



TESIS DOCTORAL

Papel de los receptores de estrógenos ER α , ER β y el receptor de estrógenos acoplado a proteínas G (GPER) en la viabilidad de la célula β .

Memoria presentada por

Ignacio Babiloni Chust

Para optar al grado de Doctor

Dirigida por

Dr. Ángel Nadal Navajas

Codirigida por

Dra. Laura Marroquí Esclapez

Programa de Doctorado en Biología Molecular y Celular.

Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en
Biotecnología sanitaria de Elche.

Universidad Miguel Hernández de Elche

Elche 2023

INDICIOS DE CALIDAD

La tesis doctoral titulada “papel de los receptores de estrógenos ER α , ER β y el receptor de estrógenos acoplado a proteínas G (GPER) en la viabilidad de la célula β ”, realizada por Don IGNACIO BABILONI CHUST, con DNI: 20920005-X, bajo la dirección de los profesores Ángel Nadal Navajas y Laura Marroquí Esclapez, se presenta bajo la modalidad de Tesis por compendio de publicaciones con los siguientes índices de calidad según el Campo de la ANECA de Ciencias de la Salud, Ciencias Biomédicas.

Publicaciones Científicas:

G protein-coupled estrogen receptor activation by bisphenol-A disrupts the protection from apoptosis conferred by the estrogen receptors ER α and ER β in pancreatic beta cells

Ignacio Babiloni-Chust, Reinaldo S.dos Santos, Regla M. Medina-Gali, Atenea A. Perez-Serna, José-Antonio Encinar, Juan Martínez-Pinna, Jan-Ake Gustafsson, Laura Marroquí, Angel Nadal

Environment International, DOI: 10.1016/j.envint.2022.107250

Publicación enmarcada en el primer cuartil (Q1) de JCR, con un factor de impacto de 13, 352.



Los abajo firmantes, el Dr. **ÁNGEL NADAL NAVAJAS**, Catedrático de Fisiología de la Universidad Miguel Hernández de Elche, director de la presente tesis, y la Dra. **LAURA MARROQUÍ ESCLAPEZ**, Profesora Contratada Doctora de Fisiología de la misma Universidad y codirectora de la presente tesis. INFORMAN:

Que la memoria presentada para optar al grado de Doctor por la Universidad Miguel Hernández de Elche por **D. IGNACIO BABILONI CHUST**, con DNI: 20920005-X, titulada "***Papel de los receptores de estrógenos ER α , ER β y el receptor de estrógenos acoplado a proteínas G (GPER) en la viabilidad de la célula β*** " ha sido realizada bajo nuestra dirección.

Que han revisado los contenidos científicos y los aspectos formales del trabajo y dan su conformidad para su presentación a la Comisión de Doctorado de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, firmamos el presente documento en Elche a

Fdo. Ángel Nadal Navajas

Catedrático de Fisiología

Universidad Miguel Hernández

Director de tesis

Fdo. Laura Marroquí Esclapez

Profesora Contratada Doctora de Fisiología

Universidad Miguel Hernández

Codirectora de tesis



Dra. Asia Fernández Carvajal, Catedrática y Coordinadora del Programa de Doctorado en Biología Molecular y Celular del Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE) de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

DA SU CONFORMIDAD para el depósito y la defensa de la tesis doctoral titulada: “Papel de los receptores de estrógenos ER α , ER β y el receptor de estrógenos acoplado a proteínas G (GPER) en la viabilidad de la célula β ”, presentada por D. Ignacio Babiloni Chust, mediante el procedimiento presencial.

Y para que así conste a los efectos oportunos, se expide el presente documento

Fdo: Dra. Asia Fernández Carvajal
Coordinadora de la CAPD de Biología Molecular y Celular
Universidad Miguel Hernández

FINANCIACIÓN

El presente trabajo ha sido financiado por las becas del Ministerio de Ciencia e Innovación, la Agencia Estatal de Investigación (AEI) y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) subvenciones BPU2017-86579-R (AN), PID2020-117294RB-I00 (AN, JM-P), Generalitat Valenciana PROMETEO 2020/006 (AN) y el programa de investigación e innovación Horizonte 2020 de la Unión Europea bajo el acuerdo de subvención GOLIATH No. 825489 (AN). Se ha disfrutado de una ayuda predoctoral PRE2018-084804



Índice

Lista de abreviaturas	Pág. 4
Índice de figuras	Pág. 7
Índice de tablas	Pág. 9
Resumen	Pág. 11
Introducción	Pág. 17
1. El páncreas endocrino: el islote de Langerhans	Pág. 19
2. La célula β pancreática	Pág. 20
3. Fracaso en el control de la glucemia: diabetes mellitus	Pág. 22
4. Los receptores de estrógenos	Pág. 25
4.1 Receptores clásicos ER α y ER β	Pág. 25
4.2 Receptor de estrógenos acoplado a proteínas G (GPER)	Pág. 28
5. Señalización mediada por los receptores de estrógenos	Pág. 29
5.1 Señalización iniciada en el núcleo	Pág. 29
5.2 Señalización iniciada fuera del núcleo	Pág. 30
5.3 Señalización mediada por GPER	Pág. 31
6. Papel de los estrógenos y de sus receptores en la célula β pancreática	Pág. 33
7. Los disruptores endocrinos y sus efectos sobre la célula β pancreática	Pág. 36
8. El Bisfenol A	Pág. 38
8.1 El BPA en la célula β pancreática	Pág. 40
9. Muerte celular programada: apoptosis	Pág. 43
9.1 Fases de la apoptosis	Pág. 45
10. Estrés oxidativo y su papel en la apoptosis de la célula β	Pág. 47
Objetivos	Pág. 51
Materiales y métodos	Pág. 55
1. Líneas celulares: INS-1E y EndoC- β H1	Pág. 57
1.1 Línea celular INS-1E	Pág. 57
1.2 Línea celular EndoC- β H1	Pág. 58
2. Aislamiento y cultivo <i>ex vivo</i> de células aisladas de islotes pancreáticos	Pág. 60

3. Tratamiento celular	Pág. 62
4. Transfección con ARN pequeño de interferencia	Pág. 64
5. Western Blot	Pág. 66
6. Determinación de la viabilidad celular	Pág. 68
6.1 Recuento de la apoptosis mediante marcajes de unión a ADN	Pág. 68
6.2 Determinación de la apoptosis por citometría de flujo: Anexina V/PI	Pág. 70
6.3 Determinación de la viabilidad celular por colorimetría: MTT	Pág. 72
7. Detección de heterodímeros	Pág. 73
7.1 Coimmunoprecipitación (CoIP)	Pág. 73
7.2 Ensayo de ligadura de proximidad (Proximity Ligand Assay (PLA)) <i>in situ</i>	Pág. 74
8. Medida de la generación de ROS intracelular	Pág. 76
9. Método Bradford	Pág. 76
10. Estadística	Pág. 77
Resultados	Pág. 79
1. El estradiol y el BPA presentan efectos diferentes en la viabilidad de la célula β	Pág. 81
2. El BPA genera un incremento en la producción de ROS induciendo apoptosis	Pág. 84
3. Papel de GPER en la apoptosis de la célula β	Pág. 85
4. El antagonista de ER α y ER β inhibe la apoptosis inducida por el BPA en la célula β	Pág. 90
5. Papel de ER α en la apoptosis de la célula β	Pág. 91
6. Papel de ER β en la apoptosis de la célula β	Pág. 95
7. El BPA requiere de ER α , ER β y GPER para inducir la muerte de la célula β	Pág. 99
8. Efecto del estradiol y del BPA en la formación de heterodímeros ER α / β	Pág. 108

Discusión	Pág. 111
1. El BPA genera muerte la celular mediante incremento de ROS	Pág. 114
2. Papel de los receptores de estrógenos en la muerte celular mediada por el BPA	Pág. 115
3. GPER induce la apoptosis mediante los receptores de estrógenos clásicos	Pág. 119
4. Heterodimerización de los receptores de estrógenos	Pág. 121
Conclusiones	Pág. 125
Bibliografía	Pág. 129
Anexo I	
Agradecimientos	

Lista de abreviaturas

ADP	Adenosín difosfato
AF-1	Activation Function 1
AF-2	Activation Function 2
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AMPK	Proteína quinasa activada por AMPc
AP-1	Activator protein-1
ATP	Adenosín trifosfato
Bak	Bcl-2 homologous antagonist/killer
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BPA	Bisfenol A
BSA	Albúmina de suero bovino
Casp	Caspasa
CAT	Catalasa
CoIP	Coinmunoprecipitación
DBD	DNA binding domain
DCF	2´7´-diclorofluoresceína diacetato
DDT	Dicloro difenil tricloroetano
DES	dietilelbestrol
DM	Diabetes mellitus
DMSO	Dimetil sulfóxido
DMT1	Diabetes mellitus tipo 1
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
DPN	Diarylpropionitrile
E2	17- β -estradiol
ECHA	Agencia Europea de Sustancias y Mezclas Químicas
EDC	Disruptor endocrino
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EPA	Agencia de Protección Ambiental
ER	Receptor de estrógenos
ERE	Elemento de respuesta a estrógenos

ERK 1/2	Extracellular signal-regulated kinase
ER α	Receptor de estrógenos α
ER β	Receptor de estrógenos β
FADH ₂	Flavín adenín dinucleótido
FBS	Suero bovino fetal
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
FITC	Isotiocinato de fluoresceína
GLUT	Transportador de glucosa
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
GPER	Receptor de estrógenos acoplado a proteínas G
GPX	Glutation peroxidasa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HO	Hoechst 3342
HO/PI	Hoechst 3342/ ioduro de propidio
HSP	Heat shock protein
ICI	ICI 182,780
IP ₃	Inositol 3-fosfato
IRS	Sustrato del receptor de insulina
JNK	quinasas c-Jun N-terminal
K _{ATP}	Canal de potasio sensible a ATP
LBD	Ligand binding domain
MAPK	Quinasa activada por mitógeno
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young
MOMP	Poros de la membrana externa mitocondrial
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NAC	N-acetil cisteína
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NMDR	Non-monotonic dose response
p/v	Peso/volumen
PC	Plástico de policarbonato
PI	ioduro de propidio
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
PKA	Proteína quinasa A

PKB	Proteína quinasa B
PKC	Proteína quinasa C
PKG	Proteína quinasa G
PLA	Proximity Ligand Assay
PLC	Fosfolipasa C
PPT	Propil pirazol triol
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
RCF	Fuerza centrífuga relativa
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPM	Revoluciones por minuto
SEM	Error estándar de la media
siRNA	Small interfering RNA
SOD	Superóxido dismutasa
SP-1	Specificity protein 1
TNF	Factor de necrosis tumoral
α RKO	Knockout ER α
β ERKO	Knockout ER β
λ ex/em	Longitud de onda de excitación/emisión

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Citoarquitectura del islote de Langerhans humano y de ratón.
- Figura 2. Localización de los dominios en los ER y sus distintas isoformas.
- Figura 3. Señalización genómica de los receptores de estrógenos.
- Figura 4. Señalización extranuclear de los receptores de estrógenos.
- Figura 5. Mecanismo de señalización por GPER.
- Figura 6. Papel protector de los estrógenos en la célula β .
- Figura 7. Efectos deletéreos del BPA sobre la célula β .
- Figura 8. Diagrama de las vías apoptóticas.
- Figura 9. Secuencia de eventos en la apoptosis.
- Figura 10. Mecanismos por los que ROS puede activar apoptosis.
- Figura 11. Compuestos moduladores de los diferentes receptores de estrógenos.
- Figura 12. Mecanismo de acción de los siRNAs.
- Figura 13. Fundamento de la técnica de tinción HO/PI para cuantificación de la apoptosis.
- Figura 14. Distribución de eventos según su fluorescencia en el citómetro de flujo.
- Figura 15. Espectro de emisión de fluorescencia del isotiocianato de fluoresceína (FITC) y del yoduro de propidio.
- Figura 16. Reducción de MTT a cristales de formazán mediante la acción de la reductasa mitocondrial.
- Figura 17. Efecto del E2 y del BPA en la apoptosis de la célula β .
- Figura 18. El E2 y el BPA ejercen efectos diferentes sobre la viabilidad de la célula β .
- Figura 19. El BPA induce un incremento de la apoptosis a través de ROS.

Figura 20. El antagonista de GPER, G15, previene los efectos del BPA sobre la apoptosis.

Figura 21. El silenciamiento de GPER previene parcialmente la apoptosis inducida por el BPA en la línea INS-1E.

Figura 22. El silenciamiento de GPER previene parcialmente la apoptosis inducida por el BPA en la línea EndoC- β H1.

Figura 23. La activación farmacológica de GPER conduce a un incremento de la apoptosis.

Figura 24: El antagonista de ER α y ER β ICI 182,780 previene la apoptosis inducida por el BPA en la célula β .

Figura 25. El bloqueo farmacológico de ER α inhibe la apoptosis inducida por el BPA.

Figura 26. El silenciamiento de ER α previene parcialmente la apoptosis inducida por el BPA en la línea INS-1E.

Figura 27. El silenciamiento de ER α previene parcialmente la apoptosis inducida por el BPA en la línea EndoC- β H1.

Figura 28. La activación de ER α no produce ningún efecto sobre la viabilidad celular.

Figura 29. Papel de ER β en la apoptosis inducida por el BPA.

Figura 30. El silenciamiento de ER β previene la apoptosis inducida por el BPA en la línea INS-1E.

Figura 31. El silenciamiento de ER β previene parcialmente la apoptosis inducida por el BPA en la línea EndoC- β H1.

Figura 32. Efecto del agonista de ER β , DPN, en la apoptosis de la célula beta pancreática.

Figura 33. La exposición conjunta a agonistas de los tres receptores de estrógenos incrementa la apoptosis de manera similar al BPA.

Figura 34. El agonista de GPER, G1, induce la muerte celular a través de la generación de ROS.

Figura 35. El silenciamiento de GPER previene la apoptosis inducida por G1 en la línea celular INS-1E.

Figura 36. El antagonista de ER α y ER β , ICI 182,780, previene la apoptosis inducida por G1 100 nM en la célula β .

Figura 37. El bloqueo farmacológico de ER α y ER β inhibe la apoptosis inducida por el G1.

Figura 38. Papel de ER α y ER β en la apoptosis inducida por G1 en la línea INS-1E.

Figura 39. El E2 y el BPA tienen un efecto diferente sobre la formación de heterodímeros.

Figura 40. Modelo propuesto sobre el papel protector de los receptores de estrógenos en la supervivencia de la célula β .

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición del medio de cultivo de la línea INS-1E.

Tabla 2. Composición del medio de cultivo de la línea EndoC- β H1.

Tabla 3. Composición del lecho de Matrigel empleado en la línea EndoC- β H1.

Tabla 4. Composición del medio de cultivo para células pancreáticas dispersas.

Tabla 5. siRNAs para receptores de estrógenos empleados en la transfección.

Tabla 6. Composición de los tampones de electroforesis y de transferencia.

Tabla 7. Anticuerpos empleados para Western Blot.

Tabla 8. Anticuerpos específicos para el ensayo del PLA.

RESUMEN

La hormona natural 17- β -estradiol (E2) ejerce un papel protector sobre la célula β , tanto en su funcionamiento como en su viabilidad. Esta hormona actúa a través de los receptores de estrógenos presentes en la célula: los receptores clásicos ER α y ER β , y el receptor de estrógenos acoplado a proteína G (GPER). Además de unirse al E2, estos receptores pueden ser diana de una gran variedad de compuestos, entre los que se encuentra el xenoestrógeno Bisfenol A (BPA).

El BPA es un agente plastificante de uso muy común en la fabricación de diferentes tipos de plásticos. Debido a su amplio uso en la fabricación de objetos cotidianos, la presencia del BPA es ubicua, por lo que estamos continuamente expuestos al mismo. Prueba de ello es que este compuesto se ha detectado en el 93% de la población estadounidense (Calafat et al., 2008).

El BPA está categorizado como un disruptor endocrino, ejerciendo sus acciones fundamentalmente a través de los receptores de estrógenos. Trabajos de carácter epidemiológico y molecular, y distintos modelos animales han permitido relacionar la exposición al BPA con un mayor aumento en la incidencia de diferentes patologías, entre las que se incluye la diabetes mellitus tipo 2 (Alonso-Magdalena et al., 2011).

Investigaciones previas han puesto de manifiesto que el BPA, uniéndose a los receptores de estrógenos, mimetiza en parte los efectos de la hormona natural E2 en la célula β . Sin embargo, y a diferencia del E2, el BPA promueve además un aumento de la muerte celular al unirse a estos mismos receptores. Por consiguiente, en este trabajo se ha analizado la implicación de los diferentes receptores de estrógenos en la viabilidad de la célula β y su participación en la apoptosis mediada por el BPA.

El papel de cada receptor a estrógenos en la célula β ha sido caracterizado en varios modelos: línea celular INS-1E (rata), línea celular EndoC- β H1 (humano) y células dispersas de islotes pancreáticos de ratón. Se emplearon diferentes abordajes: herramientas farmacológicas, como agonistas y antagonistas, el silenciamiento génico o medidas de interacción proteína-proteína.

Los resultados obtenidos mostraron que el E2 no ejercía ningún efecto sobre la viabilidad celular, pero el BPA promovía un incremento de la apoptosis a

concentraciones del orden picomolar a través de un mecanismo dependiente de ROS (Especies Reactivas de Oxígeno).

El aumento de la apoptosis producido por el BPA se redujo cuando la vía de GPER se encontraba bloqueada por su antagonista G15 o genéticamente silenciada, y fue parcialmente reproducido por el agonista de GPER G1.

El bloqueo o el silenciamiento de los receptores clásicos ER α y ER β condujo a un incremento de la apoptosis basal, la cual fue mayor silenciando el receptor ER β que el ER α . A su vez, la apoptosis inducida por BPA se podía suprimir mediante la inhibición farmacológica, el silenciamiento de ER α y ER β o usando el modelo de células de islotes dispersas de ratones knockout para ER β (β ERKO). Sin embargo, los agonistas de ER α y ER β (PPT y DPN, respectivamente) no tuvieron efecto alguno sobre la viabilidad de las células β .

Para mediar sus acciones biológicas, ER α y ER β se dimerizan formando homodímeros ER $\alpha\alpha$ y ER $\beta\beta$ y heterodímeros ER $\alpha\beta$. Los ensayos de ligandos de proximidad y de coimmunoprecipitación mostraron que en condiciones basales, ya existían heterodímeros preformados. A su vez, el E2 promovía una mayor formación de heterodímeros ER $\alpha\beta$, mientras que tanto el BPA como el agonista de GPER G1, la redujeron.

En base a los resultados del presente trabajo, proponemos que los heterodímeros ER $\alpha\beta$ desempeñan un papel antiapoptótico en las células β y que la disminución en el número de heterodímeros mediada por BPA y por el agonista G1 daría lugar a una menor protección en la célula, con el consiguiente aumento de la apoptosis.

SUMMARY

The natural hormone 17 β -estradiol (E2) has a protective role on both function and viability in pancreatic β -cells. This protection is conferred via the estrogen receptors, namely ER α , ER β and the G protein-coupled estrogen receptor (GPER). Although their natural ligand is E2, these receptors can be targeted by several substances, among them, xenoestrogen Bisphenol A (BPA).

BPA is the main component of the polycarbonate plastics and it is used as well as a plasticizing agent in many other types of plastics. It can be found in a great variety of everyday objects, making population exposure to BPA widespread. In fact, BPA can be detected in 93% of the USA population (Calafat et al., 2008).

BPA is classified as an Endocrine Disruptor Chemical, acting mostly through estrogen receptors. Several epidemiological and molecular studies and different animal models have allowed to link the exposure to BPA to a major increase of several pathologies, including type 2 diabetes (Alonso-Magdalena et al., 2011).

Previous work has shown that BPA binds the estrogen receptors and partly mimics the effects of the natural hormone in pancreatic β -cells. However, although E2 has no effect on the cell viability, BPA binding increases apoptosis through these same receptors. Therefore, in the present work we have studied the role of the estrogen receptor on the viability of β cells, and its involvement in the BPA induced apoptosis.

The role of each receptor was evaluated in several β cell models (rat; INS-1E, human; EndoC- β H1, and dispersed islet cells) through different approaches, as pharmacological tools (agonists and antagonists), siRNA, as well as measurement of protein-protein interactions.

Our results have shown that, whereas the natural hormone E2 has no effect on cell viability, BPA at doses as low as 10 pM increases β cell apoptosis. This increase of the cell death is ROS dependent.

The BPA-induced apoptosis was partially blocked by the GPER antagonist G15 or by genetic silencing of GPER, and it was partially mimicked by the GPER agonist G1.

The pharmacological blockade or the genetic silencing of ER α and ER β , promote an increase of the basal apoptosis, being stronger when silencing ER β rather than ER α . Moreover, the apoptosis induced by BPA was abolished when the estrogen receptor was blocked or silenced. However, the ER α and ER β agonists PPT and DPN, respectively, had no effect on beta cell viability.

To exerts their biological actions, ER α and ER β form homodimers ER $\alpha\alpha$, ER $\beta\beta$ and heterodimers ER $\alpha\beta$. Bioinformatic simulations together with proximity ligand assays and coimmunoprecipitation experiments, indicated that while E2 can increase the number of heterodimers, the interaction of BPA with ER α and ER β , as well as GPER activation by G1, decreased ER $\alpha\beta$ heterodimer generation.

Based on our results, we propose that heterodimers ER $\alpha\beta$ play an antiapoptotic role on β -cells. BPA and G1 diminish the number of heterodimers removing the protection they provide, with the consequent increase in apoptosis.

INTRODUCCIÓN

1. El páncreas endocrino: El islote de Langerhans

El páncreas es una glándula localizada en la cavidad abdominal con dos partes anatómicas y funcionales claramente diferenciadas: la porción exocrina y la porción endocrina. La porción exocrina está constituida por un tejido racimoso y glandular que se encarga de generar y secretar algunas enzimas esenciales para la digestión, tales como la amilasa o la lipasa. La porción endocrina del páncreas está formada por los islotes de Langerhans y su función es la de sintetizar y secretar las hormonas implicadas en el mantenimiento de la homeostasis de la glucemia.

Los islotes de Langerhans son microórganos de forma más o menos esférica y compuestos por unas 1000 células. Estas estructuras se encuentran embebidas dentro de la porción exocrina del páncreas y presentan una elevada vascularización. Los islotes están constituidos por 5 tipos celulares diferentes, clasificados según las hormonas que secretan. La célula β es la mayoritaria y es la encargada de secretar la hormona hipoglucemiante insulina. La segunda más abundante es la célula α , responsable de la liberación de la hormona hiperglucemiante glucagón. El resto de los tipos celulares son menos abundantes y presentan una función reguladora de la secreción tanto de insulina como glucagón: la célula δ secretora de somatostatina, la célula PP, que libera el polipéptido pancreático y finalmente, la célula ϵ , que secreta el polipéptido ghrelina (da Silva Xavier, 2018).

La distribución de estos tipos celulares dentro del islote no es equivalente en todas las especies, sino que presenta diferencias tanto en la localización como en la proporción de cada tipo celular (figura 1). En el islote murino las células β se encuentran en una posición central, estando rodeadas por el resto de las poblaciones celulares, mientras que, en los islotes humanos, la localización de las células β es más dispersa por todo el islote. En el ratón, las células β representan un 80% del total de células del islote y las células α aproximadamente un 10%. Por contra, en los humanos, el porcentaje de células β es sólo un 50-65% y el de células α aumenta hasta un 30-40% (Cabrera et al., 2006; Steiner et al., 2010).

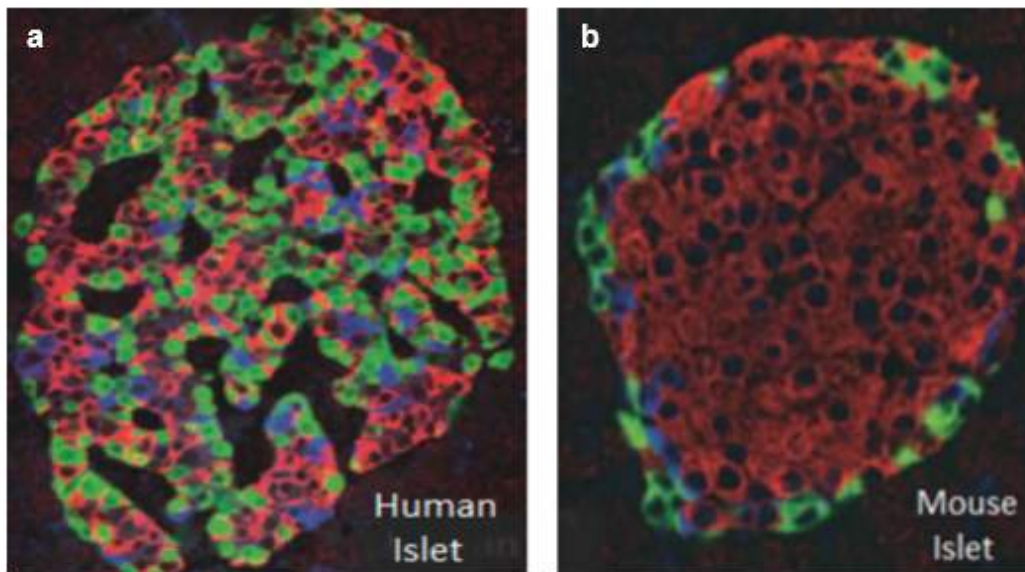


Figura 1. Citoarquitectura del islote de Langerhans humano (a) y de ratón (b). Imágenes de inmunofluorescencia empleando un marcaje triple: anti-insulina (rojo), anti-glucagón (verde) y anti-somatostatina (azul). Se observa la diferente organización celular en los islotes: (a) en el humano hay una distribución heterogénea de las diferentes poblaciones celulares, (b) en el islote de ratón las células β presentan una localización central, rodeadas del resto de poblaciones (imagen tomada de Levetan & Pierce, 2013).

2. La célula β pancreática

La célula β pancreática es la responsable tanto de la síntesis como de la liberación de la hormona insulina en respuesta a un incremento de glucosa plasmática. Otros factores, como nutrientes, hormonas y neurotransmisores participan también en la regulación de la glucemia (Rorsman & Braun, 2013). La célula β acopla los aumentos de glucosa extracelulares con la secreción de insulina mediante el siguiente mecanismo: en ausencia de glucosa, el canal de potasio sensible a ATP (K_{ATP}) se encuentra en estado abierto, permitiendo la salida de iones potasio. Este canal es el responsable de mantener el potencial de membrana en reposo próximo a -70 mV (Ashcroft et al., 1984). Cuando la glucosa aumenta a valores entre 5-10 mM, entra a la célula a través del transportador de glucosa GLUT2 en ratones y GLUT1 en humanos, donde es metabolizada por la vía glucolítica (Rorsman & Ashcroft, 2018). El piruvato resultante de la glucólisis es metabolizado en la mitocondria por el ciclo de los ácidos tricarbóxicos donde se generan especies reducidas (NADH, $FADH_2$) que,

a través de la fosforilación oxidativa, darán lugar a un aumento del ATP (Fridlyand & Phillipson, 2011, Rorsman & Ashcroft, 2018).

El K_{ATP} presenta la propiedad de que puede unir tanto ADP como ATP. Cuando se une el ADP, este promueve el estado abierto del canal permeando iones potasio al exterior, pero cuando se une ATP, se reduce marcadamente la probabilidad de apertura del canal, inhibiéndose por tanto la salida de potasio al exterior celular (Ashcroft, 2000; Huopio et al., 2002). Este cierre del K_{ATP} conduce a una despolarización paulatina de la membrana plasmática hasta alcanzar un potencial umbral de unos -55 mV, al que se activan los canales de calcio sensibles a voltaje, con la consiguiente entrada de calcio a la célula y generando el potencial de acción. Este aumento del calcio citoplasmático es fundamental para la secreción de la insulina, puesto que permite la fusión de las vesículas que contienen los gránulos de insulina adyacentes con la membrana plasmática, liberando por exocitosis su contenido al exterior (Campbell & Newgard, 2021; Misler et al., 1992; Rorsman & Ashcroft, 2018).

La insulina secretada por la célula β es transportada mediante la sangre hacia todos los tejidos, incluyendo el hígado, el tejido adiposo y el músculo esquelético, que son los tejidos diana de esta hormona. Estos tejidos son los responsables de la disminución de los niveles plasmáticos de glucosa. En el hígado, la insulina promueve la captación de glucosa y su almacenamiento en forma de glucógeno, además de inhibir la producción y liberación de glucosa por parte de este órgano (Cherrington et al., 1998; Petersen & Shulman, 2018). En el tejido adiposo, la insulina promueve la conversión de la glucosa a ácidos grasos y triglicéridos, mientras que inhibe las rutas lipolíticas. Finalmente, en el músculo esquelético, la insulina favorece la translocación del transportador de glucosa GLUT4 a la membrana plasmática, induciendo así la captación de glucosa y, a su vez, promueve la formación de glucógeno muscular (Dimitriadis et al., 2011; Titchenell et al., 2017).

3. Fracaso en el control de la glucemia: diabetes mellitus

El mantenimiento de la glucemia en valores fisiológicos es esencial para el correcto funcionamiento del organismo: cuando no puede mantenerse, se inicia un proceso patológico que desemboca en el desarrollo de la diabetes mellitus (DM). La DM es un grupo de enfermedades metabólicas en la que el signo clínico más evidente es la hiperglucemia crónica. Esta hiperglucemia crónica puede ser debida: a un fallo en la secreción de insulina, un fallo en la acción de la insulina en los órganos diana o bien un fallo tanto en la secreción como en la acción de la hormona (American Diabetes Association, 2014). Esta hiperglucemia crónica si no se controla, puede desencadenar una gran variedad de trastornos como la retinopatía y la nefropatía diabéticas, los trastornos neuropáticos, o el desarrollo del pie diabético, entre otros (Zheng et al., 2018).

Según la etiología de la diabetes mellitus, la Asociación Americana de Diabetes la clasifica en 4 grandes grupos: la diabetes tipo 1 (DMT1), la diabetes tipo 2 (DMT2), la diabetes gestacional y un cuarto grupo donde se incluyen otros tipos de diabetes, como por ejemplo la tipo MODY (American Diabetes Association, 2020).

La DMT2 es la forma predominante de diabetes, afectando a más del 90% de las personas diagnosticadas como diabéticas, lo que se traduce en más de 463 millones de personas (Tinajero & Malik, 2021). Durante su desarrollo se dan dos situaciones esenciales. En primer lugar, los tejidos diana de la insulina generan una resistencia a la hormona y, en segundo lugar, se producen alteraciones en la célula β , que ya no puede generar la cantidad de insulina requerida y acaba entrando en un proceso de desdiferenciación, agotamiento o apoptosis (Hudish et al., 2019).

La resistencia a la insulina se describe como un deterioro en la sensibilidad a la acción de esta hormona por parte de los tejidos diana. Este fenómeno conduce a una disminución de la captación hepática y muscular de la glucosa. A su vez, el hígado, como la acción de la insulina se encuentra alterada, es incapaz de inhibir la vía de la gluconeogénesis, generando y liberando glucosa a la sangre, agravando así la hiperglucemia (Mastrototaro & Roden, 2021; Michael et al., 2000). En el tejido adiposo esta resistencia induce un aumento de la lipólisis,

produciendo un incremento de ácidos grasos circulantes (hiperlipidemia), lo que contribuye a que se acumulen ácidos grasos en otros tejidos e induciendo lipotoxicidad (Kojta et al., 2020).

Tal y como se ha comentado anteriormente, además de la resistencia a la acción de la insulina en los tejidos periféricos, en la DMT2 se produce un fallo en la célula β . En el estado prediabético, donde los valores de glucosa aún son normales pero la resistencia a la insulina ya está presente, la célula β , para mantener la homeostasis, desarrolla dos mecanismos: el primero es generar un aumento en la producción (biosíntesis) y en la secreción de insulina, mientras que el segundo consiste en un aumento en la tasa de proliferación de las células β , convergiendo ambos procesos en una hiperinsulinemia (Hudish et al., 2019).

Si la resistencia periférica persiste, llega un momento en el que estos fenómenos compensatorios fracasan y la célula β puede entrar en apoptosis. Se han descrito varios mecanismos que desencadenan la muerte de las células β en la DMT2. Este estado constante de hiperglucemia y de hiperinsulinemia conduce a una elevada tasa de síntesis y secreción de insulina, produciendo un incremento del estrés del retículo endoplasmático que, si es sostenido, promueve el fallo de la célula β y la conduce a la muerte (Eizirik et al., 2020). La apoptosis también se promueve por el aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS), debido a que el estado de hiperglucemia mantenida genera un proceso de glucotoxicidad que altera el metabolismo mitocondrial, desencadenando un incremento en la producción de ROS y favoreciendo la apoptosis (Pi et al., 2014).

Otro de los mecanismos propuestos es un estado proinflamatorio de bajo grado, pero constante en el tiempo, con la liberación de citoquinas proinflamatorias, así como una infiltración de los macrófagos al interior de los islotes, promoviendo ese estado de inflamación (Esser et al., 2014).

La etiología de la DMT2 es compleja y multifactorial, puesto que en su desarrollo intervienen tanto factores genéticos como ambientales, que interaccionan entre sí, causando el desarrollo de dicha patología (Zheng et al., 2018).

En relación con el componente genético se han identificado alrededor de 400 *loci* implicados en la susceptibilidad al desarrollo de la DMT2 (Pillon et al., 2021). La gran mayoría de estos genes tienen relación con el metabolismo de la glucosa,

con la secreción de insulina por parte de la célula β , o con los genes que expresan el K_{ATP} o los canales de calcio. Una minoría presentan relación con la señalización por parte de la insulina en los tejidos periféricos, como por ejemplo, con el sustrato del receptor de la insulina (IRS) o la proteína quinasa activada por AMPc (AMPK) (Ali, 2013; Kaul & Ali, 2016; Stančáková & Laakso, 2016).

Además del componente genético, se ha evidenciado que el componente ambiental tiene una importancia esencial en el desarrollo de la DM2 (Zheng et al., 2018). Este denominado factor ambiental comprende una gran variedad de elementos como una mala alimentación, el consumo de una dieta rica en grasa y azúcares o el consumo de alcohol, así como un estilo de vida sedentario con ausencia de ejercicio aeróbico, que en conjunto suscitan un aumento de la obesidad y promueven la resistencia a la acción de la insulina (Dendup et al., 2018; Zheng et al., 2018).

La incidencia de la DM está aumentando. En el año 2021, 537 millones de adultos convivían con esta patología a nivel mundial, lo que supone una prevalencia del 10,5 %, y se prevé que en 2045 esta cifra haya aumentado a 783 millones (IDF Diabetes Atlas, 10th edn). Varias causas pueden explicar este aumento en la incidencia, tales como un cambio en el estilo de vida y la dieta, como se ha comentado anteriormente. Sin embargo, un nuevo factor que está cobrando relevancia es la exposición a contaminantes químicos ambientales, debido a su capacidad para alterar tanto la función y viabilidad de la célula β , como la acción de la insulina en los tejidos diana (Alonso-Magdalena et al., 2011). Esta información se encuentra ampliada en el punto 5 de la introducción.

Se conoce que la incidencia de la DM es menor en mujeres en edad premenopáusica que en hombres. Esta diferencia puede ser atribuida a la expresión genética específica del sexo, las hormonas sexuales y los efectos asociados a las mismas, tanto en la célula β como en los tejidos diana de la insulina (Kautzky-Willer et al., 2016). De hecho, se ha probado que dicha protección en las mujeres desaparece cuando estas alcanzan la etapa menopáusica, en la que los niveles de estrógenos sufren un fuerte descenso (Mauvais-Jarvis, 2018). Estas diferencias entre sexos pueden ser atribuidas parcialmente a la acción del 17- β estradiol (E2) sobre los receptores de estrógenos tanto en la célula β como en los órganos diana de la insulina.

4. Los receptores de estrógenos

La hormona sexual E2 ejerce su función al unirse a los diferentes receptores de estrógenos: los receptores clásicos ER α y ER β , y el receptor de estrógenos acoplado a proteínas G (GPER).

- 4.1 Los receptores clásicos ER α y ER β

ER α y ER β pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares y están codificados por dos genes independientes, ESR1 y ESR2, respectivamente. La estructura de la proteína consta de 6 dominios con propiedades específicas. Desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, se observan:

- Los dominios A y B: contienen el sitio de unión para que los diferentes correguladores transcripcionales se puedan unir a los receptores de estrógenos. A su vez, en estos dominios se localiza la región AF-1 (Yaşar et al., 2017). Además, estos dominios contienen varios sitios de fosforilación, permitiendo así la modulación de la actividad del receptor (Lannigan, 2003).
- El dominio C: está organizado en dos dedos de zinc y se acopla con alta afinidad y especificidad a secuencias de ADN concretas; por tanto, en esta región se localiza el dominio de unión al ADN (DBD; del inglés *DNA binding domain*) que se une a los denominados elementos de respuesta a estrógenos (ERE) (Ruff et al., 2000).
- La región D: algunas veces denominada región bisagra. Contiene la señal de localización nuclear, permitiendo así que cuando el ligando se une al receptor, este pueda migrar desde el citoplasma al interior del núcleo. Esta secuencia también permite la interacción entre los dominios C y E para una correcta estabilización de la hendidura donde se une el estradiol (Yaşar et al., 2017).
- El dominio E: contiene el sitio de unión al ligando LBD (del inglés *Ligand Binding Domain*), que varía ligeramente entre los dos receptores, dotando de especificidad a ligandos y antagonistas diferentes. El LBD

es una región relativamente grande y compleja, formada por doce hélices α (H1-H12) y una hoja β , dando lugar al hueco de unión del ligando. La H12 es móvil y desempeña un papel esencial en el LBD, ya que dependiendo del ligando unido adopta diferentes posiciones, pudiendo activar o inhibir al receptor (Ng et al., 2014).

- La región F: es la región localizada en el extremo C-terminal del receptor. Esta región es altamente variable en su secuencia aminoacídica y se encuentra poco descrita. Se ha sugerido que está implicada en la respuesta diferencial por parte del receptor según este se encuentre unido a un agonista o un antagonista en el LBD, por lo que sería importante para la transcripción mediada por el E2 (Arao & Korach, 2018).

Además de estos dominios estructurales, tal y como se ha comentado, los receptores de estrógenos poseen dos regiones diferentes denominadas *activation functions* AF1 y AF2. La región AF1 se encuentra localizada en el extremo N-terminal, en la región A/B. Está involucrada en la transcripción que es independiente de la unión del ligando al receptor. La región AF2 se encuentra en el extremo C-terminal, en el dominio E, donde se halla el sitio de unión al ligando de los receptores, y está implicado en la transcripción de genes ligando dependientes (Kumar et al., 2011).

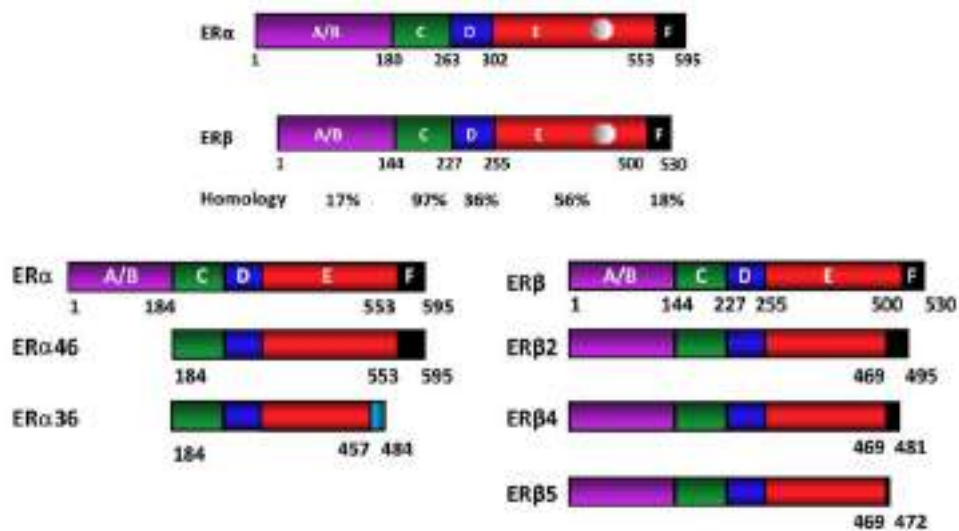


Figura 2. Localización de los dominios en los ER y sus distintas isoformas. Desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, se encuentran los dominios A/B, donde se localiza la región AF-1, dominio C, encargado de unirse al DNA a través del DBD, dominio D, que permite su traslocación desde el citoplasma al núcleo, dominio E, que presenta el LBD y dominio F. Se muestran también las diferentes isoformas que poseen los receptores (imagen adaptada de Kumar et al., 2011).

Se han encontrado diferentes isoformas gracias al mecanismo de ajuste alternativo, en el que se truncan diferentes dominios en ambos receptores. En la literatura, para ERα se han descrito principalmente 3 isoformas diferentes, clasificadas según su peso molecular: ERα 66, ERα 46 y ERα 36 (figura 2).

ERα 66 no ha sufrido ningún proceso de ajuste alternativo. Esta isoforma se ha asociado a la señalización clásica mediada por receptores de estrógenos. ERα 46 presenta la pérdida de la región AF1 y se ha descrito como un represor de la actividad transcripcional de ERα 66 dependiente de la región AF1. También se ha sugerido que su papel podría estar asociado a la membrana, e incluso una pequeña porción estaría anclada a la misma gracias al mecanismo de palmitoilación, permitiendo así la activación de las vías rápidas de los estrógenos (Lin et al., 2013). Finalmente, ERα 36 se ha demostrado que presenta la mayor capacidad de generar una señalización rápida por parte de los receptores de estrógenos, activando fundamentalmente las vías de fosfoinositol 3 quinasa/proteína quinasa B (PI3K/PKB) y quinasa activada por mitógeno (MAPK). También se ha encontrado asociada a la membrana, iniciando la respuesta a estrógenos desde la membrana plasmática (Wang & Yin, 2015).

En lo referente al ER β humano, se han nombrado 4 isoformas β 1, β 2, β 4 y β 5. ER β 1 se corresponde con el transcrito completo, con todos los dominios funcionales presentes y con capacidad de iniciar la transcripción clásica (Leung et al., 2006). ER β 2 presenta regiones más restringidas, tanto en la hendidura de unión al ligando como en los motivos de unión del corregulador, lo que interfiere en su capacidad para unir ligandos. No presenta actividad transcripcional dependiente de ligando, pero al no tener alterada la región AF1 sí que conserva cierta actividad independiente de ligando (Kim, et al., 2018). Finalmente, ER β 4 y ER β 5 son los más pequeños, careciendo de la hélice 12 y del dominio F completo, lo que resulta en una conformación más abierta en la hendidura del LBD y una afinidad por los ligandos menor que en ER β 1 (Kim, et al., 2018).

En roedores se han descrito 5 isoformas diferentes para este receptor. El rER β 2 presenta una inserción en el LBD, haciéndolo menos afín a los ligandos, y se ha postulado que puede actuar como un regulador negativo de la señalización (K. Maruyama et al., 1998). El rER β 3 presenta una delección en uno de los exones que codifica para el DBD, truncándolo y eliminando su actividad transcripcional (D. N. Petersen et al., 1998). El rER β 4, finalmente, presenta un truncamiento en la región D, perdiendo por tanto la capacidad de translocarse al interior del núcleo (Price et al., 2000).

- 4.2 El receptor de estrógenos acoplado a proteínas G: GPER

El receptor de estrógenos acoplado a proteínas G (GPER; del inglés G-protein-coupled-estrogen receptor) pertenece a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G y se encuentra anclado a las membranas celulares. GPER consta de 7 segmentos transmembrana, con el extremo N-terminal en el lado externo de la membrana y el carboxilo en la cara interna. Previamente, este receptor era conocido como el receptor huérfano GPR30 y fue en el 2007 cuando la Unión Internacional de Farmacia Clínica y Básica pasó a categorizarlo como GPER (Barton, 2012). Este receptor es fundamental en la señalización estrogénica, puesto que media parte de las respuestas “rápidas” a través de segundos mensajeros y proteínas quinasas (Gaudet et al., 2015; Luo & Liu, 2020). La estructura de este receptor no comparte ninguna homología con los receptores ER α y ER β , pero ensayos de unión a ligando demostraron que GPER presenta

un sitio específico de unión al E2, con una afinidad de 6,6 nM. Dicha afinidad es menor que la que presentan los receptores clásicos por la hormona, en el rango de 0,1-1nM (Revankar et al., 2005; Thomas et al., 2005).

5. Señalización mediada por los receptores de estrógenos.

La señalización por parte de los receptores de estrógenos puede ser clasificada según si es iniciada en el núcleo o fuera del núcleo:

- 5.1 Señalización iniciada en el núcleo.

En ausencia del ligando natural, los receptores se encuentran anclados a proteínas HSP que impiden su dimerización. Al unirse el ligando, se producen cambios conformacionales que permiten la dimerización del receptor, formando tanto homodímeros (ER α , ER β) como heterodímeros (ER α β), que se translocan al núcleo y se unen a la secuencia palindrómica específica localizada en el promotor de los genes diana (secuencia ERE), o próxima a él. La unión de ER α y ER β a la secuencia ERE permite la reestructuración de la hebra de ADN, así como el reclutamiento de coactivadores y correpresores que modulan la expresión de los genes (figura 3, punto 1) (Hall et al., 2001; Levin & Hammes, 2016; Vrtačnik et al., 2014).

Se ha descrito una gran cantidad de genes que se encuentran regulados por el E2 y que en su región promotora o reguladora no presentan la secuencia ERE, lo que indica la existencia de una vía genómica indirecta implicada en la regulación génica. La regulación de estos genes es posible, puesto que los receptores de estrógenos son capaces de unirse mediante la interacción proteína-proteína a diferentes factores de transcripción e iniciar así la transcripción de los genes. De los principales factores de transcripción que se pueden asociar con receptores de estrógeno destacan SP-1, AP-1 y NF- κ B (figura 3, punto 2) (Marino et al., 2006; Yaşar et al., 2017).

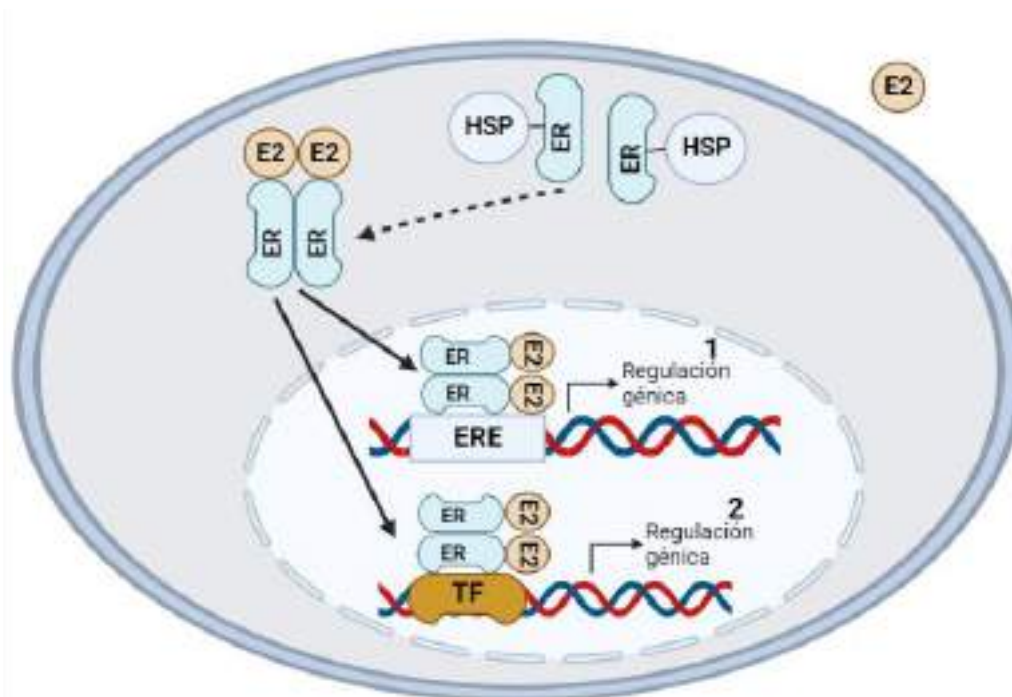


Figura 3. Señalización genómica de los receptores de estrógenos. En ausencia de ligando, los ER se encuentran anclados a las proteínas HSP. Sin embargo, cuando el E2 se une al receptor, esta unión favorece la dimerización y posterior translocación al núcleo. (1) Una vez en el núcleo, el dímero se unirá a la secuencia ERE localizada en la región promotora del gen diana, regulando su expresión. (2) El dímero puede asociarse con otros factores de transcripción, regulando así la expresión génica (imagen creada con biorender.com).

- 5.2 Señalización iniciada fuera del núcleo.

La exposición a estradiol genera cambios fisiológicos rápidos desde segundos hasta una hora. Este proceso es independiente de la transcripción de genes por parte de los receptores de estrógenos. En este caso, el receptor no actúa como un factor de transcripción, sino como una molécula iniciadora de la señalización celular mediada por varias vías y que finalmente podría conducir a la transcripción de genes (figura 4).

Los receptores de estrógenos pueden interactuar con proteínas adaptadoras, tal como c-Src, que permiten la activación de diferentes vías, siendo las más importantes las rutas de las MAPK, proteína quinasa C (PKC), proteína quinasa A (PKA), PI3K/AKT y proteína quinasa G (PKG) (Stefkovich et al., 2018). La activación de estas vías conduce a una gran variedad de señales, como por ejemplo una movilización de calcio citosólico, la modulación de la actividad de

canales iónicos o la generación de segundos mensajeros, los cuales regulan la señalización intracelular, entre otros. Todas estas vías conducen a una regulación de muchos de los procesos fisiológicos celulares, como la proliferación, la viabilidad celular, la secreción de hormonas y neurotransmisores, entre otras (Marino et al., 2006; Maruyama et al., 2013; Soriano et al., 2009; Stefkovich et al., 2018)

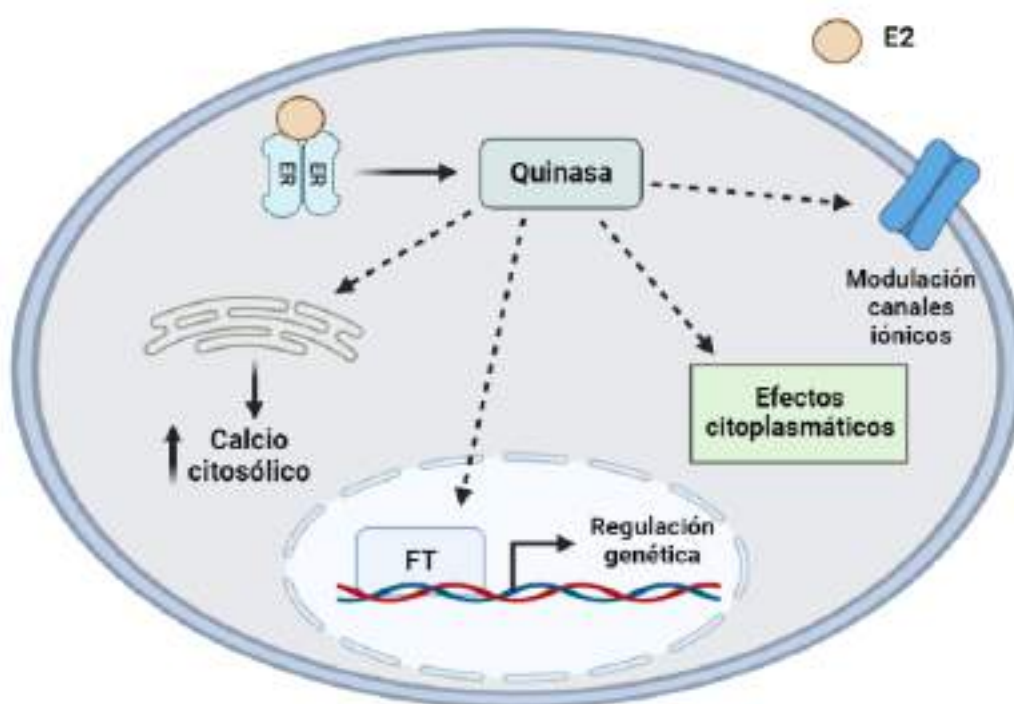


Figura 4. Señalización extranuclear de los receptores de estrógenos. Los ER presentan una señalización extranuclear que permite modular la actividad de los canales iónicos, regular la expresión génica o ejercer efectos citoplasmáticos, entre otros (imagen creada con biorender.com).

- 5.3 Señalización mediada por GPER.

El estradiol, además de unirse a ER α y ER β , puede activar al receptor de estrógenos acoplado a proteína G, GPER, aunque con menos afinidad (Luo & Liu, 2020). Este receptor es responsable de mediar parte de las respuestas rápidas evocadas por los estrógenos. Puede localizarse tanto en la membrana citoplasmática como en la del retículo endoplasmático o en la membrana nuclear, mediando en respuestas rápidas iniciadas por estrógenos. La activación de GPER regula la señalización de diferentes vías, entre las que se incluyen el

incremento del AMPc, puesto que GPER estimula la adenilato ciclasa (Balhuizen et al.,2010). GPER también puede inducir una movilización de calcio desde los depósitos intracelulares, fundamentalmente el retículo endoplasmático, mediante la activación de la fosfolipasa C (PLC), originando la formación del segundo mensajero IP3 que se une a su receptor en el retículo endoplasmático y promueve la salida de calcio desde esta organela. Además, el aumento de diacilglicerol promovido por la PLC activa a la PKC, la cual modula la actividad de ciertos canales iónicos (Merino & García-Arévalo, 2021). GPER también activa una metaloproteasa de la matriz, provocando la liberación del factor de crecimiento epidérmico (EGF). Los ligandos de EGF liberados posteriormente activan EGFR, lo que finalmente lleva a la activación de las vías MAPK y PI3K/AKT (Filardo et al., 2002) (figura 5).

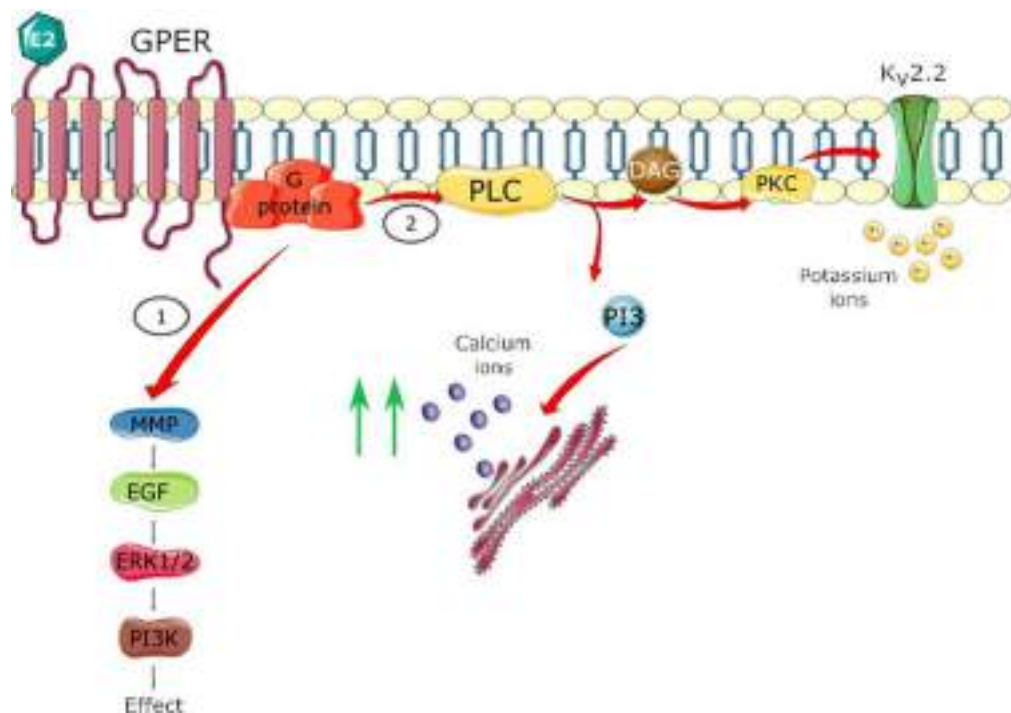


Figura 5. Mecanismo de señalización por GPER: (1) GPER, al unirse al estradiol, activa a Src, que induce que MMP corte la prHB-EGF, permitiendo su unión al EGFR. Esta activación conduce a una serie de cascadas de quinasas, entre las que se encuentra la vía de las MAPK. (2) GPER activa también la PLC provocando un aumento de la salida del calcio desde el retículo mediante la generación del segundo mensajero IP3 (imagen adaptada de Merino & García-Arévalo, 2021).

6. Papel de los estrógenos y de sus receptores en la función y viabilidad de la célula β pancreática.

Los estrógenos presentan un papel protector frente al desarrollo de DMT2, como indica el hecho de que la incidencia de diabetes durante el estado premenopáusico es menor en mujeres que en hombres. Cuando se alcanza el estado de menopausia, en el que los niveles de estrógenos disminuyen, esta protección en la incidencia de DMT2 desaparece (Gannon et al., 2018). En la célula β están presentes los tres receptores de estrógenos y todos ellos juegan un papel esencial en la fisiología de este tipo celular.

Nuestro laboratorio puso de manifiesto en el año 1998 que la hormona E2, a dosis fisiológicas y a través de un receptor de membrana, potenciaba la señal de calcio intracelular y por consiguiente, aumentaba la secreción de insulina mediada por glucosa de forma independiente de la transcripción génica (Nadal et al., 1998). Además, este aumento de calcio citoplasmático mediado por el E2 promueve la fosforilación del factor de transcripción CREB, pudiendo por tanto modular la transcripción génica (Quesada et al., 2002). Posteriormente, Alonso-Magdalena y colaboradores demostraron que una exposición aguda a E2 promovía un descenso en la glucemia y que dicho efecto era dosis dependiente, disminuyendo la glucosa plasmática a medida que se incrementaba la dosis de E2. En el mismo estudio, se mostró que la administración durante 4 días de E2 inducía un incremento en el contenido de insulina presente en las células β (Alonso-Magdalena et al., 2006). En el año 2008 quedó demostrado que ese aumento del contenido de insulina era producido mediante el receptor ER α . El E2, al unirse a ER α , activaba la vía extranuclear de ERK 1/2, promoviendo la fosforilación del factor de transcripción NeuroD1, responsable del aumento en la expresión del gen de la insulina (Alonso-Magdalena et al., 2008; Wong et al., 2010). Además, este receptor, a elevadas dosis del agonista PPT (100 y 1000 nM), promueve la entrada de calcio a la célula β usando la vía extranuclear de la PI3K (Villar-Pazos et al., 2017).

En relación con ER β , su activación presenta efectos insulíntrópicos. Por un mecanismo extranuclear promueve la formación de GMPc, lo que activa a la PKG. Esta activación de la quinasa favorece la fosforilación del K_{ATP}, dando como

resultado el cierre del canal y, en consecuencia, un aumento en la secreción de insulina (Soriano et al., 2009).

Finalmente, respecto al papel de GPER, su activación presenta también un efecto insulínico debido a un incremento del segundo mensajero AMPc (Balhuizen et al., 2010; R. Kumar et al., 2011).

Además de estos efectos celulares sobre la producción y liberación de insulina, los receptores de estrógenos poseen un papel protector sobre la función y viabilidad de la célula β . Por un lado, uno de los ejemplos más aclarativos es el ratón Knockout para ER α (α ERKO), el cual presenta intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia, obesidad y resistencia a la insulina, poniendo de manifiesto la importancia de este receptor en la homeostasis de la glucosa (le May et al., 2006). Por otro lado, cuando la célula β es expuesta a un estímulo proapoptótico, tal como un aumento del estrés oxidativo, estos receptores promueven la supervivencia celular. Liu y colaboradores, en 2009, demostraron que los receptores de estrógenos protegían frente a la muerte celular inducida por peróxido de hidrógeno (H_2O_2) mediante un mecanismo iniciado fuera del núcleo (Liu et al., 2009). En este mismo estudio demostraron, empleando ratones knockout para ER β (β ERKO), ER α (α ERKO) y GPER (GPERKO), que la ausencia de estos receptores agravaba el daño inducido por estreptozotocina, demostrando así la importancia de los tres receptores en la supervivencia celular.

Uno de los estímulos clásicos de muerte programada en la célula β son las citoquinas proinflamatorias, implicadas fundamentalmente en la etiología de la DMT1 y en menor grado, en la DMT2 (Velikova et al., 2021). Los estrógenos, en la célula β , protegen frente a la muerte inducida por citoquinas proinflamatorias mediante diferentes mecanismos, tales como el bloqueo de la translocación del factor de transcripción Nf- κ B al núcleo por medio de los receptores clásicos (Contreras et al., 2002). GPER también posee un papel protector en la viabilidad celular en presencia de citoquinas, promoviendo la supervivencia al reducir activación de vías proapoptóticas, como la vía de quinasas c-Jun N-terminal (JNKs), y estimular vías antiapoptóticas (AKT) (Kumar et al., 2011).

Se ha sugerido que este mecanismo por parte de los receptores de estrógenos sería independiente de la síntesis *de novo* de nuevas proteínas y tendría lugar

mediante eventos citoplasmáticos, como por ejemplo la fosforilación de proteínas implicadas en la supervivencia o modulación de canales iónicos (Mauvais-Jarvis et al., 2017).

En la DMT2, una hiperglucemia mantenida puede promover un aumento en la apoptosis de la célula β . En la línea INS-1E se ha demostrado que un tratamiento con alta glucosa promovía un incremento en la expresión de marcadores de estrés del retículo y un aumento de muerte celular, pero cuando estas células fueron tratadas con alta glucosa en presencia del estradiol, se inducía un descenso en dichos parámetros y una disminución en la apoptosis (Kooptiwut et al., 2014). Por otro lado, la hiperglucemia favorece un incremento del estrés oxidativo y se ha señalado que los receptores de estrógenos pueden provocar un descenso de dicho estrés, favoreciendo la expresión de proteínas implicadas en la detoxificación de ROS (Chu et al., 2020).

Otro de los estímulos de muerte celular bien definidos en la DMT2 es la lipotoxicidad generada por un exceso de ácidos grasos. Los receptores de estrógenos protegen frente a la lipotoxicidad al suprimir tanto la lipogénesis como la acumulación de lípidos mediante la reducción en la expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico (Tiano et al., 2011).

Finalmente, otro mecanismo por el que los receptores de estrógenos pueden promover la supervivencia celular consiste en la represión directa de los genes proapoptóticos. Zhou y colaboradores, en 2018, demostraron mediante un CHIP-seq que ER α reprimía de forma directa la expresión de CHOP y Oma1, dos genes proapoptóticos (Zhou et al., 2018) (figura 6).

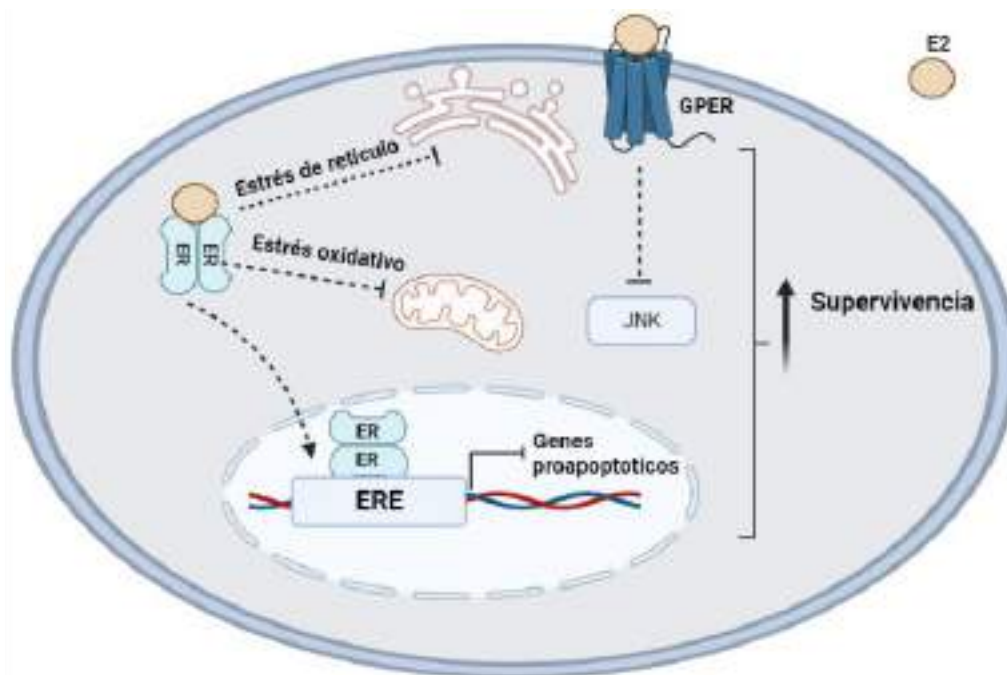


Figura 6. Papel protector de los estrógenos en la célula β . Los receptores de estrógenos ER y GPER protegen la viabilidad de la célula β mediante la reducción del estrés en el retículo, la disminución del estrés oxidativo y la supresión de genes proapoptóticos. A su vez, GPER puede inhibir la vía proapoptótica de JNK (imagen creada con biorender.com).

7. Los disruptores endocrinos y su papel en la célula β .

En los últimos veinte años, se ha descrito el posible papel de la exposición a compuestos químicos medioambientales en el incremento en la incidencia de ciertas patologías incluyendo cánceres dependientes de hormonas, diabetes, obesidad, así como trastornos reproductivos y neuronales entre otros, que afectan no solo al ser humano, sino también a la vida silvestre (Gore et al., 2015). Algunos de estos compuestos químicos se incluyen entre los denominados disruptores endocrinos (EDCs, del inglés *Endocrine Disrupting Chemicals*) definidos como un compuesto químico exógeno, o una mezcla de estos, capaces de interferir con las acciones de las hormonas (Zoeller et al., 2012).

Dentro de la clasificación de EDCs se puede encontrar una gran diversidad de compuestos, difiriendo notablemente en su estructura química, origen o fuente de exposición. Entre los EDCs descritos destaca el grupo de los bisfenoles y ftalatos, empleados en la manufactura de plásticos, las atrazinas, usadas como

herbicidas, el insecticida DDT, o los bifenilos policlorados, los cuales se encuentran en solventes de tinta o en plásticos, entre otros (Gore et al., 2015).

Los compuestos catalogados como EDCs pueden ser clasificados en dos grandes grupos: los contaminantes orgánicos persistentes, que presentan una gran dificultad para su degradación por su naturaleza lipofílica y se acumulan en el tejido adiposo, y los no persistentes, fáciles de metabolizar y de eliminar del organismo (Kumar et al., 2020).

Debido a su ubicuidad en productos de uso cotidiano podemos entrar en contacto con estos productos químicos, exponiéndonos a los mismos por muy diversas vías: mediante la ingesta oral, por inhalación o por contacto y absorción dérmica (Gore et al., 2015).

Una vez en el interior del organismo, los EDCs deben unirse a su diana para ejercer su acción, fundamentalmente a los receptores hormonales. Las acciones que realizan los EDCs sobre el sistema endocrino es muy amplia, ya que pueden actuar como agonistas o antagonistas del receptor hormonal, interferir en la señalización fisiológica de las hormonas, promover o disminuir su expresión, modificar su transporte o incluso alterar la expresión del receptor (Combarrous & Nguyen, 2019).

Los EDCs pueden presentar un patrón de dosis-respuesta no monotónica (NMDR). Una NMDR se produce cuando la pendiente de la curva dosis-respuesta cambia de signo de positivo a negativo o viceversa en algún punto a lo largo del rango de dosis examinado, con lo que la curva toma forma de U, o de U invertida (Vandenberg et al., 2012).

Un ejemplo de disrupción endocrina por compuestos químicos, con graves consecuencias para la salud humana, se observó con el dietilestilbestrol (DES). El DES es un estrógeno sintético no esteroideo, prescrito a mujeres embarazadas desde 1938 hasta 1971 para evitar abortos espontáneos o prevenir partos prematuros. Se ha evidenciado que las hijas cuyas madres habían sido tratadas con DES durante el embarazo sufrían en una gran proporción cáncer de vagina y cuello de útero (Zamora-León, 2021). Esto puso de manifiesto que la exposición a los EDC puede generar efecto ya no solo en el

organismo que ha sido expuesto, si no que puede presentar efectos transgeneracionales.

8. El Bisfenol A

El bisfenol A (BPA) fue sintetizado por primera vez en 1891 por Aleksandr Dianin y en 1936, Dodds y Lawson lo clasificaron como un estrógeno sintético (Dodds & Lawson, 1936). A partir de la década de los 50 y debido a su bajo coste en producción, así como a sus propiedades físicas, el BPA comenzó a utilizarse para la fabricación de plásticos de policarbonato (PC), un compuesto formado por la polimerización de monómeros de BPA unidos mediante enlaces éster.

El PC se encuentra en una gran variedad de utensilios de uso cotidiano, tales como juguetes infantiles, sistemas de almacenamiento óptico de información digital (CD, DVD...), piezas de automóviles, componentes eléctricos, envases y embalajes de productos para consumo humano o dispositivos médicos, entre otros. La presencia del BPA es ubicua, puesto que no solo está presente en el PC, sino que se emplea además como plastificador de otros plásticos, tales como por ejemplo el polietileno de alta densidad, tereftalato de polietileno o poliestireno (Geens et al., 2011).

También se encuentra formando parte de las resinas Epoxi que recubren la cara interna de las latas de conservas y refrescos como revestimiento en la tinta del papel térmico, o como retardante de llamas, entre otros. Prueba de la gran cantidad de productos que emplean BPA es su elevada producción anual, que alcanza los 8.000 millones de toneladas, esperándose que en 2022 se alcancen los 10.000 millones (Abraham & Chakraborty, 2020)

La ingesta ha sido propuesta como la mayor vía de exposición al BPA, ya que, bajo ciertas circunstancias, como un cambio de pH o de temperatura, el BPA puede migrar desde un contenedor de plástico al alimento, contaminándolo. Sin embargo, este compuesto químico también puede ser detectado en el aire y absorbido a través de la piel (Vasiljevic & Harner, 2021). Esta exposición tan generalizada explica que el BPA se haya detectado en el 92,6% de la población estadounidense (Calafat et al., 2008), en un rango de 0,34-3,76 ng/mL (1,4-16,5 nM) en plasma (Colorado-Yohar et al., 2021).

Una de las características que presenta el BPA tras ser ingerido, es su alta tasa de metabolización. Por ello, se le ha clasificado clásicamente como un disruptor endocrino no persistente (Dziewirska et al., 2018). Esta metabolización incluye la generación de compuestos conjugados del BPA *a priori* inactivos, entre los que destacan el BPA-glucoronato y el BPA-sulfato, ambos excretados por la orina (Ho et al., 2017).

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), estableció como ingesta diaria tolerable 4 µg/kg/día (<https://www.efsa.europa.eu/en/publications>). Sin embargo, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA), así como la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), establecieron como una dosis segura de BPA 50 µg/kg/día. Pese a estos valores de referencia, tomados como seguros, hay una gran dificultad y controversia por el establecimiento de un límite seguro. Tal es la preocupación por los efectos nocivos de la exposición al BPA sobre la salud humana que la Agencia Europea de Sustancias y Mezclas Químicas (ECHA) lo incluyó, en enero de 2017, en su lista de Sustancias de Alta Preocupación (ECHA, 2017).

El BPA actúa como un xenoestrógeno, es decir, una molécula de origen sintético capaz de unirse a los receptores de estrógenos. El BPA se había considerado tradicionalmente como un estrógeno débil, puesto que se había observado mediante experimentos de activación de la transcripción, que presenta una capacidad baja de unirse a los receptores de estrógenos e iniciar la transcripción por la vía clásica (mil a diez mil veces menor que el estradiol) (Kuiper et al., 1998).

Pese a esta categorización como estrógeno débil, en los últimos años se ha puesto de manifiesto que el BPA se une a los receptores de estrógenos localizados en el citoplasma y ejerce una acción con una potencia similar a la hormona natural en el rango nanomolar, rango al que la mayoría de la población está expuesta (Colorado-Yohar et al., 2021). Se ha probado que el BPA activa vías de señalización extranucleares, mimetizando parte de los efectos observados para la hormona natural E2 (Nadal et al., 2018).

- 8.1 El BPA en la célula β

Debido al aumento en su prevalencia, la DMT2 está categorizada como una pandemia emergente a nivel mundial, constituyendo un problema de salud pública importante. Varias hipótesis, como un cambio en el estilo de vida o la falta de ejercicio físico, se han postulado para explicar este incremento. Sin embargo, en los últimos años, se está prestando especial atención a la posible contribución del BPA a la etiología de esta enfermedad.

El BPA puede llegar al interior del organismo por ingestión, inhalación o absorción e interferir con la señalización celular de rutas implicadas en la homeostasis de la glucosa, por lo que se le ha asociado con trastornos metabólicos (Alonso-Magdalena et al., 2011). Lang y colaboradores, en 2008, analizaron una cohorte de 1455 personas en Estados Unidos, en la que evaluaron el BPA presente en la orina y demostraron que una mayor exposición a BPA se asociaba con un incremento en la incidencia de enfermedades cardiovasculares y diabetes (Lang et al., 2008). Ahmadkhaniha y colaboradores, en 2014, estudiaron una cohorte de 239 pacientes iraníes, la mitad de los cuales presentaban DMT2. El análisis de la presencia de BPA en orina dio una correlación positiva entre niveles altos de BPA y diabetes (Ahmadkhaniha et al., 2014). Finalmente, un metaanálisis reciente de 16 publicaciones determinó que las concentraciones de BPA, medidas tanto en sangre como en orina, se asociaban con un aumento en el riesgo del desarrollo de DMT2 (Hwang et al., 2018).

Las primeras evidencias que se obtuvieron del efecto del BPA en la célula β son del año 2000. Nadal y colaboradores demostraron cómo una exposición aguda a BPA aumentaba la frecuencia en las oscilaciones de calcio producidas por alta glucosa en la célula β (Nadal et al., 2000). En 2006, Alonso-Magdalena y colaboradores probaron *in vivo* que la inyección de BPA a los ratones promovía un descenso de la glucemia de una manera dosis-dependiente, a la vez que se incrementaba la secreción de insulina. A su vez, el tratamiento durante 4 días con dosis de 10 o 100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ promovía una resistencia a la insulina, un incremento de la secreción de esta hormona estimulada por glucosa, así como un aumento en el contenido de insulina presente en la célula β (Alonso-

Magdalena et al., 2006). Poco después, en 2008, se describió que este aumento en el contenido de insulina observado en el tratamiento con BPA era dependiente de ER α . Los islotes tratados *ex vivo* durante 48 horas con BPA activaban la misma vía extranuclear que el E2 y se promovía en ellos, con la misma potencia, un aumento en el contenido de insulina. (Alonso-Magdalena et al., 2008).

En relación con ER β , Soriano y colaboradores demostraron *in vitro* que una exposición aguda de 1 hora a dosis crecientes de BPA en islotes murinos y una dosis de 1 nM en islotes humanos, producían un efecto insulínico en presencia de glucosa. Asimismo, en el mismo artículo demostraron que este efecto estaba mediado por ER β , puesto que empleando ratones β ERKO el BPA no presentaba ningún efecto (Soriano et al., 2012). Por último, recientemente se ha demostrado que el BPA a través de ER β reduce las corrientes iónicas de calcio, sodio y potasio mediante el cambio en la expresión de los canales iónicos implicados (Martinez-Pinna et al., 2019; Villar-Pazos et al., 2017), alterando por tanto la fisiología de la célula β .

El BPA presenta también efectos dañinos sobre la viabilidad de la célula β . En células dispersas de islotes pancreáticos murinos, dosis de BPA en el rango nanomolar generan una disfunción mitocondrial que deriva en un aumento de ROS y una translocación al núcleo del factor Nf-KB, promoviendo la expresión del gen proapoptótico Bcl-2-associated X protein (Bax), así como una represión en la expresión del gen B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), lo que aumenta la apoptosis (Carchia et al., 2015).

En la línea INS-1E se ha demostrado que la exposición a BPA desde dosis nanomolares hasta micromolares, promovía un descenso en el potencial de membrana mitocondrial, una liberación del citocromo C y una activación de las vías apoptóticas (Lin et al., 2013). Empleando el mismo modelo, Xin y colaboradores demostraron que el BPA incrementa la producción interna de ROS, a la par que disminuye la concentración de Glutathion reducido (un protector de ROS). Este incremento de ROS inducido por el BPA es genotóxico porque fragmenta el ADN, produciendo un incremento en la muerte celular (Xin et al., 2014). Finalmente, se ha demostrado que el BPA promueve agregados tóxicos de la proteína amiloide, lo que genera un aumento del estrés oxidativo y una

desestructuración de la membrana, dando lugar a una disminución en la viabilidad celular (Gong et al., 2013) (figura 7).

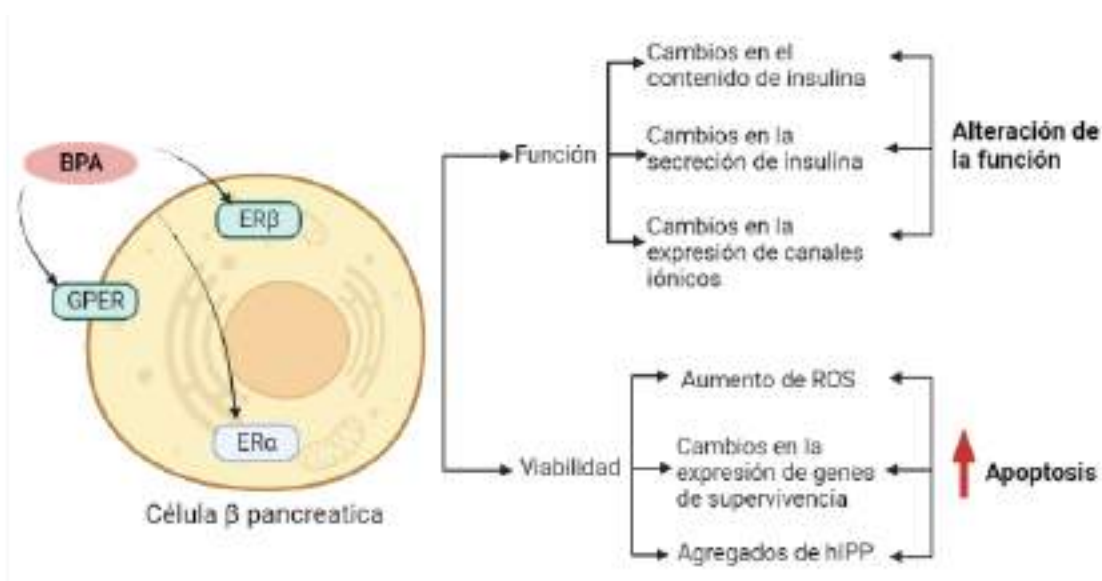


Figura 7. Efectos deletéreos del BPA sobre la célula β. El BPA puede alterar la función de la célula cambiando la expresión del gen de la insulina o la secreción de esta hormona, así como la expresión de canales iónicos. Por otra parte, el BPA favorece la apoptosis mediante un incremento en el estrés oxidativo, cambios en la expresión de genes relacionados con la viabilidad celular o la formación de agregados tóxicos de la proteína amiloide (imagen creada con biorender.com).

Uno de los periodos vitales en el que el organismo es sensible en extremo a la acción del BPA es el desarrollo embrionario. Alonso-Magdalena y colaboradores demostraron que la exposición intrauterina a dosis más bajas que las recomendadas por la EPA presentaba un efecto diabético en los machos de la descendencia. Además, estos machos presentaban hiperinsulinemia y resistencia a la insulina en los tejidos periféricos (Alonso-Magdalena et al., 2010). En una investigación reciente, Boronat-Belda y colaboradores mostraron que la exposición al BPA durante el desarrollo fetal promovía la proliferación de la célula β en la descendencia a través de un mecanismo mediado por ERβ (Boronat-Belda et al., 2020).

9. Muerte celular programada: apoptosis

La muerte celular es un proceso esencial en el mantenimiento de la homeostasis del organismo para eliminar células que no se requieren, células dañadas o senescentes o células tumorales, entre otras. El término muerte celular hace referencia a dos procesos bien diferenciados: la apoptosis y la necrosis.

La apoptosis es la muerte celular programada, en la que de una forma coordinada la célula activa las vías de muerte. En la necrosis, por el contrario, la célula es un agente pasivo, donde se rompe su membrana y se libera el contenido citoplasmático al exterior (Nirmala & Lopus, 2020).

El término apoptosis fue acuñado por primera vez por Kerr y colaboradores en 1972 y se definió como un proceso celular dirigido a la eliminación de la célula, diferente de la necrosis y complementario a la mitosis en la regulación de las poblaciones celulares en los animales (Kerr et al., 1972).

Hoy en día sabemos que la apoptosis es un proceso complejo que puede ser inducido por dos grandes vías, la vía extrínseca y la vía intrínseca o mitocondrial (figura 8).

La vía extrínseca es iniciada en la membrana plasmática por la presencia de receptores de la superfamilia de proteínas con homología estructural al receptor TNF o factor de necrosis tumoral, siendo los más representativos el receptor de FAS y el receptor de TNF α . Estos receptores presentan en su lado citoplasmático un dominio, denominado dominio de muerte, fundamental para la transducción de la señal (Boldin et al., 1996). Dicho dominio de muerte sirve como andamiaje para el reclutamiento de varias proteínas, que acaban formando el complejo DISC, provocando la activación de la caspasa 8 (Shen et al., 2018).

La vía intrínseca o mitocondrial puede ser activada por una gran variedad de factores biológicos, químicos o físicos y se encuentra finamente regulada por la familia de proteínas Bcl-2.

La familia Bcl-2 está formada por tres grupos diferentes: los miembros proapoptóticos, los miembros antiapoptóticos y los miembros BH3 only. Los miembros antiapoptóticos son capaces de inhibir mediante contacto a los miembros proapoptóticos (Shamas-Din et al., 2011). Cuando se desencadena la

apoptosis, esta inhibición por contacto es suprimida. Los miembros proapoptóticos Bax y antagonista/asesino homólogo de Bcl-2 (BAK) forman oligómeros entre sí, generando un poro en la membrana externa mitocondrial (MOMP) por el que se libera al citoplasma el citocromo C. Esta liberación es la señal inductora de la muerte celular, puesto que este citocromo C induce la formación del apoptosoma y la activación de las caspasas (Gurzov & Eizirik, 2011).

Ambas vías, tanto la extrínseca como la intrínseca, convergen en la activación de las caspasas en lo que se denomina la fase ejecutora de la apoptosis. Las caspasas son una familia de proteasas que median la rotura de otras proteínas a nivel del residuo de aspartato y son las principales mediadoras de la apoptosis. Las caspasas pueden clasificarse en dos grandes grupos, según el papel que jueguen en la apoptosis: las caspasas iniciadoras (Casp2, Casp8, Casp9, Casp10) y las caspasas efectoras (Casp3, Casp6 y Casp7) (van Opdenbosch & Lamkanfi, 2019).

Las caspasas son sintetizadas como zimógenos inactivos denominados procaspasas y se encuentran en el citoplasma. Las caspasas iniciadoras se encuentran en una conformación monomérica, mientras que las caspasas efectoras están en forma homodimérica (Donepudi & Grütter, 2002).

Cuando la señal de muerte celular bien sea por la vía intrínseca o por la extrínseca, es procesada y se activa el proceso de apoptosis, los monómeros de las caspasas iniciadoras son reclutados induciendo su dimerización y activando su capacidad proteolítica (Julien & Wells, 2017). Una vez activadas, las caspasas iniciadoras promueven la proteólisis de un pequeño segmento en el dímero de las procaspasas efectoras, lo cual conduce a la liberación del sitio activo, otorgándoles la capacidad de degradar sustratos (Kasture et al., 2021).

Las caspasas efectoras, esencialmente la casp3, serán las encargadas de inducir la apoptosis mediante varios procesos que incluyen la degradación de proteínas nucleares y del propio material genético, una alteración en la estructura de la bicapa lipídica mediante el bloqueo de la flipasa y la degradación proteolítica de los componentes del citoesqueleto (Beroske et al., 2021).

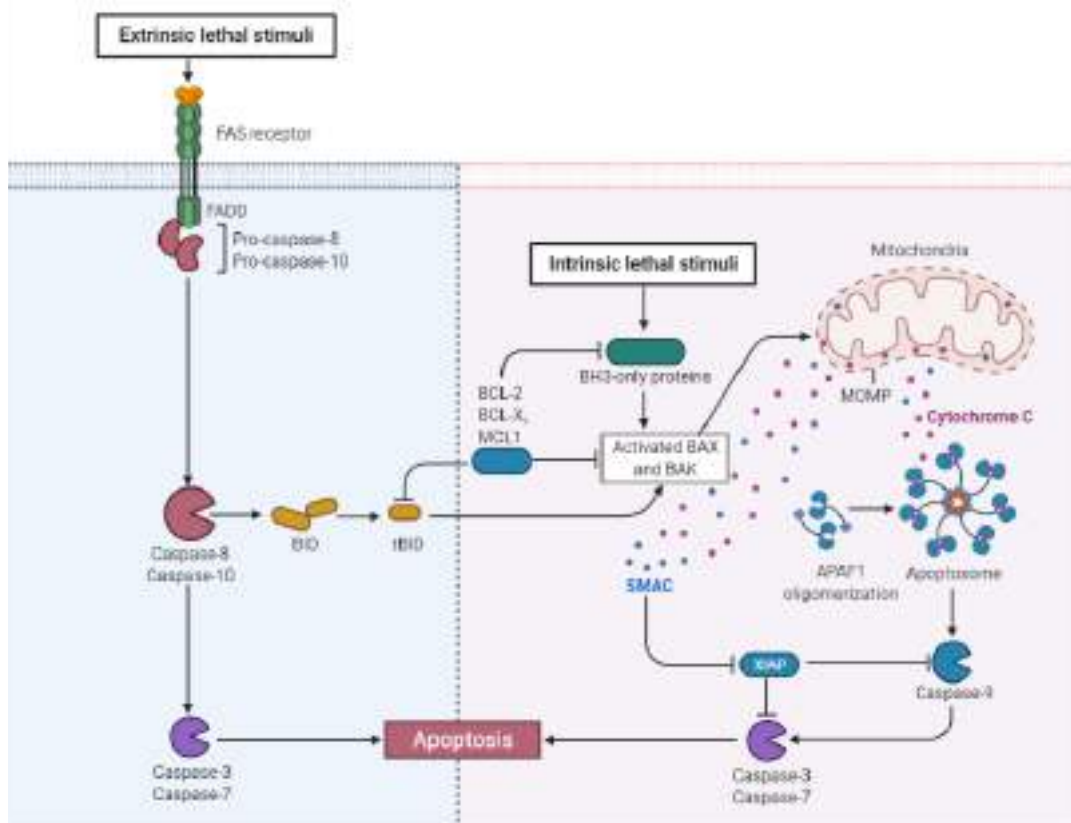


Figura 8. Diagrama de las vías apoptóticas. La apoptosis puede desencadenarse mediante dos vías, la vía extrínseca (dependiente de ligando) o la vía intrínseca (mitocondrial), dando como resultado la activación de las caspasas, que conduce a la apoptosis (imagen creada con biorender.com).

- 9.1 Fases de la apoptosis

Durante la apoptosis se suceden una serie de eventos moleculares y celulares que culminan en la degradación del ADN y la fragmentación celular (figura 9). La primera fase es la fase inductora, en la que se activan tanto factores apoptóticos como antiapoptóticos de la familia de Bcl-2. En esta fase se establece el destino celular, siendo el único punto reversible del proceso, ya que una vez el citocromo C es liberado se inicia la muerte celular.

Una vez decidido el destino de muerte celular, se activan las principales mediadoras de la apoptosis, las caspasas ejecutoras 7 y 3. La caspasa 3 induce la activación de la endonucleasa CAD, que se transloca al núcleo y promueve la condensación y posterior fragmentación de la cromatina. A su vez, en el citosol,

la caspasa 3 escindir  la proteína Gelsolina, implicada en la polimerización de los filamentos de actina, de forma que al eliminarla se desestructura la organización citoplasmática, induciendo una contracción y condensación de la célula. Durante este proceso de condensación las membranas celulares generan estructuras parecidas a burbujas. A su vez, la membrana plasmática sufre cambios en su organización, ya que uno de los procesos esenciales en la apoptosis es la translocación de la fosfatidilserina desde la cara interna hacia la cara externa de la membrana plasmática. Esta translocación permite el reconocimiento de la célula apoptótica en estadios tempranos por parte de los macrófagos, para su posterior eliminación. Finalmente, la membrana sufre una desestructuración, se encoge y se pliega formándose los cuerpos apoptóticos, los cuales contienen restos de cromatina, citoplasma y organelas (Cavalcante et al., 2019; Chmurska et al., 2021; Elmore, 2007; Jan & Chaudhry, 2019).

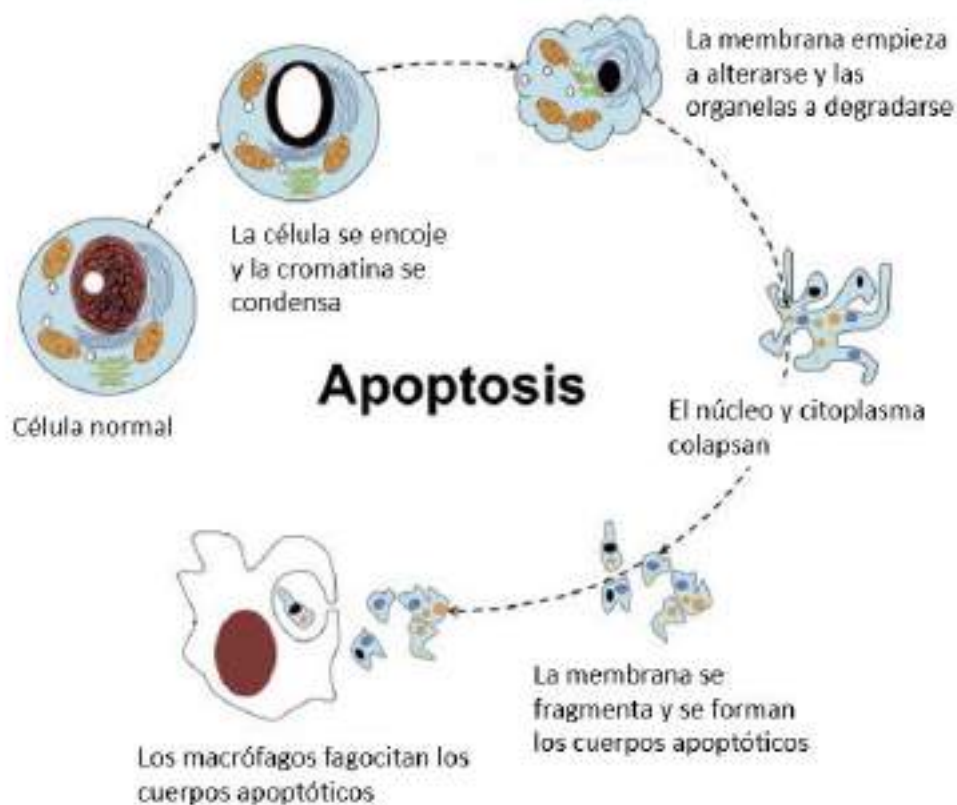


Figura 9. Secuencia de eventos en la apoptosis. La apoptosis provoca cambios morfológicos en las células, tanto en el núcleo como en la membrana plasmática, dando como producto final la formación de cuerpos apoptóticos (imagen adaptada de Abou-Ghali & Stiban, 2015).

Tal y como se ha descrito anteriormente, el proceso de apoptosis en la célula β se da tanto en la DMT1 como en la DMT2, aunque que los mecanismos pueden diferir entre ellos. Mientras que en la DMT1 es fundamentalmente un ataque autoinmunitario sostenido que acaba destruyendo la masa de células β , en la DT2 es una convergencia de varios factores lo que induce un incremento de la apoptosis, entre los que destacan la glucotoxicidad, la lipotoxicidad y la inflamación crónica de bajo grado.

10. Estrés oxidativo y su papel en la apoptosis de la célula β

Para el funcionamiento adecuado de la célula β pancreática es esencial que el metabolismo mitocondrial sea correcto, puesto que en la mitocondria se oxidan los sustratos provenientes de la ruta glucolítica y se genera ATP mediante la cadena de transporte electrónico mitocondrial, regulando la secreción de insulina. Durante el paso de los electrones por la cadena de transporte electrónico se pueden generar especies reactivas de oxígeno (ROS; del inglés, *Reactive Oxygen Species*).

Estas ROS son pequeñas moléculas con una elevada reactividad y una vida media corta y que incluyen radicales libres derivados del oxígeno, como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el radical hidroxilo (OH^{\cdot}), o bien moléculas que no son radicales libres como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Redza-Dutordoir & Averill-Bates, 2016).

Durante el metabolismo mitocondrial de la glucosa en condiciones fisiológicas se produce un aumento en la producción de ROS, fundamentalmente un incremento en la producción de H_2O_2 , que actúa como molécula señalizadora en la secreción de insulina (Pi et al., 2007). Sin embargo, durante la hiperglucemia la concentración intracelular de glucosa se eleva y los sustratos de la glucólisis son más accesibles, acelerando por tanto el ciclo de Krebs y la cadena de transporte electrónico. Este incremento en el flujo de la cadena de transporte electrónico hace que exista una mayor fuga de electrones, que reducen al O_2 induciendo la formación de ROS (Sha et al., 2020).

Pese a que la mitocondria es la principal productora de ROS, también pueden generarse en el retículo, en la membrana plasmática y en el citoplasma. La célula β es altamente sensible al aumento de ROS, ya que los mecanismos enzimáticos encargados de detoxificar las especies reactivas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y Glutathion peroxidasa (GPX) son relativamente débiles, por lo que la acumulación de ROS puede desencadenar un estado prolongado de estrés oxidativo (Lenzen, 2008).

Este desbalance en el metabolismo redox junto con un estrés oxidativo, produce una acción deletérea tanto en la función como en la viabilidad de la célula β . Se han postulado diferentes mecanismos para explicar el efecto citotóxico de la acumulación de ROS (figura 10). El primero de ellos sostiene que el exceso de ROS puede alterar diferentes macromoléculas, tales como proteínas, lípidos e incluso el ADN, mediante una variedad de mecanismos que incluyen la oxidación y peroxidación, que conlleva una disfunción de estas moléculas, alterando la fisiología de la célula β (Newsholme et al., 2019). En la propia mitocondria, los ROS pueden dañar el ADN mitocondrial, así como otros componentes mitocondriales, derivando en la liberación del citocromo C al citoplasma y activando la vía de las caspasas para inducir apoptosis (Eguchi et al., 2021). La acumulación de ROS también provoca efectos genotóxicos, induciendo modificaciones estructurales del ADN e incluso su rotura (She et al., 2017). Además del daño en la propia estructura del ADN, un aumento de ROS reduce la unión de PDX-1 al promotor del gen de la insulina. PDX-1 es un gen esencial en el desarrollo y mantenimiento de la identidad de la célula β , así como en la expresión del gen de la insulina, por lo que este efecto reduciría la capacidad secretora de la célula β (Gerber & Rutter, 2017). Finalmente, un incremento del estrés oxidativo puede inducir la acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del retículo, contribuyendo a un incremento del estrés del retículo que si no es compensado, favorecerá la apoptosis de la célula β (Hasnain et al., 2016).

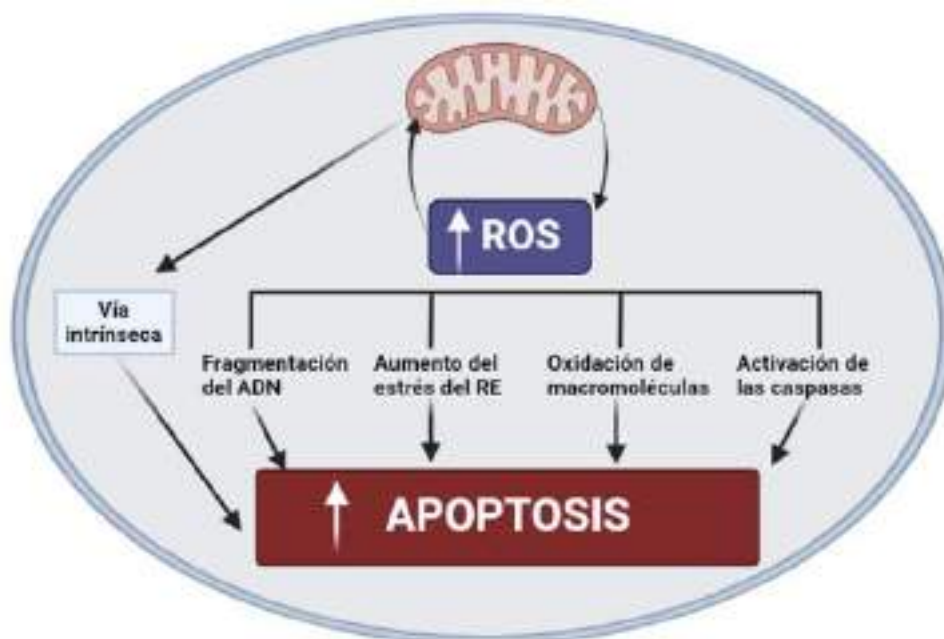


Figura 10. Mecanismos por los que ROS puede activar la apoptosis. El incremento de ROS genera apoptosis a través de varios de mecanismos, incluyendo el propio daño mitocondrial, que activa la vía intrínseca. Esta vía promueve la oxidación y daño de macromoléculas o de ADN e induce un incremento del estrés de retículo (imagen creada con biorender.com).

OBJETIVOS

La célula β secreta la hormona hipoglucemiante insulina en respuesta a un incremento de la glucosa plasmática, por lo que su correcto funcionamiento es esencial para el mantenimiento de la homeostasis de la glucemia. La hormona natural E2 posee un efecto protector sobre la célula β , tanto en su función como en su viabilidad celular, protegiéndola frente a estímulos apoptóticos tales como las citoquinas o el estrés oxidativo, entre otros. Esta protección sobre la célula se produce a través de los receptores de estrógenos ER α , ER β y GPER.

Además de su ligando natural, los receptores de estrógenos pueden unir una gran variedad de compuestos, entre los que se encuentra el Bisfenol A (BPA). El BPA es el constituyente principal de los plásticos de policarbonato y es el agente plastificante empleado en la producción de una gran variedad de plásticos. Por tanto, puede encontrarse en muchos objetos cotidianos, lo que da lugar a una exposición continuada de la población a este compuesto, fundamentalmente a través de la ingesta. Prueba de ello es que se ha detectado, en un porcentaje muy elevado de la población, bien BPA libre o bien sus conjugados. El BPA se ha categorizado como un disruptor endocrino, capaz de alterar la acción de las hormonas. Esta alteración ocurre mediante su unión a los receptores de estrógenos, por lo que es considerado un xenoestrógeno.

Estudios epidemiológicos y modelos animales y moleculares han correlacionado la exposición al BPA con un aumento en la incidencia de diferentes patologías, entre las que se incluye la diabetes mellitus tipo 2, debido tanto a la alteración en la secreción de insulina como a su acción sobre los tejidos diana de la hormona. A su vez, tanto en modelos *ex vivo* de animales como en líneas celulares, se ha puesto de manifiesto que el BPA también puede incrementar directamente la muerte de la célula β .

El E2 y el BPA presentan acciones opuestas sobre la viabilidad de la célula β empleando los mismos receptores. En la presente tesis, el objetivo principal ha sido estudiar la implicación de los receptores de estrógenos ER α , ER β y GPER en la viabilidad de la célula β , así como su participación en la apoptosis mediada por el BPA. Para ello, hemos utilizado diferentes modelos de célula β y aproximaciones tanto farmacológicas como de biología molecular, y hemos analizado el papel de cada uno de estos receptores.

Los objetivos específicos del presente trabajo son los siguientes:

1. Estudiar el mecanismo por el cual el BPA aumenta la apoptosis en la célula β pancreática.
2. Determinar la implicación de los receptores GPER, ER α y ER β en la apoptosis de la célula β pancreática, así como su participación en la muerte celular inducida por el BPA.
3. Establecer la posible intercomunicación entre los receptores de estrógenos y su papel en la apoptosis.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Líneas celulares: INS-1E y EndoC-βH1

En la realización de este trabajo se han utilizado dos líneas celulares procedentes de células β pancreáticas: la línea INS-1E, derivada de rata y la línea humana EndoC-βH1. Sus características, cultivo y manejo se detallan a continuación:

- 1.1 Línea celular INS-1E

La línea INS-1E (RRID: CVCL_0351) es una línea inmortal de célula β pancreática de rata. Esta línea celular es un clon derivado de la línea celular original INS-1, generada a través de un insulinoma inducido mediante la irradiación de rayos X en ratas macho (Asfari et al., 1992). La línea INS-1E mantiene la función primordial de la célula β, ya que aumenta la secreción de insulina en respuesta a glucosa (Merglen et al., 2004).

La línea INS-1E fue mantenida en un medio de cultivo RPMI 1640 con 11 mM de glucosa, suplementado según lo descrito en la tabla 1.

Compuesto	Concentración	Casa comercial
Piruvato sódico	1 mM	GIBCO 11360-039
HEPES	10 mM	GIBCO 15630-056
2-mercaptoetanol	50 μM	GIBCO 31350-010
FBS inactivado	5%	HYCLONE SV30160.03
Estreptomicina	50mg/mL	GIBCO 15140-122
penicilina	50 u/mL	GIBCO 15140-122
RPMI 1640+GlutaMAX-1		GIBCO 61870-010

Tabla 1. Composición del medio cultivo de la línea INS-1E.

Se comenzó a trabajar con los pases 65 y 66, amablemente cedidos por el laboratorio del Prof. Claes Wolheim de la Universidad de Ginebra (Suiza), y desechándose cuando se alcanzaba el pase 80.

Las células fueron mantenidas en frascos de 25 y 75 mL (Falcon), con 5 y 13 mL de medio respectivamente, reemplazado cada 72 horas, alcanzando en una semana una confluencia de aproximadamente un 80%, determinada de *visu*, bajo el microscopio.

Semanalmente se realizó un subcultivo, el cual consistió en una tripsinización utilizando una solución comercial de tripsina-EDTA 0,05% (Gibco) durante 3 minutos a 37°C; posteriormente, la tripsina fue neutralizada añadiendo al menos 3 veces más de medio fresco de cultivo. La suspensión celular fue transferida a un tubo de centrifuga de 15 mL (Falcon) y centrifugada a 1000 RPM durante 7 minutos; seguidamente, el sobrenadante fue retirado y el pellet de células fue resuspendido en un volumen de 5 mL de medio de cultivo.

Para calcular el número de células por mililitro se llevó a cabo un recuento celular empleando la cámara de Neubauer. Para ello, se recogió de la suspensión celular 10 µL y, bajo el microscopio, se contaron los 4 cuadrantes de la cámara, tras lo cual se empleó la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{células}}{\text{mL}} = \left(\text{N}^{\circ} \text{ células contadas} / 4 \right) \times 10000$$

Con relación a la siembra celular, según el requisito experimental se usaron placas de 96, 24 o 6 pocillos (Sarstedt), siendo el número sembrado para cada una de las placas 10-15 mil, 100-150 mil o 1 millón de células por pocillo, respectivamente. Para el mantenimiento del cultivo, en cada frasco de 25 mL se sembró 2,5 millones de células, y en el de 75 mL, 5 millones.

- 1.2 Línea celular EndoC-βH1

La línea EndoC-βH1 (RRID: CVCL_L909), procedente de un primordio pancreático fetal humano, es una línea de células β pancreáticas con capacidad de sintetizar y secretar insulina (Andersson et al., 2015). Tanto para el mantenimiento del cultivo como para los tratamientos se empleó como medio base DMEM de baja glucosa (5,5 mM) suplementado acorde a lo descrito en la tabla 2.

Compuesto	Concentración	Casa comercial
Transferrina humana	5,5 µg/mL	Sigma T8158
Selenito sódico	6,7 ng/mL	Sigma S55261
Albúmina, Fracción V, libre de ácidos grasos	2 %	Roche diagnostic 10775835001
Nicotinamida	10 mM	HYCLONE SV30160.03
2-mercaptoetanol	50 µM	Sigma M3148
Estreptomina	100 U/mL	GIBCO 15140-122
penicilina	100 U/mL	GIBCO 15140-122
DMEM baja glucosa		GIBCO 31885023

Tabla 2. Composición del medio de cultivo de la línea EndoC-βH1. *Antes del tratamiento, el medio fue suplementado con FBS inactivado (2%).

Un requerimiento de esta línea celular es que las células deben crecer sobre un lecho de Matrigel, formado por un medio DMEM de alta glucosa (25 mM) complementado con lo descrito en la tabla 3. El Matrigel fue añadido tanto al frasco de cultivo como a las placas 3 horas antes de la siembra, incubándose a 37°C.

Compuesto	Concentración	Casa comercial
ECM	1%	Sigma E1270
Fibronectina bovina de plasma	2 µg/mL	Sigma F1141
Estreptomina	50 U/mL	GIBCO 15140-122
penicilina	50 U/mL	GIBCO 15140-122
DMEM alta glucosa		GIBCO 41965-039

Tabla 3. Composición del lecho de Matrigel empleado en la línea EndoC-βH1

La línea celular fue empleada a partir del pase 62-63 y nunca más allá del pase 80. Las células fueron mantenidas en frascos de 75 mL (TPP), con 13 mL de medio de cultivo, llegando en una semana a una confluencia de aproximadamente el 80%, determinada de *visu* bajo el microscopio.

Semanalmente se realizó un subcultivo que consistió en la tripsinización utilizando una solución comercial de tripsina-EDTA 0,05% (Gibco) durante 3 minutos a 37°C; posteriormente, la tripsina fue neutralizada con un medio de

neutralización, compuesto por PBS y 20% de FBS inactivado, añadiendo al menos 3 veces más de medio de neutralización. La suspensión celular fue transferida a un tubo de centrifuga (Falcon) y centrifugada a 0,5 RCF durante 5 minutos; seguidamente, el sobrenadante fue retirado y el pellet de células resuspendido en un volumen de 5 mL medio de cultivo. Para calcular el número de células por mililitro, se hizo el recuento con la cámara de Neubauer, y bajo el microscopio, se contaron los 4 cuadrantes de la cámara. Para obtener el número de células/mL se empleó la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{células}}{\text{mL}} = \left(\text{N}^{\circ} \text{ células contadas} / 4 \right) \times 10000$$

Las células fueron sembradas en placas de 96 (TPP), a una densidad de 45 mil células por pocillo, mientras que para el mantenimiento del cultivo celular se sembraron entre 70 y 80 mil células por cm².

2. Aislamiento y cultivo *ex vivo* de células aisladas de islotes pancreáticos.

Las células aisladas de islotes pancreáticos fueron obtenidas a partir de ratones macho adultos de la cepa C57BL/6J, tanto silvestres ((*WT*, del inglés *Wild-Type*), como ratones *knockout* para ERβ (*βERKO*), con una edad comprendida entre 10 y 12 semanas, provenientes de la colonia del Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la UMH.

Los animales se mantuvieron en condiciones estandarizadas y estables (ciclo 12 horas luz/12 horas oscuridad y una temperatura aproximada de 22°C), con acceso libre a agua y comida. Los procedimientos empleados han sido previamente evaluados y aprobados por el Comité de Ética de la UMH acorde a la legislación estatal y europea vigente.

El sacrificio de los ratones se realizó mediante dislocación cervical. Tras la esterilización de la zona quirúrgica, las vísceras abdominales se expusieron realizando una laparotomía media completa, mostrando el colédoco, el cual fue posteriormente canulado con una aguja por la que se perfundió una solución de 1 mg/ml de la enzima colagenasa, preparada en medio de aislamiento (tipo V;

Sigma), al interior del páncreas. La composición del medio de aislamiento (en mM) es la siguiente: 115 NaCl, 5 KCl, 10 NaHCO₃, 1,1 MgCl₂, 1,2 NaH₂CO₄, 2,5 CaCl₂, 25 HEPES, 0,25% BSA y 5 glucosa, ajustándose el pH a 7,4 con NaOH.

Se extrajo el páncreas lleno de colagenasa, liberándolo de los órganos circundantes y se introdujo en un tubo de centrifuga de 15 mL, al que se completó parcialmente con la solución de colagenasa hasta que el páncreas quedo completamente embebido. Empleando un baño de agua a 37°C, el tubo se sumergió para realizar la digestión enzimática durante aproximadamente 7 minutos, determinándose visualmente el tiempo de digestión necesario para cada experimento, puesto que puede variar en función del lote de la enzima.

La colagenasa fue neutralizada mediante la adición de medio de aislamiento frío, manteniendo el tubo en hielo y verticalmente para poder separar así el precipitado del páncreas disgregado. Para la obtención de los islotes, el sobrenadante se fraccionó en tres partes, siendo volcados a una placa de Petri estéril y recolectados uno a uno empleando una lupa binocular y una micropipeta. Los islotes obtenidos fueron llevados al incubador a 37°C y 5% de CO₂ para permitir su recuperación al menos una hora antes de realizar el cultivo primario de células dispersas.

Una vez transcurrido el tiempo de recuperación, los islotes se introdujeron en un tubo de centrifuga, y se centrifugaron durante 7 minutos a 1000 RPM. Tras la retirada del sobrenadante, el pellet con los islotes fue resuspendido en una solución de 0,05% de Tripsina (Sigma). Se incubaron durante 3 minutos a 37°C y la reacción enzimática fue neutralizada mediante la adición de al menos 3 veces más de medio de cultivo cuya composición está detallada en la tabla 4.

Compuesto	Concentración	Casa comercial
FBS-Charcoal	8%	HYCLONE SV30160.03
Glutamina	2 mM	
Estreptomicina	50 U/mL	GIBCO 15140-122
Penicilina	50 U/mL	GIBCO 15140-122
RPMI sin rojo fenol		GIBCO 11835-063

Tabla 4. Composición del medio de cultivo para células pancreáticas dispersas.

La suspensión celular se centrifugó de nuevo a 1000 RPM durante 10 minutos, descartando el sobrenadante y resuspendiendo el pellet con las células disgregadas en un volumen de medio de cultivo determinado en función de la densidad celular necesaria para tener 30 mil células por pocillo. La siembra de células fue realizada en placas de 96 pocillos. Las placas, previamente, habían sido tratadas con poli-L-lisina 0,01% (Sigma) al menos una hora para promover la adhesión celular. El exceso de poli-L-lisina fue retirado lavándose tres veces con H₂O destilada y autoclavando.

3. Tratamiento celular.

Las líneas celulares, así como las células dispersas de islotes murinos, fueron cultivadas acorde a las necesidades específicas de cada una de ellas, e incubadas a 37°C, con un 5% de saturación de CO₂ en una atmósfera húmeda.

Los distintos compuestos moduladores de la actividad estrogénica empleados, así como su estructura química y perfil farmacológico se encuentran descritos en la figura 11. Todos ellos son de naturaleza hidrofóbica, por lo que fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma). La condición denominada vehículo contiene DMSO isovolumétrico.

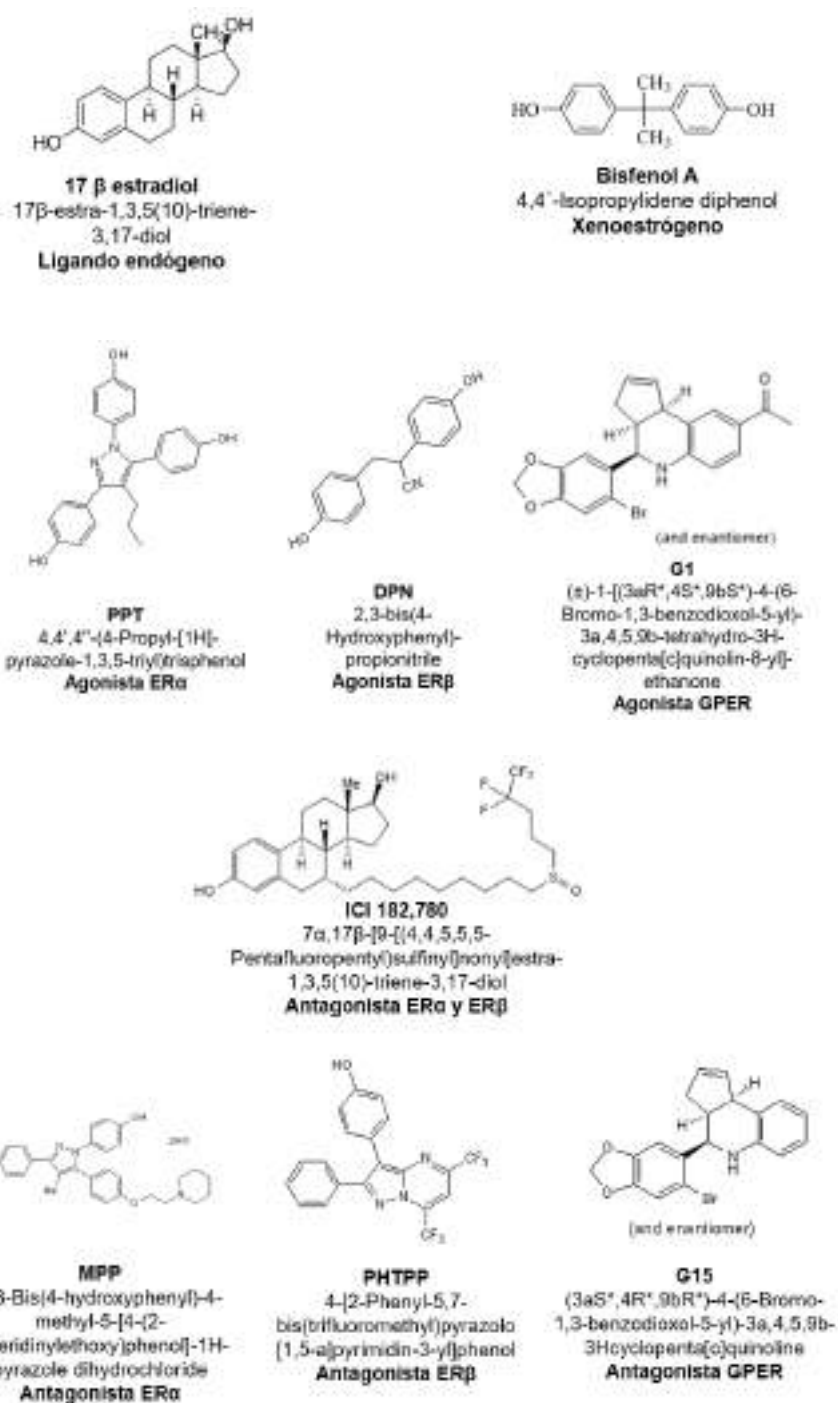


Figura 11. Compuestos moduladores de los diferentes receptores de estrógenos, con su estructura química, nombre comercial, nomenclatura de la IUPAC y actividad respecto a los receptores de estrógenos.

Un coctel de citoquinas proinflamatorias fue empleado en determinados experimentos como control positivo de muerte celular. Dicho coctel contenía IL-1 β recombinante humana e IFN γ de rata (R&D Systems), preparadas acorde a las indicaciones del fabricante y diluidas en medio completo, hasta alcanzar una concentración de uso de 10 U/mL de IL-1 β y 100 U/mL de IFN γ .

4. Transfección con ARN pequeño de interferencia.

La estrategia del ARN pequeño de interferencia (siRNA, del inglés *small interfering RNA*), conduce a la degradación del ARN mensajero de interés, impidiendo de esta forma la traducción de la proteína (Tatiparti et al., 2017). Tanto la línea INS-1E como la línea EndoC- β H1 fueron transfectadas con los diferentes siRNAs para los receptores de estrógenos recogidos en la tabla 5. Para realizar la transfección se usó una concentración final de 30 nM de siRNA (Santin et al., 2015) y como reactivo de transfección, lipofectamina RNAiMAX (Invitrogen), que permite la formación de liposomas para transportar el siRNA al interior celular (figura 12). Como control negativo se empleó Allstars Negative Control siRNA (siCTRL) (Qiagen, Venlo, Netherland) que no ejerce ningún efecto sobre la viabilidad celular ni genera cambios en la expresión génica.

Las células fueron incubadas durante 16 horas con el siRNA en un medio de transfección con la misma composición que el medio de cultivo específico para cada línea celular (detallado anteriormente en la tabla 1, línea INS-1E y tabla 2, EndoC- β H1), pero sin haber sido suplementado con antibióticos ni BSA. Transcurrido el tiempo de la transfección, el medio con el siRNA fue sustituido por medio de cultivo específico para cada línea completamente suplementado, dejándose recuperar 48 horas antes de realizar ningún tratamiento.

En los casos de GPER en INS-1E y tanto para ER α como ER β en EndoC- β H1, se realizó un protocolo de doble transfección, ya que con una solo no se llegó a silenciar el 50% la expresión. El protocolo de doble transfección consistió en la incubación de 30 nM de siCTRL o siRNA de interés durante 16 horas, permitiendo su recuperación durante 24 horas, tras las cuales se volvió a exponer a las células al siRNA en idénticas condiciones.

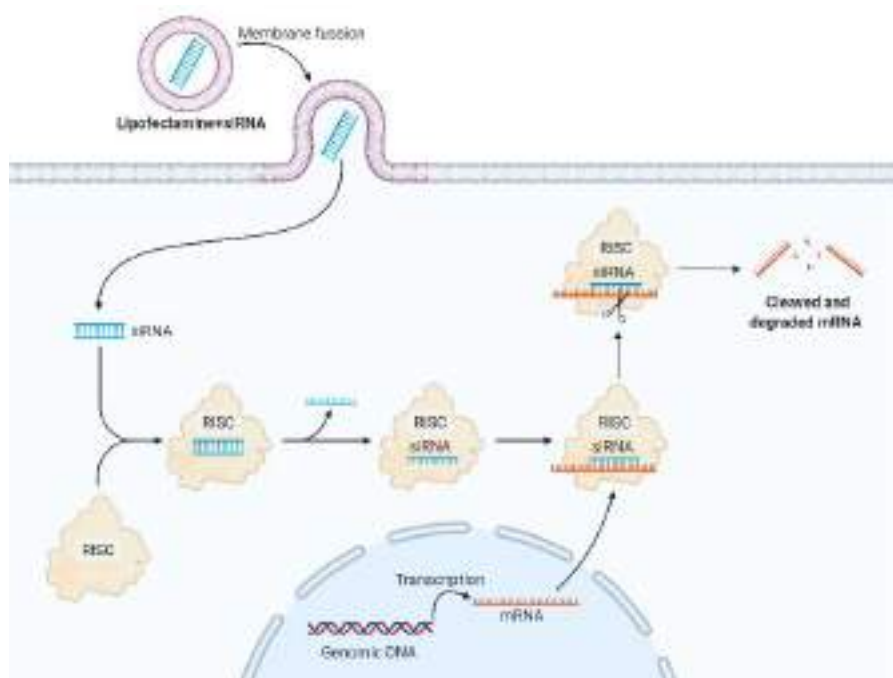


Figura 12. Mecanismo de acción de los siRNAs. Tras introducir en la célula el siRNA de doble cadena mediante liposomas es separada, dando lugar a un siRNA monocatenario que puede ser empleado por RISC como molde para la degradación del ARN mensajero diana (imagen creada con biorender.com).

	Nombre	Casa comercial	Secuencia (5' a 3')
siCTRL	Allstars Negative Control siRNA	Qiagen, Venlo, Netherlands	Secuencia no facilitada
Rn Gper	Rn_Gpr30_1 FlexiTube siRNA (SI01518335)	Qiagen, Venlo, Netherlands	Secuencia no facilitada
Rn Erα	Esr1RSS302814 (3_RNAI)	Invitrogen, Pasley, UK	GCUACAAACCAAUGCACCAUCGAUA
Rn Erβ	Esr2RSS303096	Invitrogen, Pasley, UK	CCCAAUGUGCUAUGGCCAACUUCU
HS GPER	Hs_GPR30_1 FlexiTube siRNA (SI00430360)	Qiagen, Venlo, Netherlands	Secuencia no facilitada
HS ERα	HS ESR1 8 (SI02784101)	Qiagen, Venlo, Netherlands	Secuencia no facilitada
HS ERβ	HS ESR2 6 (SI03083269)	Qiagen, Venlo, Netherlands	Secuencia no facilitada

Tabla 5. siRNAs para receptores de estrógenos empleados en la transfección: proteína de interés, nombre del siRNA, fabricante y secuencia (Rn: *Rattus norvegicus*; Hs: *Homo sapiens*).

5. Western Blot

El *Western Blot* (WB) es una técnica que consiste en la detección específica de proteínas usando anticuerpos para las mismas. En este trabajo se empleó el WB en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) para confirmar el silenciamiento por medio del siRNA de los diferentes receptores de estrógenos.

Las células fueron lavadas con PBS frío, y lisadas con el tampón de lisis de Laemmli (glicerol 10%, DTT 0,1 M, Tris base 62,5 mM, SDS 2%, azul de bromofenol 0,2 mg/mL). Las muestras recogidas fueron hervidas a 99°C durante 10 minutos con una agitación de 800 RPM.

Los geles empleados contaban con 15 pocillos y se distribuían en dos secciones, según su porcentaje de acrilamida. La primera sección se correspondía al gel concentrador, preparado al 4% de acrilamida, mientras que la segunda sección era el gel separador, que presentaba una concentración del 12% de acrilamida.

Para poder determinar la posición en el gel en la que se encontraban las proteínas de interés se empleó un marcador de peso molecular (Thermo Scientific). Se cargaron 25 µL de muestra, mientras que de marcador se cargaron 3 µL y 1 µL al principio y al final del gel, respectivamente. Los geles fueron embebidos en el tampón de electroforesis (tabla 6). La electroforesis fue realizada a 90 V y cuando las muestras se encontraban en la interfase entre el concentrador y separador, se incrementó el voltaje a 120 V.

Una vez transcurrida la electroforesis, se realizó la electrotransferencia en condiciones húmedas en una disposición “casete tipo sándwich”, donde se hace pasar una corriente desde el cátodo hasta el ánodo, induciendo así la migración de las proteínas desde los geles de acrilamida hasta una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Amersham). El PVDF posee una gran capacidad de adsorción de polipéptidos, pero presenta una alta hidrofobicidad, por lo que un requisito previo a la transferencia es la “activación” de la membrana empleando metanol puro (PanReac Applychem). Para ello se bañaron las membranas en metanol durante 2 minutos. Una vez activada la membrana de PVDF se realizó

el montaje del sándwich. Los casetes fueron sumergidos en el tampón de transferencia (Tabla 6) y los parámetros empleados fueron 90 V durante 90 minutos. La electrotransferencia es un proceso que genera una gran cantidad de calor, por lo que, para evitar el recalentamiento del gel, en el interior de la cubeta se incluyó un bloque de hielo, siendo este reemplazado a los 45 minutos del proceso, mientras que exteriormente la cubeta también fue envuelta con hielo.

Tampón de electroforesis		Tampón de transferencia	
<u>Reactivo</u>	<u>Concentración</u>	<u>Reactivo</u>	<u>Concentración</u>
Tris Base	25 mM	Tris Base	25 mM
Glicina	192 mM	Glicina	192 mM
SDS	0,1 %	Metanol	20 %
H ₂ O destilada	Hasta 1 L	H ₂ O destilada	Hasta 2 L

Tabla 6. Composición de los tampones de electroforesis y de transferencia.

Transcurrido el tiempo de la electrotransferencia, se realizó un bloqueo, el cual consistió en leche desnatada en polvo al 5% (p/v) disuelta en TBS-T (150 mM NaCl, 10 mM Tris base y 0,0005% Tween 20) durante una hora, a temperatura ambiente y en agitación suave. Una vez finalizado el bloqueo, se lavó la membrana con TBS-T y se procedió a incubar con el anticuerpo primario (Tabla 7) durante toda la noche a 4°C y en agitación suave.

Tras la incubación con el anticuerpo primario, las membranas fueron lavadas tres veces, diez minutos cada vez con TBS-T, y se incubó una hora con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (Tabla 7) en agitación suave a temperatura ambiente. Finalmente, después de realizar tres lavados de diez minutos cada uno con TBS-T, se procedió al revelado de las muestras. Las imágenes fueron obtenidas mediante quimioluminiscencia, empleando como sustrato de la reacción el reactivo SuperSignal West Femto (Thermoscientific,) y como detector de la señal, ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad Laboratories).

Proteína diana	Secuencia epítipo	Nombre del anticuerpo	Fabricante, nº catálogo	Especie	Dilución	RRID
ER α	NA	Estrogen Receptor alpha Monoclonal Antibody	Invitrogen Cat# MA5-13191	Mouse monoclonal	1:1000	AB_10986080
ER β	NA	Estrogen Receptor Beta Monoclonal Antibody	Invitrogen Cat# MA5-24807	Mouse monoclonal	1:2000	AB_2717280
GPER	350 to the C-terminus of Human GPCR GPR30	Anti-G-protein coupled receptor 30 antibody	Abcam Cat# Ab-39742	Rabbit (polyclonal)	1:1000	AB_1141090
α -Tubulin	NA	Monoclonal Anti- α Tubulin antibody	Sigma, Cat#: T9026	Mouse, monoclonal	1:5000	AB_477593
β -Actin	NA	β -Actin (D6A8) Rabbit mAb antibody	Cell Signaling Technology Cat# 8457	Rabbit, monoclonal	1:1000	AB_10950489
Goat anti-mouse IgG	NA	Goat Anti-Mouse IgG (H+L) HRP Conjugate antibody	Bio-rad, Cat# 170-6516	Goat, Polyclonal	1:5000	AB_11125547
Goat anti-rabbit IgG	NA	Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) HRP Conjugate antibody	Bio-rad Cat# 170-6515	Goat, Polyclonal	1:5000	AB_11125142

Tabla 7. Anticuerpos empleados para Western Blot. *Los anticuerpos primarios fueron preparados acorde a la dilución indicada en la tabla y diluidos en TBS-T con BSA al 5% (p/v). **Los anticuerpos secundarios fueron diluidos a 1:5000 en TBS-T y leche desnatada al 5% (p/v).

6. Determinación de la viabilidad celular.

- 6.1 Recuento de la apoptosis mediante marcajes de unión al ADN

Una vez concluido el tiempo de exposición a los distintos tratamientos, se analizó la apoptosis. Para ello se incubaron las células con dos agentes fluorescentes e intercalantes del ADN, el Hoechst 3342 (HO) (λ ex/em 350/ 461 nm) y el yoduro

de propidio (PI) (λ ex/em 535/ 617 nm) (Invitrogen). El fundamento de esta técnica radica en que el HO permea las membranas celulares cuando la célula se encuentra en un estado viable, mientras que el PI solo puede permear al interior de las células cuando la membrana se encuentra comprometida, como es el caso de la apoptosis tardía o necrosis (Figura 13), permitiendo así distinguir entre los estados viable, apoptótico y necrótico (Lema et al., 2011).

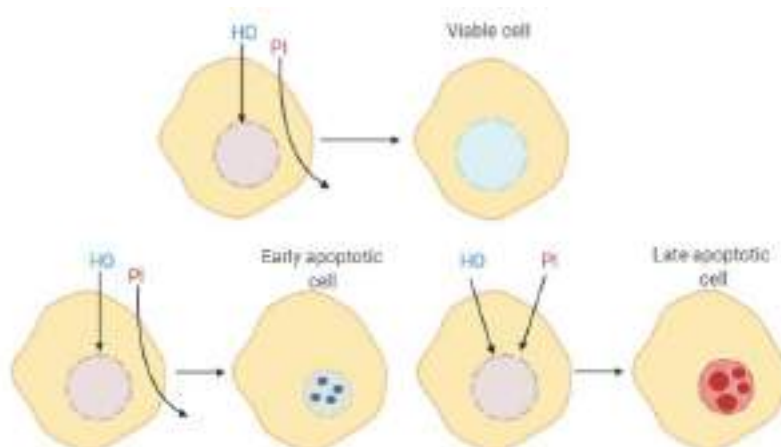


Figura 13. Fundamento de la técnica de tinción HO/PI para cuantificación de la apoptosis. Las células viables expulsan el PI, mientras que el Hoechst tiñe el núcleo de color azul. En las células apoptóticas tempranas, la condensación de la cromatina puede ser reconocida por un incremento en la intensidad del azul. Finalmente, en la apoptosis tardía, la membrana se encuentra comprometida, y el PI puede teñir el núcleo de color rojo (imagen creada con biorender.com).

Ambos compuestos se prepararon a una concentración inicial de 1 mg/mL en PBS estéril, filtrándose posteriormente con un filtro de tamaño de poro 0,2 μ m (Filtropur S 0.2, SARSTEDT). Las concentraciones finales de cada fluoróforo dependen del modelo que se vaya a emplear. En el caso de INS-1E, la concentración final empleada para cada uno de ellos fue 5 μ g/mL, mientras que para EndoC- β H1 y para las células primarias, la concentración final es de 10 μ g/mL.

Respecto a EndoC- β H1, en la composición de su medio lleva albúmina (Tabla 2), que puede secuestrar a los agentes fluorescentes, por lo que para la preparación de la tinción se empleó únicamente el DMEM de baja glucosa. Se incubaron las células a 37°C durante 15 minutos y posteriormente, se retiró la mitad del medio y se añadió el mismo volumen de medio fresco.

Para el recuento celular se empleó un microscopio invertido (Zeiss-Vision, Munich, Germany), el cual llevaba acoplado una lámpara de mercurio para generar la fluorescencia (Zeiss Fluo-Arc). Las muestras fueron visualizadas usando el objetivo de 20X y al menos 600 células fueron contadas para cada una de las condiciones experimentales. Puesto que la técnica es de *visu*, para evitar posibles sesgos la viabilidad celular fue determinada por dos investigadores, uno de ellos desconocedor de la identidad de los diferentes tratamientos celulares. Los resultados entre ambos investigadores difirieron menos del 5%. Para el cálculo del porcentaje de apoptosis se aplicó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Apoptosis} = \left(\frac{\text{Células apoptóticas}}{\text{Células totales}} \right) \times 100$$

- 6.2 Determinación de la apoptosis por citometría de flujo: Anexina V/PI

Durante el proceso de apoptosis, en los primeros estadios, la fosfatidilserina se transloca a la hemicapa externa de la membrana plasmática, pudiendo entonces ser reconocida por la anexina V, mientras que, al final de la apoptosis, la membrana celular se encuentra comprometida, pudiendo por tanto permear el PI (Pietkiewicz et al, 2015).

Para la detección de la apoptosis mediante el citómetro de flujo se utilizó el kit comercial *FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI* (Biolegend). La línea INS-1E fue sembrada en placas de 6 pocillos y tratada de acuerdo con las necesidades experimentales durante 48 horas, tras las cuales, las células fueron despegadas de la placa de cultivos empleando la solución comercial Accutase (Thermo Fisher Scientific) durante 6 minutos a 37°C. Para la recuperación de las células en suspensión, se centrifugó a 1400 RPM durante 7 minutos. Seguidamente, las células fueron teñidas con la Anexina V conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC), λ ex/em 490/ 525 nm) (Anexina V-FITC) y el PI (λ ex/em 535/ 617 nm), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las células, finalmente, fueron analizadas mediante el citómetro FACSCanto II (BD Bioscience, Madrid, España), el cual presentaba una rueda de filtros capaz de recoger en un canal la fluorescencia emitida por el FITC y en otro canal la señal del PI. Se analizaron 20 mil eventos por cada condición. Los datos

obtenidos fueron procesados empleando el programa Flowing (Turku Bioscience, Finlandia). Se dividieron todos los eventos de la muestra en cuadrantes, según la fluorescencia recogida en cada uno de dichos eventos. Los datos están representados como el porcentaje de eventos recogidos en cada uno de los cuadrantes de la figura 14.

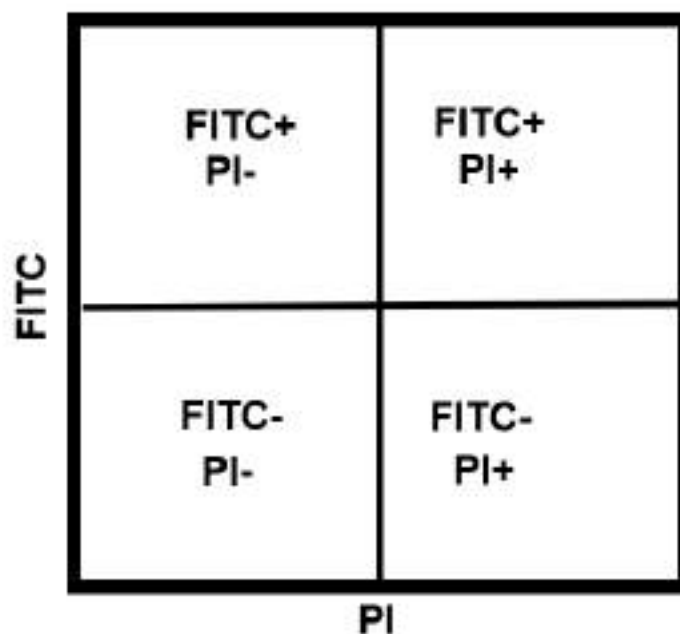


Figura 14. Distribución de eventos según su fluorescencia en el citómetro de flujo. Los eventos son recogidos y clasificados en función del marcaje fluorescente que presenten. Las dobles negativas suponen la población viable, las FITC⁺/PI⁻ son las apoptóticas tempranas, FITC⁺/PI⁺, las apoptóticas tardías y FITC⁻/PI⁺, las necróticas.

Puesto que el espectro de emisión del FITC solapaba con el espectro del PI (recuadro negro en la figura 15), fue necesario realizar una compensación previa, permitiendo eliminar dicha interferencia. Para ello, se incluyeron tres muestras control: la primera sin teñir nos permitía seleccionar la población; la segunda, solo presentaba la tinción de Anexina V-FITC y la tercera, solo marcada con el PI.

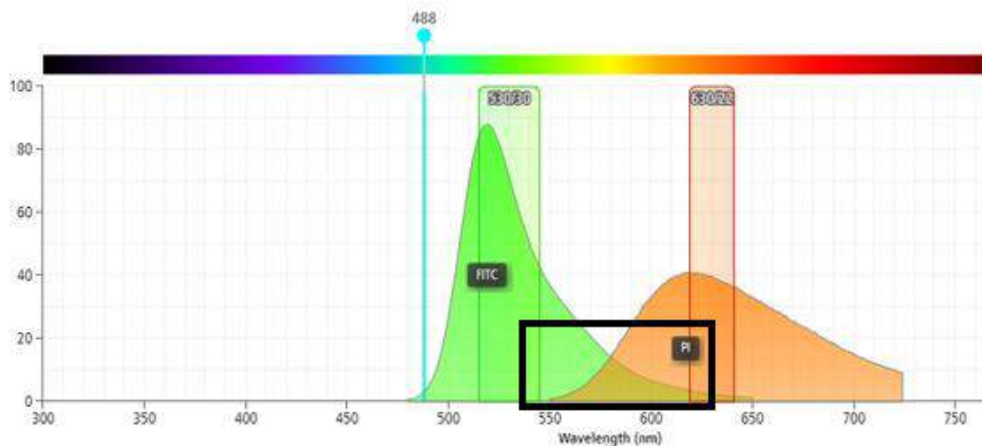


Figura 15. Espectro de emisión de la fluorescencia del isotiocianato de fluoresceína (FITC) y del ioduro de propidio (PI). Fluorescencia emitida por el FITC, (en verde) y por PI (en rojo-naranja). La excitación de ambos fluoróforos se llevó a cabo empleando un láser a 488 nm. El recuadro negro indica el solapamiento de los espectros de emisión.

- **6.3 Determinación de la viabilidad celular por colometria: MTT**

El fundamento del MTT consiste en la reducción por parte de las enzimas mitocondriales dependientes de NADPH del reactivo MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), dando como producto sales de formazán, de color morado (figura 16), pudiendo correlacionarse una mayor cantidad de cristales generados con una mayor viabilidad celular (Kumar et al., 2018).

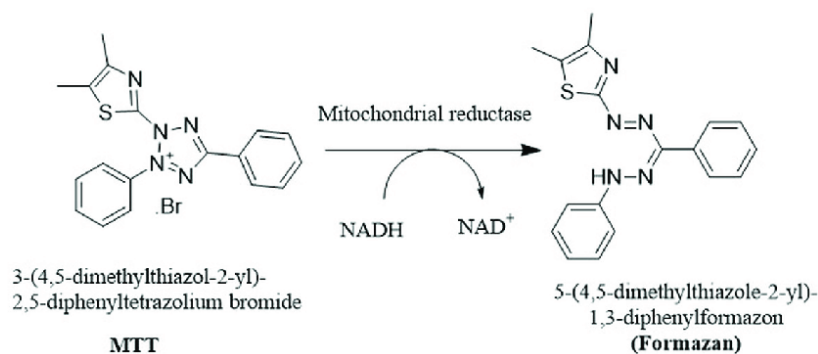


Figura 16. Reducción de MTT a cristales de formazán mediante la acción de la reductasa mitocondrial (imagen tomada de Farooq et al., 2020).

Se sembraron tanto la línea INS-1E como EndoC-βH1 en placas de 96 pocillos y posteriormente, fueron tratadas acorde a las necesidades experimentales, realizándose cada tratamiento en 4 replicados. Transcurridas 48 horas de tratamiento, se adicionó el reactivo MTT (0,5 mg/mL final) (Sigma-Aldrich)

incubándose 3 horas a 37°C para permitir la generación de cristales de formazán. Puesto que dichos cristales son insolubles en agua, pero solubles en DMSO, se retiró el medio con cuidado y se añadió 100 µL de DMSO. Finalmente, la absorbancia fue medida a una longitud de 595 nm empleando el lector de placas iMark Microplate Reader (Bio-Rad laboratories). Para la representación de los datos, la absorbancia obtenida en el vehículo fue asumida como 100% de viabilidad.

7. Detección de los heterodímeros

• 7.1 Coinmunoprecipitación (CoIP)

Los receptores de estrógenos ER α y ER β , al unirse el ligando dimerizan, dan lugar tanto a homodímeros como a heterodímeros. Para evaluar la formación de heterodímeros, se empleó la coinmunoprecipitación (CoIP), que permite purificar los complejos de proteína-proteína específicos de todo el lisado celular. Para llevar a cabo la CoIP se usó el kit Dynabeads Protein G (Thermo Fisher Scientific). La línea INS-1E fue sembrada en placas de 6 pocillos y tratada acorde a las necesidades experimentales durante 24 horas, tras las cuales, las células fueron lavadas dos veces con PBS frío y lisadas con el tampón de inmunoprecipitación (50 mM Tris pH 7,5, 4 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 10 mM NaF, 1 mM PMSF, 1% Triton X-100 y un coctel de inhibidores de proteasas (Roche Diagnostics)). Con el raspador de células se recogieron las muestras y, para la fragmentación del ADN, se hizo pasar las células a través de una jeringuilla con una aguja de 30G, dejándose posteriormente una hora en hielo.

Las muestras fueron centrifugadas a 20 mil RCF durante diez minutos a 4°C recogiendo el sobrenadante y almacenando 30 µL del mismo para utilizarlo como *input*.

Para la eliminación de uniones inespecíficas, se incubó el lisado celular con los Dynabeads en agitación rotatoria durante una hora a 4°C, separando las muestras de los Dynabeads Protein G gracias a un imán. Seguidamente, mediante el método de Bradford (detallado en el apartado 9 de esta sección) se realizó la cuantificación de proteínas, ajustándose la concentración a la menor de ellas y empleando como diluyente el tampón de inmunoprecipitación.

Se dividió la muestra en dos fracciones idénticas que fueron incubadas bien con el anticuerpo anti-ER β o bien con un IgG no específico durante la noche a 4°C en agitación rotatoria. Puesto que el anticuerpo anti-ER β , durante esta incubación, había sido capaz de unirse a ER β y para aislarlas del resto del lisado celular, se incubaron tanto las muestras que llevaban anti-ER β como el IgG no específico durante 1 hora con los Dynabeads Protein G a 4°C y en agitación rotatoria, empleando el imán para separar los Dynabeads Protein G.

Finalmente, los Dynabeads Protein G fueron lavados tres veces con el tampón de inmunoprecipitación con el 1% de Triton-X 100, dos veces con el tampón de inmunoprecipitación con el 0,1% de Triton-X 100, y una vez con el tampón de inmunoprecipitación sin Triton-X 100.

Para recuperar las proteínas precipitadas se añadieron 25 μ L de tampón Laemli y se calentaron las muestras a 99°C durante diez minutos en agitación. El análisis se realizó mediante una electroforesis SDS-PAGE, según lo descrito en el apartado 4 de la presente sección.

- 7.2 Ensayo de ligadura de proximidad *in situ* (*In situ Proximity Ligand Assay*) (PLA)

La determinación intracelular de heterodímeros se realizó mediante el PLA. Para ello se empleó el kit Doulink In Situ Red Starter (Sigma-Aldrich), siguiendo las instrucciones del fabricante.

La línea INS-1E fue sembrada en cubreobjetos de 24 mm de diámetro pretratados con Poli-L-lisina, acorde a lo descrito en el punto 2.2 de este apartado. Tras lavarlas con PBS, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Para mayor capacidad de acceso de los anticuerpos al interior de las células, después de la fijación se realizó una permeabilización celular, empleando una disolución del detergente Triton-X 100 al 0,1% durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Para evitar las uniones inespecíficas, se preparó el tampón de bloqueo acorde a las instrucciones del fabricante y se incubaron las preparaciones con la solución de bloqueo durante 1 hora a 37°C. Seguidamente, se incubaron durante la noche los anticuerpos primarios (recopilados en la tabla 8) a 4°C. Las muestras, a

continuación, fueron lavadas 2 veces, 5 minutos cada vez, en agitación suave con el tampón de lavado A (preparado acorde con las instrucciones del fabricante).

Seguidamente se incubaron las muestras con la solución de *PLA probe* durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, la solución de ligasa fue añadida e incubada a 37°C durante 100 minutos. Finalmente, las muestras fueron lavadas 2 veces, 10 minutos cada vez, en agitación suave con el tampón de lavado B (preparado acorde con las instrucciones del fabricante) y secadas a temperatura ambiente en oscuridad.

Las muestras fueron montadas con el medio de montaje, que ya incluía el agente fluorescente DAPI. Para la visualización de los heterodímeros se usó un microscopio confocal (Zeiss Confocal LSM900), empleando un objetivo de 63X, con una cámara acoplada (Zeiss-Vision, Munich, Alemania). Las imágenes obtenidas fueron analizadas usando el software ZEN (versión 3.2, Zeiss-Vision, Munich, Alemania).

Proteína diana	Nombre del anticuerpo	Fabricante, nºcatálogo	Especie	Dilución	RRID
ERα	Estrogen Receptor alpha Monoclonal Antibody (SP1)	Thermo Fisher Scientific; Cat no. MA5-14501	Rabbit, monoclonal	1:200	AB_10981779
ERβ	Estrogen Receptor beta Monoclonal Antibody (14C8)	Thermo Fisher Scientific; Cat no. MA1-23217	Mouse, monoclonal	1:2000	AB_558839

Tabla 8: Anticuerpos empleados durante el ensayo del PLA.

8. Medida de la generación de ROS intracelular.

Las líneas INS-1E y EndoC- β H1 fueron sembradas en placas negras de 96 pocillos (Corning) y tratadas acorde a las necesidades experimentales, realizándose cada tratamiento por duplicado. Como control positivo del experimento se empleó la menadiona, un inductor de ROS mediante la activación de ciclos REDOX, que provocan una acumulación de ROS (Loor et al., 2010).

Tras la incubación de 24 horas con los compuestos estrogénicos y de 90 minutos con la menadiona, se realizó una medida de la generación de ROS. Para ello se empleó una sonda fluorescente, 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCF $\lambda_{ex/em}$ 504/524 nm) (Sigma Aldrich). El DCF presenta la particularidad de que, cuando se encuentra en estado reducido, genera poca fluorescencia. Sin embargo, al ser oxidada por la presencia de ROS, su fluorescencia se incrementa (Kim & Xue, 2020). Las células fueron incubadas con 10 μ M de DCF disuelto en DMSO durante 30 minutos, en oscuridad, a 37°C. Finalmente, la fluorescencia fue medida en el lector de placas POLARSTAR (BMG Labtech, Alemania). Los resultados de fluorescencia fueron normalizados por la concentración de proteína total de cada muestra, medida por el método Bradford.

9. Método Bradford

La cantidad de proteína total fue evaluada espectrofotométricamente empleando el método de Bradford. La medida se realizó en una placa de 96 pocillos incubando 10 μ l del lisado celular con 200 μ l de reactivo de Bradford. Para permitir la reacción, el reactivo y la muestra de proteínas se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente y en agitación suave. Seguidamente, se analizó el valor de absorbancia a 595 nm para cada condición. Dicha lectura se realizó mediante el lector de placas iMark Microplate Reader (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Para la obtención de la concentración de proteínas, se cotejó la absorbancia obtenida de las muestras con una recta patrón elaborada con BSA en concentraciones crecientes (0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 y 0,5 mg/ml). Como blanco, en el caso de la recta patrón se empleó H₂O, mientras que para las muestras se usó el tampón de lisis pertinente.

10. Estadística

Los datos han sido representados como la media \pm error estándar (SEM). En base al diseño experimental y a los grupos de interés a comparar se realizó un *Student's t-test* (T-test) cuando solo se quería comparar dos grupos, o un test ANOVA, cuando se realizaban comparaciones entre tres o más grupos. En el caso de que los datos no siguiesen la normalidad, se realizaron test no paramétricos. En todos los casos se consideró la presencia de diferencias significativas con un $p \leq 0,05$.

Resultados

1. El estradiol y el BPA presentan efectos diferentes en la viabilidad de la célula β

Con el objetivo de investigar las acciones que ejercían tanto la hormona natural 17- β -estradiol (E2) como el xenoestrógeno Bisfenol A (BPA) sobre la viabilidad celular, se emplearon dos líneas de célula β : la línea INS-1E de rata y la línea humana EndoC- β H1. Ambas líneas fueron expuestas a concentraciones desde 10 pM a 1000 nM de E2 y BPA, a fin de establecer una dosis-respuesta durante 24 horas de tratamiento. La apoptosis se evaluó empleando la técnica de tinción fluorescente Hoechst/PI (HO/PI), expresándose los resultados en porcentaje de apoptosis. Cuando las células fueron expuestas al E2, no se observó ningún efecto sobre la viabilidad (figura 17a, b), salvo una ligera disminución de la apoptosis en el caso de las INS-1E con la dosis de 1 μ M, respecto al vehículo (figura 17a). Sin embargo, cuando las células fueron incubadas con BPA, tanto en la línea INS-1E como EndoC- β H1 se observó un aumento de muerte celular dependiente de la dosis en todo el rango de concentraciones empleado (figura 17c y d).

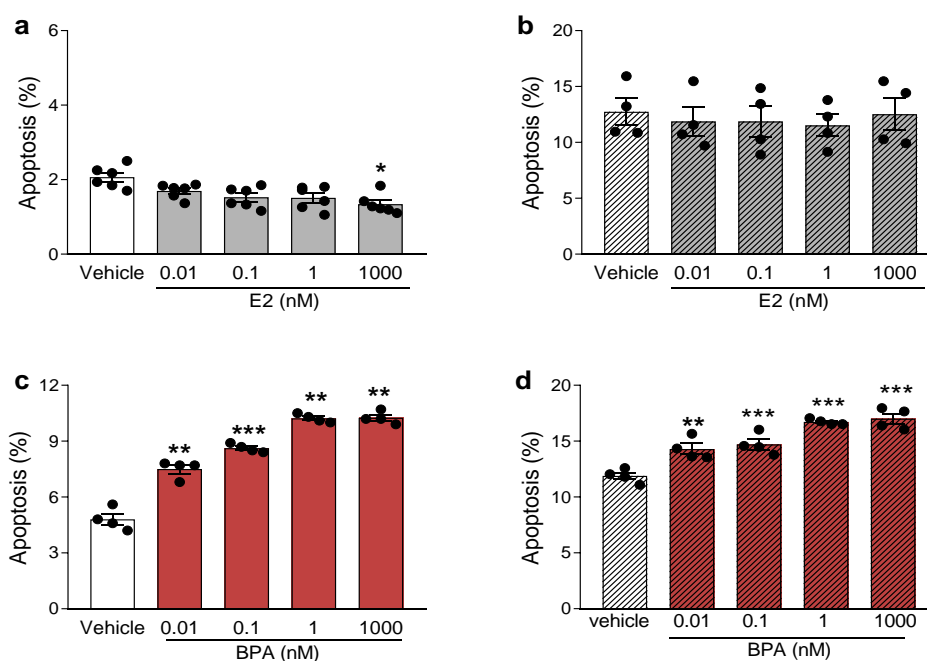


Figura 17. Efecto del E2 y del BPA en la apoptosis de la célula β . Las líneas celulares INS-1E (a-c) y EndoC- β H1 (b-d) fueron tratadas con el vehículo (barras blancas) y con concentraciones nanomolares de E2 (barras grises) o BPA (barras rojas) durante 24 horas. La apoptosis se determinó empleando la técnica del HO/PI. Los datos se muestran como la media \pm SEM de 4-6 experimentos independientes, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ respecto al vehículo. ANOVA One-way.

Los resultados mostrados fueron validados con dos técnicas adicionales: el ensayo de MTT y la detección de la apoptosis mediante citometría de flujo.

Respecto a los resultados alcanzados con la técnica MTT, las líneas INS-1E y EndoC- β H1 fueron incubadas con dosis crecientes de BPA y E2 durante 48 horas, tras las cuales se analizó la absorbancia a 595 nm. Tal y como se muestra en la figura 18, el E2 no indujo ningún efecto sobre la viabilidad celular, ni en INS-1E (figura 18a) ni en EndoC- β H1 (figura 18b). Sin embargo, en el caso del BPA, todas las dosis analizadas mostraron un claro descenso en la viabilidad celular tanto en INS-1E (figura 18c) como en EndoC- β H1 (figura 18d), de forma similar a lo obtenido con el contaje HO/PI.

El segundo método fue la detección de la apoptosis por citometría de flujo en la línea INS-1E. En este caso tratamos las células con E2 1 nM, BPA 1 nM y un coctel de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β (10 U/mL) + IFN γ (100 U/mL)) como control positivo durante 48 horas. A continuación, se despegaron de la placa de cultivo y se marcaron doblemente con Anexina V-FITC y PI para finalmente procesar las diferentes poblaciones celulares usando un citómetro de flujo. Mientras el E2 1 nM no alteró la viabilidad celular, el BPA 1 nM aumentó la apoptosis significativamente (Veh = $9,3 \pm 0,1\%$; BPA = $22,2 \pm 3,1\%$) (figura 18e). Estos datos demostraron que el E2 no genera ningún cambio en la apoptosis, mientras que el BPA disminuye la viabilidad de la célula β .

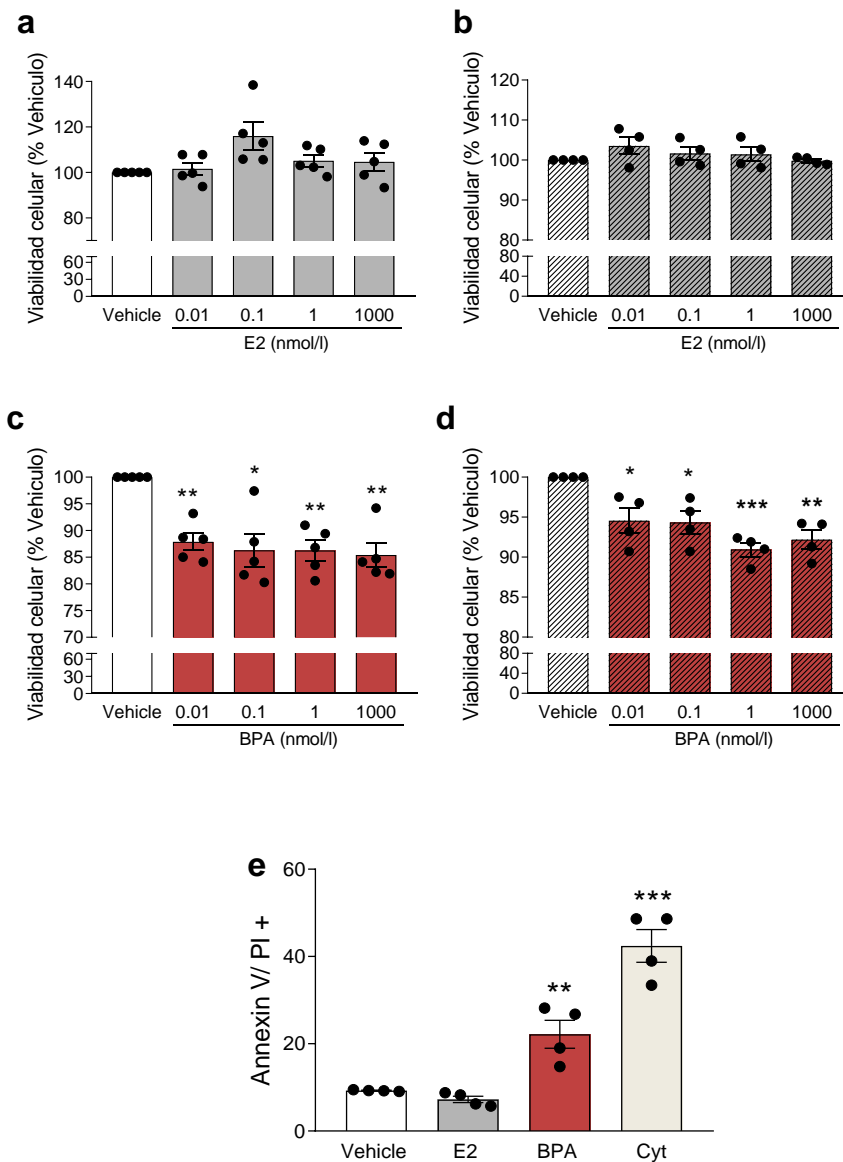


Figura 18. El E2 y el BPA ejercen efectos diferentes sobre la viabilidad de la célula β . Las líneas celulares INS-1E (a-c) y EndoC- β H1 (b-d) fueron tratadas con el vehículo (barras blancas), E2 (barras grises) o BPA (barras rojas) durante 48 horas. La viabilidad celular se determinó mediante MTT. (e) La línea INS-1E fue tratada con vehículo (barras blancas), E2 1 nM (barras grises), BPA 1 nM (barras rojas) y un coctel de citoquinas (IL-1 β 10 U/mL + IFN γ 100 U/mL) durante 48 horas, tras las cuales fueron analizadas mediante citometría de flujo con los marcajes fluorescentes Annexina y V-FITC/PI. Los datos se muestran como la media \pm SEM de 4-5 experimentos independientes, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, respecto al vehículo. ANOVA One-way.

2. El BPA genera un incremento en la producción de ROS induciendo apoptosis.

Se ha establecido que el BPA en la célula β podría promover un aumento de la apoptosis mediante la inducción de estrés oxidativo (Lin et al., 2013). Por ello, decidimos comprobar si en nuestros modelos, la muerte celular observada estaba mediada por un incremento de ROS. Ambas líneas celulares fueron incubadas con BPA 1 nM junto con la presencia o ausencia del agente reductor N acetil cisteína 3 mM (NAC 3 mM) durante 24 horas, tras las cuales se midió la generación de ROS citoplasmático empleando la sonda fluorescente DCF.

Tal y como se observa en la figura 19, el BPA incrementó la producción de ROS tanto en INS-1E (figura 19a) como en EndoC- β H1 (figura 19b) ($3,5 \pm 1,2$ y $4,2 \pm 1,2$ veces en INS-1E y en EndoC- β H1, respectivamente). Dicho aumento fue completamente bloqueado en presencia de la NAC. Para evaluar si existía una correlación entre esta generación de ROS y el aumento en la apoptosis descrito anteriormente, se empleó el mismo diseño experimental evaluando la muerte celular con la tinción HO/PI.

El BPA en ausencia de NAC aumentó la apoptosis. Sin embargo, cuando las células eran incubadas con la combinación BPA+NAC, no se detectó ningún efecto sobre la muerte celular en ambos modelos (INS-1E: Veh= $2,3 \pm 0,1\%$; BPA= $7,3 \pm 0,1\%$; Veh+NAC= $2,4 \pm 0,2\%$; BPA+NAC= $2,4 \pm 0,2\%$. EndoC- β H: Veh= $11,6 \pm 0,4\%$; BPA= $16,6 \pm 0,6\%$; Veh+NAC= $12,4 \pm 0,7\%$; BPA+NAC= $12,6 \pm 0,8\%$) (figura 19c y d). Estos resultados sugieren que la apoptosis inducida por el BPA podía estar mediada por un aumento en la producción de ROS.

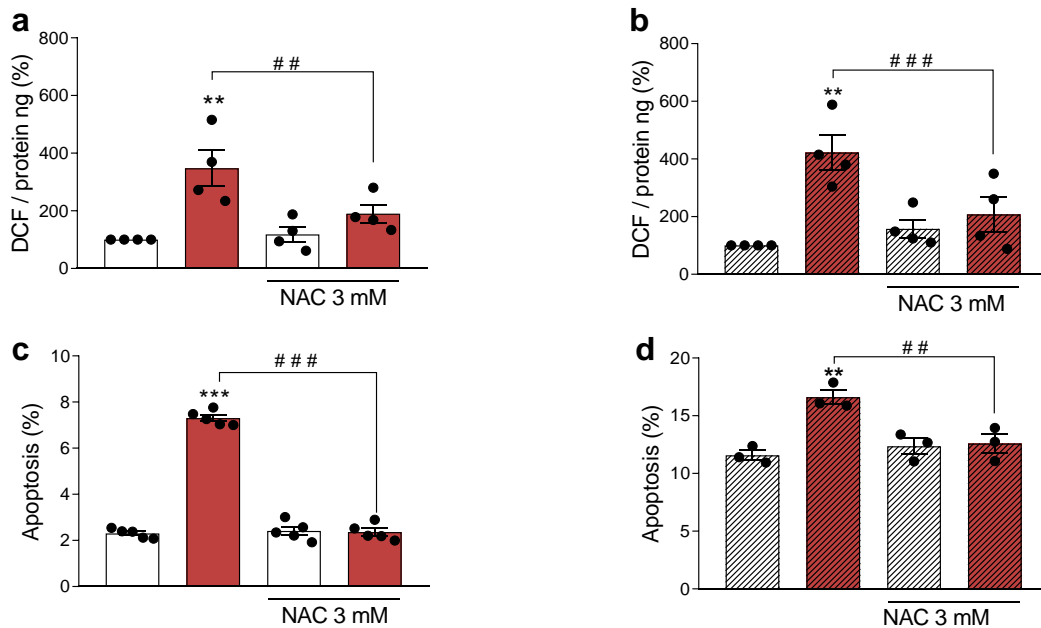


Figura 19. El BPA induce un incremento de la apoptosis a través de ROS. Las líneas celulares INS-1E (a) y EndoC-βH1 (b) fueron tratadas con vehículo (barras blancas) o BPA 1 nM (barras rojas) en presencia o ausencia del NAC 3 mM durante 24 horas. La producción de ROS fue medida empleando la sonda DCF y normalizada por la proteína total. INS-1E (c) y EndoC-βH1 (d) fueron tratadas con vehículo o BPA 1 nM en presencia o ausencia del NAC 3 mM durante 24 horas. La viabilidad celular se determinó mediante la tinción HO/PI. Los datos se muestran como la media ± SEM de 3-5 experimentos independientes. **p≤0,01, ***p≤0,001 respecto al vehículo. ##p≤0,01, ###p≤0,001 indicado por barras. ANOVA Two-way.

3. Papel de GPER en la apoptosis de la célula β.

Una vez demostrado que el E2 y el BPA presentan efectos diferentes sobre la apoptosis de la célula β, nos dispusimos a averiguar qué papel mediaba cada uno de los tres receptores de estrógenos sobre la viabilidad celular, comenzando por GPER.

En otros modelos celulares se ha descrito que el BPA puede ejercer sus acciones a través del receptor GPER (Qie et al., 2021). Por ello, para evaluar el papel que presentaba este receptor en la apoptosis mediada por el BPA en la célula β, se realizó el bloqueo farmacológico de GPER empleando su antagonista G15 a una concentración 10 nM, en combinación con BPA 1 nM, tanto en la línea INS-1E como en EndoC-βH1. Se realizó una preincubación con el G15 de tres horas y seguidamente se expusieron las células a BPA 1 nM en presencia o ausencia del antagonista G15 durante 24 horas y se midió la apoptosis con la técnica HO/PI.

Los resultados obtenidos en la línea INS-1E (figura 20a) empleando el antagonista de GPER G15 en combinación con BPA, mostraron que aquellas células con la vía de GPER bloqueada mostraban una reducción del $74 \pm 5\%$ del efecto apoptótico del BPA (Veh= $1,9 \pm 0,1\%$; BPA= $7,0 \pm 0,3\%$, veh+G15= $2,4 \pm 0,2\%$; BPA+G15= $3,7 \pm 0,2\%$). En el caso de la línea humana EndoC- β H1 (figura 20b), el antagonista promovió un aumento de la apoptosis en condiciones basales y bloqueó el efecto del BPA (Veh= $13,8 \pm 0,2\%$; BPA= $19,2 \pm 0,3\%$; Veh+G15= $19,1 \pm 0,2\%$; BPA+G15= $13,5 \pm 0,7\%$).

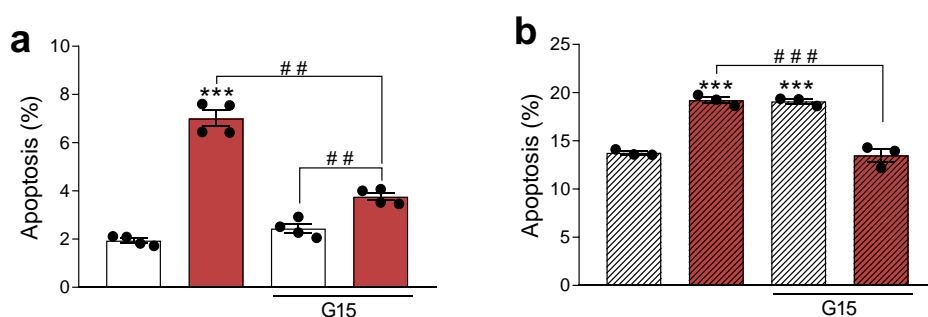


Figura 20. El antagonista de GPER, G15, previene los efectos del BPA sobre la apoptosis. Las líneas INS-1E (a) y EndoC- β H1 (b) fueron pretratadas con vehículo o con el antagonista de GPER, G15 a 10 nM durante 3 horas, tras lo cual las células fueron tratadas con vehículo (barras blancas) o BPA 1 nM (barras rojas) en presencia o ausencia de G15 10 nM durante 24 horas. La viabilidad se determinó empleando la técnica HO/PI. Los datos se muestran como la media \pm SEM de 3-4 experimentos independientes, *** $p \leq 0,001$ respecto al vehículo; ## $p \leq 0,01$, ### $p \leq 0,001$, indicado por barras, ANOVA Two-way.

Habiendo descrito mediante el antagonismo de GPER que el BPA podría ejercer parte del efecto observado mediante este receptor, quisimos corroborar estos resultados realizando un silenciamiento génico en ambas líneas celulares utilizando el siRNA (del inglés *small interfering RNA*). Las células fueron transfectadas tanto con el siRNA CONTROL (siCTRL), como con el siRNA de GPER (siGPER) específico para cada línea a una concentración final ambos de 30 nM.

Respecto a la línea INS-1E, se requirió un protocolo de doble transfección, tras la cual las células fueron tratadas con el vehículo o BPA 1 nM durante 24 horas, donde se evaluó la apoptosis mediante la técnica HO/PI. El silenciamiento génico fue confirmado a nivel proteico mediante la técnica *Western Blot* (WB). La

transfección con *siGper1* promovió un descenso del $52 \pm 9\%$ en la expresión del receptor (figura 21a y c). De acuerdo con lo mostrado en la figura 21b, en ausencia de ligando, cuando la expresión de GPER estaba reducida, se generaba un incremento en la apoptosis. Por otro lado, las células con la expresión del receptor reducida mostraron una disminución en la apoptosis mediada por BPA (*siCTRL*: Veh= $4,4 \pm 0,2$; BPA= $9,4 \pm 0,2$. *siGper1*: Veh= $6,2 \pm 0,4\%$, BPA= $7,9 \pm 0,4\%$). Aplicando el índice apoptótico se obtuvo que *siGper1* reducía la apoptosis inducida por BPA un $64 \pm 6\%$ (*siCTRL*= $5,2 \pm 0,2$; *siGper1*= $1,8 \pm 0,5$) (figura 21d).

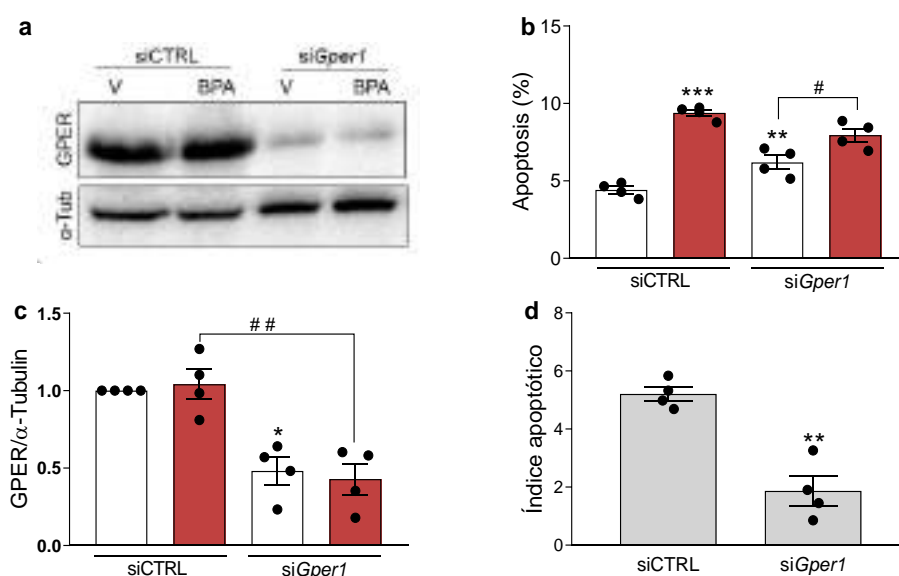


Figura 21. El silenciamiento de GPER previene parcialmente la apoptosis inducida por el BPA en la línea INS-1E. Las células fueron transfectadas con un protocolo de doble transfección para *siCTRL* o *siGper1*. Tras dejar recuperar las células durante 24 horas, fueron tratadas con vehículo (barras blancas) o BPA 1 nM (barras rojas) durante 24 horas. (a) Imagen representativa del silenciamiento para GPER. (b) Viabilidad celular de las células transfectadas con *siCTRL* o con *siGper1*, tratadas con vehículo o BPA 1nM. La viabilidad se determinó empleando la técnica HO/PI. (c) Análisis de densitometría para el silenciamiento génico de GPER, usando la α -Tubulina (α -Tub) como control de carga. (d) Representación de la viabilidad celular empleando el índice apoptótico. Los datos se muestran como la media \pm SEM de 4 experimentos independientes, (b, c) * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ respecto al vehículo; # $p \leq 0.05$, ## $p \leq 0.01$, indicado por barras, ANOVA Two-way. (d) ** $p \leq 0,01$, respecto al *siCTRL*, t-test.

Las células EndoC- β H1 fueron transfectadas con el *siCTRL* o el siRNA específico para GPER (*siGPER1*). En este caso, una única transfección fue suficiente para obtener un descenso en la expresión de un $54 \pm 4\%$ respecto al

control (figura 22a y c). En relación con la viabilidad celular, en este ensayo no se describió ningún aumento en la apoptosis al silenciar GPER. Al evaluar la apoptosis generada por el BPA 1 nM en la situación control, se observó un aumento significativo de la misma (Veh= 15,6 ± 1,0%; BPA= 21,3 ± 0,6%), mientras que las células transfectadas con siGPER1 se encontraban parcialmente protegidas frente a la muerte celular mediada por BPA (Veh= 16,6 ± 1,0%; BPA= 18,6 ± 1,2%) (figura 22b). El índice apoptótico mostró un descenso del 57 ± 8% en la apoptosis de las células con GPER silenciado (siCTRL= 6,7 ± 8%; siGPER1= 2,9 ± 0,5) (figura 22d).

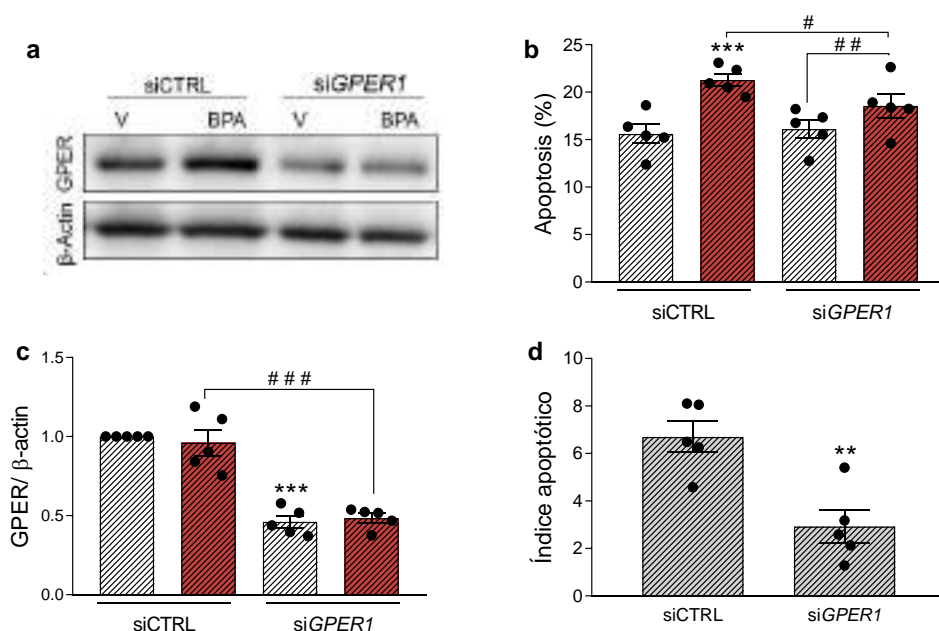


Figura 22. El silenciamiento de GPER previene parcialmente la apoptosis inducida por el BPA en la línea EndoC-βH1. Las células fueron transfectadas con un protocolo de una única transfección para el siCTRL o siGPER1. Tras dejar recuperar las células durante 24 horas, fueron tratadas con vehículo (barras blancas) o BPA 1 nM (barras rojas) durante 24 horas. (a) Imagen representativa del silenciamiento para GPER, (b) Viabilidad celular de las células transfectadas con el siCTRL o con siGPER1, tratadas con vehículo o BPA 1 nM. La viabilidad se determinó empleando la técnica HO/PI. (c) Análisis de densitometría para el silenciamiento génico para GPER, usando la β-actina como control de carga. (d) Representación de la viabilidad celular empleando el índice apoptótico. Los datos se muestran como la media ± SEM de 5 experimentos independientes, (b, c) ***p≤0,001 respecto al vehículo; #p≤0,05, ## p≤0,01, ### p≤0,001 indicado por barras. ANOVA Two-way. (d) **p≤0,01, respecto al siCTRL, T-test.

La apoptosis causada por el BPA se podía prevenir parcial o totalmente con el silenciamiento de GPER o empleando su antagonista, lo que sugería que el efecto proapoptótico del BPA involucraba a este receptor. Por ello, decidimos explorar si el agonista de GPER, G1, podría tener algún efecto sobre la viabilidad celular.

La línea INS-1E fue tratada con G1 de 0,1 a 1000 nM, durante 24 horas, tras las cuales medimos la supervivencia celular mediante la tinción HO/PI, obteniéndose un incremento de la muerte celular en todas las dosis empleadas (figura 23a).

Debido a que el G1 aumentaba la apoptosis, decidimos comparar los efectos proapoptóticos del G1 100 nM y de BPA 1 nM, tanto en la línea INS-1E (figura 23b) como en la línea EndoC- β H1 (figura 23c), observándose que en ambos modelos G1 aumentaba la muerte celular respecto al control; sin embargo, el efecto no llegaba a equipararse al inducido por el BPA (INS-1E: Veh= $1,4 \pm 0,1\%$; G1= $3,3 \pm 0,3 \%$; BPA= $6,6 \pm 0,4\%$; EndoC- β H1: Veh= $13,4 \pm 0,4\%$; G1= $18,1 \pm 0,7\%$; BPA= $20,1 \pm 0,4\%$).

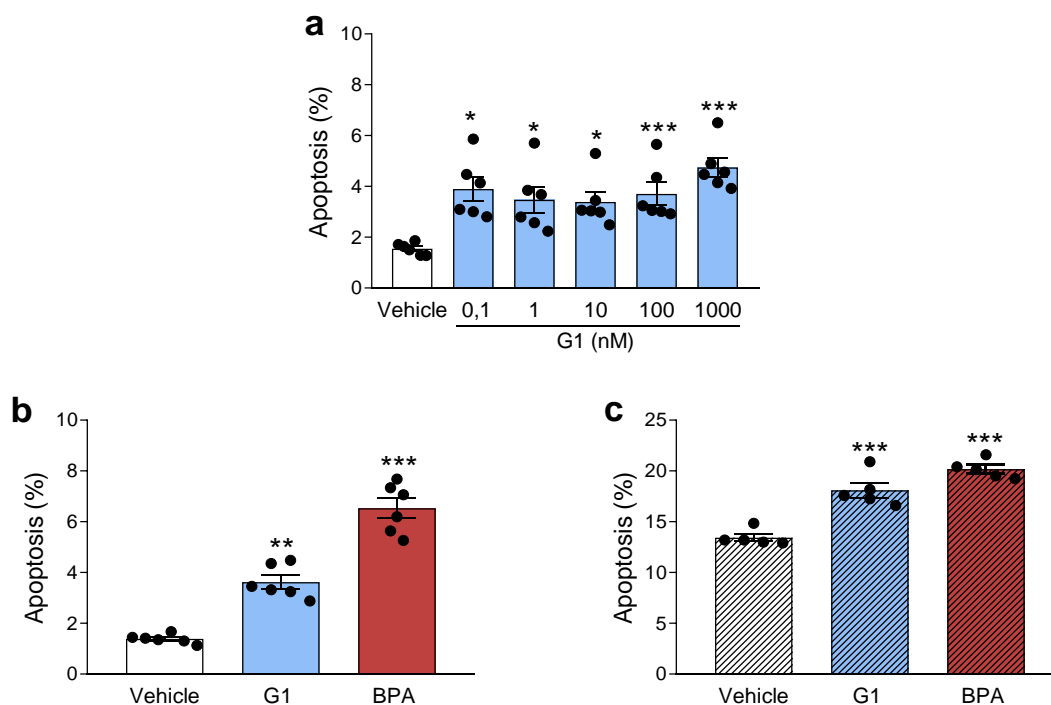


Figura 23. La activación farmacológica de GPER conduce a un incremento de la apoptosis.

(a) La línea INS-1E fue tratada con el vehículo y con 0,1, 1, 10, 100 y 1000 nM de G1 (barras azules) durante 24 horas. Las líneas INS-1E (b) y EndoC-βH1 (c) fueron tratadas con el vehículo, G1 100 nM y BPA 1 nM durante 24 horas. La viabilidad se determinó empleando la técnica HO/PI. Los datos se muestran como la media ± SEM de 3-6 experimentos independientes *p≤0,05 **p≤0,01, ***p≤0,001 respecto al vehículo. ANOVA One-way.

4. El antagonista de ERα y ERβ inhibe la apoptosis inducida por BPA en la célula β.

Los resultados farmacológicos, así como los obtenidos con el silenciamiento de GPER, sugerían que este receptor mediaba parte de los efectos observados en la muerte celular mediada por BPA, pero no de forma completa, ya que cuando la vía de GPER no estaba disponible aún perduraba un remanente de apoptosis. A su vez, con el agonista se replicaba de forma parcial el efecto observado por el BPA. Nuestro laboratorio ha demostrado que el BPA puede actuar sobre la célula β a través de ERα y ERβ (Nadal et al., 2018). Por tanto, decidimos estudiar si ERα y ERβ jugaban un papel en la apoptosis del BPA.

Ambas líneas celulares fueron incubadas con el BPA junto con el antagonista de ERα y ERβ ICI 182,780 (ICI) 1 μM durante 3 horas y posteriormente, con BPA 1 nM en presencia o ausencia de ICI durante 24 horas. La apoptosis fue analizada mediante la técnica HO/PI.

En ambos modelos celulares, en ausencia del ICI, el BPA 1 nM incrementó significativamente la muerte celular (INS-1E: Veh= 3,4 ± 0,2 %; BPA= 7,8 ± 0,4%. EndoC-βH1; Veh= 13,8 ± 0,6 %; BPA= 21,2 ± 0,2%). A su vez, tanto en la línea INS-1E (figura 24a) como en la línea EndoC-βH1 (figura 24b), los efectos apoptóticos del BPA se eliminaron en presencia del ICI, sugiriendo que los receptores clásicos participan en los efectos proapoptóticos del BPA.

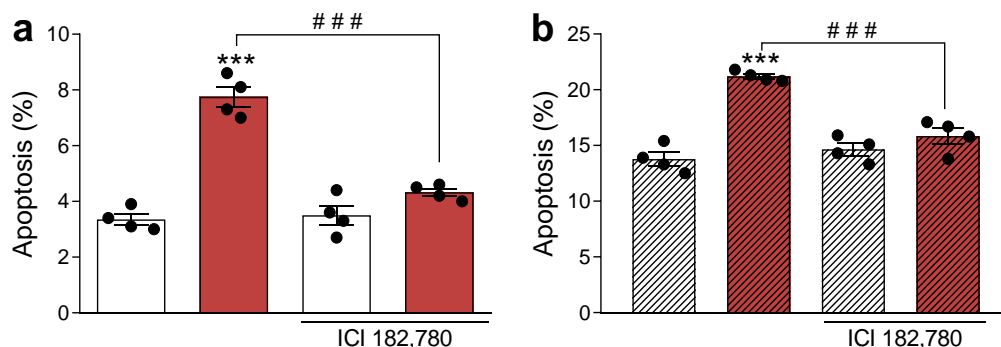


Figura 24. El antagonista de ER α y ER β ICI 182,780 previene la apoptosis inducida por el BPA en la célula β . Las células INS-1E (a) y EndoC- β H1 (b) fueron pretratadas con vehículo o el antagonista ER α y ER β , ICI 182,780 1 μ M durante 3 horas, después de lo cual, las células fueron tratadas con vehículo o BPA 1 nM en presencia o ausencia de ICI durante 24 horas. La viabilidad se determinó empleando la técnica HO/PI. Los datos se muestran como la media \pm SEM de 4 experimentos independientes, *** p \leq 0,001 respecto al vehículo, ### p \leq 0,001, indicado por barras. ANOVA Two-way.

5. Papel de ER α en la apoptosis de la célula β .

A continuación, abordamos el papel de cada uno de los receptores de estrógenos clásicos ER α y ER β en la muerte celular.

En la línea INS-1E, empleamos el antagonista de ER α MPP 100 nM, en presencia o ausencia de BPA 1 nM durante 24 horas, tras una preincubación previa de 3 horas solo con el antagonista. Se evaluó la viabilidad celular empleando la técnica HO/PI.

De acuerdo con los datos de la figura 25, el antagonismo de ER α indujo un incremento de la muerte celular basal. Por otra parte, el bloqueo farmacológico de ER α redujo el efecto apoptótico del BPA (Veh= 1,6 \pm 0,1%; BPA= 7,1 \pm 0,4%; Veh+MPP= 2,7 \pm 0,3%; BPA+MPP= 4,0 \pm 0,4%).

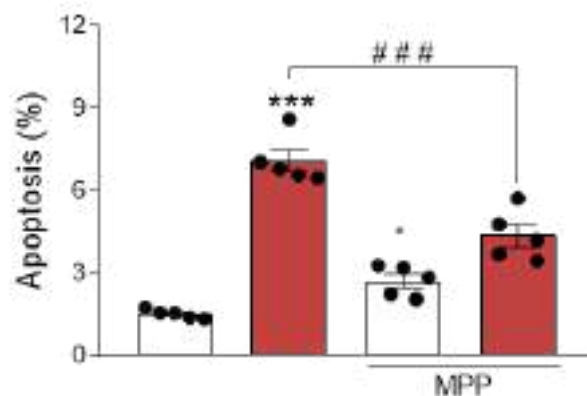


Figura 25. El bloqueo farmacológico de ER α bloquea la apoptosis inducida por el BPA. Las células INS-1E fueron pretratadas con vehículo o el antagonista de ER α , MPP 100 nM durante 3 horas, después de lo cual las células fueron tratadas con vehículo o BPA 1 nM en presencia o ausencia de MPP 100 nM durante 24 horas. La viabilidad se determinó empleando la técnica HO/PI. Los datos se muestran como la media \pm SEM de 5 experimentos independientes * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$ respecto al vehículo. ANOVA Two-way.

Para confirmar el papel de ER α en la apoptosis inducida por el BPA, decidimos emplear el siRNA específico para este receptor en las nuestras dos líneas celulares.

En la línea INS-1E, las células fueron transfectadas con el siCTRL o siE α y tratadas con BPA 1 nM durante 24 horas. La viabilidad celular fue medida por la técnica del HO/PI y el silenciamiento fue confirmado mediante WB.

La transfección con siE α , produjo un descenso del 55 ± 5 % en la expresión de ER α respecto al siCTRL (figura 26a y c). En relación con la viabilidad, el silenciamiento de ER α incrementó la muerte celular en comparación al siCTRL. Por otro lado, en aquellas células con la expresión de ER α reducida, el aumento de muerte celular producido por BPA se encontraba suprimido (figura 26b) (siCTRL: Veh= $4,2 \pm 0,2\%$; BPA= $8,9 \pm 0,4\%$; siE α : Veh= $5,9 \pm 0,2\%$; BPA= $6,6 \pm 0,3\%$). En el índice apoptótico se evidenció una disminución del $84 \pm 6\%$ en el efecto del BPA cuando ER α se encontraba silenciado (siCTRL= $4,9 \pm 0,4$; siE α = $0,8 \pm 0,3$) (figura 26d).

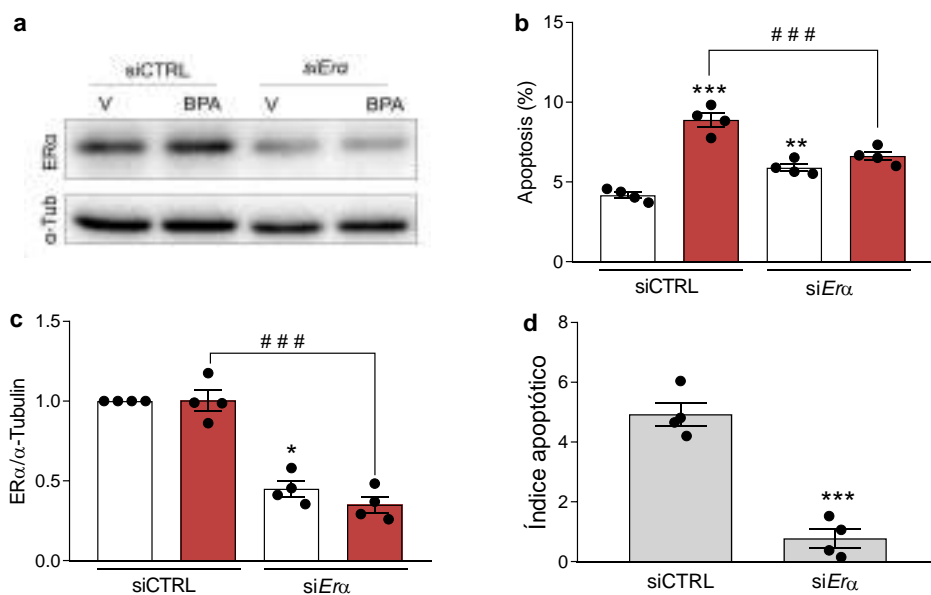


Figura 26. El silenciamiento de ER α previene parcialmente la apoptosis inducida por el BPA en la línea INS-1E. Las células fueron transfectadas con el siCTRL o siER α . Tras dejar recuperar las células durante 48 horas, fueron tratadas con vehículo (barras blancas) o BPA 1 nM (barras rojas) durante 24 horas. (a) Imagen representativa del silenciamiento de ER α (b) Viabilidad celular de las células transfectadas con el siCTRL o con siER α , tratadas con vehículo o BPA 1 nM. La viabilidad se determinó empleando la técnica HO/PI. (c) Análisis de densitometría para el silenciamiento génico para ER α usando la α -Tubulina (α -Tub) como control de carga (d) Representación de los datos de viabilidad empleando el índice apoptótico. (b,c) * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ respecto al vehículo; ### $p \leq 0,001$ indicado por barras. ANOVA Two-way. (d) *** $p \leq 0,001$, respecto al siCTRL, T-test.

En la línea EndoC- β H1 empleamos el siCTRL y el siRNA específico para ER α (siER α) en un protocolo de doble transfección. Las células se trataron con BPA 1nM durante 24 horas; después se midió la apoptosis mediante la técnica de HO/PI y el silenciamiento se analizó por WB.

Las células transfectadas con siER α redujeron la expresión del receptor un 35 \pm 4% (figura 27a y c). En cuanto a la viabilidad celular, el silenciamiento de ER α no originó un incremento en la muerte celular. Sin embargo, BPA 1 nM aumentó la apoptosis en la situación control, pero no en aquellas células que presentaban disminuida la expresión de ER α (siCTRL: Veh= 9,2 \pm 0,9 %; BPA= 15,2 \pm 1,1%; siER α : Veh= 11,3 \pm 0,9 %; BPA= 13,1 \pm 0,7%) (figura 27b). Finalmente, el índice apoptótico mostró que en las células con ER α reducido, los efectos del BPA

disminuyeron un $68 \pm 7\%$ respecto al siCTRL (siCTRL $6,7 \pm 1,1$; siER α $2,1 \pm 0,5$) (figura 27d).

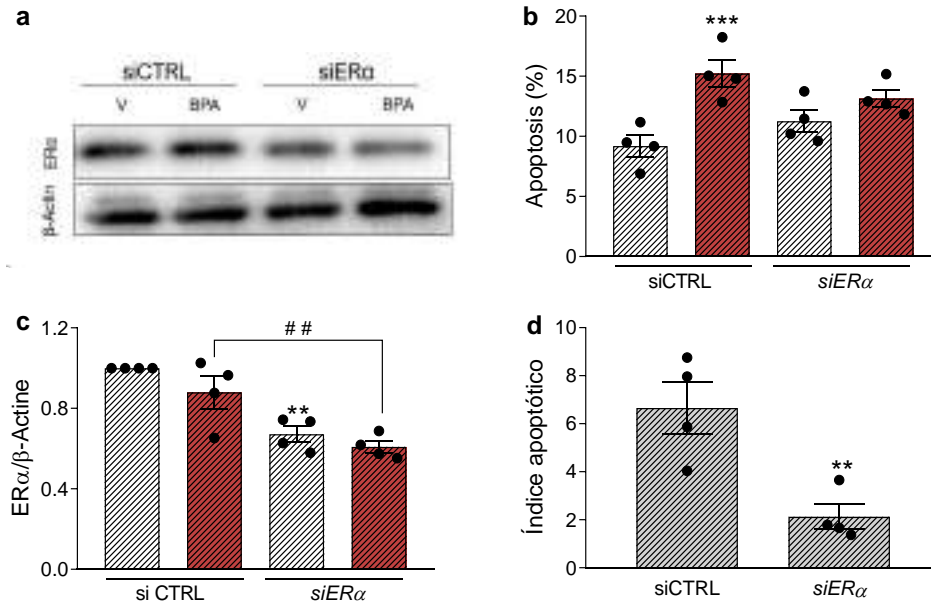


Figura 27. El silenciamiento de ER α previene parcialmente la apoptosis inducida por el BPA en la línea EndoC- β H1. La línea EndoC- β H1 fue transfectada con el siCTRL o siER α en un protocolo de doble transfección. Tras dejar recuperar las células durante 48 horas, fueron tratadas con vehículo (barras blancas) o BPA 1 nM (barras rojas) durante 24 horas. (a) Imagen representativa del silenciamiento de ER α . (b) Viabilidad celular de las células transfectadas con el siCTRL o con siER α , tratadas con vehículo o BPA 1nM. La viabilidad se determinó empleando la técnica HO/PI. (c) Análisis de densitometría para el silenciamiento génico para ER α usando la β -actina como control de carga (d) Representación de los datos de viabilidad celular empleando el índice apoptótico. Los datos se muestran como la media \pm SEM de 4 experimentos independientes, (a,c) ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ respecto al vehículo; ## $p \leq 0,01$ indicado por barras. ANOVA Two-way. (d) ** $p \leq 0,01$ respecto al siCTRL, T-test.

En base a los resultados mostrados, ER α era esencial en la muerte celular mediada por el BPA. Por ello, decidimos realizar una activación farmacológica empleando el agonista PPT para comprobar si la activación del receptor inducía un incremento de la apoptosis. La línea INS-1E fue tratada con una dosis creciente de PPT (1 a 1000 nM) mientras que en la línea EndoC- β H1 evaluamos la dosis de 1 nM. Las células fueron incubadas durante 24 horas y la apoptosis fue medida con la técnica HO/PI. Como se observa en la figura 28, no se detectó efecto en ninguna línea celular cuando éstas se expusieron al agonista de ER α .

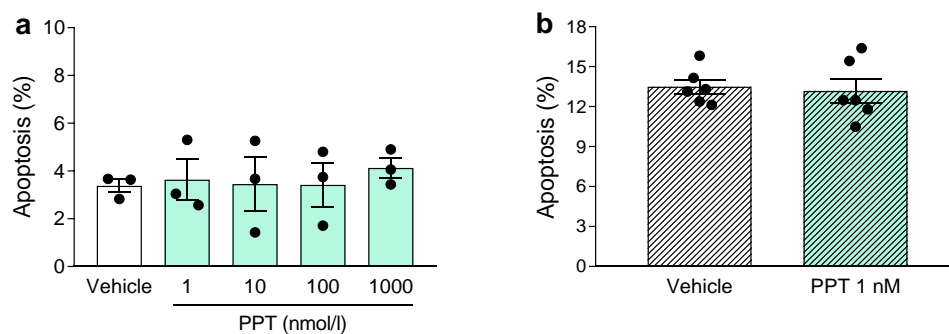


Figura 28. La activación de ER α no promueve ningún efecto en la viabilidad celular. (a) La línea INS-1E fue tratada con vehículo o con el agonista de ER α , PPT a 1, 10, 100 y 1000 nM (b) la línea EndoC- β H1 fue tratada con el vehículo o el agonista de ER α 1 nM durante 24 horas. La viabilidad se determinó empleando la técnica HO/PI. Los datos se muestran como la media \pm SEM de 3-6 experimentos independientes.

6. Papel de ER β en la apoptosis de la célula β .

En paralelo a lo mostrado con el receptor ER α , también se estudió el papel de ER β en la apoptosis de la célula β . Para ello, se emplearon las mismas estrategias que para ER α y además se usaron ratones *knockout* del receptor de ER β (β ERKO).

En la línea INS-1E, ER β fue inhibido farmacológicamente con el antagonista PHTPP 1 μ M en presencia o ausencia del BPA 1 nM durante 24 horas, tras una preincubación de 3 horas con el antagonista. La viabilidad celular fue calculada empleando la técnica HO/PI. Cuando ER β se encontraba bloqueado se promovió un incremento significativo de la apoptosis basal. A su vez, la combinación de PHTPP+BPA eliminó el efecto apoptótico del BPA (Veh= 2,3 \pm 0,2%, BPA= 6,9 \pm 0,1%; Veh+PHTPP= 4,0 \pm 0,4%; BPA+PHTPP= 5,1 \pm 0,4%) (figura 29a).

Para confirmar la implicación de ER β en la muerte celular mediada por el BPA se emplearon células dispersadas de islotes pancreáticos procedentes de ratones silvestres (WT) y de ratones *knockout* para ER β (β ERKO). Estos ratones β ERKO han sido genéticamente manipulados para que ninguna de sus células disponga de copias funcionales de ER β (Krege et al., 1998). Las células dispersas fueron incubadas con el vehículo o con BPA (1, 10 y 100 nM) durante 48 horas, tras las cuales se midió la apoptosis empleando la técnica HO/PI.

Según se muestra en la figura 29b, en las células WT el BPA aumentó la apoptosis en todas las dosis analizadas. Sin embargo, cuando se analizaron las células provenientes de β ERKO no se observó efecto del BPA a ninguna de las dosis, poniendo de manifiesto la necesidad de ER β para la muerte celular inducida por el BPA.

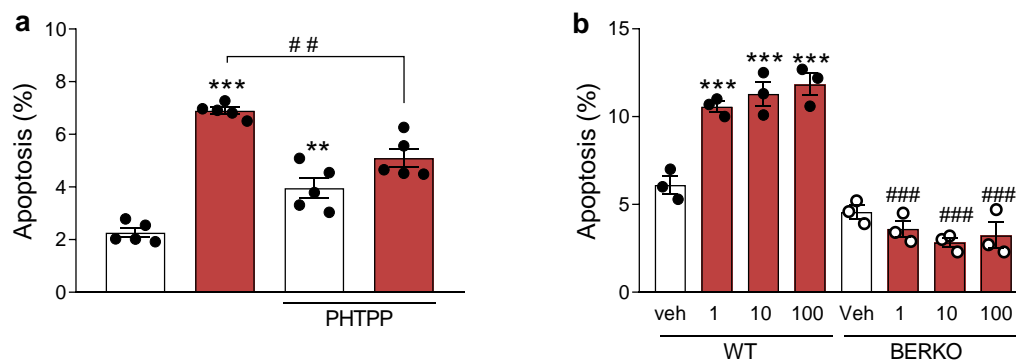


Figura 29. Papel de ER β en la apoptosis inducida por el BPA. (a) Las células INS-1E fueron pretratadas con vehículo o el antagonista de ER β , PHTPP 1 μ M durante 3 horas, después de lo cual, las células fueron tratadas con vehículo (barras blancas) o BPA 1 nM (barras rojas) en presencia o ausencia de PHTPP 1 μ M durante 24 horas. (b) células de islotes pancreáticos de ratón WT y BERKO, fueron tratadas con vehículo o BPA o con BPA (1, 10 y 100 nM) durante 48 horas. La viabilidad se determinó empleando la técnica HO/PI. Los datos se muestran como la media \pm SEM de 3-5 experimentos independientes, ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ respecto al vehículo; ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, respecto al BPA. ANOVA Two-way.

Para estudiar más a fondo el papel de este receptor en la muerte celular mediada por BPA se realizaron los experimentos empleando el siRNA de ER β , tanto en la línea INS-1E (siEr β) como en la línea EndoC- β H1 (siER β).

Células de la línea INS-1E fueron transfectada con siCTRL o con siEr β , tras lo cual se trataron con BPA 1nM durante 24 horas. La viabilidad celular se analizó mediante la tinción HO/PI y el silenciamiento fue confirmado a nivel proteico por WB. La transfección con siEr β produjo un descenso del $40 \pm 3\%$ en la expresión de este receptor (figura 30a y c). En cuanto a la viabilidad celular, el silenciamiento de ER β incrementaba de forma notoria la muerte celular. A su vez, el efecto apoptótico del BPA se encontraba parcialmente disminuido en aquellas células con la expresión de ER β reducida (siCTRL: Veh= $4,6 \pm 0,2\%$; BPA= $9,7 \pm 0,2\%$; siEr β : Veh= $9,5 \pm 0,9\%$, BPA= $10,5 \pm 1,0\%$) (figura 30b).

Finalmente, el índice apoptótico disminuía un $80 \pm 11\%$ en el caso del *siErβ* (*siCTRL* = $5,4 \pm 0,4$; *siErβ* = $1,1 \pm 0,3$) (figura 30d).

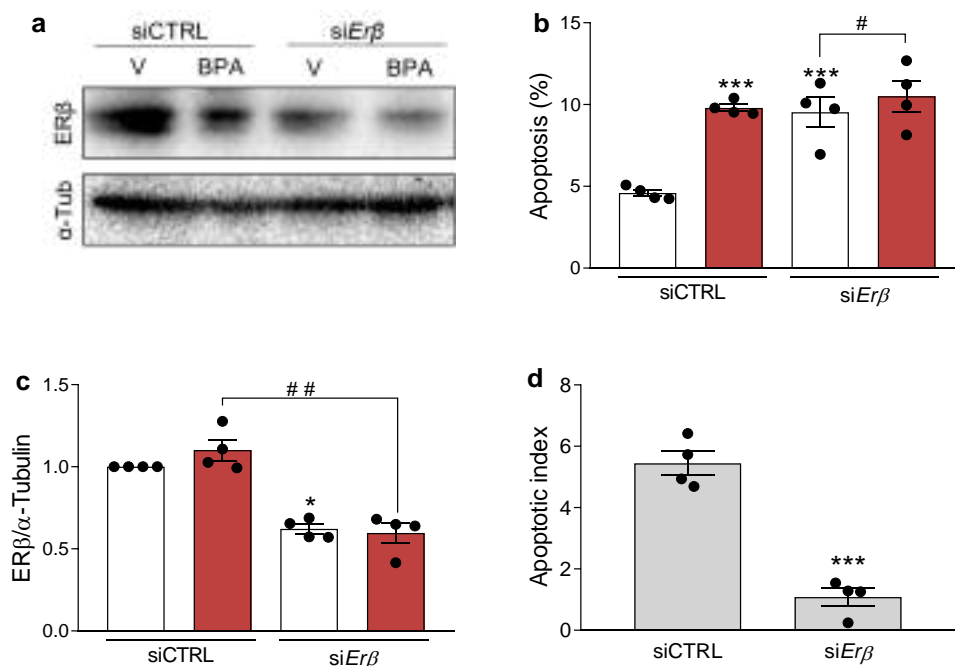


Figura 30. El silenciamiento de ERβ previene la apoptosis inducida por el BPA en la línea INS-1E. Las células fueron transfectadas con el *siCTRL* o *siErβ*. Tras dejar recuperar las células durante 48 horas, fueron tratadas con vehículo (barras blancas) o BPA 1 nM (barras rojas) durante 24 horas. (a) Imagen representativa del silenciamiento de Erβ; (b) Viabilidad celular de las células transfectadas con el *siCTRL* o con *siErβ*, tratadas con vehículo o con BPA 1nM. La viabilidad se determinó empleando la técnica HO/PI. (c) Análisis de densitometría para el silenciamiento génico para ERβ, usando la α-Tubulina (α-Tub) como control de carga. (d) Representación de la viabilidad celular empleando el índice apoptótico. Los datos se muestran como la media \pm SEM de 4 experimentos independientes (b,c) * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$ respecto al vehículo; # $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,01$ indicado por barras. ANOVA Two-way. (d) *** $p \leq 0,001$, respecto al *siCTRL*, T-test.

En la línea EndoC-βH1 se empleó un protocolo de doble transfección, tras el cual se realizó el tratamiento con BPA 1 nM durante 24 horas. La apoptosis se examinó por medio de la técnica de HO/PI y el silenciamiento fue confirmado por WB.

Empleando *siERβ* se consiguió un descenso en la expresión del receptor de un $63 \pm 5\%$ (figura 31a y c). En cuanto a la apoptosis, el silenciamiento de ERβ no

promovió ningún cambio en la viabilidad celular. Sin embargo, en la apoptosis inducida por el BPA, se observó un aumento en la condición control y en las células transfectadas con *siERβ*, aunque en menor medida (*siCTRL*: Veh= 10,7 ± 0,8%; BPA= 14,9 ± 1,0% *siERβ*: Veh= 13,9 ± 1,1%; BPA= 16,7 ± 0,9%) (figura 31b). Esta disminución del efecto apoptótico del BPA se aprecia mejor al analizar el índice apoptótico, que se encuentra reducido un 33 ± 12% respecto al *siCTRL* (*siCTRL* 4,8 ± 0,3; *siERβ* 3,3 ± 0,5) (figura 31d).

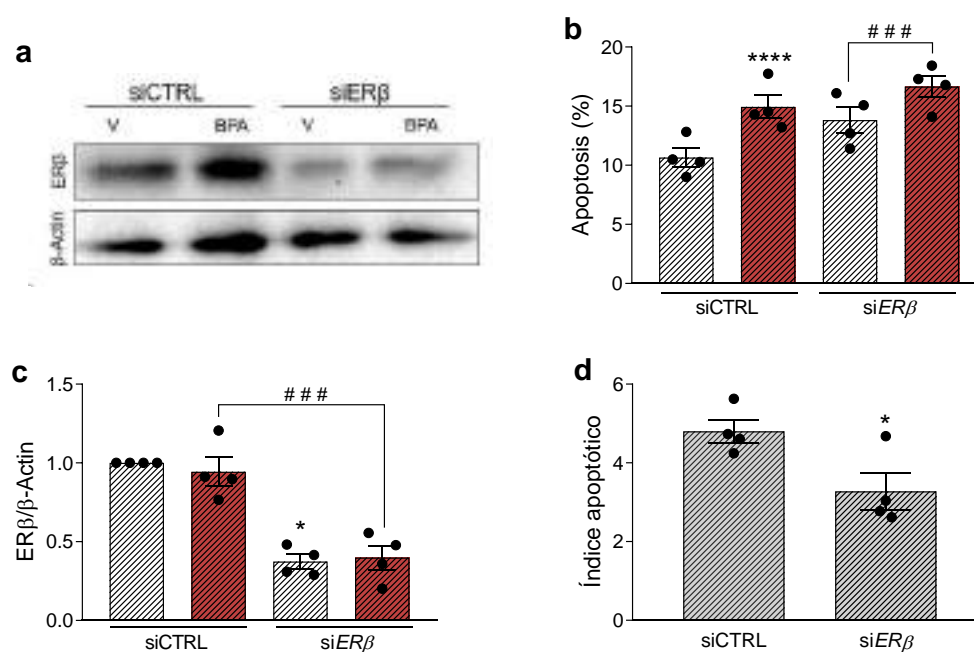


Figura 31. El silenciamiento de ERβ previene parcialmente la apoptosis inducida por el BPA en la línea EndoC-βH1. Las células fueron transfectadas con el *siCTRL* o *siERβ* en un protocolo de doble transfección. Tras dejar recuperar las células durante 48 horas, fueron tratadas con vehículo (barras blancas) o BPA 1 nM (barras rojas) durante 24 horas. (a) Imagen representativa del silenciamiento de ERβ; (b) Viabilidad celular de las células transfectadas con el *siCTRL* o con *siERβ*, tratadas con vehículo o con BPA 1 nM. La viabilidad se determinó empleando la técnica HO/PI. (c) Análisis de densitometría para el silenciamiento génico para ERβ, usando la β-actina como control de carga. (d) Representación de la viabilidad celular empleando el índice apoptótico. Los datos se muestran como la media ± SEM de 4 experimentos independientes, (b, c) * $p \leq 0,05$, **** $p \leq 0,0001$ respecto al vehículo; ### $p \leq 0,001$ indicado por barras. ANOVA Two-way. (d) * $p \leq 0,05$, respecto al *siCTRL*, T-test.

Puesto que tanto el antagonista como el silenciamiento de ERβ protegían frente a la apoptosis inducida por el BPA, decidimos evaluar si la activación de ERβ promovía un aumento de la muerte celular. Células de la línea INS-1E fueron

expuestas a dosis crecientes del agonista de ER β DPN (1, 10, 100 y 1000 nM), mientras que las de la línea EndoC- β H1 fueron incubadas con 1 nM de DPN. Las células fueron tratadas durante 24 horas y la apoptosis medida con la técnica del HO/PI. Tal y como se observa en la figura 32, el agonista de ER β no produjo ningún efecto en la viabilidad celular.

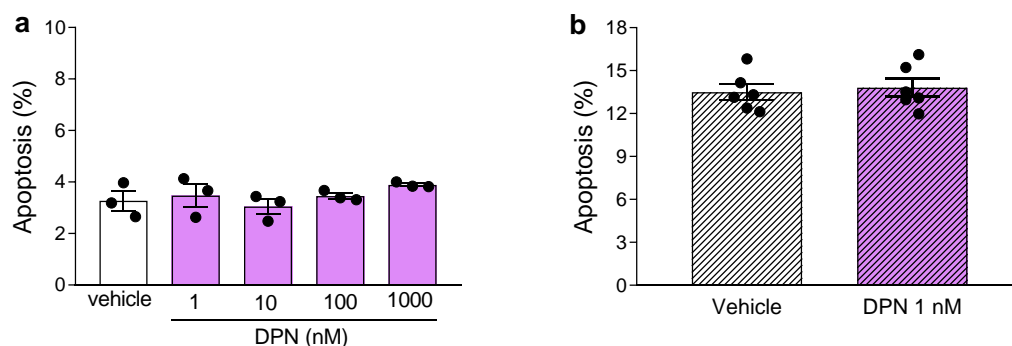


Figura 32. Efecto del agonista de ER β , DPN, en la apoptosis de la célula beta pancreática. (a) La línea INS-1E fue tratada con vehículo (barras blancas) o con 1, 10, 100 y 1000 nM de DPN (barras moradas) durante 24 horas. (b) La línea EndoC- β H1 fue tratada con vehículo (barra blanca) o DPN 1 nM (barras moradas) durante 24 horas. La viabilidad se determinó empleando la técnica HO/PI. Los datos se muestran como la media \pm SEM de 3-5 experimentos independientes.

7. El BPA requiere de ER α , ER β y GPER para inducir la apoptosis en la célula β .

Los resultados mostrados hasta aquí sugerían que los tres receptores estaban implicados en la apoptosis mediada por el BPA. Por ello decidimos evaluar si los agonistas a los tres receptores empleados simultáneamente promovían la muerte celular de igual manera que el BPA.

Las líneas INS-1E y EndoC- β H1 fueron incubadas con G1, la combinación de PPT y DPN y finalmente los tres agonistas y BPA 1 nM (usado como referencia) durante 24 horas, tras las cuales se evaluó la viabilidad celular usando la técnica HO/PI. En ambos modelos, el G1 y la combinación de los dos agonistas incrementó la muerte celular, siendo esta menor que la obtenida por el BPA. Finalmente, la combinación de los tres agonistas promovió un incremento de la apoptosis similar al BPA (INS-1E: Veh=1,4 \pm 0,1%, G1= 4,4 \pm 0,1%, P+D= 3,5 \pm

0,2%, G+P+D= $7,0 \pm 0,7\%$, BPA= $7,3 \pm 0,2\%$; EndoC- β H1: Veh= $13,4 \pm 0,6\%$, G1= $18,2 \pm 0,7\%$, P+D= $16,6 \pm 0,8\%$, G+P+D= $19,6 \pm 0,6\%$, BPA= $19,3 \pm 0,6\%$) (figura 33a y b) sugiriendo así que el BPA requiere de los tres receptores para poder ejercer su efecto.

Una vez demostrado que la combinación de los tres agonistas incrementaba la muerte celular de manera similar al BPA, quisimos estudiar si actuaban también a través de un mecanismo dependiente de ROS (figura 19). Para ello, la línea INS-1E fue tratada con BPA 1 nM y con los tres agonistas durante 24 horas, tras las cuales se midió la generación de ROS con la sonda fluorescente DCF. Tal y como se muestra en la figura 33c, el cóctel de agonistas incrementó la producción de ROS $4,3 \pm 1,3$ veces respecto a la situación control, de forma análoga al BPA, apuntando por tanto a que la muerte observada por la combinación de los tres agonistas podría estar causada por el aumento de ROS.

Para confirmar esta hipótesis, realizamos un experimento en el que se incubaron las células con los tres agonistas junto con el agente reductor NAC 3 mM durante 24 horas, tras las cuales se evaluó la muerte celular mediante la técnica HO/PI. Tal y como se observa en la figura 33d, en ausencia de la NAC la exposición a los tres agonistas generó un incremento de la muerte celular. Sin embargo, la presencia del agente reductor previno totalmente el aumento de la apoptosis (Veh= $2,1 \pm 0,1\%$; G+P+D= $6,4 \pm 0,2\%$; Veh+NAC= $2,4 \pm 0,2\%$; G+P+D+NAC= $2,8 \pm 0,2\%$), lo que indica que la apoptosis inducida por los tres agonistas está mediada por un incremento de ROS.

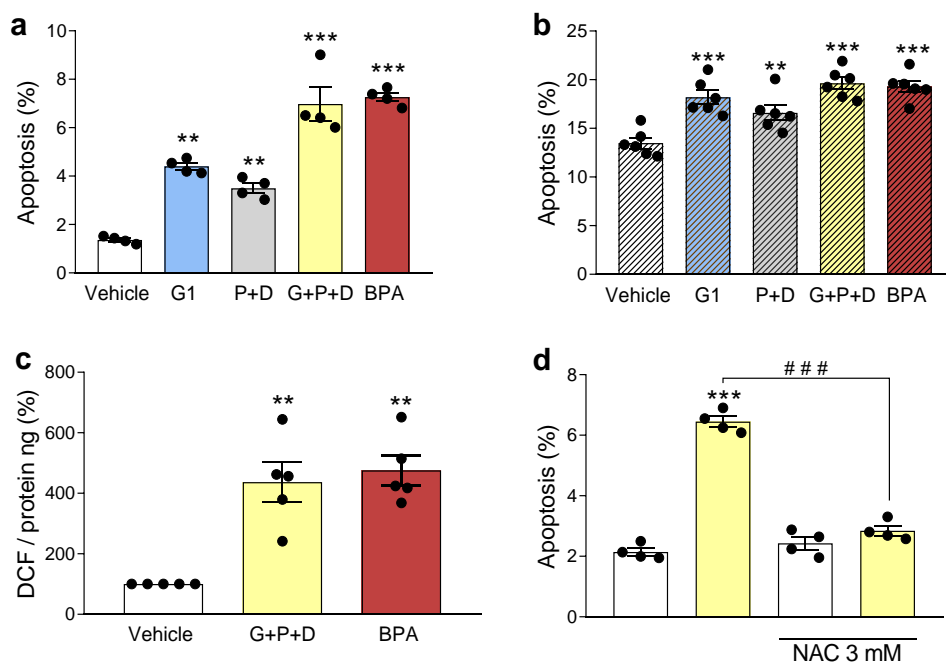


Figura 33. La exposición conjunta a agonistas de los tres receptores de estrógenos incrementa la apoptosis de manera similar al BPA. (a y b) Las líneas celulares INS-1E (a) y EndoC-βH1 (b) fueron tratadas con vehículo (barras blancas), la combinación de los tres agonistas (G+P+D; barras amarillas) o BPA 1 nM (barras rojas) durante 24 horas. La viabilidad celular se determinó mediante la tinción HO/PI. (c y d) La línea INS-1E fue tratada con vehículo, la combinación de los tres agonistas o BPA 1nM durante 24 horas. La producción de ROS fue medida empleando la sonda DCF y normalizada por la proteína total. (d) Las células fueron tratadas con vehículo o con la combinación de los tres agonistas en presencia o ausencia del NAC 3 mM durante 24 horas. La viabilidad celular se determinó mediante la tinción HO/PI. Los datos se muestran como la media \pm SEM de 3-6 experimentos independientes. (a-c) ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001001$ respecto al vehículo, ANOVA One-way, (d) *** $p \leq 0,001$ respecto al vehículo. ### $p \leq 0,001$ indicado por barras. ANOVA Two-way.

La activación de GPER con su agonista G1 incrementaba la muerte celular de una forma similar a la que provocaba el BPA, aunque a menor escala (figura 23). Por ello decidimos evaluar si actuaba también aumentando la producción de ROS. Para ello, la línea INS-1E fue tratada con el agonista de GPER G1 100 nM durante 24 horas, tras las cuales se analizó la producción de ROS con la sonda DCF.

En la figura 34a, se observa que G1 aumentaba ROS $1,8 \pm 0,3$ veces respecto al vehículo, sugiriendo que la apoptosis estaría mediada por el aumento en la producción de ROS. Para confirmar esta hipótesis se analizó la viabilidad celular

cuando se combinaba el agente antioxidante NAC 3 mM con el agonista G1 durante 24 horas. En ausencia del agente reductor, G1 incrementó significativamente la apoptosis respecto al vehículo. Sin embargo, la presencia de NAC inhibió completamente la muerte celular mediada por el agonista (Veh= $2,2 \pm 0,5\%$; G1= $4,3 \pm 0,7\%$; Veh+NAC= $2,7 \pm 0,6\%$; G1+NAC= $2,3 \pm 0,2\%$) (figura 34b).

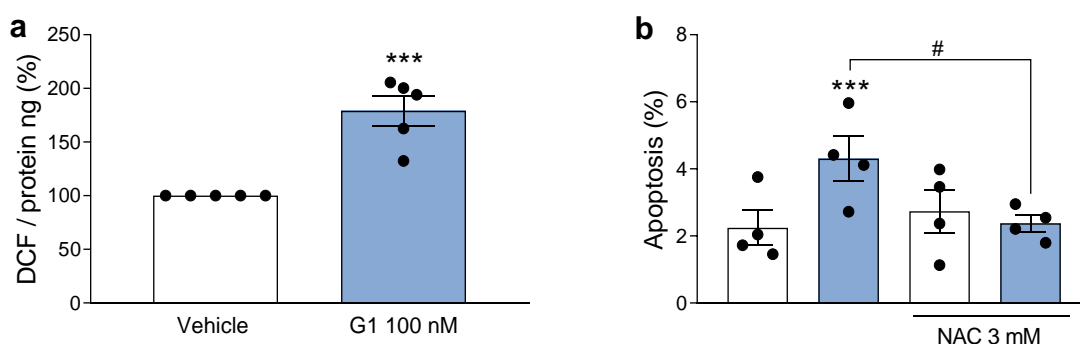


Figura 34. El agonista de GPER, G1, induce la muerte celular a través de la generación de ROS. (a) La línea celular INS-1E fue tratada con vehículo (barra blanca) o G1 100 nM (barra azul) durante 24 horas. La producción de ROS fue medida empleando la sonda DCF y normalizado por la proteína total. (b) La línea INS-1E fue tratada con vehículo (barras blancas) o G1 100 nM (barras azules) en presencia o ausencia del NAC 3 mM durante 24 horas. La viabilidad celular se determinó mediante la tinción HO/PI. Los datos se muestran como la media \pm SEM de 4-5 experimentos independientes. (a) *** $p \leq 0,001$, Student's-test, (b) *** $p \leq 0,001$ respecto al vehículo. # $p \leq 0,05$ indicado por barras. ANOVA Two-way.

Se ha descrito que G1 podría unirse a la isoforma de 36 kDa de ER α , activándola (Kang et al., 2010). Por tanto, para confirmar que el G1 actuaba a través de GPER se realizó un experimento de silenciamiento génico, usando el siRNA de GPER en combinación con el G1.

En la línea INS-1E se realizó un protocolo de doble transfección, tras lo cual las células fueron incubadas con el vehículo y el agonista durante 24 horas. Posteriormente se midió la apoptosis con la técnica HO/PI y se confirmó el silenciamiento mediante WB. El silenciamiento produjo un descenso de $58 \pm 7\%$ en la expresión de GPER (figura 35a y c). Respecto a la viabilidad celular, en la situación control G1 aumentó la apoptosis significativamente. Sin embargo, en las células con la expresión de GPER reducida el G1 no tuvo ningún efecto

(figura 35b y d). Esto demuestra, por tanto, que en nuestro modelo G1 actúa preferentemente a través de receptor GPER.

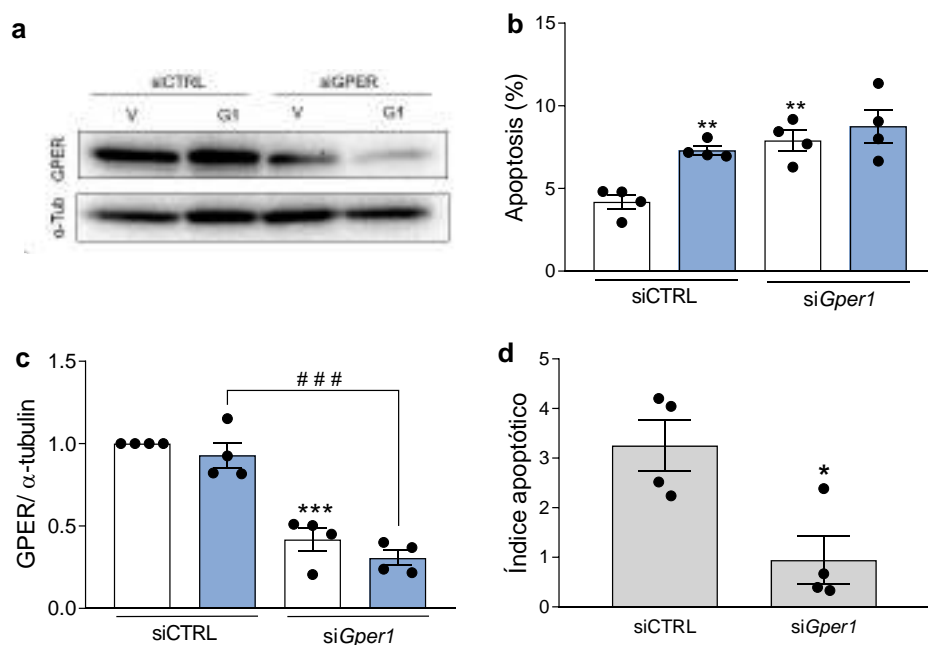


Figura 35. El silenciamiento de GPER previene la apoptosis inducida por G1 en la línea celular INS-1E. Las células fueron transfectadas con un protocolo de doble transfección para el siCTRL o siGper1 y fueron tratadas con vehículo (barras blancas) o G1 100 nM (barras azules) durante 24 horas. (a) Imagen representativa del silenciamiento para GPER; (b) Viabilidad celular de las células transfectadas con el siCTRL o con SiGper1, tratadas con vehículo o G1 100 nM. La viabilidad se determinó empleando la técnica HO/PI; (c) Análisis de densitometría para el silenciamiento génico para GPER, usando la α -Tubulina (α -Tub) como control de carga; (d) Representación de la viabilidad celular empleando el índice apoptótico. Los datos se muestran como la media \pm SEM de 4 experimentos independientes, (b, c) ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ respecto al vehículo; ### $p \leq 0,001$, indicado por barras. ANOVA Two-way. (d) * $p \leq 0,05$, respecto al siCTRL, T-test.

Como se observa en la figura 24, el BPA requiere de ER α y ER β para mediar la apoptosis. A su vez, en base a los resultados obtenidos en la figura 20, GPER también se encuentra implicado en los efectos apoptóticos del BPA. Estos datos en conjunto nos sugieren que podría establecerse una intercomunicación entre GPER y los receptores clásicos, para mediar los efectos en la apoptosis inducida por BPA en las células β pancreáticas. Para estudiar dicha intercomunicación expusimos las dos líneas celulares al agonista G1 en presencia o ausencia del

ICI durante 24 horas, tras las que analizamos la apoptosis mediante la técnica HO/PI.

Según los resultados de la figura 36, en ambos modelos celulares la ausencia del antagonista ICI, G1 era capaz de promover un incremento significativo de la apoptosis. Sin embargo, cuando los receptores clásicos se encontraban bloqueados por el ICI observamos cómo el efecto apoptótico del G1 quedaba eliminado (INS-1E: Veh= $2,3 \pm 0,1\%$; G1= $6,0 \pm 0,3\%$, Veh+ICI= $2,4 \pm 0,1\%$; G1+ICI $3,0 \pm 0,6\%$; EndoC- β H1: Veh= $11,8 \pm 0,2\%$; G1= $16,8 \pm 0,2\%$, Veh+ICI= $11,8 \pm 0,3\%$; G1+ICI $12,2 \pm 0,3\%$).

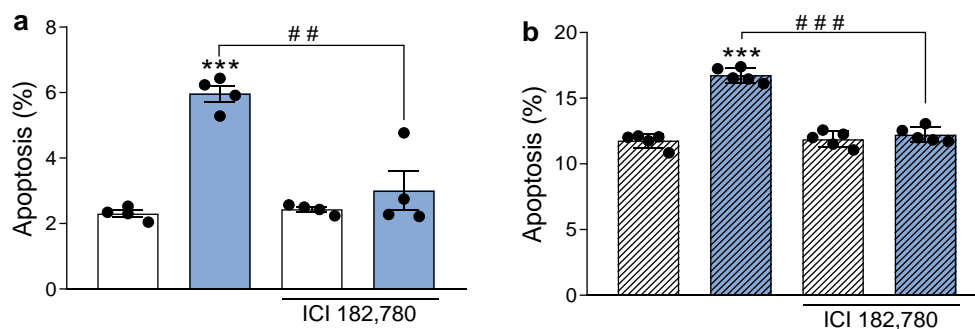


Figura 36. El antagonista de ER α y ER β ICI 182,780 previene la apoptosis inducida por G1 100 nM en la célula β . Las células INS-1E (a) y EndoC- β H1 (b) fueron pretratadas con vehículo o con el antagonista ER α y ER β , ICI 182,780 1 μ M durante 3 horas, después de lo cual, las células fueron tratadas con vehículo (barras blancas) o G1 100nM (barras azules) en presencia o ausencia de ICI 182,780 1 μ M, durante 24 horas. La viabilidad se determinó empleando la técnica HO/PI. Los datos se muestran como la media \pm SEM de 4-5 experimentos independientes, ***p<0,001 respecto al vehículo, ## p<0,01 ###p<0,001, indicado por barras, ANOVA Two-way.

Estos resultados proponían que ER α y ER β podrían encontrarse aguas abajo de la señalización de GPER mediante la muerte celular, por lo que para estudiar en profundidad el papel que presentaba cada uno de los receptores clásicos en la apoptosis inducida por GPER, tanto en la línea INS-1E como en EndoC- β H1, realizamos una disección farmacológica empleando los antagonistas de ER α (MPP 100nM) y de ER β (PHTPP 1 μ M), en combinación con G1 durante 24 horas. La apoptosis fue determinada empleando la técnica HO/PI. Los antagonistas, como en los casos anteriores, fueron preincubados durante 3 horas.

En la línea INS-1E, el antagonista de ER α MPP promovía un aumento de la muerte basal. A su vez, la combinación de MPP+G1 mostró cómo al inhibir ER α , el efecto de G1 se bloqueaba (Veh=2,0 \pm 0,1%; G1= 6,2 \pm 0,2%, Veh+MPP= 3,4 \pm 0,3%; G1+MPP= 3,4 \pm 0,3%) (figura 37a).

En la misma línea celular, el antagonista de ER β , PHTPP, aumentó la muerte celular de forma basal, pero previno los efectos apoptóticos de G1. (Veh= 2,0 \pm 0,2%; G1= 4,9 \pm 0,4%, Veh+PHTPP= 3,4 \pm 0,2%; G1+PHTPP= 3,5 \pm 0,3%) (figura 37b).

En EndoC- β H1, el bloqueo de la vía de ER α promovió por un lado el incremento de la apoptosis basal y por otro, eliminó los efectos apoptóticos de G1 (Veh= 11,0 \pm 0,5%; G1= 16,6 \pm 0,3%, Veh+MPP= 14,4 \pm 0,4%; G1+MPP= 13,7 \pm 0,5%) (figura 37c).

En el mismo modelo, y conforme a lo mostrado en la figura 37d, observamos que el antagonista PHTPP aumentó de manera basal la muerte celular. A su vez, la inhibición de ER β bloqueó los efectos apoptóticos de G1 (Veh=11,8 \pm 0,5%; G1= 16,6 \pm 0,3%, Veh+PHTPP= 14,0 \pm 0,5%; G1+PHTPP= 14,1 \pm 0,8%).

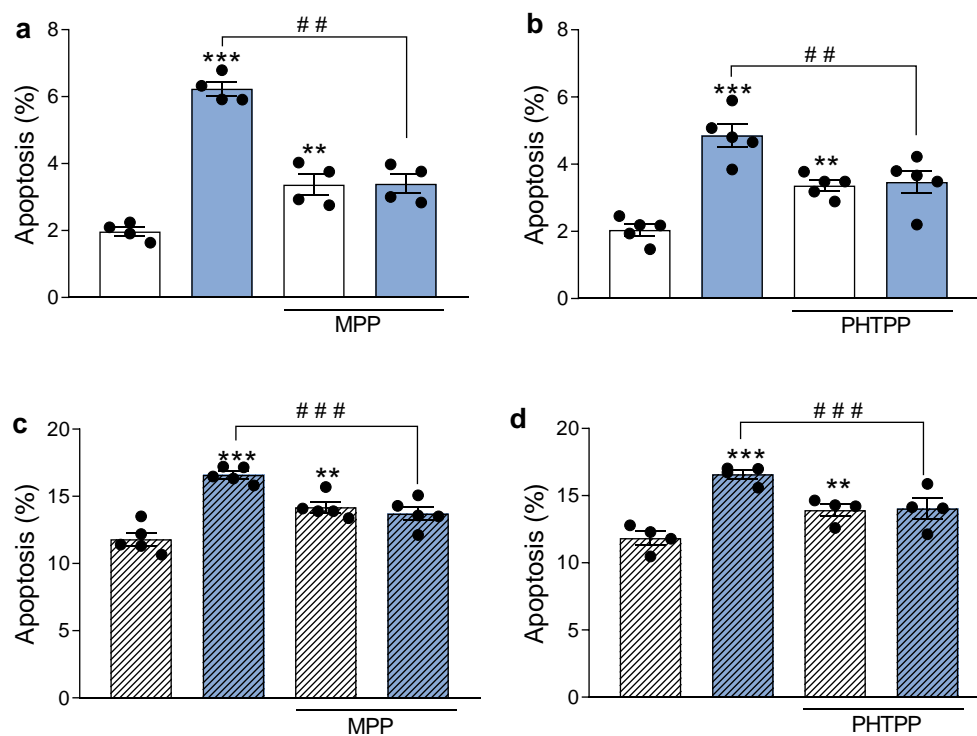


Figura 37. El bloqueo farmacológico de ER α y ER β inhibe la apoptosis inducida por el G1. (a y c) Las líneas INS-1E (a) y EndoC- β H1 (c) fueron pretratadas con vehículo o con el antagonista de ER α MPP 100nM durante 3 horas, después de lo cual, las células fueron incubadas con vehículo (barras blancas) o G1 100 nM (barras azules) en presencia o ausencia de MPP 100nM durante 24 horas. (c y d) La línea INS-1E (c) y EndoC- β H1 (d) fueron pretratadas con vehículo o con el antagonista de ER β PHTPP 1 μ M durante 3 horas, después de lo cual, las células fueron incubadas con vehículo o G1 100 nM en presencia y ausencia de PHTPP 1 μ M durante 24 horas. La viabilidad se determinó empleando la técnica HO/PI. Los datos se muestran como la media \pm SEM de 4-5 experimentos independientes. **p \leq 0,01 ***p \leq 0,001 respecto al vehículo; ## p $<$ 0.01, ### p $<$ 0.001, indicado por barras, ANOVA Two-way.

La implicación de los receptores clásicos en la muerte celular mediada por GPER fue corroborada mediante un abordaje complementario. En la línea INS-1E, silenciamos ER α y ER β por separado, y ambos simultáneamente. Las células fueron incubadas con G1 durante 24 horas y la viabilidad analizada mediante la técnica HO/PI. El silenciamiento se confirmó mediante WB.

Los resultados obtenidos mediante esta aproximación evidenciaron que el silenciamiento de tanto de ER α como de ER β promovía un incremento de la muerte celular, siendo mayor para ER β . A su vez, el doble silenciamiento promovió un aumento de la apoptosis similar al obtenido silenciando solo ER β . Estos datos sugerían un papel significativo de ER β en la supervivencia de la célula β (figura 38b).

Por otro lado, mientras que en la situación control G1 incrementó la apoptosis, en células que tenían silenciado uno de los receptores o bien ambos a la vez, no se producía efecto de G1 (siCTRL: Veh= 5,3 \pm 0,2%; G1= 9,4 \pm 0,7%; siE α : Veh= 9,8 \pm 0,9% G1= 10,9 \pm 0,9; siE β : Veh= 15,8 \pm 0,6%; G1= 16,8 \pm 0,6; siE α/β : Veh= 17,4 \pm 0,3% G1= 17,6 \pm 0,4%) (figura 38b y e). Estos resultados obtenidos mediante el silenciamiento están en concordancia con lo observado mediante la aproximación farmacológica.

Para ahondar más en la implicación de ER β en el proceso de muerte celular mediada por la activación de GPER, empleamos nuevamente los ratones β ERKO. Las células dispersas procedentes de ratones *WT* y β ERKO fueron tratadas con G1 durante 48 horas, tras las cuales se determinó la supervivencia celular mediante la técnica HO/PI. En las células provenientes de ratones *WT* la exposición al agonista G1 promovió un incremento de la apoptosis. Por el

contrario, en las células β ERKO, G1 no indujo dicho efecto apoptótico (WT: Veh= $4,8 \pm 0,6$; G1= $7,9 \pm 0,8$ β ERKO: Veh= $4,4 \pm 0,3$; G1= $4,4 \pm 0,2$) (figura 38f).

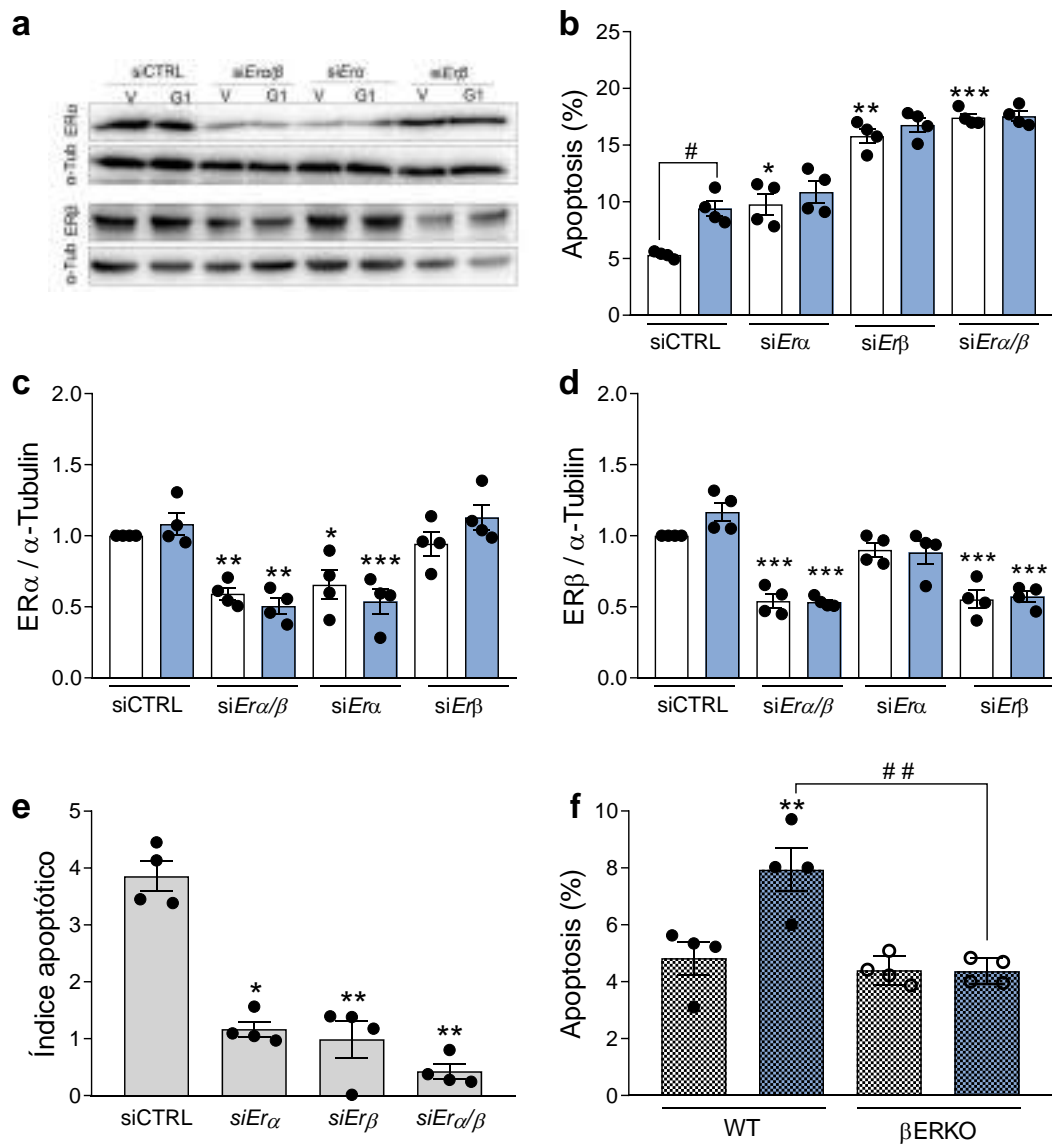


Figura 38. Papel de ER α y ER β en la apoptosis inducida por G1 en la línea INS-1E. (a-e) Las células fueron transfectadas con el siCTRL, siEr α , siEr β o siEr α/β . Tras dejar recuperar las células durante 48 horas, fueron tratadas con vehículo (barras blancas) o G1 100nM (barras azules) durante 24 horas. (a) Imagen representativa del silenciamiento para ER α y ER β , (b) Viabilidad celular de las células transfectadas con el siCTRL, siEr α , siEr β o siEr α/β , tratadas con vehículo o G1 100nM durante 24 horas. La viabilidad se determinó empleando la técnica HO/PI. (c, d) Análisis de densitometría para el silenciamiento génico para ER α (c) y ER β (d), usando la α -Tubulina (α -Tub) como control de carga. (e) Representación de la viabilidad celular empleando el índice apoptótico. (f) Células de islotes pancreáticos de ratón WT y β ERKO fueron tratadas con vehículo o G1 100 nM durante 48 horas. La viabilidad se determinó empleando la técnica

HO/PI. Los datos se muestran como la media \pm SEM de 4 experimentos independientes, (b-d y f) * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ respecto al vehículo; ### $p \leq 0,001$, indicado por barras, ANOVA Two-way. (e) * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ respecto al siCTRL, ANOVA One-way

8. Efecto del estradiol y el BPA en la formación de heterodímeros ER α / β

Para realizar sus acciones biológicas, tras unírseles el ligando, ER α y ER β forman homodímeros y heterodímeros (Levin & Hammes, 2016; Razandi et al., 2004). Debido a que nuestros datos sugieren que parte del efecto del BPA sobre la apoptosis está directamente mediado por ER α y ER β , estudiamos si la unión de E2 o BPA estabilizaría la formación de homodímeros y de heterodímeros de ER α / β . Usando herramientas bioinformáticas se predijo que mientras el E2 era promovía la estabilización de los homodímeros y heterodímeros, el BPA estabilizaba el homodímero ER β β y disminuía la estabilización del heterodímero ER α / β (Babiloni-Chust et al., 2022).

Para investigar la formación de heterodímeros *in vitro*, en primer lugar, realizamos un ensayo de PLA (del inglés *Proximity Ligand Assay*), el cual permite detectar *in situ* las interacciones físicas entre dos proteínas. Para ello, la línea INS-1E fue tratada con el E2 1 nM, el BPA 1 nM o bien el agonista G1 100 nM, durante 24 horas, tras las cuales, las células fueron fijadas y la formación de heterodímeros detectada mediante la prueba del PLA, mostrando los heterodímeros como fluorescencia emitida en rojo (Texas red). En la situación control ya se detectaron heterodímeros preformados. A su vez, el E2 1nM promovió la formación de heterodímeros ER α / β , observándose cómo hay un incremento en la fluorescencia. Por el contrario, tanto el BPA 1nM como el G1 100nM disminuían el número de heterodímeros al disminuir la señal del PLA (figura 39a).

Para demostrar esta observación de manera cuantitativa, en la misma línea celular se realizó un ensayo de coimmunoprecipitación, en el cual las células fueron nuevamente incubadas con el E2, el BPA y G1 durante 24 horas y lisadas posteriormente. La formación de heterodímeros fue analizada mediante la inmunoprecipitación de ER β y visualizando ER α mediante WB. Como control negativo del experimento se empleó un anti-IgG no específico.

Como se muestra en la figura 39b y c, se pudo detectar la presencia de heterodímeros en condiciones basales. Conforme a lo observado en el PLA, el E2 1 nM incrementó la formación de heterodímeros $1,4 \pm 0,1$ veces. Sin embargo, el BPA 1 nM redujo dicha formación $0,2 \pm 0,1$ veces respecto al control.

Finalmente, decidimos evaluar si G1 era capaz también de alterar la formación de heterodímeros. Para ello, se replicó el experimento previo, pero esta vez empleando el G1, obteniéndose una disminución en la formación de heterodímeros de $0,3 \pm 0,1$ veces respecto a la situación control (figura 39d-e).

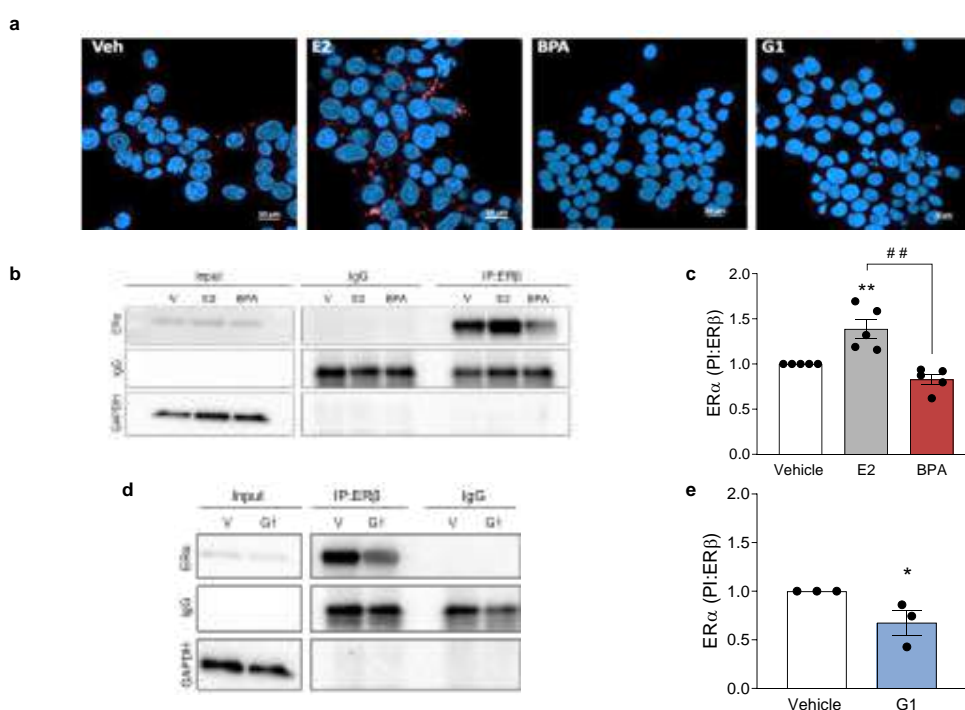


Figura 39. El E2 y el BPA tienen un efecto diferente sobre la formación de heterodímeros.

(a) La línea celular INS-1E fue tratada con vehículo, E2 1nM, BPA 1nM o G1 100nM durante 24 horas. Los heterodímeros fueron detectados usando el ensayo *in situ* de proximidad, en el que los heterodímeros se representan como puntos rojos (Texas red) y el núcleo se muestra en azul (DAPI). (b-e) La línea celular INS-1E fue tratada con vehículo (barras blancas), E2 1nM (barras grises), BPA 1 nM (barras rojas) o G1 100 nM (barras azules) durante 24 horas. Las células se lisaron y se recogió la proteína para la coimmunoprecipitación empleando el anticuerpo anti-ERβ. Se empleó como control negativo un IgG no específico. Tanto el inmunoprecipitado como la proteína total (input) fueron analizados mediante western blot (b,d) Imagen representativa de 3-5 experimentos independientes. Los resultados de densitometría están mostrados como la unión específica de ERα a ERβ (c,e). Los valores fueron normalizados por GAPDH y posteriormente por el valor del vehículo para cada experimento, normalizado como 1. Los datos se muestran como la media \pm SEM de 3-5 experimentos independientes (c) $**p \leq 0,01$ respecto al vehículo; $##p \leq 0,01$ indicado por barras. ANOVA One-way (e) $*p \leq 0,05$ respecto al vehículo. T-test.

Discusión

La hormona natural E2 posee un efecto protector sobre la célula β , tanto en su función como en la supervivencia celular, ya que es capaz de protegerla frente a estímulos apoptóticos, tales como las citoquinas, el estrés oxidativo o la glucolipototoxicidad, entre otros (Tiano & Mauvais-Jarvis, 2012). Dicha protección se produce mediante la unión del E2 a los receptores de estrógenos ER α , ER β y al receptor de estrógenos acoplado a proteínas G (GPER) (Liu et al., 2009).

Los receptores de estrógenos, además de unir la hormona natural, pueden ser diana de diferentes sustancias entre las que se encuentran varios EDCs, como el BPA. En la célula β , el BPA mimetiza en parte los efectos ejercidos por el E2 mediante las mismas vías, aumentando tanto la síntesis como la secreción de insulina (Alonso-Magdalena et al., 2008; Soriano et al., 2012).

En la presente tesis se demuestra que en los modelos de célula β tanto humanos (EndoC- β H1) como de rata (INS-1E), dosis bajas de BPA, en el rango pico y nanomolar, aumentan la apoptosis, mientras que las mismas dosis de la hormona natural no presentan ningún efecto sobre la viabilidad celular.

Este rango de dosis bajas es el rango al que estamos expuestos la mayoría de la población humana de forma habitual (Colorado-Yohar et al., 2021). Estas concentraciones se encuentran varios ordenes de magnitud por debajo de la constante de afinidad del BPA por los receptores de estrógenos clásicos (Kuiper et al., 1998), que es del orden micromolar. Sin embargo, desde hace unas décadas se conoce que estos receptores pueden iniciar una señalización extranuclear y que el BPA, en el rango nanomolar, es capaz de activar también dichas vías de señalización, con una potencia similar a la de la hormona natural y que podrían ser responsable del efecto apoptótico observado (Nadal et al., 2018; Alonso-Magdalena et al., 2012).

Estos resultados, en los que mostramos que dosis medioambientalmente relevantes de BPA son capaces de promover un aumento de la apoptosis, junto con diferentes publicaciones que demuestran que dosis a las que estamos expuestos de BPA son capaces de alterar la función de la célula β (Villar-Pazos et al., 2017; Martínez-Pinna et al., 2019) sugieren que el BPA presenta acciones sobre la célula β en dosis consideradas como seguras. Además, junto con los efectos descritos sobre la alteración en la secreción de insulina y la resistencia

a la acción de esta hormona en los tejidos periféricos (Alonso-Magdalena et al., 2006; Soriano et al., 2012), este efecto apoptótico del BPA sobre la célula β , observado tanto por nosotros como por otros investigadores (Carchia et al., 2015; Lin et al., 2013), contribuye al efecto diabetogénico del BPA.

1. El BPA genera la muerte celular mediante un incremento de ROS

Se sabe que el BPA es capaz de promover un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno en la célula β (Lin et al., 2013; Xin et al., 2014). En la presente tesis demostramos cómo la exposición a 1 nM de BPA, tanto en los modelos celulares de rata (INS-1E) como humanos (EndoC- β H1), promueve un aumento en la producción de ROS y asociado a ello, un incremento en la apoptosis.

La mitocondria es esencial para el correcto funcionamiento de la célula β , puesto que, mediante la producción de ATP, acopla el aumento de la glucemia a la secreción de insulina (Pi et al., 2007). La cadena de transporte mitocondrial es la mayor productora de ROS dentro de la célula (Murphy, 2009). Pese a que en este estudio no se describe cómo el BPA es capaz de producir el aumento en la producción de ROS, Carchia y colaboradores demostraron que el BPA, en la célula β y a la misma dosis empleada por nosotros, produce un desbalance en la mitocondria, alterando la función de la misma, puesto que es capaz de reducir la expresión de genes implicados tanto en la respiración mitocondrial como en el proceso de fosforilación oxidativa e induciendo, por tanto, un incremento en la producción de ROS (Carchia et al., 2015). En línea con estos resultados, Lin y colaboradores mostraron cómo el BPA puede alterar la función de esta organela y activar la vía mitocondrial de la apoptosis, provocando un incremento de la muerte celular (Lin et al., 2013). Por tanto, es plausible asumir que, en nuestros modelos celulares, el BPA está alterando la función mitocondrial y asociado a ello, incrementando ROS y desencadenando la apoptosis.

2. Papel de los receptores de estrógenos en la muerte mediada por el BPA.

Dado que el xenoestrógeno BPA se une a los receptores de estrógeno, pero produce efectos distintos a los del E2 sobre la supervivencia de la célula β , hemos investigado el papel de GPER, ER α y ER β en la viabilidad de estas células, así como su implicación en la muerte celular mediada por BPA.

GPER es un receptor de estrógenos acoplado a proteínas G, con una afinidad por la hormona natural de 6 nM (Thomas et al., 2005), inferior a la que presentan los receptores clásicos (0,05 y 0,07 nM para ER α y ER β , respectivamente) (Kuiper et al., 1998). A su vez, también se ha descrito que este receptor puede ser diana de distintos EDCs, entre los que se incluye el BPA (Qie et al., 2021). Se ha publicado en diferentes modelos que el BPA, a través de GPER, puede presentar efectos adversos tales como inducir apoptosis en células granulosas (Huang et al., 2021), promover la activación de vías de señalización intracelulares conduciendo a la expresión génica (Pupo et al., 2012) o favorecer la adhesión y migración de las células de cáncer de mama MDA-MB-231 (Castillo-Sanchez et al., 2020).

La célula β pancreática expresa el receptor GPER (Balhuizen et al., 2010; Kumar et al., 2011). En el presente trabajo demostramos, en primer lugar, que el BPA 1 nM, a través del receptor GPER, promueve un aumento de la muerte celular, y, en segundo lugar, que su activación mediante el uso del agonista puede promover la apoptosis de la célula β .

La constante de afinidad del BPA por GPER es de aproximadamente 600 nM (Thomas & Dong, 2006). Sin embargo, los datos mostrados en la presente tesis sugieren que dosis tan bajas como 1 nM, muy por debajo de dicha constante de afinidad, producen efectos biológicos relevantes a través de este receptor, promoviendo la muerte de la célula β . Existen evidencias previas de que dosis picomolares o nanomolares de BPA, a través de GPER, son capaces de provocar efectos celulares. LaPensee y colaboradores, en 2009, pusieron de manifiesto que una dosis de 1 nM de BPA, la misma empleada en este trabajo, a través del receptor de GPER, confería protección a las células de cáncer de mama frente a los agentes terapéuticos (LaPensee et al., 2009). Más aún, dosis

de 100 pM aumentan los marcadores inflamatorios generados por el tejido adiposo mamario (Cimmino et al., 2019). Estas evidencias ponen de manifiesto que dosis mucho menores que la constante de afinidad producen efectos biológicos relevantes, lo cual concuerda con nuestros resultados.

Cuando analizamos con detenimiento los datos obtenidos, no era posible explicar el efecto observado con el BPA actuando solo a través de GPER, ya que cuando inhibíamos el receptor farmacológicamente o con el siRNA, quedaba un remanente de apoptosis que no era dependiente de GPER, mientras que, con el agonista G1, solo se observaba un incremento parcial de la muerte celular, sin llegar a equipararse a la generada por el BPA. Ello sugería que, además de este receptor, para mediar los efectos apoptóticos del BPA debían de estar implicados otros receptores, tales como ER α y ER β .

Previamente se había descrito que el antagonista ICI 182,780, un antagonista tanto de ER α como de ER β , bloqueaba otros efectos mediados por el BPA en la célula β (Alonso-Magdalena et al., 2008). También se ha descrito que el bloqueo de los receptores clásicos inhibe la apoptosis mediada por BPA en otros modelos celulares (Liu et al., 2013). Nuestros datos, junto con los de dos Santos et al., 2022, demuestran que cuando ER α y ER β se encuentran bloqueados por el ICI, los efectos apoptóticos del BPA se anulan en nuestros dos modelos de estudio, poniendo de manifiesto la participación de los receptores clásicos de estrógenos en la muerte mediada por BPA en la célula β .

Atendiendo a los resultados obtenidos para el receptor ER α , nos encontrábamos con dos escenarios diferentes. Por un lado, en aquellas células con bloqueo farmacológico o silenciamiento del receptor detectamos un aumento basal de la apoptosis; por el contrario, cuando la vía de ER α no se encontraba disponible, el efecto apoptótico del BPA se encontraba reducido.

Estos hallazgos permiten corroborar dos puntos importantes. En primer lugar, ER α se encuentra protegiendo la supervivencia celular en ausencia de ligando, ya que cuando es silenciado, o bloqueado empleando el antagonista, esta protección basal se anula, lo que se traduce en un incremento de la muerte celular. En segundo lugar, los datos aportados en el presente trabajo sugieren que el BPA requiere de ER α , pero su efecto sería diferente al de su agonista

PPT, ya que este último es incapaz de generar en ninguna de las dosis analizadas un incremento de la muerte celular.

Una de las primeras evidencias que ponían de manifiesto la importancia de este receptor para la supervivencia celular fue aportada por Le May y colaboradores en 2006, que observaron que el ratón knockout para ER α se encontraba gravemente predispuesto a la diabetes inducida por estreptozotocina, demostrando la importancia de este receptor en la supervivencia celular (Le May et al., 2006). Posteriormente, se ha probado que ER α reduce el estrés de retículo y presenta una acción protectora sobre la mitocondria. Zhou y colaboradores manifestaron que el silenciamiento de ER α en la línea de célula β MIN 6 promovía un incremento de la apoptosis en la célula β , siendo esta una situación similar a la obtenida por nosotros. A su vez también demostraron que silenciar ER α alteraba la función mitocondrial, incrementando el estrés oxidativo e induciendo apoptosis (Zhou et al., 2018), por lo que, pese a que en este trabajo no se aborda específicamente el mecanismo de muerte celular inducido por el silenciamiento, es factible asumir que los efectos aquí observados sobre el incremento de la muerte celular cuando ER α está inhibido o silenciado se produzcan mediante los mismos mecanismos.

La inhibición farmacológica o el silenciamiento bloqueaban las acciones mediadas por el BPA. Se sabe que este disruptor endocrino, en la célula β , puede activar ER α y promover la expresión del gen de la insulina en una señalización iniciada fuera del núcleo (Alonso-Magdalena et al., 2008), poniendo de manifiesto que este receptor media algunos efectos observados por el BPA. Nuestros resultados demuestran que ER α es esencial para la muerte celular mediada por BPA, ya que cuando la vía de este receptor no se encontraba disponible los efectos apoptóticos no se producían. Sin embargo, con el agonista específico para este receptor, el PPT, no se detectó ningún cambio en la viabilidad celular, lo que sugiere que el BPA requiere de ER α , pero para la muerte celular no estaría actuando como un agonista del receptor.

Por tanto, nosotros sugerimos que en la célula β , ER α estaría mediando una protección basal en ausencia de ligando, pero que a su vez se requiere de este receptor para ejercer la muerte celular mediada por BPA.

En el caso de ER β , cuando se inhibía farmacológicamente o se silenciaba, se observaba un incremento de la muerte basal. Además, al bloquear la vía de ER β el efecto apoptótico del BPA se reducía. En 2009, Liu y colaboradores habían mostrado, empleando el ratón β ERKO, cómo este se encontraba ligeramente predispuesto a la diabetes inducida por estreptozotocina (Liu et al., 2009). En dicho estudio se sugiere que este receptor participa de una manera discreta en la protección de la célula β frente al estrés oxidativo. No obstante, atendiendo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, parece que este receptor media un papel esencial en la supervivencia celular en condiciones basales, puesto que cuando silenciábamos ER β , se producía un porcentaje de apoptosis superior a cuando se silenciaba ER α . Nuestros resultados ponen de manifiesto que este receptor también es esencial en la supervivencia de la célula β .

Estudios previos del laboratorio mostraron que dosis nanomolares de BPA a través del receptor ER β alteraban la función de la célula β , promoviendo la secreción de insulina y modulando la expresión de canales iónicos esenciales para su correcto funcionamiento (Martinez-Pinna et al., 2019; Soriano et al., 2012; Villar-Pazos et al., 2017). Nosotros aquí mostramos que este receptor es también esencial para los efectos apoptóticos del BPA. Muestra de ello es que cuando se encuentra bloqueado o silenciado, no hay efecto del BPA sobre la muerte celular; sin embargo, el agonista específico para ER β , DPN, no promovió ningún efecto en la viabilidad celular, sugiriendo que el BPA, aunque requiere de ER β , promovería efectos diferentes a los que desencadenaría su agonista en el proceso de la apoptosis.

En 2009, Liu y colaboradores habían demostrado farmacológicamente y empleando ratones knockout para cada receptor, que los tres receptores presentaban un papel protector en la viabilidad de la célula β cuando era expuesta a estímulos apoptóticos y que dicha protección era independiente de la señalización ERE (Liu et al., 2009). Nosotros aquí mostramos cómo tanto la inhibición farmacológica de los receptores como su silenciamiento, promueven un incremento de la muerte celular, lo que sugiere que, en condiciones basales, en ausencia de ligando y de estímulos apoptóticos, dichos receptores se encuentran participando activamente en la supervivencia celular.

Tomando en conjunto los resultados mostrados en el presente trabajo, la acción de los tres receptores de estrógenos sería necesaria para que el BPA produzca sus efectos apoptóticos, lo cual confirmamos mediante el uso simultáneo de los tres agonistas, que genera un incremento de la apoptosis de manera similar a la obtenida con el BPA a través de un mecanismo que implica un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno. Estos resultados refuerzan la idea de que se requieren los tres receptores para mediar las acciones deletéreas del BPA. Por tanto, pese a que el BPA presenta una baja afinidad por cada uno de los receptores por separado, dosis de 1nM podrían ejercer su efecto mediante un mecanismo de amplificación basado en una intercomunicación establecida entre los tres receptores de estrógenos, dando lugar a un incremento de la apoptosis.

3. GPER induce la apoptosis mediante los receptores de estrógenos clásicos.

En la célula β está bien descrito que la activación de GPER promueve una protección frente a estímulos apoptóticos tales como H_2O_2 (Liu et al., 2009) o citoquinas proinflamatorias (Kumar et al., 2011). Sin embargo, en el presente trabajo demostramos que la activación de GPER tanto por el BPA como por su agonista G1, en ausencia de estímulos nocivos, presenta un efecto proapoptótico y que dicho incremento de la muerte celular ocurre a través de un aumento en la generación de ROS. Varios ejemplos se han detallado en líneas de cáncer de mama sobre este efecto apoptótico de la activación de GPER. En las líneas MCF-7 y SkBr3 (una línea que solo expresa el receptor GPER), se ha probado que el agonista G1 provoca un aumento de la muerte celular (Weißborn et al., 2014). Además, Wei y colaboradores en 2014 mostraron cómo en la línea SkBr3, el G1 induce un aumento de la apoptosis debido a un descenso en el potencial de la membrana mitocondrial y, asociado a ello, un incremento de ROS que desemboca en la inducción de la muerte celular (Wei et al., 2014). Por otro lado, Deliu y colaboradores mostraron cómo las neuronas espinales, cuando eran tratadas con las mismas dosis de G1 empleadas en el presente trabajo, eran capaces de incrementar la producción de ROS tanto en el citoplasma como a nivel mitocondrial de forma similar a la que se describe aquí (Deliu et al., 2012).

Los datos mostrados con el BPA a lo largo del presente trabajo sugieren que se establece una intercomunicación entre los diferentes receptores de estrógenos para llevar a cabo el incremento de apoptosis por el BPA y a su vez, que GPER podría interaccionar con los receptores clásicos. En nuestros modelos INS-1E y EndoC- β H1, cuando los receptores clásicos de estrógenos se encontraban bloqueados o bien silenciados, observamos que el efecto apoptótico del G1 se encontraba completamente eliminado.

En otros modelos celulares, se ha mostrado que el efecto ejercido por el receptor GPER puede ser mediado a través la señalización de los receptores clásicos. En las líneas HEK293, COS7 y SkBr3, Kang y colaboradores, en 2010, demostraron que GPER regula la expresión de ER α (Kang et al., 2010). Una intercomunicación funcional entre GPER y los receptores nucleares ha sido descrita en varios estudios. En la línea de cáncer ovárico BG-1, se ha reportado la necesidad de la expresión conjunta GPER y ER α para un aumento en la proliferación celular inducida tanto por la hormona natural como por el agonista de GPER, G1 (Albanito et al., 2007). Más aún, mediante experimentos de coinmunoprecipitación, en una línea de cáncer endometrial se ha comprobado que GPER y ER α pueden interaccionar físicamente y que dicha interacción se potencia en presencia de la hormona estradiol (Vivacqua et al., 2009). En el presente trabajo se ha mostrado que el G1 ejerce sus efectos vía ER α , ER β y GPER, indicando una posible intercomunicación entre los diferentes receptores para mediar la muerte celular.

Los datos obtenidos en la presente tesis demuestran que el efecto de GPER sobre la apoptosis de la célula β es dependiente de los receptores nucleares. Sin embargo, nuestros experimentos no permiten aclarar el mecanismo mediante el cual se establece esta comunicación entre el receptor GPER y los receptores clásicos de estrógenos. La señalización por GPER es compleja e implica la generación del segundo mensajero AMPc, la movilización de calcio desde depósitos intracelulares y la activación de quinasas, entre otros mecanismos (Luo & Liu, 2020). A su vez, se conoce que GPER puede interaccionar físicamente con ER α . Por lo tanto, serían necesarios estudios que describan cómo se establece esta intercomunicación para poder comprender este mecanismo de muerte celular.

Pese a que aquí mostramos que, en la célula β , la señalización de GPER es dependiente aguas abajo de los receptores clásicos, Kumar y colaboradores mostraron cómo la secreción de insulina mediada por este receptor era independiente de los receptores nucleares, ya que cuando estos se encontraban bloqueados en presencia del antagonista ICI, este proceso no se encontraba inhibido (Kumar et al., 2011). Tomando en conjunto este estudio con nuestros datos, se sugiere que GPER puede presentar dos tipos de señalización para mediar sus efectos en la célula β : la primera sería una señalización independiente de los receptores de estrógenos clásicos, mediando por ejemplo la secreción de insulina, mientras que la segunda sería dependiente de ER α y ER β y estaría involucrada en la viabilidad celular.

La sinergia observada en este mecanismo por parte de los receptores de estrógenos muestra la gran complejidad que presenta el estudio de los disruptores endocrinos. Ya no solo sería esencial saber la constante de afinidad de un compuesto para cada uno de los receptores, sino que, a su vez, la existencia de vías de señalización no clásicas, así como una intercomunicación entre los diferentes receptores, puede aumentar la dificultad para establecer el mecanismo de la disrupción endocrina.

4. Heterodimerización de los receptores de estrógenos

ER α y ER β , para ejercer su acción biológica se dimerizan tras la unión del ligando, dando lugar a los homodímeros ER $\alpha\alpha$ y ER $\beta\beta$, y al heterodímero ER $\alpha\beta$ (Levin & Hammes, 2016). A su vez, diferentes ligandos son capaces de estabilizar tanto los homodímeros como los heterodímeros *in vitro* e *in vivo* (Paulmurugan et al., 2011). Los datos obtenidos en la presente tesis sostienen que parte de los efectos generados tanto por el BPA como por G1 son dependientes de ER α y ER β .

Nuestros resultados bioinformáticos predijeron que la hormona natural promovería la formación tanto de homodímeros como del heterodímero. Por el contrario, el BPA promovería la estabilización del homodímero ER $\beta\beta$, pero no promovería la formación o estabilización del heterodímero ER $\alpha\beta$ (Babiloni-Chust et al., 2022). Al analizar los resultados obtenidos tanto con el PLA como con la coimmunoprecipitación se observó un efecto diferencial en la dinámica de los

heterodímeros: el E2 promovía la estabilización del heterodímero, pero el BPA y el G1 favorecían la no estabilización de este, coincidiendo con los modelos predichos mediante las herramientas bioinformáticas.

En base a las observaciones de que la hormona natural E2 no generaba apoptosis o incluso promovía la supervivencia favoreciendo la formación de heterodímeros, mientras que, por el contrario, el BPA y el G1 presentaban un efecto proapoptótico e inducían la no estabilización del heterodímero, propusimos un modelo en el que los heterodímeros presentaban un papel protector sobre la viabilidad celular y que, en una situación de desestabilización del mismo inducida por el BPA o el G1, la protección mediada por el heterodímero se encontraría reducida, traduciéndose en un aumento de la apoptosis.

La forma mediante la cual se establece la estabilización o no del heterodímero en presencia del E2 y el BPA, respectivamente, es algo que con los resultados obtenidos en el presente trabajo no podemos esclarecer. Podría ser que la desestabilización del heterodímero por parte del BPA promoviera, mediante un equilibrio químico, la formación de los homodímeros; en base a los resultados bioinformáticos dicho equilibrio se encontraría desplazado hacia ER $\beta\beta$. Estos cambios en las diferentes formaciones podrían a su vez alterar la supervivencia celular y, por tanto, incrementar la apoptosis en presencia del G1 o del BPA. Tampoco se puede descartar las diferentes combinaciones entre las distintas isoformas observadas tanto en ER α como en ER β , pudiendo ser una combinación en concreto la que promoviera el aumento en la supervivencia. Se sabe que diferentes isoformas de ER β pueden llegar a antagonizar la acción de ER α , al dimerizar entre ellas y suprimir su acción (Vrtačnik et al., 2014). Por otra parte, un efecto directo del BPA sobre ER α y ER β en la no estabilización del heterodímero podría ayudar a explicar el efecto residual que se observa en la apoptosis cuando GPER se encuentra bloqueado o silenciado.

En el modelo que proponemos en el presente trabajo, esquematizado en la figura 40, la protección mediada por los estrógenos en la célula β depende de tres receptores: los homodímeros ER $\alpha\alpha$ y ER $\beta\beta$ y el heterodímero ER $\alpha\beta$. Mediante el uso de herramientas farmacológicas y del silenciamiento génico, hemos

puesto de manifiesto que la inhibición las vías de estos receptores promueve un aumento de la apoptosis y que los tres receptores son esenciales para las acciones apoptóticas del BPA.

Nuestros resultados sostienen que la unión de la hormona natural 17- β estradiol promovería la formación de heterodímeros y una protección de la apoptosis. Por el contrario, el BPA o el agonista de GPER, G1, que incrementan la muerte celular, estarían ejerciendo su acción apoptótica mediante la ruptura de los heterodímeros, perdiéndose por tanto esta protección basal otorgada por los receptores de estrógenos.

Pese a que el BPA presenta una baja afinidad por los receptores de estrógenos clásicos y su IC50 para GPER es de 630 nM, de acuerdo con los resultados aquí mostrados el efecto proapoptótico del BPA ocurre a dosis tan bajas como 1nM. Este efecto parece tener lugar mediante la intercomunicación entre los tres receptores, que daría lugar la ruptura del heterodímero y, por consiguiente, un incremento de la muerte celular. A través de qué mecanismo se establece esa intercomunicación y cómo se origina la ruptura del heterodímero son cuestiones que mediante nuestros datos no podemos contestar. Futuros estudios serán necesarios para tratar de esclarecer este mecanismo y si la ruptura de los heterodímeros y la apoptosis consiguiente es organodependiente o es un mecanismo general.

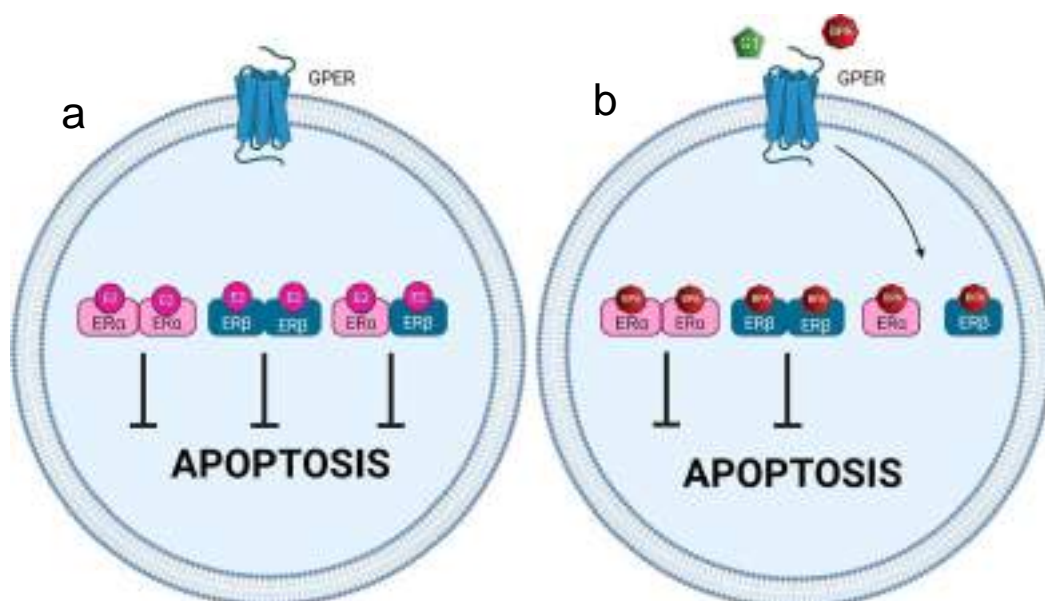


Figura 40. Modelo propuesto sobre el papel protector de los receptores de estrógenos en la supervivencia de la célula β . (a) En condiciones basales, en la célula β se encontrarían presentes tanto los homodímeros como el heterodímero y la unión del E2 al receptor potenciaría la presencia de ambos, reflejando el papel protector de dicha hormona; (b) por el contrario, la activación de GPER por BPA o por E2 promovería la destrucción del heterodímero, perdiéndose una de las vías de protección y generando el incremento de la apoptosis detectado (imagen tomada de Babiloni-Chust et al., 2022).

CONCLUSIONES

1. La exposición a la hormona natural E2 no ejerce ningún efecto sobre la viabilidad de las células β , mientras que el BPA, desde el rango picomolar, aumenta la apoptosis en estas células de una manera dependiente de la dosis.
2. La activación del receptor de estrógenos GPER, bien por BPA o por su agonista G1, es capaz de promover un incremento de la apoptosis en la célula β .
3. Los receptores de estrógenos clásicos ER α y ER β , en ausencia de ligando, promueven la supervivencia de la célula β . Dicha protección se encuentra reducida en presencia del BPA, favoreciendo así la apoptosis.
4. Se requiere de una intercomunicación entre GPER y los receptores clásicos de estrógenos, para mediar los efectos apoptóticos tanto del BPA como de GPER.

Proponemos, por tanto, que la protección basal de la apoptosis en la célula β se llevaría a cabo por los homodímeros ER $\alpha\alpha$, ER $\beta\beta$ y el heterodímero ER $\alpha\beta$. Dependiendo del ligando unido, la población de heterodímeros varía, puesto que con el E2 se promueve una formación de los heterodímeros, pero tanto con el BPA como el G1, dichos heterodímeros no se encuentran estabilizados, por tanto, el efecto protector del heterodímero se encuentra bloqueado, lo que se traduce en un incremento de la apoptosis.

1. Natural hormone E2, from picomolar to micromolar range, does not have any viability effect on pancreatic β cell. BPA at the same doses can increase the apoptosis in a dose-dependent manner. This apoptosis is mediated by ROS production.
2. GPER activation by BPA or its agonist G1 induce a β cell apoptosis.
3. The classical oestrogen receptors ER α and ER β , in a basal situation are involved at the basal protection of the β cell viability. This protection might be disturbed by BPA, thereby increasing apoptosis.
4. A GPER and classical estrogen receptors crosstalk, which are downstream, might be needed to BPA and GPER apoptotic effects.

We propose that the basal protection of apoptosis in the β cell would be conferred by the homodimers ER $\alpha\alpha$, ER $\beta\beta$ and the heterodimer ER $\alpha\beta$. Depending on the bound ligand, the population of heterodimers changes. While with E2 a formation of heterodimers is promoted, both BPA and G1, heterodimers are not stabilized, therefore, the protective branch of the heterodimer is found blocked, which translates into an increase in apoptosis.

BIBLIOGRAFÍA

Abraham, A., & Chakraborty, P. (2020). A review on sources and health impacts of bisphenol A. *Reviews on Environmental Health*, 35(2), 201–210. <https://doi.org/10.1515/reveh-2019-0034>

Ahmadkhaniha, R., Mansouri, M., Yunesian, M., Omidfar, K., Jeddi, M. Z., Larijani, B., Mesdaghinia, A., & Rastkari, N. (2014). Association of urinary bisphenol a concentration with type-2 diabetes mellitus. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 12(1), 64. <https://doi.org/10.1186/2052-336X-12-64>

Albanito, L., Madeo, A., Lappano, R., Vivacqua, A., Rago, V., Carpino, A., Oprea, T. I., Prossnitz, E. R., Musti, A. M., Andò, S., & Maggiolini, M. (2007). G Protein–Coupled Receptor 30 (GPR30) Mediates Gene Expression Changes and Growth Response to 17 β -Estradiol and Selective GPR30 Ligand G-1 in Ovarian Cancer Cells. *Cancer Research*, 67(4), 1859–1866. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2909>

Ali, O. (2013). Genetics of type 2 diabetes. *World Journal of Diabetes*, 4(4), 114. <https://doi.org/10.4239/wjd.v4.i4.114>

Alonso-Magdalena, P., Morimoto, S., Ripoll, C., Fuentes, E., & Nadal, A. (2006). The Estrogenic Effect of Bisphenol A Disrupts Pancreatic β -Cell Function In Vivo and Induces Insulin Resistance. *Environmental Health Perspectives*, 114(1), 106–112. <https://doi.org/10.1289/ehp.8451>

Alonso-Magdalena, P., Quesada, I., & Nadal, A. (2011). Endocrine disruptors in the etiology of type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*, 7(6), 346–353. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2011.56>

Alonso-Magdalena, P., Ropero, A. B., Carrera, M. P., Cederroth, C. R., Baquié, M., Gauthier, B. R., Nef, S., Stefani, E., & Nadal, A. (2008). Pancreatic Insulin Content Regulation by the Estrogen Receptor ER α . *PLoS ONE*, 3(4), e2069. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002069>

Alonso-Magdalena, P., Vieira, E., Soriano, S., Menes, L., Burks, D., Quesada, I., & Nadal, A. (2010). Bisphenol A: Exposure during Pregnancy Disrupts Glucose Homeostasis in Mothers and Adult Male Offspring. *Environmental Health Perspectives*, 118(9), 1243–1250. <https://doi.org/10.1289/ehp.1001993>

Andersson, L. E., Valtat, B., Bagge, A., Sharoyko, V. v., Nicholls, D. G., Ravassard, P., Scharfmann, R., Spéjel, P., & Mulder, H. (2015). Characterization of Stimulus-Secretion Coupling in the Human Pancreatic EndoC- β H1 Beta Cell Line. *PLOS ONE*, 10(3), e0120879. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120879>

Arao, Y., & Korach, K. S. (2018). The F domain of estrogen receptor α is involved in species-specific, tamoxifen-mediated transactivation. *Journal of Biological Chemistry*, 293(22), 8495–8507. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001212>

Asfari, M., Janjic, D., Meda, P., Li, G., Halban, P. A., & Wollheim, C. B. (1992). Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology*, 130(1), 167–178. <https://doi.org/10.1210/endo.130.1.1370150>

Ashcroft, F. M., Harrison, D. E., & Ashcroft, S. J. H. (1984). Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic β -cells. *Nature*, 312(5993), 446–448. <https://doi.org/10.1038/312446a0>

Ashcroft, S. J. H. (2000). The β -Cell KATP Channel. *The Journal of Membrane Biology*, 176(3), 187–206. <https://doi.org/10.1007/s00232001095>

Association, A. D. (2020). 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2021. *Diabetes Care*, 44(Supplement_1), S15–S33. <https://doi.org/10.2337/dc21-S002>

Babiloni-Chust, I., dos Santos, R. S., Medina-Gali, R. M., Perez-Serna, A. A., Encinar, J.-A., Martinez-Pinna, J., Gustafsson, J.-A., Marroqui, L., & Nadal, A. (2022). G protein-coupled estrogen receptor activation by bisphenol-A disrupts the protection from apoptosis conferred by the estrogen receptors ER α and ER β in pancreatic beta cells. *Environment International*, 164, 107250. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107250>

Balhuizen, A., Kumar, R., Amisten, S., Lundquist, I., & Salehi, A. (2010). Activation of G protein-coupled receptor 30 modulates hormone secretion and counteracts cytokine-induced apoptosis in pancreatic islets of female mice. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 320(1–2), 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.01.030>

Barton, M. (2012). Position paper: The membrane estrogen receptor GPER – Clues and questions. *Steroids*, 77(10), 935–942. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2012.04.001>

Beroske, L., van den Wyngaert, T., Stroobants, S., van der Veken, P., & Elvas, F. (2021). Molecular Imaging of Apoptosis: The Case of Caspase-3 Radiotracers. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), 3948. <https://doi.org/10.3390/ijms22083948>

Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell*. 1996 Jun 14;85(6):803-15. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81265-9.

Boronat-Belda, T., Ferrero, H., Al-Abdulla, R., Quesada, I., Gustafsson, J.-A., Nadal, Á., & Alonso-Magdalena, P. (2020). Bisphenol-A exposure during pregnancy alters pancreatic β -cell division and mass in male mice offspring: A role for ER β . *Food and Chemical Toxicology*, 145, 111681. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111681>

Cabrera, O.; Berman, D.M.; Kenyon, N.S.; Ricordi, C.; Berggren, P.O.; Caicedo, A (2006). The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 2334–2339 <https://doi.org/10.1073/pnas.0510790103>

Cavalcante, G.C.; Schaan, A.P.; Cabral, G.F.; Santana-da-Silva, M.N.; Pinto, P.; Vidal, A.F.; Ribeiro-dos-Santos, Â. A Cell's Fate: An Overview of the Molecular Biology and Genetics of Apoptosis. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 4133. <https://doi.org/10.3390/ijms20174133>

Calafat, A. M., Ye, X., Wong, L.-Y., Reidy, J. A., & Needham, L. L. (2008). Exposure of the U.S. Population to Bisphenol A and 4- tertiary -Octylphenol: 2003–2004. *Environmental Health Perspectives*, 116(1), 39–44. <https://doi.org/10.1289/ehp.10753>

Campbell, J. E., & Newgard, C. B. (2021). Mechanisms controlling pancreatic islet cell function in insulin secretion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22(2), 142–158. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00317-7>

Carchia, E., Porreca, I., Almeida, P. J., D'Angelo, F., Cuomo, D., Ceccarelli, M., de Felice, M., Mallardo, M., & Ambrosino, C. (2015). Evaluation of low doses BPA-induced perturbation of glycemia by toxicogenomics points to a primary role of pancreatic islets and to the mechanism of toxicity. *Cell Death & Disease*, 6(10), e1959–e1959. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.319>

Castillo-Sanchez, R., Ramirez-Ricardo, J., Martinez-Baeza, E., Cortes-Reynosa, P., Candanedo-Gonzales, F., Gomez, R., & Salazar, E. P. (2020). Bisphenol A induces focal adhesions assembly and activation of FAK, Src and ERK2 via GPER in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Toxicology in Vitro*, 66, 104871. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104871>

Cherrington, A. D., Edgerton, D., & Sindelar, D. K. (1998). The direct and indirect effects of insulin on hepatic glucose production in vivo. *Diabetologia*, 41(9), 987–996. <https://doi.org/10.1007/s001250051021>

Chu, C., Gao, X., Li, X., Zhang, X., Ma, R., Jia, Y., Li, D., Wang, D., & Xu, F. (2020). Involvement of Estrogen Receptor- α in the Activation of Nrf2-Antioxidative Signaling Pathways by Silibinin in Pancreatic β -Cells. *Biomolecules & Therapeutics*, 28(2), 163–171. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2019.071>

Chmurska A, Matczak K, Marczak A (2021). Two Faces of Autophagy in the Struggle against Cancer. *Int J Mol Sci.* 15;22(6):2981. doi: 10.3390/ijms22062981.

Cimmino, I., Oriente, F., D'Esposito, V., Liguoro, D., Liguoro, P., Ambrosio, M. R., Cabaro, S., D'Andrea, F., Beguinot, F., Formisano, P., & Valentino, R. (2019). Low-dose Bisphenol-A regulates inflammatory cytokines through GPR30 in mammary adipose cells. *Journal of Molecular Endocrinology*, 63(4), 273–283. <https://doi.org/10.1530/JME-18-0265>

Colorado-Yohar, S. M., Castillo-González, A. C., Sánchez-Meca, J., Rubio-Aparicio, M., Sánchez-Rodríguez, D., Salamanca-Fernández, E., Ardanaz, E., Amiano, P., Fernández, M. F., Mendiola, J., Navarro-Mateu, F., & Chirlaque, M. D. (2021). Concentrations of bisphenol-A in adults from the general population: A systematic review and meta-analysis. *Science of The Total Environment*, 775, 145755. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145755>

Combarnous, Y., & Nguyen, T. M. D. (2019). Comparative Overview of the Mechanisms of Action of Hormones and Endocrine Disruptor Compounds. *Toxics*, 7(1), 5. <https://doi.org/10.3390/toxics7010005>

Contreras, J. L., Smyth, C. A., Bilbao, G., Young, C. J., Thompson, J. A., & Eckhoff, D. E. (2002). 17 β -Estradiol protects isolated human pancreatic islets against proinflammatory cytokine-induced cell death: molecular mechanisms and islet functionality. *Transplantation*, 74(9), 1252–1259. <https://doi.org/10.1097/00007890-200211150-00010>

da Silva Xavier, G. (2018). The Cells of the Islets of Langerhans. *Journal of Clinical Medicine*, 7(3), 54. <https://doi.org/10.3390/jcm7030054>

Deliu, E., Brailoiu, G. C., Arterburn, J. B., Oprea, T. I., Benamar, K., Dun, N. J., & Brailoiu, E. (2012). Mechanisms of G Protein-Coupled Estrogen Receptor-Mediated Spinal Nociception. *The Journal of Pain*, 13(8), 742–754. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2012.05.011>

Dendup, T., Feng, X., Clingan, S., & Astell-Burt, T. (2018). Environmental Risk Factors for Developing Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(1), 78. <https://doi.org/10.3390/ijerph15010078>

Dimitriadis, G., Mitrou, P., Lambadiari, V., Maratou, E., & Raptis, S. A. (2011). Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 93, S52–S59. [https://doi.org/10.1016/S0168-8227\(11\)70014-6](https://doi.org/10.1016/S0168-8227(11)70014-6)

Dodds, E. C., & Lawson, W. (1936). Synthetic strogenic Agents without the Phenanthrene Nucleus. *Nature*, 137(3476), 996–996. <https://doi.org/10.1038/137996a0>

Donepudi, M., & Grütter, M. G. (2002). Structure and zymogen activation of caspases. *Biophysical Chemistry*, 101–102, 145–153. [https://doi.org/10.1016/S0301-4622\(02\)00151-5](https://doi.org/10.1016/S0301-4622(02)00151-5)

dos Santos, R. S., Medina-Gali, R. M., Babiloni-Chust, I., Marroqui, L., & Nadal, A. (2022). In Vitro Assays to Identify Metabolism-Disrupting Chemicals with Diabetogenic Activity in a Human Pancreatic β -Cell Model. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), 5040. <https://doi.org/10.3390/ijms23095040>

Dziewirska, E., Hanke, W., & Jurewicz, J. (2018). Environmental non-persistent endocrine-disrupting chemicals exposure and reproductive hormones levels in adult men. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*. <https://doi.org/10.13075/ijomeh.1896.01183>

Eguchi, N., Vaziri, N. D., Dafoe, D. C., & Ichii, H. (2021). The Role of Oxidative Stress in Pancreatic β Cell Dysfunction in Diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1509. <https://doi.org/10.3390/ijms22041509>

Eizirik, D. L., Pasquali, L., & Cnop, M. (2020). Pancreatic β -cells in type 1 and type 2 diabetes mellitus: different pathways to failure. *Nature Reviews Endocrinology*, 16(7), 349–362. <https://doi.org/10.1038/s41574-020-0355-7>

Elmore S (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* ;35(4):495-516. doi: 10.1080/01926230701320337

Esser, N., Legrand-Poels, S., Piette, J., Scheen, A. J., & Paquot, N. (2014). Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 105(2), 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2014.04.006>

Farooq, S., Mazhar, A., Ghouri, A., Ihsan-Ul-Haq, & Ullah, N. (2020). One-Pot Multicomponent Synthesis and Bioevaluation of Tetrahydroquinoline Derivatives as Potential Antioxidants, α -Amylase Enzyme Inhibitors, Anti-Cancerous and Anti-Inflammatory Agents. *Molecules*, 25(11), 2710. <https://doi.org/10.3390/molecules25112710>

Filardo, E. J., Quinn, J. A., Frackelton, A. R., & Bland, K. I. (2002). Estrogen Action Via the G Protein-Coupled Receptor, GPR30: Stimulation of Adenylyl Cyclase and cAMP-Mediated Attenuation of the Epidermal Growth Factor Receptor-to-MAPK Signaling Axis. *Molecular Endocrinology*, 16(1), 70–84. <https://doi.org/10.1210/mend.16.1.0758>

Fridlyand, L. E., & Phillipson, L. H. (2011). Mechanisms of glucose sensing in the pancreatic β -cell. *Islets*, 3(5), 224–230. <https://doi.org/10.4161/isl.3.5.16409>

Gannon, M., Kulkarni, R. N., Tse, H. M., & Mauvais-Jarvis, F. (2018). Sex differences underlying pancreatic islet biology and its dysfunction. *Molecular Metabolism*, 15, 82–91. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.05.017>

Gaudet, H. M., Cheng, S. B., Christensen, E. M., & Filardo, E. J. (2015). The G-protein coupled estrogen receptor, GPER: The inside and inside-out story. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 418, 207–219. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.07.016>

Geens, T., Goeyens, L., & Covaci, A. (2011). Are potential sources for human exposure to bisphenol-A overlooked? *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214(5), 339–347. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.04.005>

Gerber, P. A., & Rutter, G. A. (2017). The Role of Oxidative Stress and Hypoxia in Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes Mellitus. *Antioxidants & Redox Signaling*, 26(10), 501–518. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6755>

Gong, H., Zhang, X., Cheng, B., Sun, Y., Li, C., Li, T., Zheng, L., & Huang, K. (2013). Bisphenol A Accelerates Toxic Amyloid Formation of Human Islet Amyloid Polypeptide: A Possible Link between Bisphenol A Exposure and Type 2 Diabetes. *PLoS ONE*, 8(1), e54198. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054198>

Gore, A. C., Chappell, V. A., Fenton, S. E., Flaws, J. A., Nadal, A., Prins, G. S., Toppari, J., & Zoeller, R. T. (2015). EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocrine Reviews*, 36(6), E1–E150. <https://doi.org/10.1210/er.2015-1010>

Gu, C., Stein, G. H., Pan, N., Goebbels, S., Hörnberg, H., Nave, K.-A., Herrera, P., White, P., Kaestner, K. H., Sussel, L., & Lee, J. E. (2010). Pancreatic β Cells Require NeuroD to Achieve and Maintain Functional Maturity. *Cell Metabolism*, 11(4), 298–310. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.03.006>

Gurzov EN, Eizirik DL. Bcl-2 proteins in diabetes: mitochondrial pathways of β -cell death and dysfunction. *Trends Cell Biol.* 2011 Jul;21(7):424-31. doi: 10.1016/j.tcb.2011.03.001

Hall, J. M., Couse, J. F., & Korach, K. S. (2001). The Multifaceted Mechanisms of Estradiol and Estrogen Receptor Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 276(40), 36869–36872. <https://doi.org/10.1074/jbc.R100029200>

Hasnain, S. Z., Prins, J. B., & McGuckin, M. A. (2016). Oxidative and endoplasmic reticulum stress in β -cell dysfunction in diabetes. *Journal of Molecular Endocrinology*, 56(2), R33–R54. <https://doi.org/10.1530/JME-15-0232>

Ho, K.-L., Yuen, K.-K., Yau, M.-S., Murphy, M. B., Wan, Y., Fong, B. M.-W., Tam, S., Giesy, J. P., Leung, K. S.-Y., & Lam, M. H.-W. (2017). Glucuronide and Sulfate Conjugates of Bisphenol A: Chemical Synthesis and Correlation Between Their Urinary Levels and Plasma Bisphenol A Content in Voluntary Human Donors. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 73(3), 410–420. <https://doi.org/10.1007/s00244-017-0438-1>

- Huang, M., Huang, M., Li, X., Liu, S., Fu, L., Jiang, X., & Yang, M. (2021). Bisphenol A induces apoptosis through GPER-dependent activation of the ROS/Ca²⁺-ASK1-JNK pathway in human granulosa cell line KGN. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, 111429. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111429>
- Hudish, L. I., Reusch, J. E. B., & Sussel, L. (2019a). β Cell dysfunction during progression of metabolic syndrome to type 2 diabetes. *Journal of Clinical Investigation*, 129(10), 4001–4008. <https://doi.org/10.1172/JCI129188>
- Huopio, H., Shyng, S.-L., Otonkoski, T., & Nichols, C. G. (2002). K ATP channels and insulin secretion disorders. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 283(2), E207–E216. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00047.2002>
- Hwang, S., Lim, J., Choi, Y., & Jee, S. H. (2018). Bisphenol A exposure and type 2 diabetes mellitus risk: a meta-analysis. *BMC Endocrine Disorders*, 18(1), 81. <https://doi.org/10.1186/s12902-018-0310-y>
- Jan R, Chaudhry GE (2019). Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. *Adv Pharm Bull*. 2019 Jun;9(2):205-218. doi: 10.15171/apb.2019.024.
- Julien, O., & Wells, J. A. (2017). Caspases and their substrates. *Cell Death & Differentiation*, 24(8), 1380–1389. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.44>
- Kang, L., Zhang, X., Xie, Y., Tu, Y., Wang, D., Liu, Z., & Wang, Z.-Y. (2010). Involvement of Estrogen Receptor Variant ER- α 36, Not GPR30, in Nongenomic Estrogen Signaling. *Molecular Endocrinology*, 24(4), 709–721. <https://doi.org/10.1210/me.2009-0317>
- Kaul, N., & Ali, S. (2016). Genes, Genetics, and Environment in Type 2 Diabetes: Implication in Personalized Medicine. *DNA and Cell Biology*, 35(1), 1–12. <https://doi.org/10.1089/dna.2015.2883>
- Kautzky-Willer, A., Harreiter, J., & Pacini, G. (2016). Sex and Gender Differences in Risk, Pathophysiology and Complications of Type 2 Diabetes Mellitus. *Endocrine Reviews*, 37(3), 278–316. <https://doi.org/10.1210/er.2015-1137>
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972 Aug;26(4):239-57. doi: 10.1038/bjc.1972.33.
- Kim, H., & Xue, X. (2020). Detection of Total Reactive Oxygen Species in Adherent Cells by 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate Staining. *Journal of Visualized Experiments*, 160. <https://doi.org/10.3791/60682>

- Kojta, I., Chacińska, M., & Błachnio-Zabielska, A. (2020). Obesity, Bioactive Lipids, and Adipose Tissue Inflammation in Insulin Resistance. *Nutrients*, 12(5), 1305. <https://doi.org/10.3390/nu12051305>
- Kooptiwut, S., Mahawong, P., Hanchang, W., Semprasert, N., Kaewin, S., Limjindaporn, T., & Yenchitsomanus, P. (2014). Estrogen reduces endoplasmic reticulum stress to protect against glucotoxicity induced-pancreatic β -cell death. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 139, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.09.018>
- Krege, J. H., Hodgin, J. B., Couse, J. F., Enmark, E., Warner, M., Mahler, J. F., Sar, M., Korach, K. S., Gustafsson, J.-Åke, & Smithies, O. (1998). Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor β . *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(26), 15677–15682. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.26.15677>
- Kuiper, G. G. J. M., Lemmen, J. G., Carlsson, B., Corton, J. C., Safe, S. H., van der Saag, P. T., van der Burg, B., & Gustafsson, J.-Å. (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor β . *Endocrinology*, 139(10), 4252–4263. <https://doi.org/10.1210/endo.139.10.6216>
- Kumar, M., Sarma, D. K., Shubham, S., Kumawat, M., Verma, V., Prakash, A., & Tiwari, R. (2020). Environmental Endocrine-Disrupting Chemical Exposure: Role in Non-Communicable Diseases. *Frontiers in Public Health*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.553850>
- Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2018). Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(6), pdb.prot095505. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095505>
- Kumar, R., Balhuizen, A., Amisten, S., Lundquist, I., & Salehi, A. (2011). Insulinotropic and Antidiabetic Effects of 17 β -Estradiol and the GPR30 Agonist G-1 on Human Pancreatic Islets. *Endocrinology*, 152(7), 2568–2579. <https://doi.org/10.1210/en.2010-1361>
- Lang, I. A., Galloway, T. S., Scarlett, A., Henley, W. E., Depledge, M., Wallace, R. B., & Melzer, D. (2008). Association of Urinary Bisphenol A Concentration With Medical Disorders and Laboratory Abnormalities in Adults. *JAMA*, 300(11), 1303–1310. <https://doi.org/10.1001/jama.300.11.1303>
- Lannigan, D. A. (2003). Estrogen receptor phosphorylation. *Steroids*, 68(1), 1–9. [https://doi.org/10.1016/S0039-128X\(02\)00110-1](https://doi.org/10.1016/S0039-128X(02)00110-1)
- LaPensee, E. W., Tuttle, T. R., Fox, S. R., & Ben-Jonathan, N. (2009). Bisphenol A at Low Nanomolar Doses Confers Chemoresistance in Estrogen Receptor- α -Positive and -Negative Breast Cancer Cells. *Environmental Health Perspectives*, 117(2), 175–180. <https://doi.org/10.1289/ehp.11788>

le May, C., Chu, K., Hu, M., Ortega, C. S., Simpson, E. R., Korach, K. S., Tsai, M.-J., & Mauvais-Jarvis, F. (2006). Estrogens protect pancreatic β -cells from apoptosis and prevent insulin-deficient diabetes mellitus in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(24), 9232–9237. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602956103>

Lema, C., Varela-Ramirez, A., & Aguilera, R. J. (n.d.). Differential nuclear staining assay for high-throughput screening to identify cytotoxic compounds. *Current Cellular Biochemistry*, 1(1), 1–14.

Lenzen, S. (2008). Oxidative stress: the vulnerable β -cell. *Biochemical Society Transactions*, 36(3), 343–347. <https://doi.org/10.1042/BST0360343>

Levetan, C. S., & Pierce, S. M. (2013). Distinctions Between the Islets of Mice and Men: Implications for New Therapies for Type 1 and 2 Diabetes. *Endocrine Practice*, 19(2), 301–312. <https://doi.org/10.4158/EP12138.RA>

Leung YK, Mak P, Hassan S, Ho SM (2006). Estrogen receptor (ER)-beta isoforms: a key to understanding ER-beta signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug 29;103(35):13162-7. doi: 10.1073/pnas.0605676103

Levin, E. R., & Hammes, S. R. (2016). Nuclear receptors outside the nucleus: extranuclear signalling by steroid receptors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(12), 783–797. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.122>

Lin, Y., Sun, X., Qiu, L., Wei, J., Huang, Q., Fang, C., Ye, T., Kang, M., Shen, H., & Dong, S. (2013). Exposure to bisphenol A induces dysfunction of insulin secretion and apoptosis through the damage of mitochondria in rat insulinoma (INS-1) cells. *Cell Death & Disease*, 4(1), e460–e460. <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.206>

Liu, C., Duan, W., Li, R., Xu, S., Zhang, L., Chen, C., He, M., Lu, Y., Wu, H., Pi, H., Luo, X., Zhang, Y., Zhong, M., Yu, Z., & Zhou, Z. (2013). Exposure to bisphenol A disrupts meiotic progression during spermatogenesis in adult rats through estrogen-like activity. *Cell Death & Disease*, 4(6), e676–e676. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.203>

Liu, S., le May, C., Wong, W. P. S., Ward, R. D., Clegg, D. J., Marcelli, M., Korach, K. S., & Mauvais-Jarvis, F. (2009). Importance of Extranuclear Estrogen Receptor- α and Membrane G Protein–Coupled Estrogen Receptor in Pancreatic Islet Survival. *Diabetes*, 58(10), 2292–2302. <https://doi.org/10.2337/db09-0257>

Loor, G., Kondapalli, J., Schriever, J. M., Chandel, N. S., vanden Hoek, T. L., & Schumacker, P. T. (2010). Menadione triggers cell death through ROS-dependent mechanisms involving PARP activation without requiring apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(12), 1925–1936. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.021>

Luo, J., & Liu, D. (2020). Does GPER Really Function as a G Protein-Coupled Estrogen Receptor in vivo? *Frontiers in Endocrinology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00148>

Marino, M., Galluzzo, P., & Ascenzi, P. (2006). Estrogen Signaling Multiple Pathways to Impact Gene Transcription. *Current Genomics*, 7(8), 497–508. <https://doi.org/10.2174/138920206779315737>

Martinez-Pinna, J., Marroqui, L., Hmadcha, A., Lopez-Beas, J., Soriano, S., Villar-Pazos, S., Alonso-Magdalena, P., dos Santos, R. S., Quesada, I., Martin, F., Soria, B., Gustafsson, J.-Å., & Nadal, A. (2019). Oestrogen receptor β mediates the actions of bisphenol-A on ion channel expression in mouse pancreatic beta cells. *Diabetologia*, 62(9), 1667–1680. <https://doi.org/10.1007/s00125-019-4925-y>

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 Regulator of Estrogen Action. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 246(1), 142–147. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8590>

Maruyama, N. O., Lucas, T. F. G., Porto, C. S., & Abdalla, F. M. F. (2013). Estrogen receptor ESR1 regulates the phospholipase C-inositol phosphate signaling in the hippocampus from rats in proestrous and estrous phases. *Steroids*, 78(1), 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2012.10.005>

Mastrototaro, L., & Roden, M. (2021). Insulin resistance and insulin sensitizing agents. *Metabolism*, 125, 154892. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2021.154892>

Mauvais-Jarvis, F. (2018). Gender differences in glucose homeostasis and diabetes. *Physiology & Behavior*, 187, 20–23. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.08.016>

Mauvais-Jarvis, F., le May, C., Tiano, J. P., Liu, S., Kilic-Berkmen, G., & Kim, J. H. (2017). The Role of Estrogens in Pancreatic Islet Physiopathology (pp. 385–399). https://doi.org/10.1007/978-3-319-70178-3_18

Merglen, A., Theander, S., Rubi, B., Chaffard, G., Wollheim, C. B., & Maechler, P. (2004). Glucose Sensitivity and Metabolism-Secretion Coupling Studied during Two-Year Continuous Culture in INS-1E Insulinoma Cells. *Endocrinology*, 145(2), 667–678. <https://doi.org/10.1210/en.2003-1099>

Merino, B., & García-Arévalo, M. (2021). Sexual hormones and diabetes: The impact of estradiol in pancreatic β cell (pp. 81–138). <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2021.02.004>

- Michael, M. D., Kulkarni, R. N., Postic, C., Previs, S. F., Shulman, G. I., Magnuson, M. A., & Kahn, C. R. (2000). Loss of Insulin Signaling in Hepatocytes Leads to Severe Insulin Resistance and Progressive Hepatic Dysfunction. *Molecular Cell*, 6(1), 87–97. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(05\)00015-8](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(05)00015-8)
- Misler, S., Barnett, D. W., Gillis, K. D., & Pressel, D. M. (1992). Electrophysiology of Stimulus-Secretion Coupling in Human β -Cells. *Diabetes*, 41(10), 1221–1228. <https://doi.org/10.2337/diab.41.10.1221>
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417(1), 1–13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>
- Nadal, A., Fuentes, E., Ripoll, C., Villar-Pazos, S., Castellano-Muñoz, M., Soriano, S., Martinez-Pinna, J., Quesada, I., & Alonso-Magdalena, P. (2018). Extranuclear-initiated estrogenic actions of endocrine disrupting chemicals: Is there toxicology beyond paracelsus? *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 176, 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.01.014>
- Nadal, A., Ropero, A. B., Laribi, O., Maillet, M., Fuentes, E., & Soria, B. (2000). Nongenomic actions of estrogens and xenoestrogens by binding at a plasma membrane receptor unrelated to estrogen receptor α and estrogen receptor β . *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(21), 11603–11608. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.21.11603>
- Nadal, A., Rovira, J. M., Laribi, O., Leon-Quinto, T., Andreu, E., Ripoll, C., & Soria, B. (1998). Rapid insulinotropic effect of 17 β -estradiol via a plasma membrane receptor. *The FASEB Journal*, 12(13), 1341–1348. <https://doi.org/10.1096/fasebj.12.13.1341>
- Newsholme, P., Keane, K. N., Carlessi, R., & Cruzat, V. (2019). Oxidative stress pathways in pancreatic β -cells and insulin-sensitive cells and tissues: importance to cell metabolism, function, and dysfunction. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 317(3), C420–C433. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00141.2019>
- Ng, H. W., Zhang, W., Shu, M., Luo, H., Ge, W., Perkins, R., Tong, W., & Hong, H. (2014). Competitive molecular docking approach for predicting estrogen receptor subtype α agonists and antagonists. *BMC Bioinformatics*, 15(S11), S4. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-S11-S4>
- Nirmala, J. G., & Lopus, M. (2020). Cell death mechanisms in eukaryotes. *Cell Biology and Toxicology*, 36(2), 145–164. <https://doi.org/10.1007/s10565-019-09496-2>
- Paulmurugan, R., Tamrazi, A., Massoud, T. F., Katzenellenbogen, J. A., & Gambhir, S. S. (2011). In vitro and in vivo molecular imaging of estrogen receptor α and β homo- and heterodimerization: Exploration of new modes of receptor regulation. *Molecular Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/me.2011-1145>

Petersen, D. N., Tkalcevic, 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. <https://doi.org/10.1210/endo.139.3.5840>

Petersen, M. C., & Shulman, G. I. (2018). Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiological Reviews*, 98(4), 2133–2223. <https://doi.org/10.1152/physrev.00063.2017>

Pi, J., Bai, Y., Zhang, Q., Wong, V., Floering, L. M., Daniel, K., Reece, J. M., Deeney, J. T., Andersen, M. E., Corkey, B. E., & Collins, S. (2007). Reactive Oxygen Species as a Signal in Glucose-Stimulated Insulin Secretion. *Diabetes*, 56(7), 1783–1791. <https://doi.org/10.2337/db06-1601>

Pi, J., Zhang, Q., & Andersen, M. E. (2014). Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Pancreatic β -Cell Function – Yin and Yang. In *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants* (pp. 3319–3337). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30018-9_159

Pietkiewicz, S., Schmidt, J. H., & Lavrik, I. N. (2015). Quantification of apoptosis and necroptosis at the single cell level by a combination of Imaging Flow Cytometry with classical Annexin V/propidium iodide staining. *Journal of Immunological Methods*, 423, 99–103. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2015.04.025>

Pillon, N. J., Loos, R. J. F., Marshall, S. M., & Zierath, J. R. (2021). Metabolic consequences of obesity and type 2 diabetes: Balancing genes and environment for personalized care. *Cell*, 184(6), 1530–1544. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.012>

Price, R. H., Lorenzon, N., & Handa, R. J. (2000). Differential expression of estrogen receptor beta splice variants in rat brain: identification and characterization of a novel variant missing exon 4. *Molecular Brain Research*, 80(2), 260–268. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(00\)00135-2](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(00)00135-2)

Pupo, M., Pisano, A., Lappano, R., Santolla, M. F., de Francesco, E. M., Abonante, S., Rosano, C., & Maggiolini, M. (2012). Bisphenol A Induces Gene Expression Changes and Proliferative Effects through GPER in Breast Cancer Cells and Cancer-Associated Fibroblasts. *Environmental Health Perspectives*, 120(8), 1177–1182. <https://doi.org/10.1289/ehp.1104526>

Qie, Y., Qin, W., Zhao, K., Liu, C., Zhao, L., & Guo, L. H. (2021). Environmental estrogens and their biological effects through GPER mediated signal pathways. *Environmental Pollution*, 278, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116826>

Quesada, I., Fuentes, E., Viso-León, M. C., Soria, B., Ripoll, C., & Nadal, A. (2002). Low doses of the endocrine disruptor Bisphenol-A and the native hormone 17 β -estradiol rapidly activate the transcription factor CREB. *The FASEB Journal*, 16(12), 1671–1673. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0313fje>

Razandi M, Pedram A, Merchenthaler I, Greene GL, Levin (2004) ER. Plasma membrane estrogen receptors exist and functions as dimers. *Mol Endocrinol*;18(12):2854-65. doi: 10.1210/me.2004-0115.

Redza-Dutordoir, M., & Averill-Bates, D. A. (2016). Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863(12), 2977–2992. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.012>

Revankar, C. M., Cimino, D. F., Sklar, L. A., Arterburn, J. B., & Prossnitz, E. R. (2005). A Transmembrane Intracellular Estrogen Receptor Mediates Rapid Cell Signaling. *Science*, 307(5715), 1625–1630. <https://doi.org/10.1126/science.1106943>

Rorsman, P., & Ashcroft, F. M. (2018). Pancreatic β -Cell Electrical Activity and Insulin Secretion: Of Mice and Men. *Physiological Reviews*, 98(1), 117–214. <https://doi.org/10.1152/physrev.00008.2017>

Rorsman, P., & Braun, M. (2013). Regulation of Insulin Secretion in Human Pancreatic Islets. *Annual Review of Physiology*, 75(1), 155–179. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183754>

Ruff, M., Gangloff, M., Marie Wurtz, J., & Moras, D. (2000). Estrogen receptor transcription and transactivation Structure-function relationship in DNA- and ligand-binding domains of estrogen receptors. *Breast Cancer Research*, 2(5), 353. <https://doi.org/10.1186/bcr80>

Santin, I., dos Santos, R. S., & Eizirik, D. L. (2015). Pancreatic Beta Cell Survival and Signaling Pathways: Effects of Type 1 Diabetes-Associated Genetic Variants (pp. 21–54). https://doi.org/10.1007/7651_2015_291

Sha, W., Hu, F., & Bu, S. (2020). Mitochondrial dysfunction and pancreatic islet β cell failure (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, 20(6), 1–1. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.9396>

Shamas-Din, A., Brahmhatt, H., Leber, B., & Andrews, D. W. (2011). BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813(4), 508–520. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.11.024>

She, Y., Jiang, L., Zheng, L., Zuo, H., Chen, M., Sun, X., Li, Q., Geng, C., Yang, G., Jiang, L., & Liu, X. (2017). The role of oxidative stress in DNA damage in pancreatic β cells induced by di-(2-ethylhexyl) phthalate. *Chemico-Biological Interactions*, 265, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.01.015>

Shen, C., Pei, J., Guo, X. et al. Structural basis for dimerization of the death effector domain of the F122A mutant of Caspase-8. *Sci Rep* 8, 16723 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35153-5>

Soriano, S., Alonso-Magdalena, P., García-Arévalo, M., Novials, A., Muhammed, S. J., Salehi, A., Gustafsson, J.-A., Quesada, I., & Nadal, A. (2012). Rapid Insulinotropic Action of Low Doses of Bisphenol-A on Mouse and Human Islets of Langerhans: Role of Estrogen Receptor β . *PLoS ONE*, 7(2), e31109. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031109>

Soriano, S., Ropero, A. B., Alonso-Magdalena, P., Ripoll, C., Quesada, I., Gassner, B., Kuhn, M., Gustafsson, J.-A., & Nadal, A. (2009). Rapid Regulation of KATP Channel Activity by 17 β -Estradiol in Pancreatic β -Cells Involves the Estrogen Receptor β and the Atrial Natriuretic Peptide Receptor. *Molecular Endocrinology*, 23(12), 1973–1982. <https://doi.org/10.1210/me.2009-0287>

Stančáková, A., & Laakso, M. (2016). Genetics of Type 2 Diabetes (pp. 203–220). <https://doi.org/10.1159/000439418>

Steiner DJ, Kim A, Miller K, Hara M (2010). Pancreatic islet plasticity: interspecies comparison of islet architecture and composition. *Islets*; 2: 135–145. <https://doi:10.4161/isl.2.3.11815>

Stefkovich, M. L., Arao, Y., Hamilton, K. J., & Korach, K. S. (2018). Experimental models for evaluating non-genomic estrogen signaling. *Steroids*, 133, 34–37. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2017.11.001>

Sun, Q., Cornelis, M. C., Townsend, M. K., Tobias, D. K., Eliassen, A. H., Franke, A. A., Hauser, R., & Hu, F. B. (2014). Association of Urinary Concentrations of Bisphenol A and Phthalate Metabolites with Risk of Type 2 Diabetes: A Prospective Investigation in the Nurses' Health Study (NHS) and NHSII Cohorts. *Environmental Health Perspectives*, 122(6), 616–623. <https://doi.org/10.1289/ehp.1307201>

Tatiparti, K., Sau, S., Kashaw, S., & Iyer, A. (2017). siRNA Delivery Strategies: A Comprehensive Review of Recent Developments. *Nanomaterials*, 7(4), 77. <https://doi.org/10.3390/nano7040077>

Thomas, P., Pang, Y., Filardo, E. J., & Dong, J. (2005). Identity of an Estrogen Membrane Receptor Coupled to a G Protein in Human Breast Cancer Cells. *Endocrinology*, 146(2), 624–632. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1064>

Thomas P, Dong J (2006). Binding, and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: a potential novel mechanism of endocrine disruption. *J Steroid Biochem Mol Biol* <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2006.09.017>

Tiano J, Mauvais-Jarvis F (2012). Selective estrogen receptor modulation in pancreatic β -cells and the prevention of type 2 diabetes. *Islets*. doi: 10.4161/isl.19747.

Tiano, J. P., Delghingaro-Augusto, V., le May, C., Liu, S., Kaw, M. K., Khuder, S. S., Latour, M. G., Bhatt, S. A., Korach, K. S., Najjar, S. M., Prentki, M., & Mauvais-

- Jarvis, F. (2011). Estrogen receptor activation reduces lipid synthesis in pancreatic islets and prevents β cell failure in rodent models of type 2 diabetes. *Journal of Clinical Investigation*, 121(8), 3331–3342. <https://doi.org/10.1172/JCI44564>
- Tinajero, M. G., & Malik, V. S. (2021). An Update on the Epidemiology of Type 2 Diabetes. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 50(3), 337–355. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2021.05.013>
- Titchenell, P. M., Lazar, M. A., & Birnbaum, M. J. (2017). Unraveling the Regulation of Hepatic Metabolism by Insulin. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 28(7), 497–505. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.03.003>
- van Opdenbosch, N., & Lamkanfi, M. (2019). Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease. *Immunity*, 50(6), 1352–1364. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.05.020>
- Vandenberg, L. N., Colborn, T., Hayes, T. B., Heindel, J. J., Jacobs, D. R., Lee, D.-H., Shioda, T., Soto, A. M., vom Saal, F. S., Welshons, W. v., Zoeller, R. T., & Myers, J. P. (2012). Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. *Endocrine Reviews*, 33(3), 378–455. <https://doi.org/10.1210/er.2011-1050>
- Vasiljevic, T., & Harner, T. (2021). Bisphenol A and its analogues in outdoor and indoor air: Properties, sources and global levels. *Science of The Total Environment*, 789, 148013. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148013>
- Velikova, T. v., Kabakchieva, P. P., Assyov, Y. S., & Georgiev, T. A. (2021). Targeting Inflammatory Cytokines to Improve Type 2 Diabetes Control. *BioMed Research International*, 2021, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2021/7297419>
- Villar-Pazos, S., Martinez-Pinna, J., Castellano-Muñoz, M., Alonso-Magdalena, P., Marroqui, L., Quesada, I., Gustafsson, J.-A., & Nadal, A. (2017). Molecular mechanisms involved in the non-monotonic effect of bisphenol-a on Ca²⁺ entry in mouse pancreatic β -cells. *Scientific Reports*, 7(1), 11770. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11995-3>
- Vivacqua, A., Lappano, R., de Marco, P., Sisci, D., Aquila, S., de Amicis, F., Fuqua, S. A. W., Andò, S., & Maggiolini, M. (2009). G Protein-Coupled Receptor 30 Expression Is Up-Regulated by EGF and TGF α in Estrogen Receptor α -Positive Cancer Cells. *Molecular Endocrinology*, 23(11), 1815–1826. <https://doi.org/10.1210/me.2009-0120>
- Vrtačnik, P., Ostanek, B., Mencej-Bedrač, S., & Marc, J. (2014). The many faces of estrogen signaling. *Biochimica Medica*, 24(3), 329–342. <https://doi.org/10.11613/BM.2014.035>

Wang, Z. Y., & Yin, L. (2015). Estrogen receptor alpha-36 (ER- α 36): A new player in human breast cancer. *Molecular and cellular endocrinology*, 418, 193-206. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.04.017>

Wei, W., Chen, Z.-J., Zhang, K.-S., Yang, X.-L., Wu, Y.-M., Chen, X.-H., Huang, H.-B., Liu, H.-L., Cai, S.-H., Du, J., & Wang, H.-S. (2014). The activation of G protein-coupled receptor 30 (GPR30) inhibits proliferation of estrogen receptor-negative breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cell Death & Disease*, 5(10), e1428–e1428. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.398>

Weißborn, C., Ignatov, T., Poehlmann, A., Wege, A. K., Costa, S. D., Zenclussen, A. C., & Ignatov, A. (2014). GPER functions as a tumor suppressor in MCF-7 and SK-BR-3 breast cancer cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 140(4), 663–671. <https://doi.org/10.1007/s00432-014-1598-2>

Wong, W. P. S., Tiano, J. P., Liu, S., Hewitt, S. C., le May, C., Dalle, S., Katzenellenbogen, J. A., Katzenellenbogen, B. S., Korach, K. S., & Mauvais-Jarvis, F. (2010). Extranuclear estrogen receptor- α stimulates NeuroD1 binding to the insulin promoter and favors insulin synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(29), 13057–13062. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914501107>

Xin, F., Jiang, L., Liu, X., Geng, C., Wang, W., Zhong, L., Yang, G., & Chen, M. (2014). Bisphenol A induces oxidative stress-associated DNA damage in INS-1 cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 769, 29–33. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.04.019>

Yaşar, P., Ayaz, G., User, S. D., Güpür, G., & Muyan, M. (2017). Molecular mechanism of estrogen-estrogen receptor signaling. *Reproductive Medicine and Biology*, 16(1), 4–20. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12006>

Zamora-León, P. (2021). Are the Effects of DES Over? A Tragic Lesson from the Past. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(19), 10309. <https://doi.org/10.3390/ijerph181910309>

Zheng, Y., Ley, S. H., & Hu, F. B. (2018). Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nature Reviews Endocrinology*, 14(2), 88–98. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.151>

Zhou, Z., Ribas, V., Rajbhandari, P., Drew, B. G., Moore, T. M., Fluitt, A. H., Reddish, B. R., Whitney, K. A., Georgia, S., Vergnes, L., Reue, K., Liesa, M., Shirihai, O., van der Blik, A. M., Chi, N.-W., Mahata, S. K., Tiano, J. P., Hewitt, S. C., Tontonoz, P., ... Hevener, A. L. (2018). Estrogen receptor α protects pancreatic β -cells from apoptosis by preserving mitochondrial function and suppressing endoplasmic reticulum stress. *Journal of Biological Chemistry*, 293(13), 4735–4751. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.805069>

Zoeller, R. T., Brown, T. R., Doan, L. L., Gore, A. C., Skakkebaek, N. E., Soto, A. M., Woodruff, T. J., & vom Saal, F. S. (2012). Endocrine-Disrupting Chemicals and Public Health Protection: A Statement of Principles from The Endocrine Society. *Endocrinology*, 153(9), 4097–4110. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1422>

ANEXO I



Contents lists available at ScienceDirect

Environment International

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

Full length article



G protein-coupled estrogen receptor activation by bisphenol-A disrupts the protection from apoptosis conferred by the estrogen receptors ER α and ER β in pancreatic beta cells

Ignacio Babiloni-Chust^{a,b,1}, Reinaldo S. dos Santos^{a,b,1}, Regla M. Medina-Gali^{a,b}, Atenea A. Perez-Serna^{a,b}, José-Antonio Encinar^a, Juan Martinez-Pinna^{c,a}, Jan-Ake Gustafsson^{d,e}, Laura Marroqui^{a,b}, Angel Nadal^{a,b,*}

^a Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDIIE), Universidad Miguel Hernández de Elche, Elche, Spain

^b Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Spain

^c Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología, Universidad de Alicante, Alicante, Spain

^d Department of Cell Biology and Biochemistry, Center for Nuclear Receptors and Cell Signaling, University of Houston, Houston, TX, USA

^e Department of Biosciences and Nutrition, Karolinska Institutet, Huddinge, Sweden

ARTICLE INFO

Handling Editor: Adrian Covaci

Keywords:

Apoptosis
Bisphenol-A
Endocrine disruptors
GPER/GPR30
Heterodimers
17 β -estradiol
Estrogen receptors

ABSTRACT

17 β -estradiol protects pancreatic β -cells from apoptosis via the estrogen receptors ER α , ER β and GPER. Conversely, the endocrine disruptor bisphenol-A (BPA), which exerts multiple effects in this cell type via the same estrogen receptors, increased basal apoptosis. The molecular-initiated events that trigger these opposite actions have yet to be identified. We demonstrated that combined genetic downregulation and pharmacological blockade of each estrogen receptor increased apoptosis to a different extent. The increase in apoptosis induced by BPA was diminished by the pharmacological blockade or the genetic silencing of GPER, and it was partially reproduced by the GPER agonist G1. BPA and G1-induced apoptosis were abolished upon pharmacological inhibition, silencing of ER α and ER β , or in dispersed islet cells from ER β knockout (BERKO) mice. However, the ER α and ER β agonists PPT and DPN, respectively, had no effect on beta cell viability. To exert their biological actions, ER α and ER β form homodimers and heterodimers. Molecular dynamics simulations together with proximity ligand assays and coimmunoprecipitation experiments indicated that the interaction of BPA with ER α and ER β as well as GPER activation by G1 decreased ER $\alpha\beta$ heterodimers. We propose that ER $\alpha\beta$ heterodimers play an antiapoptotic role in beta cells and that BPA- and G1-induced decreases in ER $\alpha\beta$ heterodimers lead to beta cell apoptosis. Unveiling how different estrogenic chemicals affect the crosstalk among estrogen receptors should help to identify diabetogenic endocrine disruptors.

1. Introduction

Loss of functional beta cell mass is a critical component contributing to the hyperglycemia observed in individuals with type 1 or type 2 diabetes. The interaction between the individual genetic background and environmental factors determines the progression of beta cell dysfunction and death (Eizirik et al., 2020).

Sex differences exist in the prevalence of diabetes. Premenopausal women have a lower incidence of diabetes than men (Gannon et al., 2018; Kautzky-Willer et al., 2016). These sex differences can be partially attributed to the action of 17 β -estradiol (E2) through three estrogen receptors (ERs), i.e., estrogen receptors α (ER α) and β (ER β) (Heldring et al., 2007) and the G protein-coupled estrogen receptor (GPER/GPR30) (Revankar et al., 2005; Thomas et al., 2005). After ligand

Abbreviations: BERKO, Estrogen receptor β knockout; BPA, Bisphenol-A; DCF, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate; E2, 17 β -estradiol; ER, Estrogen receptor; ER α , Estrogen receptor α ; ER β , Estrogen receptor β ; GPER, G protein-coupled estrogen receptor; LBD, Ligand binding domain; MPP, Methylpiperidinopyrazole; PHTPP, 4-(2-phenyl-5,7-bis(trifluoromethyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)phenol; PLA, Proximity ligand assay; ROS, Reactive oxygen species; siRNA, Small interfering RNA.

* Corresponding author at: Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDIIE), Universidad Miguel Hernández de Elche, 03202-Elche, Alicante, Spain.

E-mail address: nadal@umh.es (A. Nadal).

¹ Ignacio Babiloni-Chust and Reinaldo S. dos Santos contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107250>

Received 11 February 2022; Received in revised form 12 April 2022; Accepted 15 April 2022

Available online 19 April 2022

0160-4120/© 2022 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

binding, ER α and ER β can either form homo and heterodimers and act as transcription factors or tether other DNA-bound transcription factors (Heldring et al., 2007). In addition to their nuclear-initiated actions, ER α and ER β can trigger extranuclear-initiated effects after dimerization and activate a variety of signaling pathways (Levin and Hammes, 2016).

All three ERs protect beta cells from different apoptotic insults (Balhuizen et al., 2010; le May et al., 2006; Liu et al., 2009), yet the role of E2 can be disrupted by environmental chemicals that compete for the same receptors and modify the physiological pathways activated by the natural hormone (Gore et al., 2015). Bisphenol-A (BPA), which is used as a model of endocrine disrupting chemicals that alter insulin secretion and insulin sensitivity in mice (Alonso-Magdalena et al., 2010, 2006), has been implicated in the etiology of diabetes (Alonso-Magdalena et al., 2011; Sargis and Simmons, 2019). At concentrations similar to those found in human blood (Vandenberg et al., 2010), BPA increases pancreatic insulin content via ER α (Alonso-Magdalena et al., 2008) and regulates ion channel expression and function as well as augments insulin release in an ER β -mediated manner (Marroqui et al., 2021; Martinez-Pinna et al., 2019; Soriano et al., 2012). In INS-1 cells and mouse dispersed islet cells, BPA induces mitochondrial dysfunction, ROS production and NF- κ B activation, which culminates in beta cell apoptosis (Carchia et al., 2015; Lin et al., 2013).

Because E2 and BPA have opposite actions on beta cell survival, we decided to investigate the molecular initiating event (MIE) (Allen et al., 2014) underlying the pro-apoptotic effect of BPA. Using several beta cell models, including the EndoC- β H1 cell line, which is a model of human beta cells recommended for screening studies (Tsonkova et al., 2018), we show that ER α , ER β and GPER mediate beta cell survival. Our findings suggest that ER $\alpha\beta$ heterodimerization is key to this antiapoptotic role and that G1, a GPER agonist, and BPA induce apoptosis via a mechanism involving the reduction in ER $\alpha\beta$ heterodimers downstream of GPER.

2. Materials and methods

2.1. Chemical substances and animals

Bisphenol-A was purchased from MP Biomedicals (Cat no. 155118; Santa Ana, CA, USA). 17 β -Estradiol (E2, Cat no. E8875) was obtained from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Propylpyrazoletriol (PPT, Cat no. 1426), diarylpropionitrile (DPN, Cat no. 1494), G1 (Cat no. 3577), ICI 182,780 (Cat no. 1047), PHTPP (Cat no. 2662) and methylpiperidinopyrazole (MPP, Cat no. 1991) were obtained from Tocris Cookson (Bristol, UK).

Mice with knockout of the *Er β* gene (also known as *Esr2*) (BERKO mice), supplied by Jan-Åke Gustafsson's laboratory, were generated as previously described (Krege et al., 1998). Wild-type littermates and BERKO mice were obtained from the same supplier and colony and kept under standard housing conditions (12 h light/dark cycle, food *ad libitum*). Experimental procedures were performed according to the Spanish Royal Decree 1201/2005 and the European Community Council directive 2010/63/EU. The ethical committee of Miguel Hernandez University reviewed and approved the methods used herein (approval IDs: UMH-IB-AN-01-14 and UMH-IB-AN-02-14).

2.2. Culture of cell lines and dispersed islet cells

Rat insulin-producing INS-1E cells (RRID: CVCL_0351, kindly provided by Dr. C. Wollheim, Department of Cell Physiology and Metabolism, University of Geneva, Geneva, Switzerland) were cultured as previously described (Santin et al., 2016). Human insulin-producing EndoC- β H1 cells (RRID: CVCL_L909, Univercell-Biosolutions, France) were cultured in Matrigel/fibronectin-coated plates as previously described (Ravassard et al., 2011). INS-1E and EndoC- β H1 cells have been shown to be free of mycoplasma infection. Pancreatic islets were isolated using collagenase (Sigma, St Louis, MO, USA) as previously

described (Alonso-Magdalena et al., 2008). Islets were dispersed into single cells and cultured in polylysine-coated plates as previously described (Martinez-Pinna et al., 2019). Cell lines and dispersed cells were kept at 37 °C in a humidified atmosphere of 95% O₂ and 5% CO₂.

2.3. RNA interference

The optimal siRNA concentration (30 nM) and conditions for small interfering RNA (siRNA) transfection using Lipofectamine RNAiMAX lipid reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) were previously established (Santin et al., 2016). Allstars Negative Control siRNA (Qiagen, Venlo, the Netherlands) was used as a negative control (siCTRL). siRNA targeting *Era* (also known as *Esr1*; siER α), *Er β* (siER β) or *Gper1* (siGPER1) (Qiagen, Venlo, the Netherlands) were used herein (Supplementary Table 2). Of note, GPER silencing in INS-1E cells as well as ER α and ER β silencing in EndoC- β H1 cells were performed in a two-step transfection protocol (Marroqui et al., 2015). Briefly, cells were exposed to 30 nmol/l siCTRL or siGPER1/siGper1 for 16 h, washed and allowed to recover in culture for 24 h. Next, cells were exposed again to the same siRNAs for 16 h, allowed to recover in culture for 48 h, and then used for the subsequent experiments. Transfection with siRNAs was performed in BSA- and antibiotic-free medium.

2.4. Cell viability assessment by DNA-binding dyes

The percentage of apoptosis was determined after staining with the DNA-binding dyes Hoechst 33,342 and propidium iodide as previously described (Santin et al., 2016). To avoid bias, cell viability was assessed by two different observers, one of whom was unaware of the sample identity. The agreement of results between both observations was higher than 90%.

2.5. Flow cytometric analysis

Apoptotic cells were analyzed by flow cytometry using the FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with propidium iodide (BioLegend, San Diego, CA, USA) following the manufacturer's instructions. Briefly, INS-1E cells were detached and dissociated using Accutase (Thermo Fisher Scientific). The cell suspension was washed twice with PBS (200 g for 7 min) and subjected to Annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC)/PI staining according to the manufacturer's instructions (FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI; BioLegend, San Diego, CA, USA). Cells stained with Annexin V (both Annexin V⁺- and Annexin V⁺/PI⁺-cells) were detected using a FACSCanto II (BD Biosciences, Madrid, Spain) flow cytometer.

2.6. Caspase 3/7 activity

Caspase 3/7 activity was determined using the Caspase-Glo® 3/7 assay (Promega, Madison, WI, USA) following the manufacturer's instructions. Briefly, following treatment, cells were incubated with Caspase-Glo® 3/7 reagent at room temperature before luminescence was recorded with a POLASTAR plate reader (BMG Labtech, Germany).

2.7. MTT assay

Cell viability was measured by the colorimetric assay showing reduction of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich) as previously described (Denizot and Lang, 1986; Mosmann, 1983). Briefly, MTT prepared in RPMI 1640 without phenol red was added (final concentration: 0.5 mg/ml) and incubated at 37 °C for 3 h. Upon incubation, the supernatant was aspirated, and 100 ml of DMSO was added to dissolve formazan crystals. The absorbance was measured at 595 nm using an iMark™ Microplate absorbance reader (Bio-Rad, Hercules, CA), and the percentage of cell viability was calculated.

2.8. Real-time PCR

Quantitative RT-PCR was performed in a CFX96 Real-Time System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). RNA was extracted with the RNeasy Micro kit (Qiagen), and cDNA was prepared with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Amplification reactions were performed as previously described (Villar-Pazos et al., 2017). Values were analyzed with CFX Manager Version 1.6 (Bio-Rad) and expressed as the relative expression with respect to control values ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) (Schmittgen and Livak, 2008). *Gapdh* and β -actin were used as housekeeping genes for rat and human samples, respectively. The primers used herein are listed in Supplementary Table 2.

2.9. DCF assay

Oxidative stress was measured using the fluorescent probe 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF; Sigma-Aldrich) as previously described (Cunha et al., 2016). Briefly, cells seeded in 96-well black plates were loaded with 10 μ M DCF for 30 min at 37 °C and washed with PBS. DCF fluorescence was quantified in a POLASTAR plate reader (BMG Labtech, Germany). Data are expressed as DCF fluorescence corrected by total protein.

2.10. Western blotting

Cells were washed with cold PBS and lysed in Laemmli buffer. Immunoblot analysis was performed by overnight incubation with antibodies against ER α , ER β , GPER, β -actin, GAPDH and α -tubulin. Afterward, the membranes were incubated for 1 h at room temperature with peroxidase-conjugated antibodies (1:5000) as secondary antibodies. SuperSignal West Femto chemiluminescent substrate (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) and ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad Laboratories) were used to detect immunoreactive bands. Densitometry analysis was performed with Image Lab software (version 4.1, Bio-Rad Laboratories). The antibodies used herein are listed in Supplementary Table 3.

2.11. In situ proximity ligation assay (PLA)

In situ PLA was performed using a Duolink® In Situ Red Starter Kit (Sigma-Aldrich) following the manufacturer's instructions with slight modifications (INCLUDE Iwabuchi E, Miki Y, Ono K, et al., J Steroid Biochem Mol Biol 165:159–169, 2017)(Iwabuchi et al., 2017). Briefly, cells grown on coverslips were washed with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde (VWR Chemicals, Spain). Then, the cells were washed with PBS and permeabilized with 0.1% Triton-X-100. Subsequently, the cells were incubated for 30 min at 37 °C with a blocking solution and incubated overnight at 4 °C with the corresponding primary antibodies (Supplementary Table 3). PLA probe solution was added and incubated for 1 h at 37 °C. Ligation-Ligase solution was added, and coverslips were incubated for 30 min at 37 °C. Subsequently, amplification-polymerase solution was added and incubated for 100 min at 37 °C. Of note, all incubations at 37 °C were performed using a pre-heated humidity chamber. Finally, coverslips were washed with a specific buffer and mounted with a minimal volume of Duolink in situ mounting medium with DAPI®. ER dimers were observed using a Zeiss Confocal LSM900 microscope equipped with a camera (Zeiss-Vision, Munich, Germany), and images were acquired at x63 magnification and analyzed using ZEN software (version 3.2; Zeiss-Vision, Munich, Germany).

2.12. Coimmunoprecipitation

INS-1E cells were washed with cold PBS, lysed in cold immunoprecipitation buffer (50 mmol/l Tris, pH 7.5, 4 mmol/l NaCl, 2 mmol/l MgCl₂, 10 mmol/l NaF, 1 mmol/l PMSF, 1% Triton X-100 and Complete

Protease inhibitor mixture, Roche Diagnostics) for 30 min on ice and centrifuged at 20,000 \times g for 10 min at 4 °C. Cell lysates were precleared for 1 h at 4 °C with Dynabeads Protein G (Thermo Fischer Scientific; Cat no. 10003D). The same amounts of protein were incubated overnight at 4 °C, either with an anti-ER β antibody or nonspecific rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology) used as a negative control. Upon overnight incubation, immunoprecipitates were incubated for 1 h at 4 °C with Dynabeads Protein G, washed six times with cold immunoprecipitation buffer and resuspended in 5x Laemmli buffer. Immunoprecipitates and total protein (input) were subjected to SDS-PAGE and immunoblotted with mouse anti-ER α antibody. The antibodies used herein are listed in Supplementary Table 3.

2.13. Molecular docking and dynamics simulations

More than 300 human ER α -ligand-binding domain (LBD) (UniProt code: P03372) and 32 human ER β -LBD (UniProt code: Q92731) structures were resolved from cryptographic data. Because these structures contained unresolved residues in mobile regions of the protein that diffracted poorly, the lost amino acids were reconstructed after generation of a homology model at the Swiss-Model server (Biasini et al., 2014; Marroqui et al., 2021). After unresolved gap elimination, models for the hER α -LBD monomer (Protein Data Bank entry 5DXE as template) and the hER β -LBD monomer (Protein Data Bank entry 3OLS as template) were generated. From these monomeric structures, homo and heterodimers were reconstructed using the GRAMM-X server (Tovchigrechko and Vakser, 2006). E2 and BPA molecular docking simulations within the cavity of each LBD were performed using YASARA structure software (version 20.12.24) (Marroqui et al., 2021). Molecular dynamics simulations of the structures with the best docking calculations were performed with YASARA structure software (version 20.10.24) (Marroqui et al., 2021). The intermolecular protein interaction energy for homo and heterodimer subunits was calculated using Folds 5.0 software (Delgado et al., 2019).

2.14. Statistical analysis

Experimenters were not blinded to group assignment and outcome assessment. GraphPad Prism 7.0 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA; <https://www.graphpad.com>) was used for all statistical analyses. Data are expressed as the mean \pm SEM. To assess differences between groups, we used two-tailed Student's *t* test or ANOVA when appropriate. For nonparametric data, we used Mann-Whitney and Kruskal-Wallis ANOVA tests (followed by Dunn's test), depending on the experimental groups involved in the comparison. A *p* value \leq 0.05 was considered to be statistically significant.

3. Results

In INS-1E (Fig. 1a) and EndoC- β H1 cells (Fig. 1b), E2 (10 pM/l to 1 μ M) either had no effect or decreased apoptosis. Conversely, BPA increased apoptosis in both cell lines in a dose-dependent manner (Fig. 1c, d). Similar results were observed in dispersed islet cells from female mice (Fig. 1e). These results were confirmed by three other approaches, i.e., flow cytometry analysis (Fig. 1f), caspase 3/7 activity (Fig. 1g) and MTT assay (Supplementary Fig. 1). When E2 and BPA were added together, 1 nM E2 prevented BPA-induced apoptosis (Fig. 1h), suggesting that E2 and BPA initiate common pathways.

Previous work demonstrated that BPA induced oxidative stress in beta cells (Carchia et al., 2015; Lin et al., 2013). Similarly, we observed that BPA upregulated genes encoding the antioxidant enzymes superoxide dismutase (*Sod2*), glutathione peroxidase 4 (*Gpx4*) and catalase (*Cat*) (Supplementary Fig. 2a-c) and increased reactive oxygen species (ROS) generation (Supplementary Fig. 2d, e). The antioxidant N-acetylcysteine abolished BPA-induced ROS production in INS-1E (Supplementary Fig. 2d) and EndoC- β H1 cells (Supplementary Fig. 2e). Of note,

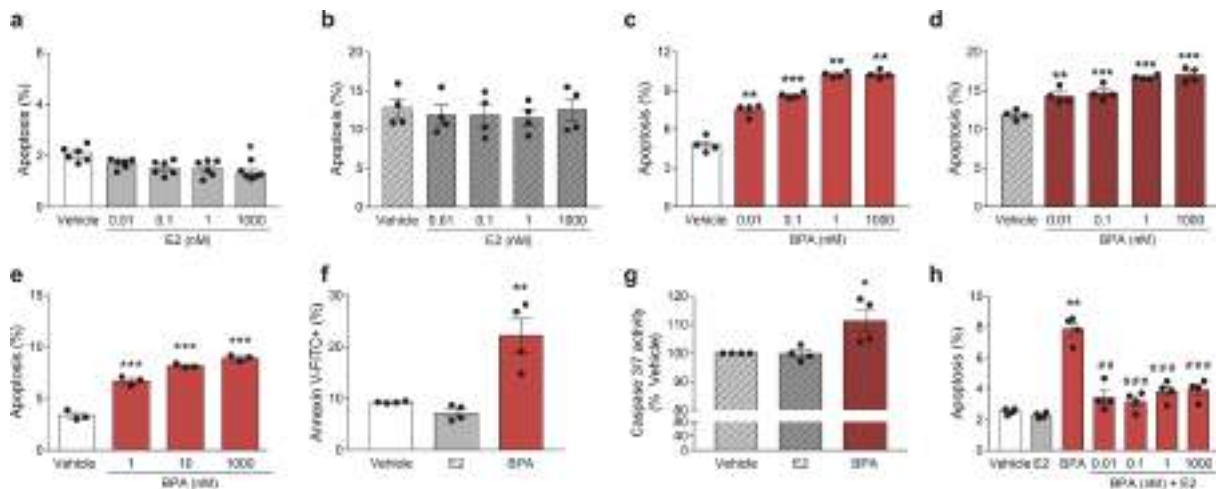


Fig. 1. E2 and BPA have different effects on beta cell viability. INS-1E (a,c) and EndoC-βH1 cells (b,d) were treated with vehicle (white bars), E2 (grey bars) or BPA (red bars) for 24 h. (e) Dispersed islet cells from female mice were treated with vehicle (white bars) or BPA (red bars) for 48 h. Apoptosis was evaluated using Hoechst 33,342 and propidium iodide staining. (f) INS-1E cells were treated with vehicle (white bar), E2 1 nM (grey bar) or BPA 1 nM (red bar) for 48 h. Annexin V-FITC-positive cells were analyzed by flow cytometry. (g) EndoC-βH1 cells were treated with vehicle (white bar), E2 1 nM (grey bar) or BPA 1 nM (red bar) for 48 h. Caspase 3/7 activity was measured by a luminescent assay. Results are expressed as % vehicle-treated cells. (h) INS-1E were treated with vehicle (white bar), E2 1 nM (grey bar), BPA 1 nM (red bar) or a combination of both (red bars + E2) for 24 h. Apoptosis was evaluated using Hoechst 33,342 and propidium iodide staining. Data are shown as means \pm SEM of 3–6 independent experiments. (a–i) * p \leq 0.05, ** p \leq 0.01 and *** p \leq 0.001 vs Vehicle, by one-way ANOVA. (h) ** p \leq 0.01 vs Vehicle; ## p \leq 0.01 and ### p \leq 0.001 vs BPA 1 nM. One-way ANOVA.

N-acetylcysteine prevented BPA-induced apoptosis in both cell lines (Supplementary Fig. 2f, g), reinforcing that oxidative stress is involved in BPA-induced apoptosis. Of note, E2 did not change the ROS levels (data not shown). These results indicate that ROS production is a key event involved in BPA-induced beta cell apoptosis.

Because previous results indicate that BPA acts via ERs in beta cells (Alonso-Magdalena et al., 2008; Martinez-Pinna et al., 2019; Soriano et al., 2012), we evaluated the expression of ER α , ER β and GPER in INS-1E and EndoC-βH1 cells by quantitative RT-PCR and western blot. Considering ER α expression as 1, mRNA analyses showed that the ratio GPER:ER α :ER β was 100:1:0.3 for INS-1E cells (Supplementary Fig. 3a) and 675:1:3.3 for EndoC-βH1 cells (Supplementary Fig. 3b). This expression pattern was confirmed at the protein level, where GPER was the most highly expressed of the three receptors (Supplementary Fig. 3c).

3.1. GPER mediates BPA-induced apoptosis

We first assessed whether GPER participated in BPA-induced apoptosis. The GPER antagonist G15 reduced BPA-triggered apoptosis in INS-1E and EndoC-βH1 cells (Fig. 2a, b). Doses as low as 100 pM of the GPER agonist G1 induced apoptosis in INS-1E cells (Supplementary Fig. 4a). In comparison with 1 nM BPA, 100 nM G1 presented a significantly smaller effect on apoptosis in both cell lines (Fig. 2c, d). To further study the role of GPER in beta cell survival, we used siRNAs to inhibit GPER expression in INS-1E and EndoC-βH1 cells (Fig. 2e–j, Supplementary Fig. 4b, c). GPER silencing promoted apoptosis under basal conditions in INS-1E cells but not in EndoC-βH1 cells (Fig. 2f, i). Moreover, GPER-inhibited cells were less susceptible to BPA-induced apoptosis than control cells (Fig. 2f, g, i, j). Similar data were obtained with a second, independent siRNA (data not shown). These results indicate that GPER activation is part of the mechanism whereby BPA elicits apoptosis.

3.2. ER α and ER β are involved in BPA-induced apoptosis

We then investigated whether ER α and ER β were also implicated in BPA-induced apoptosis. In both cell lines, the pure antiestrogen ICI

182,780 abolished the BPA effect on apoptosis (Fig. 3a, b). Treatment with the ER α antagonist methylpiperidinopyrazole (MPP) induced apoptosis under basal conditions, while propylpyrazoletriol (PPT), an ER α agonist, did not change viability (Fig. 3c, Supplementary Fig. 5a, b). In INS-1E cells, MPP abolished BPA-induced apoptosis (Fig. 3c). To further characterize ER α participation in cell survival and BPA-induced apoptosis, we silenced ER α expression in INS-1E and EndoC-βH1 cells using specific siRNAs (Fig. 3d, g, Supplementary Fig. 5c–e). ER α knockdown augmented apoptosis under basal conditions and prevented BPA-induced apoptosis in both cell lines (Fig. 3e, f, h, i). We confirmed these data with a second, independent siRNA (data not shown).

Regarding ER β , while its antagonist 4-(2-phenyl-5,7-bis(trifluoromethyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)phenol (PHTPP) also induced apoptosis under basal conditions, the ER β agonist diarylpropionitrile (DPN) had no effect on beta cell viability (Fig. 4a, Supplementary Fig. 6a, b). ER β inhibition by siRNAs (Fig. 4c, f, Supplementary Fig. 6c–h) induced a substantial increase in apoptosis, mainly in INS-1E cells; importantly, BPA-elicited apoptosis was partially lost following ER β silencing (Fig. 4d, e, g, h). Comparable results were observed with a second, independent siRNA (data not shown). Finally, the effects of BPA on viability were abrogated in dispersed islet cells from BERKO mice (Fig. 4b).

3.3. Crosstalk among ER α , ER β and GPER mediates beta cell survival

Because our data indicate that GPER signaling triggers beta cell apoptosis via downstream activation of ER α and ER β , we sought to examine this hypothesis. First, we observed that G1-induced apoptosis was abolished by the antiestrogen ICI 182,780 (Fig. 5a, b). Because G1 may also bind to and activate a 36-kDa variant of ER α , ER α 36 (Kang et al., 2010), we silenced GPER (Fig. 5c, Supplementary Fig. 7a) to test whether G1 affected apoptosis via GPER. Of note, G1 did not affect apoptosis in GPER-silenced cells (Fig. 5d, Supplementary Fig. 7b), indicating that, in our cell system, G1 acts preferentially through GPER. Moreover, MPP (ER α antagonist) and PHTPP (ER β antagonist) prevented G1-induced apoptosis (Fig. 5e–h). Then, we tested the G1 effects on apoptosis upon silencing ER α or ER β separately (siER α and siER β) or

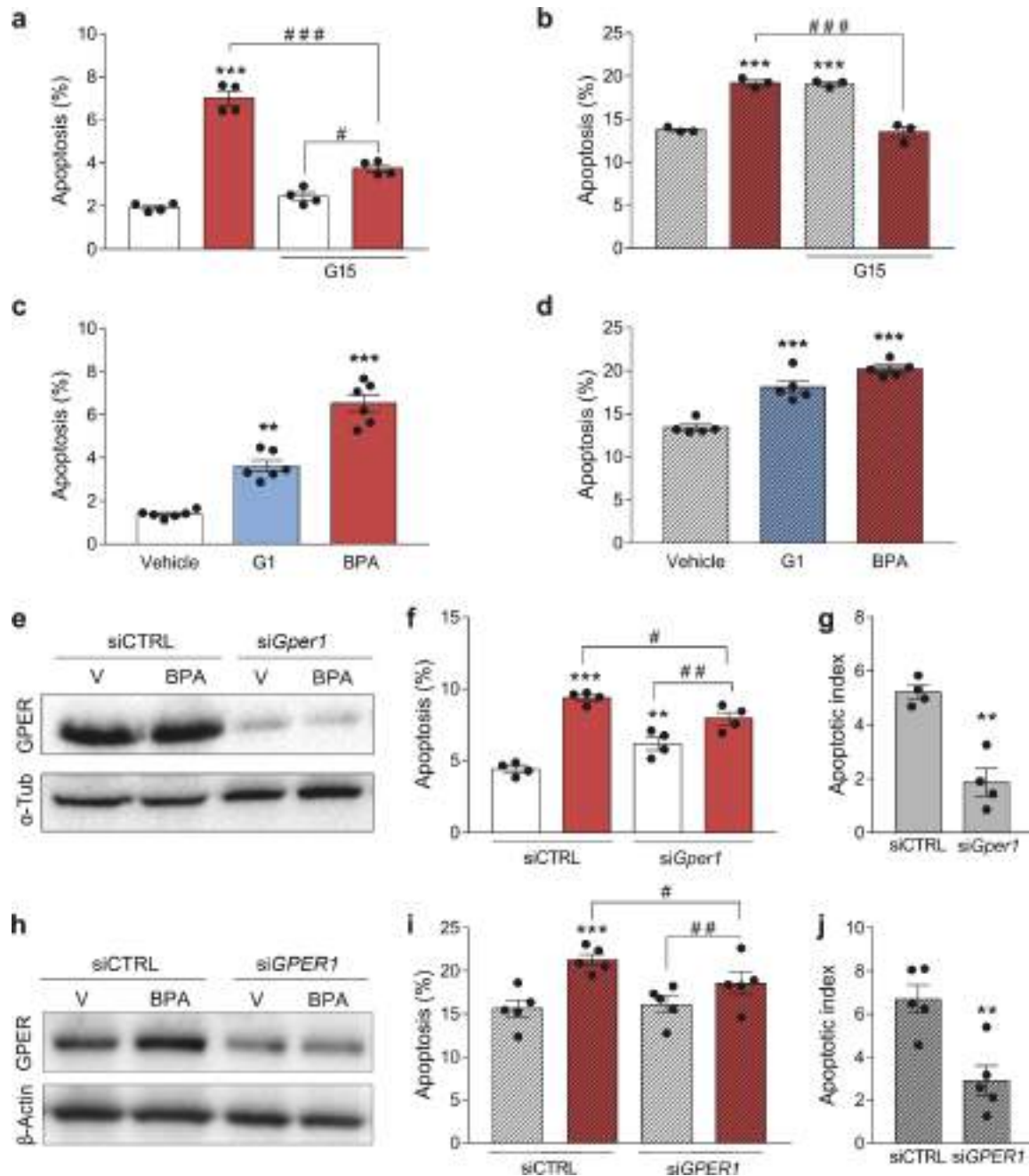


Fig. 2. BPA-induced apoptosis requires GPER. (a,b) INS-1E (a) and Endo-βH1 cells (b) were pre-treated with vehicle or GPER antagonist G15 10 nM for 3 h. Afterwards, cells were treated with vehicle (white bars) or BPA 1 nM (red bars) in the absence or presence of G15 10 nM for 24 h. (c,d) INS-1E (c) and Endo-βH1 cells (d) were treated with vehicle (white bars), G1 100 nM (blue bars) or BPA 1 nM (red bars) for 24 h. Apoptosis was evaluated using Hoechst 33,342 and propidium iodide staining. (e-j) INS-1E (e-g) and Endo-βH1 cells (h-j) were transfected with siCTRL or with a siRNA targeting GPER (siGper1 or siGPER1). Cells were treated with vehicle (white bars) or BPA 1 nM (red bars) for 24 h. (e,h) Protein expression was measured by western blot. Representative images of four (e) or five (h) independent experiments are shown. (f,i) Apoptosis was evaluated using Hoechst 33,342 and propidium iodide staining. (g,j) BPA-induced apoptosis data from Fig. 5f (g) and Fig. 5i (j) are presented as apoptotic index. Data are shown as means ± SEM of 4–6 independent experiments. (a,b) $**p \leq 0.01$ and $***p \leq 0.001$ vs untreated vehicle; $##p \leq 0.01$, $###p \leq 0.001$ as indicated by bars. Two-way ANOVA. (c,d) $**p \leq 0.01$ and $***p \leq 0.001$ vs vehicle, by one-way ANOVA. (f,i) $**p \leq 0.01$ and $***p \leq 0.001$ vs siCTRL vehicle; $#p \leq 0.05$ and $##p \leq 0.01$ as indicated by bars. Two-way ANOVA. (g,j) $**p \leq 0.01$ vs siCTRL, by two-tailed Student's *t* test.

simultaneously (siErα/Erβ) (Fig. 5i, Supplementary Fig. 7c-e). As previously described above, ERα or ERβ knockdown induced beta cell death, and silencing of both receptors simultaneously induced apoptosis to the same extent observed in ERβ-inhibited cells (Fig. 5i,

Supplementary Fig. 7f). The G1 effect on apoptosis was lost in ERα-, ERβ- or ERα/ERβ-deficient cells (Fig. 5i, Supplementary Fig. 7f). In addition, G1 induced apoptosis in dispersed islet cells from WT mice, but its effect on apoptosis was completely blunted in dispersed cells from BERKO

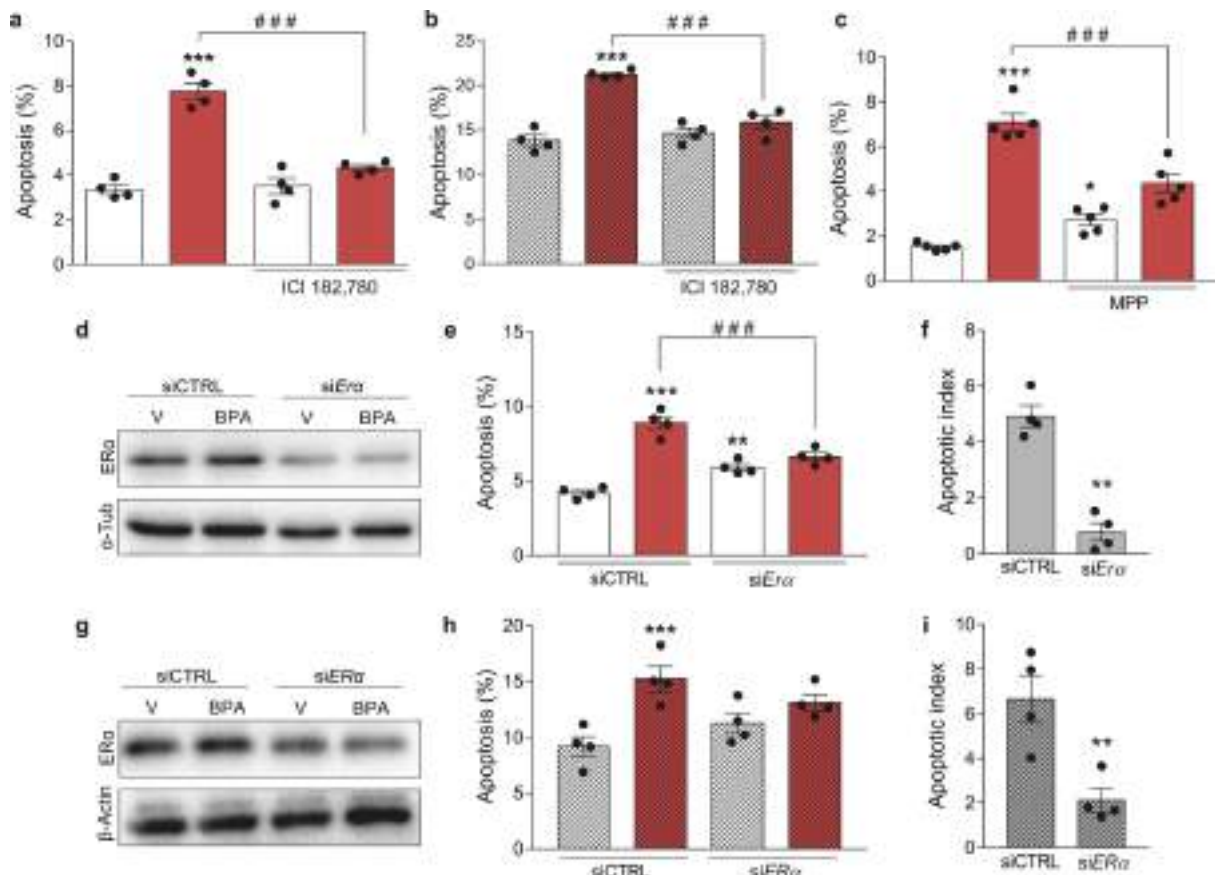


Fig. 3. ER α mediates BPA-induced apoptosis. (a,b) INS-1E (a) and EndoC- β H1 cells (b) were pre-treated with vehicle or antiestrogen ICI 182,780 1 μ M for 3 h. Afterwards, cells were treated with vehicle (white bars) or BPA 1 nM (red bars) in the absence or presence of ICI 182,780 1 μ M for 24 h. (c) INS-1E cells were pre-treated with vehicle or ER α antagonist MPP 100 nM for 3 h. Afterwards, cells were treated with vehicle (white bars) or BPA 1 nM (red bars) in the absence or presence of MPP 100 nM for 24 h. Apoptosis was evaluated using Hoechst 33,342 and propidium iodide staining. (d-f) INS-1E (d-f) and EndoC- β H1 cells (g-i) were transfected with siCTRL or with a siRNA targeting ER α (siER α or siER α). Cells were treated with vehicle (white bars) or BPA 1 nM (red bars) for 24 h. (d,g) Protein expression was measured by western blot. Representative images of four independent experiments are shown. (e,h) Apoptosis was evaluated using Hoechst 33,342 and propidium iodide staining. (g,j) BPA-induced apoptosis data from Fig. 5e (f) and Fig. 5h (i) are presented as apoptotic index. Data are shown as means \pm SEM of 4–5 independent experiments. (a–c) * p \leq 0.05 and *** p \leq 0.001 vs untreated vehicle; ### p \leq 0.001 as indicated by bars. Two-way ANOVA. (e,h) ** p \leq 0.01 and *** p \leq 0.001 vs siCTRL vehicle; ### p \leq 0.001 as indicated by bars. Two-way ANOVA. (f,i) ** p \leq 0.01 vs siCTRL, by two-tailed Student's t test.

mice (Fig. 5j). These results indicate that ER β seems to be more important than ER α for beta cell survival and that ER α and ER β are required for GPER effects on viability.

3.4. ER heterodimerization

After ligand binding, ER α and ER β form homodimers and heterodimers to exert their biological actions (Levin and Hammes, 2016; Razandi et al., 2004). Because our data suggest that part of the BPA effect on apoptosis is directly mediated by ER α and ER β , we sought to study whether the binding of E2 or BPA would stabilize ER homo and/or heterodimers. We performed docking and molecular dynamics simulations using human structural models of ER α and ER β . Our models were obtained from resolved dimeric structures of the ER LBD where the protein is cocrystallized with ligands E2 and BPA bound to the LBD cavity that is closed by the transactivation helix H12 (Fig. 6a–c). Fig. 6 depicts models of the ER α -ER α homodimer (ER $\alpha\alpha$; Fig. 6a), ER β -ER β homodimer (ER $\beta\beta$; Fig. 6b) and ER α -ER β heterodimer (ER $\alpha\beta$; Fig. 6c).

Molecular docking simulations resulted in lower Gibbs free energy changes for E2 (–11.05 and –10.86 kcal/mol for hER α -LBD and hER β -LBD, respectively) compared with BPA (–8.15 and –8.37 kcal/mol for

hER α -LBD and hER β -LBD, respectively). These values are similar to those observed for rat ERs (Marroqui et al., 2021) and agree with the higher affinity of both receptors for E2 (compared with BPA) (Kuiper et al., 1997). We used these protein–ligand complexes as the starting point to initiate molecular dynamics simulations of the ligands within the cavity for 200 ns. Then, we analyzed the monomer–monomer interaction energy (Fig. 6d–f), the trajectory of the ligands within the LBD pocket (Supplementary Fig. 8) and the solvation binding energy of E2 and BPA bound to the LBD cavity (Fig. 6g–i).

When we examined the monomer–monomer interaction energy with E2 or BPA bound to both cavities of the LBD, we found that for ER $\alpha\alpha$ homodimers, the frequency distribution of the intermolecular interaction energy between monomers was lower for E2 than for BPA (Fig. 6d). This indicates that E2 stabilizes the ER $\alpha\alpha$ homodimer more than BPA. For ER $\beta\beta$ homodimers, E2 and BPA presented a similar interaction energy, suggesting comparable ER $\beta\beta$ stabilization with both ligands (Fig. 6e). When the interaction energy for ER $\alpha\beta$ heterodimers was analyzed, E2 presented a much lower interaction energy than BPA, indicating that BPA does not stabilize heterodimers (Fig. 6f). The trajectory of E2 and BPA within the cavity behaves differently; E2 showed minimal deviations during the 200 ns simulation time for both

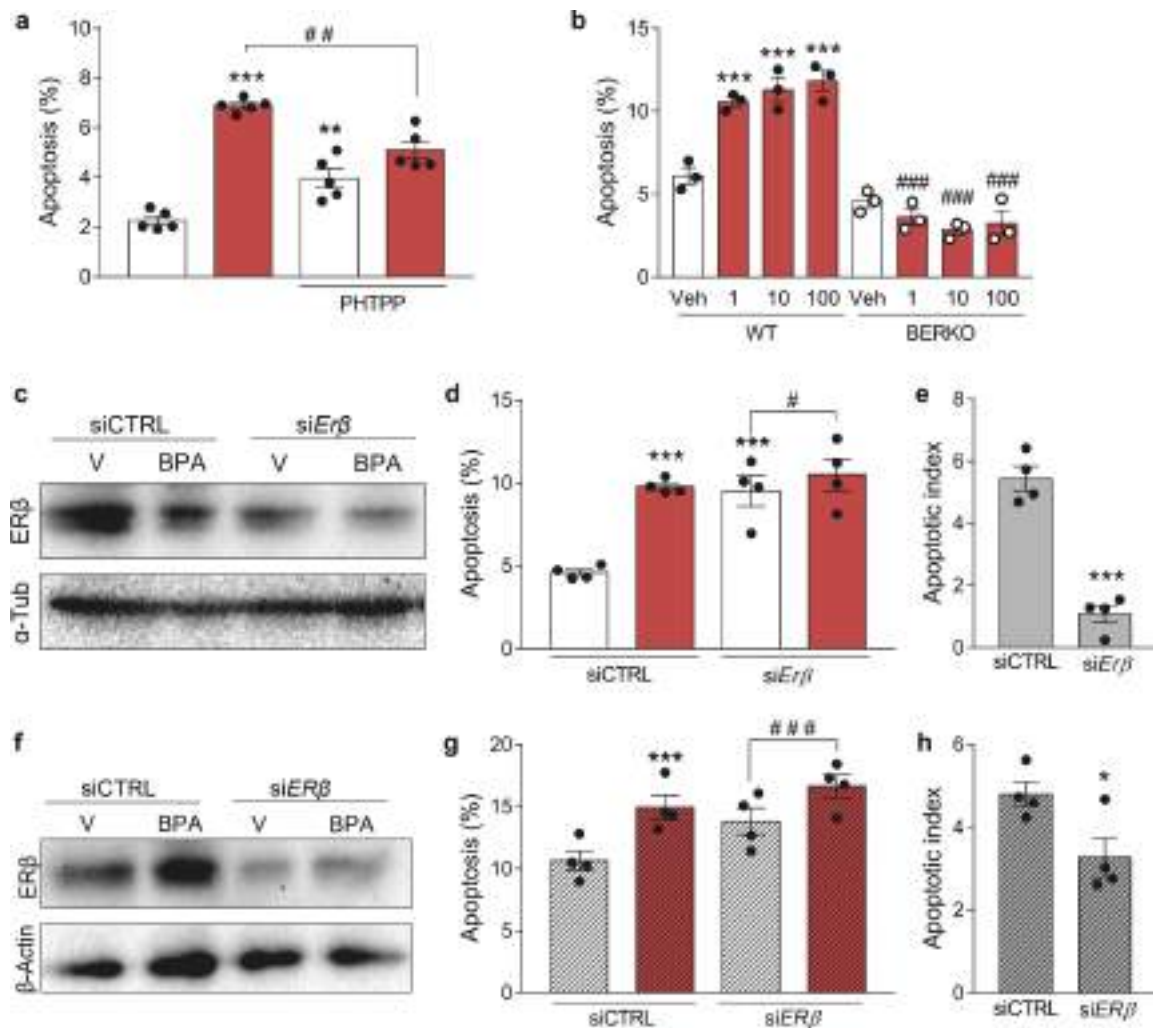


Fig. 4. ER β mediates BPA-induced apoptosis. (a) INS-1E cells were pre-treated with vehicle or ER β antagonist PHTPP 1 μ M for 3 h. Afterwards, cells were treated with vehicle (white bars) or BPA 1 nM (red bars) in the absence or presence of PHTPP 1 μ M for 24 h. (b) Dispersed islet cells from WT and BERKO mice were treated with vehicle (white bars) or BPA (red bars) for 48 h. Apoptosis was evaluated using Hoechst 33,342 and propidium iodide staining. (c-h) INS-1E (c-e) and EndoC- β H1 cells (f-h) were transfected with siCTRL or with a siRNA targeting ER β (siER β or siER β). Cells were treated with vehicle (white bars) or BPA 1 nM (red bars) for 24 h. (c,f) Protein expression was measured by western blot. Representative images of four independent experiments are shown. (d,g) Apoptosis was evaluated using Hoechst 33,342 and propidium iodide staining. (e,h) BPA-induced apoptosis data from Fig. 5d (e) and Fig. 5g (h) are presented as apoptotic index. Data are shown as means \pm SEM of 3–5 independent experiments. (a) $^{**}p \leq 0.01$ and $^{***}p \leq 0.001$ vs untreated vehicle; $^{##}p \leq 0.01$ as indicated by bars. Two-way ANOVA. (b) $^{***}p \leq 0.001$ vs WT vehicle; $^{###}p \leq 0.001$ vs respective WT. Two-way ANOVA. (d,g) $^{***}p \leq 0.001$ vs siCTRL vehicle; $^{#}p \leq 0.05$ and $^{###}p \leq 0.001$ as indicated by bars. Two-way ANOVA. (e,h) $^{*}p \leq 0.05$ and $^{***}p \leq 0.001$ vs siCTRL, by two-tailed Student's *t* test.

homodimers and for the heterodimer (Supplementary Fig. 8), suggesting a high stability of the hormone within the LBD pocket in the homo and heterodimers. Conversely, BPA shows rapid structural rearrangements for both homodimers and heterodimers (Supplementary Fig. 8), a behavior previously shown for monomers (Li et al., 2018; Marroqui et al., 2021). This suggests a less stable binding of BPA compared to E2 for the three configurations of dimers.

To investigate the binding affinity of both ligands in homo and heterodimers, we analyzed the frequency distribution of the solvation binding energy values of E2 and BPA bound to each type of dimer (Wang et al., 2016) (Fig. 6g-i). Of note, positive values indicate strong ligand-protein binding (Marroqui et al., 2021). E2 binding to both homodimer cavities, LBD-ER $\alpha\alpha$ (Fig. 6g) and LBD-ER $\beta\beta$ (Fig. 6h), shows very similar values. In the heterodimer, however, the solvation energy values were higher for E2 binding to the ER α monomer forming the

heterodimer (75 kcal/mol) than for E2 binding to the ER β monomer of the heterodimer (63 kcal/mol) (Fig. 6i). For BPA, the solvation binding energy values for homodimers were 30–35 kcal/mol for LBD-ER $\alpha\alpha$ (Fig. 6g) and 55–60 kcal/mol for LBD-ER $\beta\beta$ (Fig. 6i), which indicates that BPA showed higher affinity for ER $\beta\beta$ than for ER $\alpha\alpha$. When we analyzed LBD-ER $\alpha\beta$, the frequency distribution of the solvation energy deviated from a Gaussian distribution, especially for BPA bound to the beta subunit of the heterodimer (Fig. 6i). This suggests a much lower BPA affinity for LBD-ER $\alpha\beta$ compared with LBD-ER $\beta\beta$. In summary, these simulations indicate that BPA affinity is higher for ER $\beta\beta$ than for ER $\alpha\alpha$ and ER $\alpha\beta$. Binding of E2 should stabilize the three forms, preferentially ER $\alpha\alpha$, while BPA would mainly stabilize ER $\beta\beta$ and, to a much lesser extent, ER $\alpha\alpha$ and would not stabilize ER $\alpha\beta$.

To further explore how E2, BPA and G1 affect heterodimer formation, we performed an in situ proximity ligand assay (PLA) and

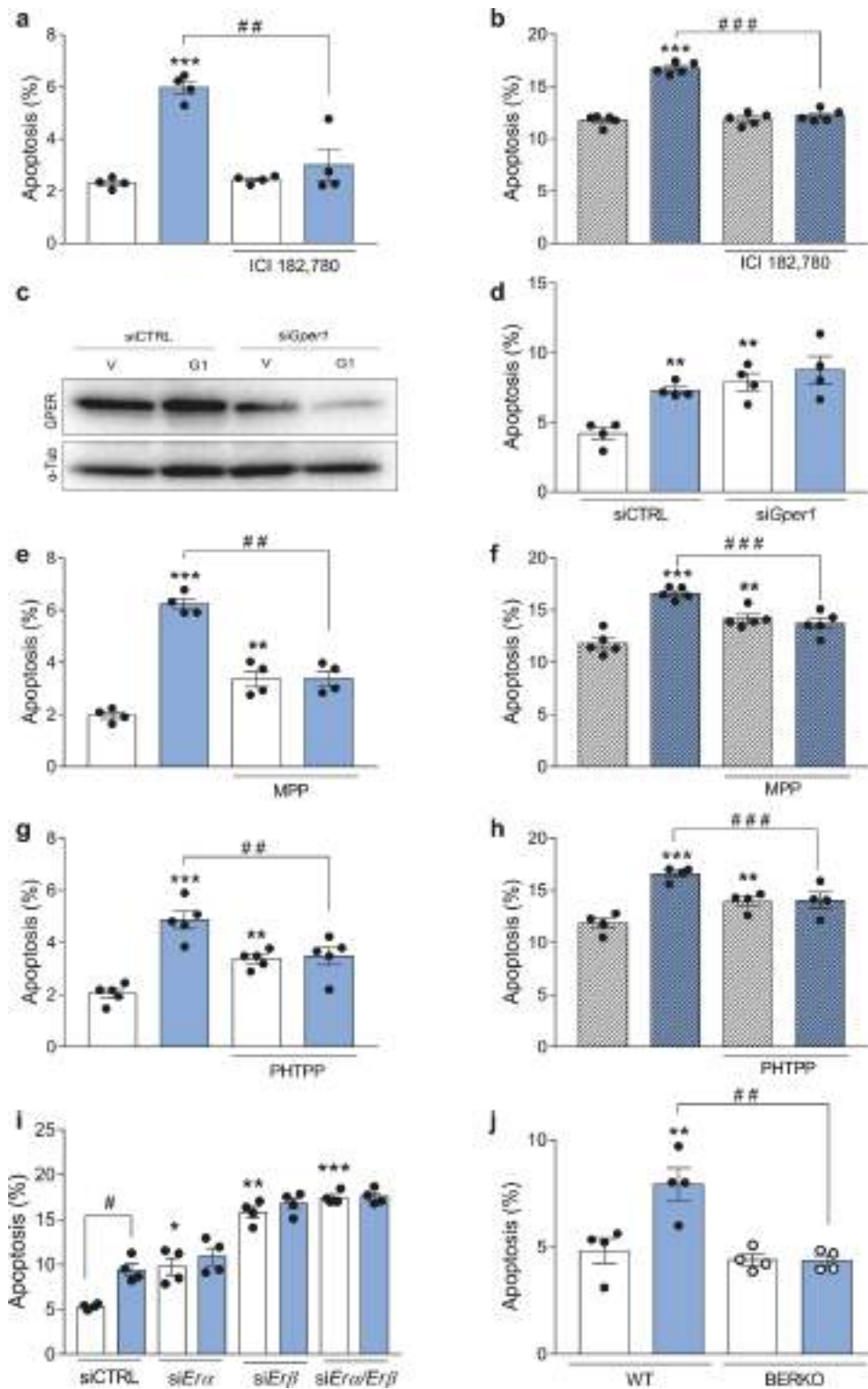


Fig. 5. A GPER crosstalk with ER α and ER β induces apoptosis. (a,b) INS-1E (a) and Endo- β H1 cells (b) were pre-treated with vehicle or antiestrogen ICI 182,780 1 μ M for 3 h. Afterwards, cells were treated with vehicle (white bars) or G1 100 nM (blue bars) in the absence or presence of ICI 182,780 1 μ M for 24 h. Apoptosis was evaluated using Hoechst 33,342 and propidium iodide staining. (c,d) INS-1E were transfected with siCTRL or with a siRNA targeting GPER (siGper1). Cells were treated with vehicle (white bars) or G1 100 nM (blue bars) for 24 h. (c) Protein expression was measured by western blot. Representative images of four independent experiments are shown. (d) Apoptosis was evaluated using Hoechst 33,342 and propidium iodide staining. (e-h) INS-1E (e,g) and Endo- β H1 cells (f,h) were pre-treated with vehicle, ER α antagonist MPP 100 nM (e,f) or ER β antagonist PHTPP 1 μ M (g,h) for 3 h. Afterwards, cells were treated with vehicle (white bars) or G1 100 nM (blue bars) in the absence or presence of MPP 100 nM (e,f) or PHTPP 1 μ M (g,h) for 24 h. Apoptosis was evaluated using Hoechst 33,342 and propidium iodide staining. (g,h) INS-1E cells were transfected with siCTRL or siRNAs targeting ER α (siEr α) and ER β (siEr β) or ER α and ER β simultaneously (siEr α /Er β). Cells were treated with vehicle (white bars) or G1 100 nM (blue bars) for 24 h. Apoptosis was evaluated using Hoechst 33,342 and propidium iodide staining. (e) Dispersed islet cells from WT and BERKO mice were treated with vehicle (white bars) or G1 100 nM (blue bars) for 48 h. Apoptosis was evaluated using Hoechst 33,342 and propidium iodide staining. Data are shown as means \pm SEM of 4–5 independent experiments. (a,b,e-h) ** p \leq 0.01 and *** p \leq 0.001 vs untreated vehicle; ### p \leq 0.001 as indicated by bars. Two-way ANOVA. (d,i) * p \leq 0.05, ** p \leq 0.01 and *** p \leq 0.001 vs siCTRL vehicle; # p \leq 0.001 as indicated by bars. Two-way ANOVA. (j) ** p \leq 0.01 vs WT vehicle; ## p \leq 0.01 as indicated by bars. Two-way ANOVA.

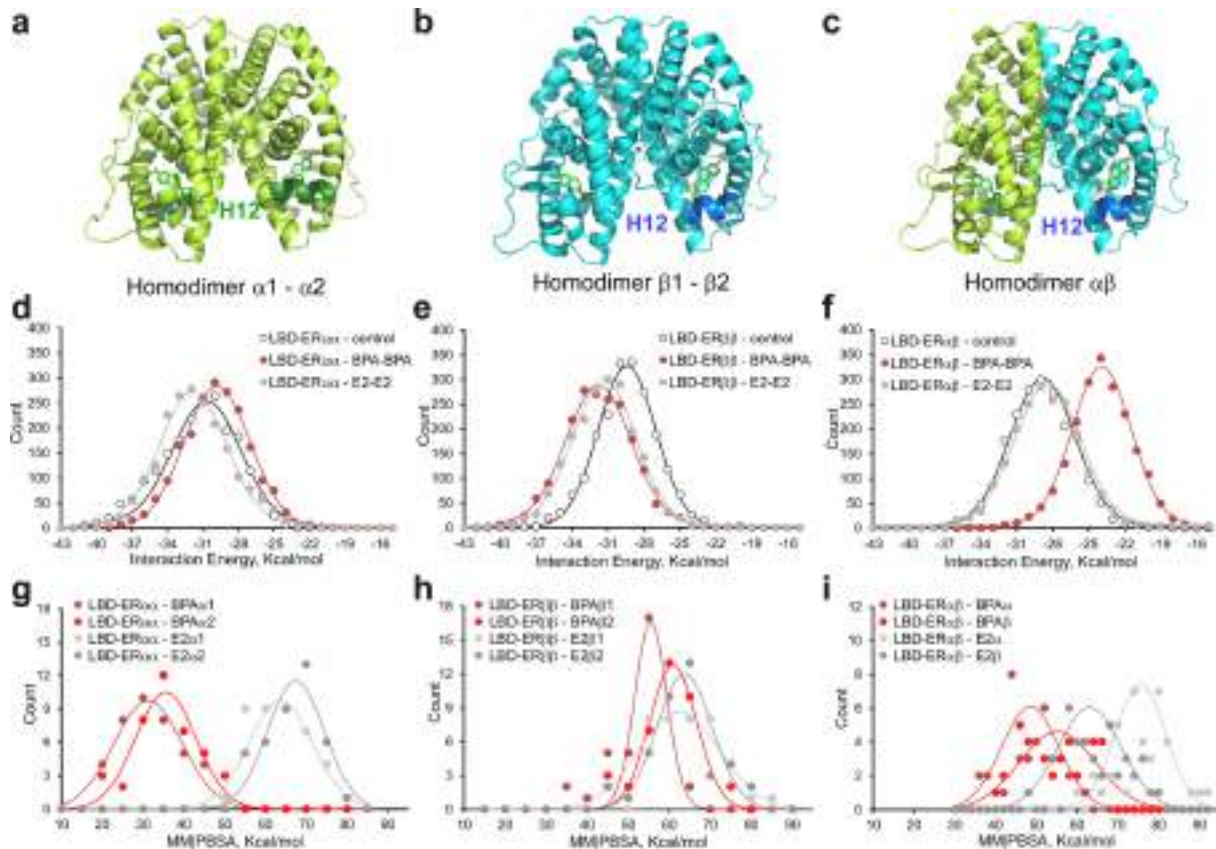


Fig. 6. Effect of BPA and E2 on the molecular dynamics for the LBD of the homodimer- or heterodimer-ER. Secondary structure models of closed LBD-ER as (a) alpha homodimer, (b) beta homodimer and (c) alpha-beta heterodimer. The H12 helix has been colored dark green (alpha monomers) or dark blue (beta monomers). The structure of E2 (green sticks for carbons) is included within the LBD cavities of both subunits. (d) Frequency distributions of the intermolecular protein Foldx-calculated interaction energy for the subunits of the alpha homodimer, (e) beta homodimer and (f) alpha-beta heterodimer in the presence of BPA or E2 ligands in each H12 closed LBD cavity. (g) Frequency distributions of the molecular mechanics Poisson-Boltzmann surface area (MM/PBSA) solvation binding energy values of each ligand bound to cavity of the alpha homodimer, (h) beta homodimer or (i) alpha-beta heterodimer in the presence of BPA or E2 ligands inside of the closed LBD. YASARA software-calculated MM/PBSA values more positive energies indicate better binding of the compound bound to the protein. A Gaussian curve overlaps discrete data.

coimmunoprecipitation. The PLA analysis showed a small number of heterodimers (shown as red dots) in vehicle-treated cells, which greatly increased upon E2 exposure for 24 h (Fig. 7a, Veh and E2 panels). In the presence of BPA or G1, however, very few red dots were observed, suggesting that these compounds decreased heterodimer formation (Fig. 7a, BPA and G1 panels). Coimmunoprecipitation assays indicated that ER α directly bound to ER β (Fig. 7b-e). In agreement with the PLA data, the interaction between ER α and ER β was augmented by E2 and significantly reduced by BPA (Fig. 7b, c) and G1 (Fig. 7d, e). Altogether, these results suggest that E2 promotes ER $\alpha\beta$ heterodimerization, while BPA and G1 disrupt ER $\alpha\beta$ formation.

4. Discussion

BPA is an endocrine disruptor with diabetogenic properties (Alonso-Magdalena et al., 2011; Sargis and Simmons, 2019). In adult mice, BPA increases serum insulin levels and induces insulin resistance (Alonso-Magdalena et al., 2006). In adult humans, BPA rapidly changed plasma insulin levels (Stahlhut et al., 2018), and epidemiological studies have linked BPA exposure to type 2 diabetes development (Ranciè et al., 2019; Wang et al., 2019). When administered to pregnant mice, BPA altered insulin release, beta cell mass, and the metabolome in male offspring (Alonso-Magdalena et al., 2010; Bansal et al., 2017; Cabaton

et al., 2013) as well as altered glucose homeostasis in mothers later in life (Alonso-Magdalena et al., 2015, 2010). In vivo results demonstrating an increase in BPA-induced apoptosis are scarce. BPA exposure during pregnancy decreased beta cell mass and increased apoptosis six months after delivery (Alonso-Magdalena et al., 2015). Increased apoptosis and decreased beta cell mass were also described in first- and second-generation male offspring born to mothers treated with BPA during pregnancy (Bansal et al., 2017). In adult male mice treated with streptozotocin, BPA exacerbated endoplasmic reticulum stress in a mechanism involving altered Ca²⁺ signaling but did not induce apoptosis (Ahn et al., 2018). Here, we show that environmentally relevant doses of BPA increase beta cell apoptosis in an ER α -, ER β -, and GPER-dependent manner. Furthermore, molecular dynamics simulations together with PLA and coimmunoprecipitation data indicate that BPA binding to ER α and ER β , as well as GPER activation, decreased ER $\alpha\beta$ heterodimers. Of note, the assessment of the in vivo effects of BPA on apoptosis in an animal model that may be linked to the findings described in this work is still missing and warrants further investigation.

It has been shown that E2 protects beta cells from several proapoptotic stimuli, such as oxidative stress (le May et al., 2006), proinflammatory cytokines (Contreras et al., 2002) and high glucose (Kooptiwut et al., 2018). These studies suggest that ER α is crucial for pancreatic islet survival. For example, E2 prevented streptozotocin-

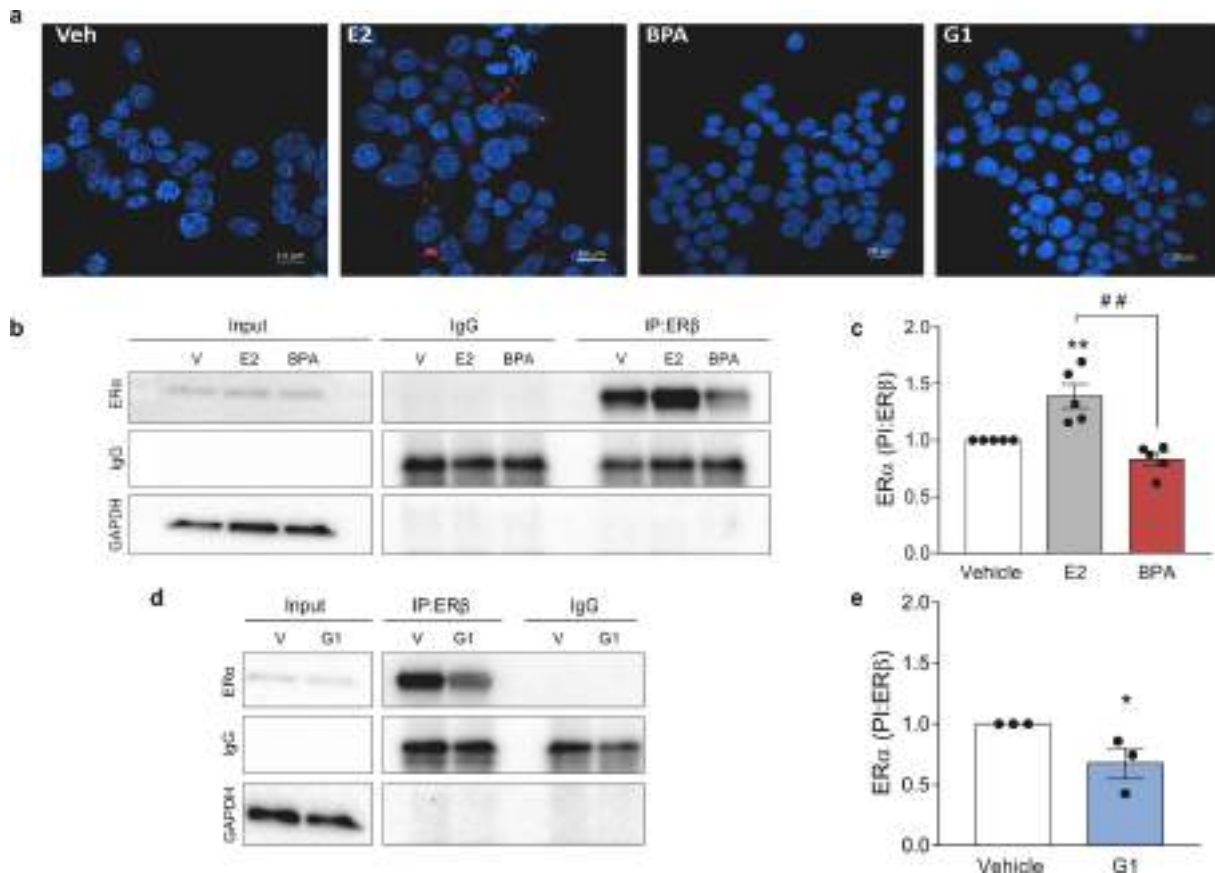


Fig. 7. E2 and BPA have differential effects on ER α / β heterodimer formation. (a) INS-1E cells were treated with vehicle, E2 1 nM, BPA 1 nM or G1 100 nM for 24 h. Heterodimers were detected using in situ proximity ligand assay, where heterodimers are represented as red dots (Texas red) and nuclei are shown in blue (DAPI). (b–e) INS-1 E cells were treated with vehicle (white bars), E2 1 nM (grey bars), BPA 1 nM (red bars) (b,c) or G1 100 nM (blue bars) (d,e) for 24 h. Cells were lysed and proteins collected for co-immunoprecipitation with anti-ER β antibody. Nonspecific rabbit IgG was used as a negative control. Immunoprecipitates and total protein (Input) expression were measured by western blot. Representative images of three to five independent experiments are shown (b,d) and densitometry results are presented for ER α -specific binding to ER β (c,e). Values were normalised by GAPDH and then by the value of vehicle-treated cells of each experiment (considered as 1). Data are shown as means \pm SEM of 3–5 independent experiments. (c) $**p \leq 0.01$ vs vehicle; $^{##}p \leq 0.01$ as indicated by bars. One-way ANOVA. (e) $*p \leq 0.05$ vs vehicle, by two-tailed Student's *t* test.

induced beta cell apoptosis in vivo and protected mice from insulin-deficient diabetes in an ER α -dependent manner (le May et al., 2006). Furthermore, ER α preserved mitochondrial function and attenuated endoplasmic reticulum stress in a context where ER α silencing promoted ROS production and induced beta cell apoptosis (Zhou et al., 2018). Here, ER α knockdown or treatment with the ER α antagonist MPP induced beta cell apoptosis, reinforcing an antiapoptotic role of this receptor even in the absence of added ligands. In the presence of ER ligands, we observed two different scenarios: while an ER α agonist had no effect on viability, BPA induced ROS production and beta cell apoptosis, indicating that BPA disrupts the ER α antiapoptotic role. Our findings indicate that ER β also plays a pro-survival role in beta cells because either its silencing or antagonism with PHTPP leads to apoptosis. Interestingly, the percentage of apoptosis in ER β -silenced cells was much higher than that in ER α -deficient cells, suggesting that ER β may be more important for beta cell survival. The BPA effect on apoptosis was abrogated in ER β -inhibited cells, indicating that ER β is also involved in BPA-induced apoptosis. The antiapoptotic protection conferred by ERs is in line with previous findings in islets from ER α - and ER β -knockout mice (Liu et al., 2009).

After ligand binding, ER α and ER β form homo and heterodimers to exert their biological effects (Levin and Hammes, 2016). Different ER

ligands stabilize ER α and ER β homo and heterodimers in a variety of combinations that mediate the effect of those ER ligands (Paulmurugan et al., 2011). Our bioinformatic results predicted that E2 favors the formation of ER $\alpha\alpha$, ER $\beta\beta$ and ER $\alpha\beta$. BPA, however, stabilized ER $\beta\beta$ but did not stabilize ER $\alpha\beta$ heterodimers. Based on these results, we proposed a model where ER $\alpha\alpha$, ER $\beta\beta$ and ER $\alpha\beta$ are antiapoptotic under basal conditions. Upon binding, E2 favors ER $\alpha\beta$ heterodimers as well as ER $\alpha\alpha$ and ER $\beta\beta$ homodimers, thus protecting beta cells from apoptosis. Conversely, ER $\alpha\beta$ heterodimer formation does not occur in the presence of BPA; in fact, the number of ER $\alpha\beta$ heterodimers is even decreased by BPA exposure. How can the change in the degree of ER $\alpha\beta$ heterodimerization influence apoptosis levels? With the experiments described in this work, we cannot know exactly, but we can speculate that the nonformation of heterodimers in the presence of BPA or G1 will increase the proportion of free ER α and ER β that could form dimers of ER $\alpha\alpha$ and ER $\beta\beta$ in the presence of BPA and, according to our bioinformatics data, preferentially ER $\beta\beta$. This modification of the dimer and heterodimer populations may lead to a lower basal protection from apoptosis, visualized in our experiments as an increase in apoptosis (Fig. 8). Another possibility that we cannot rule out is that in the presence of E2 or BPA, different combinations of heterodimers are formed with the five existing isoforms of ER β . In this work, we show the presence of ER β isoforms in

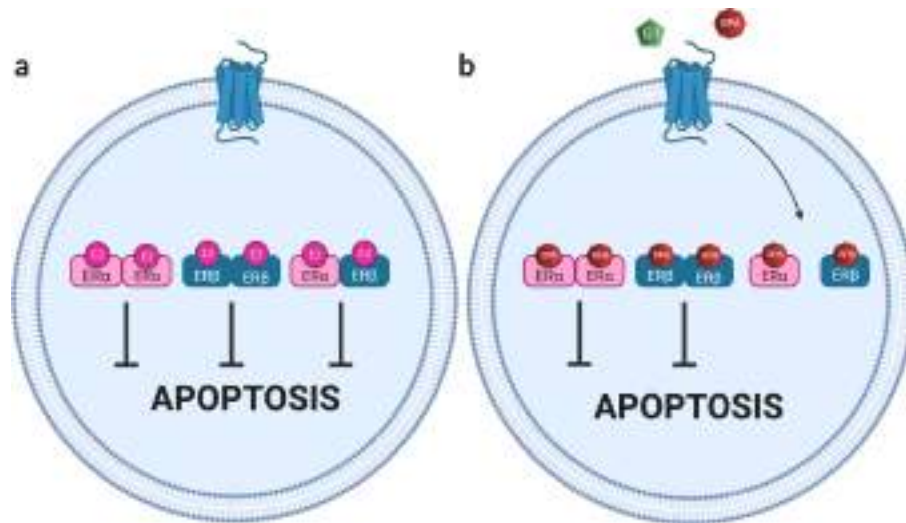


Fig. 8. Scheme summarizing our model for E2 and BPA effects on beta cell apoptosis. (a) In basal conditions, ER α , ER β homodimers and ER $\alpha\beta$ heterodimers exist and protect beta cells from apoptosis. These dimers are also stabilized by E2. (b) Activation of GPER by G1 or BPA decreases ER $\alpha\beta$ heterodimers and increases apoptosis. Binding of BPA to ER α and/or ER β disfavors ER $\alpha\beta$ formation. Created with [BioRender.com](https://www.biorender.com).

pancreatic beta cells (ESM 5). It has been previously shown that different ER β isoforms can give rise to opposite effects even in the same cell type (Leung et al., 2006; Yan et al., 2021). This possibility warrants further study.

A direct effect of BPA on ER α and ER β heterodimerization may explain the part of the BPA apoptotic effect that is neither blocked by GPER antagonism nor fully achieved by GPER activation. Nonetheless, we demonstrated that GPER activation by either BPA or G1 contributes to beta cell apoptosis. Because BPA binds to GPER in other cell systems (Thomas and Dong, 2006) and induces rapid nongenomic effects (Chevalier et al., 2014), it is plausible to assume that BPA acts as a GPER agonist in beta cells. Both cell lines expressed GPER mRNA and protein to a higher extent than ER α and ER β . Quantification of protein levels between both cell lines is difficult with the present data; nonetheless, there is a trend to higher levels of GPER in EndoC- β H1 compared to INS-1E. This may explain why the effect of G1 was stronger in the human cell line than in the rat cell line. In any case, similar results were obtained throughout the whole manuscript despite the differences in GPER expression between both cell lines.

Because the G1 and BPA effects were abolished in the presence of an ER antagonist, after ER knockdown and in islet cells from BERKO mice, we suggest that ER α and ER β are responsible for the effect of GPER activation. Remarkably, E2, which binds to and activates GPER (Revankar et al., 2005; Thomas et al., 2005), does not behave as G1 or BPA. The reason for these differences remains elusive. Crosstalk between GPER and ER α has been described for E2 and environmental estrogens (Qie et al., 2021). GPER interacts with ER α signaling directly by physical association and indirectly by GPER activity, modifying ER α expression and/or function (Romano and Gorelick, 2018). Crosstalk with ER β has been less studied, and in this work, the mode of crosstalk is another open question for future studies.

Thus, along with BPA effects on insulin secretion and insulin sensitivity, the BPA-induced apoptosis described by us (present data) and others (Carchia et al., 2015; Lin et al., 2013) may contribute to elucidating the diabetogenic effects of BPA described above. In this work, BPA induces apoptosis at doses within the picomolar and nanomolar ranges, which agrees with both in vivo and in vitro studies showing that BPA has effects at low doses (Soto et al., 2021; vom Saal and Vandenberg, 2021). Although BPA shows a low affinity for ER α and ER β (Kuiper et al., 1998; Molina-Molina et al., 2013) and binds to GPER with an IC₅₀ of 630 nM (Thomas and Dong, 2006), it is plausible to expect that an

amplification of the response to BPA caused by the crosstalk among the three ERs contributes to the proapoptotic effect induced by low concentrations of BPA.

Currently, there is a lack of methods for testing EDCs that disrupt metabolism and metabolic functions (Legler et al., 2020). The MIE triggered by BPA and the subsequent increase in ROS production should help to develop novel cellular testing methods to identify other EDCs with diabetogenic properties. Moreover, our results reinforce the need to incorporate ER α and ER β homodimer and heterodimer formation in tests to identify EDCs, as has been already proposed for ER α dimer formation (Kim et al., 2021). Finally, the MIE described herein reflects the complexity of the molecular mechanisms underlying EDC actions. Such complexity complicates the prediction of a given EDC effect without having exact knowledge of the MIE involved. Acquiring this knowledge is a long-term goal; therefore, a deep understanding of MIEs should not be a strict requirement to create public health policies on EDCs (Soto and Sonnenschein, 2018).

5. Conclusions

The three estrogen receptors, ER α , ER β and GPER, protect beta cells from apoptosis under basal conditions. Low doses of BPA increased beta cell apoptosis in three different cell models, i.e., dispersed mouse islet cells, the rat beta cell line INS-1E, and the human beta cell line EndoC- β H1. Our data indicate that EndoC- β H1 cells work as a proper human cell model for the identification of EDCs with diabetogenic activity.

The proapoptotic effect of BPA involves crosstalk among the three estrogen receptors. Activation of GPER by G1 or BPA induced apoptosis via ER α and ER β . Our results indicate that BPA directly decreases ER $\alpha\beta$ heterodimers via ER α and ER β or after activation of GPER. This decrease in ER $\alpha\beta$ heterodimers disrupts the active antiapoptotic effect of ER α and ER β in beta cells. Our results should help to develop new test methods to identify diabetogenic EDCs based on the use of human EndoC- β H1 cells, GPER activation, ROS production, and homo and heterodimerization of ER α and ER β .

Author contributions

LM and AN conceived the study. IB-C, RSDS, RMM-G, AAP-S, J-AE and LM collected and analyzed the data. IB-C, RSDS, RMM-G, AAP-S, J-AE, JM-P, LM and AN interpreted the data. RSDS, JM-P and AN drafted

the manuscript. AN and LM supervised the study. RSDS, JM-P, J-AG critically revised the manuscript for important intellectual content. J-AG, J-AE, LM, JM-P and AN acquired the funding. All authors reviewed and approved the final version of the manuscript and gave consent for publication. LM and AN are responsible for the integrity of the work as a whole.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

The authors thank Maria Luisa Navarro, Salomé Ramon, and Beatriz Bonmati Botella for their excellent technical assistance. We are grateful to the Cluster of Scientific Computing (<http://ccc.umh.es/>) of the Universidad Miguel Hernández de Elche for providing computing facilities.

Funding

This work was supported by Ministerio de Ciencia e Innovación, Agencia Estatal de Investigación (AEI) and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) grants BPU2017-86579-R (AN), PID2020-117294RB-I00 (AN, JM-P), Generalitat Valenciana PROMETEO 2020/006 (AN) and European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement GOLIATH No. 825489 (AN). Author laboratories hold grants from Ministerio de Ciencia e Innovación, Agencia Estatal de Investigación y Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) RTI2018-096724-B-C21 (J-AE) and PID2020-117569RA-I00 (LM). PROMETEO/2016/006 (J-AE) and SEJI/2018/023 (LM) supported by Generalitat Valenciana, Spain. Robert A. Welch Foundation (grant E-0004) (J-AG). CIBERDEM is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107250>.

References

- Ahn, C., Kang, H.-S., Lee, J.-H., Hong, E.-J., Jung, E.-M., Yoo, Y.-M., Jeung, E.-B., 2018. Bisphenol A and octylphenol exacerbate type 1 diabetes mellitus by disrupting calcium homeostasis in mouse pancreas. *Toxicol. Lett.* 295, 162–172.
- Allen, T.E.H., Goodman, J.M., Gutsell, S., Russell, P.J., 2014. Defining Molecular Initiating Events in the Adverse Outcome Pathway Framework for Risk Assessment. *Chem. Res. Toxicol.* 27, 2100–2112. <https://doi.org/10.1021/tx500345j>.
- Alonso-Magdalena, P., García-Arévalo, M., Quesada, I., Nadal, A., 2015. Bisphenol-A treatment during pregnancy in mice: A new window of susceptibility for the development of diabetes in mothers later in life. *Endocrinology (United States)* 156 (5), 1659–1670.
- Alonso-Magdalena, P., Morimoto, S., Ripoll, C., Fuentes, E., Nadal, A., 2006. The estrogenic effect of bisphenol A disrupts pancreatic beta-cell function in vivo and induces insulin resistance. *Environ Health Perspect* 114, 106–112. <https://doi.org/10.1289/ehp.8451>.
- Alonso-Magdalena, P., Quesada, I., Nadal, A., 2011. Endocrine disruptors in the etiology of type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 7, 346–353. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2011.56>.
- Alonso-Magdalena, P., Ropero, A.B., Carrera, M.P., Cederroth, C.R., Baquie, M., Gauthier, B.R., Nef, S., Stefani, E., Nadal, A., 2008. Pancreatic insulin content regulation by the estrogen receptor ER alpha. *PLoS ONE* 3, e2069. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002069>.
- Alonso-Magdalena, P., Vieira, E., Soriano, S., Menes, L., Burks, D., Quesada, I., Nadal, A., 2010. Bisphenol A exposure during pregnancy disrupts glucose homeostasis in mothers and adult male offspring. *Environ Health Perspect* 118, 1243–1250. <https://doi.org/10.1289/ehp.1001993>.
- Balhuizen, A., Kumar, R., Amisten, S., Lundquist, I., Salehi, A., 2010. Activation of G protein-coupled receptor 30 modulates hormone secretion and counteracts cytokine-induced apoptosis in pancreatic islets of female mice. *Mol. Cell. Endocrinol.* 320, 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.01.030>.
- Bansal, A., Rashid, C., Xin, F., Li, C., Polyak, E., Duemler, A., van der Meer, T., Stefaniak, M., Wajid, S., Doliba, N., Bartolomei, M.S., Simmons, R.A., 2017. Sex- and dose-specific effects of maternal bisphenol A exposure on pancreatic islets of first- and second-generation adult mice offspring. *Environ. Health Perspect.* 125 (9), 097022.
- Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Kiefer, F., Cassarino, T.G., Bertoni, M., Bordoli, L., Schwede, T., 2014. SWISS-MODEL: Modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Research* 42. <https://doi.org/10.1093/nar/gku340>.
- Cabaton, N.J., Canlet, C., Wadia, P.R., Tremblay-Franco, M., Gautier, R., Molina, J., Sonnenschein, C., Cravedi, J.-P., Rubin, B.S., Soto, A.M., Zalko, D., 2013. Effects of low doses of bisphenol A on the metabolome of perinatally exposed CD-1 mice. *Environ Health Perspect* 121, 586–593. <https://doi.org/10.1289/ehp.1205588>.
- Carchia, E., Porreca, I., Almeida, P.J., D'Angelo, F., Cuomo, D., Ceccarelli, M., De Felice, M., Mallardo, M., Ambrosino, C., 2015. Evaluation of low doses BPA-induced perturbation of glycemia by toxicogenomics points to a primary role of pancreatic islets and to the mechanism of toxicity. *Cell Death Dis.* 6 (10), e1959.
- Chevalier, N., Paul-Bellon, R., Camparo, P., Michiels, J.F., Chevallier, D., Fénelon, P., 2014. Genetic variants of GPER/GPR30, a novel estrogen-related G protein receptor, are associated with human seminoma. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 1574–1589. <https://doi.org/10.3390/ijms15011574>.
- Contreras, J.L., Smyth, C.A., Bilbao, G., Young, C.J., Thompson, J.A., Eckhoff, D.E., 2002. 17 β -estradiol protects isolated human pancreatic islets against proinflammatory cytokine-induced cell death: Molecular mechanisms and islet functionality. *Transplantation* 74. <https://doi.org/10.1097/00007890-20021150-00010>.
- Cunha, D.A., Cito, M., Carlsson, P.-O., Vanderwinden, J.-M., Molkentin, J.D., Bugliani, M., Marchetti, P., Eizirik, D.L., Cnop, M., 2016. Thrombospondin 1 protects pancreatic β -cells from lipotoxicity via the PERK-NRF2 pathway. *Cell Death Differ.* 23 (12), 1995–2006.
- Delgado, J., Radusky, L.G., Cianferoni, D., Serrano, L., 2019. FoldX 5.0: Working with RNA, small molecules and a new graphical interface. *Bioinformatics* 35. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz184>.
- Denizot, F., Lang, R., 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 89, 271–277. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(86\)90368-6](https://doi.org/10.1016/0022-1759(86)90368-6).
- Eizirik, D.L., Pasquali, L., Cnop, M., 2020. Pancreatic beta-cells in type 1 and type 2 diabetes mellitus: different pathways to failure. *Nat Rev Endocrinol* 16, 349–362. <https://doi.org/10.1038/s41574-020-0355-7>.
- Gannon, M., Kulkarni, R.N., Tse, H.M., Mauvais-Jarvis, F., 2018. Sex differences underlying pancreatic islet biology and its dysfunction. *Mol Metab* 15, 82–91. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.05.017>.
- Gore, A.C., Chappell, V.A., Fenton, S.E., Flaws, J.A., Nadal, A., Prins, G.S., Toppari, J., Zoeller, R.T., 2015. EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocr. Rev.* 36 (6), E1–E150.
- Heldring, N., Pike, A., Andersson, S., Matthews, J., Cheng, G., Hartman, J., Tujague, M., Strom, A., Treuter, E., Warner, M., Gustafsson, J.A., 2007. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev* 87, 905–931. <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2006>.
- Iwabuchi, E., Miki, Y., Ono, K., Onodera, Y., Suzuki, T., Hirakawa, H., Ishida, T., Ohuchi, N., Sasano, H., 2017. In situ detection of estrogen receptor dimers in breast carcinoma cells in archival materials using proximity ligation assay (PLA). *J Steroid Biochem Mol Biol* 165, 159–169. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.05.022>.
- Kang, L., Zhang, X., Xie, Y., Tu, Y., Wang, D., Liu, Z., Wang, Z.Y., 2010. Involvement of estrogen receptor variant ER-alpha36, not GPR30, in nongenomic estrogen signaling. *Mol Endocrinol* 24, 709–721. <https://doi.org/10.1210/me.2009-0317>.
- Kautzky-Willer, A., Harreiter, J., Pacini, G., 2016. Sex and Gender Differences in Risk, Pathophysiology and Complications of Type 2 Diabetes Mellitus. *Endocr Rev* 37, 278–316. <https://doi.org/10.1210/er.2015-1137>.
- Kim, H.M., Seo, H., Park, Y., Lee, H.-S., Lee, S.-H., Ko, K.S., 2021. Development of a Human Estrogen Receptor Dimerization Assay for the Estrogenic Endocrine-Disrupting Chemicals Using Bioluminescence Resonance Energy Transfer. *Int J Environ Res Public Health* 18 (16), 8875.
- Koortjuiw, S., Kaewin, S., Semprasert, N., Sujitjoo, J., Junking, M., Suksri, K., Yenchitsomanus, P. thai, 2018. Estradiol Prevents High Glucose-Induced β -cell Apoptosis by Decreased BTG2 Expression. *Scientific Reports* 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30698-x>.
- Krege, J.H., Hodgin, J.B., Couse, J.F., Enmark, E., Warner, M., Mahler, J.F., Sar, M., Korach, K.S., Gustafsson, J.-Å., Smithies, O., 1998. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor β . *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (26), 15677–15682.
- Kuiper, G.G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S., Gustafsson, J.A., 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138, 863–870. <https://doi.org/10.1210/endo.138.3.4979>.
- Kuiper, G.G., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., van der Saag, P.T., van der Burg, B., Gustafsson, J.A., 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139, 4252–4263. <https://doi.org/10.1210/endo.139.10.6216>.
- Legler, J., Zalko, D., Jourdan, F., Jacobs, M., Fromenty, B., Balaguier, P., Bourguet, W., Muncic Kos, V., Nadal, A., Beausoleil, C., Cristobal, S., Remy, S., Ermler, S., Margiotta-Casaluci, L., Griffin, J.L., Blumberg, B., Chesné, C., Hoffmann, S., Andersson, P.L., Kamstra, J.H., 2020. The goliath project: Towards an internationally harmonised approach for testing metabolite disrupting compounds. *Int. J. Mol. Sci.* 21 (10), 3480.

- le May, C., Chu, K., Hu, M., Ortega, C.S., Simpson, E.R., Korach, K.S., Tsai, M.J., Mauvais-Jarvis, F., 2006. Estrogens protect pancreatic beta-cells from apoptosis and prevent insulin-deficient diabetes mellitus in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 9232–9237. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602956103>.
- Leung, Y.-K., Mak, P., Hassan, S., Ho, S.-M., 2006. Estrogen receptor (ER)- β isoforms: A key to understanding ER- β signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (35), 13162–13167.
- Levin, E.R., Hammes, S.R., 2016. Nuclear receptors outside the nucleus: extranuclear signalling by steroid receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17, 783–797. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.122>.
- Lin, Y., Sun, X., Qiu, L., Wei, J., Huang, Q., Fang, C., Ye, T., Kang, M., Shen, H., Dong, S., 2013. Exposure to bisphenol A induces dysfunction of insulin secretion and apoptosis through the damage of mitochondria in rat insulinoma (INS-1) cells. *Cell Death Dis* 4, e460. <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.206>.
- Liu, S., le May, C., Wong, W.P., Ward, R., Clegg, D.J., Marcelli, M., Korach, K.S., Mauvais-Jarvis, F., 2009. Importance of extranuclear estrogen receptor- α and membrane G protein-coupled estrogen receptor in pancreatic islet survival. *Diabetes* 58, 2292–2302. <https://doi.org/10.2337/db09-0257>.
- Li, Y., Perera, L., Coons, L.A., Burns, K.A., Tyler Ramsey, J., Pelch, K.E., Houtman, R., van Beuningen, R., Teng, C.T., Korach, K.S., 2018. Differential in vitro biological action, coregulator interactions, and molecular dynamic analysis of bisphenol A (BPA), BPAF, and BPS ligand-ER α complexes. *Environ. Health Perspect.* 126 (1), 017012.
- Marroqui, L., Dos Santos, R.S., Fløyet, T., Grieco, F.A., Santin, I., Op de beeck, A., Marselli, L., Marchetti, P., Pociot, F., Eizirik, D.L., 2015. TYK2, a Candidate Gene for Type 1 Diabetes, Modulates Apoptosis and the Innate Immune Response in Human Pancreatic β -Cells. *Diabetes* 64 (11), 3808–3817.
- Marroqui, L., Martínez-Pinna, J., Castellano-Munoz, M., dos Santos, R.S., Medina-Gali, R. M., Soriano, S., Quesada, I., Gustafsson, J.A., Encinar, J.A., Nadal, A., 2021. Bisphenol-S and Bisphenol-F alter mouse pancreatic beta-cell ion channel expression and activity and insulin release through an estrogen receptor ERbeta mediated pathway. *Chemosphere* 265, 129051. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129051>.
- Martinez-Pinna, J., Marroqui, L., Hmadcha, A., Lopez-Beas, J., Soriano, S., Villar-Pazos, S., Alonso-Magdalena, P., dos Santos, R.S., Quesada, I., Martin, F., Soria, B., Gustafsson, J.A., Nadal, A., 2019. Oestrogen receptor beta mediates the actions of bisphenol-A on ion channel expression in mouse pancreatic beta cells. *Diabetologia* 62, 1667–1680. <https://doi.org/10.1007/s00125-019-4925-y>.
- Molina-Molina, J.-M., Amaya, E., Grimaldi, M., Sáenz, J.-M., Real, M., Fernández, M.F., Balaguer, P., Olea, N., 2013. In vitro study on the agonistic and antagonistic activities of bisphenol-S and other bisphenol-A congeners and derivatives via nuclear receptors. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 272 (1), 127–136.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- Paulmurugan, R., Tamrazi, A., Massoud, T.F., Katzenellenbogen, J.A., Gambhir, S.S., 2011. In vitro and in vivo molecular imaging of estrogen receptor α and β homo- and heterodimerization: Exploration of new modes of receptor regulation. *Mol. Endocrinol.* 25, 2029–2040. <https://doi.org/10.1210/me.2011-1145>.
- Qie, Y.u., Qin, W., Zhao, K., Liu, C., Zhao, L., Guo, L.-H., 2021. Environmental Estrogens and Their Biological Effects through GPER Mediated Signal Pathways. *Environ. Pollut.* 278, 116826.
- Rancière, Fanny, Botton, J., Slama, R., Lacroix, M.Z., Debrauwer, L., Charles, M.A., Roussel, Ronan, Balkau, Beverley, Magliano, D.J., Balkau, B., Ducimetière, P., Eschwege, E., Rancière, F., Alhenc-Gelas, F., Girault, A., Fumeron, F., Marre, M., Roussel, R., Bonnet, F., Bonnefond, A., Cauchi, S., Froguel, P., Alençon, Angers, Blois, Caen, Chateauroux, Chartres, Cholet, le Mans, Orléans, Tours, Cogneau, J., Born, C., Caces, E., Cailleau, M., Lantieri, O., Moreau, J.G., Rakotozafy, F., Tichet, J., Vol, S., 2019. Exposure to bisphenol a and bisphenol s and incident type 2 diabetes: A case-cohort study in the French cohort D.E.S.I.R. *Environmental Health Perspectives* 127. <https://doi.org/10.1289/EHP5159>.
- Ravassard, P., Hazhouz, Y., Pechberty, S., Bricout-Neveu, E., Armanet, M., Czernichow, P., Scharfmann, R., 2011. A genetically engineered human pancreatic β cell line exhibiting glucose-inducible insulin secretion. *Journal of Clinical Investigation* 121 (9), 3589–3597.
- Razandi, M., Pedram, A., Merenthaler, I., Greene, G.L., Levin, E.R., 2004. Plasma membrane estrogen receptors exist and functions as dimers. *Mol Endocrinol* 18, 2854–2865. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0115>.
- Revankar, C.M., Cimino, D.F., Sklar, L.A., Arterburn, J.B., Prossnitz, E.R., 2005. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* 199 (307), 1625–1630. <https://doi.org/10.1126/science.1106943>.
- Romano, S.N., Gorelick, D.A., 2018. Crosstalk between nuclear and G protein-coupled estrogen receptors. *Gen. Comp. Endocrinol.* 261, 190–197. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.04.013>.
- Santin, I., dos Santos, R.S., Eizirik, D.L., 2016. Pancreatic beta cell survival and signaling pathways: Effects of type 1 diabetes-associated genetic variants, in: *Methods in Molecular Biology*. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9999-9_291.
- Sargis, R.M., Simmons, R.A., 2019. Environmental neglect: endocrine disruptors as underappreciated but potentially modifiable diabetes risk factors. *Diabetologia* 62, 1811–1822. <https://doi.org/10.1007/s00125-019-4940-z>.
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C (T) method. *Nat Protoc* 3, 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>.
- Soriano, S., Alonso-Magdalena, P., Garcia-Arevalo, M., Novials, A., Muhammed, S.J., Salehi, A., Gustafsson, J.A., Quesada, I., Nadal, A., 2012. Rapid insulinotropic action of low doses of bisphenol-A on mouse and human islets of Langerhans: role of estrogen receptor beta. *PLoS ONE* 7, e31109. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031109>.
- Soto, A.M., Schaeberle, C.M., Sonnenschein, C., 2021. From Wingspread to CLARITY: a personal trajectory. *Nat Rev Endocrinol* 17, 247–256. <https://doi.org/10.1038/s41574-020-00460-3>.
- Soto, A.M., Sonnenschein, C., 2018. Endocrine disruptors - putting the mechanistic cart before the phenomenological horse. *Nat Rev Endocrinol* 14, 317–318. <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0003-7>.
- Stahlhut, R.W., Myers, J.P., Taylor, J.A., Nadal, A., Dyer, J.A., vom Saal, F.S., 2018. Experimental BPA exposure and glucose-stimulated insulin response in adult men and women. *J Endocr Soc* 2. <https://doi.org/10.1210/je.2018-00151>.
- Thomas, P., Dong, J., 2006. Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: A potential novel mechanism of endocrine disruption. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 102, 175–179. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2006.09.017>.
- Thomas, P., Pang, Y., Filardo, E.J., Dong, J., 2005. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology* 146, 624–632. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1064>.
- Tovchigrechko, A., Vakser, I.A., 2006. GRAMM-X public web server for protein-protein docking. *Nucleic Acids Res.* 34 (Web Server), W310–W314.
- Tsonkova, V.G., Sand, F.W., Wolf, X.A., Grunnet, L.G., Kirstine Ringgaard, A., Ingvorsen, C., Winkel, L., Kalisz, M., Dalgaard, K., Bruun, C., Fels, J.J., Helgstrand, C., Hastrup, S., Öberg, F.K., Vernet, E., Sandrini, M.P.B., Shaw, A.C., Jessen, C., Grønberg, M., Hald, J., Willenbrock, H., Madsen, D., Wernersson, R., Hansson, L., Jensen, J.N., Plesner, A., Alantalo, T., Petersen, M.B.K., Grapin-Botton, A., Honoré, C., Ahnfelt-Ronne, J., Hecksher-Sørensen, J., Ravassard, P., Madsen, O.D., Rescan, C., Frogne, T., 2018. The Endo β H1 cell line is a valid model of human beta cells and applicable for screenings to identify novel drug target candidates. *Mol Metab* 8, 144–157. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.12.007>.
- Vandenbergh, L.N., Chahoud, I., Heindel, J.J., Padmanabhan, V., Paumgarten, F.J., Schoenfelder, G., 2010. Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environ Health Perspect* 118, 1055–1070. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901716>.
- Villar-Pazos, S., Martínez-Pinna, J., Castellano-Munoz, M., Alonso-Magdalena, P., Marroqui, L., Quesada, I., Gustafsson, J.-A., Nadal, A., 2017. Molecular mechanisms involved in the non-monotonic effect of bisphenol-a on ca2+ entry in mouse pancreatic β -cells. *Sci. Rep.* 7 <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11995-3>.
- vom Saal, F.S., Vandenberg, L.N., 2021. Update on the Health Effects of Bisphenol A: Overwhelming Evidence of Harm. *Endocrinology* 162. <https://doi.org/10.1210/endo/bqaa171>.
- Wang, B., Li, M., Zhao, Z., Lu, J., Chen, Y., Xu, Y., Xu, M., Wang, W., Wang, T., Bi, Y., Ning, G., 2019. Urinary bisphenol A concentration and glucose homeostasis in non-diabetic adults: a repeated-measures, longitudinal study. *Diabetologia* 62, 1591–1600. <https://doi.org/10.1007/s00125-019-4898-x>.
- Wang, C., Nguyen, P.H., Pham, K., Huynh, D., Le, T.B., Wang, H., Ren, P., Luo, R., 2016. Calculating protein-ligand binding affinities with MMPBSA: Method and error analysis. *J Comput Chem* 37, 2436–2446. <https://doi.org/10.1002/jcc.24467>.
- Yan, S., Dey, P., Ziegler, Y., Jiao, X., Kim, S.H., Katzenellenbogen, J.A., Katzenellenbogen, B.S., 2021. Contrasting activities of estrogen receptor beta isoforms in triple negative breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 185 (2), 281–292.
- Zhou, Z., Ribas, V., Rajbhandari, P., Drew, B.G., Moore, T.M., Fluit, A.H., Reddish, B.R., Whitney, K.A., Georgia, S., Vergnes, L., Reue, K., Liesa, M., Shirihai, O., van der Blik, A.M., Chi, N.W., Mahata, S.K., Tian, J.P., Hewitt, S.C., Tontonoz, P., Korach, K.S., Mauvais-Jarvis, F., Hevener, A.L., 2018. Estrogen receptor protects pancreatic β -cells from apoptosis by preserving mitochondrial function and suppressing endoplasmic reticulum stress. *J. Biol. Chem.* 293, 4735–4751. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.805069>.

Supplementary Material

G protein-coupled estrogen receptor activation by Bisphenol-A disrupts protection from apoptosis conferred by estrogen receptors ER α and ER β in pancreatic beta cells

Ignacio Babiloni-Chust^{1,2,*}, Reinaldo S. dos Santos^{1,2,*}, Regla M. Medina-Gali^{1,2}, Atenea A. Perez-Serna^{1,2}, José-Antonio Encinar¹, Juan Martinez-Pinna^{3,1}, Jan-Ake Gustafsson^{4,5}, Laura Marroqui^{1,2} and Angel Nadal^{1,2}

1. Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE), Universidad Miguel Hernández de Elche, Elche, Spain.
2. Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Spain. www.ciberdem.org
3. Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología, Universidad de Alicante, Alicante, Spain.
4. Department of Cell Biology and Biochemistry, Center for Nuclear Receptors and Cell Signaling, University of Houston, Houston, TX, USA.
5. Department of Biosciences and Nutrition, Karolinska Institutet, Huddinge, Sweden

* Ignacio Babiloni-Chust and Reinaldo S. dos Santos contributed equally to this work.

Corresponding author

Angel Nadal, Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE), Universidad Miguel Hernández de Elche, 03202, Elche, Spain.

E-mail: nadal@umh.es

Supplementary Table 1. List of siRNAs used in this study.

Code	Name	Distributor	Sequence (5'to 3')
siCTRL	Allstars Negative Control siRNA	Qiagen, Venlo, Netherlands	Sequence not provided
Rat si <i>Gper1</i>	Rn_Gpr30_1 FlexiTube siRNA (SI01518335)	Qiagen, Venlo, Netherlands	Sequence not provided
Rat si <i>Gper1</i>	Rn_Gpr30_2 FlexiTube siRNA (SI01518342)	Qiagen, Venlo, Netherlands	Sequence not provided
Rat si <i>Era</i>	Esr1RSS302814 (3_RNAI)	Invitrogen, Pasley, UK	GCUACAAACCAAUGCACCAUCGAUA
Rat si <i>Era</i>	Esr1RSS302815 (3_RNAI)	Invitrogen, Pasley, UK	GCUUAAUUCUGGAGUGUACACAUUU
Rat si <i>Erβ</i>	Esr2RSS303096	Invitrogen, Pasley, UK	CCCAAUGUGCUAUGGCCAACUUCU
Rat si <i>Erβ</i>	Esr2RSS303097	Invitrogen, Pasley, UK	GCGUAGAAGGGAUUCUGGAAAUCUU
Human si <i>GPER1</i>	Hs_GPR30_1 FlexiTube siRNA (SI00430360)	Qiagen, Venlo, Netherlands	Sequence not provided
Human si <i>GPER1</i>	Hs_GPR30_1 FlexiTube siRNA (SI00430367)	Qiagen, Venlo, Netherlands	Sequence not provided
Human si <i>ERα</i>	HS ESR1 8 (SI02784101)	Qiagen, Venlo, Netherlands	Sequence not provided
Human si <i>ERβ</i>	HS ESR2 6 (SI03083269)	Qiagen, Venlo, Netherlands	Sequence not provided

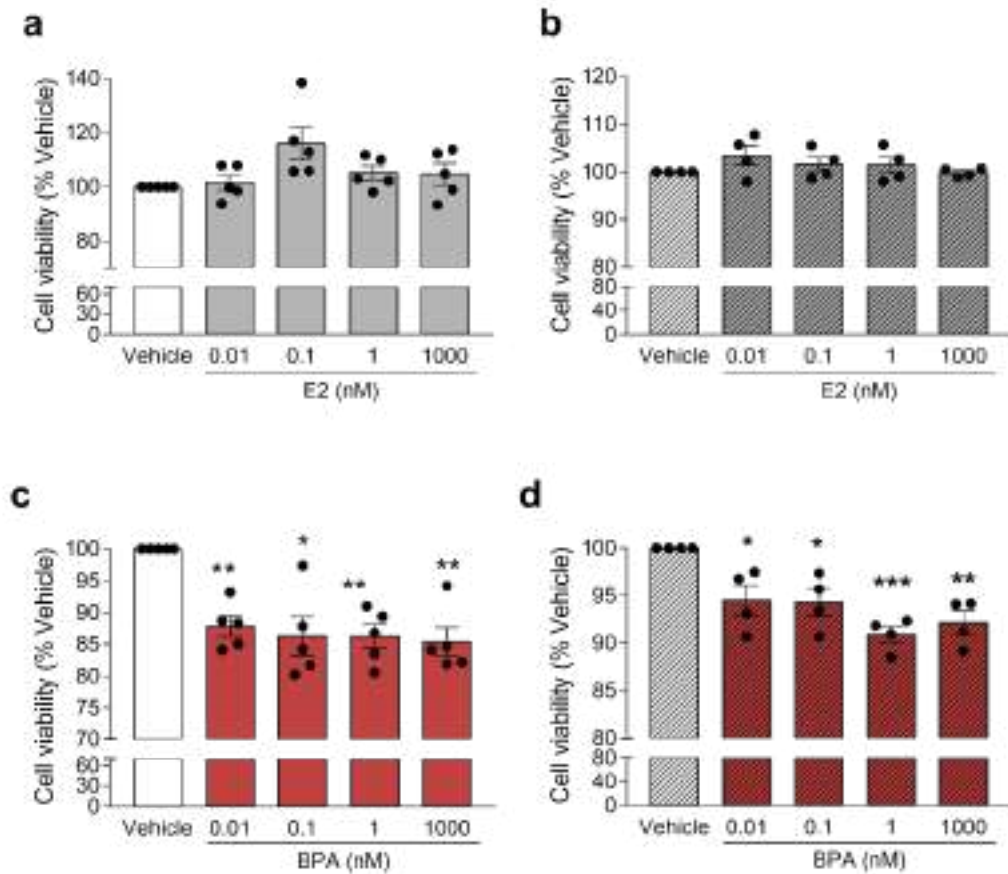
Supplementary Table 2. List of primers used in this study.

Gene	Forward	Reverse
	Sequence (5'-3')	Sequence (5'-3')
Rat <i>Esr1</i>	CTGACAATCGACGCCAGAA	TCGTTACACACAGCACAGTAG
Rat <i>Esr2</i>	TGGTCATGTGAAGGATGTAAGG	TTACGCCGGTTCTTGTCTATG
Rat <i>Gper1</i>	TCTACACCATCTTCCTCTTCCC	ACAGGTCTGGGATAGTCATCTT
Rat <i>Gapdh</i>	AGTTCAACGGCACAGTCAAG	TACTCAGCACCAGCATCACC
Human <i>ESR1</i>	CAGATGGTCAGTGCCTTGTT	GTTGGTCAGTAAGCCCATCAT
Human <i>ESR2</i>	TGGGCACCTTTCTCCTTTAG	AGGTGTGTTCTAGCGATCTTG
Human <i>GPER1</i>	GTCTCTAAACTGCGGTCAGATG	AGCAATTCTGTGTGAGGAGTG
Human β -actin	CTGTACGCCAACACAGTGCT	GCTCAGGAGGAGCAATGATC

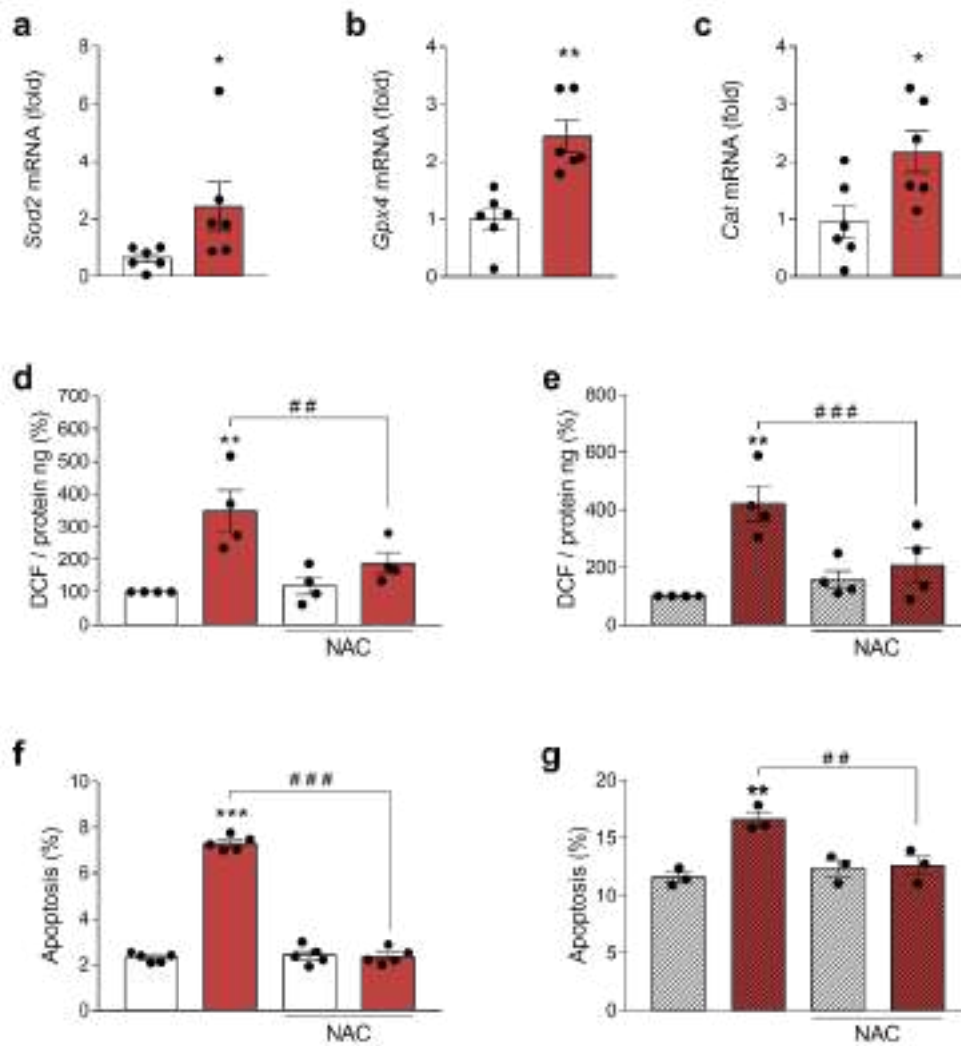
Supplementary Table 3. List of antibodies used in this study.

Target antigen	Antibody Name	Manufacturer and catalogue number (Cat no.)	Species raised in	Dilution	RRID
ER α	Estrogen Receptor alpha Monoclonal Antibody	Invitrogen; Cat no. MA5-13191	Mouse, monoclonal	1:1000 (WB)	AB_10986080
ER α	Estrogen Receptor alpha Monoclonal Antibody (SP1)	Thermo Fisher Scientific; Cat no. MA5-14501	Rabbit, monoclonal	1:200 (PLA)	AB_10981779
ER β	Estrogen Receptor Beta Monoclonal Antibody	Invitrogen; Cat no. MA5-24807	Mouse, monoclonal	1:2000 (WB) and 2 mg/ml (IP)	AB_2717280
ER β	Estrogen Receptor beta Monoclonal Antibody (14C8)	Thermo Fisher Scientific; Cat no. MA1-23217	Mouse, monoclonal	1:2000 (PLA)	AB_558839
GPER	Anti-G-protein coupled receptor 30 antibody	Abcam; Cat no. Ab-39742	Rabbit, polyclonal	1:1000 (WB)	AB_1141090
α -Tubulin	Monoclonal Anti- α Tubulin antibody	Sigma; Cat no. T9026	Mouse, monoclonal	1:5000 (WB)	AB_477593
GAPDH	GAPDH (D16H11) XP Rabbit mAb antibody	Cell Signaling Technology; Cat no. 5174	Rabbit, monoclonal	1:1000 (WB)	AB_10622025
β -Actin	β -Actin (D6A8) Rabbit mAb antibody	Cell Signaling Technology; Cat no. 8457	Rabbit, monoclonal	1:1000 (WB)	AB_10950489
Goat anti-mouse IgG	Goat Anti-Mouse IgG (H+L) HRP Conjugate antibody	Bio-rad; Cat no. 170-6516	Goat, Polyclonal	1:5000 (WB)	AB_11125547

Goat anti-rabbit IgG	Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) HRP Conjugate antibody	Bio-rad; Cat no. 170-6515	Goat, Polyclonal	1:5000 (WB)	AB_11125142
Goat anti-rabbit IgG	Normal Rabbit IgG antibody	Cell Signaling Technology; Cat no. 2729	Goat, Polyclonal	Used for IP	AB_1031062

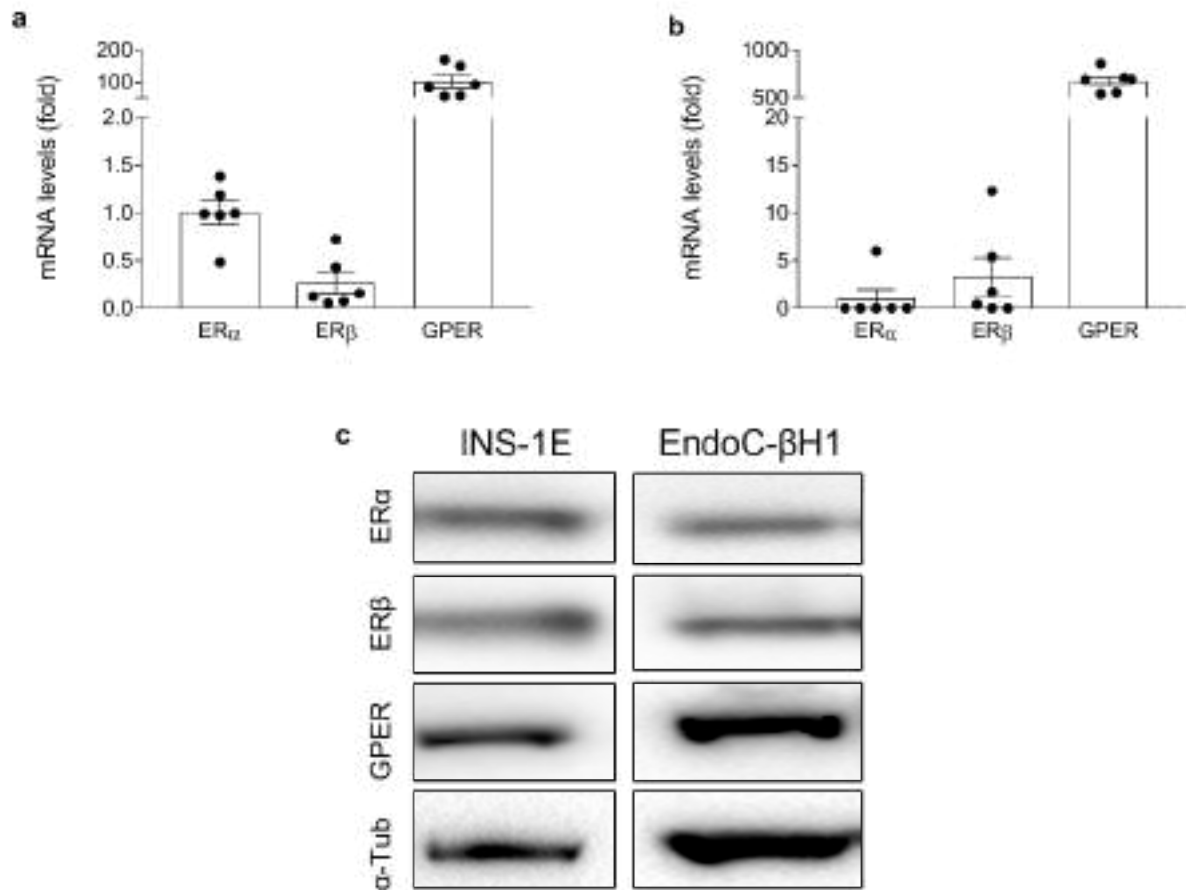


Supplementary Fig. 1 E2 and BPA have different effects on beta cell viability. INS-1E (a,c) and EndoC-βH1 cells (b,d) were treated with vehicle (white bars), E2 (grey bars) or BPA (red bars) for 48 h. Cell viability was evaluated by MTT assay. Data are shown as means ± SEM of 5 independent experiments. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ and *** $p \leq 0.001$ vs Vehicle. One-way ANOVA.

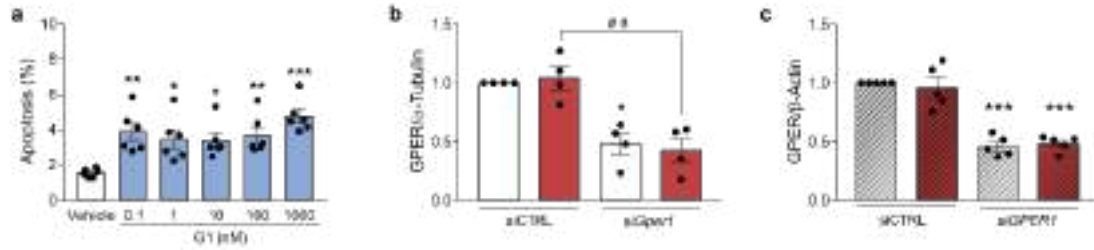


Supplementary Fig. 2 Involvement of oxidative stress in BPA-induced apoptosis.

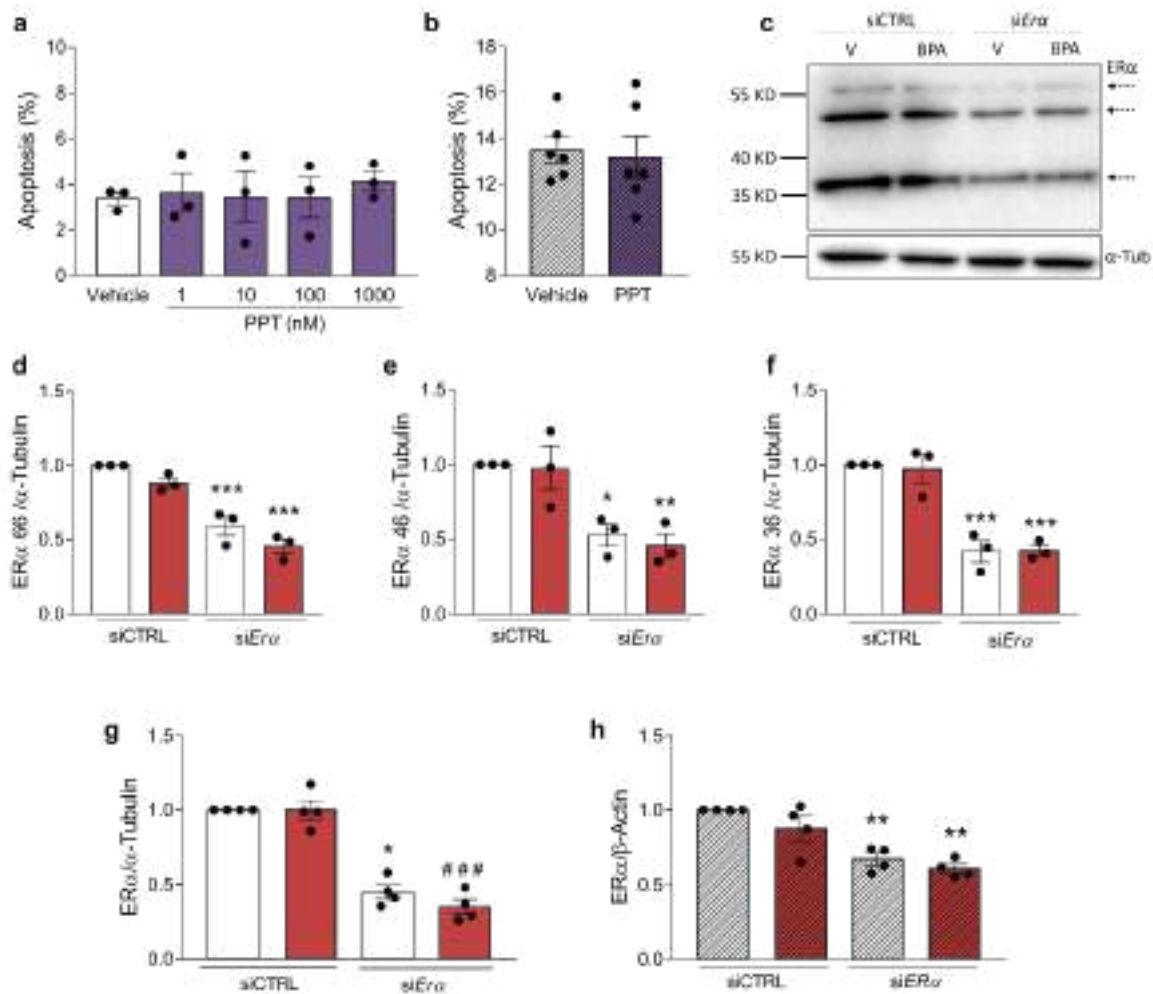
(a-c) mRNA expression of *Sod2* (a), *Gpx4* (b), and *Cat* (c) in INS-1E cells treated with vehicle (white bars) or BPA 1 nmol/l (red bars) for 24 h. mRNA expression was measured by qRT-PCR and normalised to the housekeeping gene *Gapdh*, and it is shown as fold vs vehicle. INS-1E (d) and EndoC-βH1 (e) cells were treated with vehicle (white bars) or BPA 1 nmol/l (red bars) in the absence or presence of N-acetylcysteine (NAC; 3 mmol/l) for 24 h. Oxidative stress was measured by oxidation of the fluorescent probe DCF and normalized by total protein. INS-1E (f) and EndoC-βH1 (g) cells were treated with vehicle (white bars) or BPA 1 nmol/l (red bars) in the absence or presence of NAC 3 mM for 24 h. Apoptosis was evaluated using Hoechst 33342 and propidium iodide staining. Data are shown as means ± SEM of 3-6 independent experiments. (a-c) * $p \leq 0.05$ and ** $p \leq 0.01$, by two-tailed Student's *t* test. (d-g) ** $p \leq 0.01$ and *** $p \leq 0.001$ vs the respective vehicle; ## $p \leq 0.01$ and ### $p \leq 0.001$ as indicated by bars. Two-way ANOVA.



Supplementary Fig. 3 ER α , ER β and GPER expression in INS-1E and EndoC- β H1 cells. mRNA expression of ER α , ER β and GPER in INS-1E (a) and EndoC- β H1 cells (b). mRNA expression was measured by qRT-PCR and normalised to the housekeeping genes *Gapdh* (a) and β -actin (b). Data are shown as fold-change of ER α expression (considered as 1). (c) Protein expression of ER α , ER β and GPER in INS-1E (left panel) and EndoC- β H1 cells (right panel) was measured by western blot.

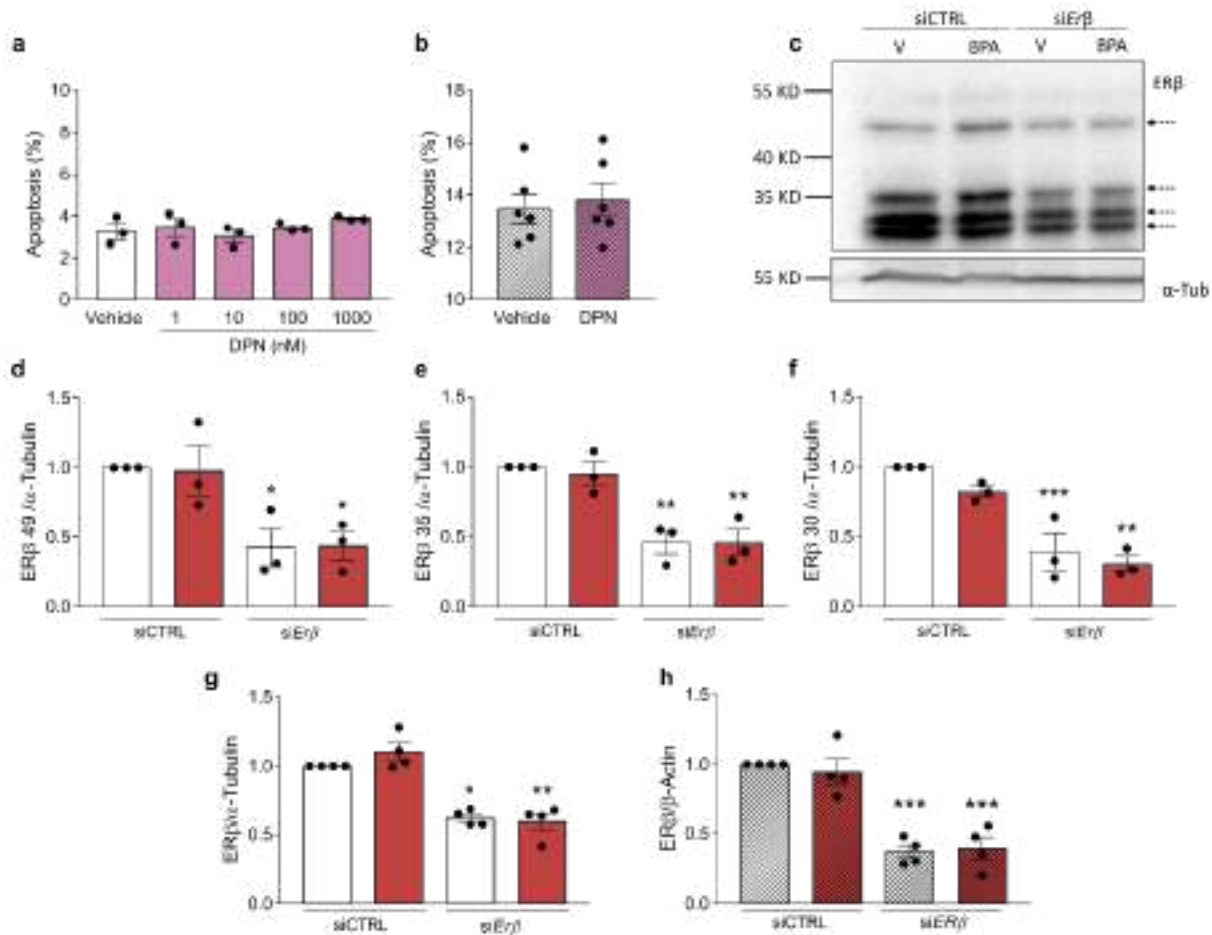


Supplementary Fig. 4 GPER activation induces apoptosis. (a) INS-1E cells were treated with vehicle (white bars) or GPER agonist G1 (blue bars) for 24 h. Apoptosis was evaluated using Hoechst 33342 and propidium iodide staining. (b,c) Densitometry analysis of immunoblots shown in Fig. 2e (b) and Fig. 2h (c). Values were normalised by α -tubulin (b) or β -actin (c) and then by the value of siCTRL-transfected vehicle-treated cells of each experiment (considered as 1). Data are shown as means \pm SEM of 4-6 independent experiments. (a) $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$ and $***p \leq 0.001$ vs Vehicle, by one-way ANOVA. (b,c) $*p \leq 0.05$ and $***p \leq 0.001$ vs the respective siCTRL. $##p \leq 0.01$ as indicated by bars. Two-way ANOVA.



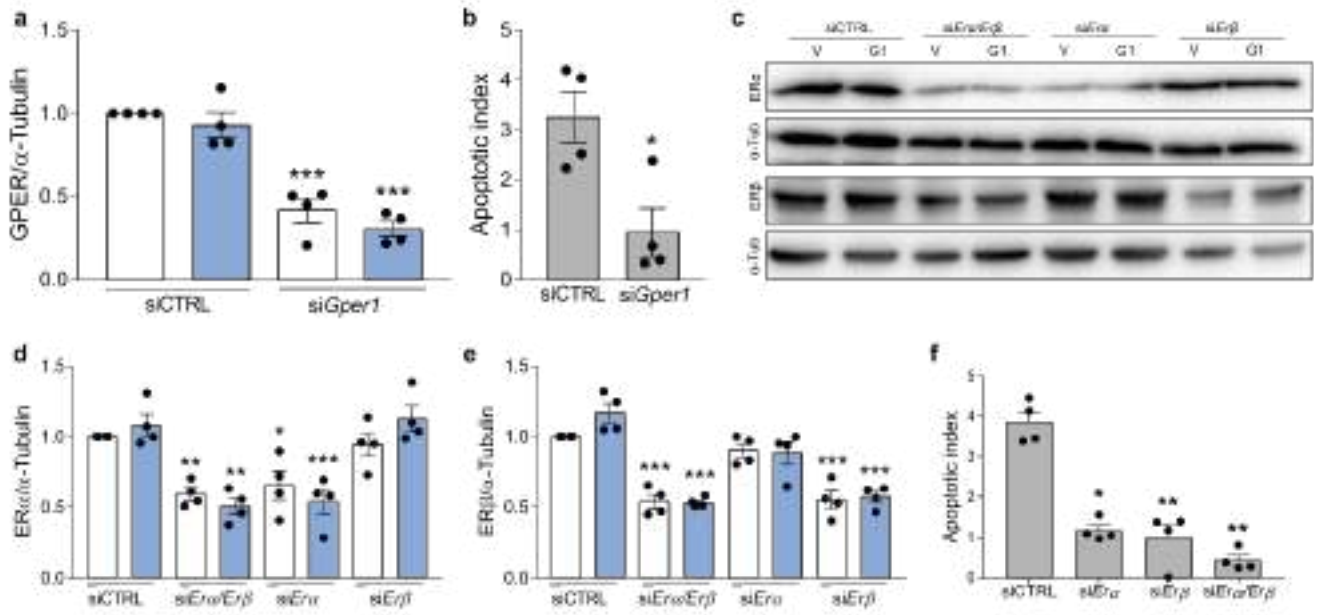
Supplementary Fig. 5 PPT effect on viability and confirmation of ERα knockdown.

INS-1E (a) and EndoC-βH1 cells (b) were treated with vehicle or ERα agonist PPT (1 nmol/l in b) for 24 h. Apoptosis was evaluated using Hoechst 33342 and propidium iodide staining. (c-f) INS-1E cells were transfected with siCTRL or with a siRNA targeting ERα (siEra). Cells were treated with vehicle (white bars) or BPA 1 nmol/l (red bars) for 24 h. Protein expression was measured by western blot. Representative images of three independent experiments are shown (c) and densitometry results are presented for different ERα variants, namely ERα 66 (d), ERα 46 (e) and ERα 36 (f). Values were normalised by α-tubulin (α-tub) and then by the value of siCTRL-transfected vehicle-treated cells of each experiment (considered as 1). (g,h) Densitometry analysis of immunoblots shown in Fig. 3d (g) and Fig. 3g (h). Values were normalised by α-tubulin or β-actin and then by the value of siCTRL-transfected vehicle-treated cells of each experiment (considered as 1). Data are shown as means ± SEM of 3-4 independent experiments. (d-h) * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ vs the respective siCTRL, by two-way ANOVA. PPT, propylpyrazone triol.

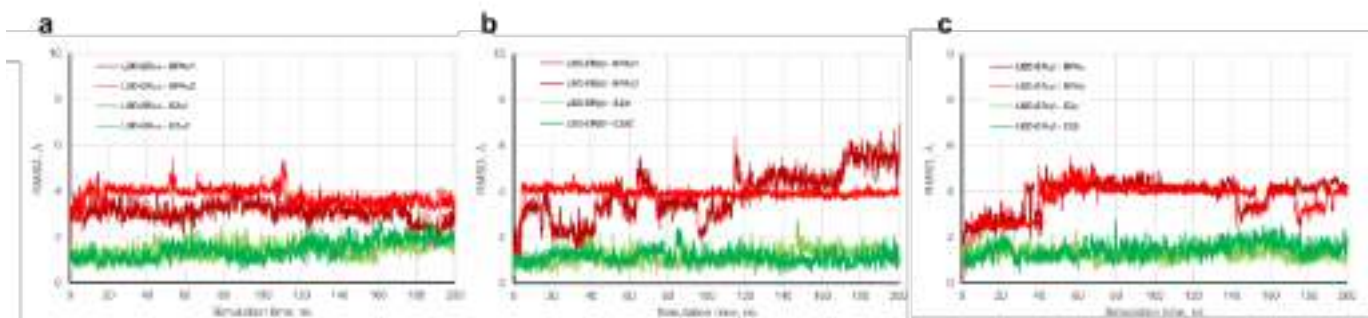


Supplementary Fig. 6 DPN effect on viability and confirmation of ERβ knockdown.

INS-1E (**a**) and EndoC-βH1 cells (**b**) were treated with vehicle or ERβ agonist DPN (1 nmol/l in **b**) for 24 h. Apoptosis was evaluated using Hoechst 33342 and propidium iodide staining. (**c-f**) INS-1E cells were transfected with siCTRL or with a siRNA targeting ERα (siErβ). Cells were treated with vehicle (white bars) or BPA 1 nmol/l (red bars) for 24 h. Protein expression was measured by western blot. Representative images of three independent experiments are shown (**c**) and densitometry results are presented for different ERβ variants, namely ERβ 49 (**d**), ERβ 35 (**e**) and ERβ 30 (**f**). Values were normalised by α-tubulin (α-tub) and then by the value of siCTRL-transfected vehicle-treated cells of each experiment (considered as 1). (**g,h**) Densitometry analysis of immunoblots shown in Fig. 4c (**g**) and Fig. 4f (**h**). Values were normalised by α-tubulin or β-actin and then by the value of siCTRL-transfected vehicle-treated cells of each experiment (considered as 1). Data are shown as means ± SEM of 3-6 independent experiments: (d-h) * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ vs the respective siCTRL, by two-way ANOVA. DPN, diarylpropionitrile.



Supplementary Fig. 7 GPER requires ER α and ER β to induce apoptosis. (a) Densitometry analysis of immunoblots shown in Fig. 5c. Values were normalised by α -tubulin and then by the value of siCTRL-transfected vehicle-treated cells of each experiment (considered as 1). (b) G1-induced apoptosis data from Fig. 5d are presented as apoptotic index. (c-e) Related to Fig. 5i. Protein expression was measured by western blot. Representative images of four independent experiments are shown (c) and densitometry results are presented for ER α (d) or ER β (e). (f) G1-induced apoptosis data from Fig. 5i are presented as apoptotic index. Data are shown as means \pm SEM of 4 independent experiments. (a,d,e) * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ vs the respective siCTRL, by two-way ANOVA. (b) * $p \leq 0.05$, by two-tailed Student's t test. (f) * $p \leq 0.05$ and ** $p \leq 0.01$ vs siCTRL, by one-way ANOVA.



Supplementary Fig. 8 Molecular dynamics simulation of homo- and heterodimers of **hLBD-ER**. Analysis of the trajectory of the ligands bound to the closed cavity of the LBD-ER for homodimers α/α (**a**), homodimers β/β (**b**) and heterodimers α/β (**c**).

AGRADECIMIENTOS

Parece mentira que hayan pasado 4 años y pico (y una pandemia de por medio) desde que empecé esta aventura. En primer lugar, quiero agradecerles y pedirles perdón por los quebraderos de cabeza que les he dado a los responsables de que hoy este escribiendo estas líneas, mis directores de tesis, el Dr. Ángel Nadal y la Dra. Laura Marroquí. Gracias Ángel por tu infinita paciencia, por haber sido exigente y a la vez comprensivo, por siempre enseñarnos a cómo un experimento nos lleva a otro, por tu incansable dedicación a la ciencia, por ser un gran mentor. Nunca olvidaré una conversación al principio de mi tesis, que me hizo darme cuenta de que aparte de gran científico, eres una excelente persona. Laura, no se muy bien como darte las gracias, me has enseñado tanto, técnicas, razonamientos científicos, estadística, parte de Excel y Word. Gracias por ser una investigadora accesible, siempre dispuesta a aconsejar, a resolver las miles de dudas, gracias por todo el tiempo que hemos invertido, espero que no te hayas arrepentido mucho de aquella conversación en tu despacho de ya está, ya no hay vuelta atrás, hemos firmado por 4 años. Sin duda, ha sido un gran privilegio poder trabajar y principalmente formarme a vuestro lado. De todo corazón, gracias. Al Dr Jose Antonio, por siempre estar pendiente, preguntando y animando. Gracias por supuesto a las entidades financieras que han hecho posible la realización de esta tesis.

No podrían faltar en estos agradecimientos la Dra Paloma Alonso y la Dra Cristina Ripoll. Palo, muchas gracias por atenderme con la mejor de tus sonrisas, eres un ejemplo a seguir, por apoyarme. Cristina, gracias por esa alegría que tienes, ese sentido del humor y, sobre todo, por haber estado siempre animándome. Gracias también al Dr. Iván Quesada y la Dra. Esther Fuentes, por ser grandes pilares en este laboratorio.

A los increíbles postdocs Dr. Reinaldo Sousa y la Dra. Regla Medina. Reinaldo, contigo he aprendido mucho, me has ayudado más de lo que crees mucho obligado! Regla, Regli, Reglita, has sido una gozada conocerte y trabajar a tu lado, con toda esa fuerza arrasadora que tanto te caracteriza, por ser un pozo de sabiduría, retransmitida a no menos de 70 decibelios, extrañare mucho no decirte cada mañana buenos días corazón y hasta luego Maricarmen. Gracias a la Dra Hilda y la Dra Talia por su cariño y simpatía

A Athenea, ella que es mamarracha, pero una excelente muchacha. Mi vida en Elche, en el laboratorio y fuera de él no hubieran sido lo mismo sin ti. No sabes

cuantas veces he dado gracias por aquel Holaaaaaa en el laboratorio de soluciones, en el que nos calzábamos la bata a la vez, por vernos crecer, llorar, reír (eso principalmente), por todas las bromas y confianzas, por ser mi hermana retorcida que con una simple mirada entiende todo lo que quiero decir, por haber sentido que mis victorias eran las suyas también, ya te lo he dicho muchas veces, pero quiero que te lo grabes a fuego, eres una mujer maravillosa y mucho más fuerte de lo que jamás pensaste.

A los chispas, Dr. Sergi Soriano y Dr. Juan Pinna, estos años me han confirmado lo que en la carrera ya sospeché fuertemente, aparte de ser unos excelentes profesores e investigadores, sois unas magníficas personas. Gracias por estar siempre dispuestos, por vuestro sentido del humor ¡¡La ciencia necesita más gente como vosotros!! Mención especial en este apartado se merece nuestro minichispas, alias Pichu, conocido formalmente como Roberto, gracias por esa calma que tantas veces he necesitado, por seguirme siempre a cualquier plan loco que se me haya ocurrido, o liarme tu en algunos de ellos, por todas las cervezas en Elche, Sanvi, el Amerador o donde sea. Eres una persona increíble.

A las maravillosas técnicas, Luisi, Salo y Bea. Luisi y Salo, yo he sido un doctorando atípico y poco trabajo os he dado cazando islotes, sin embargo, no hace falta pasar mucho rato con vosotras para cogeros cariño, sois la caña. Bea, a ti no sé cómo darte las gracias, parte de mi cordura te la debo a ti, gracias por escucharme, aconsejarme, por ser un pilar esencial, de corazón gracias. Ojalá pudiera llevaros a las tres en una mochila allá donde fuera.

Gracias al Virusteam, en especial a María y Celia, más que compañeras sois familia, gracias por esas comidas que hacen que el tiempo pase volando, por esas cervezas, por vuestros consejos, apoyo, risas y llantos compartidos, son tantos momentos juntos que soy incapaz de ponerlos todos, pero se que mi estancia en Elche y fuera de ella, hubiera sido mucho peor de no haberos encontrado por el camino.

No puedo, ni quiero, olvidarme en estas líneas a la gente fuera del laboratorio, pero que sin embargo han estado muy presentes, a veces hasta atrincherados en mi piso. Raquel, Davide, Pilar, Kalinka, Sam, Ángela, Danny, Ximo... Nunca podré decir en palabras todo lo que os agradezco el que me hayáis acompañado

en el tortuoso camino que es una tesis doctoral, de verdad. Por alegraros con cada pasito que daba, por haber celebrado conmigo el paper, por haber venido de sorpresa a las tierras de las palmeras en mi cumpleaños, por haberme acogido y haberme perdonado después de marearos durante días. Todos y cada uno de vosotros, con vuestro apoyo habéis hecho posible que hoy esté terminando este proyecto, así que de corazón gracias. Lo que se unió en la R3, que nunca nadie lo separe.

A mis biolocos, Marta, Miner, Rober y Cata, aunque nos veamos de pascuas a ramos, la unión formada es inquebrantable, sois increíbles.

A mis castelloneses del alma, Tato, Pedro, Mari, Olgui, Gloria (esta es de la terreta postiza), Miguel, Ángel...habéis sido uno de los pilares que han hecho posible este proyecto. No sabéis lo curativas que son esas cervezas y cafés en la Cúpula, aunque estéis lejos, os llevo conmigo, aquí en Elche o donde sea.

Gracias a mi familia, mis tíos Amparo y Miguel, mi tío Alberto, la teta Ana, no concibo ir a Castellón y no veros. A Margarita, por haber estado siempre ahí, por venir a Elche cuando más lo necesitaba. Por supuesto un enorme gracias destinado a mi hermana, Sus, por tus ánimos incansables, por saber animarme, comprenderme y guiarme, has sido hermana, amiga, psicóloga, siempre dispuesta a cuidar al nene. A mi padre, el cual ha sido, es y será mi mayor modelo a seguir, la persona que más me ha aconsejado y creído en mí, hemos aprendido juntos. Pater, tendría que escribir otro libro como este y me faltaría hueco para decirte todas las razones por las que esta tesis es tanto tuya como mía.

Con el permiso de todos, me gustaría dedicar esta sección, para mí la más importante, a la que fue la mujer de mi vida, mi madre, ella, que fue luchadora hasta la médula, un ejemplo de valentía, que siempre me apoyó en todo lo que decidí, aunque eso significara irme a 300 km de casa para cumplir mi sueño científico. Tu que siempre me hiciste saber lo orgullosa que estabas de que tu hijo estuviera logrando sus sueños. El día de la defensa, aunque estemos tres, se que seremos cuatro, y espero, que allá donde estés, te sigas sintiendo tan orgullosa de tu hijo como me demostraste. Esta tesis, estará siempre vinculada a ti, va por ti, mama.

