *Nutr Metab (Lond)*; 7: 47.

30. Irwin RW, Yao J, Hamilton RT, Cadenas E, Brinton RD, Nilsen J. 2008. Progesterone and estrogen regulate oxidative metabolism in brain mitochondria. *Endocrinology*; 149: 3167-3175.
31. Ivanova MM, Mazhawidza W, Dougherty SM, Minna JD, Klinge CM. 2009. Activity and intracellular location of estrogen receptors alpha and beta in human bronchial epithelial cells. *Mol Cell Endocrinol*; 305: 12-21.
32. Jayachandran M, Preston CC, Hunter LW, Jahangir A, Owen WG, Korach KS, Miller VM. 2010. Loss of estrogen receptor beta decreases mitochondrial energetic potential and increases thrombogenicity of platelets in aged female mice. *Age (Dordr)*; 32: 109-121.
33. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 93: 5925-5930.
34. Lee HC, Wei YH. 2007. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and apoptosis in aging. *Exp Biol Med (Maywood)*; 232: 592-606.
35. Milanese L, Vasconsuelo A, de Boland AR, Boland R. 2009. Expression and subcellular distribution of native estrogen receptor beta in murine C2C12 cells and skeletal muscle tissue. *Steroids*; 74: 489-497.
36. Milner TA, Ayoola K, Drake CT, Herrick SP, Tabori NE, McEwen BS, Warriar S, Alves SE. 2005. Ultrastructural localization of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat hippocampal formation. *J Comp Neurol*; 491: 81-95.
37. Milner TA, Lubbers LS, Alves SE, McEwen BS. 2008. Nuclear and extranuclear estrogen binding sites in the rat forebrain and autonomic medullary areas. *Endocrinology*; 149: 3306-3312.
38. Monje P, Boland R. 2001. Subcellular distribution of native estrogen receptor alpha and beta isoforms in rabbit uterus and ovary. *J Cell Biochem*; 82: 467-479.
39. Moore F, Evans S. 1999. Steroid hormones use non-genomic mechanisms to control brain functions and behaviors. *Brain Behav Evol*; 54: 41-50.

40. Morani A, Warner M, Gustafsson JA. 2008. Biological functions and clinical implications of oestrogen receptors alfa and beta in epithelial tissues. *J Intern Med*; 264: 128-142.
41. Nilsen J, Diaz Brinton R. 2003. Mechanism of estrogen-mediated neuroprotection: regulation of mitochondrial calcium and Bcl-2 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 100: 2842-2847.
42. Nilsen J, Irwin RW, Gallaher TK, Brinton RD. 2007. Estradiol *in vivo* regulation of brain mitochondrial proteome. *J Neurosci*; 27: 14069-14077.
43. O'Lone R, Knorr K, Jaffe IZ, Schaffer ME, Martini PG, Karas RH, Bienkowska J, Mendelsohn ME, Hansen U. 2007. Estrogen receptors alpha and beta mediate distinct pathways of vascular gene expression, including genes involved in mitochondrial electron transport and generation of reactive oxygen species. *Mol Endocrinol*; 21: 1281-1296.
44. Pedram A, Razandi M, Wallace DC, Levin ER. 2006. Functional estrogen receptors in the mitochondria of breast cancer cells. *Mol Biol Cell*; 17: 2125-2137.
45. Pradelli LA, Beneteau M, Ricci JE. 2010. Mitochondrial control of caspase-dependent and -independent cell death. *Cell Mol Life Sci*; 67: 1589-1597.
46. Psarra AM, Sekeris CE. 2008. Steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria. *IUBMB Life*; 60: 210-223.
47. Schäfer E, Seelert H, Reifschneider NH, Krause F, Dencher NA, Vonck J. 2006. Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem*; 281: 15370-15375.
48. Seelert H, et al. 2009. From protons to OXPHOS supercomplexes and Alzheimer's disease: structure-dynamics-function relationships of energy-transducing membranes. *Biochim Biophys Acta*; 1787: 657-671.
49. Shoubridge EA. 2001. Cytochrome c oxidase deficiency. *Am J Med Genet*; 106: 46-52.
50. Simpkins JW, Yi KD, Yang SH. 2009. Role of protein phosphatases and mitochondria in the neuroprotective effects of estrogens. *Front Neuroendocrinol*; 30: 93-105.

51. Stirone C, Duckles SP, Krause DN, Procaccio V. 2005. Estrogen increases mitochondrial efficiency and reduces oxidative stress in cerebral blood vessels. *Mol Pharmacol*; 68: 959-965.
52. Vasconsuelo A, Milanesi L, Boland R. 2008. 17Beta-estradiol abrogates apoptosis in murine skeletal muscle cells through estrogen receptors: role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Endocrinol*; 196: 385-397.
53. Wallace DC. 2010 Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *Environ Mol Mutagen*; 51: 440-450.
54. Wallace DC, Fan W. 2010. Energetics, epigenetics, mitochondrial genetics. *Mitochondrion*; 10: 12-31.
55. Wang L, Andersson S, Warner M, Gustafsson JA. 2001. Morphological abnormalities in the brains of estrogen receptor beta knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 98: 2792-2796.
56. Wise PM, Dubal DB, Wilson ME, Rau SW, Bottner M, Rosewell KL. 2001. Estradiol is a protective factor in the adult and aging brain: understanding of mechanisms derived from *in vivo* and *in vitro* studies. *Brain Res Brain Res Rev*; 37: 313-319.
57. Yang SH, Liu R, Perez EJ, Wen Y, Stevens SM Jr, Valencia T, Brun-Zinkernagel AM, Prokai L, Will Y, Dykens J, Koulen P, Simpkins JW. 2004. Mitochondrial localization of estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 101: 4130-4135.
58. Yang SH, Sarkar SN, Liu R, Perez EJ, Wang X, Wen Y, Yan LJ, Simpkins JW. 2009. Estrogen receptor beta as a mitochondrial vulnerability factor. *J Biol Chem*; 284: 9540-9548.
59. Zhai P, Eurell TE, Cotthaus R, Jeffery EH, Bahr JM, Gross DR. 2000. Effect of estrogen on global myocardial ischemia-reperfusion injury in female rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 279: H2766-2775.
60. Zhai P, Eurell TE, Cotthaus RP, Jeffery EH, Bahr JM, Gross DR. 2001. Effects of dietary phytoestrogen on global myocardial ischemia-reperfusion injury in isolated female rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 281: H1223-1232.

61. Zhao L, Brinton RD. 2007. Estrogen receptor alpha and beta differentially regulate intracellular Ca^{2+} dynamics leading to ERK phosphorylation and estrogen neuroprotection in hippocampal neurons. *Brain Res*; 1172: 48-59.

62. Zheng J, Ramírez VD. 1999a. Purification and identification of an estrogen binding protein from rat brain: oligomycin sensitivity-conferring protein (OSCP), a subunit of mitochondrial F₀F₁-ATP synthase/ATPase. *J Steroid Biochem Mol Biol*; 68: 65-75.

63. Zheng J, Ramírez VD. 1999b. Rapid inhibition of rat brain mitochondrial proton F₀F₁-ATPase activity by estrogens: comparison with Na⁺, K⁺ -ATPase of porcine cortex. *Eur J Pharmacol*; 368: 95-102.