

Universidad de Oviedo

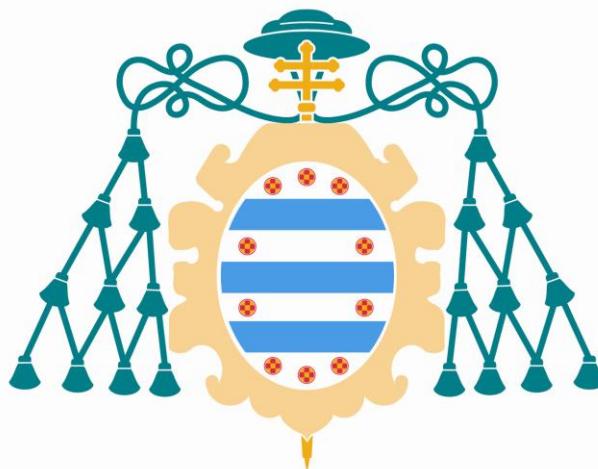
Programa de Doctorado

“Morfología y Biología Celular”

**DISTINTOS TIPOS DE
AUTOFAGIA EN LA GLÁNDULA DE
HARDER DEL HÁMSTER SIRIO
(*Mesocricetus auratus*). ESTUDIO DE
LA REGULACIÓN HORMONAL
DURANTE EL CICLO ESTRAL.**

Marina García Macia

Tesis Doctoral, 2014



Universidad de Oviedo

Programa de Doctorado

“Morfología y Biología Celular”

**DISTINTOS TIPOS DE
AUTOFAGIA EN LA GLÁNDULA DE
HARDER DEL HÁMSTER SIRIO
(*Mesocricetus auratus*). ESTUDIO DE
LA REGULACIÓN HORMONAL
DURANTE EL CICLO ESTRAL.**

Marina García Macia

Tesis Doctoral, 2014



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Distintos tipos de autofagia en la glándula de Harder del hámster Sirio (<i>Mesocricetus auratus</i>). Estudio de la regulación hormonal durante el ciclo estral.	Inglés: Different types of autophagy in the Harderian gland of Syrian hamster (<i>Mesocricetus auratus</i>). Hormonal regulation study during the estrous cycle.
2.- Autor	
Nombre: Marina García Macía	DNI/Pasaporte/NIE: /
Programa de Doctorado: Morfología y Biología Celular	
Órgano responsable: Departamento de Morfología y Biología Celular	

RESUMEN (en español)

La glándula de Harder (GH) de hámster Sirio (*Mesocricetus auratus*) muestra un claro dimorfismo sexual con variaciones tanto a nivel morfológico como bioquímico. Las diferencias morfológicas incluyen cambios en el tipo celular, ya que mientras que los machos muestran dos tipos celulares, el tipo I y el tipo II, las hembras carecen de los de tipo II, además estas últimas acumulan porfirinas en los lúmenes glandulares, mientras que los machos no. Al tratarse de un órgano con un elevado metabolismo porfirinogénico siendo las porfirinas moléculas prooxidantes, conlleva que la glándula utiliza un elevado estrés oxidativo, mucho mayor en hembras, puesto que acumulan más porfirinas. La respuesta para sobrevivir a esta situación adversa es principalmente el proceso de reciclaje celular denominado autofagia, el cual, muestra también un importante dimorfismo sexual. En base a ello, las alteraciones en hormonas sexuales deberían influir en la regulación de este proceso, lo que hasta el presente trabajo no se había estudiado.

En esta tesis hemos abordado a lo largo del ciclo estral la influencia de las variaciones de las hormonas sexuales en la glándula de Harder abarcando un estudio en el que se estudiarían los cambios hormonales que suceden de forma natural en el organismo, con lo que el estudio de la glándula durante el ciclo estral es idóneo para este propósito. Por ello, dentro del ciclo estral, se tomaron las dos fases con diferencias más importantes en cuanto a su nivel de hormonas sexuales: el estro, con el máximo nivel de estrógenos, pues es la fase de la ovulación (fértil) y el diestro, niveles mínimos de estrógenos y más elevados de melatonina circulante, siendo esta molécula una hormona de secreción pineal encargada de regular los ritmos circadianos, por lo que tiene un importante papel en la regulación de la fisiología reproductora.

El balance oxidativo se caracterizó en ambas fases, observándose que los marcadores del estado redox se encontraban en niveles opuestos. El estro con un elevado daño oxidativo y una pobre respuesta antioxidante, mientras que el diestro presentaba un menor daño y una elevada actividad antioxidante. El estudio de la viabilidad mitocondrial, mostró una menor población mitocondrial



en estro, con una menor actividad del enzima citrato sintasa, y mitocondrias menos eficaces, con los niveles de ATP más bajos. Ante esta situación observada en estro de alto estrés oxidativo y baja producción mitocondrial se estudiaron los mecanismos observados en este proceso, viéndose que en estro se había activado una respuesta pro-inflamatoria con altos niveles del factor de transcripción NF- κ B, predominando sin embargo en diestro la respuesta anti-inflamatoria con altos niveles de Nrf2. Además, en cuanto a la actividad proteolítica, el estro presentó una gran estimulación, tanto a nivel del sistema ubiquitin-proteosoma, como el sistema lisosomal-autofágico. Sin embargo, el diestro mantuvo una baja actividad proteolítica.

Los resultados del estudio de la autofagia sirvieron para caracterizar dos tipos principales de procesos: una autofagia masiva o extensiva y una autofagia selectiva, que coexistían en la GH. En cuanto a la autofagia masiva, se observó que los marcadores principales de la macroautofagia, Beclin-1 y LC3-II, se encontraban altamente expresados en estro. A su vez, la vía de inhibición principal de la autofagia, la de mTOR, se encontró inhibida en esta fase. Esto junto con los datos morfológicos que muestran una menor superficie glandular en el estro, parece indicar que este proceso provoca una importante destrucción glandular en esta fase. Teniendo en cuenta que el estro es la etapa de mayor producción y acumulación de porfirinas, la inducción de los procesos autófagos podría estar inducida a la secreción porfirica y sus propiedades tóxicas y prooxidantes.

RESUMEN (en Inglés)

The Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) Harderian gland (HG) shows a clear sexual dimorphism, important variations at both morphologic and biochemistry level. The morphologic differences are related with the cellular type, because while males show two types of cells, type I and type II, females have not type II cells. Furthermore females accumulate porphyrins into glandular lumen, and males do not have. As the HG has a high porphyrin metabolism and the porphyrins are pro-oxidant molecules, the HG develops an elevated oxidative stress, higher in females because they accumulate more porphyrins. The HG from both genders develops autophagy in response to this adverse situation, having also this process an important sexual dimorphism. Taking that into account, sexual hormonal variations should have an influence in the regulation of the autophagy, the study of this regulation is the aim of the present work.

In this thesis, we have studied the influence of the sexual hormone variations throughout the estrous cycle in the Harderian gland. We selected the two phases with most important differences in the estrous cycle: the estrus, with the highest estrogen level, because it is the ovulation moment (fertile) and the diestrus, with the lowest estrogen and highest melatonin levels. The melatonin is the hormone which regulates the circadian rhythms and, therefore, it has an essential role in the reproductive physiology.



Oxidative balance was characterized in both phases, and it was observed that the redox markers are in opposite points in each phase. The highest oxidative damage and low antioxidant response were found in estrus phase, while the lowest damage and high antioxidant activity in diestrus one. Mitochondrial viability study showed a low mitochondrial population in estrus, that was evaluated by citrate synthase activity, being, moreover, these mitochondria less effective, with ATP levels lower in estrus than diestrus. Following both phases, estrus with high oxidative stress and low mitochondrial production showed activation of pro-inflammatory response with high NF- κ B levels, while predominantly anti-inflammatory response was observed in diestrus with high levels of Nrf2. Furthermore, so opposite situation, also induced important differences in cellular proteolytic response. Thus, an intense proteolitic stimulation was observed in estrus phase, with important activity in proteasome-ubiquitin mechanism as well as at lisosomal-autophagy level. However, a low proteolitic activity in general was found in diestrus phase.

The autophagy characterization showed two main processes coexisting in the Harderian gland, a massive autophagy and a selective autophagy. About massive autophagy, key macroautophagy markers: Beclin-1 and ratio LC3-II/LC3-I, were higher expressed in estrus phase. At the same time, mTOR pathway, main inhibition of the autophagy, was going down. These data agree with morphological obtained results, that showed a lower glandular area in the estrus phase than diestrus one, suggesting that this process at this stage causes a significant glandular destruction. It has to be noted that the gland showed its highest activity production in estrus phase, what is remarking a possible autophagy induction caused by the porphyrin secretion and by its toxic and prooxidants properties.

Referred to selective autophagy, Lamp-2a protein expression, which is directly correlated to chaperone mediated autophagy (CMA) activity, a selective way to deliver damage proteins. Lamp-2a overexpression was observed in estrus while in diestrus its expression was much lower.

Likewise, there are recently discovered ways to delete selective organelles by the autophagy, mitophagy and lipophagy. Both of them were found more active in this phase. Last one, lipophagy seems to be directly related with the Type II cell which disappeared in diestrus phase. Holocrine secretion, previously described by our group, was mainly observed in the estrus phase.

In summary, taking into account all these data, we confirm that as the Harderian gland is so affected by the estrous cycle hormonal changes, it has to have an important role in the reproductive physiology, probably related with the pheromone secretions in the fertile phase, with a high production and delivery of porphyrins in the estrus phase and a retrieval phase in the diestrus.

“Por la ciencia, como por el arte, se va al mismo sitio: a la verdad”

Gregorio Marañón

“Quien no haya experimentado la irresistible atracción de la ciencia, no podrá comprender su tiranía”

Frankenstein. Mary Shelley

A David

Este trabajo ha sido subvencionado con los proyectos del Ministerio de Educación y Ciencia MICINN-10-BFU2010-20919 y FISS-13-RD12/0043/0030.

La autora de la Tesis doctoral ha sido beneficiaria de la siguiente ayuda: Beca predoctoral del Instituto de salud Carlos III (FI10/00065).

Gracias a la Universidad de Oviedo por ceder sus instalaciones y servicios.

Agradecimientos

Este era, desde el principio, el apartado que más me apetecía escribir, puesto que esta memoria, es solo una pequeña muestra de un gran trabajo, en el que han colaborado muchas personas, seguramente alguna me dejaré en el tintero, y por ello, me disculpo de antemano.

En primer lugar quisiera agradecer a Ana, su confianza y paciencia, y sobre todo la oportunidad de asomar la cabeza en este mundo. Además de hacer que estos años de esfuerzo hayan sido muy enriquecedores y plenos, de una gran cantidad de recuerdos divertidos, en viajes, cenas, comidas. Gracias por permitirme formar parte de esta familia que formamos.

A Pepa, como no, que ha sido siempre un gran apoyo y un gran ejemplo. A Nacho y Vero, que han marcado mis primeros pasos, y me han enseñado tanta magia. A Bea, que poquito a poco se ha convertido en una parte indispensable de este trabajo. Gracias a Mamen, que me has enseñado mucho. Y a Boga, que lo crea o no, también ha dejado su granito de arena.

A mis niñas, Bea (Peque) y Yaiza, que sois encantadoras, cada una con su estilo, y a los niños David, que me ha dado grandes lecciones, Adrian e Illán. Y a la gente que ha formado en algún momento parte de nuestra familia: Ana, Covi, Clara, Kim, Mely, Carlos, Iván, Angel y Gelurri, Saúl, Carlinos...

A esta altura, ya tendré a alguien un poco enfurruñado (aunque lo niegue), pensando que ya no me acordaba de ella...por supuesto que no me olvido de ti, Susana, mi mediaLangosta, no creo que quepa aquí todo lo que te tengo que agradecer, hemos compartido tanto... que nos hemos hecho fuertes, una piña!!

No me puedo olvidar de toda la gente que ha formado parte estos años de nuestro departamento, la pequeña familia de Morfología, con los que he compartido comidas, cenas, cafés y risas... las Cristinas, las Evas, Felipe, Irene, de la familia antigua; y Aida, Sope, Ana,

Henar, Pedro, Trabanco, de la familia más joven. Y de Arantxa y Varo, que también forman parte de la familia, aunque pertenezcan a otros departamentos.

Y por supuesto, de Avelina, Gloria y Toly, que son indispensables, siempre.

A todas las personas que conforman el departamento de Morfología y Biología Celular, de las que he aprendido mucho, me han cedido instalaciones, tiempo de dedicación y ayudado en todo en el estrés que ha supuesto este trabajo: JA Vega, Celia, JM López, JM García, Rafa...

A mi gente de otros departamentos que han colaborado de una forma u otra con esta tesis, esas pequeñas cosas sin las que no hubiera sido posible...

A mi familia de León, empezando por Arsenio, que me ha acogido y adoptado, haciéndome sentir una más de su familia, pasando por mi Irene, un gran ejemplo y mejor amiga, Berta y Diego, Taia, Noelia, María, y finalmente Marta, que es una mami de todos.

To my family from NY, the singhitos, thanks Rajat, thank you for trust me, it's so important!! And thank you for all that I've learnt in 6 months!! Nuria, singhitos's soul, it is great work with you, better than great... Lisa (Srabani) Sahu, you are our lovely mammy. Diana, thank you, you teach me a lot of things and how explain with a lot of passion a protocol!! Jaakko, you are wonderful!! I like your big patience with my friendly behavior. Thanks Priti and Gillian.

A mi nueva familia del otro lado del charco, la Spanish community y mis amigos de Manhattan. A mi Esther, que meses de buena convivencia, cuento apoyo, cuanta labor de mami regañona cuando lo necesitaba, love u! Y por supuesto, Adrián, que me has mimado tanto... no habría podido escribir todo esto sin ti.

Los amigos, de los que he tenido un apoyo incondicional, Ro, Ru, MJ, Sar, Manu, Carol, Nati, habeís estado ahí siempre, siempre, es un regalo teneros. Y como no, a mi hermana de puntas mojadas, Raquel, no se puede ser más afortunada que yo, gracias.

A mis Mariachis, aunque les haya dedicado menos tiempo de lo que debiera, han dado la parte más festiva a esta etapa. Esther y Anais, creo que hemos formado un trio terrorífico ;). A los de siempre, y los nuevos, ha sido un placer.

A la familia y amigos, que no he citado expresamente, todos formáis parte de mi mundo, este mundo que me ha acompañado todo este tiempo, en toda la elaboración de este trabajo.

Ya que he prometido no alargar mucho esto, tengo que agradecer, y no poco, a mis padres, cada uno ha aportado una gran parte en este trabajo. Me han enseñado lo importante, mi madre me ha puesto la leña y mi padre ha encendido la llama. La llama para que te guste la ciencia. Juntos han volcado todos sus esfuerzos en conseguir que yo consiguiera mis sueños, gracias, ha sido un gran trabajo en equipo, gracias!!

Por último, aunque la vida te depare sorpresas y cambios de rumbo, gracias David. Tú, has tenido toda la paciencia del mundo y me has acompañado todo este tiempo con todo el amor del mundo, a lo largo de este duro camino, no lo hubiera logrado sin ti.

Índice

Agradecimientos	13
Índice.....	16
Abreviaturas	20
Introducción	24
Ciclo estral	25
La glándula de Harder del hámster sirio	27
Características morfológicas	28
Tipos de secreción	30
Productos de secreción	31
Modelo de estrés oxidativo	32
Estrés oxidativo	33
Defensa antioxidante	34
Daño oxidativo	38
Reacciones prooxidantes de las porfirinas	41
Respuesta celular al estrés oxidativo	42
Factores de transcripción sensibles al estrés oxidativo	42
Sistemas proteolíticos celulares	45
Autofagia	48
CMA	49
Microautofagia	50
Macroautofagia	51
Objetivos.....	54

Material y métodos.....	56
Animales.....	57
Técnicas morfológicas.....	58
Microscopía óptica: fijación y sección	58
Tinción de hematoxilina-eosina	58
Contaje celular	59
Inmunohistoquímica: Sistema Peroxidasa-AntiPeroxidasa (PAP)	60
Microscopía electrónica: fijación y sección.....	61
Técnicas bioquímicas.....	62
Homogeneización del tejido	62
Carbonilación proteica.....	63
Actividad Antioxidante Total	63
Actividad del Proteosoma	65
SDS-PAGE e inmunodetección de proteínas.....	65
(Western Blot)	65
Extracción de ARN y retrotranscripción (RT)	68
PCR en tiempo real o cuantitativa (Rt-PCR o qPCR).....	69
Función mitocondrial	70
Análisis estadístico	71
Resultados.....	73
Estudio 1: Cambios morfológicos.....	74
Estudio 2: Estado redox	76
Actividad Antioxidante Total (AAT)	77
Daño de proteínas	77

Estudio del papel de la melatonina, antioxidante natural, en el ciclo estral	77
Estudio 3: Respuesta al estrés oxidativo	79
Factores de transcripción	79
Sistemas proteolíticos	81
Estudio 4: Respuesta autofágica	84
Autofagia mediada por chaperonas	84
Macroautofagia	85
Discusión	95
Balance Redox en el ciclo estral	97
Variación de los procesos autofágicos en el ciclo estral	101
Conclusiones.....	110
Bibliografía	112
Anexos	126

Abreviaturas

$^1\text{O}_2$: oxígeno singlete.

2,4-DNP: 2,4-dinitrofenilhidrazina.

4-HNE: 4-hidroxi-2-nonenal.

AAT: actividad antioxidante total.

ABTS: ácido 2, 2'-azido-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)

ABTS $\cdot+$: radical ABTS.

ADG: 1-alquil-2,3-diacilglicerol.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario.

ALA: ácido δ -aminolevulínico.

ALA-S: ácido δ -aminolevulínico sintasa.

AMC: aminometilcoumarin.

ARE: elemento de respuesta antioxidante.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

Atg: Genes relacionados con la autofagia

ATP: adenosín trifosfato

Bcl-2: Linfoma de células B 2

BNIP3L/NIX: Bcl2/Adenovirus E1B 19

kDa and protein-interacting protein 3-like

CAT: catalasa.

CGA: Campo de gran aumento

CK: Citoqueratina

CMA: Autofagia mediada por chaperonas

CoA: Coenzima A.

CS: citrato sintasa.

DNP: dinitrofenilhidrazina.

DP: daño proteíco.

DTNB: ácido 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoico, también denominado reactivo de Ellmann.

ELISA: ensayo de inmunoadsorción enzimática.

ERK: quinasa regulada por señales extracelulares.

ERNs: especies reactivas de nitrógeno.

EROs: especies reactivas de oxígeno.

FH: hormona folículoestimulante.	Keap1: Kelch-like ECH- associated protein 1.
GH: glándula de Harder.	L [•] : radical alquilo.
GR: glutatión reductasa.	LAL: lipasa lisosomal acida.
GSH: glutatión reducido.	Lamp-2: Proteína asociada a la membrana lisosomal 2.
GSH/GSSG: cofactores glutatión.	Lamp-2a: Proteína asociada a la membrana lisosomal 2, isoforma A.
GSH-Px: glutatión peroxidasa	LC3: Cadena ligera 3 de la proteína asociada a los microtúbulos 1.
GSH-Px/GR: sistema glutatión peroxidasa/reductasa.	LH: hormona luteneizante.
GSSG: glutatión oxidado.	LH: ácido graso.
HIOMT: Hidroxindol-O-metiltransferasa.	LO [•] : alcoxilo.
H ₂ O: agua	LOO [•] : radical peroxilo.
H ₂ O ₂ : peróxido de hidrógeno.	LOOH: hidroperóxido lipídico.
HRP: peroxidasa de rábano.	LPO: Lipoperoxidación
HSL: lipasa sensible a hormonas.	MDA: Malondialdehído
IκB: IκB α , IκB β , IκB γ : inhibidoras del NF-κB.	MT1: Receptor de melatonina Mel 1A.
Iκκ: complejo inhibidor de IκBs.	MT2: Receptor de melatonina Mel 1B.
Iκκ α , Iκκ β : subunidad catalítica del Iκκ.	mTOR: Diana de la rapamicina en mamíferos
Iκκ γ o NEMO: subunidad reguladora del Iκκ.	NAT: Arilalquilamin-N-acetyltransacetylasa

NADP: nicotinamida adenín dinucleótido fosfato.

NADPH: nicotinamida adenín dinucleótido fosfato reducida.

NF-κB: factor nuclear kappa-B.

NF-κB1: proteína p50, del NF- κB.

NF-κB2: proteína p52, del NF- κB.

NF-κB2: proteína p52, del NF- κB.

NIX: Bcl2/Adenovirus E1B 19 kDa and protein-interacting protein 3-like (BNIP3L).

Nrf2: Factor relacionado con el factor nuclear eritroide 2.

O₂⁻: radical superóxido

OH⁻: radical hidroxilo.

OsO₄: osmio.

PAI: porfiria aguda intermitente.

PAP: Peroxidasa antiperoxidasa

PBG-D: Porfobilinógeno deaminasa

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PLIN: perlipina.

PUFA: ácidos grasos poliinsaturados.

PVDF: fluoruro de polivinilideno.

qPCR o RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o en tiempo real.

RE: retículo endoplasmático.

Rel A: proteína p65, del NF- κB.

RIP: proteína de interacción con el receptor.

RORα: receptor huérfano del ácido retinoico α.

RT: retrotranscripción

RZR/ROR: Receptores huérfanos del ácido retinoico

SDS: Dodecilsulfato sódico

SDS-PAGE: Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida

SOD: superóxido dismutasa.

SOD1: superóxido dismutasa citosólica.

SOD2: superóxido dismutasa mitocondrial.

TBS-T: tampón tris salino con tween.

TNFα Factor de necrosis tumoral alfa

Tx: trolox.

UPS: sistema ubiquitina-proteosoma.

Introducción

CICLO ESTRAL

El ciclo estral es el conjunto de acontecimientos fisiológicos que se producen en el ovario a intervalos de tiempo cílicos, una vez que las hembras son maduras sexualmente, como consecuencia de las variaciones hormonales cuya finalidad es el éxito reproductor. Clásicamente el ciclo estral se ha dividido en cuatro fases: proestro, estro, metaestro y diestro; o en dos: fase folicular y fase luteínica. En cualquier caso, el acontecimiento más importante es el de la ovulación, que coincide con el estro o el final de la fase folicular.

Los hámsteres poseen un ciclo estral muy regular de cuatro días de duración, en el que existen unos cambios hormonales importantes derivados del mismo (Lisk, 1985). Se pueden distinguir las 4 fases anteriormente mencionadas:

a.- Proestro o periodo de preparación, marca el inicio de la fase folicular con la consiguiente liberación de las hormonas gonadotropas, sobre todo de hormona folículoestimulante FSH que dan lugar al crecimiento y desarrollo folicular y por tanto la producción de estrógenos. Esta fase tiene unas 8 horas de duración.

b.- Estro o fase de receptividad sexual, de un día de duración, donde se alcanza el máximo nivel de estrógenos, aumentando la hormona luteinizante (LH) y disminuyendo la FSH. En esta fase tiene lugar la ovulación, con desprendimiento parcial del epitelio uterino.

c.- Metaestro, los cuerpos lúteos inician su desarrollo, se comienza a sintetizar progesterona, disminuyendo la secreción de estrógenos. Suele incluirse dentro del diestro.

c.- Diestro, los cuerpos lúteos alcanzan su máxima actividad. Esta fase tiene 2 días de duración.

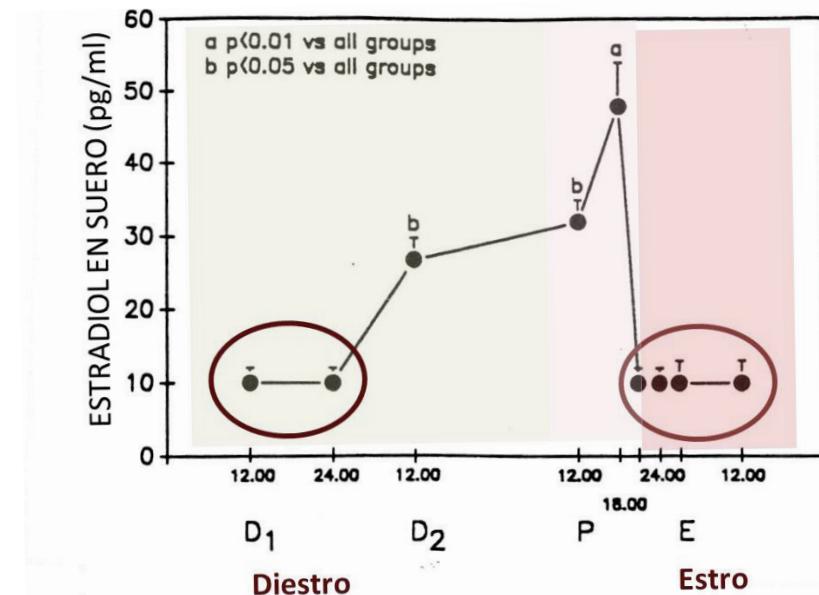


Figura 1 Niveles de estradiol en suero del hamster hembra. Adaptado de Menéndez-Peláez y cols. 1991 (Menendez-Pelaez et al., 1991a)

Estas variaciones hormonales producen su efecto no sólo a nivel de los órganos reproductores principales. Para garantizar el éxito reproductor es necesario modular una respuesta compleja que incluya al animal de una forma más integral. La glándula de Harder posee receptores de estrógenos (Varriale, 1996). También se ha descrito el drástico efecto de la ovariectomía, masculinizando de forma notable la morfología y función de esta glándula (Menendez-Pelaez et al., 1988; Spike et al., 1986). Incluso Payne y colaboradores han demostrado cambios en la función glandular a lo largo del ciclo estral (Payne et al., 1979), lo cual parece integrar a nuestra glándula en esta respuesta con fines reproductores.

El estradiol, es el estrógeno principal en la hembra adulta, derivado de la testosterona. Debido a que la glándula de Harder posee receptores para esta hormona, sus variaciones plasmáticas suponen cambios en nuestro órgano de estudio. Se le han atribuido diversas funciones, no solo las estrictamente reproductoras, sino que también se le conocen propiedades antioxidantes (Behl et al., 1995). Su efecto se observa en diferentes órganos y tejidos, como el cerebro, en tejido sanguíneo, hígado, y, por supuesto en nuestra glándula de estudio, la GH del hámster Sirio (Payne, 1979).

LA GLÁNDULA DE HARDER DEL HÁMSTER SIRIO

Fue en 1694 cuando Jacob Harder (1656-1711) describió por primera vez su “glandula nova lachrymalis”, a la que le atribuía la función de humedecer la superficie ocular del gamo (*Dama dama*) y del ciervo (*Cervus elaphus*). Con el paso del tiempo, se descubrió que esta glándula, posteriormente denominada glándula de Harder (GH), estaba presente en todos los vertebrados terrestres, aunque sólo aparece de forma rudimentaria en monos y vestigial en fetos humanos de entre 11 y 30 semanas de gestación (Brownscheidle and Niewenhuis, 1978).

Entre las funciones que se le han atribuido, pese a que la principal sea la de lubricación de la córnea (Sakai, 1981), cabe destacar, la producción de feromonas, funciones de fotorrecepción extrapineal y de termorregulación (Payne 1994). Así como funciones relacionadas con el eje pineal-gonadal (Hoffman et al., 1985) y la síntesis de melatonina (Menendez-Pelaez et al., 1993). La GH ha sido incluso implicada en funciones inmunes locales en algunos taxones e incluso parece desempeñar un papel relevante en el sistema vomeronasal (Hillenius et al., 2007), e incluso en funciones de osmorregulación (Chieffi Baccari et al., 1992). Sin embargo, pese a tal diversidad de posibles funciones, aún no se le adscrito una función certera, así como tampoco están descritas satisfactoriamente muchas de sus características morfológicas.

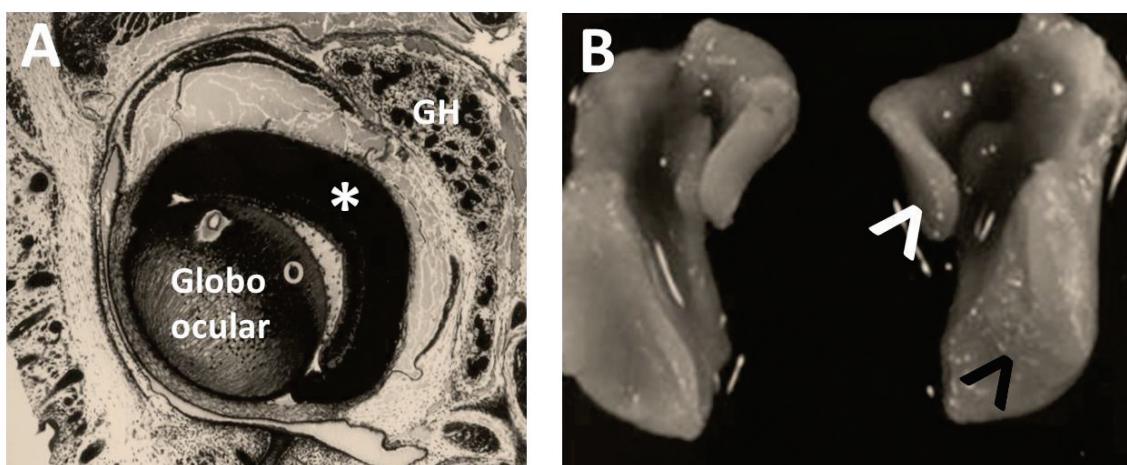


Figura 2 A) Fotografía de microscopía óptica de la cavidad ocular de un embrión de hámster Sirio hembra en la que se puede observar la localización de la glándula de Harder (GH) cerca de la retina (asterisco), en la región retro-orbital. x55. B) Fotografía macroscópica de glándulas de Harder de hámster Sirio donde se pueden distinguir los lóbulos grande (punta de flecha negra) y pequeño (punta de flecha blanca). Fotografías por cortesía del Dr. Delio Tolivia.

La glándula de Harder del hámster sirio (*Mesocricetus auratus*) ha sido objeto de numerosos estudios puesto que presenta un fuerte dimorfismo sexual. Dichas diferencias son a nivel morfológico, en cuanto a tipos celulares (Payne et al., 1982; Rodriguez-Colunga et al., 1993), como bioquímico. El dimorfismo sexual que presenta la glándula respecto a este último nivel, se ve bien representado con importantes diferencias tanto en el patrón proteico (Buzzell et al., 1990; Varriale et al., 1992), como lípidico (Seyama et al., 1996a). Así como, también, en cuanto al contenido de indolaminas (Marrufo et al., 1989; Menendez-Pelaez et al., 1991a) y al acúmulo y síntesis de porfirinas (Menendez-Pelaez et al., 1991b; Payne et al., 1977). Este diferente patrón sexo-dependiente conlleva unas repercusiones de gran relevancia fisiológica.

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

La GH del hámster Sirio (*Mesocricetus auratus*) es una glándula túbulo-alveolar simple localizada en posición medial y posterior al globo ocular.

Estructuralmente, se distinguen en la glándula distintos componentes:

- Células mioepiteliales: Red de células que se localiza entre la lámina basal y la porción basal de las células acinares. Constituyen el elemento contráctil del acino, que contribuye a la secreción del contenido acinar.
- Tejido intersticial: Es el tejido conjuntivo que se sitúa entre los túbulo-alvéolos glandulares. Está constituido por fibras de colágeno, fibroblastos, vasos sanguíneos y nervios.
- Células epiteliales: Son las que constituyen el componente glandular del acino. De morfología piramidal, poseen un núcleo grande y redondeado desplazado hacia la zona basal de la célula. Estas células se caracterizan por contener una gran cantidad de gotas lipídicas de distintos tamaños que son las responsables de la actividad secretora de la glándula, así como también son responsables del dimorfismo sexual a nivel morfológico. En esta especie, la GH presenta dos tipos de células epiteliales (tipo I y tipo II) cuya disparidad viene marcada por el tamaño de las gotas lipídicas y, consecuentemente, por el volumen de citoplasma que éstas ocupan, por tanto:

Autofagia en el ciclo estral

- Células de tipo I: poseen gotas lipídicas pequeñas, numerosas mitocondrias y un denso citoplasma rico en retículo endoplásmico. Cabe destacar como la parte apical de dichas células está cubierto de microvilli, intercalados con zonas de liberación de gotas lipídicas (McGadey et al., 1992).
- Células de tipo II: se caracterizan por contener grandes gotas lipídicas que ocupan casi todo el espacio citoplasmático, por lo que este tipo celular tiene relativamente pocos orgánulos.

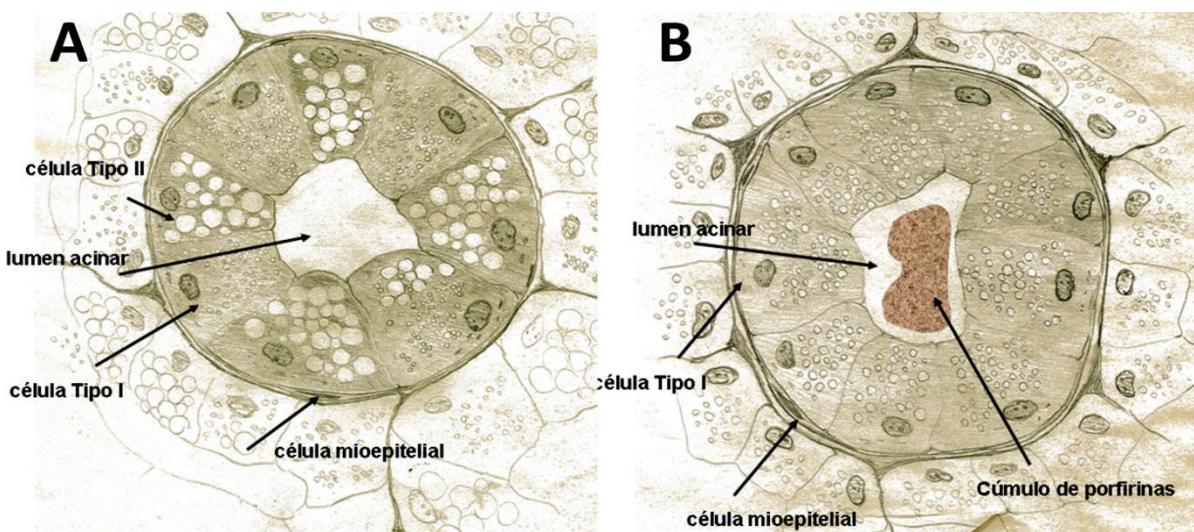


Figura 3 A) Representación esquemática de un túculo-alveolo de glándula de Harder de un hámster Sirio macho. B) Representación esquemática de un túculo-alveolo de glándula de Harder de un hámster Sirio hembra. Fotografías de dibujos cedidos por el Dr. Delio Tolivia.

Hasta el momento no se ha podido establecer si se trata de dos tipos celulares independientes o si es un mismo tipo celular con diferente actividad secretora, puesto que no se han encontrado dos precursores celulares diferenciados (Payne, 1994). Está bien documentado que las hormonas sexuales ejercen un fuerte control en la distribución de estos tipos celulares. En aquellos estudios en los que se ha manipulado el contenido de hormonas sexuales se ha visto cómo se producen cambios en los tipos celulares hacia un fenotipo masculino o femenino, en función de la hormona que suprimamos, efecto que se revierte mediante el tratamiento con la hormona sexual suprimida (Antolin et al., 1996; Spike et al., 1985). Estos datos parecen apoyar la hipótesis de que esta glándula no presenta dos tipos celulares independientes, sino que más bien un solo tipo celular en distintas fases de actividad (Lopez et al., 1992).

TIPOS DE SECRECIÓN

Pese a que dicha glándula carece de un sistema de conductos, algunos túbulo-alveolos se modifican de forma que se ensancha el espacio luminal para que el producto de secreción se dirija y centre en la zona del hilio, donde se encuentran tubos colectores como tal para la expulsión de la secrección. Dicha descripción correspondería a lo conocido como una glándula exocrina. Pese a que se postuló que el mecanismo de secreción era esencialmente apocrino, característico en las glándulas secretoras de lípidos, la naturaleza de la secreción de esta glándula generó una gran controversia, ya que se ha observado como gotas lipídicas son secretadas mediante exocitosis, convirtiendo a la GH en el único ejemplo de una glándula exocrina en la cual los lípidos se secretan por exocitosis (Payne, 1994). Además de dicha apreciación, nuestro grupo ha descrito cómo esta glándula está adscrita a procesos de secreción holocrina (Vega-Naredo et al., 2009), en los que células enteras son desprendidas a la luz tubular, corroborado por restos citoplasmicos y núcleos de aspecto picnótico encontrados en la luz de los tubos e incluso la liberación de restos acinares al tejido conjuntivo subyacente originando fenómenos muy destacables a nivel morfológico, la producción de masas sincitiales.

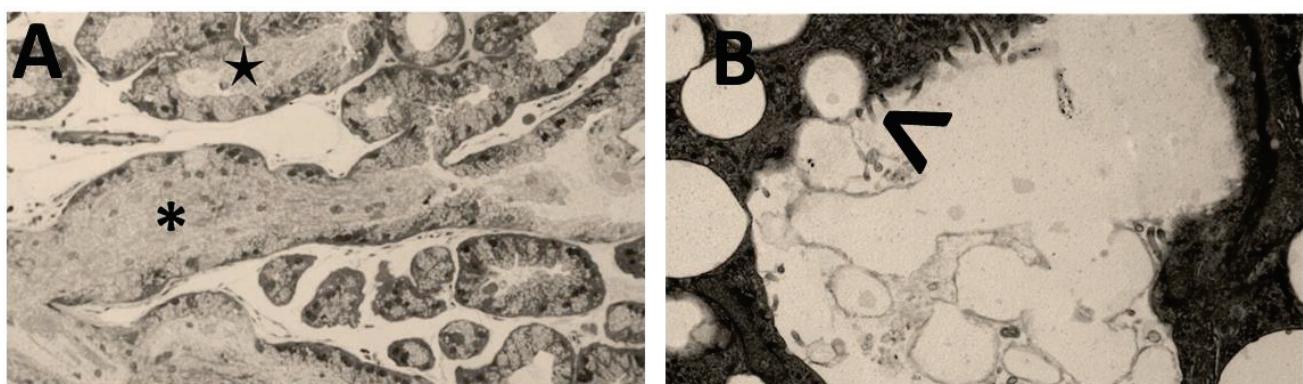


Figura 4 A) GH de hámster hembra. Sección semifina teñida con azul de toluidina donde se puede apreciar las masas de material glandular (asterisco) de contenido similar al que aparece en el espacio intraluminal (estrella). x100. B) Apariencia ultraestructural de la luz glandular de un hámster hembra, donde se puede apreciar un proceso de exocitosis (cabeza de flecha). 15000x

Dichas masas habían sido descritas profundamente en nuestro grupo (Tolivia et al., 1996; Tomas-Zapico et al., 2005b), habiendo sido observadas exclusivamente en GH de hámster hembra, sumando un aspecto más al ya más comentado dimorfismo sexual.

Autofagia en el ciclo estral

PRODUCTOS DE SECRECIÓN

Los lípidos constituyen, junto a las porfirinas, el principal producto de secreción de la glándula de Harder de los roedores.

LIPIDOS

Estudios bioquímicos han mostrado como el 35% del peso total de la glándula son lípidos (Watanabe, 1980), siendo el más importante producto de secreción. Aunque su papel biológico está aún por determinar, se ha propuesto que actúen como lubricante de la membrana nictitante, y, probablemente, sirvan como solvente para feromonas u otras sustancias biológicamente activas (Seyama and Uchijima, 2007). Cerca del 92% del contenido lipídico de la glándula es 1-alquil-2,3-diacil-glicerol (ADG), aunque los ácidos grasos de la GH presentan un elevado dimorfismo sexual (Seyama et al., 1995). Los diacil-gliceroles de los machos presentan predominantemente ácidos grasos lineales, mientras que los de las hembras contienen también ácidos grasos ramificados (Seyama and Uchijima, 2007). Además, este dimorfismo sexual en el 1-alquil-2,3-diacil-glicerol se encuentra también bajo control androgénico (Seyama et al., 1996b).

PORFIRINAS

Estás moléculas, que constituyen el grupo prostético de importantes proteínas, como la hemoglobina, la clorofila y los citocromos, son uno de los principales productos de secreción de la glándula, y desempeñan uno de los papeles más importantes en el dimorfismo sexual, cuyas diferencias se aprecian tanto a nivel macroscópico como microscópico. La GH posee las enzimas necesarias para la síntesis del grupo hemo, sin embargo, se caracteriza por una baja actividad ferroquelatasa, lo que conlleva un acumulo de protoporfirina IX principalmente (Thompson et al., 1984).

Este acúmulo es entre 100 y 1000 veces mayor en la glándula de las hembras respecto a la de los machos, ocasionando que se acumule en los espacios luminales, y sean apreciables a microscopia óptica. A simple vista, dotar a la GH de las hembras de una coloración rojiza de la que carecen los machos. Pese a que en los machos no existen estos acúmulos, la proporción

intracelular de porfirinas excede con mucho la de otros órganos porfirígenicos como el hígado o el riñón (Payne et al., 1977; Spike et al., 1985).

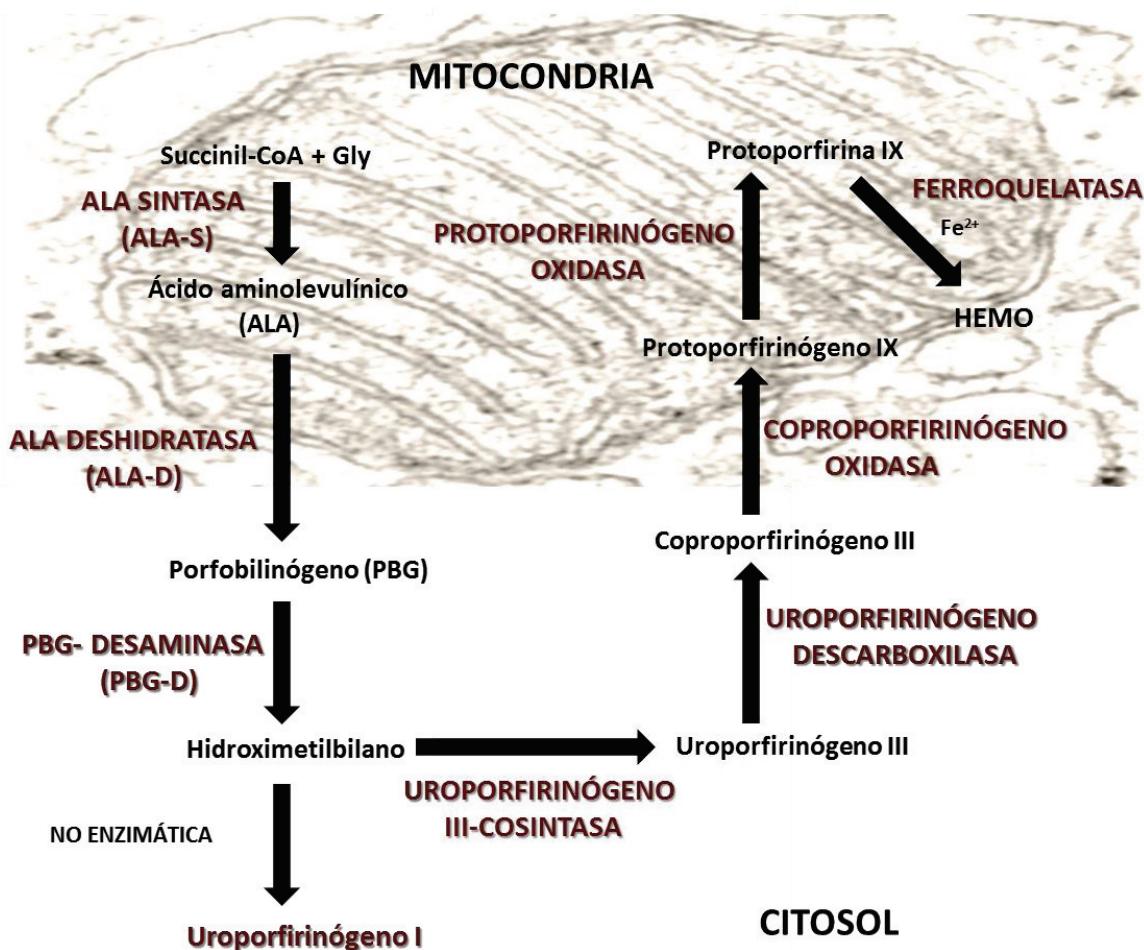


Figura 5 Ruta de síntesis del hemo. El enzima ácido δ -aminolevulínico sintasa (ALA-S; E.C. 2.3.1.37) es el primero en la ruta de biosíntesis de porfirinas y cataliza la condensación de glicina y succinil-CoA para formar ácido δ -aminolevulínico (ALA). La mitocondria exporta el ALA al citoplasma para la formación de porfobilinógeno, la desaminación de la cadena lateral, etc. Los pasos finales (oxidación de la cadena lateral y deshidrogenación) se llevan a cabo, de nuevo, en la mitocondria. La glándula de Harder, al igual que el hígado, contiene todos los enzimas implicados en la síntesis del grupo hemo. En el hígado ALA-S y PBG-D son los principales puntos de control, siendo regulados negativamente por la presencia de hemo. En la glándula de Harder los bajos niveles de actividad ferroquelatasa implican la acumulación de protoporfirina IX.

MODELO DE ESTRÉS OXIDATIVO

Debido a la posición yuxtaocular de la glándula y la elevada síntesis de porfirinas, en la GH de las hembras se acumulan un gran número de moléculas de alta reactividad y elevada toxicidad, lo cual produce un estado de elevado estrés oxidativo. Determinadas respuestas

Autofagia en el ciclo estral

frente al estrés oxidativo son necesarias para el desarrollo de diferentes respuestas fisiológicas, como la ovulación, siendo comparado con un proceso inflamatorio. Sin embargo, el estrés oxidativo está considerado también como actor fundamental en procesos de muerte celular, envejecimiento y mutagénesis, estando además implicado en muchos tipos de enfermedades como cáncer, trauma post-isquémico y desórdenes neurodegenerativos (Behrend y cols. 2003; Caballero y cols. 2009b). Aparte de su indiscutible significado patofisiológico, pocas células y órganos permanecen expuestos, de forma crónica y fisiológica, a altos niveles de estrés oxidativo, de forma que la ausencia de buenos modelos experimentales dificulta el estudio del papel del estrés oxidativo bajo condiciones “normales” o fisiológicas. La GH del hámster Sirio es uno de esos órganos expuestos crónicamente a niveles anormalmente altos de estrés oxidativo por lo que resulta un modelo excelente para el estudio de dicha patología.

ESTRÉS OXIDATIVO

Los radicales libres son moléculas altamente inestables y reactivas al poseer un electrón desapareado en su orbital exterior. Son productos del metabolismo normal de la célula que pueden jugar un papel tanto beneficioso como dañino en el organismo. Mientras que a bajas o moderadas concentraciones pueden generar efectos positivos, puesto que participan en la defensa frente a agentes infecciosos y en las rutas de señalización celular, a altas concentraciones generan una situación altamente perjudicial denominada estrés oxidativo. Esto que puede ocurrir tanto en condiciones fisiológicas como patológicas y que provoca el desequilibrio del delicado balance oxidativo existente entre la producción de especies reactivas y su eliminación, puede desencadenar una cascada de procesos dañinos (Kohen and Nyska, 2002) que pueden afectar a los lípidos, proteínas y DNA, ocasionando el daño oxidativo.

Las principales Especies Reactivas del Oxígeno (EROs) son las siguientes:

El radical superóxido (O_2^-) se produce “in vivo” por varias vías, aunque su principal fuente de producción es la cadena de transporte de electrones de la mitocondria. Una vez formado dismuta rápidamente a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual no es especialmente tóxico por sí mismo y se puede encontrar en altas concentraciones dentro de las células (Figura 6). El H_2O_2 difunde rápidamente a través de las membranas celulares, de forma que puede llegar fácilmente a sitios distantes de los que fue generado. Sin embargo, el radical superóxido en presencia de metales de transición, como pueden ser el Fe^{2+} y el Cu^{2+} , el H_2O_2 se reduce a radical hidroxilo (OH^-) a través de la reacción de Fenton. El radical (OH^-) es la especie reactiva de oxígeno más activa y mejor estudiada. Una vez formado reacciona rápidamente con cualquier molécula que se encuentre en las cercanías del lugar donde se ha producido, pudiendo producir daño en el ADN, tanto mitocondrial como nuclear, y dañar lípidos de membrana y proteínas.

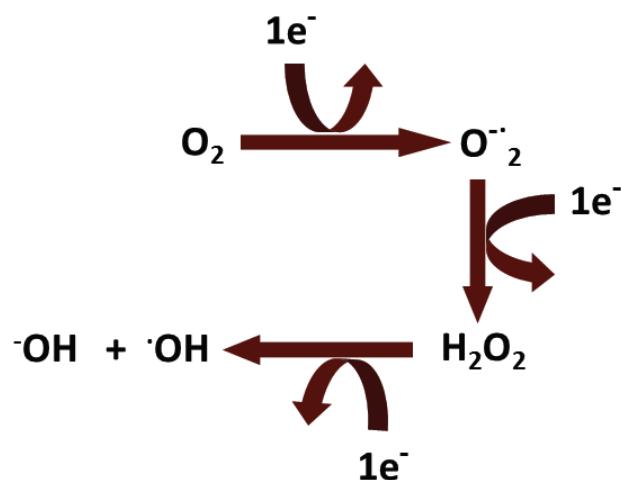


Figura 6 Especies reactivas del oxígeno Cuando el oxígeno molecular adquiere un electrón, se genera el radical superóxido (O_2^-) este dismuta rápidamente a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que se puede reducir a radical hidroxilo (OH^-) principalmente en presencia de

Otras fuentes de EROS endógenas incluyen reacciones en las que participan oxidasa peroxisomales, enzimas como el citocromo P-450, NADPH oxidadas o xantina oxidadas. Una gran variedad de estímulos exógenos como infecciones, xenobióticos, herbicidas e insecticidas, contaminación ambiental y radiación ultravioleta también pueden implicarse en la producción de EROS.

DEFENSA ANTIOXIDANTE

La producción de radicales libres como resultado del metabolismo celular generó la producción de una respuesta evolutiva adecuada para evitar el daño que podrían ocasionar, que

Autofagia en el ciclo estral

se conoce como defensa antioxidante. Se define como antioxidante a aquella sustancia que se encuentra en pequeñas concentraciones, comparada con el sustrato oxidable, que inhibe o retarda significativamente la oxidación de dicho sustrato sin perder su propia estabilidad electroquímica.

El organismo cuenta con dos sistemas principales de defensa que le permiten neutralizar el estrés oxidativo: los enzimas antioxidantes y los depuradores no enzimáticos de radicales libres que conforma una compleja red antioxidante con la función de mantener la homeostasis tisular.

ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Los principales enzimas involucrados en la eliminación de especies reactivas de oxígeno son: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GSH-Px)- glutatión reductasa (GR).

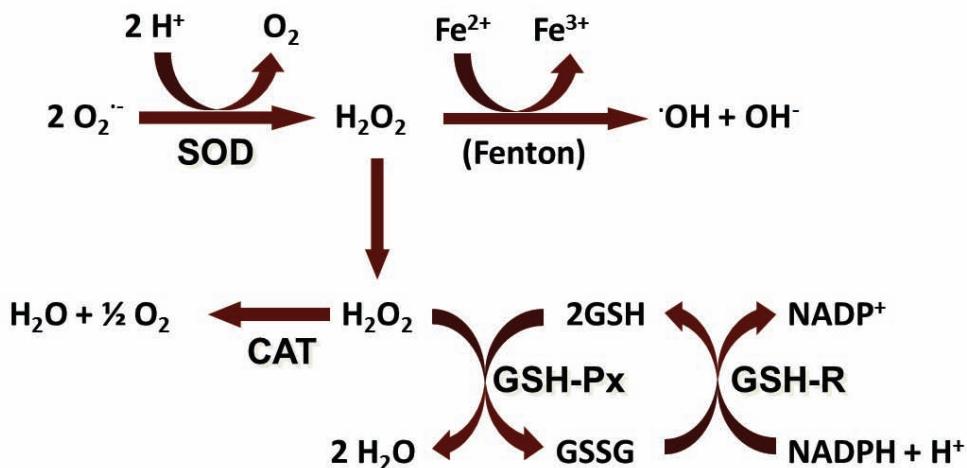


Figura 7 Sistema enzimático de defensa antioxidante. El enzima Superóxido dismutasa (SOD) permite la dismutación del anión superóxido (O_2^-) en oxígeno molecular (O_2) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), cuya acumulación es evitada por la actividad de dos enzimas: la catalasa (CAT), que lo transforma en agua (H_2O) y O_2 , y el tandem glutatión peroxidasa/reductasa (GSH-Px/GSH-R).

La SOD, cataliza la dismutación del anión superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno, está distribuida universalmente en todas las células con respiración aerobia. Se considera que es uno de los más importantes enzimas antioxidantes, sin embargo, su papel como antioxidante pasa siempre por un acoplamiento perfecto con los enzimas encargados de neutralizar el H_2O_2 , producto de la reacción de este enzima. En eucariotas superiores hay tres

formas del enzima: SOD citosólica o SOD1 (con cobre y zinc en su centro activo), SOD mitocondrial o SOD2 (con manganeso en su centro activo) y SOD extracelular o SOD3 (con cobre y zinc en su centro activo) (Loschen et al., 1974).

La CAT y el sistema GSH-Px/GR ayudan a eliminar el H₂O₂ (Figura 7). La CAT se encuentra principalmente dentro de compartimentos celulares con membranas, como por ejemplo los peroxisomas y actúa con una baja afinidad por su sustrato.

El sistema GSH-Px/GR consiste en varios componentes, incluyendo los enzimas GSH-Px y GR y los cofactores glutatióñ (GSH/GSSG) y nicotinamida adenosina dinucleótido fosfato (NADPH) como donador. GPx utiliza el glutatióñ reducido (GSH) para reducir el H₂O₂ liberando el glutatióñ oxidado (GSSG) y H₂O y tiene una alta afinidad por su sustrato.

MELATONINA

La melatonina es una indolamina derivada del triptófano. La glándula pineal es la principal fuente de melatonina sérica, con un ritmo de secreción sincronizado con el ciclo de luz/oscuridad, presentando un máximo nocturno y unos niveles basales diurnos. Esto la convierte en la principal reguladora de ritmos circadianos y del ciclo sueño-vigilia (Pandi-Perumal et al., 2006). Pero son muchas otras las funciones que esta indolamina desempeña en los seres vivos: interviene en la fisiología neuroendocrina, especialmente en la reproductiva (Reiter, 1973), es inmunomoduladora (Maestroni, 2001), interviene en el crecimiento cancerígeno (Blask et al., 2005) y actúa como antioxidante fundamentalmente gracias a la melatonina extrapineal.

Ya que la melatonina es también producida por otros órganos como la retina, la médula ósea, el tracto gastrointestinal, la piel y la glándula de Harder sin aparente ritmo circadiano de producción (Reiter et al., 2000).

Durante las últimas décadas, la melatonina ha adquirido especial relevancia debido a su papel como antioxidante, papel que desempeña de forma directa, al ser capaz de captar radicales libres (Allegra et al., 2003; Hardeland et al., 1993) e indirecta al estimular la expresión y actividad de los principales enzimas antioxidantes (Tomás-Zapico y cols., 2002a, 2002b).

Autofagia en el ciclo estral

Gracias a su pequeño tamaño y su naturaleza elevadamente lipofílica y moderadamente hidrofílica, la melatonina es capaz de penetrar en todas las células y compartimentos celulares del organismo (Reiter et al., 2000). Sin embargo se han descrito, hasta el momento, dos tipos de receptores de membrana: MT1 y MT2 (Reppert et al., 1994); y nucleares, como el ROR α , perteneciente a la familia de receptores huérfanos relacionados con el ácido retinoico (ROR/RZR). Parece que tanto en la regulación de la actividad de los enzimas antioxidantes como en la síntesis de sus ARNm en la GH ambos están implicados (Coto-Montes et al., 2003; Rodriguez et al., 2004; Tomas-Zapico et al., 2005a). Así mismo, se ha descrito como esta indolamina puede activar o inhibir cascadas de transducción de señales mediante receptores o sin ellos (Reiter, 1991).

La GH está sujeta a los efectos de la melatonina circulante y, por tanto, es diana de dichas señales día/noche. Nuestro grupo ha descrito la expresión de receptores de melatonina en la glándula, tanto de membrana, el MT1, como el nuclear ROR α (Tomas-Zapico et al., 2005a).

Pero, al mismo tiempo, esta glándula también es capaz de sintetizar su propia melatonina, representando una fuente de producción extrapineal importante (Gunduz, 2002). Interesantemente, en base a la actividad HIOMT, la producción de melatonina harderiana es mayor en hembras que en machos (Menéndez-Peláez y cols. 1987; Buzzell y cols. 1990), lo cual correlaciona directamente con la concentración de porfirinas. Mostrando así, la intensa labor antioxidante de dicha indolamina en la glándula. Además se ha demostrado como el tratamiento con melatonina en hembras durante más de tres meses provoca un descenso en el área luminal ocupado por porfirinas. Sin embargo, si se administra durante períodos inferiores no provoca ningún cambio en los depósitos (Rodríguez-Colunga et al., 1991). Resultados de nuestro grupo (Tomás-Zapico y cols. 2002a) demostraron que la administración de melatonina durante 15 días disminuyó la actividad ALA sintasa. Así mismo, no podemos olvidar el efecto que la melatonina tiene en la actividad y morfología de la glándula, afectando de manera muy dispar a hembras y machos, sugiriendo una interacción con el sistema reproductor (Rodríguez-Colunga et al., 1991). Como ejemplo de dicha interrelación melatonina-hormonas sexuales cabe destacar como el tratamiento con melatonina puede modificar el número de células de tipo II (Rodríguez-

Colunga et al., 1991), mientras que estos efectos desaparecen en animales castrados (Rodriguez-Colunga et al., 1991).

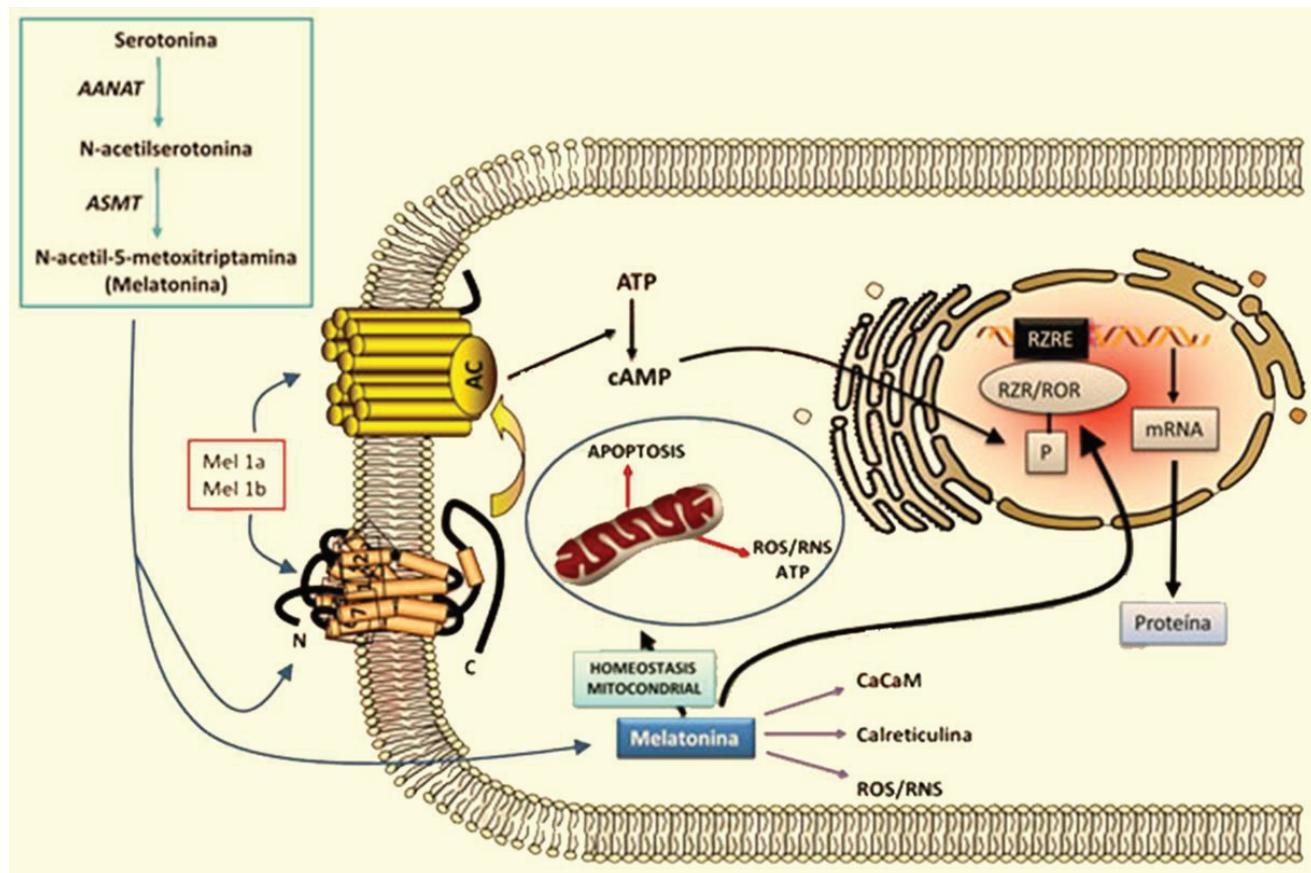


Figura 8 Los mecanismos de acción de la melatonina son múltiples. Actúa sobre receptores de membrana (MT1 y MT2); sobre receptores nucleares (ROR/RZR), sobre proteínas citosólica ligadoras de calcio (calmodulina, calreticulina); sobre la mitocondria manteniendo la homeostasis mitocondrial, y depurando radicales libres allí donde se produzcan.

DAÑO OXIDATIVO

Pese a las diferentes estrategias que desarrollan evolutivamente las células para eludir el efecto de los radicales libres y neutralizar su acción, en ocasiones no son suficientes y el balance entre especies reactivas y antioxidantes se pierde a favor de los primeros produciendo el conocido estrés oxidativo. Cuando el estrés oxidativo se prolonga en el tiempo, los radicales libres ejercen su efecto sobre las principales macromoléculas celulares produciendo afectación tanto en lípidos, proteínas o el ADN, conocido como daño oxidativo.

Autofagia en el ciclo estral

LA LIPOPEROXIDACIÓN (LPO), u oxidación lipídica, es un proceso degradativo de autooxidación que implica una propagación en cadena de reacciones de radicales libres que afecta mayoritariamente a ácidos grasos poliinsaturados abundantes en las membranas biológicas y en las lipoproteínas, y que culmina en la formación de hidroperóxidos lipídicos y aldehídos lo suficientemente tóxicos como para reaccionar con otros ácidos grasos poliinsaturados (Figura 9).

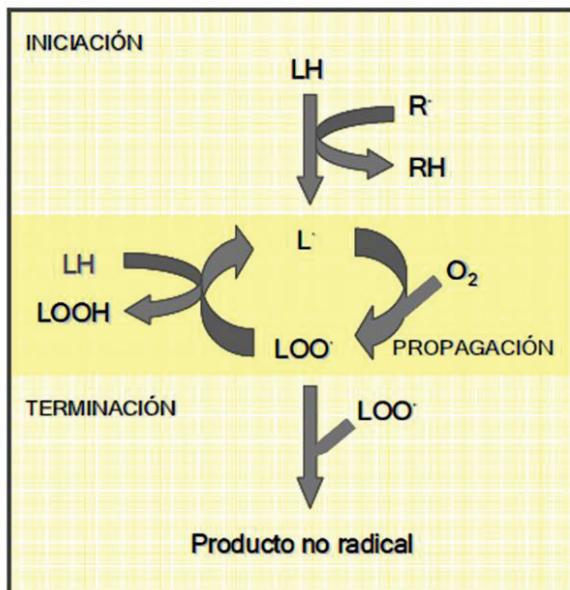


Figura 9 Proceso de lipoperoxidación (LPO). El proceso de LPO consta de tres fases: iniciación, propagación y terminación. La iniciación comienza cuando un radical libre sustrae un átomo de hidrógeno de un ácido graso (LH), formándose un radical alquilo ($L\cdot$) que a su vez reacciona rápidamente con el oxígeno molecular formando radicales peroxilo ($LOO\cdot$). Este último, en la fase de propagación del proceso, vuelve a atacar a otro LH formando un hidroperóxido lipídico ($LOOH$) y más radicales alquilo y alcóxilo ($LO\cdot$). El proceso termina cuando se encuentran dos radicales lipídicos o un radical lipídico y un radical peroxilo ya que la reacción da lugar a un producto no radical.

Entre los aldehídos derivados de la LPO destacan el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) que puede ser producido por los ácidos araquidónico, linoleico o sus hidroperóxidos. El 4-HNE presenta un amplio rango de actividades biológicas, incluyendo la inhibición de la síntesis de proteínas y de ADN, inactivación de enzimas, estimulación de la fosfolipasa C, expresión de varios genes, etc... incluso puede reaccionar con proteínas y ADN para generar varios tipos de aductos (Esterbauer and Cheeseman, 1990). Cabe destacar la implicación de la LPO en la patogénesis de numerosas enfermedades, incluyendo ateroesclerosis, diabetes, cáncer y artritis reumatoide, así como en la toxicidad asociada a drogas y en procesos de envejecimiento (Uchida et al., 1999). Debido a su alto contenido lipídico, la glándula de Harder, es muy susceptible a sufrir este tipo de daño celular.

DAÑO PROTEÍCO (DP), los radicales libres producidos durante una situación de estrés oxidativo también pueden dañar el esqueleto peptídico de las proteínas, generando

proteínas carboniladas. Este proceso se inicia por la sustracción del hidrógeno de un carbono alfa en una cadena polipeptídica. Alternativamente, el oxígeno molecular puede atacar al radical del carbono para formar intermediarios peróxidos llevando finalmente a la formación de péptidos que contienen carbonilos (Dean et al., 1997) (Figura 10).

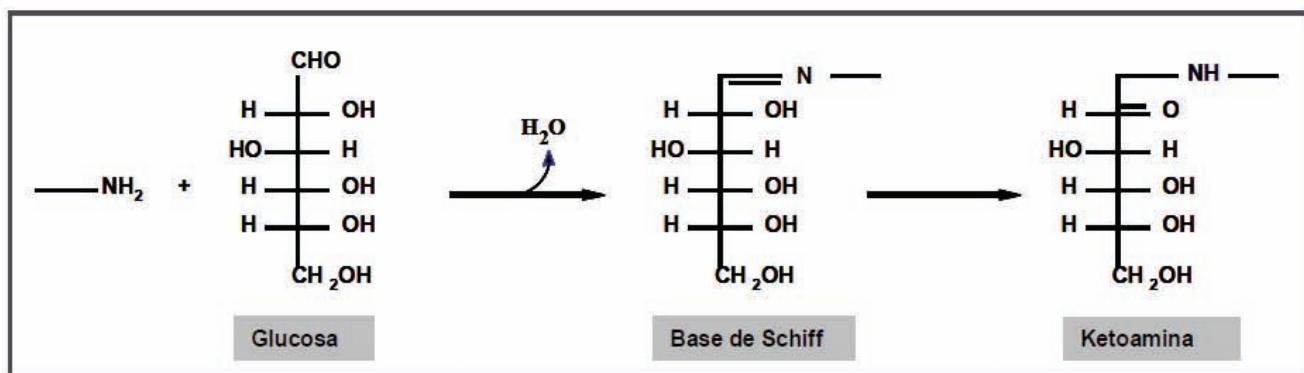


Figura 10 Formación de grupos carbonilo en residuos aminoacídicos de proteínas como ejemplo de daño oxidativo proteíco (DP).

Las proteínas carboniladas se acumulan en una gran variedad de organismos durante el envejecimiento y en enfermedades relacionadas con el mismo (Levine and Stadtman, 2001). También se han encontrado proteínas modificadas por productos derivados de la LPO en enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Uchida, 2000).

DAÑO DE ADN, a exposición a oxidantes lleva también al incremento del daño a ácidos nucleicos. El daño al ADN puede resultar de reacciones con los residuos de desoxirribosa, con el esqueleto fosfodiéster o con las bases nitrogenadas. Habitualmente se produce por acción de radicales hidroxilo y epóxidos sobre las bases nitrogenadas, dando lugar a especies como la 8-oxo-deoxiguanosina. Las lesiones del ADN que no son reparadas se van acumulando y pueden contribuir a la aparición de procesos mutagénicos y carcinogénicos (Chatgilialoglu and O'Neill, 2001). Sin embargo, el factor de transcripción p53 puede ser activado en respuesta al daño oxidativo en el ADN, favoreciendo la detención del ciclo celular y la corrección de los daños del material genético o, en el caso de un daño mayor, disparando la muerte programada de la célula.

REACCIONES PROOXIDANTES DE LAS PORFIRINAS

La acumulación de ácido aminolevulínico (ALA) y protoporfirina IX en contacto con la luz que se produce en la GH es responsable de un tipo de estrés oxidativo fisiológico que incluye fotorreacciones de estos compuestos. Las propiedades fotosensibles de las porfirinas están basadas en la absorción de un fotón de luz que genera un estado de alta energía. La porfirina activada de esta manera, reacciona directamente con moléculas diana o con el oxígeno molecular, generando oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) (Dai et al., 1999). Además, otras EROs, como O_2^\cdot , H_2O_2 y OH^\cdot , también juegan un papel relevante en la citotoxicidad mediada por porfirinas fotosensibles, de forma que la estructura química de la porfirina influye en la cantidad y tipo de EROs que se producen durante la irradiación (Haberman y Menon 1993). Así mismo, el ALA y las porfirinas pueden ser generadores de EROs en ausencia de luz activadora (Demasi et al., 1997). La autooxidación de ALA a pH fisiológico está catalizada por metales y lleva a la formación de EROs y del radical ALA (ALA $^\cdot$) (Costa et al., 1997). El ALA, como precursor del hemo, se suele acumular en muchos tejidos durante enfermedades como la porfiria aguda intermitente (PAI), la coproporfiria hereditaria, la porfiria variegata y el envenenamiento por plomo. Además, es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, produciendo daño en el sistema nervioso central y neuropatías periféricas (Ryter and Tyrrell, 2000).

Previamente se ha propuesto a la GH como modelo para el estudio de la situación patológica que se produce en la *porfiria cutanea tarda*, en la cual, ocurren el mismo tipo de fotorreacciones que originan lesiones en la piel, mientras que en la glándula se trata de una situación fisiológica. Así mismo en otros tipos de porfiria, como en la PAI, se ha observado como el grado de afectación varía mucho en función de los cambios en los hormonas sexuales, produciendo sus crisis en momentos de altos niveles de las mismas. De manera general, análoga la función de la glándula en cuanto a la producción de porfirinas, se ve muy afectada por estos mismos cambios hormonales (Payne et al., 1979).

La GH parece sobrevivir en un estado de porfiria permanente, sin que por ello su integridad funcional se vea afectada, así mismo posee puntos en común con determinadas

porfirias. Por todo esto, la GH de hámster Sirio es también un modelo excelente para el estudio de las porfirinas (Coto-Montes et al., 2001a).

RESPUESTA CELULAR AL ESTRÉS OXIDATIVO

Como ya indicamos anteriormente los radicales libres son generados intracelularmente a

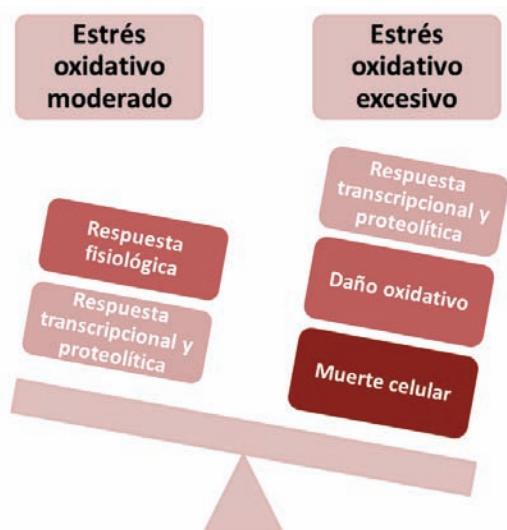


Figura 11 Respuesta celular al estrés oxidativo.

El estrés oxidativo moderado genera una respuesta a nivel transcripcional y proteolítica que culmina se traduce en una respuesta fisiologica. Sin embargo, cuando el estrés oxidativo es excesivo la respuesta originada no siempre es suficiente para eliminar todo el daño producido y culmina en la muerte celular.

través de una gran variedad de procesos, como productos derivados del metabolismo aeróbico normal o como mensajeros secundarios en varias rutas de transducción de señales. Bajos niveles de EROs promueven rutas de proliferación y supervivencia, llegando incluso a mediar respuestas fisiológicas; en contraste, un severo incremento de los mismos induce rutas de muerte celular. Dichas rutas ejercen su influencia a dos niveles principalmente, a través de la modulación de la actividad de factores de transcripción, afectando al patrón de expresión génica; y modulando los sistemas proteolíticos celulares.

FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN SENSIBLES AL ESTRÉS OXIDATIVO

Cuando el balance redox se pierde a favor de las sustancias oxidantes, los factores de transcripción sensibles al estado redox, como el Factor Nuclear kappaB (NF-κB) o el Factor relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2), se promueven y dirigen respuestas celulares con la intención de recuperar la homeostasis.

VÍA NF-κB

El NF-κB es uno de los factores de transcripción más altamente estudiados, cuya señalización NF-κB puede ser activada en respuesta a estímulos como el estrés oxidativo, proteínas mitogénicas, citoquinas o productos bacterianos (Kratsovnik et al., 2005; Li and Verma, 2002; Schreck and Baeuerle, 1991). Esta respuesta es característicamente rápida, ya que no requiere su propia síntesis para que estimule la transcripción de multitud de genes.

El NF-κB comprende una familia de proteínas compuesta por homodímeros o heterodímeros de las proteínas p50 (NF-κB1), p65 (RelA), p52 (NF-κB2), Rel B y cRel. Este factor de transcripción es reprimido en el citosol por moléculas inhibidoras κB ($I\kappa B\alpha$, β y γ). La fosforilación del $I\kappa B$ favorece la degradación del mismo a través del proteosoma, permitiendo la liberación y entrada al núcleo del NF-κB, que precisa su fosforilación para el paso al núcleo, donde controla la transcripción de numerosos genes de supervivencia, muerte celular, proliferación, inflamación y regulación inmune (Fig. 10). El complejo de quinasas encargado de fosforilar el $I\kappa B$ (IKK) está formado por tres subunidades, dos catalíticas (IKK α y IKK β) y una reguladora (IKK γ o NEMO) (Spencer et al., 1997). Por último, las quinasas inductoras del NF-κB (NIK) fosforilan y activan directamente a IKK β para disparar la ruta de señalización NF-κB.

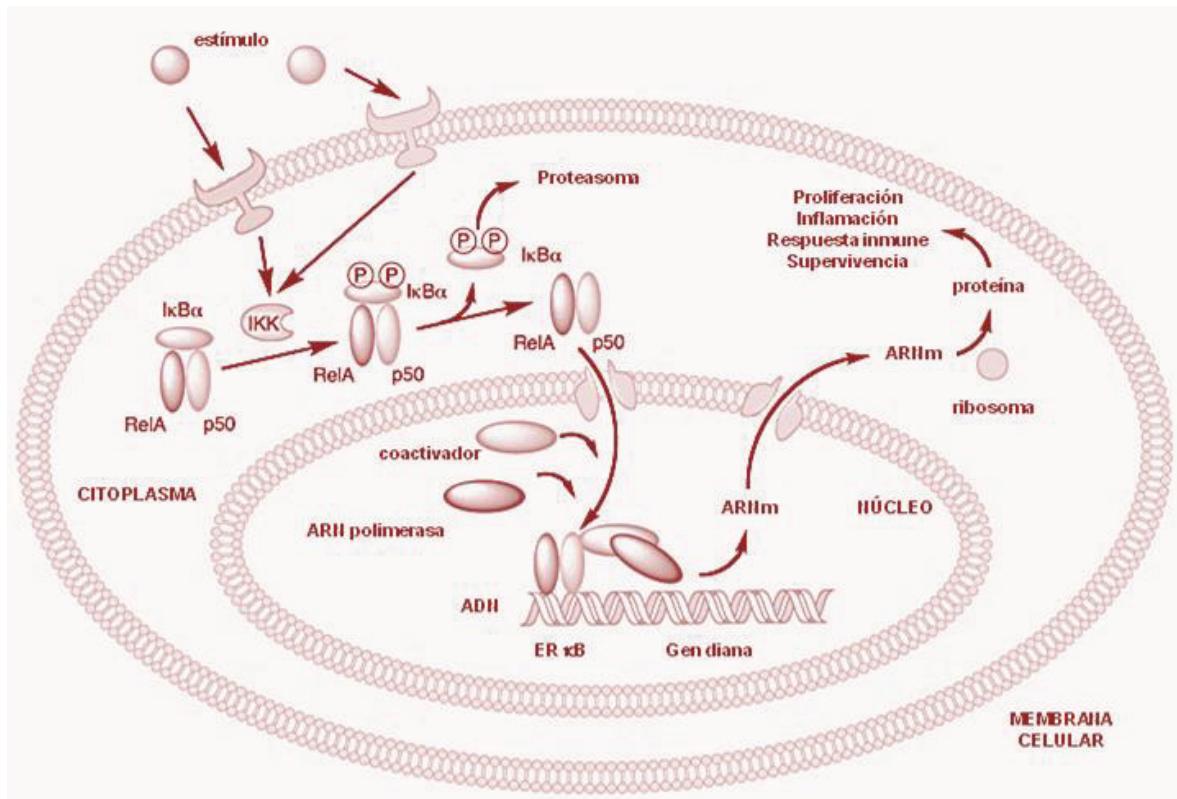


Figura 12 Ruta canónica de activación del factor de transcripción NF-κB. La fosforilación de las I-KB quinasas (IKK) conlleva su propia activación. Las IKK fosforilan el inhibidor I-KB. El I-KB fosforilado es diana del proteasoma y, una vez degradado, los dímeros NF-κB (p65/p50) pueden entrar al núcleo y unirse al ADN para la transcripción específica de genes implicados en proliferación, inflamación y supervivencia.

NRF2

Uno de los principales factores de transcripción que se encargan de aminorar el estrés oxidativo es el Factor relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2), que regula la expresión inducible de numerosos genes de enzimas destoxicantes y antioxidantes, mediante su unión a una secuencia específica del ADN, a las regiones ARE (Elemento de Respuesta Antioxidante). Los niveles basales de esta proteína se mantienen a un nivel bajo, lo cual resulta sorprendente ya que su expresión es constitutiva en la mayoría de las células, ésto sugiere que su actividad se encuentra fuertemente regulada. Para este propósito, la vía de señalización del Nrf2 se encuentra negativamente regulada por Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1). Esta proteína es el substrato y adaptador para el complejo ubiquitin-ligasa Cullin3. Keap1 se mantiene unida a Nrf2 y facilita su degradación por el proteasoma, manteniendo unos bajos niveles de Nrf2 en la célula, así como su mantenimiento en su forma inactiva. Cuando se elevan

Autofagia en el ciclo estral

los niveles de radicales libres, se produce la oxidación de los residuos sulfhidrilos de las cisteínas de Keap1, permitiendo la disociación del Keap1 y Nrf2, así que este Nrf2 se podrá dirigir al núcleo para activar la transcripción de los genes de las regiones ARE. Sin embargo, no solo la oxidación de Keap1 consigue su disociación de Nrf2, sino que existen otros mecanismos que conducen a la activación de Nrf2. Así se ha visto como la sobre-expresión de p62, produce el mismo efecto (Lau et al., 2010).

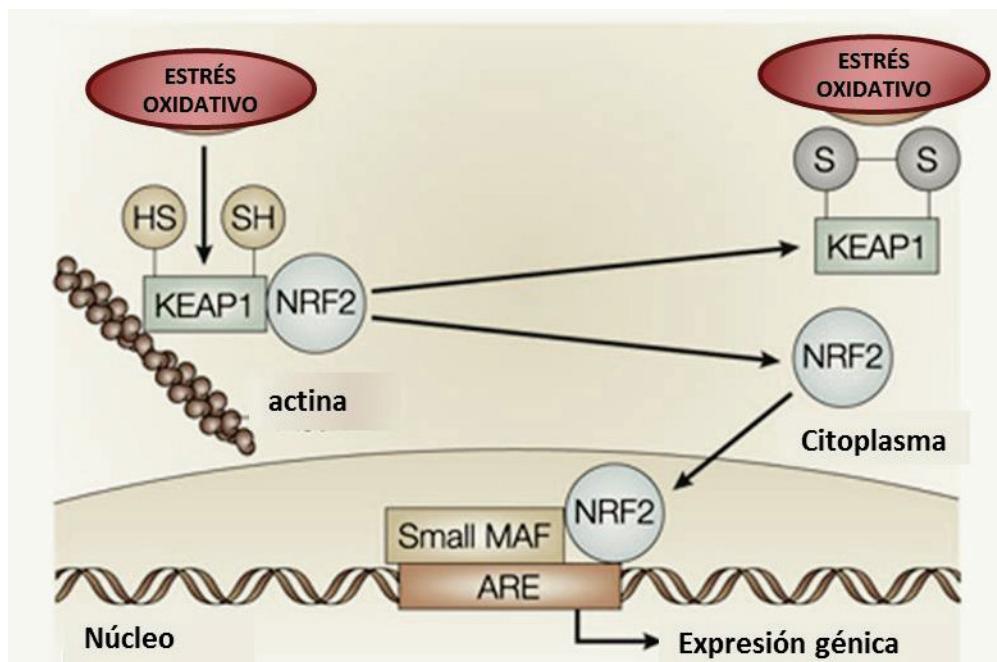


Figura 13 Vía clásica del Nrf2. El Estrés oxidativo modifica los grupos sulfhidrilo y el keap1 se disocia del Nrf2, que se dirige al nucleo para fomentar la transcripción de los genes de las regiones are (Elemento de respuesta antioxidante). Modificado del Kensler y colaboradores (Kensler et al., 2003)

SISTEMAS PROTEOLÍTICOS CELULARES

El mantenimiento de la homeostasis celular es un delicado equilibrio entre la síntesis y degradación, tanto de orgánulos como de los diferentes componentes moleculares. Un aporte de químicos y energía externa es necesario para este estado de equilibrio. Por tanto, una elevada eficiencia en estos procesos adecuado de aporte energético de vital importancia para la célula. Evolutivamente se han adquirido diferentes estrategias para su optimización, aunque la obtención de esta energía conlleva la generación de radicales libres.

Adicionalmente, la correcta degradación de los componentes celulares dañados, en muchos casos por estos radicales libres anteriormente comentados, o envejecidos, es un proceso clave para mantener la viabilidad celular, tan relevante como la síntesis. Existen dos sistemas de degradación principales: el complejo proteíco denominado proteosoma, que se encarga de eliminar proteínas; y el lisosoma, un orgánulo altamente catalítico que degrada tanto el material extracelular (heterofagia), como intracelular (micro y macroautofagia).

SISTEMA UBIQUITINA-PROTEOSOMA

Este sistema juega un papel importante en la degradación de proteínas de vida media corta y de proteínas reguladoras, fundamentales en una gran variedad de procesos celulares, incluyendo el ciclo celular, la modulación de receptores de la superficie celular, canales iónicos y presentación de antígenos (Glickman and Ciechanover, 2002).

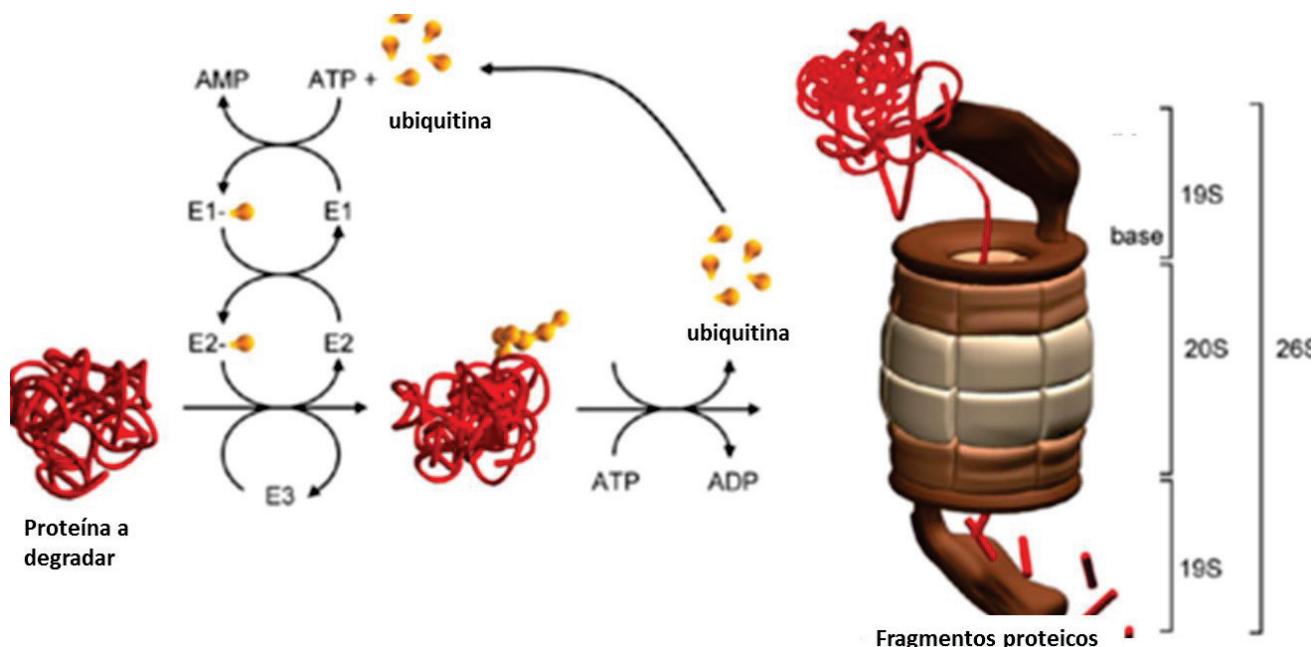


Figura 14 Funcionamiento del sistema UPS (ubiquitina-proteosoma). Las proteínas a degradar se poliubiquitinizan y son conducidas al proteosoma donde son degradadas, por la parte catalítica (20S)

La estructura del proteosoma consta de un núcleo catalítico (20S) y varias subunidades reguladoras (19S y 11S) que se unen dando lugar a distintos tipos de proteosomas. La degradación a través de este sistema requiere la poliubiquitinización de las proteínas diana para que sean reconocidas y degradadas por el núcleo catalítico del proteosoma. La ubiquitina es

Autofagia en el ciclo estral

añadida a las proteínas diana por un mecanismo de tres pasos que implica la acción secuencial de los enzimas ligasa específicos conocidos como E1, E2 y E3 (Glickman and Ciechanover, 2002)(Figura 14).

Las proteínas poliubiquitinizadas son reconocidas y degradadas por el proteosoma 26S (20S+19S) (Figura 14), el cual degrada la mayor parte de las proteínas celulares de forma dependiente de energía (Glickman and Ciechanover, 2002).

El proteosoma normalmente degrada aquellas proteínas dañadas en su estructura o con errores en su conformación, aunque, este sistema proteolítico puede también ser activado en respuesta a un nivel de estrés oxidativo medio (Grune et al., 2003). Sin embargo, las proteínas oxidadas no son fáciles de ubiquitinizar y, además, la actividad del proteosoma disminuye con la edad (Keller et al., 2004). Es por ello que las alteraciones en la actividad del proteosoma se han encontrado en numerosas patologías neurodegenerativas, inflamatorias e incluso inmunológicas asociadas a la edad (Keller et al., 2004).

SISTEMA LISOSOMAL/AUTOFAGICO

El lisosoma es el orgánulo que se encarga de la digestión celular. Para lo cual contiene una gran cantidad de enzimas proteólíticos e hidrolíticos que son activas a pH muy bajos, entre los que caben destacar las catepsinas. La naturaleza del material a degradar define los diferentes tipos de degradación lisosomal, si el material es de origen externo se denomina heterofagia,mientras que la degradación de los componentes incluidos en vesículas de secreción tiene lugar a través de la crinofagia. Si el materia es de origen interno el proceso que se lleva a cabo es la autofagia (Levine and Klionsky, 2004). La autofagia juega también un papel muy importante en una serie de procesos implicados tanto en el desarrollo de los organismos (Levine y Klionsky, 2004), como en los mecanismos de defensa frente a la invasión de determinados tipos de bacterias y virus (Deretic, 2006), conocida en este último caso como xenofagia.

AUTOFAGIA

Se trata del mecanismo de supervivencia más importante adscrito a la glándula de Harder, es el proceso clave frente al imperante estrés oxidativo observado. Sin embargo de una forma más genérica, se trata del principal sistema de reciclaje a nivel celular. Pese a su relevancia, el descubrimiento de la autofagia no se propició hasta el descubrimiento del lisosoma en 1955 (De Duve et al., 1955) y el avance del estudio de la morfología celular gracias al uso del microscopio electrónico. En este contexto, fue Clark el primero en describir unas vacuolas de forma irregular que contenían determinado material amorfó en el que se podían distinguir incluso mitocondrias (Clark, 1957). La cantidad de estas estructuras se incrementaba tras el estímulo hormonal del glucagón, siendo el marco perfecto para abordar el seguimiento de las mismas, cuyo fin era común a todas, fusionarse con el lisosoma. Fue C de Duve en 1963 (de Duve, 1963) quien acuñó el nombre de autofagia a este tipo de transporte que cargaba productos citoplasmáticos para su degradación en el lisosoma. Este descubrimiento despertó gran interés por conocer el sentido fisiológico de este proceso. Y en los primeros estudios se observó que su actividad dependía de la cantidad de nutrientes, siendo el ayuno su mayor estimulador (Pfeifer and Warmuth-Metz, 1983). Sin embargo, el ayuno no fue el único gran estímulo de dicho proceso, sino que se han observado diferentes activadores e incluso diferentes funciones, en las que se involucra a la autofagia pudiendo destacar que uno de los primeros papeles que se le ha otorgado fue el de regular la actividad secretora en respuesta a las fluctuaciones de hormonas esteroideas (Yi and Tang, 1995).

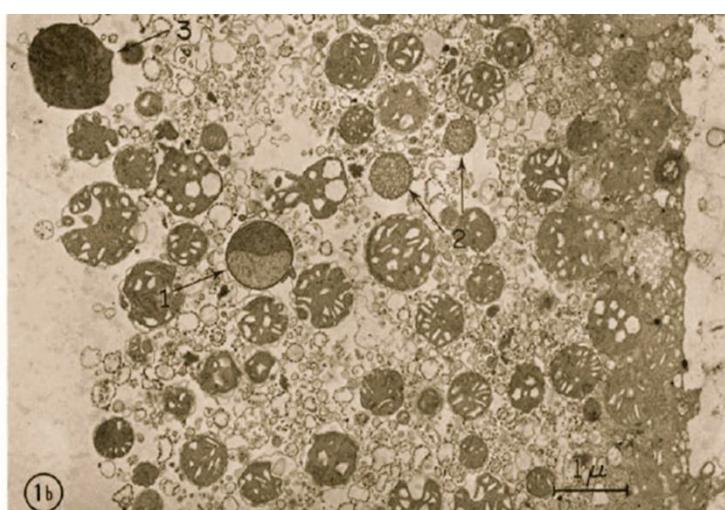


Figura 15 Fotografía extraída de los primeros artículos en los que De Duve describía la autofagia, tras su inducción con glucagon. Señala unas estructuras, similares a mitocondrias, muy electrondensas que parecen contener proteínas en su interior. tomado de (Deter et al., 1967)

Autofagia en el ciclo estral

La autofagia está considerada como la principal ruta inducible para la renovación de componentes citoplásmicos. Se han descrito tres tipos de autofagia: autofagia mediada por chaperonas (chaperone-mediated autophagy, CMA), microautofagia y macroautofagia. Estos tres tipos de autofagia difieren entre sí en la ruta que sigue el material a degradar en su camino hacia el lisosoma, pero muestran un paso final común que consiste en la degradación lisosomal y posterior reciclaje del material al citoplasma.

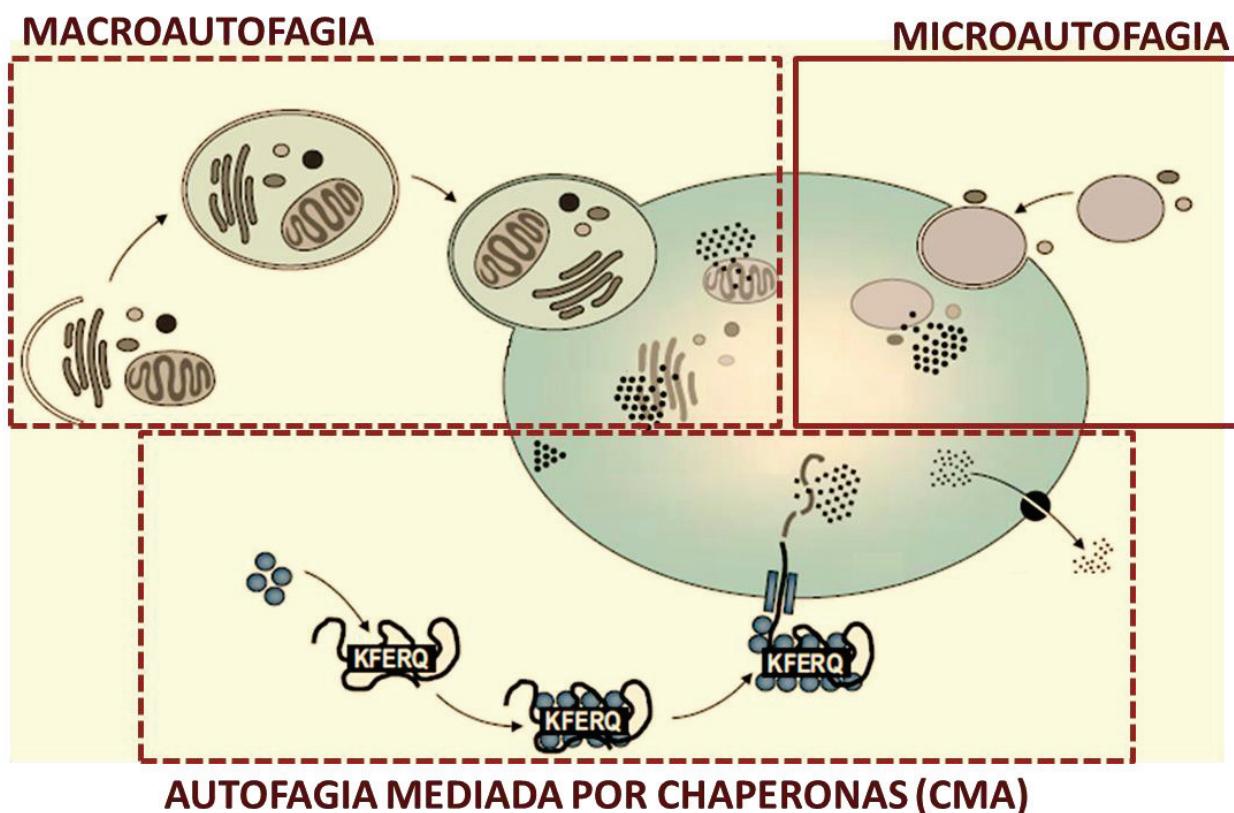


Figura 16 Tipos de autofagia. El diagrama muestra las tres principales formas de autofagia: macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas. En la microautofagia, porciones de citosol son internalizadas a través de invaginaciones de la membrana lisosomal. En la macroautofagia, grandes porciones de citoplasma son secuestradas en estructuras de doble membrana que se fusionan con lisosomas. En la autofagia mediada por chaperonas, proteínas citosólicas específicas son transportadas al interior lisosomal a través de un complejo chaperona/receptor. Adaptado de Vicencio y cols. 2008 (Vicencio et al., 2008).

CMA

La especificidad no era una característica esperable cuando se describió por primera vez este tipo de degradación lisosomal, sin embargo, durante el desarrollo de estudios posteriores se observó como en estados de carencia de nutrientes aceleraba la degradación de ciertas proteínas

citoplasmáticas respecto a otras (Dice et al., 1978). La fragmentación enzimática de estas proteínas cuya tasa de degradación era más elevada denotó que todas poseían un motivo aminoacídico común, el péptido señal KFERQ, suficiente para inducir su degradación (Backer et al., 1983; Backer and Dice, 1986; Cuervo and Wong, 2014). Tras este descubrimiento, se observó como este pentapéptido era el sitio de unión de una chaperona, que se encargaba de dirigir a las proteínas marcadas al lisosoma, lo cual, bautizó este proceso como Autofagia Mediada por Chaperonas (Cuervo and Dice, 2000). Pero no solo la especificidad fue una de las facetas destacables de este proceso, sino también el hecho de que la proteína sustrato pareciera atravesar la membrana del lisosoma. El estudio *in vitro* de este proceso, mostró como estas proteínas atravesaban la membrana lisosomal gracias a la acción de la proteína asociada a la membrana lisosomal 2a (lysosome-associated membrane protein type 2A, Lamp-2a), que es una de las variantes del ayuste alternativo del gen lamp2 siendo la única implicada en este proceso (Cuervo and Dice, 1996; Cuervo and Wong, 2014). Con todo ello, este proceso de degradación distaba de lo anteriormente descrito, ya que no era necesario la formación de un complejo vesicular para el transporte del material a degradar, bastaba con la interacción con la chaperona Hsc70, y la translocación al lisosoma dependería únicamente de una proteína, la Lamp-2a.

MICROAUTOFAGIA

Pese a ser descrita inicialmente como un proceso no selectivo y constitutivo, en el que se degrada contenido citoplasmático mediante la invaginación directa de la membrana del lisosoma para la renovación sistemática de componentes u orgánulos dañados de la célula (Yen and Klionsky, 2008), recientes trabajos en levaduras han mostrado como resulta muy relevante su papel en el mantenimiento del tamaño de determinados orgánulos, mitocondrias, núcleo y peroxisomas (Li et al., 2012; Mijaljica et al., 2011). En cuanto a organismos superiores, se ha observado cómo se produce un incremento de la microautofagia en respuesta a la hambruna, así como también en respuesta al tratamiento con rapamicina (Li et al., 2012).

MACROAUTOFAGIA

La macroautofagia es el principal programa catabólico que permite el secuestro simultáneo de múltiples constituyentes citoplásmicos, incluyendo grandes orgánulos, para su degradación en el lumen lisosomal (Levine and Klionsky, 2004). Para conseguir este fin, se produce la formación de una vesícula de doble membrana, denominada autofagosoma. Dicha característica propició el descubrimiento de la autofagia *per se*, el cual es responsable, en mayor medida, de que se atribuya el apelativo de autofagia de forma general al referirse a este tipo específico. La formación del autofagosoma, así como su procesamiento posterior, son conducidos por un conjunto de proteínas denominadas ATG o proteínas relacionadas con la autofagia, que derivan de los genes ATG (*autophagic related genes*), descritos en levaduras, estando ya muchos de sus ortólogos en mamíferos caracterizados. El proceso consta de cinco fases: inducción; selección de carga y embalaje el autofagosoma; fusión de los autofagosomas con endosomas tardíos; degradación de los autofagosomas y su contenido por las proteasas lisosomales; y reciclaje de las macromoléculas constituyentes y formación del cuerpo residual (Yen y Klionsky 2008). Los componentes moleculares relacionados con estas fases se clasifican en:

- a) Los complejos de proteínas serina/treonina quinasas (Atg1, Atg13, Atg17) que actúan como sustratos de mTOR (*mammalian target of rapamycin*) quinasa en la inducción.
- b) El complejo de señalización lípido-quinasa (Atg 6 o Beclin-1, Atg14, Atg34, Atg15) que participan en procesos de nucleación vesicular.
- c) El sistema de conjugación similar a ubiquitina (Atg8 o LC3, Atg12) que participa en la elongación de la membrana vesicular.
- d) Las proteínas implicadas en la ruta de reciclado y que median el desmontaje de las proteínas Atg de los autofagosomas maduros (Atg2, Atg9, Atg18).

Aunque el origen de las membranas que forman el autofagosoma ha permanecido oscuro, varios estudios recientes han revelado que tanto la membrana plasmática (Ravikumar et al.,

2010a; Ravikumar et al., 2010b), el retículo endoplasmático (RE) (Roberts and Ktistakis, 2013), la mitocondria (Hailey et al., 2010), el aparato de Golgi (Ge et al., 2013) y los contactos RE-mitocondria (Hamasaki et al., 2013) contribuyen a la formación *de novo* del autofagosoma.

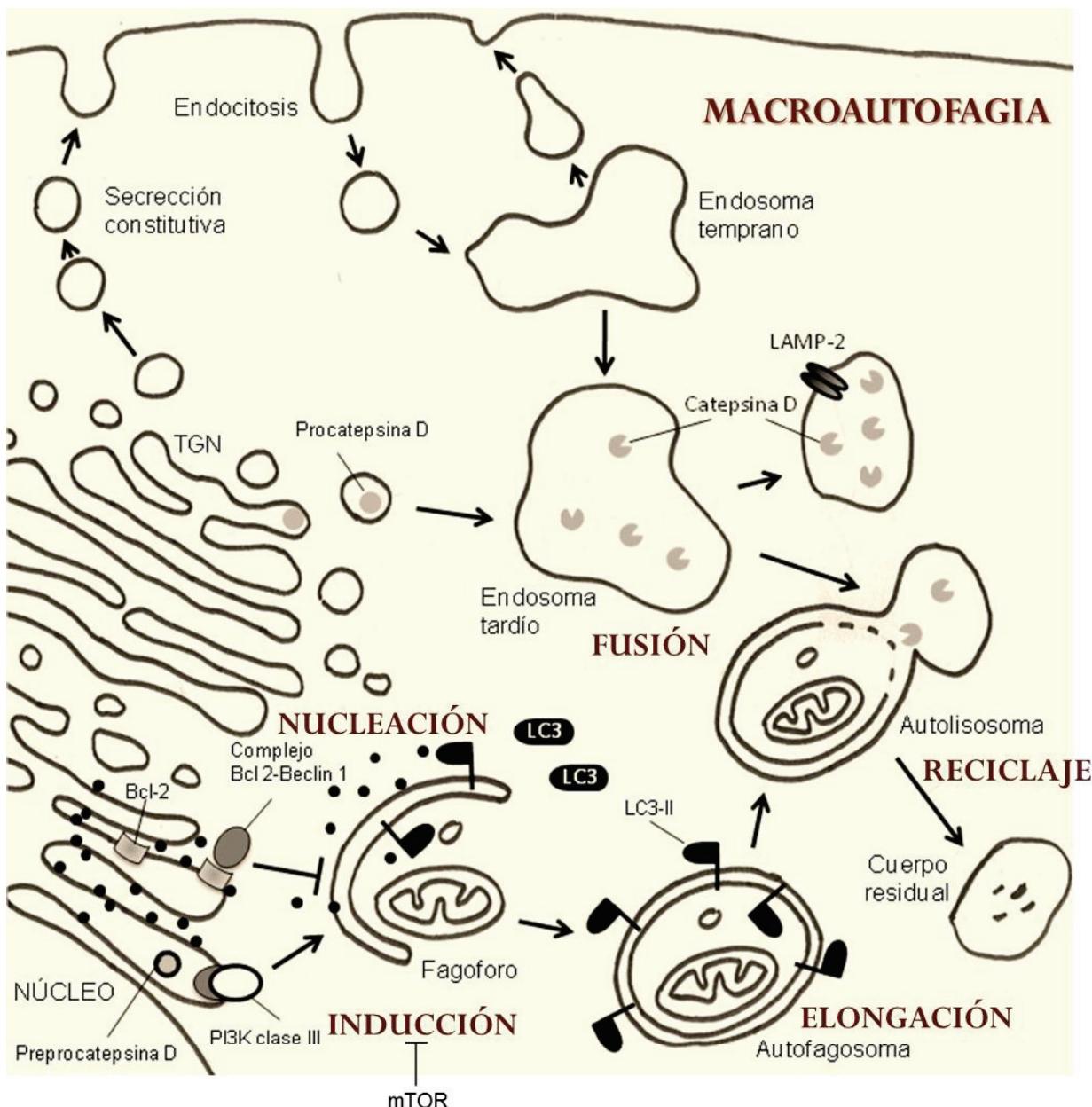


Figura 17 Macroautofagia. Consta de cinco fases:

- Fase de inducción a través de diferentes vías de señalización celular.
- Fase de nucleación: en la cual se forma una estructura membranosa llamada fagoforo que proviene del RE, del golgi o incluso se ha descrito que se puede formar a partir de membranas de la mitocondria.
- Fase de elongación de dicho fagoforo que llega a rodear a los componentes a degradar y forma una estructura denominada autofagosoma.
- Fase de fusión con los lisosomas cuyas enzimas degradan el material interior y la membrana interna formando un autolisisomosoma.
- Reciclaje de los componentes del material degradado.

Autofagia en el ciclo estral

Si bien bajo el término macroautofagia se incluye cualquier proceso no selectivo de secuestro de grandes estructuras celulares, ya De Duve describió diferentes orgánulos englobados dentro de los autofagosomas (de Duve, 1963). Los estudios que describen la degradación selectiva de orgánulos dañados ha sido de reciente publicación y, en función de los orgánulos secuestrados, se les han ido denominado mitofagia, macropexofagia, reticulofagia, ribofagia y lipofagia. Destacando la mitofagia, la selectiva degradación de las mitocondrias mediante autofagia (Novak et al., 2010), y la lipofagia, degradación de las gotas lipídicas (Singh and Cuervo, 2012; Singh et al., 2009), por su relevancia en el mantenimiento de la homeostasis y metabolismo celular y en la realización de esta tesis doctoral.

Objetivos

El **objetivo general** que nos propusimos abordar fue: Caracterizar los fenómenos autofágicos que suceden frente a las fluctuaciones hormonales a lo largo del ciclo estral, para averiguar su significado fisiológico.

Este objetivo general se desglosa en los siguientes **objetivos parciales**:

1. Estudio del estado redox a lo largo ciclo estral.
2. Estudio de la respuesta transcripcional a dicho estado redox durante el ciclo estral.
3. Evaluación de los procesos proteolíticos desarrollados en la glándula de Harder a lo largo del ciclo estral, prestando especial atención al estado de la ruta lisosomal/autofágica.
4. Descripción de los procesos de autofagia selectiva que tienen lugar en la glándula de Harder a lo largo del ciclo estral y la función de los mismos en la fisiología reproductora.

Material y métodos

La autofagia en el ciclo estral

ANIMALES

La parte experimental de esta tesis se llevó a cabo con hámster Sirio (*Mesocricetus auratus*) adquiridos a Harlan Interfauna Ibérica (Barcelona). Estos animales de un mes y medio de edad fueron aclimatados durante quince días a $22\pm2^{\circ}\text{C}$ con un ciclo de luz/oscuridad 14:10 horas y mantenidos en el bioterio de la Universidad de Oviedo, con alimentación y bebida *ad libitum* hasta el momento del sacrificio.

El comité de ética de la Universidad de Oviedo aprobó todos los protocolos experimentales y cada uno de los experimentos fueron llevados a cabo de acuerdo con las legislaciones española (R.D. 1201/2005) y europea (Directiva 86/609/EEC) en materia de experimentación animal.

En el presente estudio se utilizaron 16 hámsteres hembras. Tras la sincronización de los ciclos estrales de los animales, 8 de estas hembras fueron sacrificadas en la fase estro del ciclo estral, mientras que las 8 restantes fueron sacrificadas en la fase diestro del mencionado ciclo. Para determinar la fase del ciclo estral se realizó un frotis vaginal con posterior observación al microscopio en fresco. La determinación de cada una de las fases se realizó de acuerdo con el método Orsini para hámsteres (Orsini, 1961).

Tras los respectivos tratamientos, los hámsteres fueron anestesiados con cloformo y posteriormente decapitados. Las glándulas de Harder fueron diseccionadas rápidamente y fijadas para su estudio histológico, a microscopia óptica y/o electrónica, o congeladas en nitrógeno líquido para ser almacenadas a -80°C y posteriormente homogeneizadas.

TÉCNICAS MORFOLOGICAS

MICROSCOPÍA ÓPTICA: FIJACIÓN Y SECCIÓN

- Las glándulas de Harder de tres hámsteres de cada condición experimental se dividieron en piezas de 4 mm de grosor, las cuales fueron sumergidas en una solución fijadora de paraformaldehído al 4 % en tampón fosfato 0,1 M a pH 7,4, durante 15 minutos.
- Posteriormente, las muestras se post-fijaron con la misma solución durante 2 días.
- Se deshidrataron pasándolas por una batería de alcohol etílico creciente (30, 50, 70, 96 y 100%), dos veces durante 10 minutos en cada porcentaje de alcohol. Después, las piezas se sumergieron en alcohol isopropílico al 100 % durante 30 minutos. Posteriormente, las muestras se sumergieron en una mezcla de parafina y alcohol isopropílico a partes iguales, y se mantuvieron en estufa a 60°C durante una hora, para pasarlas seguidamente a parafina pura donde se mantuvieron durante la noche.
- Los bloques de parafina fueron cortados en secciones de 5 µm con un micrótomo (Leica RM2155, Leica instruments GmbH, Nussloch, Alemania) y dichas secciones fueron adheridas a portaobjetos (Superfrost Plus, Menzel GmbH and Co KG, Braunschweig, Alemania).

TINCIÓN DE HEMATOXILINA-EOSINA

- Los cortes fueron desparafinados sumergiendo los portaobjetos en un coplin con Xileno durante 15 minutos.
- Se hidrató la muestra mediante una batería de alcohol etílico decreciente (100, 96, 70, 50%) durante 5 minutos en cada alcohol. Posteriormente los cortes se sumergieron en agua destilada, para tu total hidratación.
- Se tiñó con Hematoxilina, se sumergieron los cortes durante 10 minutos.
- Se lavó con agua corriente hasta que se observó el viraje del color.
- Se contrastó con eosina durante 1 minuto.

La autofagia en el ciclo estral

- Se lavó con agua destilada y se procedió al deshidratado de la muestra pasándola por una batería de alcohol etílico creciente (70 y 96%, durante medio minuto, 100% durante dos minutos).
- Se aclaró con Xileno para facilitar su posterior montaje, durante 5 minutos.
- Se montaron en un medio no acuoso o bálsamo Eukitt

CONTAJE CELULAR

- Se utilizaron secciones de 5 μm de grosor teñidas con hematoxilina-eosina para contar el número de células tipo II, el número de células desprendidas al lumen tubular y el área ocupado por las porfirinas.
- En cada glándula se analizaron 4 niveles separados por 300 μm y en cada nivel 3 campos de gran aumento.
- Un campo de gran aumento (CGA) es el área visible en una observación con el objetivo de 40x del microscopio óptico, siendo esto una unidad de superficie habitualmente utilizada en análisis histológicos y que es específica de cada microscópico. Utilizamos un microscopio NIKON Eclipse E200 en el que un CGA equivale a 0,196 mm^2 . En cada CGA se contaron los núcleos de las células tipo II y los núcleos de las células desprendidas al lumen, llegando así a analizar un total de 0,588 mm^2 por nivel y 2,352 mm^2 por glándula.
- Para el estudio del área ocupado por las porfirinas (área de porfirinas/área de glándula total), el área de las porfirinas y el área total fue medido en cada sección usando una macro facilitada por el servicio de microscopia de la Universidad de Oviedo desarrollada en el programa Confocal Uniovi Image J (National Institutes of Health (NIH), Maryland, USA).
- Para las CGA por área total de glándula, se buscó el número de CGAs en la superficie total de cada glándula, y se realizó un ratio de estos datos.
- Cada glándula de Harder se considera una muestra en términos estadísticos. Los resultados se dan como porcentaje de células tipo II por mm^2 , número de células

desprendidas al lumen por mm², mm² de porfirinas por mm² de glándula y área de la glándula en mm² entre CGA.

INMUNOHISTOQUÍMICA: SISTEMA PEROXIDASA-ANTIPEROXIDASA (PAP)

- Las secciones fueron desparafinadas a temperatura ambiente por inmersión en xileno puro durante 10 minutos y, posteriormente hidratadas, al pasarlas por una sucesión de alcoholes etílicos en concentración decreciente (100, 96, 70, 50 y 30%), durante diez minutos en cada alcohol, finalizando en agua destilada.
- Las secciones se lavaron tres veces durante 10 minutos en 0,01 M Tris-HCl con 150 mM NaCl , tritón X-100 al 0,1% y albúmina de suero bovino al 0,25% (TBS-TB).
- Posteriormente, las secciones se incubaron durante 30 minutos en una solución de peróxido de hidrógeno al 3% en metanol, para inhibir la actividad peroxidasa endógena.
- Las muestras se lavaron con TBS-TB tres veces, durante 5 minutos cada una.
- Seguidamente, se añadió suero normal del animal en que se desarrolló el anticuerpo secundario (1:30 en TBS-TB) durante 30 minutos para bloquear la unión inespecífica. El suero utilizado fue desarrollado en cabra (G9023; Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania).
- Las secciones se incubaron con el correspondiente anticuerpo primario (1:100 en TBS-TB) durante 24 horas a 4°C en cámara húmeda. El anticuerpo primario utilizado fue anti-p-mTOR (p-FRAP) (Ser 2448), desarrollado en conejo (sc-101738, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA, USA).
- Las muestras se lavaron tres veces con TBS-TB durante 5 minutos cada una.
- Posteriormente, las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa (1:158 en TBS-TB), durante al menos 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario utilizado fue anti-conejo IgG desarrollado en cabra (A9169; Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania).
- Las secciones se lavaron de nuevo tres veces con TBS-TB durante 10 minutos cada una.

La autofagia en el ciclo estral

- A continuación, se incubaron las muestras con complejos peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) del animal en que está desarrollado el anticuerpo primario (1:50 en TBS-TB), durante 1 hora a temperatura ambiente. El complejo peroxidasa-antiperoxidasa utilizado fue desarrollado en conejo (P1291; Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania).
- Se lavaron las secciones 2 veces con TBS-TB durante 10 minutos, y durante otros 10 minutos con tampón Tris-HCl 50 mM a pH 7,6.
- Se reveló durante 5-15 minutos con 3,3'-diaminobenzidina-HCl al 0,05% (D5637, Sigma) con peróxido de hidrógeno al 0,005% en Tris-HCl 50 mM. La reacción se detuvo con agua corriente.
- Las secciones se deshidrataron siguiendo el protocolo anteriormente descrito y se montaron en medio hidrófobo con Eukitt (O. Kinder GmbH).
- Las muestras fueron estudiadas con ayuda de un microscopio óptico (CAST-2, Olympus, Barcelona, España) y las imágenes obtenidas fueron importadas e incorporadas en las figuras electrónicas con MS PowerPoint.

MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA: FIJACIÓN Y SECCIÓN

- Las glándulas de Harder se diseccionaron rápidamente y se dividieron en piezas de 3-4 mm de grosor que fueron sumergidas en la solución fijadora (paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 1,25% en tampón fosfato 0,1 M a pH 7,4) durante una noche, a 4°C.
- Dichas piezas fueron lavadas 3 veces, durante 10 minutos cada vez, con tampón fosfato 0,1 M a pH 7,4.
- Las piezas se dividieron en trozos de 1 mm² que se postfijaron en OsO₄ al 1% durante 2 horas.
- Posteriormente, las muestras se deshidrataron en acetonas crecientes, siguiendo el itinerario especificado a continuación:
 - Acetona al 50%, 3 veces durante 5 minutos cada vez.
 - Acetato de uranilo al 0,5% en acetona al 70%, durante 30 minutos.
 - Acetona al 80%, 3 veces durante 5 minutos cada vez.

- Acetona al 90%, 3 veces durante 5 minutos cada vez.
 - Acetona al 100%, 3 veces durante 5 minutos cada vez.
 - Acetona anhidra, 3 veces durante 5 minutos cada vez.
- Las muestras se infiltraron secuencialmente en mezclas de Epon:acetona 1:3, 1:1 y 3:1, 3 veces durante 15 minutos en cada mezcla.
 - Las piezas se incluyeron en la resina Epon y se almacenaron en la estufa a 60°C hasta su polimerización.
 - Los bloques de resina fueron cortados en secciones semifinas de 1 µm de grosor con un ultramicrótomo RMC MT-7 (Boeckeler Instruments, Inc., Arizona, USA) que fueron teñidas con azul de toluidina al 0,5% hasta obtener la coloración deseada. Estas secciones fueron estudiadas con un microscopio óptico para seleccionar el área de interés.
 - Seguidamente, se retalló el bloque original y se colecciónaron una serie de secciones ultrafinas (alrededor de 600 nm de grosor) en rejillas de cobre para microscopía electrónica.
 - Las muestras se contrastaron con acetato de uranilo al 2% y citrato de plomo al 2% en agua.
 - Para finalizar, las muestras se estudiaron bajo un microscopio electrónico de transmisión JEM-1011 (JEOL Ltd., Japón). Las imágenes obtenidas fueron importadas e incorporadas en las figuras electrónicas con CorelDraw X5 y MS PowerPoint.

TÉCNICAS BIOQUÍMICAS

HOMOGENEIZACIÓN DEL TEJIDO

El protocolo de homogeneización utilizado fue el siguiente:

- Se homogeneizaron 100 mg de tejido con un politrón Ultra-turrax T25 (IKA-Labortechnik, Alemania) a 4°C en 1 ml de tampón Tris/HCl 50 mM a pH 7,4 y NaCl 150 mM con inhibidores de proteasas (Na_3VO_4 1 mM y aprotinina 1 µg/ml).

La autofagia en el ciclo estral

- El producto de la homogeneización se centrifugó a 3000 rpm a 4°C, los precipitados fueron descartados y los sobrenadantes recogidos y centrifugados de nuevo bajo las mismas condiciones.
- Se determinó la concentración de proteínas de los sobrenadantes mediante el método de Bradford (Bradford 1976).

CARBONILACIÓN PROTEICA

Como medida del daño oxidativo en las proteínas se midió la concentración de proteínas carboniladas, puesto que se trata de la forma más común de deterioro de estas moléculas y se ha demostrado que la carbonilación proteica es proporcional al daño oxidativo (Levine et al., 1990; Levine and Stadtman, 2001). La concentración de proteínas carboniladas se determinó mediante un ELISA, en el que tiene lugar la reacción de la dinitrofenilhidrazina (DNP) con las proteínas carboniladas y se reconoce mediante un anticuerpo anti-DNP (Buss et al., 1997). Para el protocolo se siguieron las instrucciones del fabricante, los valores se obtuvieron por espectrometría, a una longitud de onda de 450 nm, y el contenido final de proteínas carboniladas se sustrajo de la recta de los estándares. Los datos se presentaron como nmol proteína carbonilada/mg proteína.

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL

La actividad antioxidante total (AAT) es un parámetro medible que proporciona información fiable sobre la cantidad total de sustancias antioxidantes disueltas tanto enzimáticas como no enzimáticas (de Gonzalo-Calvo D., 2010), y a menudo es considerada un indicador útil de la capacidad del sistema para regular el daño causado por los EROs. El protocolo es una adaptación de De Gonzalo-Calvo (de Gonzalo-Calvo et al., 2010) de la técnica de Arnao y colaboradores para extractos vegetales (Arnao et al., 2001). En este ensayo, el H₂O₂ reacciona con el ABTS [ácido 2, 2'-azido-bis (3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico)] para formar el radical ABTS•+ en una reacción catalizada por la peroxidasa de rábano (HRP). Dicho radical posee una elevada estabilidad y tiene un espectro de absorbancia característico con máximo a 734 nm. La

determinación de la Actividad Antioxidante Total se realizó mediante las estimaciones del descenso en la absorbancia a 734 nm provocado por la adición de la muestra al medio de reacción que contiene el radical de ABTS preformado y estabilizado. La diferencia entre el valor inicial y final de absorbancia a 734 nm se utiliza como índice de actividad antioxidante. Finalmente los resultados obtenidos se transforman en los equivalentes de Trolox (mg Trolox/mL), análogo sintético de la vitamina E, que producen el mismo efecto antioxidante que la muestra de tejido a estudiar.

- Composición del radical ABTS:

STOCKS	Volumen (μl)	Concentración final
1-Tampón fosfato-Na 50 mM pH 7,5	23894	
2-ABTS 50 mM	1000	2 mM
3-HRP 0,1mM	6,0	0,25 μM
4-H ₂ O ₂ 10 Mm	100	40 μM
Volumen Total	25000	

Una vez mezclado, se mantuvo en frío y oscuridad durante 3-4 horas. Reacción para la determinación de la Actividad Antioxidante Total:

- Se añaden 5 μl de muestra a cada pocillo y 5 μl del tampón de homogenización de la muestra (Tampón fosfato 100 mM) para obtener el blanco.
- Se añaden 245 μl del radical estabilizado a cada pocillo. Se agitó.
- Se mide a λ= 734 nm.
- Se incubó durante 15 min en oscuridad.
- Se mide nuevamente la absorbancia a λ= 734 nm (Lector de placas ELx800 uv, Nio-tek instruments).
- La diferencia entre el valor inicial y final, implica la neutralización del radical, por tanto, la actividad antioxidante de la muestra.

La autofagia en el ciclo estral

La actividad antioxidante se expresa como equivalente de Trolox que producen el mismo efecto antioxidante que la muestra a estudiar (1 mol de Tx reacciona con 2 moles de radical ABTS). El coeficiente de extinción del radical ABTS a $\lambda=734$ nm es $15000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Los resultados se expresaron como mg Tx/mg proteína.

ACTIVIDAD DEL PROTEOSOMA

El proteosoma se encarga de degradar las proteínas dañadas marcadas mediante una señalización de ubiquitina. La actividad del proteosoma fue evaluada en el tejido homogenizado usando el kit comercial 20S proteasome activity assay kit (Chemicon, CHEMICON International, Inc, Temecula, CA, USA). Este ensayo está basado en la detección del fluoroforo 7-amino-4-metilcoumarin (AMC) después de su corte del sustrato marcado LLVY-AMC debido a la actividad de tipo quimiotripsina del proteosoma. El AMC libre es detectado por fluorimetría (380/460 nm).

- Se prepararon las muestras y los estándares y se pipetea a la placa.
- Se añadió el sustrato.
- Se incubó durante 2 horas a 37°C
- Se midió mediante un fluorímetro (380/460 nm).

Los datos son presentados como unidades arbitrarias de fluorescencia/ mg de proteína.

SDS-PAGE E INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS

(WESTERN BLOT)

Para la detección de las proteínas en un homogenizado y poder llevar a cabo su cuantificación se realiza esta técnica, en la que se separa el total de las proteínas por peso molecular, tras lo cual se selecciona mediante inmunodetección. En general, el protocolo utilizado fue el siguiente:

- Las muestras fueron desnaturizadas en tampón de carga (Tris/HCl 0,5 M, pH 6,8, glicerol 10%, dodecilsulfato sódico (SDS) 10%, β -mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 0,05%) a 95-100°C, durante 5 minutos.
- Las muestras se sometieron a electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Tampón de electroforesis: Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0,1%.
- Las proteínas fueron transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) a 350 mA durante 120 minutos. Tampón de transferencia: Tris 25 mM, glicina 190 mM y metanol al 20%. Se utilizó la tinción Ponceau S (Ponceau S 0,01%, ácido acético glacial 0,1%) para asegurar la igual carga de proteínas y comprobar una correcta transferencia.
- La membrana se bloqueó durante toda una noche, a 4°C con leche desnatada en polvo al 5% en TBS-T (Tris/HCl 20 mM, pH 7,4 con NaCl 150 mM y Tween-20 al 0,05%).
- La membrana se incubó con el correspondiente anticuerpo primario diluido a la concentración adecuada con TBS-T (ver Tabla 1) durante 4 horas, a 4°C.
- Se lavó 3 veces con TBS-T durante 10 minutos cada vez, a temperatura ambiente.
- La membrana se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa durante 1 o 2 horas a 4°C (ver Tabla 1).
- Se lavó 3 veces con TBS-T durante 10 minutos cada vez, a temperatura ambiente.
- Los inmunoconjungados fueron detectados usando luminol (sc-2048; Santa cruz Biotechnology) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

Todos los datos presentados son representativos de tres experimentos independientes. Además, analizados cuantitativamente con el programa Quantity One 5.5.1 y los resultados normalizados con la actina como control de carga.

La autofagia en el ciclo estral

Anticuerpo	Referencia	Casa Comercial	Concentración
β-actina	A 5441	Sigma	1:5000
Beclin-1	sc-10086	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
Bcl2/Adenovirus E1B 19 kDa and protein-interacting protein 3-like (BNIP3L/NIX)	N 0399	Sigma	1:1000
Catepsina D	sc-6486	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
Lamp-2a	Ab18528	Abcam	1:1000
Lipasa lisosomal acida (LAL)	9G7F12	Abcam	1:1000
Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (LC3)	PD014	MBL	1:1000
Receptor de melatonina 1A (MT1)	sc-13186	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
Mammalian target of rapamycin (mTOR)	sc-8319	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
Factor nuclear kappa B (NF-κB) p65, y Phospho-NF-κB-p65 (Ser536)	#9936	Cell Signaling Technology	1:500
Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)	sc-722	Santa Cruz Biotechnology	1:250
Phospho-p70 S6 kinase (Thr389) (phospho-pS6K)	#9206	Cell Signaling Technology	1:1000
Perilipina (PLIN)	sc-67164	Santa Cruz Biotechnology	1:1000

Material y Métodos

Retinoid-related orphan receptor alpha (RORα)	sc-6062	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
Superoxido dismutasa 2 (SOD2)	sc-18504	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
Sequestosoma-1 (SQSTM1/p62)	#5114	Cell Signaling Technology	1:1000
anti-cabra IgG desarrollado en conejo	A5420	Sigma-Aldrich	1:5000
anti-conejo IgG desarrollado en cabra	A9169	Sigma-Aldrich	1:5000
anti-ratón IgG desarrollado en cabra	TM-001-HR	NeoMarkers	1:5000

Tabla 1 Relación de los anticuerpos utilizados en la SDS-PAGE e inmunodetección de proteínas (Western blot)

EXTRACCIÓN DE ARN Y RETROTRANSCRIPCIÓN (RT)

En determinadas ocasiones es necesario averiguar si una proteína está muy expresada porque se esté sintetizando o por que no se esté degradando. Con este fin, es interesante evaluar los niveles de ARN mensajero (ARNm). El ARN fue extraído usando Tripure™ Isolation Reagent (Roche Applied Science, Mannheim, Germany), según las instrucciones del fabricante. El ADN presente en las muestras fue eliminado mediante la incubación con DNase (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) y confirmado por análisis de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del ARN total (Llorente et al., 2013). La integridad del ARN fue evaluada mediante el kit comercial Experion RNA HighSens Analysis Kit (Biorad Laboratories, Wilmington, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La cantidad total del ARN fue determinada por absorbancia (260/280 nm) usando un espectofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, USA), resultando similar entre los distintos grupos de animales utilizados (0.5-0.7 μ g/mg de tejido).

La autofagia en el ciclo estral

Con el objeto de obtener una copia del ARN extraído en forma de ADN complementario (ADNc), ya que el enzima Taq polimerasa funciona con una doble hebra de ácido nucleíco, no con una simple como la que forma el ARN; 600 ng de ARN fueron sometidos a una retrotranscripción (RT) usando el kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

PCR EN TIEMPO REAL O CUANTITATIVA (RT-PCR O qPCR)

La expresión del gen p62, así como del gen de la subunidad 18S de los ribosomas utilizado como referencia, se analizó mediante cuantificación del ARN mensajero (ARNm) de dichos genes presente en las diferentes muestras estudiadas. Para ello, el ADNc obtenido del ARN total extraído fue sometido a qPCR utilizando el preparado comercial SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) suplementado con los cebadores cuya secuencia se muestra en la Tabla 2 y que fueron diseñados usando el programa Primer Express software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) a partir de las secuencias de los ARNm obtenidas del GenBank [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/>]. Para asegurar que la amplificación no provenga del ADN genómico, los cebadores fueron diseñados flanqueando una secuencia intrón. Para optimizar la concentración de los cebadores y la cantidad de ADNc a utilizar se realizó una curva estándar usando diferentes diluciones de ADNc y varias concentraciones de cebadores (Dos-Anjos et al., 2008), resultando que las cantidades óptimas fueron 2 µL de cDNA diluido 1/10 como muestra y 300 nM de cada cebador. El gen de referencia fue la subunidad 18s de los ribosomas.

Gen	Genk Bank	Cebador	Secuencia (5'>3')
p62	NM_175843.3	p62-Fwd	CCATGGGTTCTCGGATGAA
		p62-Rev	GGAGGGTGCTTGAATACTGG
18S	V01270	18S-Fwd	GATTAGTCCCTGCCCTTG
		18S-Rev	GATCCCGAGGGCCTCAACTAAC

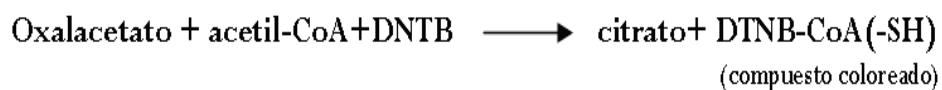
Tabla 2 Cebadores usados en la qPCR de los genes p62 y 18S

Las reacciones fueron realizadas en un termociclador ABI PRISM 7000 .Se analizó el incremento en la fluorescencia durante la reacción de amplificación con el programa Sequence Detector Software (SDS 1.6, Applied Biosystems). Las variaciones en los niveles de ARNm se expresaron mediante los valores $2^{-\Delta \Delta Ct}$, siendo Ct corresponde al número de ciclo de amplificación en que la fluorescencia emitida supera el valor umbral establecido, $\Delta Ct = Ct_{gen\ p62} - Ct_{gen\ ARN\ 18S}$ y $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ del gen en la condición a estudiar - ΔCt del gen en la condición control (Livak and Schmittgen, 2001).

FUNCIÓN MITOCONDRIAL

ACTIVIDAD DEL ENZIMA CITRATO SINTASA

La primera reacción del ciclo de Krebs es realizada por el enzima Citrato Sintasa (CS), en el paso en el que se libera coenzima A (CoA) a partir del acetil-CoA después de la acción de la CS sobre el oxalacetato, con lo que el estudio de su actividad permite conocer la población mitocondrial activa en la muestra homogenizada. En base a la reacción en la que participa, se utiliza para medir su actividad el DTNB (ácido 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoico, también denominado reactivo de Ellmann), que reacciona con los grupos tioles libre de la CoA, lo que origina un aumento de absorbancia a 412 nm siguiendo la siguiente reacción:



Para determinar la actividad de este enzima se siguió el siguiente protocolo:

- En un espectofotómetro, con temperatura constante a 30°C, se colocaron cubetas de capacidad 1ml, conteniendo:
 - 500 μL de Tris 200 mM pH 8
 - 20 μL de Acetil-CoA 10 mM
 - 20 μL de DTNB 10 mM
 - 50-x μL de agua milli Q

La autofagia en el ciclo estral

- Se añadió el volumen x de muestra, correspondiente en cada caso a una cantidad de 50 µg de proteína.
- Se inició la reacción por adicción del sustrato: 10 µL de oxalacetato al 10 mM (la concentración final es de 100 mM), y se midió la absorbancia en este punto a una longitud de onda de 412 nm. Se realizó una segunda medida a los 5 minutos. La diferencia entre ambas medidas informa de la cantidad de DTNB-CoA que se forma, y por tanto de la actividad de la CS.
- El coeficiente de extinción del DTNB a 412 nm es 13,6 mM⁻¹cm⁻¹.

Los resultados se expresaron en nmoles/minuto * miligramo proteína

NIVELES DE ATP

Los niveles de adenosin-5'-trifosfato (ATP) intracelulares fueron medidos con un kit comercial Adenosine-5'-triphosphate bioluminescent assay kit (FL-AA, Sigma Aldrich Inc.). Las reacciones bioluminiscentes del sistema luciferin-luciferasa proporciona la base de un simple, rápido y sensible análisis para evaluar los niveles de ATP (Taylor et al., 1998). El protocolo se presenta a continuación:

- Las muestras del homogenizado se diluyeron en una proporción 1:100.
- Se añadieron 100 µL de la mezcla del ensayo a la cubeta, contiendo el sustrato diluido en un tampón a un pH de 7.8.
- Se vortearon y se dejaron reposar 3 minutos.
- Se añadió 100 µL del estándar o la muestra y se midió inmediatamente.
- La producción de luz fue inmediatamente medida por luminiscencia usando el luminómetro Luminometer Turner Designs TD-20/20 (Turner BioSystems Inc., Sunnyvale, CA, USA) (Yen et al., 2007).

Los resultados se expresaron en moles de ATP/gramo proteína.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Material y Métodos

Todos los datos mostrados en esta memoria, se presentan como la media \pm desviación estándar, calculados a partir de tres experimentos independientes, cada uno analizado por triplicado. La normalidad de los datos fue analizada por el test Kolmogorov-Smirnov. Las comparaciones estadísticas entre grupos fueron analizadas mediante un test t de Student. La diferencia de valores obtenidos entre los distintos grupos se consideró estadísticamente significativa a partir de $p<0,050$. Para la obtención de las gráficas y la estadística se utilizó el programa GraphPad 5.10 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA)

Resultados

El principal mecanismo descrito de defensa frente a los niveles elevados de estrés oxidativo existentes en la GH es la autofagia (Tomás-Zapico y cols. 2005b). Este proceso ha sido descrito por nuestro grupo, aunque existen aún muchos mediadores o inductores de este proceso aún desconocidos. El papel de las hormonas sexuales en su regulación es uno de ellos. Por ello, resulta esencial profundizar en su estudio.

ESTUDIO 1: CAMBIOS MORFOLÓGICOS

La glándula de Harder (GH) del hamster hembra acumula porfirinas intraluminares tóxicas y prooxidantes. Las células glandulares de la misma, debido a las características descritas profundamente en la introducción, se ven sometidas a un alto nivel de estrés oxidativo y, por ello, frecuentemente experimentan alteraciones que culminan en la muerte celular, producida por una intensa autofagia, siendo estas células desprendidas a la luz glandular. Este proceso conlleva una secreción glandular masiva descrita anteriormente por nuestro grupo (Vega-Naredo et al., 2009). Relacionando estos datos previamente conocidos con nuestra intención inicial de evaluar el papel de las hormonas sexuales, decidimos llevar a cabo una caracterización profunda de la GH entre las dos fases opuestas en función de los niveles de estrógenos a lo largo del ciclo estral: la fase de estro y de diestro.

Estudiamos el área glandular/ CGA (campo de gran aumento) para evaluar las posibles alteraciones en el área glandular, producidas por los procesos de autofagia másiva anteriormente descritos, durante el ciclo estral. Los resultados mostraron un detrimiento significativo ($p<0,010$) en el área glandular en la fase de estro respecto a la de diestro, lo que se relaciona perfectamente con el proceso de autofagia masiva indicado y confirma nuestra suposición (Figura 18).

La autofagia en el ciclo estral

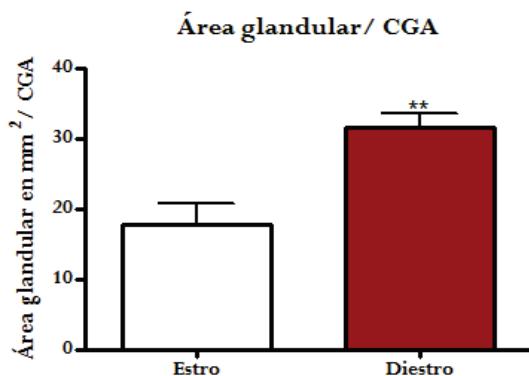


Figura 18 Área ocupada por tejido glandular en cada CGA (campo de gran aumento). Expresado en mm². Los valores se presentan como media ± desviación típica (**: p<0,010).

Así mismo, el incremento en los estrógenos durante el estro causó a su vez un acumulo significativo en células de tipo II, respecto a las observadas en el diestro. Ya que el porcentaje de células de tipo II fue del 1,2% en el estro y vs. 0,4% en el diestro (Figura 19A). Las células de tipo II observadas en el estro (Figura 19B) comparten las principales características morfológicas que las de Tipo II de los machos, pero desarrollan ciertas peculiaridades, tales como unas gotas lipídicas de mayor tamaño.

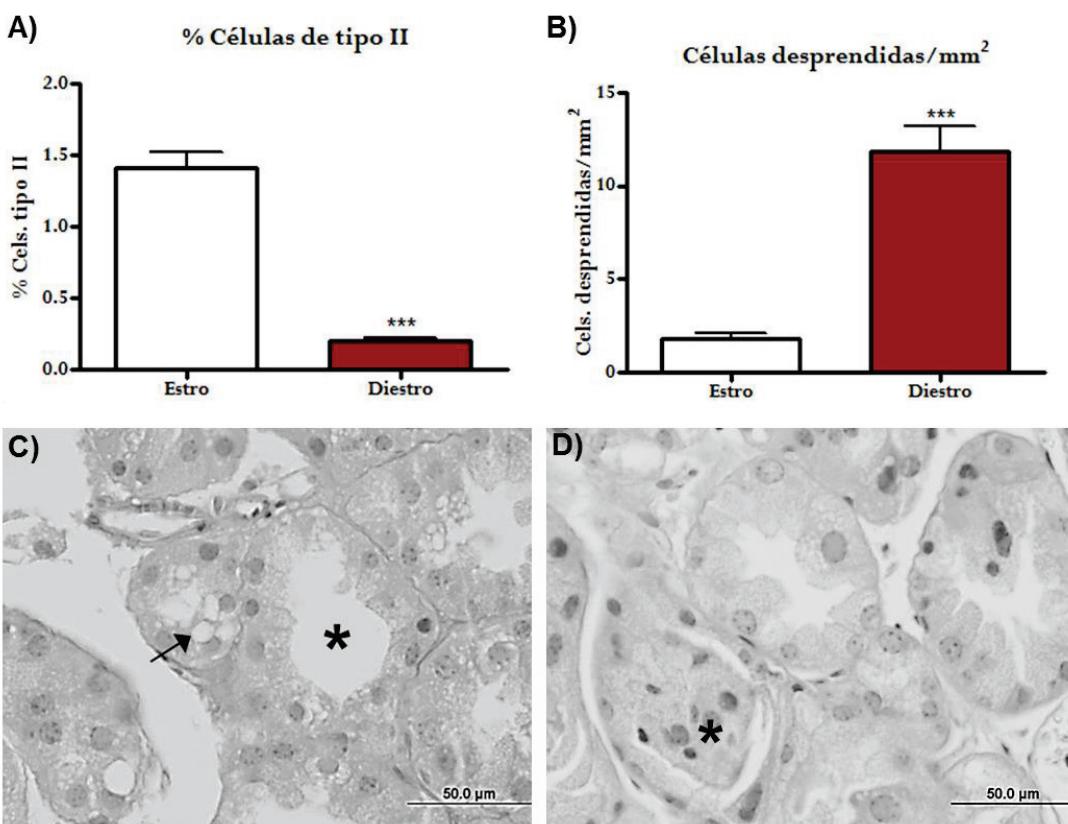


Figura 19 A) Porcentaje de celulas de Tipo II en los acinos secretores, B) celulas desprendidas/mm² en las GH de hamster hembra en fase de estro y diestro. C) Sección de parafina de la GH en fase de estro. Las dos características más llamativas son: unas gotas lipídicas mayores de lo normal en unas celulas de Tipo II especiales (flecha) y unos lúmenes acinares limpios (asterisco). D) Sección de parafina de la GH en fase de diestro; cabe destacar la secreción holocrina en el lumen acinar (asterisco) Barra = 50 μm. ***: (p< 0,001).

Resultados

Sin embargo, mientras las células de Tipo II muestran un incremento en estro, la secreción holocrina manifiesta una significativa reducción en estro, medida como el número de células desprendidas por mm^2 ($p < 0,001$) (Figura 19B y 19D).

La medida del área de porfirinas respecto al área total de la glándula, mostró que las porfirinas ocupan un área estadísticamente superior en el estro respecto al diestro ($p < 0,010$) (Figura 20). Así mismo, el estudio de la microscopía óptica de las secciones de GH reveló que en la glándula de Harder, durante el estro, las áreas intraluminares son habitualmente más amplias y con menos restos celulares comparados con las áreas glandulares en el diestro (Figura 19C y 19D).

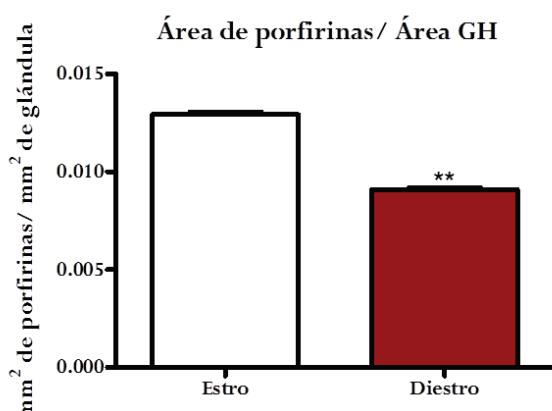


Figura 20 Área ocupada por porfirinas/ área glandular total en GH de hamster hembra en estro y diestro. Los valores se presentan como media \pm desviación típica (**: $p < 0,010$).

ESTUDIO 2: ESTADO REDOX

La GH del hámster Sirio posee un alto nivel de porfirinas, mucho mayor que otros órganos porfirígenos. La GH, debido a su localización orbital, recibe la luz y, siendo las porfirinas fotooxidantes, los efectos tóxicos de las porfirinas son muy abundantes (Coto-Montes et al., 2001b). Es por ello por lo que debemos, por tanto, estudiar las alteraciones del estado redox que sufre la glándula en ambas fases estrales.

La autofagia en el ciclo estral

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL (AAT)

La AAT es frecuentemente considerada como un útil indicador de la habilidad del sistema para regular el daño producido por EROS (Garcia-Macia et al., 2011). La actividad antioxidante total fue significativamente más baja en la fase de estro que en diestro ($p<0,001$) (Figura 21A).

DAÑO DE PROTEÍNAS

El daño de proteínas fue expresado en términos del contenido en proteínas carboniladas, siendo esta carbonilación un indicador directo de la oxidación proteica por el estrés oxidativo (Figura 21B) El mayor daño de proteínas observado sucedió en estro al compararlo con diestro ($p< 0,050$).

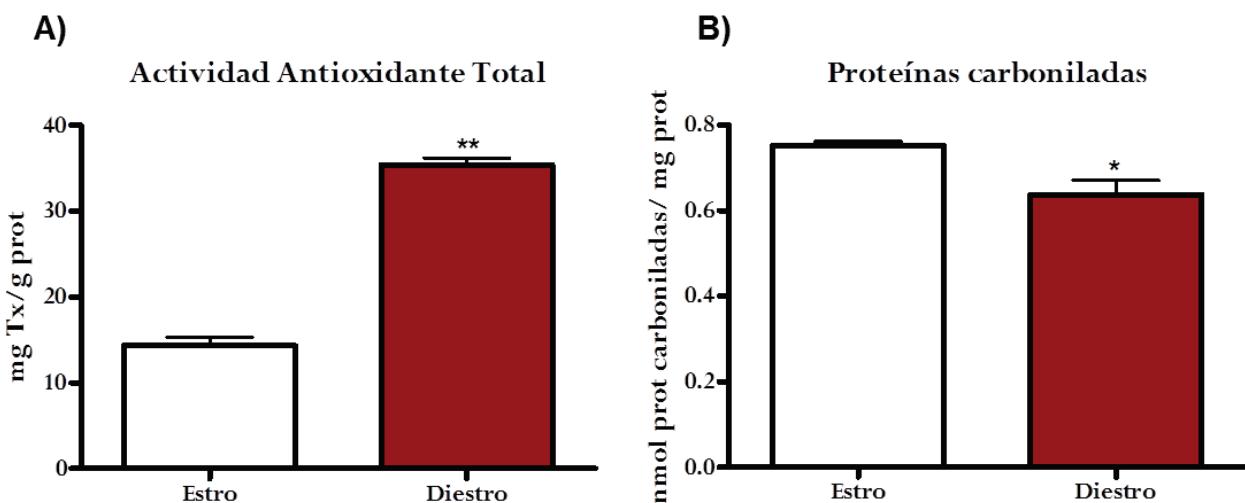


Figura 21 Estado redox durante el ciclo estral. A) Actividad antioxidante total (AAT). B) Daño de proteínas representado como proteínas carboniladas. Los resultados de la AAT han sido expresados como equivalentes de mg de Trolox/mg proteína. Los resultados del daño de proteínas se han expresado como nmol proteínas carboniladas/mg proteína. Los valores se presentan como media ± desviación típica. *: ($p< 0.05$) **: ($p< 0.01$).

ESTUDIO DEL PAPEL DE LA MELATONINA, ANTIOXIDANTE NATURAL, EN EL CICLO ESTRAL

El papel fisiológico de la melatonina en el ciclo estral puede ser evaluado por la expresión sus receptores. Nuestro grupo ha descrito la coexpresión del receptor de melatonina 1A (MT_1) y el receptor huérfano relacionado con el ácido retinoico alfa ($ROR\alpha$, RAR-related orphan

Resultados

receptor alpha) en la GH (Tomas-Zapico et al., 2005a). MT₁ es un receptor acoplado a proteína G de la membrana plasmática (Reppert et al., 1994), y es activado por la melatonina pineal (Tomas-Zapico et al., 2005a). En nuestro datos, los análisis de MT₁ por westernblot muestran una mayor expresión en diestro que en estro (Figura 22B, p<0,050). RORα, un receptor de melatonina nuclear que juega un importante papel celular contra el estrés oxidativo (Caballero et al., 2008; Delerive et al., 2001; Novak et al., 2010). Mostró, por westernblot, otra vez, muestra una mayor expresión de este receptor de melatonina en diestro que estro (Figura 22C, p<0,050).

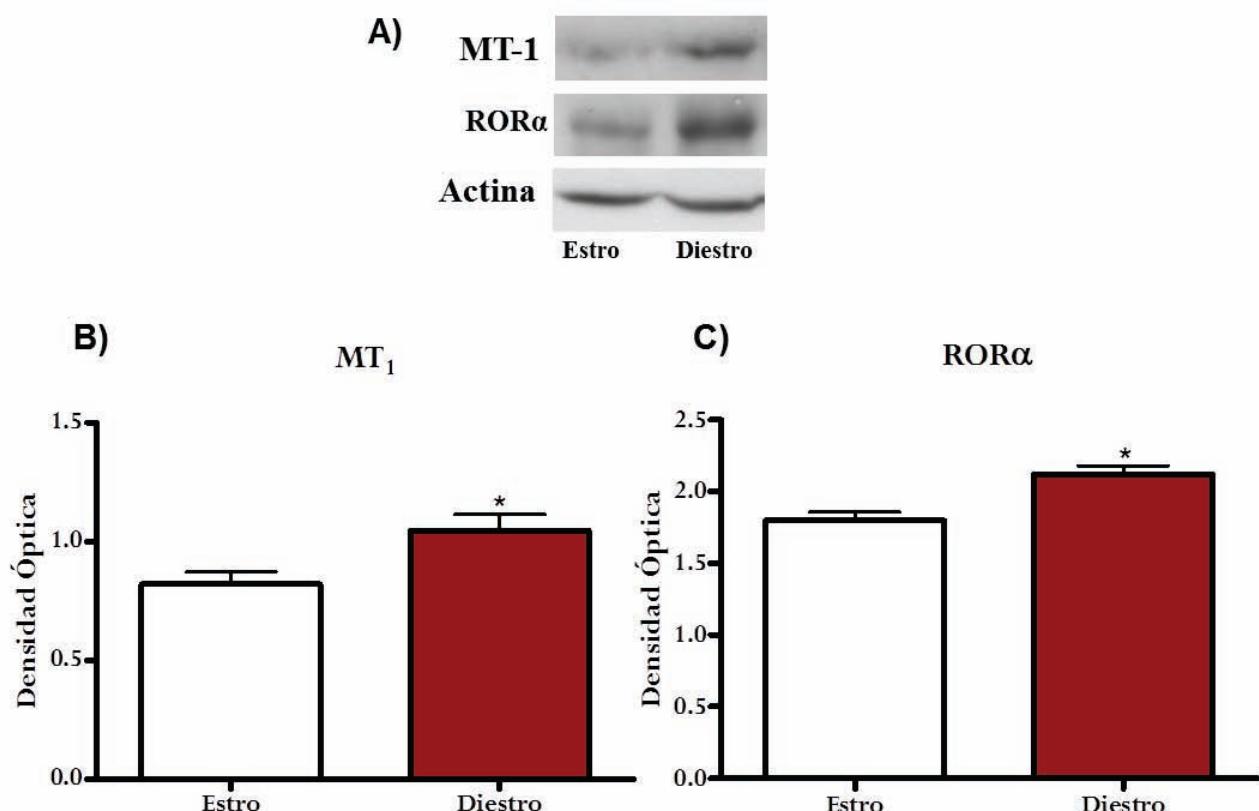


Figura 22 Expresión de los receptores de melatonina. Inmunoblot representativo para MT-1 y RORα en las diferentes fracciones de GH de la fase de estro y diestro. Los histogramas de MT-1 y RORα cuantifican la densidad optica de los inmunosblots normalizados con la β-actin. Los histogramas muestran las densidades ópticas de las bandas de tres experimentos desarrollados independientemente. Los valores se presentan como media ± desviación típica. *: (p< 0.05).

ESTUDIO 3: RESPUESTA AL ESTRÉS OXIDATIVO

El desequilibrio del balance redox produce una respuesta observada a dos niveles, implica cambios a nivel génico, ya que modula la respuesta de los factores de transcripción sensibles al estrés oxidativo y origina una variación en cuanto a la actividad proteolítica, que se encarga de eliminar las proteínas dañadas.

FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

Existen varios factores de transcripción sensibles al estrés oxidativo, que modulan una respuesta que puede desencadenar diferentes respuestas celulares. De entre todos ellos, centraremos el estudio en NF- κ B y Nrf2, ya que ambos tienen una respuesta rápida y generan importantes respuestas celulares frente al estrés oxidativo.

NF- κ B

El factor nuclear kappaB es un factor de transcripción que juega un papel clave en las respuestas celulares al estrés oxidativo (Michiels et al., 2002). La activación tiene lugar vía la fosforilación del p65 en la Ser536, y solo la proteína fosforilada entra en el núcleo y tiene actividad transcripcional (Vega-Naredo et al., 2009). Examinamos su estado de activación mediante análisis de inmunoblot de las proteínas: NF- κ B-p65 y el phospho-NF- κ B-p65 (Ser536) (phospho-p65). En nuestros resultados, la cantidad total de p65 no mostró diferencias entre fases (Figura 23C). Sin embargo, la expresión de la forma fosforilada se ha observado más elevada en estro respecto a diestro (Figura 23B). Así mismo, para caracterizar la activación de la ruta de NF- κ B, evaluamos el ratio entre la forma fosforilada y la total, este ratio confirmó los niveles más elevados de la forma fosforilada respecto a la total en estro (Figura 23D, $p < 0.001$). Por tanto, nuestros datos sugieren una activación de la ruta del NF- κ B en la fase de estro.

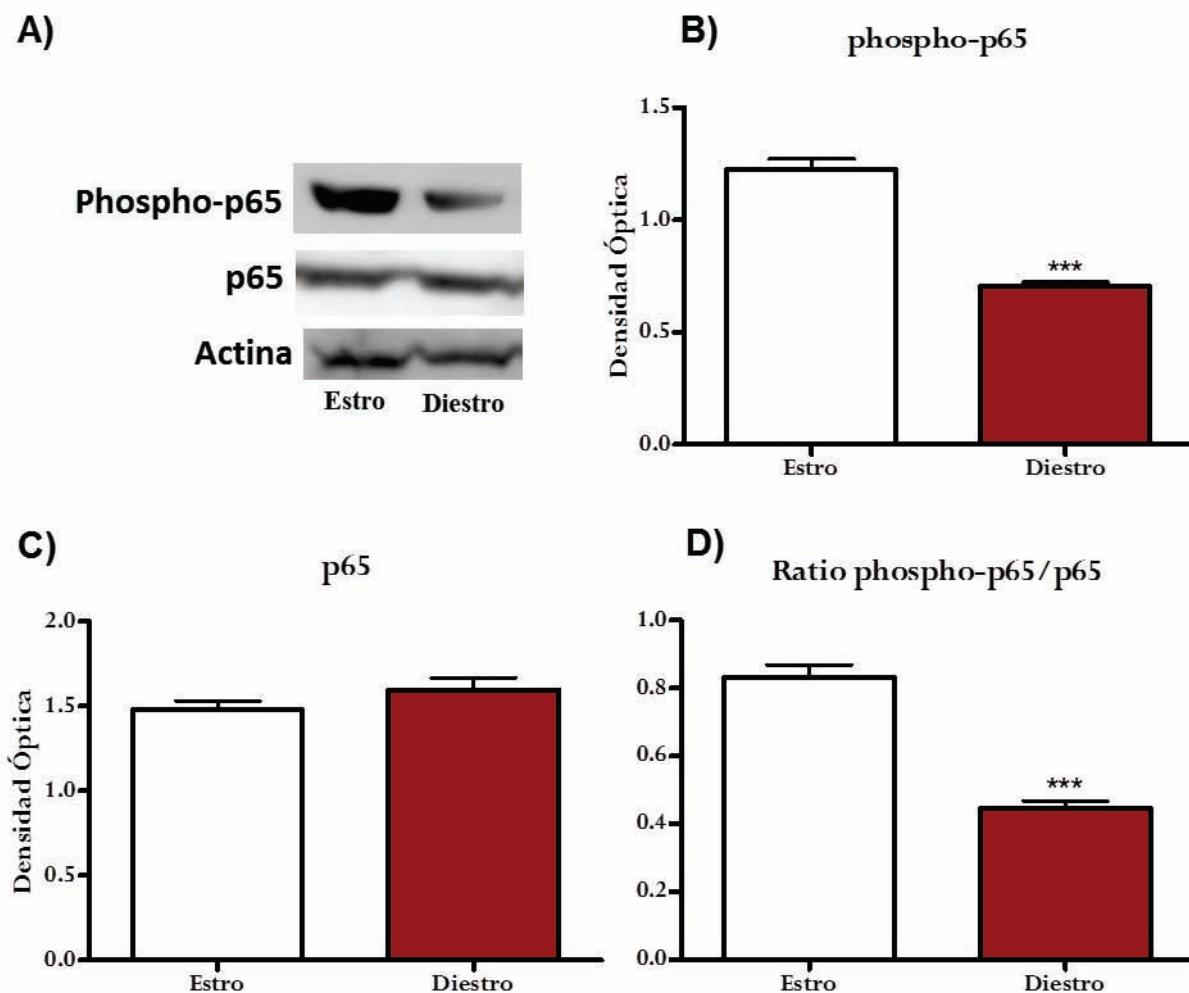


Figura 23 A) Inmunoblot representativo para phospho-p65 y p65 en las diferentes fracciones de GH de la fase de estro y diestro. Los histogramas de phospho-p65 (B) y p65 (C) cuantifican la densidad óptica de los inmunosblots normalizados con la β -actina. D) El histograma del ratio de phospho-p65 / p65 como marcador de la activación de la ruta del NF- κ B. Los histogramas muestran las densidades ópticas de las bandas de tres experimentos desarrollados independientemente. Los valores se presentan como media \pm desviación típica. ***: ($p < 0,001$).

NRF2

Nrf2 es un factor de transcripción esencial en la respuesta celular al estrés oxidativo ya que se une a las zonas del DNA denominadas regiones de respuesta antioxidante (ARE)(Zhang, 2006). En condiciones basales, los niveles de Nrf2 permanecen relativamente bajos, porque es secuestrada en el citosol por Keap1 (Jung et al., 2009). El mecanismo de activación de Nrf2 depende de un incremento en el estrés oxidativo (Wakabayashi et al., 2010). Así, una mayor expresión de Nrf2 conlleva la activación de esta vía (Lau et al., 2010). Nuestro estudio reveló una fuerte activación de Nrf2 en diestro, debido a una alta expresión de esta proteína en esta fase, que ha sido evaluada mediante inmunoblot con diferencias significativas con los niveles encontrados en estro (Figura 24, $p < 0,050$).

La autofagia en el ciclo estral

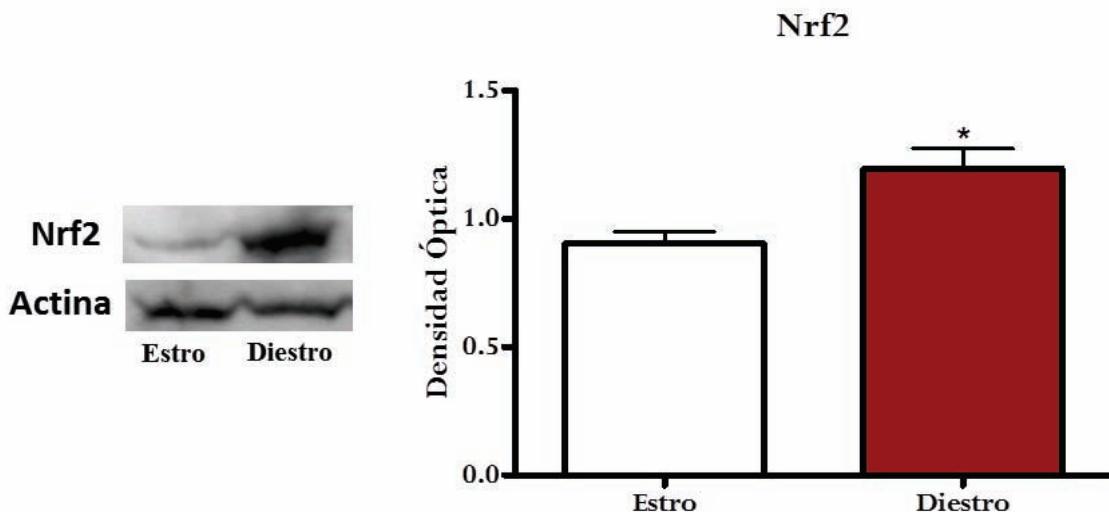


Figura 24. Inmunoblot representativo para Nrf2 en las diferentes fracciones de GH de la fase de estro y diestro. El histograma de Nrf2 cuantifican la densidad óptica de los inmunosblots normalizados con la β -actina. El histograma muestra las densidades ópticas de las bandas de tres experimentos desarrollados independientemente. Los valores se presentan como media \pm desviación típica. *: ($p < 0,050$).

SISTEMAS PROTEOLÍTICOS

SISTEMA UBIQUITIN-PROTEOSOMA (UPS)

El proteosoma es conocido como el mecanismo que degrada la mayoría de las proteínas intracelulares, incluidas las de vida corta y larga. El sistema Ub/20S es el responsable de tal degradación. La medición de la actividad de la subunidad 20S del proteasoma mostró una elevada actividad en estro con diferencias significativas con la actividad encontrada en diestro ($p < 0,010$) (Figura 25).

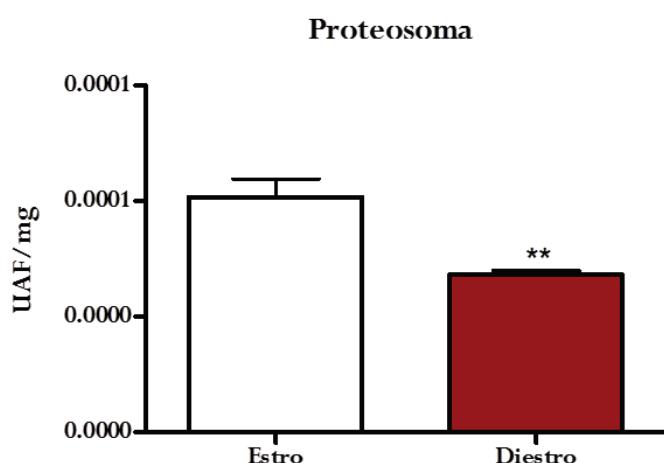


Figura 25 Actividad del Proteosoma de extractos de tejido en fase de estro y diestro de las GH. Los resultados están expresados en equivalentes de unidades arbitrarias de fluorescencia UAF/ mg proteína. Los valores se presentan como media \pm desviación típica. *: ($p < 0,050$).

Resultados

Sin embargo, el análisis tanto de la ubiquitina libre como de las proteínas poliubiquitinadas mediante westernblot, no mostró diferencias estadísticas (Figura 26).

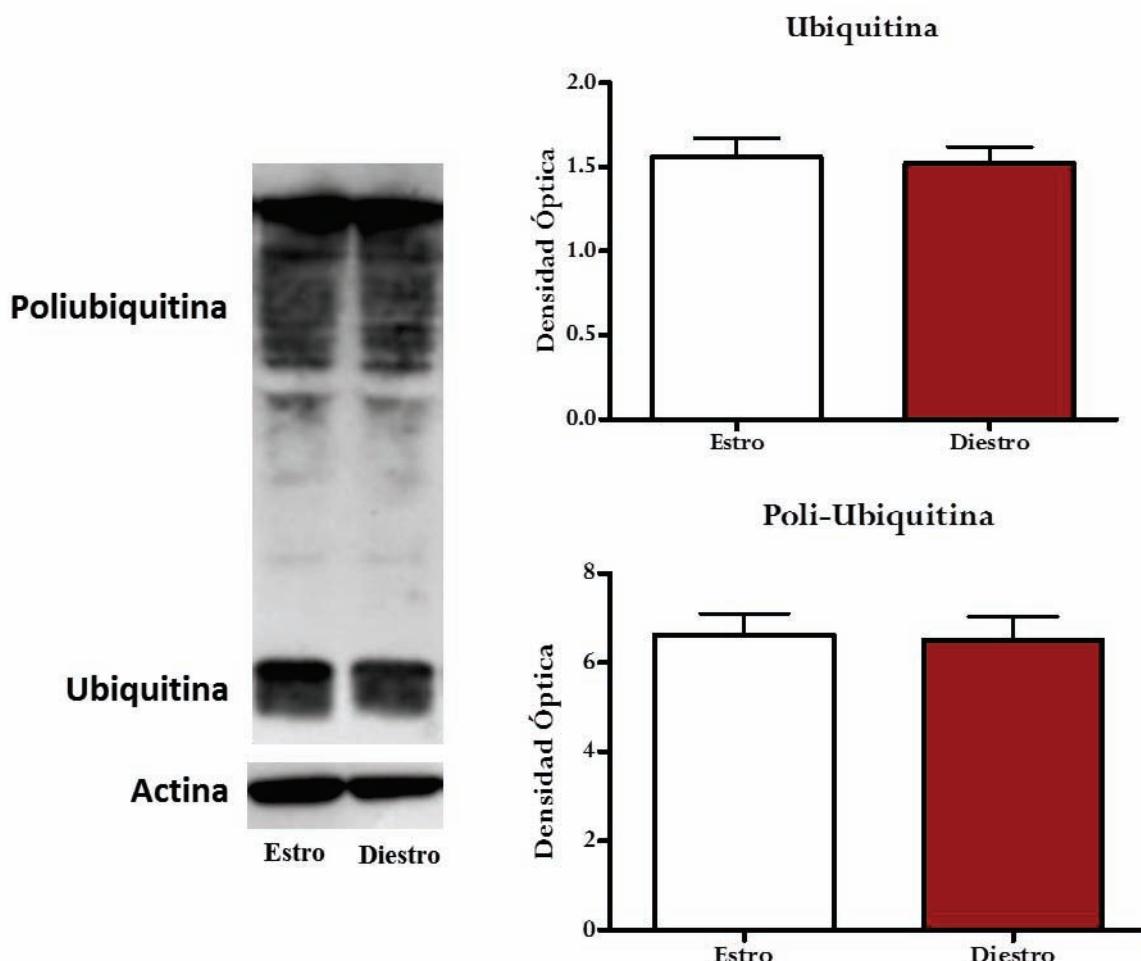


Figura 26 Inmunoblot representativo para poliubiquitina y ubiquitina en las diferentes fracciones de GH de la fase de estro y diestro. Los histogramas de ubiquitina y poliubiquitina cuantifican la densidad óptica de los inmunosblots normalizados con la β -actin. Los histogramas muestran las densidades ópticas de las bandas de tres experimentos desarrollados independientemente. Los valores se presentan como media \pm desviación típica.

LISOSOMAL-AUTOFAGICO

El estudio de la expresión de la catepsina D, una de las principales proteasas lisosomales, nos proporciona una valiosa información acerca de la afectación del sistema lisosomal ya que durante procesos de autofagia masiva, acontece a nivel celular una vacuolización extensa que bloquea el tráfico de procatepsina D hacia los lisosomas, de manera que se produce una acumulación de procatepsina D en detrimento de la forma madura. De este modo, el análisis de

La autofagia en el ciclo estral

la presencia de esta proteasa y de su proforma nos informa sobre la existencia o no de dicho bloqueo así como de la magnitud de los procesos autofágicos presentes en una célula. Nuestros resultados no mostraron diferencias en cuanto a la expresión de la proforma, procatepsina D, mostrando, sin embargo, una mayor expresión de la forma madura en el diestro (Figura 27, $p<0,001$)

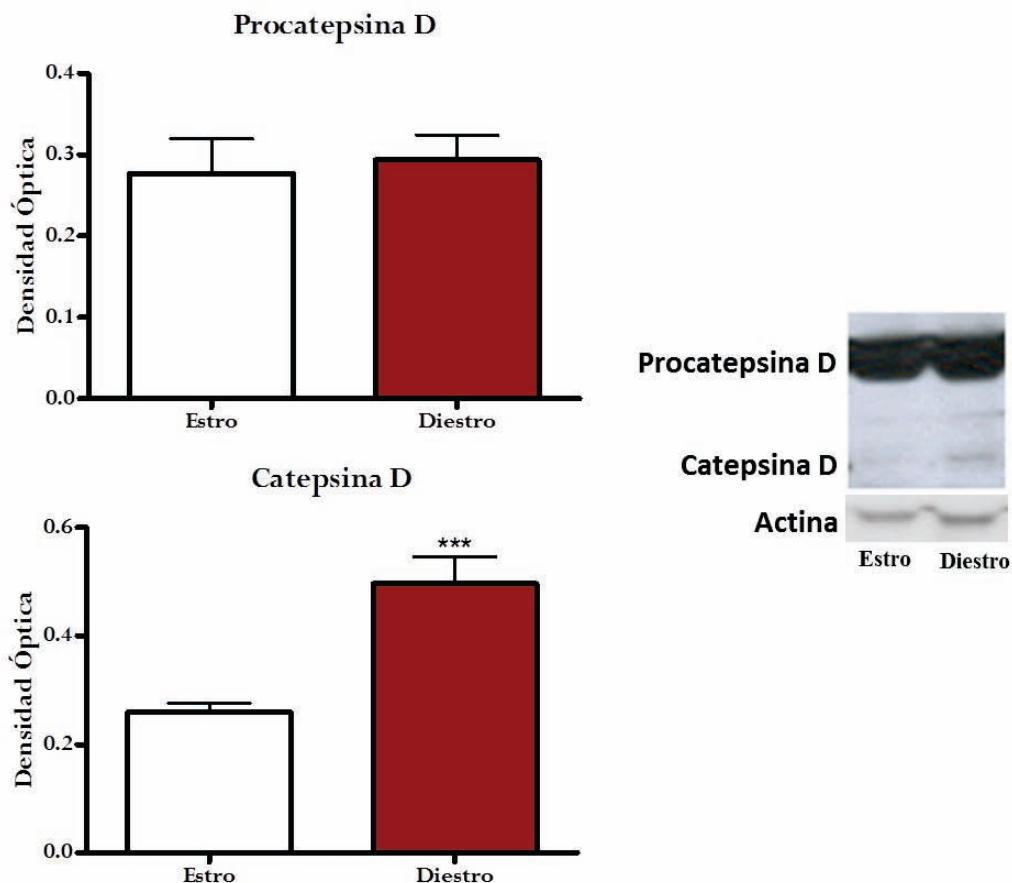


Figura 27 Inmunoblot representativo para catepsina D en las diferentes fracciones de GH de la fase de estro y diestro, en el que se aprecian la banda de la forma inmadura, la procatepsina D, así como la madura, catepsina D. Los histogramas de procatepsina D y catepsina D cuantifican la densidad óptica de los inmunosblots normalizados con la β -actina. El histograma muestra las densidades ópticas de las bandas de tres experimentos desarrollados independientemente. Los valores se presentan como media \pm desviación típica. ***: ($p < 0,001$).

ESTUDIO 4: RESPUESTA AUTOFÁGICA

Como principal mecanismo de supervivencia que desarrolla nuestra glándula al estrés oxidativo, el estudio se centró en los dos tipos de autofagia que responden al desbalance del estado redox: la autofagia mediada por chaperonas (CMA) y macroautofagia, CMA responde a niveles moderados de estrés oxidativo y la macroautofagia se dispara ante situaciones de estrés exacerbado, así como también se encarga de degradar orgánulos dañados por unos niveles elevados de radicales libres (Cuervo and Dice, 2000).

AUTOFAGIA MEDIADA POR CHAPERONAS

Lamp2 es un gen que experimenta ayuste alternativo, resultando en tres diferentes ARNm que codifican las tres variantes de esta proteína: Lamp-2a, Lamp-2b y Lamp-2c. Aunque es posible que todas las isoformas compartan funciones comunes, se han demostrado funciones específicas para cada isoforma. Lamp-2a es la única isoforma que se ha mostrado que participa en la CMA, y es, por tanto, usada como marcador de este proceso catalítico (Cuervo and Dice, 1996). Por ello, para evaluar la actividad de la autofagia mediada por chaperonas, estudiamos la expresión de Lamp-2a por westernblot. Los resultados mostraron una mayor expresión en estro respecto al diestro (Figura 28, $p < 0,001$), que implica que este tipo de degradación lisosomal es más activa en estro que en diestro.

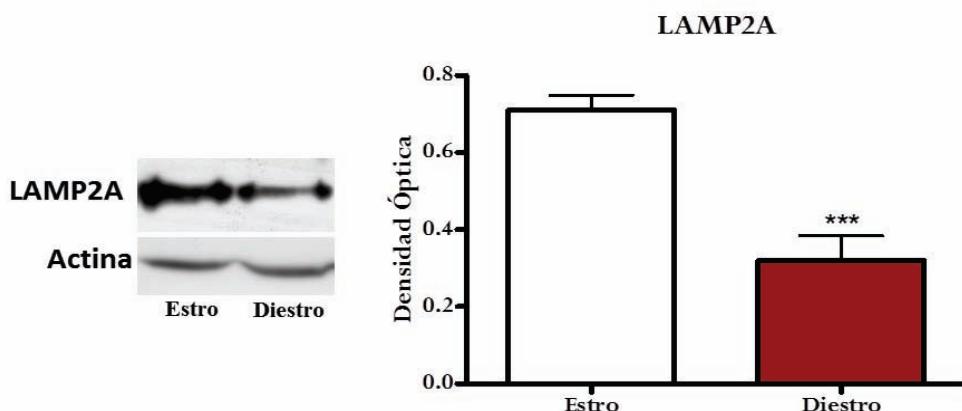


Figura 28 Inmunoblot representativo para LAMP2A en las diferentes fracciones de GH de la fase de estro y diestro. El histograma de LAMP2A cuantifica la densidad óptica de los inmunosblots normalizados con la β -actina. El histograma muestra las densidades ópticas de las bandas de tres experimentos desarrollados independientemente. Los valores se presentan como media \pm desviación típica. ***: ($p < 0,001$).

La autofagia en el ciclo estral

MACROAUTOFAGIA

Se realizó un pormenorizado estudio de la inducción de la macroautofagia, como también sus marcadores más importantes, en ambas fases del ciclo estral mediante inmunohistoquímica y westernblot. Los resultados sugirieron que la autofagia está estimulada en la fase estro, cuando los estrógenos están ejerciendo su máxima actividad y estando, sin embargo, bloqueado por mTOR en el diestro.

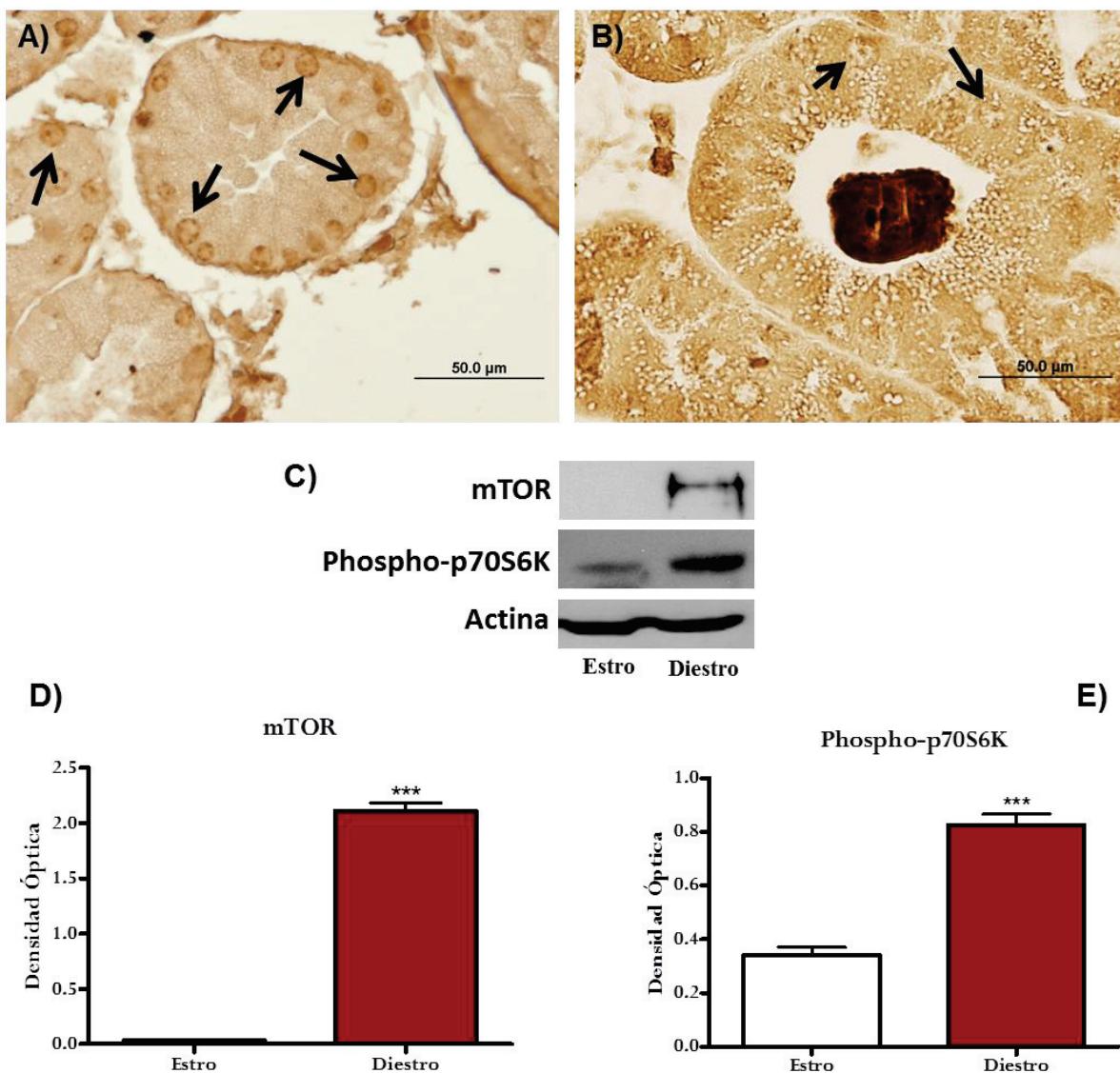


Figura 29 Inducción de la autofagia por la vía de mTOR. El marcaje positivo mediante inmunohistoquímica para p-mTOR (Ser 2448) en nucleos (flechas) de GH de hamster hembra durante el diestro (A) y marcaje negativo (flechas) en estro (B) (Barra = 50 μm). C) Inmunoblot representativo para mTOR total y phospho-p70S6K en fase de estro y diestro. Los histogramas de m-TOR (D) y phospho-p70SK (E) cuantifican la densidad óptica de los inmunosblots normalizados con la β-actin. Los histogramas muestran las densidades ópticas de las bandas de tres experimentos desarrollados independientemente. Los valores se presentan como media ± desviación típica. ***: ($p < 0,001$).

Resultados

La diana de la rapamicina en mamíferos, mTOR (mammalian target of rapamycin), es una proteína quinasa que está implicada en el control de un amplio rango de procesos celulares, incluyendo entre ellos a la autofagia. La activación de mTOR por su fosforilación en la Serina 2448 produce la inhibición de la autofagia (Chiang and Abraham, 2005). Por el contrario, la inhibición de esta fosforilación induce el proceso.

Para evaluar la presencia de mTOR se realizó un ensayo de westernblot, en el cual se encontró como mTOR solo se expresaba en la fase de diestro (Figura 29C y 29D). A continuación, se evaluó la fosforilación del mismo mediante inmunohistoquímica. Fue observado resultado positivo, con núcleos fuertemente teñidos, en la fase de diestro (Figura 29A). Este resultado positivo, no sólo informó de la actividad del mTOR por estar fosforilado, sino que también confirmó la misma con su localización nuclear. En la fase de estro no fue encontrada ninguna célula con marcaje positivo (Figura 29B). Este resultado positivo para p-mTOR (Ser 2448) en el diestro y negativo en el estro implicaba que la autofagia estaba inhibida solo en diestro (Figura 29A y 29B). Para confirmar que mTOR está activado en diestro, fue estudiada una de sus proteínas diana p70S6K. Cuando la vía de mTOR está activada, ambas, mTOR y p70S6K están fosforiladas, y la autofagia se encuentra, por tanto, inhibida. La fosforilación en la treonina 389, que marca la actividad de p70S6K, fue estudiada por westernblot. Los resultados mostraron una menor expresión del phospho-p70S6K en estro respecto al diestro (Figura 29C y 29E), lo cual concuerda con la activación de mTOR. Respecto a la presencia de la forma fosforilada del p70S6K en la fase de estro, pese a que mTOR no se expresó en esta fase, puede deberse a que diversas proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) pueden también fosforilar a p70S6K directamente (Mukhopadhyay et al., 1992). Sin embargo, MAPK no es suficiente para provocar la activación del p70S6K, el cual es un complejo proceso que requiere multiples estímulos (Pullen and Thomas, 1997), siendo el mTOR esencial para su activación (Pullen and Thomas, 1997; Wang et al., 2011).

Para el estudio de la macroautofagia en la glándula de Harder del hamster Sirio durante las fases de estro y diestro, se realizaron análisis de western blot para sus principales marcadores Beclin-1 y LC3, utilizando β -actina como marcador de carga.

La autofagia en el ciclo estral

Beclin-1, es una proteína que interacciona con una fosfatidilinositol 3-quinasa de clase III cuya proteína homóloga en levaduras a Atg6. Beclin-1 juega un importante papel promoviendo la autofagia (Furuya et al., 2005). El análisis realizado mediante inmunoblot muestra diferencias significativas entre las fases de estudio (Figura 31). Las glandulas analizadas en la fase de estro mostraron una mayor expresión de esta proteína ($p < 0,001$) respecto a las estudiadas en la fase de diestro, indicando que la estimulación de la autofagia se produce en la fase de estro (Figura 31).

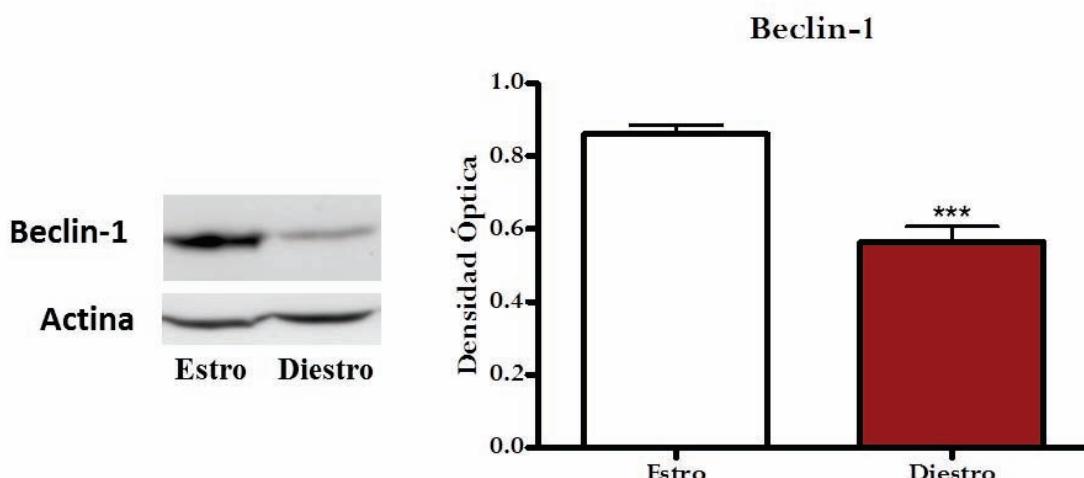


Figura 30 Inmunoblot representativo para Beclin-1 en las diferentes fracciones de GH de la fase de estro y diestro. El histograma de Beclin-1 cuantifica la densidad óptica de los inmunosblots normalizados con la β -actina. El histograma muestra las densidades ópticas de las bandas de tres experimentos desarrollados independientemente. Los valores se presentan como media \pm desviación típica. ***: ($p < 0,001$).

La proteína asociada a microtubules de cadena ligera 3 (Microtubule-associated protein light chain 3 (LC3)) es a la proteína de levaduras Atg8. La modificación del LC3 es esencial para que se desarrolle la autofagia, ya que la forma LC3-II está localizada en preautofagosomas y autofagosomas y es considerada marcador de autofagosomas. El análisis por westernblot mostró dos bandas que corresponden a LC3-I y LC3-II, a 16 y 18 kDa, respectivamente (Figura 31A). Se observaron valores similares para LC3-I (Figura 31B) en ambas etapas pero fue encontrada una expresión significativamente mayor de LC3-II en estro respecto al diestro ($p < 0,001$) (Figura 31C). Este resultado implica que hay más autofagosomas (en proceso de fusionarse con los lisosomas o acumulándose en el citoplasma) en estro que en diestro. El resultado del ratio

Resultados

entre LC3-I y LC3-II fue, consecuentemente, mayor en estro ($p<0,010$) (Figura 31D), indicando que los autofagosomas se están formando principalmente en esta fase.

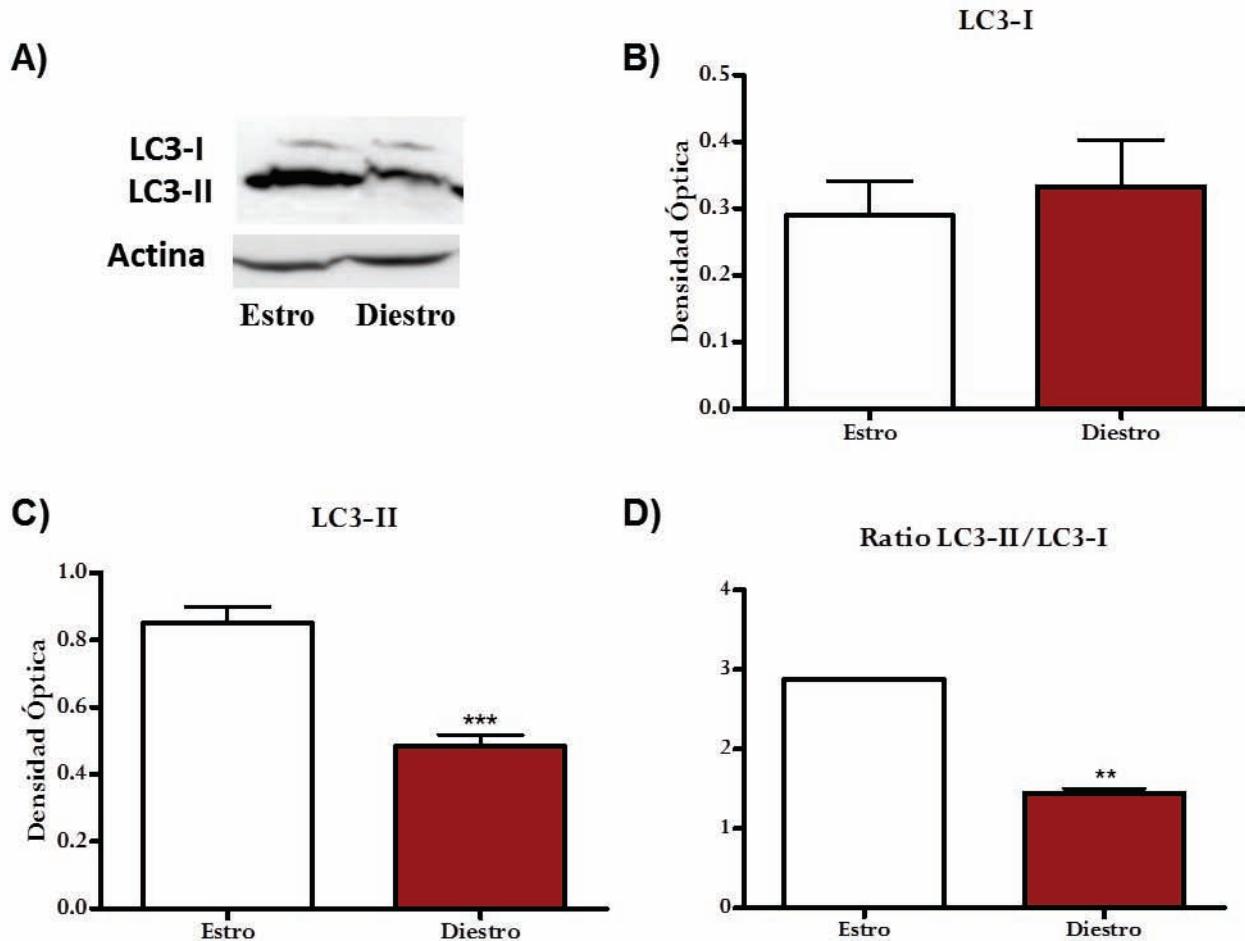


Figura 31 Formación de autofagosomas. A) Inmunoblot representativo para LC3 en las diferentes fracciones de GH de la fase de estro y diestro. Los histogramas de LC3-I (B) y LC3-II (C) cuantifican la densidad óptica de los inmunosblots normalizados con la β -actina. D) El histograma del ratio de LC3-II/ LC3-I como marcador de la formación de autofagosomas. Los histogramas muestran las densidades ópticas de las bandas de tres experimentos desarrollados independientemente. Los valores se presentan como media \pm desviación típica. **: ($p < 0,01$), ***: ($p < 0,001$).

AUTOFAGIA SELECTIVA

ESTUDIO DEL ESTADO MITOCONDRIAL

La mitocondria es un orgánulo esencial para la supervivencia celular (Caballero et al., 2013), debido a que es la encargada de proporcionar la mayor parte de la energía que necesitan las células. Pero en este proceso, se generan radicales libres que alteran el balance oxidativo

La autofagia en el ciclo estral

celular (Leon et al., 2004; Suski et al., 2011). Además, la mitocondria desempeña un papel muy importante en el metabolismo lipídico (Schatz, 1995), el cual tiene una importancia fundamental en la GH. Para caracterizar su estado funcional, fue estudiada la actividad del enzima citrato sintasa (CS), la generación de ATP, la superóxido dismutasa 2 (SOD2) y la expresión de NIX, como marcador de mitofagia.

La citrato sintasa es el primer enzima del ciclo de Krebs, y por tanto se sitúa en la matriz mitocondrial, es por esta localización tan específica, por lo que se usa como indicador de la población mitocondrial (Garcia-Macia et al., 2011). En base a esta información, se ha visto como el número de mitocondrias es mayor en diestro respecto al estro (Figura 32A, $p<0,050$).

Una vez evaluada la cantidad, evaluar la eficiencia mitocondrial resultó más que necesario, para lo cual, se realizó el estudio de los niveles de ATP. Las células de la glándula que mostraron una mayor dotación energética fueron aquellas que se estudiaron en diestro, con unos

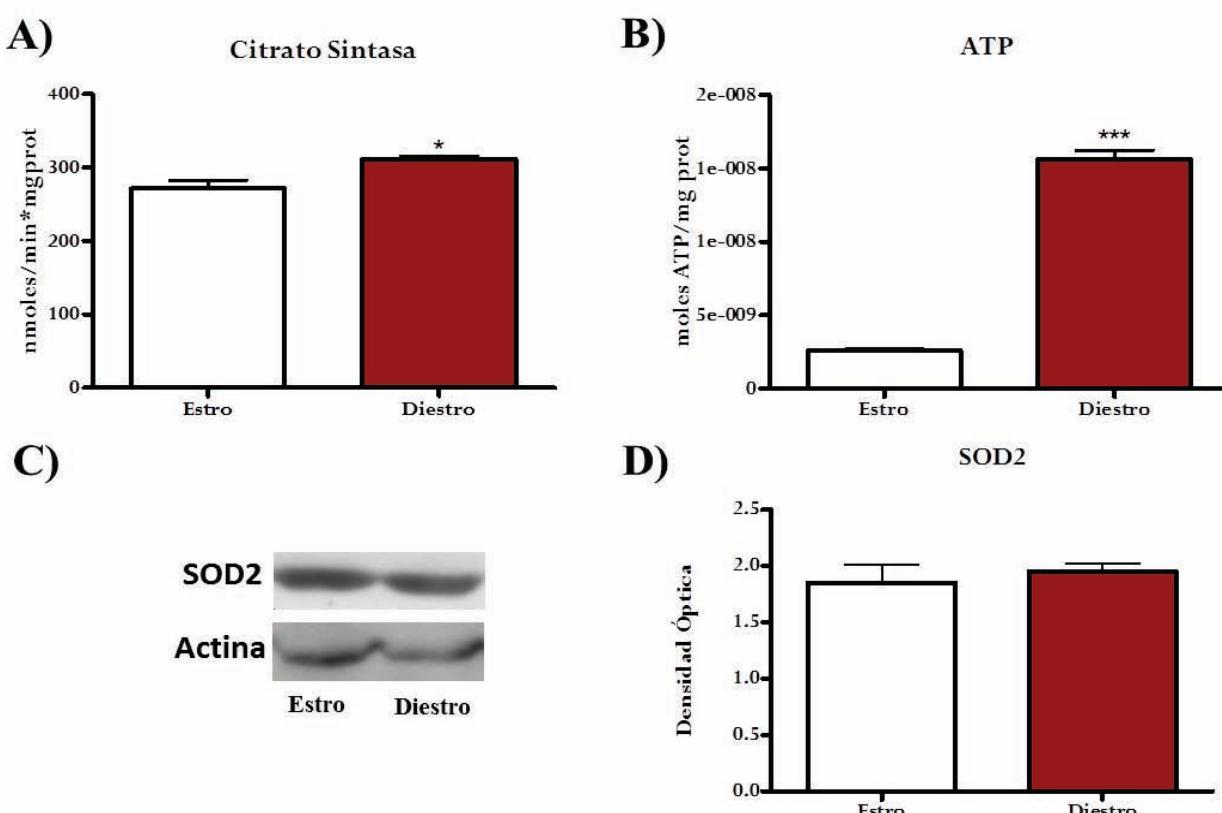


Figura 32 Estado mitocondrial. A) Actividad del enzima Citrato Sintasa (CS), B) Niveles de ATP intracelular, C) Inmunoblot de superóxido dismutasa 2 (SOD2) y D) el histograma de SOD2 que cuantifica la densidad óptica de los inmunosblots normalizados con la β -actina. Los resultados de CS están expresados en nmolés/min*mg protein. Los niveles de ATP están expresado en molés de ATP/g proteína. Los valores se presentan como media \pm desviación típica. *: ($p<0,050$) ***: ($p<0,001$).

niveles muy superiores de ATP, a los encontrados en fase de estro (Figura 32B, $p<0,001$). En la cadena de transporte de electrones, cuya finalidad es la obtención final de ATP, se produce una pequeña cantidad de EROs, un coste a pagar por el uso del O₂ como donador de electrones. Evolutivamente se generó una respuesta a la generación de estos radicales libres, por lo que la mitocondria fue dotada de un sistema antioxidante propio, con lo que, evaluar la estabilidad de éste, nos indica de una forma indirecta, la viabilidad mitocondrial. Por este motivo fue ensayada la expresión de la SOD2, proteína antioxidante propia de las mitocondrias (Macmillan-Crow and Cruthirds, 2001). Los resultados no mostraron diferencias en la expresión de SOD2 en las dos fases de estudio del ciclo estral de nuestras glándulas (Figura 32C).

MITOFAGIA

En los últimos años se han descrito diferentes procesos en los que la autofagia parece ser un mecanismo de degradación selectiva de orgánulos, en el caso de ser degradadas mitocondrias, en la mayoría de los casos, dañadas o envejecidas (Coto-Montes, 2013; Coto-Montes et al., 2012), se denomina mitofagia. (Coto-Montes et al., 2012; Kim et al., 2007; Lemasters, 2005). La proteína mitocondrial NIX ha sido descrita como un receptor de autofagia, que media la eliminación de mitocondrias dañadas. Esto es así ya que NIX presenta un dominio de interacción con LC3, lo que permite el englobamiento de mitocondrias marcadas con NIX en autofagosomas (Novak et al., 2010). La evaluación de la expression de NIX, mostró que sus niveles fueron más bajos en diestro respecto al estro (Figura 33A, $p<0,010$). Para corroborar que se estaban eliminando las mitocondrias mediante un proceso de autofagia, se realizó un estudio de microscopia electrónica, en el cual se buscó la presencia de mitocondrias dentro de autofagosomas, es decir, la presencia de mitofagosomas (Kim et al., 2007). En este análisis, encontramos una abundante cantidad de mitofagosomas en fase de estro como los que mostramos en la figura 33B.

La autofagia en el ciclo estral

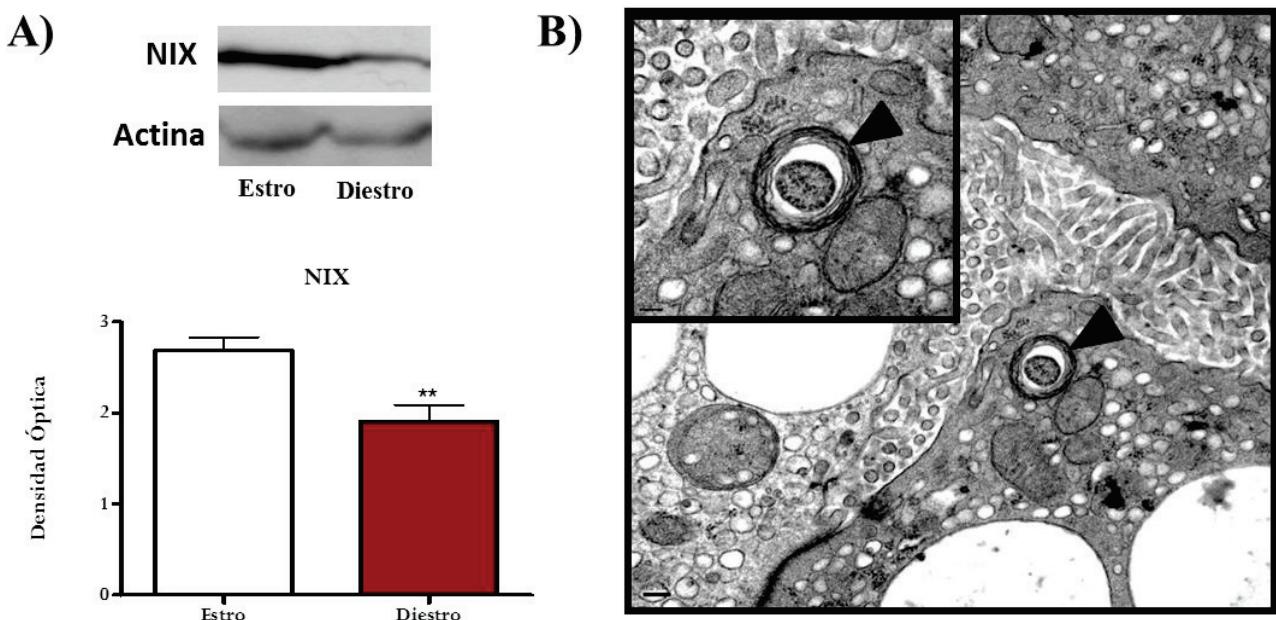


Figura 33 Mitofagia. Immunoblot representativo para NIX en las diferentes fracciones de GH de la fase de estro y diestro. El histograma de NIX cuantifica la densidad optica de los inmunosblots normalizados con la β -actina. B) Fotografía de microscopía electrónica célula glandular de glándula de Harder de hámster Sirio hembra en fase de estro mostrando un autofagosoma que contiene una mitocondria (mitofagosome) (cabeza de flecha). En la esquina superior izquierda se muestra una ampliación del mitofagosome. Barra: 1 μm . El histograma muestra las densidades ópticas de las bandas de tres experimentos desarrollados independientemente. Los valores se presentan como media \pm desviación típica. **: ($p < 0.01$).

LIPOFAGIA

p62, una proteína de interacción con LC3, es una proteína clave en la autofagia, para regular la homeostasis celular, para que los agregados de proteínas sean degradados de forma específica (Inami et al., 2011; Lin et al., 2013). Además, recientes estudios han descrito a p62 como un regulador clave para procesos de lipólisis (Inami et al., 2011). p62 media entre el UPS y la autofagia después del daño proteotóxico (Su and Wang, 2011). Los niveles de p62 fueron estudiados en la GH durante el ciclo estral. En cuanto a la expresión de la forma proteína de p62, los niveles encontrados por western blot fueron significativamente altos en estro respecto al diestro (Figura 34A, $p < 0.010$). Para determinar si se trataba de un proceso activo de síntesis o un acumulo de proteína se midieron los niveles de ARNm, y se observó como también existe una mayor cantidad de ARN que codifica esta proteína en estro en comparación con diestro (Figura 34B, $p < 0.010$).

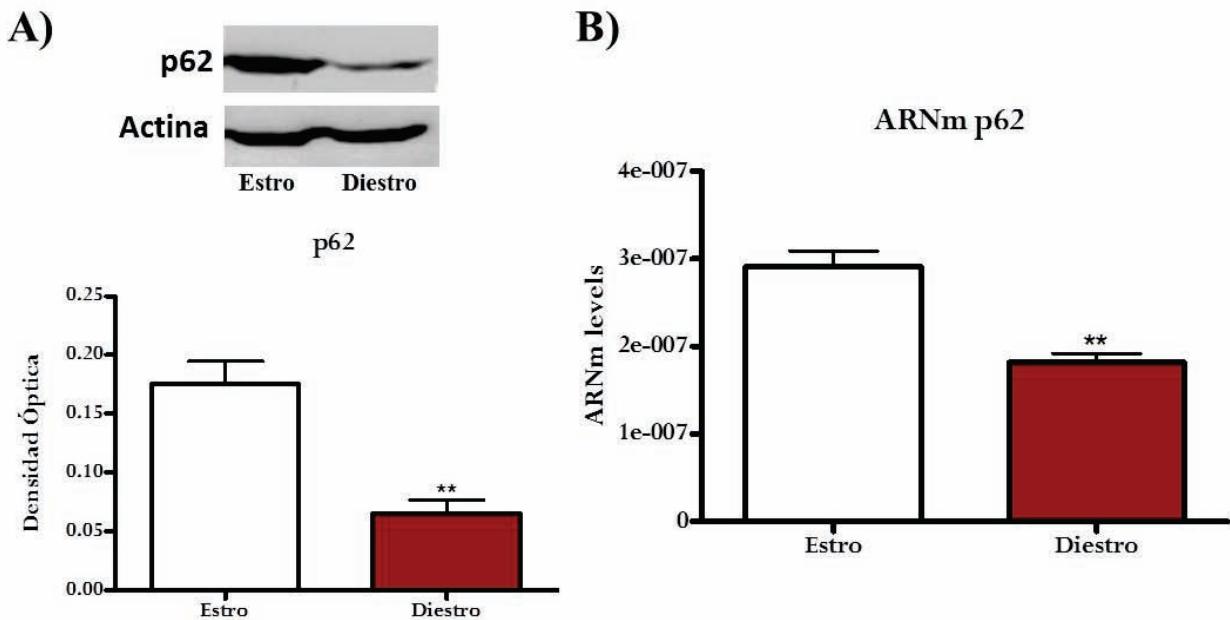


Figura 34 A) Inmunoblot representativo para p62 en las diferentes fracciones de GH de la fase de estro y diestro. El histograma de p62 cuantifica la densidad óptica de los immunosblots normalizados con la β -actina. Niveles relativos de ARNm para el p62, normalizado con respecto a los niveles de ARNm del 18s de cada grupo experimental. El histograma muestra las densidades ópticas de las bandas de tres experimentos desarrollados independientemente, así como los análisis de los niveles ARNm se han realizado en tres experimentos independientes. Los valores se presentan como media \pm desviación típica. **: ($p < 0,01$); ***: ($p < 0,001$).

Además de su implicación en la degradación selectiva de proteínas, p62 interactúa con TNF- α y NF- κ B a través de varios de sus dominios (Manley et al., 2013). De hecho, ésta puede ser una de las vías más importantes para la regulación de la homeostasis lipídica que también realiza p62 (Lee et al., 2010; Vega-Naredo et al., 2012)). Recientemente, NF- κ B fue relacionado con la lipólisis inducida por el factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α) (Tumor Necrosis Factor- α). La activación de NF- κ B es importante para el mantenimiento de esta respuesta lipolítica (Laurencikiene et al., 2007), en la cual, la perilipina (PLIN) ejerce un papel esencial. PLIN es una proteína protectora contra las lipasas que se ubica alrededor de las gotas lipídicas, por tanto, es la principal reguladora del almacenamiento de lípidos. Cuando la perilipina desaparece, las lipasas pueden realizar su función catalítica (Miyoshi et al., 2006; Moore et al., 2005). Nuestros resultados mostraron un descenso significativo en la expresión de perilipina en estro (Figura 35A, $p < 0,050$); así mismo, se observó una activación del NF- κ B en

La autofagia en el ciclo estral

esta fase. Por tanto, parece que la vía lipolítica se encuentra desbloqueada en esta fase del ciclo estral.

En consecuencia, siguiendo esta línea argumental, este detrimiento de la expresión de la PLIN observada permitiría la actividad de las lipasas. Para concluir si se está produciendo un

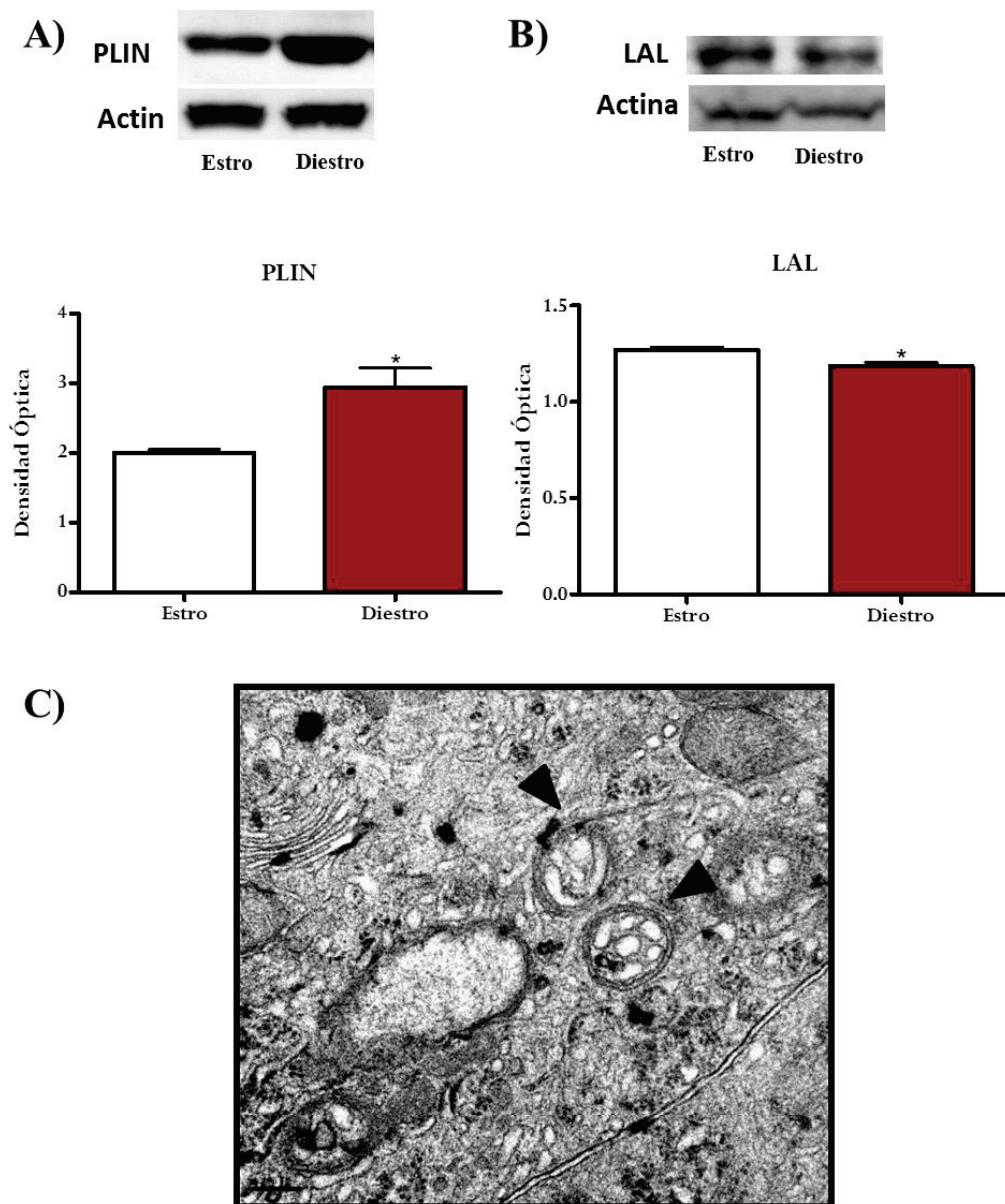


Figura 35 Lipofagy A) y B) Inmunoblot representativo para perilipina (PLIN) y la lipasa lisosomal ácida (LAL) en las diferentes fracciones de GH de la fase de estro y diestro. Los histogramas de PLIN y LAL cuantifican la densidad óptica de los inmunosblots normalizados con la β -actina. C) Fotografía de microscopía electrónica célula glandular de glándula de Harder de hámster Sirio hembra en fase de estro mostrando un autófagosomas que contienen unas gotas lípidicas (cabeza de flecha). Barra: 1 μ m. El histograma muestra las densidades ópticas de las bandas de tres experimentos desarrollados independientemente. Los valores se presentan como media \pm desviación típica. *: ($p < 0,050$).

proceso clásico de lipólisis, se ha de evaluar la expresión de la lipasa acida lisosomal (LAL). Esta lipasa se ha relacionado con la degradación de los esteres de colesterol y los triglicéridos (Anderson et al., 1999). Los resultados mostraron un patrón opuesto para LAL respecto a PLIN, por lo que, con una mayor expresión de LAL en estro (Figura 35B, $p<0,050$). Estos resultados en conjunto muestran una activación de los procesos lipolíticos en estro.

Curiosamente, estudios recientes sugieren una estrecha relación entre la actividad del LAL y el recién descrito proceso de autofagia selectiva de lípidos, la lipofagia (Pearson et al., 2014; Skop et al., 2012). Este proceso describe como la maquinaria de la autofagia es la que moviliza fragmentos de las gotas lipídicas al lisosoma, para su degradación posterior por las lipasas. Los resultados de los marcadores de la autofagia obtenidos mostraron una activación de este en estro, al tiempo que una mayor lipólisis. Esto sugiere que puede estar produciéndose este proceso descrito recientemente, la lipofagia, en la GH de las hembras en la fase del ciclo estral. Para confirmar si este proceso se está llevando a cabo es de vital relevancia el análisis de microscopia electrónica para estudiar el contenido de los autofagosomas. En este estudio se observó numerosos autofagosomas que contenían fragmentos de gotas lipídicas, más numerosos en estro (figura 35C).

Discusión

Estudios previos han mostrado como la glándula de Harder (GH) está regulada por cambios en las hormonas sexuales así como control pineal (Hoffman et al., 1985). Esta modulación se produce ya que la GH expresa receptores para andrógenos, estrógenos y melatonina en animales de ambos sexos (Coto-Montes et al., 1996; Tomas-Zapico et al., 2005a; Vilchis and Perez-Palacios, 1989). La respuesta de la GH a cambios en las hormonas sexuales es rápida y total, cambios en el fotoperiodo y la castración en machos adultos resulta en la feminización de la estructura glandular, implicando un rápido incremento de la producción de porfirinas y una reducción de células de tipo II (Coto-Montes et al., 1994; Payne et al., 1977). La administración de testosterona a hámster hembras (Marrufo et al., 1989) conduce a la masculinización de la glándula, incluyendo cambios en la producción de porfirinas y un incremento en las células de tipo II. Estos cambios en la producción de porfirinas implican importantes variaciones en el balance redox de la glándula, ya que, cuando la glándula es muy activa, como en el caso de las hembras, el estrés oxidativo es exacerbado. Nuestro grupo ha demostrado como los procesos lisosomal-autofágicos ayudan a contrarrestar el estrés oxidativo en las glándulas de ambos sexos (Tomas-Zapico et al., 2005b). Se ha mostrado como la autofagia en la GH de machos promueve la supervivencia celular, con un estrés oxidativo moderado, mientras que en hembras, con estrés oxidativo exacerbado, la autofagia culmina en muerte celular por desprendimiento (Vega-Naredo et al., 2009). Aunque estas diferencias en la evolución de la autofagia sugieren que las hormonas sexuales están relacionadas en la regulación de este proceso en la GH de ambos sexos, los datos que apoyan esta relación no son definitivos. Sin embargo, en el presente trabajo se muestra como la autofagia fluctúa a lo largo del ciclo estral, no solo como una consecuencia de las variaciones del estado redox, sino también como un mecanismo activo que controla la actividad de la GH.

La autofagia en el ciclo estral

BALANCE REDOX EN EL CICLO ESTRAL

La producción de especies reactivas de oxígeno es más que inevitable en el metabolismo mitocondrial, este hecho ha producido que evolutivamente se desarrollen mecanismos de respuesta y eliminación de estas especies dañinas. No obstante, la respuesta evolutiva no se caracteriza por ser un proceso unidireccional un incremento en los radicales libres ha servido como señalización para diferentes respuestas fisiológicas. Como ejemplo, tradicionalmente se ha descrito a la ovulación. La ovulación es el principal evento en el ciclo reproductor de las hembras de todas las especies animales, marca su capacidad fértil. Durante este evento, se produce una respuesta muy similar a una respuesta inflamatoria (Miyazaki et al., 1991), en los órganos reproductores se dispara la señalización de diferentes vías pro-inflamatorias. En base a esto, el hecho de observar un elevado estrés oxidativo en la fase de estro en la GH, etapa en la que produce la ovulación, con un mayor daño proteíco, debido en parte a una reducida capacidad antioxidante, parece adquirir sentido fisiológico. Así mismo, este desequilibrio redox fomenta la activación de la vía del NF-κB, que incrementa la transcripción de abundantes factores pro-inflamatorios.

Previamente se ha descrito como la GH desarrolla autofagia como mecanismo de supervivencia al estrés oxidativo (Tomas-Zapico et al., 2005b). Así mismo, la respuesta generada a este ambiente hostil, no solo se produce a nivel transcripcional, se observa una robusta activación de la maquinaria autofágica, tanto a nivel de la macroautofagia como de la autofagia mediada por chaperonas (CMA). La CMA está asociada a niveles moderados de estrés oxidativo (Kiffin et al., 2006), es un mecanismo selectivo que degrada proteínas oxidadas. Este proceso ya ha sido descrito en la GH (Vega-Naredo et al., 2009), no obstante, la variación observada durante el ciclo estral potencia la capacidad de este órgano para adaptarse a los cambios que origina el estrés oxidativo. No sólo estos mecanismos proteolíticos se ven incrementados, la respuesta del sistema ubiquitin-proteosoma (UPS), también se ve incrementada en esta situación de elevado estrés. El UPS interviene en el control de calidad celular, ya que degrada proteínas

dañadas que pueden formar agregados (Nandi et al., 2006). Con lo que el incremento en este proceso contribuye a eliminar las proteínas dañadas, de las que tenemos excedente.

La plasticidad que muestra la GH frente a los cambios en las hormonas sexuales ha sido demostrado en trabajos anteriores, que realizaban una manipulación del contenido de las mismas (Coto-Montes et al., 1994; Rodriguez-Colunga et al., 1993). Durante el ciclo estral se producen cambios drásticos en los niveles hormonales, la ovulación se produce como respuesta al pico de secreción de estrógenos. Nuestros resultado muestran como el estímulo que produce el estradiol es capaz de estimular una robusta respuesta proteolítica en la glándula de Harder. Esto sugiere que la función de este órgano, no es tan simple como la de lubricar la superficie ocular, sino que parece adquirir una funcionalidad en el sistema reproductor.

No podemos olvidar el papel hormonal de la melatonina, descrito previamente. En trabajos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación se ha sugerido que la administración crónica de la melatonina induce cambios en la actividad de la GH y su morfología, mostrando además cambios en la fisiología reproductora del hamster (estado gondadal) (Rodriguez-Colunga et al., 1992; Vega-Naredo et al., 2012). Se observó como el tratamiento de melatonina puede modificar el número de células de tipo II (Rodriguez-Colunga et al., 1991). Sin embargo, las hembras que han sufrido una ovariectomía a largo plazo, no muestran este cambio en células de tipo II (Rodriguez-Colunga et al., 1991), sugiriendo una interacción de la melatonina con otras hormonas que modulan estos cambios morfológicos. Curiosamente, se han descrito efectos anti-estrogénicos de la melatonina (Rato et al., 1999). Se han propuesto efectos anti-estrogénicos de la melatonina a nivel celular en líneas celulares de cáncer de mama (Cos et al., 1991; Hill and Blask, 1988). Estudios recientes han mostrado como este efecto se debe principalmente a la inducción del receptor de membrana de melatonina MT₁ (Girgert et al., 2009). Mientras, que la participación de los receptores nucleares están aún sin aclarar (Girgert et al., 2009).

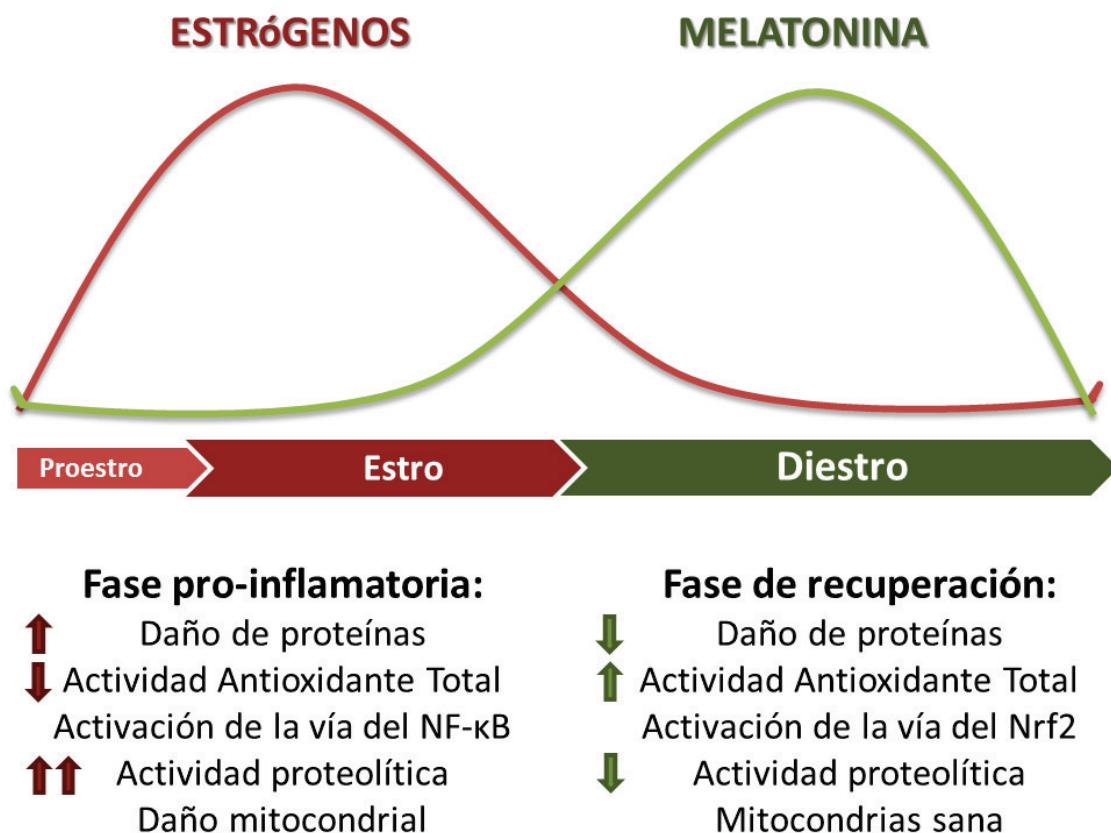
La tasa de secreción de melatonina varía de forma sincronizada con el ciclo estral (Ozaki et al., 1978). Esta indolamina pineal tiene su pico de secreción de mayor tamaño cuando la secreción de estrógenos es menor, en la fase de diestro (Ozaki et al., 1978; Soares et al., 2003).

La autofagia en el ciclo estral

En concordancia a esto, los receptores de melatonina, tanto MT₁ y ROR α , están expresados fuertemente en esta fase. En el diestro se muestra, en contraposición, una intensa actividad antioxidante que consigue disminuir el daño de proteínas y reduce la activación de la vía del NF- κ B. Por tanto, la melatonina, vía sus receptores, reduce los mediadores pro-inflamatorios y alivia los elevados niveles de estrés oxidativo. Se ha descrito como la melatonina tiene la capacidad de actuar sobre determinados orgánulos como las mitocondrias, incrementando su población (Garcia-Macia et al., 2011) y su eficiencia (Leon et al., 2004), puesto que incrementa la eficacia de la cadena de transporte de electrones, incrementando así la producción de ATP (Leon et al., 2004). Este efecto se observa en los resultados obtenidos en el estudio del estado mitocondrial a lo largo del ciclo, con lo que parece indicar que la melatonina no sólo alivia los elevados niveles de estrés oxidativo, sino que contribuye a que no se produzcan más EROs, mejorando la salud mitocondrial.

Por tanto, después de la intensa actividad promovida por los altos niveles de estrógenos en la fase de estro, la melatonina parece ser la responsable de que en la fase de diestro sea una fase de recuperación en la glándula de Harder. Además, de estos efectos de reparación, llevados a cabo a través de sus propios receptores, la melatonina parece estar estimulando la actividad de otras vías de respuesta antioxidante. Trabajos previos han corroborado que el tratamiento con melatonina induce la activación de Nrf2 y fomentando su translocación nuclear y su subsiguiente unión a las regiones de respuesta antioxidante (ARE) (Aparicio-Soto et al., 2014; Jung et al., 2009). En la fase de diestro, se observa una elevada expresión de Nrf2, que corrobora su activación. Por tanto, el efecto antioxidante de la melatonina parece ser potenciado por la activación de la activación de Nrf2 en esta fase, asociado al mínimo nivel de estrógenos. Resulta llamativo, como recientes estudios han mostrado que la melatonina es capaz de activar la señalización Nrf2 y simultáneamente bloquear la vía del NF- κ B bajo condiciones de estrés oxidativo (Negi et al., 2011). Como se ha descrito previamente, en adicción a los elevados niveles de los receptores de melatonina, fueron encontrados elevados niveles de Nrf2 y un detrimiento de NF- κ B en la glándula de Harder de los hámster hembra en la fase de diestro. La

melatonina, está ejerciendo una labor de recuperación de la homeostasis celular a varios niveles en esta fase del ciclo estral.



Estos resultados plantean que el ciclo estral se compone de dos fases muy diferenciadas en cuanto al balance redox. La fase de estro, en la que los elevados niveles de estrógenos, necesarios para la ovulación, se correlacionan con el elevado estrés oxidativo y produce una respuesta tanto a nivel transcripcional, vía NF-κB, como proteolítica. Mientras que en el diestro, los elevados niveles de melatonina producen una recuperación del balance redox, incluyendo una mejora en el metabolismo mitocondrial, a través de sus propios receptores y de la inducción de la actividad de Nrf2.

La autofagia en el ciclo estral

VARIACIÓN DE LOS PROCESOS AUTOFÁGICOS EN EL CICLO ESTRAL

La principal estrategia de supervivencia de la glándula de Harder frente al estrés oxidativo es la autofagia, principalmente la macroautofagia (Tomas-Zapico et al., 2005b). Además se ha descrito como este mecanismo concierne una diferente respuesta celular, supervivencia o muerte, en función del nivel de estrés oxidativo, en machos cuando el estrés oxidativo es moderado genera una respuesta de supervivencia, mientras que en hembras en las que el estrés oxidativo es exacerbado, la respuesta celular conlleva un muerte celular (Vega-Naredo et al., 2009). Por tanto, la autofagia en la GH es un proceso dinámico, sujeto a cambios hormonales que se correlacionan directamente con el estado redox de la glándula.

Durante el ciclo estral se ha descrito, como estos cambios hormonales generan desequilibrios en el balance oxidativo, que disparan el estímulo de la actividad autofágica. Los resultados han mostrado como la activación de mTOR puede actuar como un interruptor de la autofagia durante el ciclo estral, activando o bloqueando la autofagia y controlando la secreción de porfirinas en la fase de estro. Además, todas las proteínas autofágicas analizadas en este estudio correlacionan inversamente con la expresión de la forma fosforilada de mTOR y pS6K: Beclin-1 y LC3, marcadores de la macroautofagia, y Lamp-2a, un marcador de la autofagia mediada por chaperonas, fueron incrementados en estro respecto de la fase de diestro. Por tanto, los procesos lisosomal-autofágicos parecen oscilar dependiendo de los niveles de estrógenos.

Estos datos correlacionan perfectamente con los resultados previos que muestran que el estro es el periodo de máxima producción de copro- y proto-porfirinas (que son, con mucho los principales tipos de porfirinas) en la glándula. En contraposición, durante el diestro, las concentraciones de coproporfirinas, protoporfirinas y porfirinas totales fueron significativamente disminuidas (Payne et al., 1979). Parece que el sistema proteolítico y la producción de porfirinas están sincronizadas por un propósito común. ¿Cuál es el papel de esos importantes cambios en la glándula durante este corto periodo de tiempo? Estos cambios

parecen estar relacionados con la función de la glándula. Mientras la función de la glándula de Harder es aún desconocida, hay numerosas teorías al respecto. Las características de esta glándula, incluyendo su marcado dimorfismo sexual en cuanto a su histología, la producción de porfirinas y el estrés oxidativo (Coto-Montes et al., 2001a), parece demasiado complejo para una glándula cuya única función es lubricar el ojo. La glándula de Harder parece jugar un papel importante como fuente de señales olorosas (Payne et al., 1979).

Resultados de finales de los 1970s apoyan esta hipótesis junto con los resultados aquí expuestos. Machos, experimentados y no, se sienten más atraídos por las secreciones de las glándulas de Hamster de las hembras, con abundante concentración en porfirinas, que de las secreciones de los machos (Payne et al., 1979). Estos resultados sugieren que las porfirinas pueden actuar como feromonas y aportan la base para transmitir información sobre el estado reproductor de las hamster hembra. Previos resultados de nuestro laboratorio muestran que en la GH de las hembras, una autofagia masiva provoca una secreción holocrina con la liberación de acreciones porfirinicas al lumen acinar (Vega-Naredo et al., 2009). Los resultados actuales muestran una significativa reducción de la liberación de celulas a la luz glandular durante la fase de estro y un acumulo de estas durante el diestro, cuando la autofagia y todos los procesos proteolíticos fueron reducidos. Además, una reducción del mTOR total ocurre a la misma vez que la activación de la autofagia en la fase de estro. Con lo que parece que las células que estén desarrollando procesos de autofagia masiva en estro, se desprenden y su acúmulo se produce en el diestro, fomentando este proceso por la inhibición de la vía del NF-κB. Ya que se ha descrito como un bloqueo de esta vía en la GH fomenta el desprendimiento celular (Vega-Naredo et al., 2009).

Previos estudios han mostrado como la máxima producción de porfirinas en la glándula de Harder coincide con el periodo receptivo para la glándula de Harder (Payne et al., 1979). Esto demuestra que la GH del hamster hembra tiene la habilidad de actuar como un organo que produce señales olorosas, liberando porfirinas que funcionan como feromonas para señalizar que la hembra es receptiva. Los datos del presente estudio correlacionan la producción de las porfirinas con las fluctuaciones en autofagia y los niveles de estrogenos a traves del ciclo estral.

La autofagia en el ciclo estral

De forma específica, la producción de porfirinas está bloqueada en diestro pero activa en estro, cuando los niveles de macroautofagia, autofagia mediada por chaperonas y la actividad del proteosoma son más elevados. Estos incrementos deben inducir los cambios morfológicos observados en la glándula puesto que los estrógenos son activadores autófágicos (Sobolewska et al., 2009).

En base a estos descubrimientos, el papel de los estrógenos en la autofagia que tiene lugar en la GH y, por tanto, en la liberación de las porfirinas vía autofagia, pueden tener un interés clínico. La relación entre las crisis de porfiria y las hormonas sexuales han sido recientemente esbozadas (Farfaras et al., 2010), y los estudios clínicos han mostrado que la producción de hormonas aumenta durante el embarazo y la ovulación (Lyberatos et al., 1972). Consecuentemente, la superproducción de porfirinas, como tiene lugar en la Porfiria Intermitente Aguda (AIP), es exacerbada durante el embarazo y puede inducir ataques agudos y se considera motivo de muerte fetal, especialmente durante el primer trimestre (Farfaras et al., 2010). Los resultados han mostrado como la autofagia puede presentar una base fisiológica para los cambios cíclicos en el contenido de porfirinas. Además, el bloqueo causado por la activación de mTOR puede regular la producción cíclica de porfirinas. Estos son los primeros datos que muestran la relación entre la autofagia y la porfiria regulada por hormonas sexuales, estos datos sugieren un enfoque prometedor para el tratamiento de la AIP durante el embarazo, que actualmente carece de opciones de tratamiento. Sin embargo, son necesarios más estudios para el entender de una manera más profunda, por tanto, la evolución de la autofagia en la GH durante el embarazo de los hamsters. Tales estudios pueden aportar nuevos enfoques para tratar la porfiria.

Los resultados obtenidos nos muestran como la autofagia parece modular la secreción de porfirinas. Al tratarse de una activación tan robusta, ya que los marcadores de la autofagia muestran una gran expresión, no carece de sentido pensar que este proceso este mediando diferentes respuestas, dependiendo del tipo celular e incluso dentro de la misma célula. Datos previos de nuestro laboratorio (Vega-Naredo et al., 2012; Vega-Naredo et al., 2009) sugieren que los tipos celulares I y II, las células clásicas de la GH con características específicas de sexo

en cuanto a sus características morfológicas, son simplemente estados de único tipo celular. Los resultados presentados en este estudio, corroboran esta hipótesis. El incremento de las células de Tipo II durante el estro cuando la autofagia se vé incrementada y casi desaparecen cuando la autofagia está bloqueada. Los estudios previos mostraron que las células de tipo II tiene un papel esencial en la autofagia masiva provocando la secreción holocrina (Vega-Naredo et al., 2009), mientras Fung y colaboradores (Fung et al., 2008) mostraron que el desprendimiento celular es inducido por la autofagia. Por tanto, en la fase de estro, el incremento de los procesos autofágicos promueve secreción holocrina en las células de tipo II, las cuales apenas desaparecen del lumen acinar en la fase de diestro. De hecho, los resultados muestran que el tejido glandular está desapareciendo mientras los depósitos de porfirinas permanecen en el lumen acinar.

En este proceso de autofagia masiva, que desembocaría en la muerte celular por desprendimiento, que parece que están desarrollando las células de tipo II, se esperaría un fenotipo de muerte celular. Este fenotipo se caracteriza por un colapso en el tráfico de la procatepsina D, desde la red trans Golgi hasta los endosomas tardíos y lisosomas, que se refleja en una acumulación de procatepsina D, sin expresarse la forma madura. Sin embargo, la expresión de catepsina D madura en diestro, implica que el colapso en este tráfico celular, no es un proceso extensivo a toda la población celular, sino más bien minoritario, sólo en un pequeño porcentaje de células. Para corroborarlo se han estudiado otros marcadores que se hayan relacionado con la muerte celular por autofagia másiva. Se ha descrito como la proteína p62 es un marcador específico de proteínas y orgánulos a degradar mediante autofagia. Así mismo, esta proteína p62 se une de forma no covalente a ubiquitina, preferentemente a cadenas de poliubiquitina a través de su dominio de unión a ubiquitina (*Ubiquitin Binding Domain*, UBA) (Bjorkoy et al., 2005), reclutando a los agregados proteicos u otros orgánulos deteriorados al autofagosoma a través de p62 (Novak et al., 2010). Al estar p62 unida a los agregados proteicos u orgánulos a degradar, ella misma es evidentemente, degradada en el autolisosoma, por lo que p62 es un buen indicador del flujo autofágico y, por consiguiente, la acumulación de p62 sugeriría un bloqueo del proceso (Mizushima and Yoshimori, 2007). Este bloqueo sería característico de este fenotipo de muerte celular. Se ha descrito como en estos casos en los que

La autofagia en el ciclo estral

se produce la desregulación de la autofagia, el acúmulo de p62 conlleva un incremento de la expresión de Nrf2, en una forma no clásica de activación de la vía del Nrf2 (Lau et al., 2010). El patrón de la expresión de estos dos marcadores en la GH durante el ciclo estral es opuesto, cuando uno está muy expresado el otro no lo está y viceversa. Esto parece indicar que la elevada expresión de p62 nos informa del estado que caracteriza a este pequeño porcentaje de células que se están desprendiendo, en pos de la secreción holocrina necesaria para la función reproductora. Además, debido a que la expresión de Nrf2 no es elevada, p62 ha de estar involucrado en otras funciones.

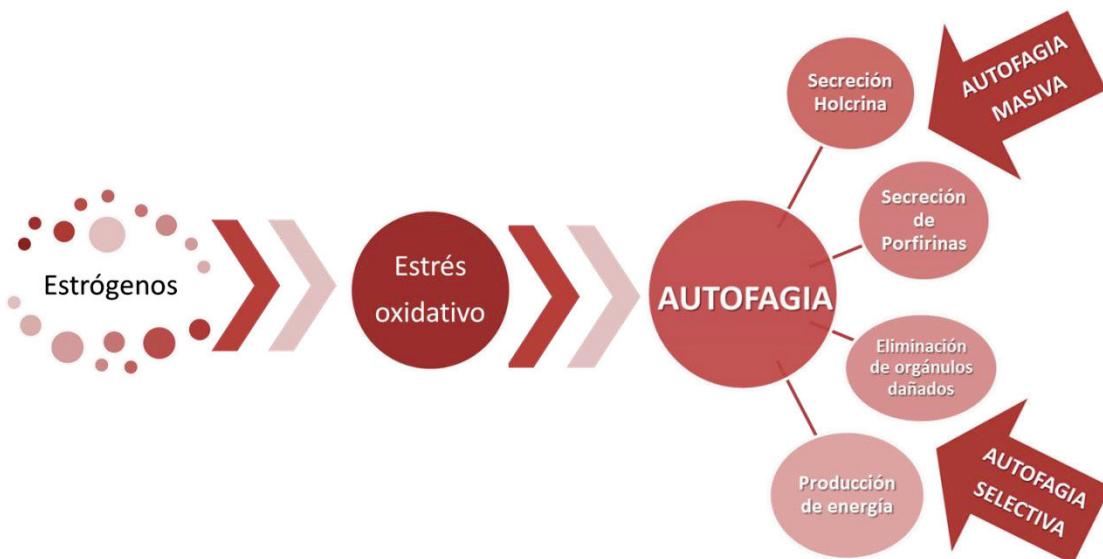
p62, juega un papel importante en la eliminación selectiva de orgánulos dañados o disfuncionales incluidos la mitocondria (Ding et al., 2010; Lemasters, 2005; Novak et al., 2010) y los peroxisomas (Kim et al., 2008). Recientemente, ha sido descrita que la localización mitocondrial de p62 puede ejercer una importante influencia en la morfología y dinámica mitocondrial, incluido el potencial de membrana mitocondrial (Seibenhener et al., 2013). Por tanto, la proteína p62 esta asociada a la integridad mitocondrial y su degradación (Boldrini et al., 2004; Ding et al., 2010). En cuanto a la eliminación de mitocondrias, la proteína NIX, que está localizada en la membrana externa mitocondrial has sido definida como el receptor mitocondrial para la mitofagia (Novak et al., 2010; Sandoval et al., 2008). Los presentes resultados muestran una mayor expression de NIX en la fase de estro respecto al diestro. Además, fue observada la presencia de mitofagosomas (Figura 35B) (mitocondrias localizadas dentro de un autófagosoma para su degradación por autofagia selectiva), principalmente en fase de estro. Estos datos sugieren la activación de procesos mitofágicos en la glándula de las hembras durante esta fase. Es interesante destacar como la depolarización mitocondrial y la subsecuente generación de EROS han sido previamente unido a la habilida de NIX de activar directamente a la autofagia via inhibición de mTOR (Ding et al., 2010).

Adicionalmente, p62 tiene dos dominios, uno TB y un anillo de zinc ZZ, que estan estrechamente relacionados con la activación de NF-κB (Manley et al., 2013). El factor de transcripción NF-κB es un factor pro-inflamatorio que se activa de forma habitual por estrés oxidativo (Jung et al., 2009). En particular, el dominio de dedo de zinc ZZ del p62 es el

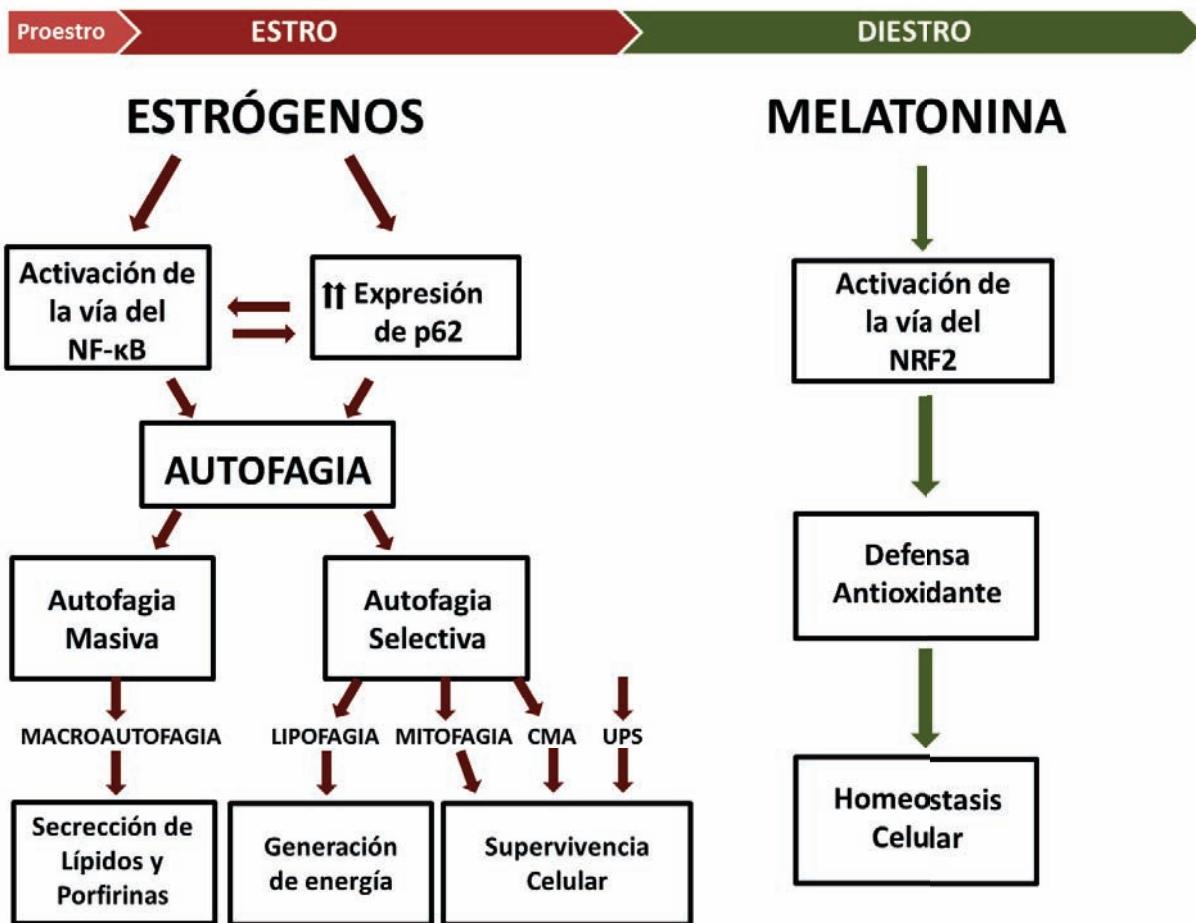
responsable de la unión con la proteína de interacción receptor (receptor interacting protein) (RIP), que es una serina/treonina quinasa que regula al activación de NF-κB mediante TNF-α (Manley et al., 2013). El domino TB también conduce a la activación de la vía de NF-κB, mediante su interacción con TRAF-6 (Manley et al., 2013). p62 también regula la activación de NF-κB a través de su dominio PB1, este dominio interactúa con la quinasa regulada por señales extracelulares (extracellular signal-regulated kinase) (ERK), que juega un papel crucial en la homeostasis de lípidos (Lee et al., 2010). Curiosamente, la GH muestra una activación conjunta de p62 y NF-κB, principalmente durante la fase de estro. Los elevados niveles de estrés oxidativo descritos parecen inducir la activación de NF-κB, pudiendo además, favorecer el perfil pro-inflamatorio de la GH en la fase de estro. Recientemente, ha sido descrito que las citoquinas inflamatorias como TNF-α pueden ser relacionadas con la activación de los procesos lipolíticos (Laurencikiene et al., 2007; Ryden et al., 2004). Tanto en roedores como en células humanas, TNF-α promueve la fosforilación (Zhang et al., 2002) y la inhibición de la perilipina (PLIN) (Ryden et al., 2004; Souza et al., 1998), lo que favorece la activación de los procesos lipolíticos por la lipasa sensible a hormonas (HSL) (Londos et al., 1999; Miyoshi et al., 2006; Moore et al., 2005). La actividad lipolítica de TNF-α requiere la activación de NF-κB (Laurencikiene et al., 2007). Curiosamente, la GH en estro muestra una expresión menor de PLIN. Este resultado, junto con la activación de NF- κB, parece indicar la activación de los procesos lipolíticos en la fase de estro. El estudio de la lipasa lisosomal ácida (LAL), cuya actividad lipolítica se produce en el lisosoma, mostró una mayor cantidad de la misma en las GH estudiadas en la fase de estro. Esta mayor expresión en estro, contribuye a ratificar el estímulo de la lipólisis en esta fase. La autofagia y los procesos lipolíticos, que han sido descritos en la glándula de las hembras en fase de estro, pueden asociarse con la degradación de las grandes gotas lipídicas de las células de tipo II, características en esta fase. Estudios recientes consideran a las gotas lipídicas como orgánulos dinámicos (Singh and Cuervo, 2012). Es aquí donde aparece la evidencia de que el Sistema autofágico contribuye directamente a la mobilización de los lípidos, de las gotas lipídicas a los lisosomas, como un proceso selectivo realmente conocido como lipofagia (Singh and Cuervo, 2012). Existen actualmente un creciente número de

La autofagia en el ciclo estral

evidencias que relacionan la actividad de la lipasa lisosomal ácida (LAL), con los procesos de lipofagia, siendo este enzima el encargado de la degradación de los lípidos en los lisosomas. Por tanto, una mayor actividad de la LAL, implicaría la existencia de la lipofagia en la fase de estro (Lettieri Barbato et al., 2013; Pearson et al., 2014; Skop et al., 2012). Por tanto, los datos aquí expuestos parecen ser capaces de relacionar las actividades lipolíticas y proteolíticas con los cambios celulares usualmente observados en la GH durante el ciclo estral, que hasta ahora eran inexplicables. Por consiguiente, este proceso degradativo puede contribuir a la desaparición de las células de Tipo II que de hecho observamos en la fase de diestro.



Por tanto, se ha descrito como la autofagia, en concreto la macroautofagia, tiene un papel primordial en la actividad de la glándula, siendo clave en su función secretora. Este proceso participa en la secreción de porfirinas, que actúan de reclamo sexual en la fase receptiva del ciclo estral, y de lípidos mediante la ya descrita secreción holocrina (Vega-Naredo et al., 2009). A su vez, implica la degradación selectiva de orgánulos dañados en este periodo en el que impera un ambiente tremadamente oxidante, como también forma parte de la generación energética mediante la degradación de fragmentos de las grandes gotas lipídicas de las células de tipo II.



En resumen, la glándula de Harder en el ciclo estral se caracteriza por importantes variaciones en los niveles de estrógenos y estés oxidativo, esto promueve dos estados bien diferenciados que coinciden con las fases más importantes: el estro y el diestro.

El estro es la fase en la que se produce la ovulación, el periodo fértil, la gándula de Harder parece ser responsable de determinadas funciones en esta etapa. Responde al aumento de estrógenos y el subsiguiente estrés oxidativo con la activación de las vías proteolíticas, principalmente la autofagia. Procesos de autofagia masiva contribuyen a la secreción, tanto de lípidos como de porfirinas. Así como la autofagia selectiva comporta los aspectos más relevantes en cuanto a la supervivencia celular, ya que degrada proteínas dañadas, mediante CMA y el UPS, como orgánulos, mediante la mitofagia; y contribuye al mantenimiento energético mediante la lipofagia.

La autofagia en el ciclo estral

En el diestro se incrementan los niveles circulantes de melatonina activando todo un mecanismo de respuesta antioxidante y se produce una etapa de recuperación del balance oxidativo, el metabolismo mitocondrial y por tanto, la homeostasis celular.

Conclusiones

Alterations in the sexual hormonal levels along the estrous cycle trigger important changes in the Harderian gland inducing:

- Higher oxidative stress in estrus than diestrus phase.
- A pro-inflammatory situation in estrus and anti-inflammatory in diestrus.
- An autophagy increase in estrus phase, in all the autophagy types, if it is compared with the diestrus phase.

Take account this information we can conclude that the Harderian gland could have an important role in the reproductive physiology, probably related with the pheromone secretions in the fertile phase, with a high production and delivery of porphyrins in the estrus phase and a retrieval phase in the diestrus.

Bibliografía

- Allegra M, Reiter RJ, Tan DX, Gentile C, Tesoriere L, Livrea MA. 2003. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. *J Pineal Res* 34(1):1-10.
- Anderson RA, Bryson GM, Parks JS. 1999. Lysosomal acid lipase mutations that determine phenotype in Wolman and cholesterol ester storage disease. *Molecular genetics and metabolism* 68(3):333-345.
- Antolin I, Rodriguez C, Uria H, Sainz RM, Mayo JC, Kotler ML, Rodriguez-Colunga MJ, Tolivia D, Menendez-Pelaez A. 1996. Castration increases cell damage induced by porphyrins in the Harderian gland of male Syrian hamster. Necrosis and not apoptosis mediates the subsequent cell death. *Journal of structural biology* 116(3):377-389.
- Aparicio-Soto M, Alarcon-de-la-Lastra C, Cardeno A, Sanchez-Fidalgo S, Sanchez-Hidalgo M. 2014. Melatonin modulates microsomal PGE synthase 1 and NF-E2-related factor-2-regulated antioxidant enzyme expression in LPS-induced murine peritoneal macrophages. *British journal of pharmacology* 171(1):134-144.
- Arnao MB, Cano A, Acosta M. 2001. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry* 73:239-244.
- Backer JM, Bourret L, Dice JF. 1983. Regulation of catabolism of microinjected ribonuclease A requires the amino-terminal 20 amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(8):2166-2170.
- Backer JM, Dice JF. 1986. Covalent linkage of ribonuclease S-peptide to microinjected proteins causes their intracellular degradation to be enhanced during serum withdrawal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(16):5830-5834.
- Behl C, Widmann M, Trapp T, Holsboer F. 1995. 17-beta estradiol protects neurons from oxidative stress-induced cell death in vitro. *Biochemical and biophysical research communications* 216(2):473-482.
- Bjorkoy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, Stenmark H, Johansen T. 2005. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *The Journal of cell biology* 171(4):603-614.
- Blask DE, Dauchy RT, Sauer LA. 2005. Putting cancer to sleep at night: the neuroendocrine/circadian melatonin signal. *Endocrine* 27(2):179-188.
- Boldrini R, Devito R, Biselli R, Filocamo M, Bosman C. 2004. Wolman disease and cholestryl ester storage disease diagnosed by histological and ultrastructural examination of intestinal and liver biopsy. *Pathology, research and practice* 200(3):231-240.

- Brownscheidle CM, Niewenhuis RJ. 1978. Ultrastructure of the harderian gland in male albino rats. *Anat Rec* 190(3):735-753.
- Buss H, Chan TP, Sluis KB, Domigan NM, Winterbourn CC. 1997. Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. *Free radical biology & medicine* 23(3):361-366.
- Buzzell GR, Menendez-Pelaez A, Hoffman RA, Vaughan MK, Reiter RJ. 1990. N-acetyltransferase activity in the Harderian glands of the Syrian hamster, *Mesocricetus auratus*, is regulated by androgens and by hormones of the pituitary-thyroid axis. *The Journal of endocrinology* 127(1):59-67.
- Caballero B, Veenman L, Gavish M. 2013. Role of mitochondrial translocator protein (18 kDa) on mitochondrial- related cell death processes. *Recent patents on endocrine, metabolic & immune drug discovery* 7(2):86-101.
- Caballero B, Vega-Naredo I, Sierra V, Huidobro-Fernandez C, Soria-Valles C, De Gonzalo-Calvo D, Tolivia D, Gutierrez-Cuesta J, Pallas M, Camins A, Rodriguez-Colunga MJ, Coto-Montes A. 2008. Favorable effects of a prolonged treatment with melatonin on the level of oxidative damage and neurodegeneration in senescence-accelerated mice. *J Pineal Res* 45(3):302-311.
- Clark SL, Jr. 1957. Cellular differentiation in the kidneys of newborn mice studies with the electron microscope. *The Journal of biophysical and biochemical cytology* 3(3):349-362.
- Cos S, Blask DE, Lemus-Wilson A, Hill AB. 1991. Effects of melatonin on the cell cycle kinetics and "estrogen-rescue" of MCF-7 human breast cancer cells in culture. *J Pineal Res* 10(1):36-42.
- Costa CA, Trivelato GC, Pinto AM, Bechara EJ. 1997. Correlation between plasma 5-aminolevulinic acid concentrations and indicators of oxidative stress in lead-exposed workers. *Clinical chemistry* 43(7):1196-1202.
- Coto-Montes A. 2013. Editorial: Mitochondrion: an organelle more and more implication in new processes. *Recent patents on endocrine, metabolic & immune drug discovery* 7(2):83-85.
- Coto-Montes A, Boga JA, Rosales-Corral S, Fuentes-Broto L, Tan DX, Reiter RJ. 2012. Role of melatonin in the regulation of autophagy and mitophagy: a review. *Molecular and cellular endocrinology* 361(1-2):12-23.
- Coto-Montes A, Boga JA, Tomas-Zapico C, Rodriguez-Colunga MJ, Martinez-Fraga J, Tolivia-Cadrecha D, Menendez G, Hardeland R, Tolivia D. 2001a. Physiological oxidative stress model: Syrian hamster Harderian gland-sex differences in antioxidant enzymes. *Free radical biology & medicine* 30(7):785-792.
- Coto-Montes A, Boga JA, Tomas-Zapico C, Rodriguez-Colunga MJ, Martinez-Fraga J, Tolivia-Cadrecha D, Menendez G, Hardeland R, Tolivia D. 2001b. Porphyric enzymes in hamster Harderian gland, a model of damage by

- porphyrins and their precursors. A chronobiological study on the role of sex differences. *Chemico-biological interactions* 134(2):135-149.
- Coto-Montes A, Tomas-Zapico C, Escames G, Leon J, Tolivia D, JosefaRodriguez-Colunga M, Acuna-Castroviejo D. 2003. Characterization of melatonin high-affinity binding sites in purified cell nuclei of the hamster (*Mesocricetus auratus*) harderian gland. *J Pineal Res* 34(3):202-207.
- Coto-Montes AM, Rodriguez-Colunga MJ, Tolivia D, Menendez-Pelaez A. 1996. Immunocytochemical localization of melatonin in the harderian gland of Syrian hamster. *Anat Rec* 245(1):13-16.
- Coto-Montes AM, Rodriguez-Colunga MJ, Uria H, Antolin I, Tolivia D, Buzzell GR, Menendez-Pelaez A. 1994. Photoperiod and the pineal gland regulate the male phenotype of the Harderian glands of male Syrian hamsters after androgen withdrawal. *J Pineal Res* 17(1):48-54.
- Cuervo AM, Dice JF. 1996. A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science* 273(5274):501-503.
- Cuervo AM, Dice JF. 2000. Age-related decline in chaperone-mediated autophagy. *J Biol Chem* 275(40):31505-31513.
- Cuervo AM, Wong E. 2014. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell research* 24(1):92-104.
- Chatgilialoglu C, O'Neill P. 2001. Free radicals associated with DNA damage. *Experimental gerontology* 36(9):1459-1471.
- Chiang GG, Abraham RT. 2005. Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at Ser-2448 is mediated by p70S6 kinase. *J Biol Chem* 280(27):25485-25490.
- Chieffi Baccari G, DiMatteo L, Minucci S. 1992. The orbital glands of the chelonians *Pseudemys scripta* and *Testudo graeca*: comparative histological, histochemical and ultrastructural investigations. *Journal of anatomy* 180 (Pt 1):1-13.
- Dai Y, Chang P, Li G, Lin Y. 1999. [Mechanism of injury by active oxygen radical to hemoglobin]. *Wei sheng yan jiu = Journal of hygiene research* 28(1):30-32.
- de Duve C. 1963. Lysosome. In: De Reuck A CM, editor. *Ciba Foundation Symposium*. Little: Brown.
- De Duve C, Pressman BC, Gianetto R, Wattiaux R, Appelmans F. 1955. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *The Biochemical journal* 60(4):604-617.
- de Gonzalo-Calvo D, Neitzert K, Fernandez M, Vega-Naredo I, Caballero B, Garcia-Macia M, Suarez FM, Rodriguez-Colunga MJ, Solano JJ, Coto-Montes A. 2010. Differential inflammatory responses in aging and disease: TNF-alpha and IL-6 as possible biomarkers. *Free radical biology & medicine* 49(5):733-737.
- de Gonzalo-Calvo D, NK, Fernández M., Vega- Naredo I., Caballero B., García-Macía M., Tolivia D., Suárez F.M., Rodríguez-Colunga J.F., Solano J.J., Coto-Montes

- A. 2010. DIFFERENTIAL INFLAMMATORY RESPONSES IN AGING AND DISEASE. TNF- α AND IL-6 AS POSSIBLE MARKERS. Free Radicals.
- Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. 1997. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *The Biochemical journal* 324 (Pt 1):1-18.
- Delerive P, Monte D, Dubois G, Trottein F, Fruchart-Najib J, Mariani J, Fruchart JC, Staels B. 2001. The orphan nuclear receptor ROR alpha is a negative regulator of the inflammatory response. *EMBO Rep* 2(1):42-48.
- Demasi M, Costa CA, Pascual C, Llesuy S, Bechara EJ. 1997. Oxidative tissue response promoted by 5-aminolevulinic acid promptly induces the increase of plasma antioxidant capacity. *Free radical research* 26(3):235-243.
- Deretic V. 2006. Autophagy as an immune defense mechanism. *Current opinion in immunology* 18(4):375-382.
- Deter RL, Baudhuin P, De Duve C. 1967. Participation of lysosomes in cellular autophagy induced in rat liver by glucagon. *The Journal of cell biology* 35(2):C11-16.
- Dice JF, Walker CD, Byrne B, Cardiel A. 1978. General characteristics of protein degradation in diabetes and starvation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(5):2093-2097.
- Ding WX, Ni HM, Li M, Liao Y, Chen X, Stoltz DB, Dorn GW, 2nd, Yin XM. 2010. Nix is critical to two distinct phases of mitophagy, reactive oxygen species-mediated autophagy induction and Parkin-ubiquitin-p62-mediated mitochondrial priming. *J Biol Chem* 285(36):27879-27890.
- Dos-Anjos S, Martinez-Villayandre B, Montori S, Salas A, Perez-Garcia CC, Fernandez-Lopez A. 2008. Quantitative gene expression analysis in a brain slice model: influence of temperature and incubation media. *Analytical biochemistry* 378(1):99-101.
- Esterbauer H, Cheeseman KH. 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in enzymology* 186:407-421.
- Farfaras A, Zagouri F, Zografos G, Kostopoulou A, Sergentanis TN, Antoniou S. 2010. Acute intermittent porphyria in pregnancy: a common misdiagnosis. *Clinical and experimental obstetrics & gynecology* 37(4):256-260.
- Fung C, Lock R, Gao S, Salas E, Debnath J. 2008. Induction of autophagy during extracellular matrix detachment promotes cell survival. *Molecular biology of the cell* 19(3):797-806.
- Furuya N, Yu J, Byfield M, Pattingre S, Levine B. 2005. The evolutionarily conserved domain of Beclin 1 is required for Vps34 binding, autophagy and tumor suppressor function. *Autophagy* 1(1):46-52.
- Garcia-Macia M, Vega-Naredo I, De Gonzalo-Calvo D, Rodriguez-Gonzalez SM, Camello PJ, Camello-Almaraz C, Martin-Cano FE, Rodriguez-Colunga MJ, Pozo MJ, Coto-Montes AM. 2011. Melatonin induces neural SOD2

- expression independent of the NF-kappaB pathway and improves the mitochondrial population and function in old mice. *J Pineal Res* 50(1):54-63.
- Ge L, Melville D, Zhang M, Schekman R. 2013. The ER-Golgi intermediate compartment is a key membrane source for the LC3 lipidation step of autophagosome biogenesis. *eLife* 2:e00947.
- Girgert R, Hanf V, Emons G, Grundker C. 2009. Membrane-bound melatonin receptor MT1 down-regulates estrogen responsive genes in breast cancer cells. *J Pineal Res* 47(1):23-31.
- Glickman MH, Ciechanover A. 2002. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiological reviews* 82(2):373-428.
- Grune T, Merker K, Sandig G, Davies KJ. 2003. Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochemical and biophysical research communications* 305(3):709-718.
- Gunduz B. 2002. Daily rhythm in serum melatonin and leptin levels in the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*). *Comparative biochemistry and physiology Part A, Molecular & integrative physiology* 132(2):393-401.
- Hailey DW, Rambold AS, Satpute-Krishnan P, Mitra K, Sougrat R, Kim PK, Lippincott-Schwartz J. 2010. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell* 141(4):656-667.
- Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A, Nezu A, Yamamoto A, Fujita N, Oomori H, Noda T, Haraguchi T, Hiraoka Y, Amano A, Yoshimori T. 2013. Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature* 495(7441):389-393.
- Hardeland R, Reiter RJ, Poeggeler B, Tan DX. 1993. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neurosci Biobehav Rev* 17(3):347-357.
- Hill SM, Blask DE. 1988. Effects of the pineal hormone melatonin on the proliferation and morphological characteristics of human breast cancer cells (MCF-7) in culture. *Cancer Res* 48(21):6121-6126.
- Hillenius WJ, Phillips DA, Rehorek SJ. 2007. "A new lachrymal gland with an excretory duct in red and fallow deer" by Johann jacob Harder (1694): English translation and historical perspective. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft* 189(5):423-433.
- Hoffman RA, Johnson LB, Reiter RJ. 1985. Harderian glands of golden hamsters: temporal and sexual differences in immunoreactive melatonin. *J Pineal Res* 2(2):161-168.
- Inami Y, Yamashina S, Izumi K, Ueno T, Tanida I, Ikejima K, Watanabe S. 2011. Hepatic steatosis inhibits autophagic proteolysis via impairment of autophagosomal acidification and cathepsin expression. *Biochemical and biophysical research communications* 412(4):618-625.

- Jung KH, Hong SW, Zheng HM, Lee DH, Hong SS. 2009. Melatonin downregulates nuclear erythroid 2-related factor 2 and nuclear factor-kappaB during prevention of oxidative liver injury in a dimethylnitrosamine model. *J Pineal Res* 47(2):173-183.
- Keller JN, Dimayuga E, Chen Q, Thorpe J, Gee J, Ding Q. 2004. Autophagy, proteasomes, lipofuscin, and oxidative stress in the aging brain. *The international journal of biochemistry & cell biology* 36(12):2376-2391.
- Kensler TW, Qian GS, Chen JG, Groopman JD. 2003. Translational strategies for cancer prevention in liver. *Nature reviews Cancer* 3(5):321-329.
- Kiffin R, Bandyopadhyay U, Cuervo AM. 2006. Oxidative stress and autophagy. *Antioxid Redox Signal* 8(1-2):152-162.
- Kim I, Rodriguez-Enriquez S, Lemasters JJ. 2007. Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Archives of biochemistry and biophysics* 462(2):245-253.
- Kim PK, Hailey DW, Mullen RT, Lippincott-Schwartz J. 2008. Ubiquitin signals autophagic degradation of cytosolic proteins and peroxisomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(52):20567-20574.
- Kohen R, Nyska A. 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* 30(6):620-650.
- Kratsovnik E, Bromberg Y, Sperling O, Zoref-Shani E. 2005. Oxidative stress activates transcription factor NF- κ B-mediated protective signaling in primary rat neuronal cultures. *J Mol Neurosci* 26(1):27-32.
- Lau A, Wang XJ, Zhao F, Villeneuve NF, Wu T, Jiang T, Sun Z, White E, Zhang DD. 2010. A noncanonical mechanism of Nrf2 activation by autophagy deficiency: direct interaction between Keap1 and p62. *Mol Cell Biol* 30(13):3275-3285.
- Laurencikiene J, van Harmelen V, Arvidsson Nordstrom E, Dicker A, Blomqvist L, Naslund E, Langin D, Arner P, Ryden M. 2007. NF- κ B is important for TNF-alpha-induced lipolysis in human adipocytes. *J Lipid Res* 48(5):1069-1077.
- Lee SJ, Pfluger PT, Kim JY, Nogueiras R, Duran A, Pages G, Pouyssegur J, Tschop MH, Diaz-Meco MT, Moscat J. 2010. A functional role for the p62-ERK1 axis in the control of energy homeostasis and adipogenesis. *EMBO Rep* 11(3):226-232.
- Lemasters JJ. 2005. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation research* 8(1):3-5.
- Leon J, Acuna-Castroviejo D, Sainz RM, Mayo JC, Tan DX, Reiter RJ. 2004. Melatonin and mitochondrial function. *Life Sci* 75(7):765-790.

- Lettieri Barbato D, Tatulli G, Aquilano K, Ciriolo MR. 2013. FoxO1 controls lysosomal acid lipase in adipocytes: implication of lipophagy during nutrient restriction and metformin treatment. *Cell death & disease* 4:e861.
- Levine B, Klionsky DJ. 2004. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 6(4):463-477.
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in enzymology* 186:464-478.
- Levine RL, Stadtman ER. 2001. Oxidative modification of proteins during aging. *Experimental gerontology* 36(9):1495-1502.
- Li Q, Verma IM. 2002. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2(10):725-734.
- Li WW, Li J, Bao JK. 2012. Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 69(7):1125-1136.
- Lin X, Li S, Zhao Y, Ma X, Zhang K, He X, Wang Z. 2013. Interaction Domains of p62: A Bridge Between p62 and Selective Autophagy. *DNA and cell biology*.
- Lisk RD. 1985. The estrous cycle. *The hamster: reproduction and behavior*: New York: Plenum Press. p 23-51.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4):402-408.
- Londos C, Brasaemle DL, Schultz CJ, Segrest JP, Kimmel AR. 1999. Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells. *Seminars in cell & developmental biology* 10(1):51-58.
- Lopez JM, Tolivia J, Alvarez-Uria M. 1992. Postnatal development of the harderian gland in the Syrian golden hamster (*Mesocricetus auratus*): a light and electron microscopic study. *Anat Rec* 233(4):597-616.
- Loschen G, Azzi A, Richter C, Flohe L. 1974. Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Lett* 42(1):68-72.
- Lyberatos C, Chalevelakis G, Platis A, Gardikas C. 1972. Urinary porphyrins and their precursors in human pregnancy and after delivery. *The Journal of obstetrics and gynaecology of the British Commonwealth* 79(10):921-923.
- Llorente IL, Perez-Rodriguez D, Burgin TC, Gonzalo-Orden JM, Martinez-Villayandre B, Fernandez-Lopez A. 2013. Age and meloxicam modify the response of the glutamate vesicular transporters (VGLUTs) after transient global cerebral ischemia in the rat brain. *Brain research bulletin* 94:90-97.
- Macmillan-Crow LA, Cruthirds DL. 2001. Invited review: manganese superoxide dismutase in disease. *Free radical research* 34(4):325-336.
- Maestroni GJ. 2001. The immunotherapeutic potential of melatonin. *Expert Opin Investig Drugs* 10(3):467-476.

- Manley S, Williams JA, Ding WX. 2013. Role of p62/SQSTM1 in liver physiology and pathogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)* 238(5):525-538.
- Marrufo B, Menendez-Pelaez A, Buzzell GR, Gonzalez-Brito A, Reiter RJ. 1989. 5 alpha-dihydrotestosterone administration converts indolamine metabolism and porphyrin content of the female Syrian hamster Harderian gland to the male type. *Proc Soc Exp Biol Med* 192(2):192-195.
- McGadey J, Johnston HS, Payne AP. 1992. The hamster harderian gland: a combined scanning and transmission electron microscopic investigation. *Journal of anatomy* 180 (Pt 1):127-136.
- Menendez-Pelaez A, Buzzell GR, Rodriguez C, Reiter RJ. 1991a. Indole and porphyrin content of the Syrian hamster harderian glands during the proestrous and estrous phases of the estrous cycle. *J Steroid Biochem Mol Biol* 38(1):101-104.
- Menendez-Pelaez A, Lopez-Gonzalez MA, Guerrero JM. 1993. Melatonin binding sites in the Harderian gland of Syrian hamsters: sexual differences and effect of castration. *J Pineal Res* 14(1):34-38.
- Menendez-Pelaez A, Reiter RJ, Howes KA, Puig-Domingo M, Vaughan MK, Troiani ME, Little JC. 1988. Harderian gland N-acetyltransferase activity in the male Syrian hamster: effects of gonadectomy, short photoperiod exposure, or subcutaneous melatonin implants. *Endocrine research* 14(2-3):121-130.
- Menendez-Pelaez A, Rodriguez C, Dominguez P. 1991b. 5-aminolevulinate synthase mRNA levels in the Harderian gland of Syrian hamsters: correlation with porphyrin concentrations and regulation by androgens and melatonin. *Molecular and cellular endocrinology* 80(1-3):177-182.
- Michiels C, Minet E, Mottet D, Raes M. 2002. Regulation of gene expression by oxygen: NF-kappaB and HIF-1, two extremes. *Free radical biology & medicine* 33(9):1231-1242.
- Mijaljica D, Prescott M, Devenish RJ. 2011. Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy* 7(7):673-682.
- Miyazaki T, Sueoka K, Dharmarajan AM, Atlas SJ, Bulkley GB, Wallach EE. 1991. Effect of inhibition of oxygen free radical on ovulation and progesterone production by the in-vitro perfused rabbit ovary. *J Reprod Fertil* 91(1):207-212.
- Miyoshi H, Souza SC, Zhang HH, Strissel KJ, Christoffolete MA, Kovsan J, Rudich A, Kraemer FB, Bianco AC, Obin MS, Greenberg AS. 2006. Perilipin promotes hormone-sensitive lipase-mediated adipocyte lipolysis via phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem* 281(23):15837-15844.
- Mizushima N, Yoshimori T. 2007. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* 3(6):542-545.

- Moore HP, Silver RB, Mottillo EP, Bernlohr DA, Granneman JG. 2005. Perilipin targets a novel pool of lipid droplets for lipolytic attack by hormone-sensitive lipase. *J Biol Chem* 280(52):43109-43120.
- Mukhopadhyay NK, Price DJ, Kyriakis JM, Pelech S, Sanghera J, Avruch J. 1992. An array of insulin-activated, proline-directed serine/threonine protein kinases phosphorylate the p70 S6 kinase. *J Biol Chem* 267(5):3325-3335.
- Nandi D, Tahiliani P, Kumar A, Chandu D. 2006. The ubiquitin-proteasome system. *Journal of biosciences* 31(1):137-155.
- Negi G, Kumar A, Sharma SS. 2011. Melatonin modulates neuroinflammation and oxidative stress in experimental diabetic neuropathy: effects on NF-kappaB and Nrf2 cascades. *J Pineal Res* 50(2):124-131.
- Novak I, Kirkin V, McEwan DG, Zhang J, Wild P, Rozenknop A, Rogov V, Lohr F, Popovic D, Occhipinti A, Reichert AS, Terzic J, Dotsch V, Ney PA, Dikic I. 2010. Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO Rep* 11(1):45-51.
- Orsini MW. 1961. The external vaginal phenomena characterizing the stages of the estrous cycle, pregnancy, pseudopregnancy, lactation, and the anestrous hamster, *Mesocricetus auratus* waterhouse. *Proceedings of the animal care panel* 11(4):193-206.
- Ozaki Y, Wurtman RJ, Alonso R, Lynch HJ. 1978. Melatonin secretion decreases during the proestrous stage of the rat estrous cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(1):531-534.
- Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJ, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R. 2006. Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *FEBS J* 273(13):2813-2838.
- Payne AP. 1979. The attractiveness of Harderian gland smears to sexually naive and experienced male golden hamsters. *Anim Behav* 27(Pt 3):897-904.
- Payne AP. 1994. The harderian gland: a tercentennial review. *Journal of anatomy* 185 (Pt 1):1-49.
- Payne AP, McGadey J, Johnston HS, Moore MR, Thompson GG. 1982. Mast cells in the hamster Harderian gland: sex differences, hormonal control and relationship to porphyrin. *Journal of anatomy* 135(Pt 3):451-461.
- Payne AP, McGadey J, Moore MH, Thompson GG. 1979. Changes in Harderian gland activity in the female golden hamster during the oestrous cycle, pregnancy and lactation. *The Biochemical journal* 178(3):597-604.
- Payne AP, McGadey J, Moore MR, Thompson G. 1977. Androgenic control of the harderian gland in the male golden hamster. *The Journal of endocrinology* 75(1):73-82.
- Pearson GL, Mellett N, Chu KY, Cantley J, Davenport A, Bourbon P, Cosner CC, Helquist P, Meikle PJ, Biden TJ. 2014. Lysosomal acid lipase and lipophagy are constitutive negative regulators of glucose-stimulated insulin secretion from pancreatic beta cells. *Diabetologia* 57(1):129-139.

- Pfeifer U, Warmuth-Metz M. 1983. Inhibition by insulin of cellular autophagy in proximal tubular cells of rat kidney. *The American journal of physiology* 244(2):E109-114.
- Pullen N, Thomas G. 1997. The modular phosphorylation and activation of p70s6k. *FEBS letters* 410(1):78-82.
- Rato AG, Pedrero JG, Martinez MA, del Rio B, Lazo PS, Ramos S. 1999. Melatonin blocks the activation of estrogen receptor for DNA binding. *FASEB J* 13(8):857-868.
- Ravikumar B, Moreau K, Jahreiss L, Puri C, Rubinsztein DC. 2010a. Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nature cell biology* 12(8):747-757.
- Ravikumar B, Moreau K, Rubinsztein DC. 2010b. Plasma membrane helps autophagosomes grow. *Autophagy* 6(8):1184-1186.
- Reiter RJ. 1973. Comparative physiology: pineal gland. *Annu Rev Physiol* 35:305-328.
- Reiter RJ. 1991. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev* 12(2):151-180.
- Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. 2000. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. *J Biomed Sci* 7(6):444-458.
- Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T. 1994. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 13(5):1177-1185.
- Roberts R, Ktistakis NT. 2013. Omegasomes: PI3P platforms that manufacture autophagosomes. *Essays in biochemistry* 55:17-27.
- Rodriguez-Colunga MJ, Fernandez C, Antolin I, Rodriguez C, Tolivia D, Menendez-Pelaez A. 1991. Chronic administration of melatonin induces changes in porphyrins and in the histology of male and female hamster harderian gland: interrelation with the gonadal status. *J Pineal Res* 11(1):42-48.
- Rodriguez-Colunga MJ, Fernandez C, Rodriguez C, Tolivia D, Menendez-Pelaez A. 1992. Female Syrian hamster Harderian gland: development and effects of high environmental temperature and melatonin injections on histology and porphyrin deposits. *Anat Rec* 232(2):293-300.
- Rodriguez-Colunga MJ, Rodriguez C, Antolin I, Uria H, Tolivia D, Vaughan MK, Menendez-Pelaez A. 1993. Development and androgen regulation of the secretory cell types of the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) Harderian gland. *Cell and tissue research* 274(1):189-197.
- Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martin V, Reiter RJ. 2004. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* 36(1):1-9.
- Ryden M, Arvidsson E, Blomqvist L, Perbeck L, Dicker A, Arner P. 2004. Targets for TNF-alpha-induced lipolysis in human adipocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 318(1):168-175.

- Ryter SW, Tyrrell RM. 2000. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. *Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties*. Free radical biology & medicine 28(2):289-309.
- Sakai T. 1981. The mammalian Harderian gland: morphology, biochemistry, function and phylogeny. *Arch Histol Jpn* 44(4):299-333.
- Sandoval H, Thiagarajan P, Dasgupta SK, Schumacher A, Prchal JT, Chen M, Wang J. 2008. Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells. *Nature* 454(7201):232-235.
- Schatz G. 1995. Mitochondria: beyond oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 1271(1):123-126.
- Schreck R, Baeuerle PA. 1991. A role for oxygen radicals as second messengers. *Trends Cell Biol* 1(2-3):39-42.
- Seibenhener ML, Du Y, Diaz-Meco MT, Moscat J, Wooten MC, Wooten MW. 2013. A role for sequestosome 1/p62 in mitochondrial dynamics, import and genome integrity. *Biochim Biophys Acta* 1833(3):452-459.
- Seyama Y, Hida A, Hayashi S, Buzzell GR. 1996a. Androgenic control of 1-alkyl-2,3-diacylglycerol in the harderian gland of the golden hamster, *Mesocricetus auratus*. *Journal of biochemistry* 119(4):799-804.
- Seyama Y, Otsuka H, Ohashi K, Vivien-Roels B, Pevet P. 1995. Sexual dimorphism of lipids in Harderian glands of golden hamsters. *Journal of biochemistry* 117(3):661-670.
- Seyama Y, Otsuka H, Ohashi K, Vivien-Roels B, Pevet P. 1996b. Sexual diversity of the lipid metabolism in the Harderian gland of the golden hamster. *Microscopy research and technique* 34(1):71-76.
- Seyama Y, Uchijima Y. 2007. Novel function of lipids as a pheromone from the Harderian gland of golden hamster. *Proceedings of the Japan Academy Series B, Physical and biological sciences* 83(3):77-96.
- Singh R, Cuervo AM. 2012. Lipophagy: connecting autophagy and lipid metabolism. *Int J Cell Biol* 2012:282041.
- Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, Tanaka K, Cuervo AM, Czaja MJ. 2009. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 458(7242):1131-1135.
- Skop V, Cahova M, Papackova Z, Palenickova E, Dankova H, Baranowski M, Zabielski P, Zdychova J, Zidkova J, Kazdova L. 2012. Autophagy-lysosomal pathway is involved in lipid degradation in rat liver. *Physiol Res* 61(3):287-297.
- Soares JM, Jr., Masana MI, Ersahin C, Dubocovich ML. 2003. Functional melatonin receptors in rat ovaries at various stages of the estrous cycle. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 306(2):694-702.
- Sobolewska A, Gajewska M, Zarzynska J, Gajkowska B, Motyl T. 2009. IGF-I, EGF, and sex steroids regulate autophagy in bovine mammary epithelial cells via the mTOR pathway. *Eur J Cell Biol* 88(2):117-130.

- Souza SC, de Vargas LM, Yamamoto MT, Lien P, Franciosa MD, Moss LG, Greenberg AS. 1998. Overexpression of perilipin A and B blocks the ability of tumor necrosis factor alpha to increase lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 273(38):24665-24669.
- Spencer NF, Poynter ME, Im SY, Daynes RA. 1997. Constitutive activation of NF-kappa B in an animal model of aging. *Int Immunol* 9(10):1581-1588.
- Spike RC, Johnston HS, McGadey J, Moore MR, Thompson GG, Payne AP. 1985. Quantitative studies on the effects of hormones on structure and porphyrin biosynthesis in the Harderian gland of the female golden hamster: I. The effects of ovariectomy and nitrogen administration. *Journal of anatomy* 142:59-72.
- Spike RC, Johnston HS, McGadey J, Moore MR, Thompson GG, Payne AP. 1986. Quantitative studies on the effects of hormones on structure and porphyrin biosynthesis in the harderian gland of the female golden hamster. II. The time course of changes after ovariectomy. *Journal of anatomy* 145:67-77.
- Su H, Wang X. 2011. p62 Stages an interplay between the ubiquitin-proteasome system and autophagy in the heart of defense against proteotoxic stress. *Trends in cardiovascular medicine* 21(8):224-228.
- Suski J, Lebiedzinska M, Machado NG, Oliveira PJ, Pinton P, Duszynski J, Wieckowski MR. 2011. Mitochondrial tolerance to drugs and toxic agents in ageing and disease. *Current drug targets* 12(6):827-849.
- Taylor AL, Kudlow BA, Marrs KL, Gruenert DC, Guggino WB, Schwiebert EM. 1998. Bioluminescence detection of ATP release mechanisms in epithelia. *The American journal of physiology* 275(5 Pt 1):C1391-1406.
- Thompson GG, Hordovatzi X, Moore MR, McGadey J, Payne AP. 1984. Sex differences in haem biosynthesis and porphyrin content in the Harderian gland of the golden hamster. *Int J Biochem* 16(7):849-852.
- Tolivia D, Uria H, Mayo JC, Antolin I, Rodriguez-Colunga MJ, Menendez-Pelaez A. 1996. Invasive processes in the normal Harderian gland of Syrian hamster. *Microscopy research and technique* 34(1):55-64.
- Tomas-Zapico C, Antonio Boga J, Caballero B, Vega-Naredo I, Sierra V, Alvarez-Garcia O, Tolivia D, Josefa Rodriguez-Colunga M, Coto-Montes A. 2005a. Coexpression of MT1 and RORalpha1 melatonin receptors in the Syrian hamster Harderian gland. *J Pineal Res* 39(1):21-26.
- Tomas-Zapico C, Caballero B, Sierra V, Vega-Naredo I, Alvarez-Garcia O, Tolivia D, Rodriguez-Colunga MJ, Coto-Montes A. 2005b. Survival mechanisms in a physiological oxidative stress model. *Faseb J* 19(14):2066-2068.
- Uchida K. 2000. Cellular response to bioactive lipid peroxidation products. *Free radical research* 33(6):731-737.
- Uchida K, Shiraishi M, Naito Y, Torii Y, Nakamura Y, Osawa T. 1999. Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid peroxidation. 4-

- hydroxy-2-nonenal is a potential inducer of intracellular peroxide production. *J Biol Chem* 274(4):2234-2242.
- Varriale B. 1996. Occurrence of androgen and estrogen receptor mRNAs in the harderian gland: a comparative survey. *Microscopy research and technique* 34(2):97-103.
- Varriale B, Chieffi-Baccari G, d'Istria M, Di Matteo L, Minucci S, Serino I, Chieffi G. 1992. Testosterone induction of poly(A)(+)-RNA synthesis and [³⁵S]methionine incorporation into proteins of *Rana esculenta* Harderian gland. *Molecular and cellular endocrinology* 84(3):R51-56.
- Vega-Naredo I, Caballero B, Sierra V, Garcia-Macia M, de Gonzalo-Calvo D, Oliveira PJ, Rodriguez-Colunga MJ, Coto-Montes A. 2012. Melatonin modulates autophagy through a redox-mediated action in female Syrian hamster Harderian gland controlling cell types and gland activity. *J Pineal Res* 52(1):80-92.
- Vega-Naredo I, Caballero B, Sierra V, Huidobro-Fernandez C, de Gonzalo-Calvo D, Garcia-Macia M, Tolivia D, Rodriguez-Colunga MJ, Coto-Montes A. 2009. Sexual dimorphism of autophagy in Syrian hamster Harderian gland culminates in a holocrine secretion in female glands. *Autophagy* 5(7):1004-1017.
- Vicencio JM, Galluzzi L, Tajeddine N, Ortiz C, Criollo A, Tasdemir E, Morselli E, Ben Younes A, Maiuri MC, Lavandero S, Kroemer G. 2008. Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path--a mini-review. *Gerontology* 54(2):92-99.
- Vilchis F, Perez-Palacios G. 1989. Steroid hormone receptors and the sexual phenotype of the Harderian gland in hamsters. *The Journal of endocrinology* 121(1):149-156.
- Wakabayashi N, Slocum SL, Skoko JJ, Shin S, Kensler TW. 2010. When NRF2 talks, who's listening? *Antioxid Redox Signal* 13(11):1649-1663.
- Wang SY, Yu QJ, Zhang RD, Liu B. 2011. Core signaling pathways of survival/death in autophagy-related cancer networks. *The international journal of biochemistry & cell biology* 43(9):1263-1266.
- Watanabe M. 1980. An autoradiographic, biochemical, and morphological study of the harderian gland of the mouse. *Journal of morphology* 163(3):349-365.
- Yen CC, Lu FJ, Huang CF, Chen WK, Liu SH, Lin-Shiau SY. 2007. The diabetogenic effects of the combination of humic acid and arsenic: in vitro and in vivo studies. *Toxicology letters* 172(3):91-105.
- Yen WL, Klionsky DJ. 2008. How to live long and prosper: autophagy, mitochondria, and aging. *Physiology (Bethesda)* 23:248-262.
- Yi J, Tang XM. 1995. Functional implication of autophagy in steroid-secreting cells of the rat. *Anat Rec* 242(2):137-146.

Zhang DD. 2006. Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. Drug metabolism reviews 38(4):769-789.

Zhang HH, Halbleib M, Ahmad F, Manganiello VC, Greenberg AS. 2002. Tumor necrosis factor-alpha stimulates lipolysis in differentiated human adipocytes through activation of extracellular signal-related kinase and elevation of intracellular cAMP. Diabetes 51(10):2929-2935.

Anexos

Artículo 1: García-Macia M, Rubio-Gonzalez A, de Luxán-Delgado B, Potes Y, Rodríguez-González S, de Gonzalo-Calvo D, Boga JA, Coto-Montes A. Autophagic and proteolytic processes in the Harderian gland are modulated during the estrous cycle. Histochem Cell Biol. 2014 May;141(5):519-29. doi: 10.1007/s00418-013-1170-1. Epub 2013 Dec 6.

Artículo 2: García-Macia M, Caballero B, Rubio-González A, de Luxán-Delgado B, Potes Y, Illán-Rodríguez D, Boga JA, Coto-Montes A. **Lipophagy in the Harderian gland along the estrous cycle: a potential retrieval effect of melatonin.**

Autophagic and proteolytic processes in the Harderian gland are modulated during the estrous cycle

**M. García-Macia, A. Rubio-Gonzalez,
B. de Luxán-Delgado, Y. Potes,
S. Rodríguez-González, D. de Gonzalo-
Calvo, J. A. Boga, et al.**

Histochemistry and Cell Biology

ISSN 0948-6143

Histochem Cell Biol
DOI 10.1007/s00418-013-1170-1

The image shows the front cover of the journal Histochemistry and Cell Biology. The title 'Histochemistry and Cell Biology' is prominently displayed in blue text. A large orange circular badge on the right side contains the text 'ONLINE FIRST'. Below the title, there is a red 'Free Color!' logo. At the bottom left, there is a large fluorescence microscopy image showing a cell with green and red fluorescence. A white rectangular box highlights a specific area within the cell. To the right of this main image is a vertical inset showing a close-up of a single neuron-like structure with red and green fluorescence. At the bottom right, the Springer logo is visible.

Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer-Verlag Berlin Heidelberg. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".

Autophagic and proteolytic processes in the Harderian gland are modulated during the estrous cycle

M. García-Macia · A. Rubio-Gonzalez · B. de Luxán-Delgado ·
 Y. Potes · S. Rodríguez-González · D. de Gonzalo-Calvo ·
 J. A. Boga · A. Coto-Montes

Accepted: 20 November 2013
 © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract The Syrian hamster Harderian gland (HG) is an organ that undergoes physiological autophagy in response to oxidative stress induced by porphyrin production. Porphyrin production in the HG has marked sex differences and is closely linked to reproductive function. In the present study, we observed that the estrous cycle and associated estrogen variations may affect oxidative-stress-induced proteolytic processes. In particular, significant changes in autophagic activity were detected during the estrous cycle. Notably, increased activation of macroautophagy as well as chaperone-mediated autophagy in the estrus phase coincided with a minimal antioxidant capability and the highest protein damage levels. By contrast, autophagic machinery was found to be blocked in the diestrus phase, likely due to mammalian target of rapamycin activation, which could be corroborated by the subsequent pS6K activation. Analogous results were observed regarding proteasome activity, which also showed maximal activity in the estrus phase. Interestingly, all these mechanisms were associated with important morphological changes in the HG during the estrous cycle. We observed statistically significant increases in Type II cells, which may be related to extensive autophagy in the estrus phase. Physiologically, this would result in a significant release of porphyrins specifically when females are

more receptive. These data support the role of porphyrins as pheromones, as other authors have previously suggested, thus making the HG a scent organ. In addition, these results suggest a porphyrin-based approach to the treatment of porphyria during pregnancy, a condition for which no treatment is currently known.

Keywords Autophagy · Estrous cycle · Sexual hormones · Proteolysis · Porphyria

Abbreviations

AIP	Acute intermittent porphyria
DNP	Dinitrophenylhydrazine
HG	Harderian gland
HPF	High-power fields
mTOR	Mammalian target of rapamycin
pS6K	p70 S6 kinase
phospho-pS6K	Phospho-p70 S6 kinase (Thr389)
ROS	Reactive oxygen species
TAA	Total antioxidant activity

Introduction

Autophagy is a regulated process for degrading cellular components and is well conserved in eukaryotic cells. Although this process has traditionally been linked to the cellular energy balance, recent studies have begun to clarify its importance in other cellular functions such as organ remodelling. A role for autophagy in adapting to or even regulating secretory activity in response to fluctuations in steroid secretion was proposed almost twenty years ago (Yi and Tang 1995). Recent studies support the idea that autophagy can be regulated by sex hormones in androgen-dependent organs (Coto-Montes et al. 2009). However, the

M. García-Macia (✉) · A. Rubio-Gonzalez ·
 B. de Luxán-Delgado · Y. Potes · S. Rodríguez-González ·
 D. de Gonzalo-Calvo · A. Coto-Montes
 Department of Morphology and Cellular Biology,
 Cellular Biology Area, Faculty of Medicine, University
 of Oviedo, Julián Clavería s/n, 33006 Oviedo, Spain
 e-mail: marinagarciamacia@gmail.com

J. A. Boga
 Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Central de
 Asturias, Celestino Villamil s/n, 33006 Oviedo, Spain

contribution of autophagy to cellular renovation may be dependent on not only sex hormone levels but also other factors, such as induced oxidative stress or cellular damage. However, the contribution of these determinants, together or separately, toward autophagic initiation remains unknown.

The Syrian hamster Harderian gland (HG) is an organ that undergoes physiological autophagy (Vega-Naredo and Coto-Montes 2009) and is a source of pheromones (Payne et al. 1977). These pheromones, as Thiessen and Rice have suggested, mainly consist of porphyrins (Thiessen and Rice 1976). The HG exhibits marked sex differences in cell type and porphyrin production. The glands of females consist of a single secretory cell type (female Type I) and large intraluminal deposits of porphyrins, whereas male hamsters have two secretory cell types (Types I and II) and produce much lower concentrations of porphyrin. However, in both male and female HGs, the porphyrin production is higher than in the liver (Coto-Montes et al. 2001b). This production of porphyrins, as Thiessen and Rice have shown, is closely linked to reproductive function (Thiessen and Rice 1976). In the female hamster, the gland weight, the number of solid intraluminal porphyrin accretions, and the concentrations of copro- and protoporphyrin are all maximal on day 1 of the cycle (estrus, when peak estrogen secretion occurs) and decrease gradually thereafter (Payne et al. 1979).

Because of the localization of the HG within the bony orbit, the porphyrins are exposed to light and thus produce reactive oxygen species (ROS) by photo-oxidation (Tomas-Zapico et al. 2002). The concentration of porphyrins therefore determines the level of physiological oxidative stress in this gland: mild oxidative stress occurs in the male HG and extreme oxidative stress occurs in the female gland (Tomas-Zapico et al. 2005b). Damage caused by the porphyrin-induced ROS forces the gland to develop autophagic processes to remodel the system and allow cells to maintain vital functions and adapt to environmental stress (Vega-Naredo and Coto-Montes 2009). The physiological autophagic-lysosomal pathway found in the Syrian hamster displays unique features depending on sex; male HGs develop survival autophagy, whereas female HGs exhibit detachment-derived cell death.

Porphyrin production in the Harderian gland appears to be regulated by sex. The study of porphyrin production in the Harderian gland of the Syrian hamster could provide promising approaches to treat porphyria (Coto-Montes et al. 2001a), particularly because sex hormones play an important role in the clinical expression of several porphyrias (Goldberg 1959). Some forms of this disease, which are characterized by increased excretion of porphyrin precursors, are more common in women than in men and are exacerbated during menses and pregnancy

(McColl et al. 1982; Menendez-Pelaez et al. 1992). Acute intermittent porphyria (AIP) is inherited in an autosomal-dominant fashion, though only 10–15 % of gene carriers have the clinical syndrome. The prevalence of AIP in Europe is 1/20,000 (Farfaras et al. 2010). Pregnancy represents an essential risk factor in patients suffering from AIP, and pregnancy in women with AIP is associated with higher rates of spontaneous abortion, hypertension, low birth weight infants and considerable mortality (2–42 %) (Farfaras et al. 2010). Despite intense research on porphyria during the last several decades, little clinical improvement has been achieved because the physiological basis for the gestational change in porphyrin content is not yet known.

The cellular mechanisms involved in the control and production of porphyrins in the Harderian gland could be similar to those in other tissues in which porphyrin accumulation triggers porphyria attacks.

The purpose of this work was to study the Harderian gland during the estrous cycle and to explore the effects of estrogen variation on the proteolytic processes that counteract porphyrin deposits in this gland. The potential application of these findings to the study of AIP during pregnancy is also discussed.

Materials and methods

Animals

Eight eight-week-old female Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) (Harlan Interfauna Ibérica, Barcelona, Spain) were housed two per cage under long light periods with a 14/10 light/dark cycle (lights on daily from 0700 to 2100) at 22 ± 2 °C. Animals received tap water and a standard pellet diet ad libitum.

The Oviedo University Local Animal Care and Use Committee approved the experimental protocol. All experiments were carried out according to the Spanish Government Guide and the European Community Guide for Animal Care (Directive 2010/63/UE).

Females were monitored daily by vaginal smears to determine their reproductive phase (proestrus, estrus, metestrus, or diestrus) according to the method of Orsini (1961), for three consecutive cycles. To study opposite phases, we collected female hamsters during estrous and diestrus phases, which present the highest difference in plasmatic estrogen concentration during the estrous cycle.

After confirmation of the estrous or diestrus phase, hamsters were killed at these points of the estrous cycle, and the Harderian glands were immediately removed, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C until the experiments were performed.

If not indicated otherwise, HGs (0.1 g) were homogenized with a Polytron homogenizer at 4° C in 1 ml of lysis buffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl). The tissue homogenates were then centrifuged for 6 min at 3,000 rpm at 4° C. The supernatants were collected and centrifuged again under the same conditions. We carried out experiments both with protease inhibitors (1 mM Na₃VO₄, 1 µg/ml aprotinin) and without inhibitors and found the results to be comparable.

The protein concentration of the supernatants was measured by the Bradford method (Bradford 1976).

Total antioxidant activity (TAA)

TAA was determined using the ABTS/H₂O₂/HRP method modified for tissue samples (Arnao et al. 2001; Garcia-Macia et al. 2011). The results are expressed as equivalents of mg Trolox/mg protein.

Protein oxidative damage

Protein carbonyl concentrations were determined by an ELISA involving reaction of the protein with dinitrophenylhydrazine (DNP) and detection with an anti-DNP antibody (Buss et al. 1997). Data are presented as nmol protein carbonyl/mg protein.

Morphological and immunohistochemistry studies

Harderian glands were fixed for 15 min in 4 % paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4), postfixed in the same buffer for at least two days, and washed in TBS buffer. The samples were embedded in paraffin by standard methods, and morphological analysis was performed using eosin-hematoxylin staining and immunohistochemical studies.

The morphological parameters studied were number of Type II cells per mm², the number of cells detached into the lumen per mm², and porphyrin area/HG total area in mm². In each HG, four different sections (300 µm apart) were collected, and in each section, two random high-power fields (HPF) were analyzed using a NIKON Eclipse E200 microscope (Nikon Corp., Tokyo, Japan) (the size of the HPF for this microscope is 0.196 mm²). For the study of the porphyrin area (porphyrin area/HG total), the total HG area and the porphyrin area were measured in each section using the Confocal Uniovi Image J (National Institutes of Health (NIH), Maryland, USA).

For the immunohistochemical procedures, the sections were rinsed three times for 10 min in 0.01 M PBS with 0.1 % Triton X-100 and 0.25 % bovine serum albumin (PBS-TB) and blocked in 30 % serum in PBS-TB for 30 min. This procedure was followed by incubation with

antibody against p-mTOR (FRAP) (Ser 2448) (sc-101738, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) for 24 h at 4 °C in a humidified chamber. After being washed with PBS-TB, the sections were incubated with a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody and then peroxidase anti-peroxidase complexes (Sigma, St. Quentin Fallavier, France) for 1 h at room temperature. Finally, the sections were washed and developed with 0.05 % 3,3'-diaminobenzidine/HCl with 0.005 % H₂O₂ in Tris/HCl. The stained sections were studied under a light microscope (CAST2; Olympus España, Barcelona, Spain). The images were imported and incorporated into electronic figures using MS PowerPoint 2010.

Immunoblotting of autophagic markers

In all, 100 µg of protein was separated by 12 % SDS-PAGE at 100 V and transferred to PVDF membranes at 350 mA. The membranes were blocked for 1 h at room temperature in 5 % skim milk in PBS containing 0.05 % Tween-20 (PBS-T) and probed for 1 h at room temperature with antibodies against Beclin-1 (sc-10086) and mTOR (sc-8319) from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), phospho-p70 S6 kinase (Thr389) (phospho-pS6K) (#9206) from Cell Signaling (Boston, MA, USA), Lamp-2a (Cat. No. Ab18528, Abcam plc, Cambridge, UK), LC3 (PD014; MBL, Naka-ku Nagoya, Japan), and actin (sc-1615; Santa Cruz Biotechnology), all previously diluted 1:1,000 in blocking buffer, except for Lamp-2a, which was diluted 1:500. After being washed in PBS-T, the membranes were then incubated with the corresponding horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) for 1 h at room temperature. Development was carried out using the Western Blotting Luminol Reagent (sc-2048; Santa Cruz Biotechnology, Inc.) according to the manufacturer's protocol. The results were calculated from at least three separate experiments for each antibody and were normalized to β-actin. The levels of protein band intensities in the different fractions were quantitatively analyzed using Quantity One v. 5.5.1. (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA).

Proteasome activity assay

Proteasome activity was assessed in homogenized tissue using a 20S proteasome activity assay kit (Chemicon, Chemicon International, Inc, Temecula, CA, USA). The assay is based on the detection of the fluorophore 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) after its cleavage from the labeled substrate LLVY-AMC by chymotrypsin-like activity of the proteasome. Free AMC is detected by fluorimetric quantification (380/460 nm). Data are presented as arbitrary fluorescence units/mg protein.

Statistical analysis

Data are presented as the mean values \pm SD calculated from at least three separate experiments, each performed in triplicate. The normality of the data was analyzed by the Kolmogorov-Smirnov test. Statistical comparisons between the two groups, estrous and diestrus, were made by Student's *t* test with normal data. The accepted level of significance was $p < 0.05$.

Results

The Harderian gland has been studied under several conditions. However, cellular alterations during the estrous cycle, particularly changes in the HG when females are receptive, have yet to be elucidated. Estrogen variations have previously been shown to be related to oxidative modifications (Navarro et al. 2005), and autophagy is modulated by oxidative stress (Tomas-Zapico et al. 2005b). On the basis of these findings, we characterized the oxidative state and both types of autophagy (macroautophagy and chaperone-mediated autophagy) in female HGs from the two main phases of the estrous cycle: the estrous and diestrus phases. We studied possible morphological alterations because previous studies from our laboratory have shown a high level of plasticity of this gland and a rapid morphological response to a variety of stimuli (Rodríguez-Colunga et al. 1991, Rodríguez-Colunga et al. 1993).

Oxidative state

The HG of the Syrian hamster has a high level of porphyrins, much higher than other porphyrinogenic tissues. The

HG, with its orbital location, is accessible to light and thus to the toxic effects produced by the porphyrins accumulated in it (Coto-Montes et al. 2001b). Therefore, it has been described as an excellent model of physiological oxidative stress.

Total antioxidant activity (TAA)

The TAA is frequently considered a useful indicator of a system's ability to regulate ROS-induced damage (Garcia-Macia et al. 2011). The TAA was significantly lower in estrus phase than in diestrus phase glands ($p < 0.001$) (Fig. 1a).

Protein oxidative damage

The protein damage was expressed in terms of the protein carbonyl content (Fig. 1b). More protein damage was observed in the estrus phase than in the diestrus phase ($p < 0.05$).

Characterization of autophagy

We studied the main autophagic induction pathway, as well as autophagic markers, in both stages of the estrous cycle by immunohistochemistry and immunoblotting. Our results suggest that autophagy is upregulated in the estrus phase, when the expression of estrogens is highest, and is blocked by mTOR in the diestrus phase.

Mammalian target of rapamycin (mTOR) is a protein kinase that is involved in the control of a diverse range of cellular processes, including autophagy. The activation of mTOR by phosphorylation at Ser 2448 inhibits autophagy (Chiang and Abraham 2005). In turn, the inhibition of this pathway induces autophagy.

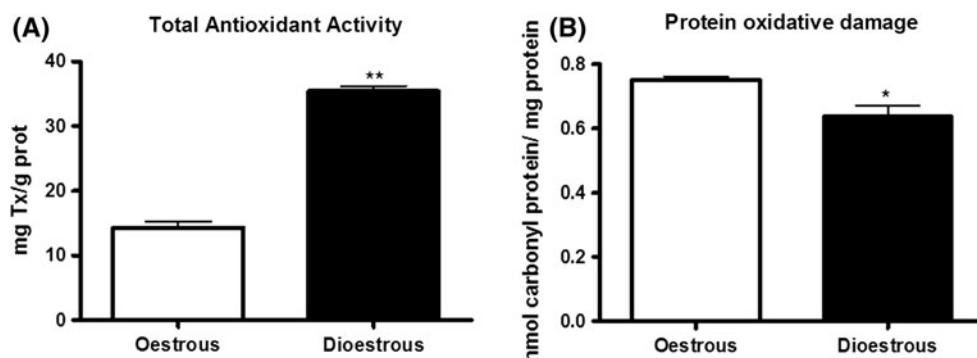


Fig. 1 Imbalance in the redox state during the estrous cycle. **a** Comparison of total antioxidant activity (TAA). **b** Protein oxidative damage (PD). Regarding the redox status, the TAA results are expressed as equivalents of mg Trolox/mg protein. The PD results are expressed as nmol protein carbonyl/mg protein. Data are expressed as the

mean \pm SD and are calculated from at least three separate experiments, with each experiment performed in triplicate. For morphological studies and images, we obtained sections of the Harderian gland from female during the estrous and diestrus phases. *($p < 0.05$), **($p < 0.01$)

A Western blot of total mTOR was developed to assess its presence during the estrous cycle. In this assay, we found that mTOR was only expressed in the diestrus phase (Fig. 2c, d). Next, phosphorylation of mTOR was evaluated by immunohistochemistry. We observed specific nuclear staining in all cells of the gland in the diestrus phase, which is a positive result, whereas it was not present in the HGs from the estrus phase. These positive results for p-mTOR (Ser 2448) in the diestrus phase and negative results in the estrus phase imply that autophagy is inhibited only in the diestrus phase (Fig. 2a, b). To confirm that mTOR is activated in the diestrus phase, we studied pS6K, which is the target of activated mTOR. When this mTOR pathway is activated, both mTOR and pS6K are phosphorylated, and autophagic processes are inhibited. The phosphorylation of pS6K (Thr 389) was studied by Western blot, and the results showed a lower expression of phospho-pS6K in estrous than diestrus phase (Fig. 2c, e), consistent with mTOR activation. With regard to the presence of phosphorylated pS6K in the estrus phase, despite mTOR having no expression in that phase, it has been demonstrated that MAPK can also directly phosphorylate pS6K (Mukhopadhyay et al. 1992). However, MAPK is not sufficient to elicit

pS6K activation. pS6K activation is a complex process requiring multiple signaling inputs (Pullen and Thomas 1997), and mTOR is essential for this activation (Pullen and Thomas 1997; Wang et al. 2011).

Extensive and non-selective macroautophagy

To study the macroautophagy processes in the female Syrian hamster Harderian gland during estrous and diestrus phases, we performed Western blot analysis using antibodies against Beclin-1 and LC3 and normalized the results to β -actin.

Beclin-1, a class III phosphatidylinositol 3-kinase-interacting protein homologous to yeast Atg6, plays a role in promoting autophagy (Furuya et al. 2005). The sequential immunoblot analysis showed significant differences in protein expression between the two analyzed phases of the estrous cycle (Fig. 3a). The estrus phase HGs showed a higher expression level ($p < 0.001$) than the diestrus phase glands, indicating that autophagy is most likely upregulated in the estrus phase (Fig. 3b).

Microtubule-associated protein light chain 3 (LC3) is an autophagosomal ortholog of yeast Atg8. LC3 modification is

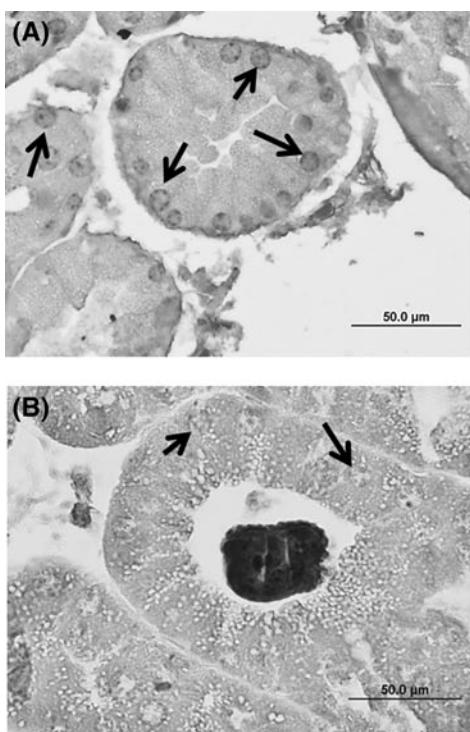
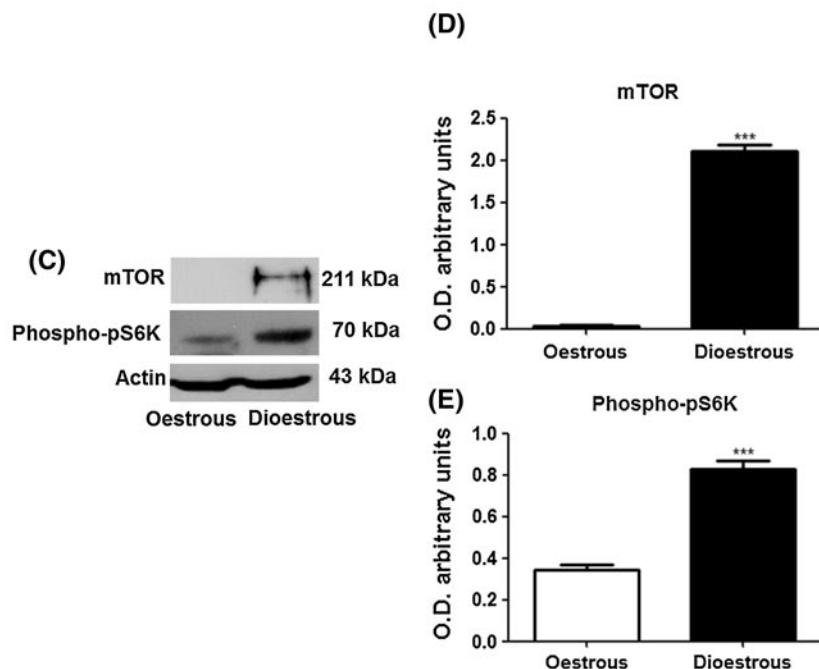
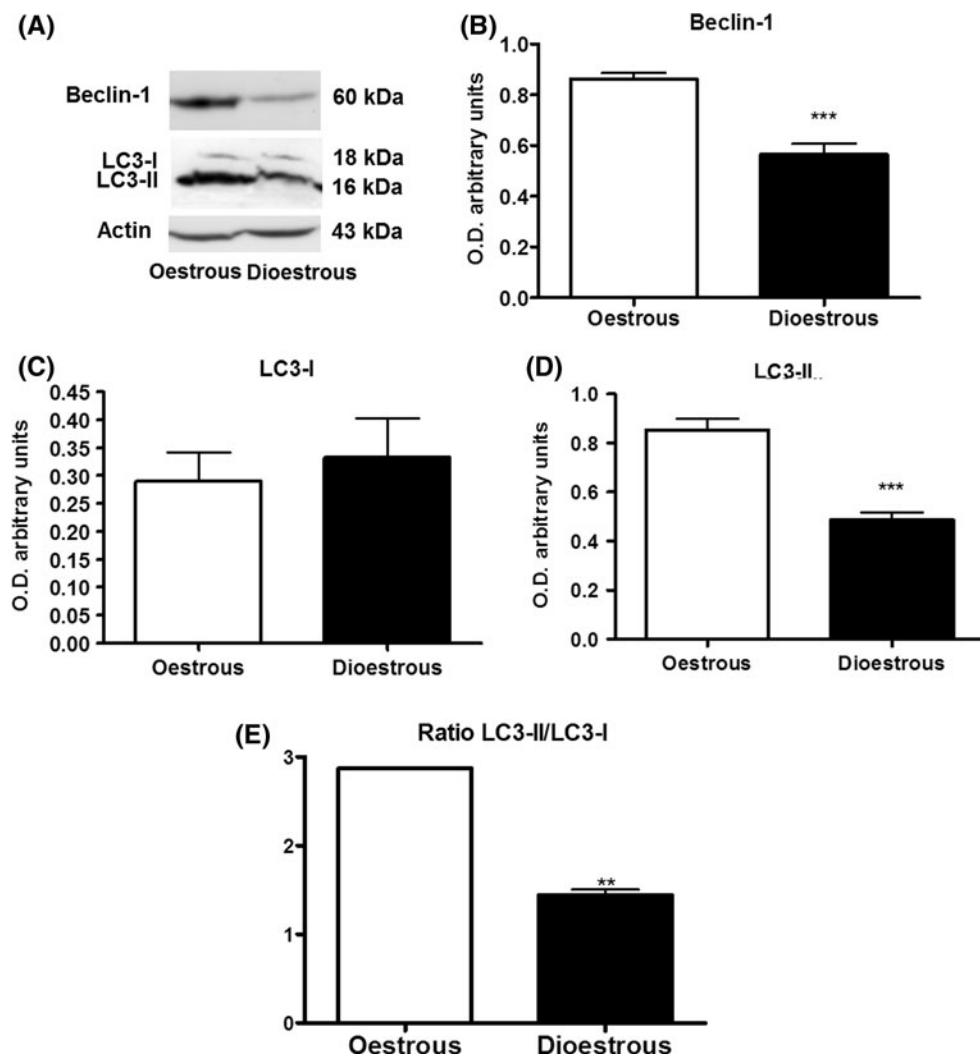


Fig. 2 mTOR signaling pathway activated in diestrus. Immunohistochemical staining for p-mTOR (Ser 2448) in nuclei (arrow) of female Harderian glands during the diestrus phase (a) and negative staining (arrow) during the estrus phase (b) (Bar 50 μ m). c Total mTOR and phospho-pS6K protein band intensities in the estrous and diestrus fractions. The bar graphs of mTOR (d) and phospho-pS6K



(e) quantify the optical densities of the Western blot bands normalized to β -actin. Typical experiments are shown. Similar results were obtained from three separate experiments. Data are expressed as the mean \pm SD and are calculated from at least three separate experiments. ***($p < 0.001$)

Fig. 3 Higher expression of autophagic markers in the estrus phase. Beclin-1 and LC3 protein band intensities in the Harderian gland fractions from the estrous and diestrus phases (a). The bar graphs of Beclin-1 (b), LC3-I (c), and LC3-II (d) quantify the optical densities of the Western blot bands normalized to β -actin and the LC3-II/LC3-I ratio as a marker of autophagic flux (e). Similar results were obtained from three separate experiments. Data are expressed as the mean \pm SD and are calculated from at least three separate experiments. **($p < 0.01$), ***($p < 0.001$)



essential for the autophagic process, as the protein LC3-II is localized to preautophagosomes and autophagosomes and is considered an autophagosomal marker. Western blot analysis showed two bands corresponding to LC3-I and LC3-II, at 18 and 16 kDa, respectively (Fig. 3a). We observed similar values for LC3-I (Fig. 3c) in both stages but found significantly higher LC3-II expression in estrus than in diestrus ($p < 0.001$) (Fig. 3d). This result implies that there are more autophagosomes (in the process of joining lysosomes or accumulating in cytoplasm) in estrus than in diestrus. The resulting ratio between LC3-I and LC3-II was higher in estrus than in diestrus ($p < 0.01$) (Fig. 3e), indicating that autophagosomes are primarily newly formed in the estrus phase.

Selective autophagy via chaperone-mediated autophagy (CMA) in Syrian hamster HG

Lamp2 is a single gene that undergoes alternative splicing, resulting in three different mRNA species that encode the Lamp-2a, Lamp-2b, and Lamp-2c variants of this protein.

Although it is possible that all the isoforms share common functions, isoform-specific functions have also been described. Lamp-2a is the only isoform shown to participate in CMA and is therefore used as a marker of CMA activity (Cuervo and Dice 1996). To evaluate CMA activity, we studied Lamp-2a expression by Western blotting. The results showed significantly greater expression in estrus than in diestrus ($p < 0.001$) (Fig. 4), which implies that this type of lysosomal degradation is more active in estrus than in diestrus.

Morphological studies

The female Syrian hamster HG, which accumulates intraluminal porphyrins, frequently undergoes changes that culminate in cell-detachment-derived cell death, which leads to massive glandular secretion (Vega-Naredo et al. 2009). This process plays a major role in the secretory activity of the gland.

Massive autophagy, observed in estrus, induces a subsequent decrease in glandular area. We studied glandular

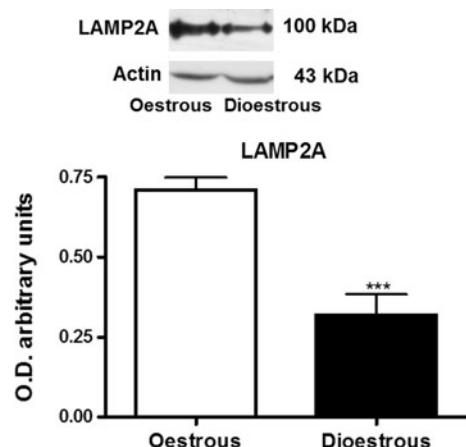


Fig. 4 Elevated CMA activity in the estrus phase. Lamp-2a protein band intensities in the Harderian gland fractions from the estrous and diestrus phases. The bar graph quantifies the optical densities of the Western blot bands normalized to β -actin. Typical experiments are shown. Similar results were obtained from three separate experiments. Data are expressed as the mean \pm SD and are calculated from at least three separate experiments ***($p < 0.001$)

area/HPF to evaluate possible alterations in glandular area during the estrous cycle. Our studies showed a significant decrease ($p < 0.01$) in glandular area in the estrus phase vs. the diestrus phase, most likely due to the extensive autophagy occurring in this phase (Fig. 5d).

An increase in estrogen hormone during estrus caused a significant increase in Type II cells compared to the number in diestrus. The percentage of Type II cells per total cells was 1.2 and 0.4 % in estrus and diestrus, respectively (Fig. 5a). The Type II cells observed in estrus (Fig. 5e) shared the main morphological features with Type II cells from male hamsters but displayed peculiarities such as larger lipid droplets than those found in Type II cells from the male HG (Fig. 5g).

However, while autophagy and Type II cells increase in estrus, holocrine secretion displayed a significant reduction in estrus, as measured by the number of detached cells per mm² ($p < 0.001$) (Fig. 5c). Measurement of the porphyrin area with respect to the total glandular area showed that porphyrins occupied a statistically higher area in the estrus phase than the diestrus phase ($p < 0.01$) (Fig. 5b). Likewise, optical microscopic study of Harderian gland sections revealed that in the female Harderian gland during estrus, the intraluminal areas were usually wider and without cellular debris compared with the intraluminal areas in diestrus (Fig. 5e, f).

Proteasome activity

The proteasome is now known to degrade the majority of intracellular proteins, including both short- and long-lived proteins. It has been shown that the Ub/20S proteasome

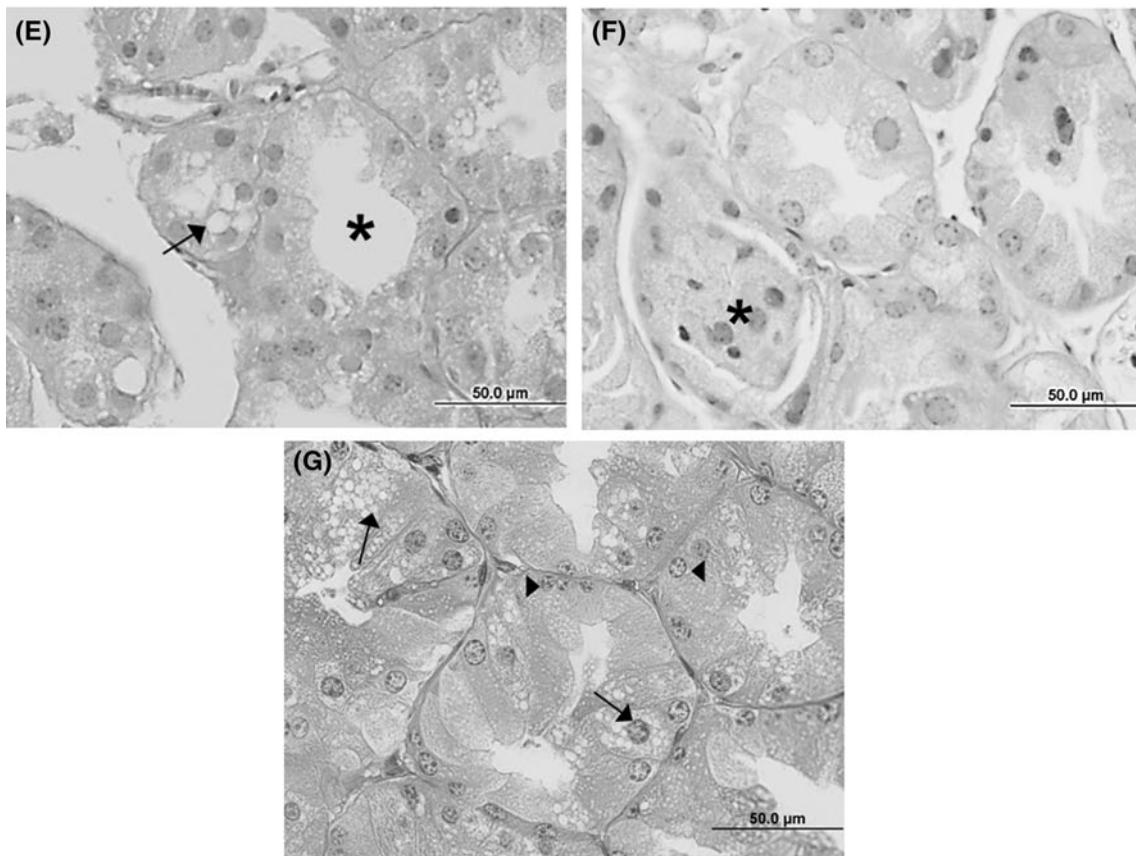
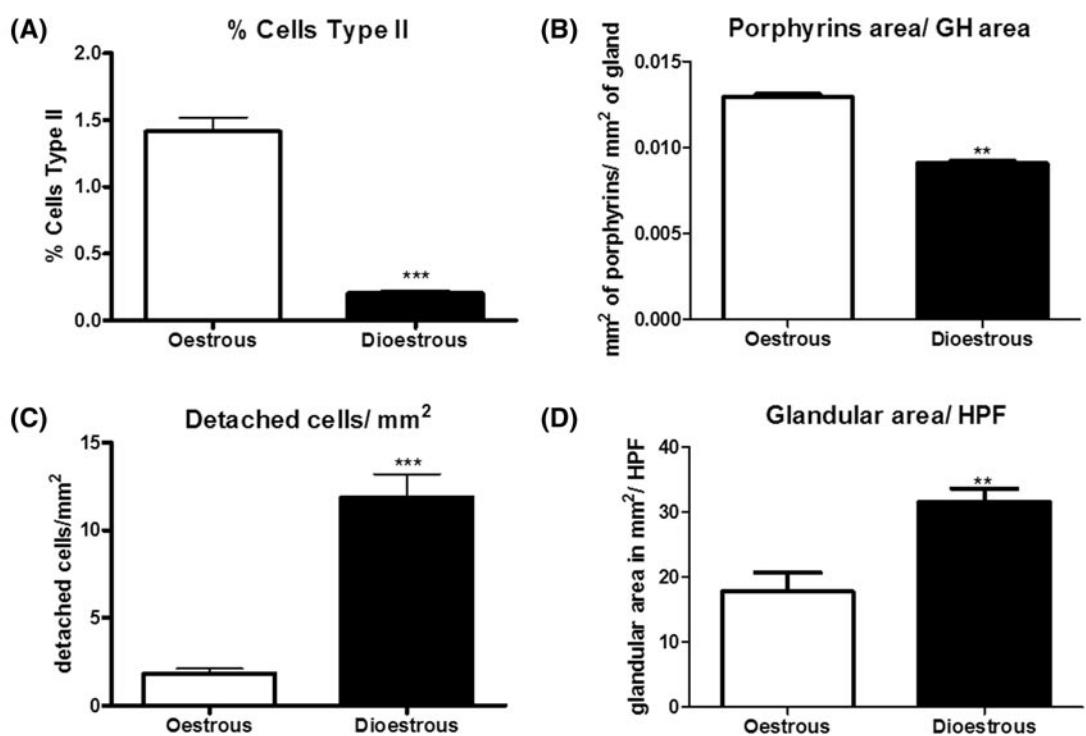
system is responsible for protein degradation. When we measured the 20S proteasome activity, the results showed a higher activity in estrus than in diestrus ($p < 0.01$) (Fig. 6).

Discussion

Several studies have demonstrated that the Harderian gland is under gonadal and pineal regulation (Hoffman et al. 1985) and expresses androgen, estrogen, and melatonin receptors in animals of both sexes (Vilchis and Perez-Palacios 1989; Coto-Montes et al. 1996; Tomas-Zapico et al. 2005a). The HG response to sex hormone alterations is fast and complete: both photoperiodic changes and castration of adult males result in feminization of the gland structure, implying a rapid increase in Harderian gland porphyrin production and a reduction in Type II cells (Payne et al. 1977; Coto-Montes et al. 1994). Testosterone administration to female (Marrufo et al. 1989) hamsters leads to masculinization of the gland, including changes in porphyrin production and an increase in Type II cells. As noted in the introduction, changes in porphyrin production induce important variations in the glandular redox balance, and when porphyrin levels are very high, as in female Harderian glands, oxidative stress is exacerbated. Recently, our group has demonstrated that the autophagic-lysosomal processes help counteract the glandular oxidative stress in glands from both sexes (Tomas-Zapico et al. 2005b). Thus, we have shown that male HGs developed survival autophagy, while in female HGs, autophagy culminated in detachment-derived cell death (Vega-Naredo et al. 2009). Although these observed differences in autophagy evolution suggest that sex hormones are involved in autophagy regulation in the Harderian gland of both sexes, the data supporting this involvement are not definitive. However, the present study shows that the autophagic process fluctuates throughout the estrous cycle, not only as a consequence of prevailing oxidative stress in the Harderian gland but also as an active mechanism controlling HG activity.

Our results have shown that activated mTOR could act as an autophagic switch during the estrous cycle, activating or blocking autophagy and controlling the production of secreted porphyrin during the estrus phase, which is the phase of highest estrogen production. Furthermore, all the autophagic enzymes analyzed in this study were inversely correlated with mTOR and pS6K phosphorylation expression: Beclin-1 and LC3, markers of macroautophagy, and Lamp-2a, a marker of chaperone-mediated autophagy, were increased in the estrus phase compared with the diestrus. Therefore, autophagic-lysosomal processes oscillate during the estrous cycle depending on estrogen levels.

Our results have demonstrated that autophagy and the ubiquitin-proteasome system, the main cellular proteolytic



systems, are regulated by the estrogen levels, showing higher activity when the plasma estrogen concentration is increased, as in the estrus phase.

These data correlate perfectly with previous results that showed that estrus is the period of highest production of copro- and protoporphyrins (which is by far the most

◀Fig. 5 Morphological changes during the estrous cycle. **a** Percentage of Type II cells in the secretory acini, **b** area occupied by porphyrins/total glandular area, **c** detached cells/mm², and **d** glandular area/HPFs (high-power fields) in female hamster Harderian glands from the estrous and diestrus phases. **e** Paraffin section of the female HG in the estrus phase. Two morphological features are noticeable: larger than normal lipid droplets in special Type II cells (*arrow*) and a clear acinar lumen (*asterisk*). **f** Paraffin section of the female HG in the diestrus phase; note the holocrine secretion in the acinar lumen (*asterisk*). **g** Paraffin section of the male HG with typical Type II cells (*arrow*) and Type I cells (*arrowhead*). Bar 50 μm. **($p < 0.01$) ***($p < 0.001$)

prevalent types of porphyrin) in the gland. However, during diestrus, the concentrations of coproporphyrins, protoporphyrins, and total porphyrins were significantly decreased (Payne et al. 1979). It appears that the proteolytic systems and porphyrin production are synchronized during the estrous cycle for a common purpose. What is the role of these important biochemical changes in the HG during this short temporal period? These changes are most likely related to Harderian gland function. While the function of the Harderian gland is still unknown, there have been numerous theories on this subject. The characteristics of this gland, including its pronounced sexual dimorphism in histology, porphyrin production, and oxidative stress (Coto-Montes et al. 2001a), seem too complex for a gland whose only role is to lubricate the eye. The Harderian gland likely also plays a role as a source of olfactory cues (Payne et al. 1979).

Results from the late 1970s support this hypothesis and our results. Both sexually experienced and inexperienced males were more attracted to fresh smears of the female Harderian gland than to smears of the male HG (Payne et al. 1979). These results suggest that porphyrins may act as pheromones and provide the basis for transmitting

information about the reproductive status of the female hamster. Previous results from our laboratory showed that in the female HG, massive autophagy provoked a holocrine secretion with the release of porphyrin accretions into the acinar lumen (Vega-Naredo et al. 2009). Our current results show a significant reduction during the estrus phase in the release of cells into the glandular lumen and an accumulation of these cells during diestrous, when autophagy and all proteolytic processes were reduced. Moreover, a reduction in total mTOR occurs at the same time as the activation of autophagy in the estrus phase. This increase in autophagy has a rapid morphological effect in the gland. Massive proteolytic activity induces a clearance of the Harderian gland, resulting in a wide and clean glandular lumen.

Previous data from our laboratory (Vega-Naredo et al. 2009; Vega-Naredo et al. 2012) led us to suggest that Type I and Type II cells, the classical HG cells with special sex-specific morphological characteristics, are simply different states of one type of cell. The results of the present study corroborate this hypothesis. Type II cells increase significantly during the estrus phase when autophagy is increased and almost disappear during the diestrus phase when autophagy is blocked. Our previous studies showed that Type II cells have an essential role in massive autophagy and in provoking holocrine secretion (Vega-Naredo et al. 2009), while Fung and coworkers (Fung et al. 2008) showed that cellular detachment is induced by autophagy. Hence, in the estrus phase, the increased autophagic processes promote holocrine secretion in the Type II cells, which have almost disappeared from the acinar lumen in the diestrus phase. In fact, our results show that glandular tissue is disappearing while porphyrin deposits remain present in the acinar lumen. Several studies, mostly from our group, have demonstrated significant plasticity in the Harderian gland, displaying its ability to change the relative number of Type II cells and porphyrin concentrations after castration (Antolin et al. 1996) or treatment with sex hormones (Rodriguez-Colunga et al. 1993; Vilchis et al. 2006), melatonin (Coto-Montes et al. 1994), triiodothyronine (Hoffman et al. 1985), human chorionic gonadotropin, or progesterone (Menendez-Pelaez et al. 1992). Previous data indicate that there is a strong negative correlation between the porphyrin concentration and the relative number of Type II cells, but the reason for this correlation remained unknown. On the basis of data from the present study, we conclude that autophagy could be the mechanism that accounts for the biochemical and morphological changes in the Harderian gland. This process, in turn, can be regulated by sex hormones and other hormones through oxidative stress.

Previous studies have shown maximal porphyrin production in the HG during the receptive period of the female hamster (Payne et al. 1979). This demonstrates that the

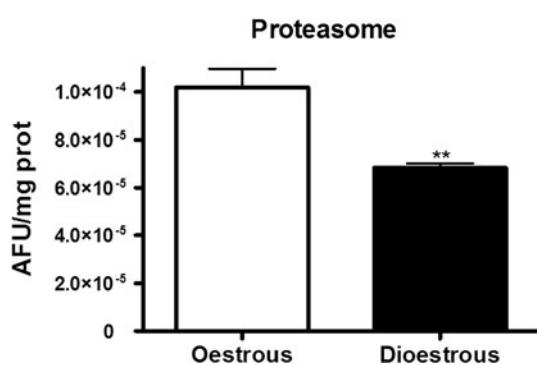


Fig. 6 Higher proteasome activity in the estrus phase. Proteasome activity from tissue extracts of estrous and diestrus phase Harderian glands. The results are expressed in equivalents of UAF/mg protein. Data are expressed as the mean ± SD and are calculated from at least three separate experiments, with each experiment performed in triplicate **($p < 0.01$)

Harderian gland from the female hamster has the ability to act as a scent organ, releasing porphyrins that function like pheromones to signal that the female is receptive. Our data from the present study correlate porphyrin production with the fluctuations in autophagy and the estrogen level throughout the estrous cycle. Specifically, porphyrin production is blocked in diestrus but is activated in estrus, when there are high levels of macroautophagy, chaperone-mediated autophagy, and proteasome activity. These increases should induce the morphological changes observed in the gland because estrogens and indolamines are autophagic activators.

In the light of our findings, the role of estrogens in HG autophagy and, thereby, in porphyrin release via autophagy could be of clinical interest. The relationship between porphyria crises and sex hormones have recently been established (Farfaras et al. 2010), and clinical studies have shown that porphyrin production in normal women rises during pregnancy (Lyberatos et al. 1972). Consequently, porphyrin overproduction, such as in AIP, is exacerbated during pregnancy and could induce acute attacks and considerable fetal mortality, especially during the first trimester (Farfaras et al. 2010). Our results have shown that autophagy could present a physiological basis for the cyclic changes in porphyrin content. Furthermore, autophagy blockage caused by the activation of mTOR could regulate the cyclic production of porphyrin. Because this is the first article that shows the relationship between autophagy and porphyria regulated by sex hormones, and these data suggest a promising approach for the treatment of AIP during pregnancy, which currently lacks treatment options. However, further studies are needed to better understand, for instance, the evolution of autophagy in the HG during pregnancy in the hamster. Such studies could provide new approaches to treat porphyria.

References

- Antolin I, Rodriguez C, Uria H, Sainz RM, Mayo JC, Kotler ML, Rodriguez-Colunga MJ, Tolivia D, Menendez-Pelaez A (1996) Castration increases cell damage induced by porphyrins in the Harderian gland of male Syrian hamster. Necrosis and not apoptosis mediates the subsequent cell death. *J Struct Biol* 116(3):377–389
- Arnao MB, Cano A, Acosta M (2001) The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chem* 73:239–244
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Buss H, Chan TP, Sluis KB, Domigan NM, Winterbourn CC (1997) Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. *Free Radical Biol Med* 23(3):361–366
- Chiang GG, Abraham RT (2005) Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at Ser-2448 is mediated by p70S6 kinase. *J Biol Chem* 280(27):25485–25490. doi:[10.1074/jbc.M501707200](https://doi.org/10.1074/jbc.M501707200)
- Coto-Montes AM, Rodriguez-Colunga MJ, Uria H, Antolin I, Tolivia D, Buzzell GR, Menendez-Pelaez A (1994) Photoperiod and the pineal gland regulate the male phenotype of the Harderian glands of male Syrian hamsters after androgen withdrawal. *J Pineal Res* 17(1):48–54
- Coto-Montes AM, Rodriguez-Colunga MJ, Tolivia D, Menendez-Pelaez A (1996) Immunocytochemical localization of melatonin in the Harderian gland of Syrian hamster. *Anat Rec* 245(1):13–16
- Coto-Montes A, Boga JA, Tomas-Zapico C, Rodriguez-Colunga MJ, Martinez-Fraga J, Tolivia-Cadrecha D, Menendez G, Hardeland R, Tolivia D (2001a) Physiological oxidative stress model: Syrian hamster Harderian gland-sex differences in antioxidant enzymes. *Free Radical Biol Med* 30(7):785–792
- Coto-Montes A, Boga JA, Tomas-Zapico C, Rodriguez-Colunga MJ, Martinez-Fraga J, Tolivia-Cadrecha D, Menendez G, Hardeland R, Tolivia D (2001b) Porphyrin enzymes in hamster Harderian gland, a model of damage by porphyrins and their precursors. A chronobiological study on the role of sex differences. *Chem Biol Interact* 134(2):135–149
- Coto-Montes A, Tomas-Zapico C, Martinez-Fraga J, Vega-Naredo I, Sierra V, Caballero B, Huidobro-Fernandez C, Soria-Valles C, Tolivia D, Rodriguez-Colunga MJ (2009) Sexual autophagic differences in the androgen-dependent flank organ of Syrian hamsters. *J Androl* 30(2):113–121
- Cuervo AM, Dice JF (1996) A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science* 273(5274):501–503
- Farfaras A, Zagouri F, Zografos G, Kostopoulou A, Sergentanis TN, Antoniou S (2010) Acute intermittent porphyria in pregnancy: a common misdiagnosis. *Clin Exp Obstet Gynecol* 37(4):256–260
- Fung C, Lock R, Gao S, Salas E, Debnath J (2008) Induction of autophagy during extracellular matrix detachment promotes cell survival. *Mol Biol Cell* 19(3):797–806
- Furuya N, Yu J, Byfield M, Patingre S, Levine B (2005) The evolutionarily conserved domain of Beclin 1 is required for Vps34 binding, autophagy and tumor suppressor function. *Autophagy* 1(1):46–52
- Garcia-Macia M, Vega-Naredo I, De Gonzalo-Calvo D, Rodriguez-Gonzalez SM, Camello PJ, Camello-Almaraz C, Martin-Cano FE, Rodriguez-Colunga MJ, Pozo MJ, Coto-Montes AM (2011) Melatonin induces neural SOD2 expression independent of the NF- κ B pathway and improves the mitochondrial population and function in old mice. *J Pineal Res* 50(1):54–63
- Goldberg A (1959) Acute intermittent porphyria: a study of 50 cases. *Q J Med* 28(110):183–209
- Hoffman RA, Johnson LB, Reiter RJ (1985) Harderian glands of golden hamsters: temporal and sexual differences in immunoreactive melatonin. *J Pineal Res* 2(2):161–168
- Lyberatos C, Chalevelakis G, Platis A, Gardikas C (1972) Urinary porphyrins and their precursors in human pregnancy and after delivery. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 79(10):921–923
- Marrufo B, Menendez-Pelaez A, Buzzell GR, Gonzalez-Brito A, Reiter RJ (1989) 5 alpha-dihydrotestosterone administration converts indolamine metabolism and porphyrin content of the female Syrian hamster Harderian gland to the male type. *Proc Soc Exp Biol Med* 192(2):192–195
- McColl KE, Wallace AM, Moore MR, Thompson GG, Goldberg A (1982) Alterations in haem biosynthesis during the human menstrual cycle: studies in normal subjects and patients with latent and active acute intermittent porphyria. *Clin Sci (Lond)* 62(2):183–191
- Menendez-Pelaez A, Rodriguez-Colunga MJ, Rodriguez C, Tolivia D, Dominguez P (1992) Effects of human chorionic gonadotropin and progesterone administration on porphyrin biosynthesis and histology of the Harderian glands in male and female Syrian hamsters. *Biol Reprod* 47(3):307–315

- Mukhopadhyay NK, Price DJ, Kyriakis JM, Pelech S, Sanghera J, Avruch J (1992) An array of insulin-activated, proline-directed serine/threonine protein kinases phosphorylate the p70 S6 kinase. *J Biol Chem* 267(5):3325–3335
- Navarro A, Torrejon R, Bandez MJ, Lopez-Cepero JM, Boveris A (2005) Mitochondrial function and mitochondria-induced apoptosis in an overstimulated rat ovarian cycle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289(6):E1101–E1109
- Orsini MW (1961) The external vaginal phenomena characterizing the stages of the estrous cycle, pregnancy, pseudopregnancy, lactation, and the anestrous hamster, *Mesocricetus auratus* waterhouse. *Proc Anim Care Panel* 11(4):193–206
- Payne AP, McGadey J, Moore MR, Thompson G (1977) Androgenic control of the Harderian gland in the male golden hamster. *J Endocrinol* 75(1):73–82
- Payne AP, McGadey J, Moore MH, Thompson GG (1979) Changes in Harderian gland activity in the female golden hamster during the oestrous cycle, pregnancy and lactation. *Biochem J* 178(3):597–604
- Pullen N, Thomas G (1997) The modular phosphorylation and activation of p70s6k. *FEBS Lett* 410(1):78–82
- Rodriguez-Colunga MJ, Fernandez C, Antolin I, Rodriguez C, Tolivia D, Menendez-Pelaez A (1991) Chronic administration of melatonin induces changes in porphyrins and in the histology of male and female hamster Harderian gland: interrelation with the gonadal status. *J Pineal Res* 11(1):42–48
- Rodriguez-Colunga MJ, Rodriguez C, Antolin I, Uria H, Tolivia D, Vaughan MK, Menendez-Pelaez A (1993) Development and androgen regulation of the secretory cell types of the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) Harderian gland. *Cell Tissue Res* 274(1):189–197
- Rodríguez-Colunga MJ, Menendez-Pelaez A, Vaughan MK, Reiter RJ (1993) Gender-associated differences in the development of 5-aminolevulinate synthase gene expression in the Harderian gland of Syrian hamsters. *Mol Cell Endocrinol* 93:167–173
- Thiessen D, Rice M (1976) Mammalian scent gland marking and social behavior. *Psychol Bull* 83(4):505–539
- Tomas-Zapico C, Martinez-Fraga J, Rodriguez-Colunga MJ, Tolivia D, Hardeland R, Coto-Montes A (2002) Melatonin protects against delta-aminolevulinic acid-induced oxidative damage in male Syrian hamster Harderian glands. *Int J Biochem Cell Biol* 34(5):544–553
- Tomas-Zapico C, Antonio Boga J, Caballero B, Vega-Naredo I, Sierra V, Alvarez-Garcia O, Tolivia D, Josefa Rodriguez-Colunga M, Coto-Montes A (2005a) Coexpression of MT1 and RORalpha1 melatonin receptors in the Syrian hamster Harderian gland. *J Pineal Res* 39(1):21–26
- Tomas-Zapico C, Caballero B, Sierra V, Vega-Naredo I, Alvarez-Garcia O, Tolivia D, Rodriguez-Colunga MJ, Coto-Montes A (2005b) Survival mechanisms in a physiological oxidative stress model. *Faseb J* 19(14):2066–2068
- Vega-Naredo I, Coto-Montes A (2009) Physiological autophagy in the Syrian hamster Harderian gland. *Methods Enzymol* 452:457–476
- Vega-Naredo I, Caballero B, Sierra V, Huidobro-Fernandez C, de Gonzalo-Calvo D, Garcia-Macia M, Tolivia D, Rodriguez-Colunga MJ, Coto-Montes A (2009) Sexual dimorphism of autophagy in Syrian hamster Harderian gland culminates in a holocrine secretion in female glands. *Autophagy* 5(7):1004–1017
- Vega-Naredo I, Caballero B, Sierra V, Garcia-Macia M, de Gonzalo-Calvo D, Oliveira PJ, Rodriguez-Colunga MJ, Coto-Montes A (2012) Melatonin modulates autophagy through a redox-mediated action in female Syrian hamster Harderian gland controlling cell types and gland activity. *J Pineal Res* 52(1):80–92
- Vilchis F, Perez-Palacios G (1989) Steroid hormone receptors and the sexual phenotype of the Harderian gland in hamsters. *J Endocrinol* 121(1):149–156
- Vilchis F, Ramos L, Timossi C, Chavez B (2006) The influence of sex steroid hormones on ferrochelatase gene expression in Harderian gland of hamster (*Mesocricetus auratus*). *J Endocrinol* 189(1):103–112
- Wang SY, Yu QJ, Zhang RD, Liu B (2011) Core signaling pathways of survival/death in autophagy-related cancer networks. *Int J Biochem Cell Biol* 43(9):1263–1266
- Yi J, Tang XM (1995) Functional implication of autophagy in steroid-secreting cells of the rat. *Anat Rec* 242(2):137–146



Lipophagy in the Harderian gland along the estrous cycle: a potential retrieval effect of melatonin.

Journal:	<i>Journal of Cellular Physiology</i>
Manuscript ID:	Draft
Wiley - Manuscript type:	Original Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Garcia-Macia, Marina; University of Oviedo, Department of Morphology and Cellular Biology Caballero, Beatriz; Universidad de Oviedo, Departamento de Morfología y Biología Celular; Universidad de Oviedo, Morfología y Biología Celular Rubio-Gonzalez, Adrian; University of Oviedo, Department of Morphology and Cellular Biology; Universidad de Oviedo, Morfología y Biología Celular de Luxán-Delgado, Beatriz; University of Oviedo, Department of Morphology and Cellular Biology; Universidad de Oviedo, Departamento de Morfología y Biología Celular Potes, Yaiza; Universidad de Oviedo, Departamento de Morfología y Biología Celular Illán-Rodríguez, David; Universidad de Oviedo, Departamento de Morfología y Biología Celular Boga, José Antonio; Servicio de Microbiología I, Hospital Universitario Central de Asturias, Coto-Montes, Ana; Universidad de Oviedo, Morfología y Biología Celular
Key Words:	lypolysis, lipophagy, melatonin, estrous cycle, oxidative stress

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3 **Lipophagy in the Harderian gland along the estrous cycle: a potential retrieval effect of**
4
5 **melatonin.**

6
7
8 *Garcia-Macia M.^{1*}, Caballero B.¹, Rubio-Gonzalez A.¹, de Luxán-Delgado B.¹, Potes Y.¹,*
9
10 *Illán-Rodríguez D.¹, Boga J.A.², Coto-Montes A.^{1*}*

11
12
13 ¹Departamento de Morfología y Biología Celular, Área de Biología Celular, Facultad de
14
15 Medicina, Universidad de Oviedo, Julian Clavería s/n, 33006, Oviedo, Spain.

16
17
18 ²Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Central de Asturias, Celestino Villamil s/n,
19
20 33006 Oviedo, Spain.

21
22
23
24
25
26
27 (*)Corresponding authors:

28
29
30 Ana Coto-Montes

31
32
33 Department of Morphology and Cellular Biology, Cellular Biology Area, Faculty of
34
35 Medicine, University of Oviedo, Julián Clavería s/n, 33006, Oviedo, Spain.

36
37 acoto@uniovi.es

38
39 Marina García Macia

40
41
42 Department of Morphology and Cellular Biology, Cellular Biology Area, Faculty of
43
44 Medicine, University of Oviedo, Julián Clavería s/n, 33006, Oviedo, Spain.

45
46
47 marinagarciamacia@gmail.com

48
49 Phone: +34-985102779, Fax: +34-985103618

1
2 **Running title:** Melatonin effects on lipophagy in HG.
3
4
5
6
7
8
9

10
11 **Keywords:** lypolysis, lipophagy, melatonin, estrous cycle, oxidative stress, sexual
12 hormones.
13
14
15

16 Text figures: 6.
17
18
19

20 Contract grant sponsor: Ministry of Science and Innovation
21
22

23 Contract grant number: BFU2010-20919
24
25

26 Contract grant sponsor: Ministry of Science and Innovation, PFIS fellow
27
28

29 Contract grant number: FI10/00065
30
31

32 Contract grant sponsor: FICYT pre-doctoral fellow from the Principado de Asturias
33 government.
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

ABSTRACT

The Syrian hamster Harderian gland (HG) exhibits important changes during the estrous cycle. The estrus phase showed the highest porphyrin production and subsequent high oxidative stress, as well as the highest proteolytic activity, mediated by both the ubiquitin-proteasome system and autophagy. This phase also shows morphological changes such as a significant increase in Type II cells over the diestrus phase. The aim of this study was to identify the main processes behind these differences and their modulator. In the present study, we observed that the estrus phase was characterized by NF- κ B activation, along with an increase in p62 expression, which, in turn, was associated with mitochondrial degradation via mitophagy. NF- κ B activation also appears to lead to lipolytic processes, including a reduction in perilipin expression. Diestrus phase, as a retrieval stage, showed a restoration of mitochondrial homeostasis, activation of Nfr2, a transcription factor that stimulates the transcription of antioxidant enzymes, and, consequently, a reduction in oxidative stress. Regarding these variations in redox-sensitive transcription factors, oxidative stress seems to be the key point in the processes that occur during the estrous cycle. Therefore, melatonin, as the main natural antioxidant molecule and a regulator of circadian and stationary rhythms, could be behind these processes, mainly via its membranal and nuclear receptors. Indeed, results showed that melatonin is able to significantly modulate these mechanisms because both receptors showed increased expression in the diestrus phase, leading to decreases in pro-inflammatory mediators and enhanced Nrf2 expression. Consequently, autophagy was blocked, and porphyrin release was reduced.

1. INTRODUCTION

The Syrian hamster Harderian gland (HG) is a tubule-alveolar orbital gland that secretes lipids favoring lubrication of the cornea (Sakai, 1981). However, other potential functions including the production of pheromones (Payne et al., 1979), functions related to the pineal-gonadal axis (Hoffman et al., 1985), and synthesis of indolamines (Menendez-Pelaez et al., 1993) have been studied in this gland. HG exhibits marked sexual differences in relation to cell type and porphyrin production. In particular, the concentration of porphyrins is the determining factor that induces two levels of physiological oxidative stress in this gland: mild oxidative stress in the male HG, and extremely elevated oxidative stress in the female gland (Coto-Montes et al., 2001a; Coto-Montes et al., 2001b). Regarding cell type, female glands possesses a single secretory cell type (Type I cells), which is characterized by small lipid droplets, while the male HG contains two secretory cell types, Type I cells (similar but not identical to those of females) and Type II cells, which are filled with large lipid vacuoles and have a swollen appearance.

In previous studies, we have demonstrated alterations of female gland activity during the estrous cycle (Garcia-Macia et al., 2013). Interestingly, the estrus phase presents the highest porphyrin-production activity, which has been associated with a prominent oxidative damage to proteins, together with a lower total antioxidant activity, compared to that found in the diestrus phase (Garcia-Macia et al., 2013). Consistently, morphological changes were also observed throughout the estrous cycle, with Type II cells increased during the estrus phase (Garcia-Macia et al., 2013). Notably, proteolytic activity, such as that of the ubiquitin-proteasome system as well as autophagic machinery, is significantly elevated in the estrus phase (Garcia-Macia et al., 2013). We assumed that the increased autophagy is not merely a consequence of the prevailing oxidative stress of female glands but should also be considered

an active physiological mechanism (Tomas-Zapico et al., 2005b; Vega-Naredo et al., 2009). Thus, autophagic activity would promote the release of porphyrins, which can act as pheromones during the estrus phase, making the HG act as a scent organ (Garcia-Macia et al., 2013). By contrast, the diestrus phase shows a lower porphyrins production causing reduced oxidative stress levels, a decrease in proteolytic activities and a blockage of autophagy due to activation of the mammalian target of rapamycin (mTOR) (Garcia-Macia et al., 2013). Morphological changes associated with the diestrus phase were also observed, including decreased numbers of Type II cells and higher holocrine secretion (Coto-Montes et al., 2013; Garcia-Macia et al., 2013; Vega-Naredo et al., 2009). Thus, a retrieval phase appears to be necessary after the intense activity of the estrus phase.

Large lipid droplets, described as the main characteristic of Type II cells, cannot be inactive cytoplasmic compartments. Along the estrous cycle, oscillations between fatty acid synthesis and lipolysis have been described in fat cells, functioning in cell energy generation or in the maintenance of lipid homeostasis (Hansen et al., 1980). Interestingly, lipolytic enzymes in tears, and consequently lipolytic processes, can contribute to appropriate or inappropriate inflammatory responses (Remington and Nelson, 2002). Secretion of tear lipids from the HG may also have a reproductive role (Garcia-Macia et al., 2013; Payne et al., 1979). Furthermore, a new type of autophagy related to lipid degradation has been recently described, called lipophagy (Singh and Cuervo, 2012). Lysosomal lipolytic activities have been described in several organs (Debeer et al., 1979). However, an objection against this process has often been proposed, which is that the lipolytic enzymes and lipid droplets have different intracellular localizations (Skop et al., 2012). Singh's group has recently revealed evidence supporting a model in which the mobilization of lipid droplets to lysosomes is mediated by the autophagy machinery (Singh et al., 2009). Although lipophagy was first discovered in liver, it has also been observed in several cell types, where it acts as an energy

source with the peculiar capability to provide large amounts of free fatty acids (FFAs) in a short time (Singh and Cuervo, 2012). Lysosomal acid lipase (LAL) has been implicated in the turnover of endogenous lipid stores via lipophagy (Pearson et al., 2014), which makes it an essential lipophagy marker. However, the presence of lipophagy in HG is still unconfirmed, even though lipid droplets are indispensable components of glandular cells.

The pineal melatonin is the endogenous synchronizer of the circadian rhythms in organisms, mainly of those related to the control of seasonal reproductive phenomena (Reiter, 1980). Likewise, melatonin and its metabolites are well-known antioxidants (Negi et al., 2011). Notably, melatonin is able to maintain mitochondrial homeostasis (Coto-Montes et al., 2012). Melatonin also increases the activity of the mitochondrial respiratory complexes I and IV, which result in increased ATP production (Martin et al., 2000). Furthermore, melatonin's beneficial effects are linked to increased activity of mitochondrial antioxidant enzymes (Garcia-Macia et al., 2011). Previous studies showed that melatonin secretion varies with the phase of the estrous cycle (Ozaki et al., 1978) because it is diminished by gonadal steroid hormones (Rato et al., 1999). Moreover, in previous studies developed by our group, coexpression of membranal (MT₁) and nuclear (ROR α) melatonin receptors has been described in the HG (Tomas-Zapico et al., 2005a).

Based on those findings and considering the observed oscillations in autophagy activity as well as Type II cell abundance along the estrous cycle (Garcia-Macia et al., 2013), the aim of this study was to assess the existence of lipophagy in HG and the implications of this process throughout the estrous cycle, as well as how melatonin, as a modulator of stational rhythm, could be the essential key to these variations in processes developing during the estrous cycle.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Animals

Eight-week-old female Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) (Harlan Interfauna Ibérica, Barcelona, Spain) were housed 2 per cage under long days with a 14:10 light:dark cycle (lights on daily from 07:00 to 21:00) at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ (n=8 per experimental condition). Animals received water and a standard pellet diet *ad libitum*. The Oviedo University Local Animal Care and Use Committee approved the experimental protocols. All experiments were carried out according to the Spanish Government Guide and the European Community Guide for Animal Care (Council Directive 86/609/EEC). Female hamsters were monitored daily by vaginal smears to determine their reproductive phase (proestrus, estrus, metestrus, diestrus) according to the method of Orsini (Orsini, 1961), during 3 consecutive cycles. For studying opposite phases, we collected female hamsters during the estrus and diestrus phases because these phases present the highest plasmatic differences in estrogen concentration during the estrous cycle (Lisk, 1985). After determination of the specific estrus phase, hamsters were sacrificed, and the Harderian glands were immediately removed, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until performing of the experiments.

HGs (0.1 g) were homogenized using a Polytron homogenizer at 4°C in 1 ml of lysis buffer (50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl at pH 7.4). The tissue homogenates were then centrifuged for 6 min at 3000 rpm at 4°C . The supernatants were collected and centrifuged again under the same conditions. The protein concentration of the supernatants was measured by the method of Bradford (Bradford, 1976).

2.2 Immunoblotting

Protein samples (100 µg) were prepared in western-blotting sample buffer (65.8 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2.1% SDS, 26.3% (w/v) glycerol, 0.01% Bromophenol Blue). The 12% SDS-polyacrylamide gels were run and analyzed as previously described (Garcia-Macia et al.,

1
2
3 2011; Vega-Naredo et al., 2012; Vega-Naredo et al., 2005). Primary antibodies applied were
4 as follows: nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), superoxide dismutase 2 (SOD2),
5 perilipin (PLIN), retinoid-related orphan receptor alpha (ROR α) and melatonin receptor 1A
6 (MT₁) from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), nuclear factor kappa-B p65
7 subunit (NF- κ B p65) and nuclear factor kappa-B p65 subunit phosphorylated at Serine 536
8 (Phospho-NF- κ B p65 [Ser536]) and sequestosome-1 (SQSTM1/p62) from Cell Signaling
9 Technology (Boston, MA, USA), Lysosomal acid lipase (LAL) antibody from Abcam
10 (Cambridge, UK) and Bcl2/Adenovirus E1B 19 kDa and protein-interacting protein 3-like
11 (BNIP3L/NIX) from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Primary antibodies were mostly
12 diluted 1:1000 in blocking buffer, except for Phospho-NF- κ B p65 (Ser536), which was
13 diluted 1:500, and Nrf2, which was diluted 1:250. Goat anti-human β -actin antibody (Santa
14 Cruz Biotechnology, Inc.) diluted at 1:1000 was always assayed as a loading reference. After
15 washing in TBS-T (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4 and 0.05% Tween-20), the
16 membranes were then incubated with the corresponding horseradish peroxidase-conjugated
17 secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) diluted 1:2500. Binding of antibodies to
18 their antigens was detected using the Western Blotting Luminol Reagent (sc-2048; Santa Cruz
19 Biotechnology, Inc.) according to the manufacturer's protocol. The results were calculated
20 from at least three separate experiments for each antibody and were normalized to actin. Band
21 intensity was quantified using the Quantity One 1D analysis software v. 5.5.1. (Bio-Rad
22 Laboratories Inc., Hercules, CA, USA).

50 2.3 Morphological studies. 51

52 For ultrastructural studies, HGs were treated as previously described (Coto-Montes et
53 al., 1994; Tomas-Zapico et al., 2002a). HGs were lightly fixed by immersion in a solution
54 containing 1.5% glutaraldehyde and 2.5% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH
55
56
57
58
59

1
2
3 7.4). Fixation was continued overnight at 4°C using fresh fixing solutions. Tissues were then
4 postfixed in 1% Osmium (OsO₄) for 2 hours. After dehydration in a graded acetone series,
5 the tissue fragments were embedded in the epoxy resin TAAB 812, and 1 µm semithin
6 sections were stained with toluidine blue. Ultrathin sections were collected on copper grids,
7 stained with uranyl acetate-lead citrate, and examined using a Zeiss EM-109 transmission
8 electron microscope (Zeiss, Oberkochen Germany) operating at 80 kV.
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18

2.4 Mitochondrial functionality

19
20 As an indicator of the mitochondrial population, citrate synthase (CS) activity was
21 determined spectrophotometrically at 412 nm and 30°C, as previously described (Garcia-
22 Macia et al., 2011).
23
24

25 The intracellular ATP content in the HGs was measured with an Adenosine-5'-
26 triphosphate bioluminescent assay kit (FL-AA, Sigma Aldrich Inc.). Bioluminescent
27 luciferase-luciferin reactions provide the basis of simple, rapid, and highly sensitive assays for
28 ATP (Taylor et al., 1998). Samples (100 µL) of tissue homogenates diluted 1:100 were mixed
29 with 100 µL of ATP assay mix dilution buffer FL-AAB (pH 7.8). Light production was then
30 immediately measured by luminescence using a Luminometer Turner Designs TD-20/20
31 (Turner BioSystems Inc., Sunnyvale, CA, USA) (Yen et al., 2007).
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44

3. RESULTS

3.1 Cellular response to oxidative stress

45
46 Nrf2 is an essential transcription factor in the cellular response to oxidative stress
47 (Zhang, 2006). Under basal conditions, Nrf2 levels remain relatively low because it is
48 normally sequestered in the cytosol (Jung et al., 2009). The canonical mechanism of Nrf2
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

activation involves increases in oxidative stress level (Wakabayashi et al., 2010). It has been demonstrated that increased expression of Nrf2 induces the activation of this pathway (Lau et al., 2010). Our study reveals a strong Nrf2 activation in the diestrus phase, due to a higher Nrf2 expression in this phase compared to the estrus phase, and this was evaluated by immunoblotting (Fig. 1A, $p<0.05$).

Nuclear factor-kappa B (NF- κ B) is a transcription factor that also plays a key role in cell responses against oxidative stress (Michiels et al., 2002). We examined its activation state using immunoblot analysis of key proteins in the NF- κ B pathway: The NF- κ B-p65 and phospho-NF- κ B-p65 (Ser536) (phospho-p65). Activation occurs via phosphorylation of NF- κ B-p65 phosphorylation at Ser536, and only the phosphorylated protein has nuclear localization and transcriptional activity (Vega-Naredo et al., 2009). In our results, total amount of p65 did not show significant differences between phases of the estrous cycle of HG (Fig. 1B). However, expression of the phosphorylated p65 was significantly lower in diestrus than estrus phase (Fig. 1B). To characterize the NF- κ B activation, we evaluated the ratio of phospho-p65 respect to total p65 protein and thus confirmed a lower level of phospho-p65/p65 in diestrus compared to estrus (Fig. 1B, $p<0.001$). Thus, our data suggest a lower activation level of the NF- κ B pathway in the diestrus phase.

3.2 Functional mitochondrial status

Mitochondria play an essential role in cell survival (Caballero et al., 2013), but this process generates free radicals that alter the oxidative balance (Leon et al., 2004; Suski et al., 2011). Furthermore, mitochondria play a key role in lipid metabolism (Schatz, 1995). To characterize their functional status, we studied citrate synthase activity, ATP generation, and SOD2 and NIX expression.

Citrate synthase is a mitochondrial matrix enzyme that is used as an indicator of the cellular mitochondrial population (Garcia-Macia et al., 2011). Based on this mitochondrial

marker, the number of mitochondria seems to be higher in diestrus than in estrus (Fig. 2A, p<0.05).

Efficiency of mitochondrial function was studied via ATP levels, which were significantly higher in diestrus respect to estrus phase (Fig. 2B, p<0.001). We also studied the efficiency of the mitochondrial antioxidant defense by assaying the levels of SOD2, well-known mitochondrial antioxidant protein (Macmillan-Crow and Cruthirds, 2001). In our results, western blotting for SOD2 expression showed no differences between these two phases of the estrous cycle in HG (Fig. 2C).

Many recent findings have revealed that there are specific types of autophagy that are able to degrade damaged organelles, including mitochondria (Coto-Montes, 2013; Coto-Montes et al., 2012). This process is called mitophagy (Coto-Montes et al., 2012; Kim et al., 2007; Lemasters, 2005). The mitochondrial protein NIX has been described as an autophagy receptor, mediating the clearance of damaged mitochondria (Novak et al., 2010). NIX expression was lower in diestrus than estrus (Fig. 3A, p<0.01). Furthermore, electron microscopic studies were performed to study the presence of autophagosomes containing mitochondria, which are normally called mitophagosomes (Kim et al., 2007). In our analysis, we were able to find mitophagosomes, as shown in figure 3B with an estrus image (Fig. 3B).

3.3 Lipophagy

The LC3-interacting protein p62 is a key autophagic protein for cell homeostasis by the selective specific degradation of protein aggregates and cytoplasmic bodies (Inami et al., 2011; Lin et al., 2013). Recent studies have described p62 as a key regulator of lipolytic processes (Inami et al., 2011). p62 also mediates the crosstalk between the ubiquitin-proteasome system and autophagy after proteotoxic cellular damage (Su and Wang, 2011). p62 levels were studied in HGs during the estrus cycle. Notably, p62 protein levels were significantly lower during the diestrus phase than those levels found in estrus (Fig. 4A,

1
2 p<0.01). Accordingly, mRNA p62 expression was also lower in diestrus than in estrus (data
3
4 not shown).

5 Furthermore, p62 interacts with TNF- α and NF- κ B through several of its domains
6 (Manley et al., 2013). In fact, this may be an important pathway for the regulation of lipid
7 homeostasis by p62 (Lee et al., 2010; Vega-Naredo et al., 2012). Recently, NF- κ B was linked
8 with Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)-induced lipolysis. NF- κ B activation is important for
9 maintaining this lipolytic response (Laurencikiene et al., 2007), in which perilipin has a major
10 role. Perilipin acts as a protective coating from the natural lipases and is the main regulator of
11 lipid storage. The disappearance of perilipin allows the lipase activity (Miyoshi et al., 2006;
12 Moore et al., 2005). Our results showed a significantly higher perilipin expression level in
13 diestrus (Fig. 4B, p<0.05); likewise, we have shown NF- κ B activation in this phase. Thus, this
14 lipolytic pathway appears to be unblocked in this phase of the estrous cycle.

15 Following this line of thought, decreased perilipin expression was observed in the
16 estrus phase, permitting lipase activity. Classic lipolytic processes were studied by assaying
17 the expression of lysosomal acid lipase (LAL). This lysosomal lipase is involved in the
18 degradation of cholesteryl esters and triglycerides (Anderson et al., 1999). Our data showed
19 opposite results for LAL and perilipin. LAL occurs at lower levels in the diestrus phase than
20 in the estrus phase (Fig. 4C, p<0.05)

21 Interestingly, recent studies suggested a relationship between LAL activity and
22 lipophagy (Skop et al., 2012). Consistently, our results from electron microscopic analysis of
23 HGs during the estrous cycle revealed the presence of lipid droplets inside the
24 autophagosomes. In particular, lipid droplets were mainly caught inside the autophagosomes
25 during the estrus phase, as shown in figure 4D.

26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

3.4 Melatonin receptor expression

The role of melatonin in estrous cycle physiology could be assessed by the expression of melatonin receptors, which have been described in HG (Tomas-Zapico et al., 2005a). MT₁ is a G protein-coupled receptor at the plasma membrane (Reppert et al., 1994), and it is activated by the pineal-synthesized melatonin (Tomas-Zapico et al., 2005a). In our data, western-blotting analyses for MT₁ protein showed a higher level of MT₁ expression in diestrus (Fig. 5, p<0.05). ROR α , a nuclear melatonin receptor, plays an important role in cell protection against oxidative stress (Caballero et al., 2008; Delerive et al., 2001; Novak et al., 2010). Western-blotting analysis for ROR α , again, showed a higher expression of this melatonin receptor in diestrus than estrus (Fig. 5, p<0.05).

Consistent with the mitochondrial markers studied in HG, which indicate more highly efficient mitochondria in diestrus than in estrus, these higher levels of melatonin receptors found in the diestrus phase should be associated with an increased need for antioxidant protection in this phase.

4. DISCUSSION

Syrian hamster HG has an intrinsic plasticity to quickly respond to several internal and external stimuli via both morphological and biochemical changes (Rodriguez-Colunga et al., 1991; Rodriguez-Colunga et al., 1993). We have previously shown important variations in the HG of the female that are dependent on the fluctuations in sex hormones during the estrous cycle (Garcia-Macia et al., 2013). As described above, the highest porphyrin accumulation in the HG was produced during the estrus phase, which caused substantial oxidative damage to proteins due to a lower antioxidant defense (Garcia-Macia et al., 2013). Furthermore, different types of selective proteolysis were increased in the estrus phase of HG, including CMA and macroautophagy (Garcia-Macia et al., 2013). Notably, these autophagic processes were

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
considered to be involved in porphyrin release to the lumen of the cells (Garcia-Macia et al., 2013). In addition, we found that Type II cells, with large lipid droplets, were more abundant in the estrus phase of HG (Garcia-Macia et al., 2013). By contrast, the diestrus phase showed the opposite situation as a retrieval state, characterized by a decrease in porphyrin production that causes, in turn, a decline in oxidative stress (Garcia-Macia et al., 2013). Coupled with a higher observed antioxidant capacity, this phase showed a reduction in protein damage (Garcia-Macia et al., 2013). Interestingly, proteolytic and autophagic activities were also decreased, and the Type II cells almost disappeared (Garcia-Macia et al., 2013). Based on these data, in the present work, we decided to further examine the physiological relevance of these observed differences regarding the oxidative stress level and autophagy activity, mainly the new described autophagy type: lipophagy, during the estrous cycle in the female's HG.

In the HG, melatonin usually appears to be related to protection against oxidative stress because of its antioxidant properties (Tomas-Zapico et al., 2002a; Tomas-Zapico et al., 2003; Tomas-Zapico et al., 2002b; Vega-Naredo et al., 2012). However, we cannot forget the previously described hormonal role of melatonin; our previous works suggested that chronic administration of melatonin induced changes in HG activity and morphology, displaying an interrelation with the gonadal status (Rodriguez-Colunga et al., 1992; Vega-Naredo et al., 2012). Notably, it has also been shown that melatonin treatment can modify the number of Type II cells (Rodriguez-Colunga et al., 1991). However, in female hamsters subjected to a long-term ovariectomy, these changes in Type II cells have not been observed (Rodriguez-Colunga et al., 1991), suggesting that other sexual hormones may be involved in these morphological changes. Interestingly, an anti-estrogenic effect of melatonin has also been reported (Rato et al., 1999). Direct anti-estrogenic actions of melatonin at the cellular level have been proposed in breast cancer cells (Cos et al., 1991; Hill and Blask, 1988). Recent studies have shown that this effect is primarily induced by the membrane-bound melatonin

1
2 receptor MT₁ (Girgert et al., 2009). However, the participation of melatonin nuclear receptors
3 remained unclear (Girgert et al., 2009). Interestingly, the rate of melatonin excretion during
4 the dark period clearly varies synchronously with the vaginal estrous cycle (Ozaki et al.,
5 1978). This pineal indolamine secretion is higher when estrogen secretion is lowest, as in the
6 diestrus phase (Ozaki et al., 1978; Soares et al., 2003). Accordingly, melatonin receptors, both
7 MT₁ and ROR α , are expressed more highly in this phase. Thus, melatonin, via its receptors,
8 reduced pro-inflammatory mediators and alleviated higher oxidative stress levels, as we have
9 shown in the diestrus phase. After the intense activity promoted by the high estrogen levels
10 during the estrus phase, melatonin appears to be responsible for the diestrus phase acting as a
11 retrieval stage in HG. Further, this stage is developed by the activation of its own receptors as
12 well as, perhaps, by the induction of another antioxidant. Previous works have corroborated
13 that melatonin treatment induced the activation of Nrf2 and enhanced its nuclear translocation
14 and its subsequent antioxidant response (ARE) binding (Aparicio-Soto et al., 2014; Jung et
15 al., 2009). In the diestrus phase, we observed higher Nrf2 expression, which corroborates
16 Nrf2 activation. Thus, the melatonin antioxidant effect seems to be potentiated by Nrf2
17 activation in this phase along with minimal estrogen levels.

18
19 Based on the description of processes triggered during the estrous cycle, in the present
20 work, females' HGs showed increased p62 levels in the estrus phase. In addition, we have
21 previously showed significant autophagic processes in HGs during estrus phase (Garcia-
22 Macia et al., 2013). In particular, we observed increases in macroautophagic processes as well
23 as in chaperone-mediated autophagy (CMA) (Garcia-Macia et al., 2013). These processes of
24 selective autophagy should be considered associated with the high p62 levels found in
25 females' HGs at the estrus phase. Autophagy and other proteolytic processes such as
26 proteasome activity have been previously demonstrated to release porphyrins from the
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2 female's HG during the estrus phase, possibly to act as pheromones (Garcia-Macia et al.,
3
4 2013).
5

6 In addition, p62 plays a particularly important role in the selective removal of
7 damaged and dysfunctional organelles, including mitochondria (Ding et al., 2010; Lemasters,
8 2005; Novak et al., 2010) and peroxisomes (Kim et al., 2008). Recently, it has been described
9 that the mitochondrial localization of p62 may influence mitochondrial morphology and
10 dynamics, including the mitochondrial membrane potential (Seibenhener et al., 2013). Thus,
11 p62 protein is associated with both mitochondrial integrity and degradation (Boldrini et al.,
12 2004; Ding et al., 2010). Regarding mitochondrial clearance, the NIX protein, which is
13 localized at the mitochondrial outer membrane, has been defined as the mitochondrial
14 receptor for mitophagy (Novak et al., 2010; Sandoval et al., 2008). Notably, our present result
15 showed a higher NIX expression in the female HG at the estrus phase than in the diestrus
16 phase. Additionally, we observed the presence of mitophagosomes (Fig. 3B) (mitochondria
17 localized inside on autophagosome for their selective autophagy), mainly in the estrus phase.
18 These data suggest the activation of mitophagic processes in the female's HG during this
19 phase. Interestingly, mitochondrial depolarization and the subsequent mitochondrial ROS
20 generation have been previously linked to the ability of NIX to directly activate the autophagy
21 machinery via mTOR inhibition (Ding et al., 2010). Consistent with these previous markers
22 and data, mitochondrial energetic functions must be altered in female HG at the estrus phase.
23 In our data, energetic levels, as assayed by ATP concentration, were significantly lower in the
24 HGs during the estrus phase. Therefore, increased levels of the mitophagic protein such as
25 p62 and NIX, formation of mitophagosomes, and impaired mitochondrial functionality
26 suggest an intense mitochondrial removal by selective autophagy in the female HG at the
27 estrus phase.
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 p62 has a ZZ zinc finger and TB domains, which are closely associated with NF- κ B
4 activation (Manley et al., 2013). The transcription factor NF- κ B is a pro-inflammatory factor
5 normally activated by oxidative stress (Jung et al., 2009). In particular, the ZZ zinc finger
6 domain of p62 is responsible for binding to the receptor interacting protein (RIP), which is a
7 serine/threonine kinase that regulates NF- κ B activation by TNF- α (Manley et al., 2013). The
8 TB domain also leads to activation of the NF- κ B pathway, via its interaction with TRAF-6
9 (Manley et al., 2013). p62 also regulates NF- κ B activation through its PB1 domain; this
10 domain interacts with the extracellular signal-regulated kinase (ERK), which plays a crucial
11 role in lipid homeostasis (Lee et al., 2010). Interestingly, female HG showed activation of
12 both p62 and NF- κ B, mainly during the estrus phase. In our previous studies, we described
13 elevated levels of oxidative stress in HGs during the estrus phase (Garcia-Macia et al., 2013).
14 Thus, activation of NF- κ B may also favor a pro-inflammatory profile in HG at the estrus
15 phase. Notably, it has been observed that inflammatory cytokines such as TNF- α can be
16 related to the activation of lipolytic processes (Laurencikiene et al., 2007; Ryden et al., 2004).
17 In both rodent and human cells, TNF- α promotes the phosphorylation (Zhang et al., 2002) and
18 downregulation of PLIN (Ryden et al., 2004; Souza et al., 1998), which would favor the
19 activation of lipolytic processes by hormone-sensitive lipases (Londos et al., 1999; Miyoshi
20 et al., 2006; Moore et al., 2005). The lipolytic activity induced by TNF- α requires NF- κ B
21 activation (Laurencikiene et al., 2007). Interestingly, the female's HG in estrus phase showed
22 lower PLIN expression. This result, together with the NF- κ B activation, appears to indicate
23 the activation of lipolytic processes in the estrus phase. Autophagy and lipolytic processes, as
24 described in the female's HG in the estrus phase, could be associated with the degradation of
25 the large lipid droplet in the Type II cells, which is characteristic of this phase. Notably, our
26 electron microscopic studies have revealed the presence of lipid droplets within the
27 autophagosomes. Recent studies consider lipid droplets to be dynamic organelles (Singh and
28

Cuervo, 2012). There is now evidence that the autophagic system directly contributes to the mobilization of lipids from lipid droplets to lysosomes, as a type of selective process actually known as lipophagy (Singh and Cuervo, 2012). Thus, our data are able to relate lipolytic and proteolytic activities with cellular changes usually observed in the HG during the estrous cycle and, until now, inexplicable. Thus, these described degradative processes may contribute to the disappearance of Type II cells that in fact occurs in the female HG at the diestrus phase.

As we previously described, autophagy is associated with lipid secretion by holocrine processes, which contribute to the reproductive role of HG at the estrus phase (Garcia-Macia et al., 2013; Vega-Naredo and Coto-Montes, 2009). Moreover, the female HG at the diestrus phase is characterized by a completely opposite situation from that described in the estrus phase. At the diestrus phase, the p62 expression is diminished in HG, together with a decrease in NF- κ B activation. Additionally, selective autophagy was found to be diminished in the diestrus phase [7, this work]. Accordingly, mitochondrial efficiency was significantly restored at this phase, as demonstrated by increased citrate synthase activity and ATP production and, thus, increased mitochondrial metabolism.

Our group has previously described the coexpression of melatonin receptors, MT₁ and ROR α , in the HG (Tomas-Zapico et al., 2005a). Both receptors are involved in the antioxidant effects of melatonin (Kharwar and Haldar, 2012; Mollaoglu et al., 2007; Ortega-Gutierrez et al., 2002). ROR α has a negative transcriptional effect on the antioxidant enzymes superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase by blocking the transcriptional activity of NF- κ B (Tomas-Zapico et al., 2005a). Notably, melatonin can temper ROR α activity through its interaction with calmodulin or its binding to MT₁ receptors, which may favor the transcription of antioxidant genes (Tomas-Zapico and Coto-Montes, 2005). Interestingly, recent studies have shown that melatonin was able to activate Nrf2 signaling and simultaneously block the

NF- κ B pathway under oxidative stress conditions (Negi et al., 2011). As we described above, in addition to increased levels of melatonin receptors, we found elevated levels of Nrf2 and decreased levels of NF- κ B factor in the female HG at the diestrus phase.

In conclusion, as detailed in figure 6, HG in the estrous cycle is characterized by important variations in estrogen levels and oxidative stress, and melatonin may be its primary moderator. ROR α expression is reduced in the estrus phase and entails the activation of NF- κ B, which induces not only macroautophagy and CMA (Garcia-Macia et al., 2013) but also the increase of p62 expression associated with a clear decrease in mitochondrial activity, leading to its degradation via mitophagy. Likewise, activation of NF- κ B may also lead to lipolytic processes, as suggested by the decrease in perilipin and the degradation of large lipid droplets in Type II cells. All of these degradation processes require a high lysosomal effort, as shown by the increases in LAL expression. ROR α and MT₁ are recovered during the diestrus phase, when the gland returns to a rest period.

Oxidative stress seems to be the key to these observed processes developed along the estrous cycle, with melatonin as the modulator. Melatonin, via both membranal and nuclear receptors, reduces pro-inflammatory mediators and enhances the expression of Nrf-2 in diestrus phase. Consequently, autophagy is blocked and porphyrin release is reduced. Later, during the estrus phase, oxidative stress is increased, triggering all types of autophagy, accompanied by lipolysis and increased porphyrin production.

Acknowledgments

We are members of the INPROTEOLYS and INEUROPA network. This work was supported by: FISS-06-RD06/0013/0011 and FISS-13-RD12/0043/0030; BFU2010-0919, FISS (ISCII) PI13/02741 and FEDER funds. M.G.-M. acknowledges a predoctoral fellowship from the Ministerio de Economía y Competitividad. B.de L-D and D. de G-C are FICYT predoctoral fellow from the Gobierno del Principado de Asturias. Y. P has a Universidad de Oviedo pre-doctoral fellow. Financial support from the University of Oviedo is also acknowledged.

For Peer Review

1
2
3
4
5
REFERENCES

- 6 Anderson RA, Bryson GM, Parks JS. 1999. Lysosomal acid lipase mutations that determine phenotype
7 in Wolman and cholesterol ester storage disease. *Molecular genetics and metabolism*
8 68(3):333-345.
- 9 Aparicio-Soto M, Alarcon-de-la-Lastra C, Cardeno A, Sanchez-Fidalgo S, Sanchez-Hidalgo M. 2014.
10 Melatonin modulates microsomal PGE synthase 1 and NF-E2-related factor-2-regulated
11 antioxidant enzyme expression in LPS-induced murine peritoneal macrophages. *British journal of pharmacology* 171(1):134-144.
- 12 Boldrini R, Devito R, Biselli R, Filocamo M, Bosman C. 2004. Wolman disease and cholesteryl ester
13 storage disease diagnosed by histological and ultrastructural examination of intestinal and
14 liver biopsy. *Pathology, research and practice* 200(3):231-240.
- 15 Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of
16 protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72:248-254.
- 17 Caballero B, Veenman L, Gavish M. 2013. Role of mitochondrial translocator protein (18 kDa) on
18 mitochondrial- related cell death processes. *Recent patents on endocrine, metabolic &*
19 *immune drug discovery* 7(2):86-101.
- 20 Caballero B, Vega-Naredo I, Sierra V, Huidobro-Fernandez C, Soria-Valles C, De Gonzalo-Calvo D,
21 Tolivia D, Gutierrez-Cuesta J, Pallas M, Camins A, Rodriguez-Colunga MJ, Coto-Montes A.
22 2008. Favorable effects of a prolonged treatment with melatonin on the level of oxidative
23 damage and neurodegeneration in senescence-accelerated mice. *J Pineal Res* 45(3):302-311.
- 24 Cos S, Blask DE, Lemus-Wilson A, Hill AB. 1991. Effects of melatonin on the cell cycle kinetics and
25 "estrogen-rescue" of MCF-7 human breast cancer cells in culture. *J Pineal Res* 10(1):36-42.
- 26 Coto-Montes A. 2013. Editorial: Mitochondrion: an organelle more and more implication in new
27 processes. *Recent patents on endocrine, metabolic & immune drug discovery* 7(2):83-85.
- 28 Coto-Montes A, Boga JA, Rosales-Corral S, Fuentes-Broto L, Tan DX, Reiter RJ. 2012. Role of
29 melatonin in the regulation of autophagy and mitophagy: a review. *Molecular and cellular
30 endocrinology* 361(1-2):12-23.
- 31 Coto-Montes A, Boga JA, Tomas-Zapico C, Rodriguez-Colunga MJ, Martinez-Fraga J, Tolivia-Cadrecha
32 D, Menendez G, Hardeland R, Tolivia D. 2001a. Physiological oxidative stress model: Syrian
33 hamster Harderian gland-sex differences in antioxidant enzymes. *Free radical biology &
34 medicine* 30(7):785-792.
- 35 Coto-Montes A, Boga JA, Tomas-Zapico C, Rodriguez-Colunga MJ, Martinez-Fraga J, Tolivia-Cadrecha
36 D, Menendez G, Hardeland R, Tolivia D. 2001b. Porphyric enzymes in hamster Harderian
37 gland, a model of damage by porphyrins and their precursors. A chronobiological study on
38 the role of sex differences. *Chem Biol Interact* 134(2):135-149.
- 39 Coto-Montes A, Garcia-Macia M, Caballero B, Sierra V, Rodriguez-Colunga MJ, Reiter RJ, Vega-Naredo
40 I. 2013. Analysis of constant tissue remodeling in Syrian hamster Harderian gland: intra-
41 tubular and inter-tubular syncytial masses. *Journal of anatomy* 222(5):558-569.
- 42 Coto-Montes A, Masson-Pevet M, Pevet P, Moller M. 1994. The presence of opioidergic pinealocytes
43 in the pineal gland of the European hamster (*Cricetus cricetus*): an immunocytochemical
44 study. *Cell and tissue research* 278(3):483-491.
- 45 Debeer LJ, Thomas J, De Schepper PJ, Mannaerts GP. 1979. Lysosomal triacylglycerol lipase and
46 lipolysis in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem* 254(18):8841-8846.
- 47 Delerive P, Monte D, Dubois G, Trottein F, Fruchart-Najib J, Mariani J, Fruchart JC, Staels B. 2001. The
48 orphan nuclear receptor ROR alpha is a negative regulator of the inflammatory response.
49 *EMBO Rep* 2(1):42-48.
- 50 Ding WX, Ni HM, Li M, Liao Y, Chen X, Stoltz DB, Dorn GW, 2nd, Yin XM. 2010. Nix is critical to two
51 distinct phases of mitophagy, reactive oxygen species-mediated autophagy induction and
52 Parkin-ubiquitin-p62-mediated mitochondrial priming. *J Biol Chem* 285(36):27879-27890.
- 53
- 54
- 55
- 56
- 57
- 58
- 59
- 60

- Garcia-Macia M, Rubio-Gonzalez A, de Luxan-Delgado B, Potes Y, Rodriguez-Gonzalez S, de Gonzalo-Calvo D, Boga JA, Coto-Montes A. 2013. Autophagic and proteolytic processes in the Harderian gland are modulated during the estrous cycle. *Histochemistry and cell biology*.
- Garcia-Macia M, Vega-Naredo I, De Gonzalo-Calvo D, Rodriguez-Gonzalez SM, Camello PJ, Camello-Almaraz C, Martin-Cano FE, Rodriguez-Colunga MJ, Pozo MJ, Coto-Montes AM. 2011. Melatonin induces neural SOD2 expression independent of the NF-kappaB pathway and improves the mitochondrial population and function in old mice. *J Pineal Res* 50(1):54-63.
- Girgert R, Hanf V, Emons G, Grundker C. 2009. Membrane-bound melatonin receptor MT1 downregulates estrogen responsive genes in breast cancer cells. *J Pineal Res* 47(1):23-31.
- Hansen FM, Fahmy N, Nielsen JH. 1980. The influence of sexual hormones on lipogenesis and lipolysis in rat fat cells. *Acta Endocrinol (Copenh)* 95(4):566-570.
- Hill SM, Blask DE. 1988. Effects of the pineal hormone melatonin on the proliferation and morphological characteristics of human breast cancer cells (MCF-7) in culture. *Cancer Res* 48(21):6121-6126.
- Hoffman RA, Johnson LB, Reiter RJ. 1985. Harderian glands of golden hamsters: temporal and sexual differences in immunoreactive melatonin. *J Pineal Res* 2(2):161-168.
- Inami Y, Yamashina S, Izumi K, Ueno T, Tanida I, Ikejima K, Watanabe S. 2011. Hepatic steatosis inhibits autophagic proteolysis via impairment of autophagosomal acidification and cathepsin expression. *Biochemical and biophysical research communications* 412(4):618-625.
- Jung KH, Hong SW, Zheng HM, Lee DH, Hong SS. 2009. Melatonin downregulates nuclear erythroid 2-related factor 2 and nuclear factor-kappaB during prevention of oxidative liver injury in a dimethylnitrosamine model. *J Pineal Res* 47(2):173-183.
- Kharwar RK, Haldar C. 2012. Daily variation in antioxidant enzymes and lipid peroxidation in lungs of a tropical bird *Perdicula asiatica*: role of melatonin and nuclear receptor RORalpha. *Comparative biochemistry and physiology Part A, Molecular & integrative physiology* 162(4):296-302.
- Kim I, Rodriguez-Enriquez S, Lemasters JJ. 2007. Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Archives of biochemistry and biophysics* 462(2):245-253.
- Kim PK, Hailey DW, Mullen RT, Lippincott-Schwartz J. 2008. Ubiquitin signals autophagic degradation of cytosolic proteins and peroxisomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(52):20567-20574.
- Lau A, Wang XJ, Zhao F, Villeneuve NF, Wu T, Jiang T, Sun Z, White E, Zhang DD. 2010. A noncanonical mechanism of Nrf2 activation by autophagy deficiency: direct interaction between Keap1 and p62. *Mol Cell Biol* 30(13):3275-3285.
- Laurencikiene J, van Harmelen V, Arvidsson Nordstrom E, Dicker A, Blomqvist L, Naslund E, Langin D, Arner P, Ryden M. 2007. NF-kappaB is important for TNF-alpha-induced lipolysis in human adipocytes. *J Lipid Res* 48(5):1069-1077.
- Lee SJ, Pfluger PT, Kim JY, Nogueiras R, Duran A, Pages G, Pouyssegur J, Tschop MH, Diaz-Meco MT, Moscat J. 2010. A functional role for the p62-ERK1 axis in the control of energy homeostasis and adipogenesis. *EMBO Rep* 11(3):226-232.
- Lemasters JJ. 2005. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation research* 8(1):3-5.
- Leon J, Acuna-Castroviejo D, Sainz RM, Mayo JC, Tan DX, Reiter RJ. 2004. Melatonin and mitochondrial function. *Life Sci* 75(7):765-790.
- Lin X, Li S, Zhao Y, Ma X, Zhang K, He X, Wang Z. 2013. Interaction Domains of p62: A Bridge Between p62 and Selective Autophagy. *DNA and cell biology*.
- Lisk RD. 1985. The estrous cycle. The hamster: reproduction and behavior: New York: Plenum Press. p 23-51.
- Londos C, Brasaemle DL, Schultz CJ, Segrest JP, Kimmel AR. 1999. Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells. *Seminars in cell & developmental biology* 10(1):51-58.
- Macmillan-Crow LA, Cruthirds DL. 2001. Invited review: manganese superoxide dismutase in disease. *Free radical research* 34(4):325-336.

- 1
2
3 Manley S, Williams JA, Ding WX. 2013. Role of p62/SQSTM1 in liver physiology and pathogenesis. *Exp
4 Biol Med (Maywood)* 238(5):525-538.
- 5 Martin M, Macias M, Escames G, Reiter RJ, Agapito MT, Ortiz GG, Acuna-Castroviejo D. 2000.
6 Melatonin-induced increased activity of the respiratory chain complexes I and IV can prevent
7 mitochondrial damage induced by ruthenium red in vivo. *J Pineal Res* 28(4):242-248.
- 8 Menendez-Pelaez A, Lopez-Gonzalez MA, Guerrero JM. 1993. Melatonin binding sites in the
9 Harderian gland of Syrian hamsters: sexual differences and effect of castration. *J Pineal Res*
10 14(1):34-38.
- 11 Michiels C, Minet E, Mottet D, Raes M. 2002. Regulation of gene expression by oxygen: NF-kappaB
12 and HIF-1, two extremes. *Free radical biology & medicine* 33(9):1231-1242.
- 13 Miyoshi H, Souza SC, Zhang HH, Strissel KJ, Christoffolete MA, Kovsan J, Rudich A, Kraemer FB, Bianco
14 AC, Obin MS, Greenberg AS. 2006. Perilipin promotes hormone-sensitive lipase-mediated
15 adipocyte lipolysis via phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. *J Biol
16 Chem* 281(23):15837-15844.
- 17 Mollaoglu H, Topal T, Ozler M, Uysal B, Reiter RJ, Korkmaz A, Oter S. 2007. Antioxidant effects of
18 melatonin in rats during chronic exposure to hyperbaric oxygen. *J Pineal Res* 42(1):50-54.
- 19 Moore HP, Silver RB, Mottillo EP, Bernlohr DA, Granneman JG. 2005. Perilipin targets a novel pool of
20 lipid droplets for lipolytic attack by hormone-sensitive lipase. *J Biol Chem* 280(52):43109-
21 43120.
- 22 Negi G, Kumar A, Sharma SS. 2011. Melatonin modulates neuroinflammation and oxidative stress in
23 experimental diabetic neuropathy: effects on NF-kappaB and Nrf2 cascades. *J Pineal Res*
24 50(2):124-131.
- 25 Novak I, Kirkin V, McEwan DG, Zhang J, Wild P, Rozenknop A, Rogov V, Lohr F, Popovic D, Occhipinti
26 A, Reichert AS, Terzic J, Dotsch V, Ney PA, Dikic I. 2010. Nix is a selective autophagy receptor
27 for mitochondrial clearance. *EMBO Rep* 11(1):45-51.
- 28 Orsini MW. 1961. The external vaginal phenomena characterizing the stages of the estrous cycle,
29 pregnancy, pseudopregnancy, lactation, and the anestrous hamster, *Mesocricetus auratus*
30 waterhouse. *Proceedings of the animal care panel* 11(4):193-206.
- 31 Ortega-Gutierrez S, Garcia JJ, Martinez-Ballarin E, Reiter RJ, Millan-Plano S, Robinson M, Acuna-
32 Castroviejo D. 2002. Melatonin improves deferoxamine antioxidant activity in protecting
33 against lipid peroxidation caused by hydrogen peroxide in rat brain homogenates.
34 Neuroscience letters 323(1):55-59.
- 35 Ozaki Y, Wurtman RJ, Alonso R, Lynch HJ. 1978. Melatonin secretion decreases during the proestrous
36 stage of the rat estrous cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(1):531-534.
- 37 Payne AP, McGadey J, Moore MH, Thompson GG. 1979. Changes in Harderian gland activity in the
38 female golden hamster during the oestrous cycle, pregnancy and lactation. *The Biochemical
39 journal* 178(3):597-604.
- 40 Pearson GL, Mellett N, Chu KY, Cantley J, Davenport A, Bourbon P, Cosner CC, Helquist P, Meikle PJ,
41 Biden TJ. 2014. Lysosomal acid lipase and lipophagy are constitutive negative regulators of
42 glucose-stimulated insulin secretion from pancreatic beta cells. *Diabetologia* 57(1):129-139.
- 43 Rato AG, Pedrero JG, Martinez MA, del Rio B, Lazo PS, Ramos S. 1999. Melatonin blocks the
44 activation of estrogen receptor for DNA binding. *FASEB J* 13(8):857-868.
- 45 Reiter RJ. 1980. The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocr Rev*
46 1(2):109-131.
- 47 Remington SG, Nelson JD. 2002. mRNA encoding a new lipolytic enzyme expressed in rabbit lacrimal
48 glands. *Investigative ophthalmology & visual science* 43(12):3617-3624.
- 49 Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T. 1994. Cloning and characterization of a mammalian melatonin
50 receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 13(5):1177-1185.
- 51 Rodriguez-Colunga MJ, Fernandez C, Antolin I, Rodriguez C, Tolivia D, Menendez-Pelaez A. 1991.
52 Chronic administration of melatonin induces changes in porphyrins and in the histology of
53 male and female hamster harderian gland: interrelation with the gonadal status. *J Pineal Res*
54 11(1):42-48.

- Rodriguez-Colunga MJ, Fernandez C, Rodriguez C, Tolivia D, Menendez-Pelaez A. 1992. Female Syrian hamster Harderian gland: development and effects of high environmental temperature and melatonin injections on histology and porphyrin deposits. *Anat Rec* 232(2):293-300.
- Rodriguez-Colunga MJ, Rodriguez C, Antolin I, Urias H, Tolivia D, Vaughan MK, Menendez-Pelaez A. 1993. Development and androgen regulation of the secretory cell types of the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) Harderian gland. *Cell and tissue research* 274(1):189-197.
- Ryden M, Arvidsson E, Blomqvist L, Perbeck L, Dicker A, Arner P. 2004. Targets for TNF-alpha-induced lipolysis in human adipocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 318(1):168-175.
- Sakai T. 1981. The mammalian Harderian gland: morphology, biochemistry, function and phylogeny. *Arch Histol Jpn* 44(4):299-333.
- Sandoval H, Thiagarajan P, Dasgupta SK, Schumacher A, Prchal JT, Chen M, Wang J. 2008. Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells. *Nature* 454(7201):232-235.
- Schatz G. 1995. Mitochondria: beyond oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 1271(1):123-126.
- Seibenhener ML, Du Y, Diaz-Meco MT, Moscat J, Wooten MC, Wooten MW. 2013. A role for sequestosome 1/p62 in mitochondrial dynamics, import and genome integrity. *Biochim Biophys Acta* 1833(3):452-459.
- Singh R, Cuervo AM. 2012. Lipophagy: connecting autophagy and lipid metabolism. *Int J Cell Biol* 2012:282041.
- Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, Tanaka K, Cuervo AM, Czaja MJ. 2009. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 458(7242):1131-1135.
- Skop V, Cahova M, Papackova Z, Palenickova E, Dankova H, Baranowski M, Zabielski P, Zdychova J, Zidkova J, Kazdova L. 2012. Autophagy-lysosomal pathway is involved in lipid degradation in rat liver. *Physiol Res* 61(3):287-297.
- Soares JM, Jr., Masana MI, Ersahin C, Dubocovich ML. 2003. Functional melatonin receptors in rat ovaries at various stages of the estrous cycle. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 306(2):694-702.
- Souza SC, de Vargas LM, Yamamoto MT, Lien P, Franciosa MD, Moss LG, Greenberg AS. 1998. Overexpression of perilipin A and B blocks the ability of tumor necrosis factor alpha to increase lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 273(38):24665-24669.
- Su H, Wang X. 2011. p62 Stages an interplay between the ubiquitin-proteasome system and autophagy in the heart of defense against proteotoxic stress. *Trends in cardiovascular medicine* 21(8):224-228.
- Suski J, Lebiedzinska M, Machado NG, Oliveira PJ, Pinton P, Duszynski J, Wieckowski MR. 2011. Mitochondrial tolerance to drugs and toxic agents in ageing and disease. *Current drug targets* 12(6):827-849.
- Taylor AL, Kudlow BA, Marrs KL, Gruenert DC, Guggino WB, Schwiebert EM. 1998. Bioluminescence detection of ATP release mechanisms in epithelia. *The American journal of physiology* 275(5 Pt 1):C1391-1406.
- Tomas-Zapico C, Antonio Boga J, Caballero B, Vega-Naredo I, Sierra V, Alvarez-Garcia O, Tolivia D, Josefa Rodriguez-Colunga M, Coto-Montes A. 2005a. Coexpression of MT1 and RORalpha1 melatonin receptors in the Syrian hamster Harderian gland. *J Pineal Res* 39(1):21-26.
- Tomas-Zapico C, Caballero B, Sierra V, Vega-Naredo I, Alvarez-Garcia O, Tolivia D, Rodriguez-Colunga MJ, Coto-Montes A. 2005b. Survival mechanisms in a physiological oxidative stress model. *Faseb J* 19(14):2066-2068.
- Tomas-Zapico C, Coto-Montes A. 2005. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. *J Pineal Res* 39(2):99-104.
- Tomas-Zapico C, Coto-Montes A, Martinez-Fraga J, Rodriguez-Colunga MJ, Hardeland R, Tolivia D. 2002a. Effects of delta-aminolevulinic acid and melatonin in the harderian gland of female Syrian hamsters. *Free radical biology & medicine* 32(11):1197-1204.

- 1
2
3 Tomas-Zapico C, Coto-Montes A, Martinez-Fraga J, Rodriguez-Colunga MJ, Tolivia D. 2003. Effects of
4 continuous light exposure on antioxidant enzymes, porphyrin enzymes and cellular damage
5 in the Harderian gland of the Syrian hamster. *J Pineal Res* 34(1):60-68.
6 Tomas-Zapico C, Martinez-Fraga J, Rodriguez-Colunga MJ, Tolivia D, Hardeland R, Coto-Montes A.
7 2002b. Melatonin protects against delta-aminolevulinic acid-induced oxidative damage in
8 male Syrian hamster Harderian glands. *The international journal of biochemistry & cell
9 biology* 34(5):544-553.
10 Vega-Naredo I, Caballero B, Sierra V, Garcia-Macia M, de Gonzalo-Calvo D, Oliveira PJ, Rodriguez-
11 Colunga MJ, Coto-Montes A. 2012. Melatonin modulates autophagy through a redox-
12 mediated action in female Syrian hamster Harderian gland controlling cell types and gland
13 activity. *J Pineal Res* 52(1):80-92.
14 Vega-Naredo I, Caballero B, Sierra V, Huidobro-Fernandez C, de Gonzalo-Calvo D, Garcia-Macia M,
15 Tolivia D, Rodriguez-Colunga MJ, Coto-Montes A. 2009. Sexual dimorphism of autophagy in
16 Syrian hamster Harderian gland culminates in a holocrine secretion in female glands.
17 *Autophagy* 5(7):1004-1017.
18 Vega-Naredo I, Coto-Montes A. 2009. Physiological autophagy in the Syrian hamster Harderian gland.
19 *Methods in enzymology* 452:457-476.
20 Vega-Naredo I, Poeggeler B, Sierra-Sanchez V, Caballero B, Tomas-Zapico C, Alvarez-Garcia O, Tolivia
21 D, Rodriguez-Colunga MJ, Coto-Montes A. 2005. Melatonin neutralizes neurotoxicity induced
22 by quinolinic acid in brain tissue culture. *J Pineal Res* 39(3):266-275.
23 Wakabayashi N, Slocum SL, Skoko JJ, Shin S, Kensler TW. 2010. When NRF2 talks, who's listening?
24 *Antioxid Redox Signal* 13(11):1649-1663.
25 Yen CC, Lu FJ, Huang CF, Chen WK, Liu SH, Lin-Shiau SY. 2007. The diabetogenic effects of the
26 combination of humic acid and arsenic: in vitro and in vivo studies. *Toxicology letters*
27 172(3):91-105.
28 Zhang DD. 2006. Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *Drug metabolism reviews*
29 38(4):769-789.
30 Zhang HH, Halbleib M, Ahmad F, Manganiello VC, Greenberg AS. 2002. Tumor necrosis factor-alpha
31 stimulates lipolysis in differentiated human adipocytes through activation of extracellular
32 signal-related kinase and elevation of intracellular cAMP. *Diabetes* 51(10):2929-2935.
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

LEGENDS

Fig. 1 Cellular response to oxidative stress. (A) Nrf2 protein band intensity and (B) phospho-p65 and p65 protein band intensities in the different fractions of the Harderian glands from the estrus and diestrus phases. The bar graph of Nrf2 (A) quantifies the optical densities of the western blot bands normalized to β -actin and the phospho-p65/ p65 ratio as NF- κ B activation marker (B). Similar results were obtained from three separate experiments. Data are expressed as the means \pm SEM and are calculated from at least three separate experiments. *: ($p < 0.05$), ***: ($p < 0.001$).

Fig. 2 Mitochondrial status. (A) Comparison of Citrate Synthase (CS) activity, (B) ATP intracellular content and (C) SOD2 protein band intensities in the different fractions of the Harderian glands from the estrus and diestrus phases. The CS results are expressed in nmoles/min*mg protein. The ATP content results are expressed as ATP moles/g protein. The bar graph of SOD2 (C) quantifies the optical densities of the western blot bands normalized to β -actin. Data are expressed as the means \pm SEM and are calculated from at least three separate experiments, with each experiment performed in triplicate. *: ($p < 0.05$) ***: ($p < 0.001$).

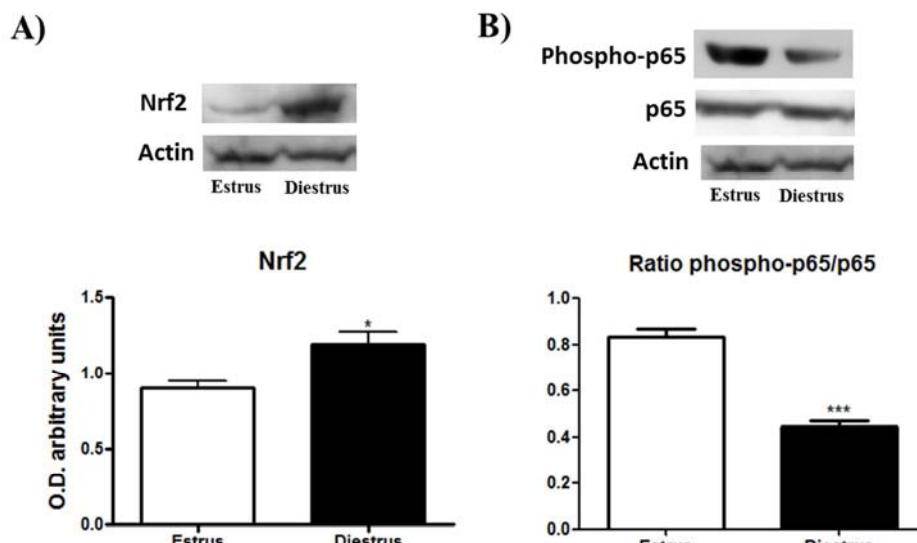
Fig. 3 Mitochondrial clearance. (A) NIX protein band intensity and NIX bar graph that quantifies the optical densities of the western blot bands normalized to β -actin. Data are expressed as the means \pm SEM and are calculated from at least three separate experiments, with each experiment performed in triplicate. **: ($p < 0.01$). (B) Electron micrograph of female cells in estrus phase showing mitochondria within a autophagosome (arrowhead) as a representative image. Scale bar, 0.2 μ m.

Fig. 4 Lipolysis-related autophagy activity. (A) p62, (B) Perilipin and (C) LAL protein band intensities and its respective bar graphs that quantifies the optical densities of the western

1 blot bands normalized to β -actin. Data are expressed as the means \pm SEM and are calculated
2 from at least three separate experiments, with each experiment performed in triplicate. *: (p<
3 0.05) **: (p< 0.01) (D) Electron micrograph of female cells in estrus phase showed lipid
4 droplets within autophagosomes (arrowheads) as a representative image. Scale bar, 200 nm.
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

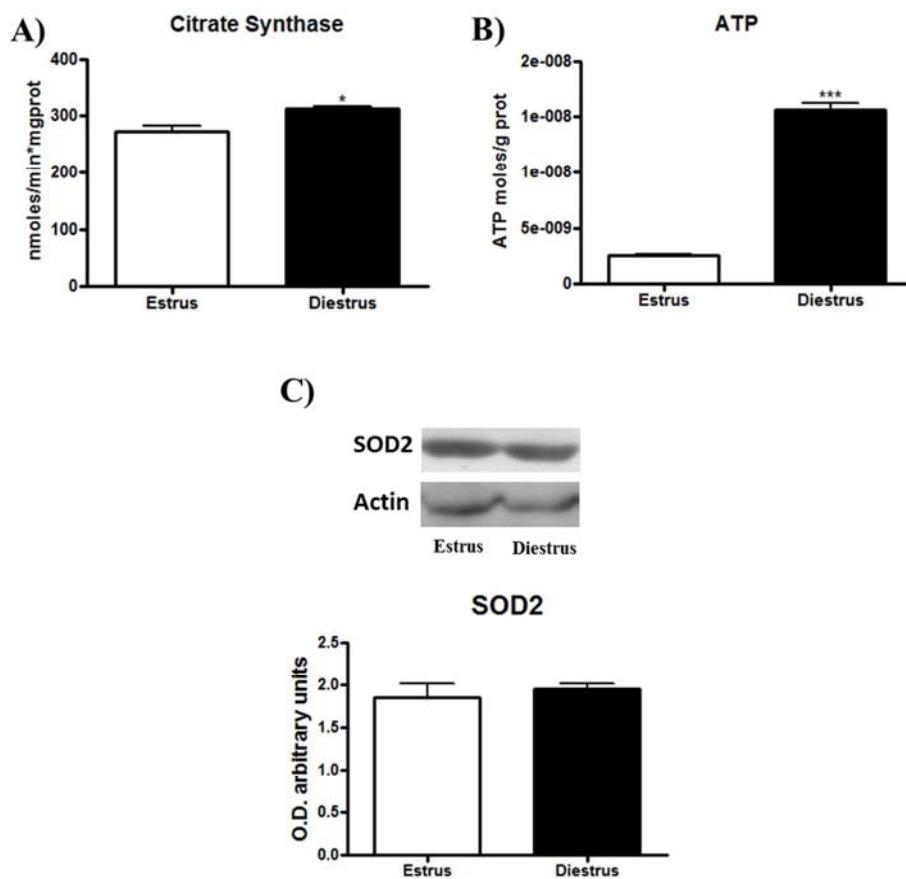
Fig. 5 Melatonin receptors expression. MT-1 and ROR α protein band intensities in the different fractions of the Harderian glands from the estrus and diestrus phases. The bar graphs of MT-1 and ROR α quantifies the optical densities of the western blot bands normalized to β -actin. Similar results were obtained from three separate experiments. Data are expressed as the means \pm SEM and are calculated from at least three separate experiments. *: (p< 0.05).

Fig. 6 Modulation by melatonin of the estrous cycle mechanisms. The scheme proposes as oxidative stress seems to be the key of these observed processes developed along estrous cycle with melatonin as modulator of it. Thereby, in estrus phase the high oxidative stress (Garcia-Macia et al., 2013) and estrogens (Lisk, 1985) trigger the NF- κ B activation, whose activation plays an important role in p62 activity. Increased p62 expression, involves an increased selective autophagic processes: from macroautophagy (Garcia-Macia et al., 2013) and CMA (Garcia-Macia et al., 2013) until mitophagy. This NF- κ B activation mediates lipolitic activities. Notably, the expression of melatonin receptors is lower in this phase. On the other hand, Nrf2 pathway is activated in HG at the diestrus phase. Antioxidant activity is higher in this phase (Garcia-Macia et al., 2013), the Nrf2 higher activation in diestrus phase should be related to the antioxidant signaling to the Nrf2 factor. Melatonin, via its receptors, which expression is higher in this phase, reduces pro-inflammatory mediators and enhances the expression of Nrf-2.



García-Macia et al. Fig. 1

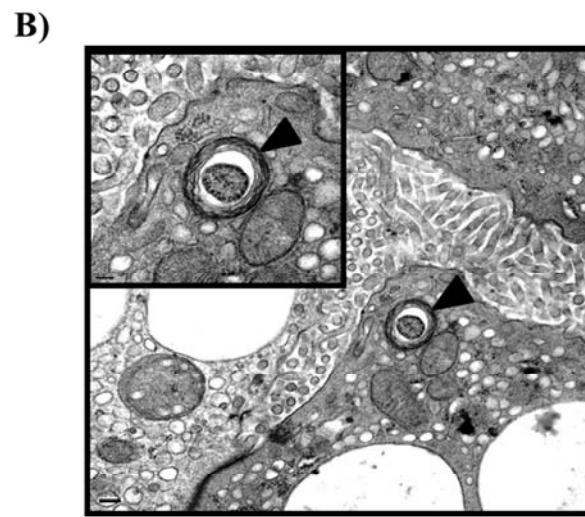
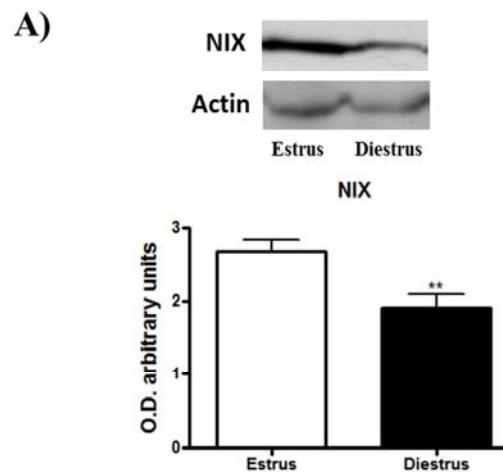
188x132mm (150 x 150 DPI)



García-Macia et al. Fig. 2

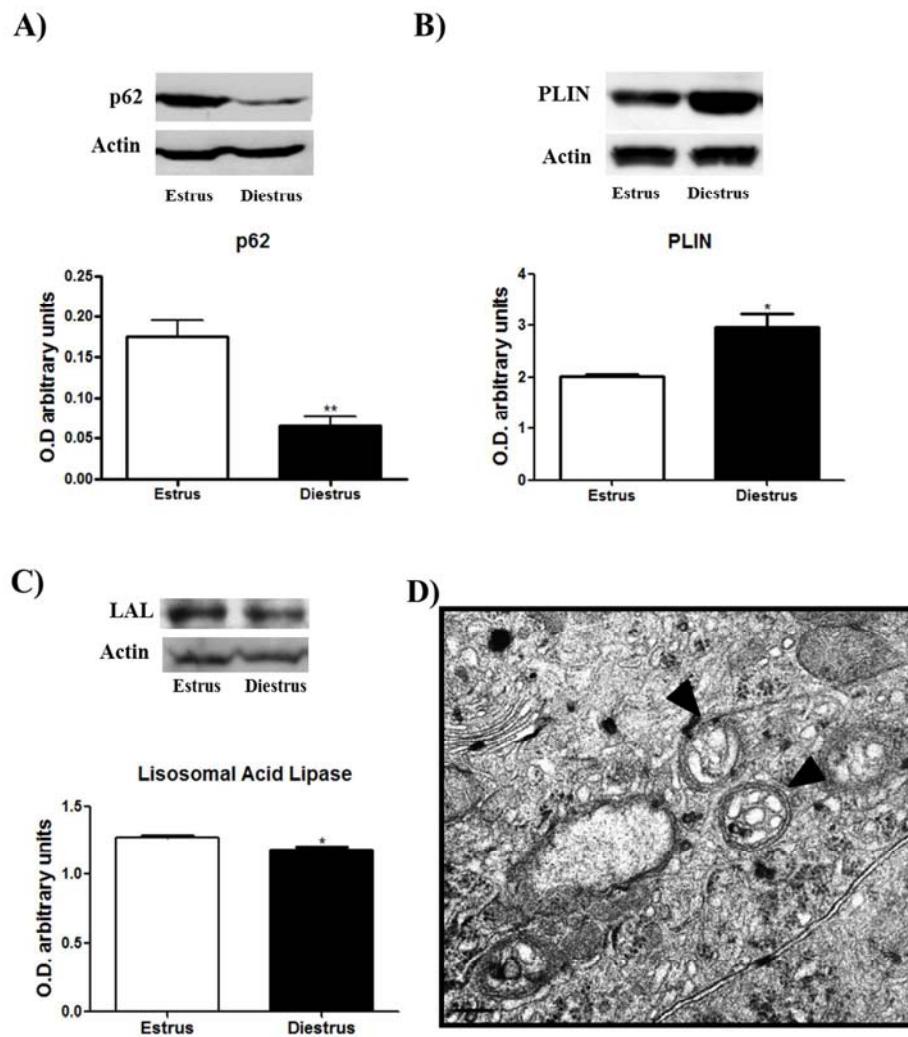
189x191mm (150 x 150 DPI)

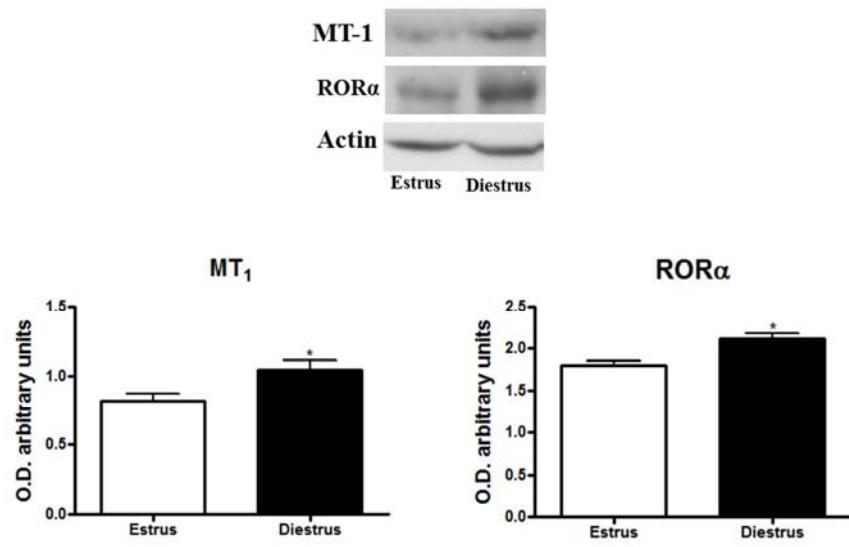




García-Macia et al. Fig. 3

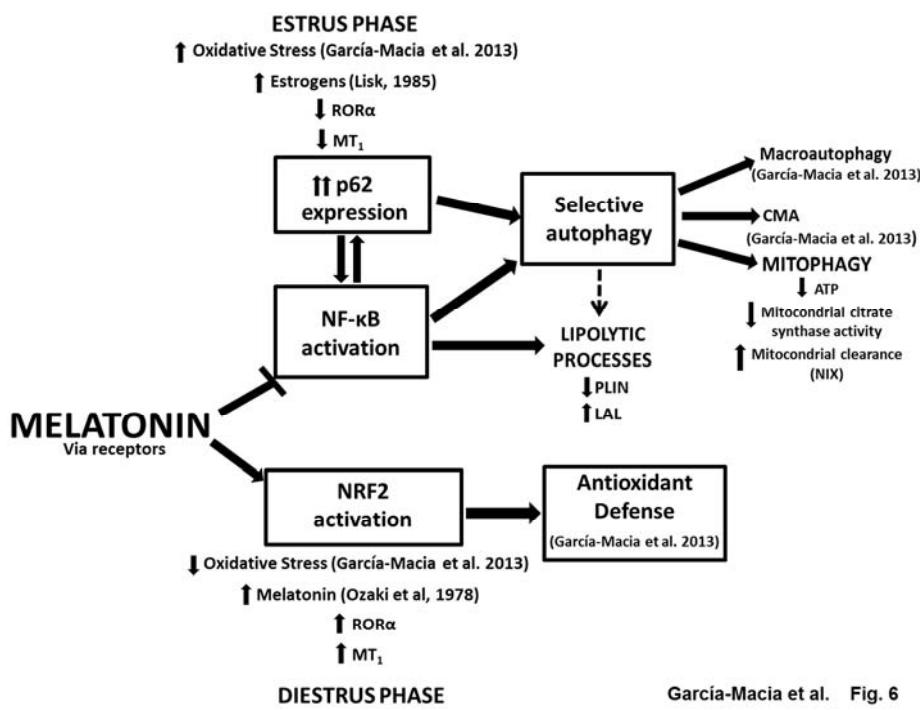
43
44
45
46
47 180x216mm (150 x 150 DPI)
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60





García-Macia et al. Fig. 5

186x144mm (150 x 150 DPI)



García-Macia et al. Fig. 6

265x196mm (150 x 150 DPI)