

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



“Estudio de las vías transduccionales que regulan la actividad metabólica de la testosterona a través de PGC-1 α en cardiomiocitos”

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización en Toxicología y Diagnóstico Molecular y Memoria para optar al título profesional de Bioquímica por:

Nataly Belén Venegas Zúñiga

Directores de Tesis: Dr. Manuel Estrada Hormazábal
Dr. Mario Chiong Lay

SANTIAGO-CHILE
Marzo 2016

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato:

NATALY BELÉN VENEGAS ZÚÑIGA

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización en Toxicología y Diagnóstico Molecular y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día

Director de Tesis:

Dr. Manuel Estrada _____

Director de Tesis:

Dr. Mario Chiong _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. Lorena García _____

Dr. Guillermo Díaz _____

Dra. Paulina Donoso _____

FINANCIAMIENTO

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Endocrinología Celular dirigido por el Dr. Manuel Estrada de la Facultad de Medicina y el Laboratorio de Transducción de Señales Moleculares dirigido por el Dr. Mario Chiong de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, ambos de la Universidad de Chile

Este trabajo fue financiado por los siguientes proyectos:

FONDECYT 1120259 y FONDECYT 1151118 (ME)

FONDECYT 1140329 (MC), ANILLO ACT1111 (MC) y FONDAP 15130011 (MC)

Además, para la realización del programa de estudios se contó con el financiamiento de CONICYT PCHA/Beca Magister en Chile 221320392 y la Beca para Estadías Cortas de Investigación en el Extranjero del Departamento de Postgrado y Postítulo de la Vicerrectoría de Asuntos Académicos de la Universidad de Chile.

Producción científica de la tesis

Congresos:

Ca²⁺-dependent pathways upstream of AMPK can modify the metabolic control in cardiomyocytes. **Venegas N**, Basualto C, Durán J, Pavez M, Chiong M, Estrada M. 1st Panamerican Congress of Physiological Society (PANAM). Foz de Iguazú, Brasil, 2 al 6 de Agosto del 2014.

FoxO1 prevents the effect of testosterone on gene expression associated with energy metabolism and development of cardiomyocyte hypertrophy. Pavez M, **Venegas N**, Durán J, Quiroga C, Lavandero S, Estrada M. 1st Panamerican Congress of Physiological Society (PANAM). Foz de Iguazú, Brasil, 2 al 6 de Agosto del 2014.

Testosterone activates MEF2 by Ca²⁺/Androgen receptor signaling pathway to stimulate cardiomyocyte hypertrophy. Durán J, **Venegas N**, Pavez M, Lavandero S, Estrada M. 1st Panamerican Congress of Physiological Society (PANAM). Foz de Iguazú, Brasil, 2 al 6 de Agosto del 2014.

Agradecimientos

A la comisión de tesis, las Dras. Lorena García y Paulina Donoso y el Dr. Guillermo Díaz por evaluarme y sus siempre bien recibidas críticas constructivas que fueron aportando al desarrollo de esta tesis.

También a todos los profesores de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, agradezco por enseñarme no solo contenidos, sino que también a ser una mejor alumna y profesional, sin duda fueron parte fundamental de mi etapa universitaria. A los funcionarios de postgrado, especialmente la labor de Francisca que siempre tuvo la mejor disposición con nosotros.

Al Dr. Mario Chiong, por dirigir esta tesis. Primero, por ser uno de los mejores profesores de la facultad y por siempre ayudarme en esta tesis, ya sea con consejos, enseñanza y un poco del quehacer del Bioquímico.

Al Dr. Manuel Estrada, mi director de tesis y profe, como siempre le he dicho. Gracias por recibirme en su laboratorio cuando no sabía nada de la ciencia y también por mostrarme el mundo de la investigación y todo lo que esta conlleva. Sin duda, fue más que solo mi director de tesis.

A Marioly Müller, que confió en mí y me acompañó a una aventura junto a Camila Leyton, la que nos enseñó muchísimo más que solo ciencia.

Del laboratorio de Endocrinología Celular, a los que en un principio me enseñaron (Carlos Wilson y Katherine Montoya) y mis compañeros de siempre, Mario Pavez gracias por la largas conversaciones de la vida y a Javier Durán por las risas y amistad. A Daniel Lagos y Francisca Troncoso, por toda la ayuda y motivación para trabajar. A Carla Basualto, por siempre aportar con un consejo, un reactivo o algún comentario constructivo. A Genaro Barrientos por la compañía en los almuerzos y consejos siempre útiles. A Pepe Galaz, Ismael Valdés, Alejandro Chamorro, Héctor del Riego y Luis Cifuentes por siempre los buenos momentos dentro y fuera del laboratorio.

Agradezco también a mis compañeros de Bioquímica: Natalia, Melany, Fernanda, Andrea, Diego, Víctor, Sebastián, Alonso y Pascal. Hemos compartido toda nuestra vida en la Universidad: estudio, carretes, consejos, pasar el tiempo, de todo un poco. Hago mención especial a Eduardo Tobar que estuvo conmigo siempre, en las buenas y las malas.

A mis amigos de voley, Anamaría Sánchez, mi amiga más apañadora, también a Pancha, Carito, Piri y Gerardo; todos ellos me hicieron sentir como en casa desde que ingresé al equipo, compartimos la pasión por este deporte y llegaron a ser mucho más que compañeros (as) de equipo, grandes amigos. A Ignacio y Agustín, por los muchos momentos de risas y también las largas conversaciones. A Loreto Arias que más que mi amiga ha llegado a ser mi hermana adoptiva.

A mis amigas de la vida, Giselle, Chansey y Nicole. Han sido parte fundamental de mi desarrollo como persona y siempre han estado conmigo. También a Camila, Nathalia, Laura y Catalina, amigas de muchísimos años.

Y a todos mis demás amigas y amigos que han aportado de una u otra forma. A los que estuvieron, a pesar de tomar caminos diferentes fueron parte de esto.

Y finalmente, a quienes han sido mi pilar fundamental en toda mi vida. Mis abuelos, mi tía Chanita, mi tía Liliana, todas mis tías y tíos que han aportado con más de un consejo, mis primos y primas que siempre han estado. Mi hermano Francisco por soportarme viviendo juntos, a mi mamá Gabriela por estar incondicionalmente conmigo y por supuesto, a mi papá Francisco, que hasta el último momento quiso lo mejor para mí e intentó darme todo lo que estuvo a su alcance. A mi familia le debo todo lo que hoy soy, han sido el impulso y motor para cada día ser mejor persona y profesional. Los amo...gracias infinitas

Tabla de Contenidos

FINANCIAMIENTO	3
Producción científica de la tesis	4
Agradecimientos.....	5
Tabla de Figuras.	9
2. Abreviaturas	10
3. Resumen	11
4. Abstract	13
5. Introducción.....	14
5.1. Testosterona.....	14
5.2. Efectos cardiovasculares de la testosterona	14
5.3. Metabolismo cardiaco	16
5.4. Co-activador 1 α del Receptor Activador de la Proliferación de Peroxisoma γ (PGC-1 α).....	18
5.4.1 Regulación de PGC-1 α	19
5.5. Señalización por Ca ²⁺ y CaMKII.....	20
5.6. Proteína Quinasa Activada por AMP (AMPK)	22
6. Problema.....	24
7. Hipótesis.....	25
8. Objetivo General.	25
9. Objetivos Específicos.	25
9.1. Objetivo Específico 1.	25
9.2. Objetivo Específico 2	25
9.3. Objetivo Específico 3.	25
10. Materiales y Métodos	26
10.1. Materiales y Reactivos.....	26
10.2. Cultivo primario de cardiomiocitos.	26
10.2.1 Aislamiento de corazones desde ratas neonatas.....	26
10.3. siRNA y transfecciones.	27
10.4. Extracción de proteínas totales.	27
10.5. Inmunodetección por Western blot.....	28
10.6. Medición de la actividad transcripcional.	28
10.7. Inmunofluorescencia.	28
10.8. PCR en tiempo real.....	29
10.9. Captación de 2-NBDG.....	29
10.10. Expresión de resultados y análisis estadístico.	30
11. Resultados	31
11.1 Efecto de la testosterona sobre PGC-1 α	31
11.1.1 Efecto de la testosterona sobre los niveles proteicos de PGC-1 α	31
11.1.2. Efecto de la testosterona sobre la actividad de PGC-1 α	31

11.1.3. Efecto de la testosterona sobre la localización subcelular de PGC-1 α .	32
11.2. Efecto de la testosterona sobre AMPK.	34
11.2.1. Efecto de la testosterona sobre la fosforilación de AMPK a tiempos cortos.	34
11.2.2. Efecto de la testosterona sobre la expresión de AMPK a tiempos largos	35
11.3. Efecto de CaMKII y AMPK sobre PGC-1 α .	36
11.3.1 Efecto de AMPK sobre la actividad de PGC-1 α .	36
11.3.2 Efecto de CaMKII sobre la actividad de PGC-1 α .	37
11.3.3. Efecto de CaMKII sobre la localización subcelular de PGC-1 α .	38
11.4. Cambios en la expresión de genes metabólicos inducidos por la testosterona	39
11.5. Participación de GLUT4 en el aumento de la captación de glucosa.	39
11.6. Rol de CaMKII y PGC-1 α en el aumento de la captación de glucosa.	40
12. Discusión	42
13. Proyecciones	47
14. Limitaciones del estudio	48
16. Bibliografía	49
15. Anexos	60
15.1. Efectos de la testosterona sobre la línea celular HL-1	60

Tabla de Figuras.

Figura 1: Testosterona induce hipertrofia del cardiomiocito..	16
Figura 2 : Testosterona induce la captación de glucosa en cardiomiocitos.....	18
Figura 3: Testosterona aumenta la fosforilación de CaMKII en cardiomiocitos.	22
Figura 4: Cinética de estimulación con testosterona 100 nM para PGC-1 α	31
Figura 5: Efecto de la testosterona sobre la actividad transcripcional de PGC-1 α	32
Figura 6: Efecto de la testosterona sobra la localización subcelular de PGC-1 α	33
Figura 7: Efecto de la concentración de AICAR sobre la fosforilación de AMPK.....	34
Figura 8: Efecto de la testosterona sobre la fosforilación de AMPK a tiempos cortos..	35
Figura 9: Efectos de la testosterona sobre la expresión de AMPK..	36
Figura 10: Efecto de AMPK sobre la actividad transcripcional de PGC-1 α	37
Figura 11: Efecto de CaMKII sobre la actividad transcripcional de PGC-1 α	37
Figura 12: El aumento de la localización nuclear de PGC-1 α estimulado por testosterona depende de CaMKII.....	38
Figura 13: Efecto de la testosterona sobre la expresión de genes del metabolismo glicolítico.....	39
Figura 14: El aumento de la captación de glucosa inducido por testosterona es dependiente de GLUT4	40
Figura 15: siPGC-1 reduce los niveles de PGC-1 α	40
Figura 16: El aumento de la captación de glucosa inducida por testosterona depende de CaMKII y PGC-1 α	41
Figura 17: Modelo propuesto de trabajo.....	46
Figura 18: Efecto de la testosterona sobre la localización subcelular de PGC-1 α en células HL-1.	61

2. Abreviaturas

2-NBDG: 2-(N-(7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-il) amino)-2-deoxiglucosa). Análogo fluorescente de glucosa.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ARN: Ácido ribonucleico.

AICAR: *5-Aminoimidazol-4-Carboxamide-1-β-Ribofuranoside*

AIP: del acrónimo inglés *Autocamtide-2 Related Inhibitor Peptide* (inhibidor de CaMKII).

AMP: Adenosina monofosfato

AMPK: Proteína quinasa activada por AMP

ATP: Adenosina trifosfato.

β-MHC: Cadena pesada de la β-miosina.

BrdU: 5-Bromo-deoxiuridina.

CaMKII: Proteína quinasa dependiente del complejo Ca²⁺/calmodulina.

DMEM: Medio *Dulbecco* modificado por *Eagle*.

DTT: Ditioneitol.

EDTA: Ácido etilén diamino tetra acético.

FT: Factor de transcripción.

GLUT1: Transportador de glucosa 1.

GLUT4: Transportador de glucosa 4.

Luc: Luciferasa.

MEF2C: del acrónimo inglés: *myocyte enhancer factor 2C*.

p38 MAPK: Proteína quinasa p38 activada por mitógeno.

PGC-1α: Co-activador 1α del receptor activador de la proliferación de peroxisoma γ.

PBS: Amortiguador fosfato salino.

PMSF: Fenil metil sulfonil fluoruro.

RAi: Receptor intracelular para andrógenos.

RL: Renilla luciferasa.

ROI: Región de interés.

siRNA: *small interfering RNA*, en español ARN pequeño de interferencia.

SKA: α-actina esquelética.

3. Resumen

El **cardiomiocito**, la célula contráctil del corazón, requiere el suministro continuo de energía para llevar a cabo la contracción muscular y sus diversos procesos celulares que incluyen sobrevivencia, crecimiento y metabolismo. Los efectos anabólicos de la **testosterona**, la principal hormona esteroide anabólica/androgénica, sobre el cardiomiocito implican adaptaciones metabólicas. En este tipo celular el ATP se genera por β -oxidación y en menor medida por glicólisis. En condiciones fisiológicas, la respuesta metabólica del cardiomiocito comprende una interacción entre las necesidades y la disponibilidad de sustratos energéticos. A pesar de los avances en el conocimiento de los efectos de la testosterona sobre el sistema cardiovascular, poco se sabe de las vías metabólicas usadas por esta hormona en cardiomiocitos.

El co-factor transcripcional **PGC-1 α** es un coactivador transcripcional que regula la biogénesis mitocondrial y diversos genes del metabolismo oxidativo y glicolítico. PGC-1 α es regulado por diversas proteínas, tales como la quinasa dependiente del complejo Ca^{2+} /Calmodulina tipo II (**CaMKII**) y la proteína quinasa activada por AMPK (**AMPK**). El objetivo de este trabajo fue estudiar la participación de estas proteínas quinasas en la activación de PGC-1 α mediada por testosterona en condiciones de hipertrofia del cardiomiocito.

Los resultados muestran que la testosterona (100 nM) produce un aumento de la localización nuclear de PGC-1 α y de la actividad del plasmidio reportero PGC-1 α luciferasa a las 24 h de estímulo. En este tiempo el cardiomiocito presenta un fenotipo hipertrófico. La inhibición de CaMKII con el péptido inhibidor, AIP (*Autocamtide-2 Related Inhibitor Peptide*) bloqueó tanto la translocación nuclear como la actividad transcripcional de PGC-1 α . Por otro lado, la testosterona aumentó la expresión de Hexoquinasa II (HKII) y la captación de glucosa. Este último fue inhibido por Indinavir (inhibidor del transportador de glucosa GLUT4) y AIP. Además, el aumento en la captación de glucosa inducido por testosterona fue bloqueado por el uso de un siRNA dirigido contra PGC-1 α .

Estos resultados sugieren a PGC-1 α como un regulador clave en los cambios metabólicos inducidos por testosterona, donde la CaMKII es necesaria para la activación de PGC-1 α . La participación de CaMKII y PGC-1 α parecen ser actores claves en el

control del metabolismo inducido por la testosterona para inducir hipertrofia del cardiomiocito.

4. Abstract

Cardiomyocytes require a continuous supply of energy to maintain muscle contraction as well as hemodynamic adaptation, survival, growth and metabolism. Anabolic effects of **testosterone**, the main anabolic/androgenic steroid hormone, on cardiomyocytes involve metabolic adaptations. In cardiomyocytes, ATP required for cellular energy is generated mainly by fatty acid oxidation and in less proportion by glucose as energy substrate. Because the heart must adapt to continuously changing energy demands but has limited capacity for storing fatty acids or glucose, cardiomyocyte energy substrate flux must be tightly matched with demand.

To elicit functional actions, androgen receptor once activated by testosterone must interact with coactivator proteins. A main metabolic coactivator in cardiac cells is the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR γ) coactivator-1 α (**PGC-1 α**), which is a key transcriptional energy regulator. PGC-1 α obtains information from upstream signaling pathways as Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (**CaMKII**) and AMPK protein kinase activated by AMP (**AMPK**) to connect energy demands with cell growth via gene expression. However, the signaling mechanisms that regulate cardiac metabolic adaptation during testosterone-induced cardiomyocyte hypertrophy are up until now incompletely understood. The objective of this work was to study the involvement of these protein kinases in the activation of PGC-1 α by testosterone during cardiomyocyte hypertrophy.

The results show that testosterone (100 nM) increased nuclear localization of PGC-1 α and PGC-1 α -luciferase activity. Inhibition of CaMKII with autocamtide-2 related inhibitor peptide (AIP) blocked both nuclear translocation and transcriptional activity of PGC-1 α . Moreover, testosterone increased hexokinase II (HKII) expression and glucose uptake. Glucose uptake was inhibited by indinavir (a GLUT4 inhibitor) and AIP. Moreover, glucose uptake increases induced testosterone was blocked by siRNA to PGC-1 α .

Together, these results suggest that CaMKII is required for PGC-1 α activation and PGC-1 α is a key regulator of the metabolic changes induced by testosterone in cardiomyocytes.

5. Introducción

5.1. Testosterona

Los andrógenos corresponden a hormonas masculinas involucradas en el desarrollo de los caracteres sexuales primarios y secundarios. La testosterona, es el principal esteroide anabólico/andrógeno y posee múltiples efectos en el organismo, tales como el desarrollo la masa muscular, eritropoyesis y densidad ósea, entre otras. Esta hormona también se produce en mujeres, pero se encuentra en concentraciones menores que en hombres. Mujeres en edad pre-menopáusicas presentan 1/10 de los niveles de testosterona encontrados en hombres (Wittnich *et al*, 2013), debido a la conversión de testosterona a estradiol por la enzima aromatasa. Esta enzima convierte la testosterona producida en los ovarios a estradiol (Mooradian *et al*, 1987). La testosterona ejerce sus efectos a través de mecanismos dependientes e independientes del receptor de andrógenos. El primero, dependiente del receptor de andrógenos intracelular (RA_i) genera un complejo testosterona-RA_i que migra al núcleo y se une a distintos elementos de respuesta a andrógenos ubicados en el ADN para regular la expresión o represión de diversos genes (Beato *et al*, 1987; Simental *et al*, 1992). Este receptor intracelular se encuentra presente en cardiomiocitos (Hickson *et al*, 1984; Marsh *et al*, 1998). El segundo mecanismo es independiente del RA_i y se postula la unión de la testosterona a un receptor de membrana acoplado a proteína G (Foradori *et al*, 2008; Pi *et al*, 2010). Nuestro grupo de investigación ha descrito efectos a través de este receptor en células de neuroblastoma, músculo esquelético y cardíaco. Esto genera efectos rápidos, mediado principalmente por cambios en las señales del Ca²⁺ intracelular y activación de diversas proteínas quinasas, lo que a su vez desencadena la activación de factores transcripcionales (Vicencio *et al*, 2006; Estrada *et al*, 2003; Guo *et al*, 2002; Altamirano *et al*, 2009; Vicencio *et al*, 2011).

Por lo tanto, el mecanismo de acción de la testosterona en el cardiomiocito involucra un efecto cooperativo entre estas vías para ejercer los efectos fisiológicos y en ocasiones patológicos de esta hormona.

5.2. Efectos cardiovasculares de la testosterona

Los cardiomiocitos, las células contráctiles del corazón, son un blanco para la acción de los andrógenos. La testosterona induce hipertrofia cardíaca tanto *in vitro* como *in vivo* (Marsh *et al*, 1998; Sullivan *et al*, 1998; Altamirano *et al*, 2009). Elevadas dosis de

testosterona o sus derivados sintéticos se asocian a hipertrofia cardíaca, remodelado ventricular, cardiomiopatía, infarto del miocardio y muerte cardíaca súbita. Sin embargo, dentro del rango normal de concentraciones plasmáticas, las acciones de los andrógenos son necesarias para el desarrollo y procesos fisiológicos del cardiomiocito (Weidemann & Hanke, 2002; Ikeda *et al*, 2005). Los andrógenos también pueden producir un aumento en la contractibilidad cardíaca, relajación del músculo liso vascular y reducir la post-carga cardíaca (Li *et al*, 2004). Además, la administración prolongada de testosterona en ratas que con infarto del miocardio induce un patrón de hipertrofia cardíaca fisiológica sin producir efectos perjudiciales, lo que sugiere una mejora en la función cardíaca (Nahrendorf *et al*, 2003). Por lo tanto, el efecto de la testosterona sobre el sistema cardiovascular aún no está bien dilucidado ya que se han observado tanto efectos beneficiosos como patológicos. Sin embargo, muchos de los efectos descritos son simplemente observacionales y carecen de estudios científicos rigurosos.

Diversos estudios han evaluado la relación que existe entre los niveles plasmáticos de testosterona y enfermedades metabólicas. Muthusamy mostró que la deficiencia de testosterona se correlaciona con una deficiente oxidación de glucosa en músculo esquelético, hígado y tejido adiposo (Muthusamy *et al*, 2007). Por otro lado, también se ha mostrado que la disminución en las concentraciones plasmáticas de la testosterona se asocian al desarrollo de síndrome metabólico, diabetes mellitus tipo 2 (Saad, 2009) e insuficiencia cardíaca (Malkin *et al*, 2010). A esto se suman los ensayos clínicos demostrando que la administración de testosterona mejora el pronóstico de la insuficiencia cardíaca en hombres con síndrome metabólico (Cook & Romashkan, 2011). A pesar de estos efectos beneficiosos, la administración de elevadas dosis de testosterona se asocia con el desarrollo de hipertrofia cardíaca (Sachtleben *et al*, 1993).

El efecto de la testosterona como un modulador metabólico podría mejorar la sensibilidad a la insulina y la captación de glucosa en el corazón. Sin embargo, para establecer protocolos de intervención o de reemplazo hormonal se requiere mayor investigación acerca de los mecanismos celulares y moleculares implicados en las acciones metabólicas de la testosterona.

Nuestro grupo de trabajo determinó que la testosterona (100 nM) induce aumento en la expresión de las proteínas β -MHC y SKA a las 24 h de estímulo, lo que indica que la testosterona induce hipertrofia del cardiomiocito (Figura 1) (Altamirano *et al*, 2009).

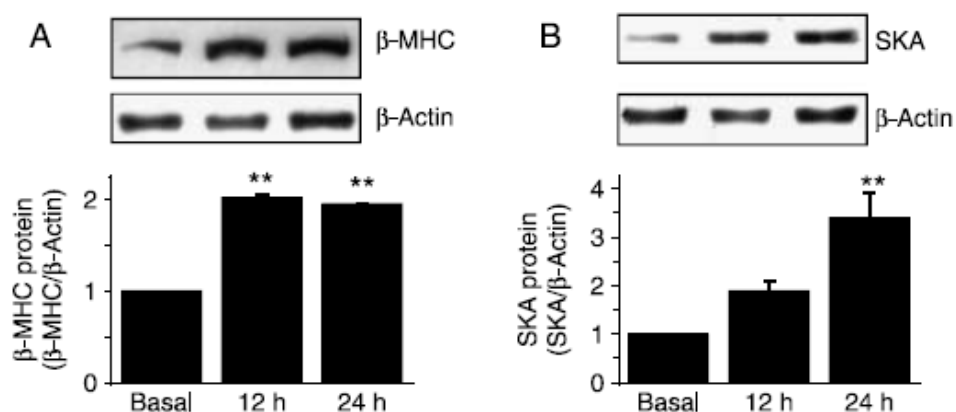


Figura 1: Testosterona induce hipertrofia del cardiomiocito. Las células fueron estimuladas por 12 y 24 h con 100 nM de testosterona. Se observa un aumento en la expresión de β -MHC y SKA a las 12 y 24 h de estímulo, estas proteínas son marcadores de la hipertrofia del cardiomiocito. **p < 0,01 vs basal. Adaptada de Altamirano et al, 2009.

5.3. Metabolismo cardiaco

El corazón es un órgano que requiere un constante suministro energético y por ende cantidades suficientes de ATP para mantener la función contráctil y la viabilidad celular. El corazón usa una amplia variedad de sustratos energéticos como ácidos grasos, aminoácidos, glucosa, lactato y cuerpos cetónicos. Por lo tanto, la función cardiaca depende de una estrecha regulación de las vías metabólicas necesarias para dar respuesta a la alta demanda energética del corazón. Bajo condiciones normales, la mayor parte del ATP formado proviene de la β -oxidación de ácidos grasos en la mitocondria, del cual aproximadamente un 60-70% es destinado a la contracción (Weiss & Maslov, 2004; Balaban, 2012). La glucosa, en menor cuantía, es el otro sustrato que a través de la glicólisis es metabolizada para generar ATP. Los ácidos grasos ingresan a la célula mediante proteínas translocasas ubicadas en la membrana plasmática, luego deben ser transportados a la mitocondria para la β -oxidación, proceso mediado por la enzima carnitina palmitoil transferasa 1 (CPT-1). La captación de glucosa ocurre mediante dos transportadores de glucosa, GLUT1 y GLUT4 (Zorzano *et al*, 1997). La captación basal de glucosa está determinada por la presencia de GLUT1 en la membrana plasmática de los cardiomiocitos. Estímulos como insulina y estrés metabólico inducen la translocación de GLUT4 desde el citoplasma hacia la membrana plasmática (Brownsey *et al*, 1997). Una vez en el interior de la célula, la glucosa es rápidamente fosforilada para ser catabolizada directamente o incorporada en glucógeno. Como sustrato energético, la

glucosa es metabolizada a través de la vía glicolítica donde es oxidada hasta CO₂ en la mitocondria o genera lactato y alanina por la vía no oxidativa (Depré *et al*, 1998). Tanto la incorporación de glucosa a través de transportadores tipo GLUT y la regulación de las enzimas hexoquinasa-II (HK-II) y fosfofructoquinasa 1(PFK-1) son los mayores determinantes de la glicólisis en el corazón (Allard, 2004). Estas enzimas son reguladas mediante alosterismo y por la razón sustrato/producto (Ingwall, 2009; Weiss & Maslov, 2004; Broun *et al*, 2013)

Tanto la β -oxidación como la glicólisis convergen en la producción de acetyl-CoA, la cual ingresa al ciclo de Krebs para generar NADH y FADH₂. Estos dos metabolitos son utilizados posteriormente por la mitocondria para generar ATP mediante la cadena transportadora de electrones.

Durante el desarrollo de hipertrofia cardiaca se modifica el metabolismo celular, alterando la razón entre β -oxidación y glicólisis para la generación de ATP. Por ejemplo, la hipertrofia cardiaca producto de una sobrecarga de presión conlleva un aumento en la tasa glicolítica y una disminución en la β -oxidación. Por otro lado, en la hipertrofia cardiaca fisiológica producida por ejercicio existe un aumento en la oxidación de glucosa y ácidos grasos con disminución de la glicólisis (Stanley *et al*, 2005; van der Vusse *et al*, 2002, 2000; Allard, 2004). Por lo tanto, parece ser que la naturaleza del estímulo hipertrófico es un determinante clave de los cambios metabólicos generados por en el cardiomiocito para optimizar la producción de ATP durante el desarrollo del fenotipo hipertrófico (Scolletta & Biagioli, 2010).

En la insuficiencia cardiaca, el corazón no es capaz de producir suficiente ATP para la contracción, lo que desencadena un desempeño contráctil deficiente. Se ha descrito que existe una asociación entre esta patología y bajos niveles de testosterona plasmática (Saad & Gooren, 2009; Saad, 2009). Adicionalmente, la testosterona es necesaria para mantener la insulina y glucosa plasmática en niveles adecuados (Kelly & Jones, 2013). Recientemente, nuestro laboratorio ha descrito que de forma aguda la testosterona produce un aumento en la captación de glucosa dependiente del transportador GLUT4 en cardiomiocitos (Figura 2) (Wilson *et al*, 2013).

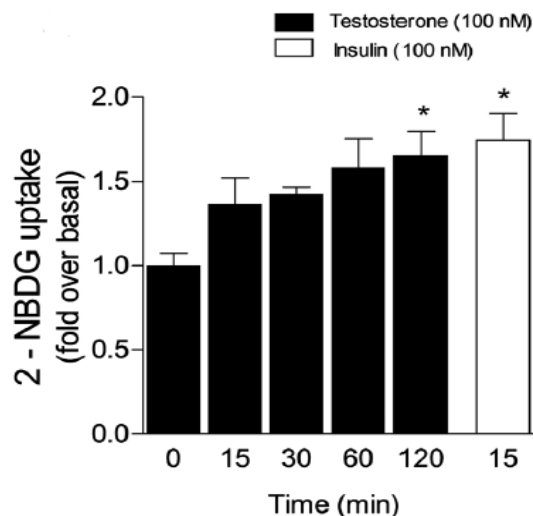


Figura 2 : Testosterona induce la captación de glucosa en cardiomiocitos. Cinética de captación de análogo fluorescente de glucosa 2-NBDG en cardiomiocitos estimulados con 100 nM de testosterona por los tiempos indicados. Insulina (100 nM) fue usado como control positivo. Se observa un aumento en la captación de glucosa a los 120 min de estimulación con la hormona; * $p < 0.05$. Adaptado de Wilson et al. 2013

5.4. Co-activador 1 α del Receptor Activador de la Proliferación de Peroxisoma γ (PGC-1 α)

Los factores de transcripción (FT) funcionan acoplándose a proteínas específicas co-activadoras o co-represoras. En general, los FT contienen dominios específicos de unión al ADN, pero carecen de la maquinaria enzimática necesaria para activar la transcripción de sus genes blanco. Esta actividad bioquímica la aportan co-reguladores, que usualmente existen en forma de complejos multiproteicos en el núcleo y son reclutados por los FT en respuesta a diversos estímulos como temperatura, estado nutricional y actividad física (Lin *et al*, 2005). Los co-activadores son reclutados al gen blanco mediante interacciones proteína-proteína con los FT. Ellos estimulan la transcripción modificando la estructura de la cromatina de los genes blanco o mediante la asociación con la maquinaria de la ARN polimerasa. Un mismo co-activador puede interactuar con múltiples FTs y un FT puede interactuar con más de un co-activador (Knutti & Kralli, 2001).

La familia de co-activadores PGC-1 son uno de los principales actores que integran vías de señalización en el control del metabolismo celular y sistémico, principalmente sobre el metabolismo oxidativo. PGC-1 α fue el primer miembro descrito de esta familia

y en grasa parda promueve la proliferación mitocondrial, el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa a través de la proteína UCP-1 y la disipación de energía en forma de calor (Lin *et al*, 2004). En músculo esquelético y cardíaco la sobreexpresión de PGC-1 α promueve la biogénesis mitocondrial, fosforilación oxidativa y la captación de glucosa mediada por GLUT4 (Lehman *et al*, 2000; St-Pierre *et al*, 2003). En el corazón, la expresión de PGC-1 α es inducida perinatalmente y luego en la adultez, lo que sugiere que PGC-1 α regula la biogénesis mitocondrial en el estado perinatal (Lehman & Kelly, 2002). La estrecha regulación de PGC-1 α es clave para el funcionamiento normal del corazón. En este contexto, se han diseñado modelos de ratones transgénicos para estudiar el rol de PGC-1 α . En ellos se ha determinado que la sobreexpresión de esta proteína conduce a una biogénesis mitocondrial descontrolada que finalmente lleva a la pérdida de la estructura sarcomérica del cardiomiocito y cardiomiopatía dilatada (Lehman *et al*, 2000; Riehle & Abel, 2012). Por otro lado, modelos *knock out* (KO) de PGC-1 α presentan hipertrofia e insuficiencia cardíaca y además muestran un deterioro en la respuesta ionotrópica y cronotrópica frente a ejercicio y agonistas β -adrenérgicos como la dobutamina (Barger *et al*, 2000; Garnier *et al*, 2003; Arany *et al*, 2005). Pero además, PGC-1 α parece tener un rol protector. La hormona T3 induce hipertrofia del cardiomiocito asociado a una disminución en la expresión de PGC-1 α . Utilizando un adenovirus para sobreexpresar la proteína, se logró inhibir la hipertrofia del cardiomiocito inducida por T3 y restituir sus niveles basales de PGC-1 α (Xu *et al*, 2012).

5.4.1 Regulación de PGC-1 α

PGC-1 α es un regulador metabólico que integra múltiples señales ambientales y fisiológicas para coordinar diversos factores de transcripción que regulan el metabolismo energético; por lo que no es sorprendente que existan variados puntos de regulación para este co-activador (Patten & Arany, 2012; Fernandez-Marcos & Auwerx, 2011; Villena, 2015). De hecho, la vida media de la proteína PGC-1 α es de 2-3 h y es estabilizada mediante la fosforilación en tres sitios (T262, S265 y T298) por la proteína p38 MAPK (Knutti *et al*, 2001; Puigserver *et al*, 2001). Se ha descrito que la expresión de PGC-1 α es regulada por cambios del Ca²⁺ intracelular a través de la quinasa dependiente del complejo Ca²⁺/Calmodulina (CaMK) y calcineurina (Cn) (Ojuka *et al*. 2003; Ojuka 2004; Guerfali *et al*. 2007). La activación mediada por CaMK activa una serie de genes blanco

de PGC-1 α involucrados en el metabolismo de la utilización de glucosa y oxidación mitocondrial (Schaeffer et al. 2004). En músculo esquelético se sugiere que p38 MAPK podría ser un blanco río abajo de CaMKII, lo que finalmente llevaría a un aumento en la expresión de PGC-1 α y la biogénesis mitocondrial (Wright *et al*, 2007). Otra de las quinasas que es capaz de fosforilar a PGC-1 α en 2 sitios (T177 y S538) es la proteína quinasa activada por AMP (AMPK). Esta quinasa se activa en respuesta a un aumento en los niveles de AMP y en músculo aumenta los niveles de un grupo en particular de genes blanco de PGC-1 α , tales como GLUT4 y citocromo c (Winder *et al*, 2000; Ojuka, 2004; Handschin & Spiegelman, 2006).

Además de fosforilaciones, existen otras modificaciones post-traduccionales que pueden regular la actividad de PGC-1 α . La acetilación de este coactivador parece tener gran influencia sobre su actividad, proceso mediado por enzimas acetiltransferasas y desacetilasas (Jeninga *et al*, 2010). En músculo la desacetilación mediada por SIRT1 (activada por aumentos en la razón NAD⁺/NADH) es necesaria para la activación de PGC-1 α . La activación de AMPK induce un aumento en la razón (NAD⁺/NADH) y fosforila directamente a PGC-1 α , ambas acciones activan a PGC-1 α y promueven la expresión de sus genes blanco.

En células de cáncer de próstata los andrógenos promueven el crecimiento celular dependiente de AMPK, lo que es acompañado por un cambio metabólico que incluye un aumento en la biogénesis mitocondrial dependiente de PGC-1 α (Tennakoon *et al*, 2013). Recientemente, se observó que en ratas castradas con infarto del miocardio existe un mayor daño mitocondrial, disminución en la expresión de PGC-1 α y función cardíaca deficiente. El tratamiento con testosterona aumentó la expresión de PGC-1 α , disminuyó la apoptosis de cardiomiocitos y el daño mitocondrial (Wang *et al*, 2015).

5.5. Señalización por Ca²⁺ y CaMKII

El ión Ca²⁺ es un segundo mensajero intracelular universal en eucariontes y constituye uno de los mensajeros más complejos dentro de la célula ya que participa de múltiples procesos y funciones. En músculo, el Ca²⁺ es conocido por su función en la actividad contráctil, pero además regula múltiples procesos como el balance energético, entre otros. El tipo de la señal de Ca²⁺ va a determinar el proceso y/o función a seguir, por ejemplo señales rápidas y altamente localizadas en forma de “spikes” regulan respuestas rápidas,

mientras que señales transitorias u ondas de Ca^{2+} determinan respuestas más lentas y duraderas (Berridge *et al*, 2000).

Los efectos de las señales de Ca^{2+} generadas por diversos agonistas, son decodificadas por proteínas específicas de unión a Ca^{2+} , como Calmodulina (CaM) y Troponina C (TnC). También es importante la localización subcelular de la señal, ya que sus efectos también son regulados en zonas discretas de la célula por cambios en la concentración local de Ca^{2+} (Bers, 2008).

Una de las principales proteínas que decodifican las señales de Ca^{2+} es la CaMKII, la que se expresa altamente en cardiomiocitos. CaMKII puede responder a oscilaciones de Ca^{2+} de gran amplitud o frecuencia y requiere autofosforilación para activarse (Bers, 2008; Zhang *et al*, 2004; Vicencio *et al*, 2011). En el corazón la isoforma predominante de CaMKII es la CaMKII δ . Esta quinasa es activada por la unión del complejo Ca^{2+} /calmodulina y tiene un rol clave en la transcripción génica y el desarrollo de la hipertrofia cardiaca (Zhang *et al*, 2004). Bajo condiciones como estrés, la sobreactivación de CaMKII promueve insuficiencia cardiaca y arritmia (Wu *et al*, 2002; Zhang *et al*, 2003). Además, se ha mostrado que en la hipertrofia cardiaca existe un aumento en la actividad de esta quinasa (Hoch *et al*, 1999).

Estos antecedentes son interesantes ya que nuestro grupo de investigación demostró que la testosterona produce un aumento en el Ca^{2+} intracelular y también activación de CaMKII en cardiomiocitos (Figura 3), mostrando la habilidad de esta hormona para activar vías intracelulares dependientes de Ca^{2+} (Vicencio *et al*, 2006; Wilson *et al*, 2013).

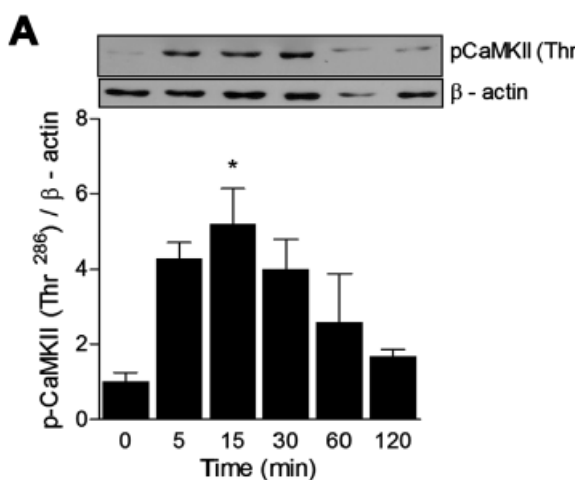


Figura 3: Testosterona aumenta la fosforilación de CaMKII en cardiomiocitos. Los cardiomiocitos se estimularon con 100 nM de testosterona para determinar los cambios en la fosforilación de CaMKII en Thr286 por Western blot a diferentes tiempos. n=4; * p < 0.05. Adaptado de Wilson et al. 2013

5.6. Proteína Quinasa Activada por AMP (AMPK)

La proteína quinasa activada por AMP (AMPK) corresponde a una serina/treonina quinasa que regula el metabolismo y diversas funciones celulares y es considerada el principal sensor energético intracelular (Hardie, 2011). La AMPK es una proteína heterotrimérica compuesta por una subunidad catalítica α , una subunidad reguladora β y una subunidad γ (Carling *et al*, 1994; Heidrich *et al*, 2010). En corazón, se expresan principalmente las subunidades α_2 , β_2 y γ_2 (Stapleton *et al*, 1996; Sakamoto *et al*, 2007; Chen *et al*, 1999). La unión de AMP a la subunidad γ activa a la AMPK por cambios conformacionales en la subunidad α que promueven la fosforilación en Thr172 por quinasas río arriba de AMPK, como LKB1, CaMKK y CaMK. Por último, la inhibición de la fosforilación puede ocurrir por diversas proteínas fosfatasas que regulan la actividad de AMPK (Hawley *et al*, 1996; Shaw *et al*, 2004; Woods *et al*, 2003).

Estímulos fisiológicos o patológicos que reducen los niveles energéticos de la célula como estrés oxidativo, hipoxia, isquemia o deprivación de nutrientes llevan a un aumento en la razón AMP/ATP y por ende activación de AMPK. Esta activación coordina un programa celular que limita el gasto de ATP y promueve cambios compensatorios para mantener los niveles celulares de ATP (Li & Keaney, 2010). En general, se inhiben los procesos que consumen energía y se estimulan aquellos procesos catabólicos productores de ATP. Así, AMPK promueve: (1) un aumento en la entrada de ácidos grasos a la mitocondria y oxidación, que corresponde al principal combustible del corazón en estado normal; (2) un aumento en la captación de glucosa y (3) estimulación de la glicólisis (Dolinsky & Dyck, 2006; Sambandam & Lopaschuk, 2003; Ewart & Kennedy, 2011). El efecto sobre la captación de glucosa ocurre por un aumento de la residencia del transportador de glucosa GLUT4 en la membrana plasmática, ya sea estimulando la translocación a la membrana plasmática y/o disminuyendo su endocitosis. Por otro lado, la AMPK es capaz de estimular la glicólisis activando a la fosfofructoquinasa-2 (PFK-2), una de las principales enzimas reguladoras de la vía glicolítica (Young *et al*, 2005). Se ha descrito a AMPK como un potente cardioprotector durante la isquemia-reperfusión. En

ratones transgénicos que expresan una quinasa muerta dominante negativo de la subunidad α de AMPK, se observó pérdida de la fuerza contráctil y bajos niveles de ATP, sugiriendo que AMPK juega un papel crucial en la función cardiaca (Russell *et al*, 2004). Adicionalmente, en un trabajo de nuestro laboratorio se determinó que AMPK es determinante en el aumento en la captación de glucosa y translocación de GLUT4 a la membrana bajo los efectos de testosterona en cardiomiocitos (Wilson *et al*, 2013).

6. Problema

Considerando los efectos anabólicos de la testosterona, esta hormona debe regular y controlar múltiples vías metabólicas para producir sus efectos fisiológicos. El conocimiento actual, además indica que la disminución de las concentraciones plasmáticas de testosterona se relaciona con diferentes patologías metabólicas. Por otro lado, elevadas concentraciones de testosterona inducen hipertrofia cardíaca y un elevado consumo de nutrientes y energía. A pesar de este nuevo conocimiento, los mecanismos de acción de la testosterona sobre la célula cardíaca permanecen poco estudiados. El factor transcripcional PGC-1 α es un regulador maestro del metabolismo en cardiomiocitos, por su control en procesos como la captación de glucosa y expresión de genes metabólicos como HK-II. Se desconoce si la testosterona es capaz de activar a PGC-1 α produciendo cambios en el metabolismo del cardiomiocito. Por otro lado, nuestros antecedentes muestran que la testosterona induce aumentos en el Ca²⁺ intracelular y activación de la proteína CaMKII. Esta proteína ha sido descrita como regulador de PGC-1 α en otros modelos celulares. Sin embargo, no hay antecedentes que muestren que la testosterona regule la vía CaMKII/PGC-1 α en cardiomiocitos.

En esta tesis proponemos que la testosterona activa a PGC-1 α a través de un mecanismo dependiente de CaMKII, lo que además conlleva cambios en el metabolismo durante la hipertrofia del cardiomiocito.

7. Hipótesis. *“La testosterona aumenta la captación de glucosa por activación de PGC-1 α en cardiomiocitos”*

8. Objetivo General. Investigar el papel de CaMKII y AMPK sobre la activación de PGC-1 α mediada por testosterona en condiciones de hipertrofia del cardiomiocito

9. Objetivos Específicos.

9.1. Objetivo Específico 1. Determinar el efecto de la testosterona sobre PGC-1 α .

9.2. Objetivo Específico 2. Evaluar la participación de CaMKII, y AMPK sobre PGC-1 α

9.3. Objetivo Específico 3. Estudiar los cambios en patrones del metabolismo de la glucosa y la participación de la vía a través de PGC-1 α

10. Materiales y Métodos

10.1. Materiales y Reactivos.

Testosterona, AICAR, insulina y pancreatina fueron obtenidos desde *Sigma Chemical Company (St Louis, MO, USA)*. El péptido inhibidor AIP fue obtenido desde *Calbiochem (La Jolla, CA)*. Los siRNA contra CaMKII y PGC-1 α fueron adquiridos desde Santa Cruz Biotechnology (*Santa Cruz, CA*). El análogo fluorescente de glucosa 2-NBDG (2-(N-(7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-il) amino)-2-deoxiglucosa) y el anticuerpo secundario *Alexa Fluor 488 anti-rabbit* fueron adquiridos desde Invitrogen (*Eugene, OR, USA*). Los anticuerpos anti-fosfoAMPK α , antiAMPK α y anti-GAPDH fueron adquiridos desde Cell Signalling (*Danvers, MA*), anti-PGC-1 α desde Novus Biologicals (*Littleton, CO*) y anti- β -actina desde *Sigma Chemical Company (St Louis, MO, USA)*. La colagenasa tipo II fue adquirida desde *Worthington Biochemical Corporation (Lakewood, CA, USA)*. Todos los otros reactivos utilizados en este trabajo fueron de grado analítico.

10.2. Cultivo primario de cardiomiocitos.

Se utilizaron ratas neonatas Sprague-Dawley de 1 – 3 días de edad, provenientes del Bioterio Central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, bajo la aprobación del comité de bioética de esta institución (CBA # 0768 FMUCH).

10.2.1 Aislamiento de corazones desde ratas neonatas.

El aislamiento y cultivo celular de cardiomiocitos se realizó en conformidad al protocolo descrito por Vicencio et al., 2006. Brevemente, las ratas fueron sacrificadas por decapitación y posteriormente los corazones fueron removidos con pinzas y lavados en medio Hank's. Posteriormente, los ventrículos izquierdos fueron separados de las aurículas, para ser digeridos mecánicamente hasta formar un macerado homogéneo de células. Luego, se agregó medio de digestión celular (colagenasa tipo II (0,25 mg/mL) y pancreatina (0,8 mg/mL) disueltas en medio Hank's) y se agitó por 30 min. a 37°. Luego, se dejó sedimentar por 5 min. el tejido aún no digerido y se rescató el sobrenadante, centrifugándolo a 900 x g por 10 min. a 20 °C. El *pellet* resultante fue re-suspendido en medio completo (DMEM: M199 = 4:1, suplementado con 10 % de suero fetal bovino

(SFB) y 1% de penicilina-estreptomicina) hasta pre-plaquear. El tejido sin digerir fue sometido a dos procesos de digestión adicionales para el aislamiento de los cardiomiocitos aún remanentes en el tejido. Para descartar los fibroblastos, las células fueron preplaqueadas por 60 min. a 37°C. Posteriormente, se rescató el sobrenadante, se añadió 5-bromo-2-deoxirudina (BrdU) (100 μ M), para evitar la proliferación de fibroblastos remanentes. Los cardiomiocitos fueron mantenidos a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ y 95% de aire.

10.3. siRNA y transfecciones.

Para evaluar la participación de CaMKII los cardiomiocitos se transfectaron con un RNA de interferencia dirigido contra la isoforma CaMKII δ . Para determinar la participación de PGC-1 α las células se transfectaron con un siRNA para PGC-1. En todos los casos se utilizó un siRNA scramble como control. Todas las transfecciones se realizaron utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen).

10.4. Extracción de proteínas totales.

Para determinar la cantidad relativa de proteínas totales y fosforiladas, los cardiomiocitos fueron sembrados en placas plásticas de 35 mm de diámetro (2×10^6 células/placa) en el día 1 de cultivo. En el día 2 de cultivo, se reemplazó el medio de cultivo por medio al 2% por al menos 8 h previo a la realización de los experimentos. Luego, las células fueron removidas mecánicamente con una espátula destinada para este fin (*Cell scraper, Orange*) y tratadas con una solución de lisis celular que contuvo Buffer RIPA (*Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL*) Na₃VO₄ (10 mM), PMSF (1 mM) y mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasas (*Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL*) por 20 minutos a 4°C. El lisado celular obtenido fue centrifugado a 15.000 \times g por 20 min. a 4°C. Se rescató el sobrenadante y se midió concentración de proteínas mediante el *kit Commassie Plus*, de acuerdo a las instrucciones del proveedor (*Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL*). Las proteínas fueron denaturadas por 5 min. a 95°C y diluidas en una solución que contuvo Tris-HCl (52,5 mM, pH 6,8), glicerol (10% v/v), dodecil sulfato de sodio (2% p/v), DTT (100 mM) y azul de bromofenol (0,01% p/v). Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta el momento de la electroforesis.

10.5. Inmunodetección por Western blot.

Las proteínas obtenidas fueron separadas electroforéticamente en geles de SDS-PAGE al 10% en una cámara Miniprotean (BioRad) y transferidas a membranas de nitrocelulosa (*Thermo Scientific, Rockford, IL*), por medio de un sistema de electro-transferencia utilizando el equipo PierceG2 Fast Blotter (*Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL*). Las membranas de nitrocelulosa fueron bloqueadas con leche o albúmina de suero bovino (BSA) al 5% en TBS-Tween-20 (0,05% v/v) (TBS-T) por 1 h a temperatura ambiente y posteriormente incubadas con los anticuerpos primarios correspondientes; anti-fosfo-AMPK (Thr 172) (*rabbit, 1:1.000*), anti-AMPK α (*rabbit, 1:1.000*), anti- β -actina (*mouse, 1:5.000*), anti-PGC-1 α (*rabbit, 1:1000*) y anti-GAPDH (*rabbit, 1:1000*) disueltos en leche o BSA al 5% en TBS-T (0,05% v/v) a 4°C durante toda la noche (12-16 h) con agitación. Posteriormente, las membranas fueron lavados con TBS-T (0,05% v/v) e incubadas con los respectivos anticuerpos secundarios (*anti-rabbit* o *anti-mouse, 1:1.000*, conjugados a la enzima peroxidasa de rábano, *Sigma*) en leche o BSA al 5% en TBS-T (0,05% v/v) por 1 h a temperatura ambiente con agitación. La detección de las proteínas se realizó mediante un ensayo de quimioluminiscencia (*Thermo Scientific enhanced chemiluminescence Western blotting detection system*)

10.6. Medición de la actividad transcripcional.

Para determinar la actividad transcripcional de PGC-1 α , se utilizó un gen reportero asociado con luciferasa. En principio se utilizó el plasmidio PGC-1 α promoter luciferase deltaMEF (Addgene, plasmidio 8889), luego se utilizó el plasmidio PGC-1 α promoter 2kb luciferasa (Addgene, plasmidio 8887). Los cardiomiocitos fueron co-transfectados con el plasmidio PGC-1 α y un plasmidio que expresa Renilla (CMV-Renilla) como control de transfección. Luego se determinó la actividad luciferasa utilizando el kit “Dual-Luciferase Reporter Assay System” (Promega) en un luminómetro. Los datos se expresan como razón Luciferasa/Renilla.

10.7. Inmunofluorescencia.

Luego de los estímulos correspondientes, las células fueron lavadas con PBS 1x a 4°C, fijadas en paraformaldehído al 4% por 15 min. y tratadas con Triton X-100 al 0,01% con el fin de permeabilizar las células y posteriormente se incubó con solución de bloqueo

(BSA 1% en PBS) por 1 h a temperatura ambiente. Las células se incubaron con un anticuerpo específico (anti PGC-1 α , 1:100) a 4°C durante toda la noche. Luego de la incubación las células fueron lavadas con PBS 1x y se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor 488 (*anti rabbit*, 1:500) durante 1 h para posteriormente incubarse con Hoechst 1:500 por 5 min. Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio de fluorescencia (Colibri 2, Carl Zeiss, Alemania), donde se recolectaron imágenes de al menos 100 células por condición experimental utilizando un aumento 63 \times . El análisis de las imágenes se realizó utilizando regiones de interés (ROI) circulares de 40 x 40 píxeles.

10.8. PCR en tiempo real.

El ARN se extrajo de las placas de cultivo utilizando 1mL de reactivo TRIZOL (Invitrogen). La pureza del ARN se verificó mediante la razón de absorbancia 260 nm/280 nm y su concentración se determinó en un espectrofotómetro Thermo Genesys 10UV. Para la síntesis de cADN a partir de ARN extraído por transcripción inversa se utilizó 1 μ g de ARN y la enzima SuperScriptII (Invitrogen). Una vez obtenido el cDNA, se tomaron 2 μ L del producto de la reacción reversa y se realizó un PCR en tiempo real en un termociclador StepOnePlus (Applied Biosystems) usando un kit de amplificación Brilliant III Ultra-Fast QPCR & QRT-PCR Master Mix (Agilent Technologies) utilizando partidores específicos: para HKII (partidor sentido CCAGCAGAACAGCCTAGACC y partidor antisentido AGATGCCTTGAATCCCTTTG); para PFK-2 (partidor sentido CCTATGCACTAGCCAACTTC y partidor antisentido CACCCGCATCAATCTCATTC); para GLUT4 (partidos sentido TTCCAGCAGATCGGCTCTGA y partidor antisentido AAGACATTGTTGGCCAGCAT). Como control se utilizó 18S (partidor sentido CGACGACCCATTCTGAACGTCT y partidor antisentido GCTATTGGAGCATGGAATTACCG).

10.9. Captación de 2-NBDG.

Para evaluar la captación de glucosa por testosterona, las células fueron sembradas sobre cubreobjetos de vidrio de 25 mm de diámetro en placas de 6 pocillos (500.000 células por cubreobjeto). Luego, los cardiomiocitos fueron tratados con activadores o inhibidores farmacológicos y estimulados con testosterona según corresponde.

Posteriormente, los cardiomiocitos fueron incubados en medio Krebs sin glucosa por 15 min. y luego incubados con el análogo fluorescente de glucosa 2-NBDG (300 μ M) por 15 min. a 37° C, evitando la exposición a la luz. La emisión fluorescente fue recolectada en células únicas (al menos 100 células por cada condición experimental por cultivo) a través de un microscopio de fluorescencia (longitud de onda de excitación $\lambda = \pm 480$ nm), realizando ROI (*Region of interest*) circulares de 30 x 30 píxeles.

10.10. Expresión de resultados y análisis estadístico.

Los datos experimentales se presentan como el promedio \pm error estándar de la media (SEM) de un número de experimentos indicados como (n) o como resultados representativos de al menos 3 experimentos independientes. Los datos experimentales se sometieron a un análisis de varianza y las comparaciones entre los grupos se llevaron a cabo a través de análisis de varianza (ANOVA) y post test tales como Bonferroni o Dunnett, mediante el uso del programa GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, CA). Un valor $p < 0.05$ se consideró como una diferencia estadísticamente significativa.

11. Resultados

11.1 Efecto de la testosterona sobre PGC-1 α

11.1.1 Efecto de la testosterona sobre los niveles proteicos de PGC-1 α . En primer lugar se evaluó el efecto de la testosterona sobre los niveles proteicos de PGC-1 α por western blot. Se utilizó la proteína GAPDH como control de carga. Previamente se demostró que la concentración 100 nM de testosterona induce hipertrofia del cardiomiocito. Por esta razón, las células se estimularon con 100 nM de testosterona desde 0 hasta 24 h (n=3) con el fin de estudiar su efecto sobre PGC-1 α durante el desarrollo de la hipertrofia. Los resultados muestran que la testosterona no afecta los niveles de proteína total de PGC-1 α en los tiempos estudiados (Figura 4).

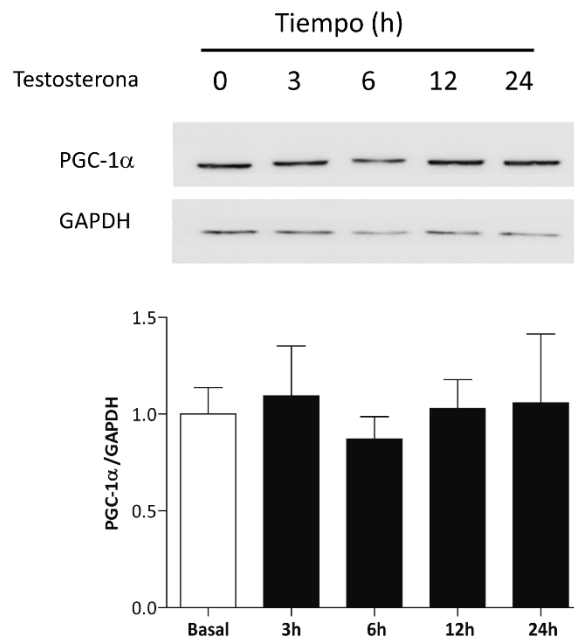


Figura 4: Cinética de estimulación con testosterona 100 nM para PGC-1 α . Los cardiomiocitos fueron tratados con 100 nM de testosterona por los tiempos indicados (n=5). Se utilizó la proteína GAPDH como control de carga. Los datos corresponden al promedio \pm SEM. El análisis estadístico se realizó con análisis de varianza (ANOVA) para múltiples comparaciones seguido del post-test Dunnett. A los tiempos estudiados no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las condiciones vs la condición basal.

11.1.2. Efecto de la testosterona sobre la actividad de PGC-1 α . Para evaluar la actividad transcripcional de PGC-1 α se utilizó un ensayo de gen reportero del promotor de PGC-1 α (PGC-1 α promoter 2kb luciferase). Renilla se utilizó como control del ensayo

reportero. Los cardiomiocitos se co-transfectaron con ambos plasmidios por 24 h y luego se estimularon con 100 nM de testosterona por otras 24 h. Los resultados muestran que la testosterona aumentó la actividad transcripcional de PGC-1 α ($p < 0,001$ vs basal, $n=6$) (Figura 5). Estas condiciones se utilizaron para los siguientes experimentos de la actividad transcripcional de PGC-1 α .

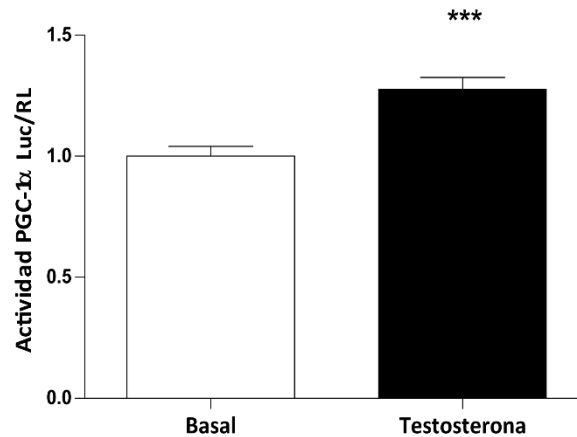


Figura 5: Efecto de la testosterona sobre la actividad transcripcional de PGC-1 α . Las células se co-transfectaron con el plasmidio reportero PGC-1 α -luciferasa (PGC-1 α -luc) y el plasmidio Renilla como control de transfección por 24 h. Luego fueron estimulados con testosterona por 24 h (100 nM) ($n=6$). Los datos corresponden al promedio \pm SEM. . El análisis estadístico se realizó con t-test para muestras no pareadas *** $p < 0,001$ vs basal.

11.1.3. Efecto de la testosterona sobre la localización subcelular de PGC-1 α . PGC-1 α es un cofactor transcripcional que es modulado a través de modificaciones post-traduccionales, las que regulan su localización subcelular (Cantó *et al*, 2009). Producto de estas modificaciones PGC-1 α puede migrar entre citoplasma y núcleo. Para evaluar estos cambios, se determinó la localización subcelular de PGC-1 α mediante inmunofluorescencia.

La Figura 6A muestra que la testosterona (100 nM) aumentó la localización nuclear de PGC-1 α luego de 24 h de estimulación, lo que se traduce en un aumento en la razón núcleo/citoplasma de la proteína ($p < 0,001$ vs basal, 180 células por condición, $n=3$) (Figura 6B).

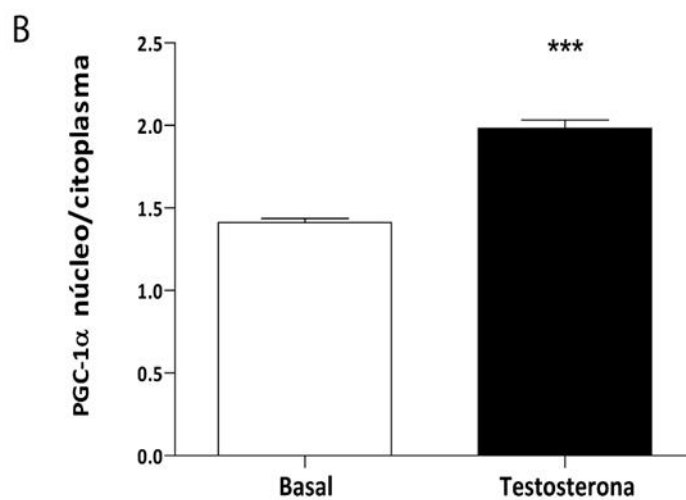
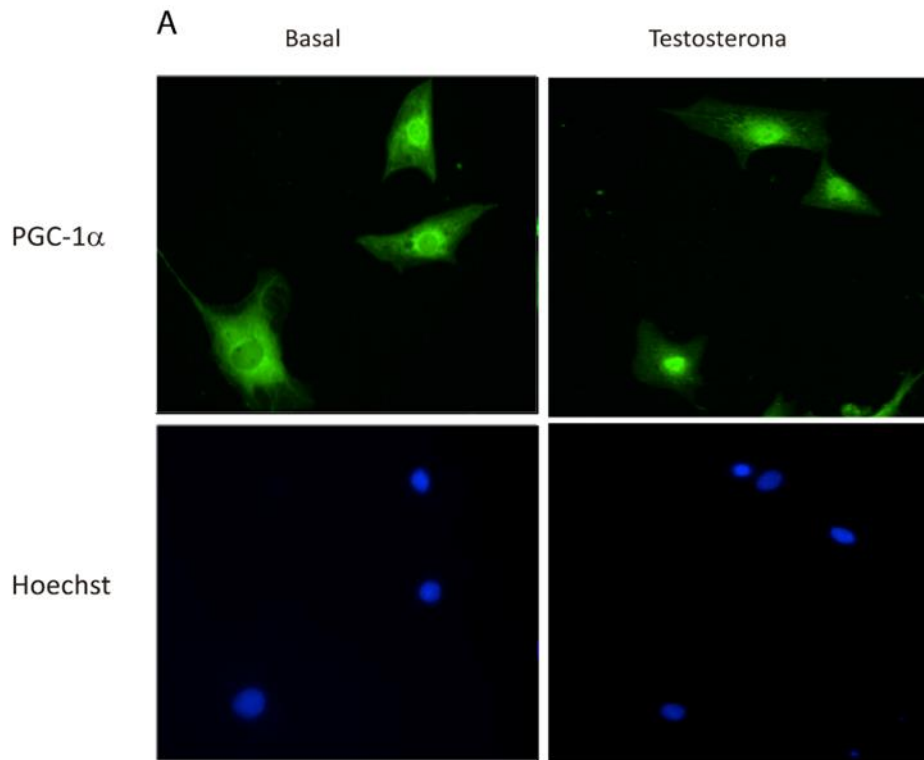


Figura 6: Efecto de la testosterona sobre la localización subcelular de PGC-1 α . Los cardiomiocitos se estimularon con testosterona por 24 h (100 nM) (n=180 células por condición, 3 cultivos independientes). En (A) PGC-1 α en color verde, Hoechst indica los núcleos en azul. En (B) los datos corresponden al promedio \pm SEM. El análisis estadístico se realizó con t-test no pareado. ***p < 0,001 vs basal. UA: unidades arbitrarias

Estos resultados muestran que la testosterona aumenta la actividad transcripcional de PGC-1 α e induce un aumento en la localización nuclear de este cofactor, sin alterar la expresión de la proteína.

11.2. Efecto de la testosterona sobre AMPK.

11.2.1. Efecto de la testosterona sobre la fosforilación de AMPK a tiempos cortos.

Dos proteínas activadoras de PGC-1 α son la AMPK y la CaMKII. Primero, para evaluar la participación de AMPK sobre PGC-1 α se determinó el efecto de la testosterona sobre el estado de fosforilación de AMPK en el residuo Thr172, lo que se correlaciona con la activación de la proteína. Como control positivo se utilizó AICAR, un activador farmacológico de AMPK que tiene una estructura análoga a AMP. La Figura 7 muestra que a concentraciones de 2 mM de AICAR se produce un aumento en la fosforilación de AMPK respecto a la condición basal (n=3).

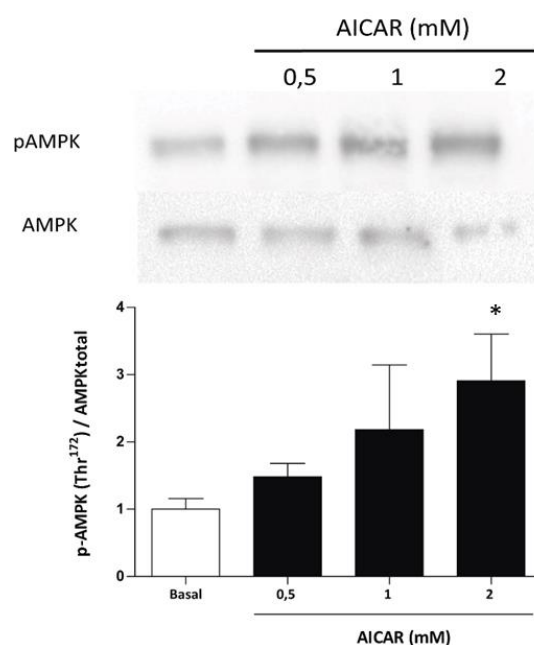


Figura 7: Efecto de la concentración de AICAR sobre la fosforilación de AMPK. Los cardiomiocitos se estimularon con AICAR a la concentraciones descritas por 30 minutos (n=3 para cada condición). Los datos corresponden al promedio \pm SEM. El análisis estadístico se realizó con t-test para muestras no pareadas comparando cada condición vs el basal. *p < 0,05 vs basal.

Luego de esto se realizó una cinética de estimulación con testosterona a tiempos cortos. La Figura 8 muestra que a los 60 min de estimulación con testosterona existe un pequeño aumento en la fosforilación de AMPK. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

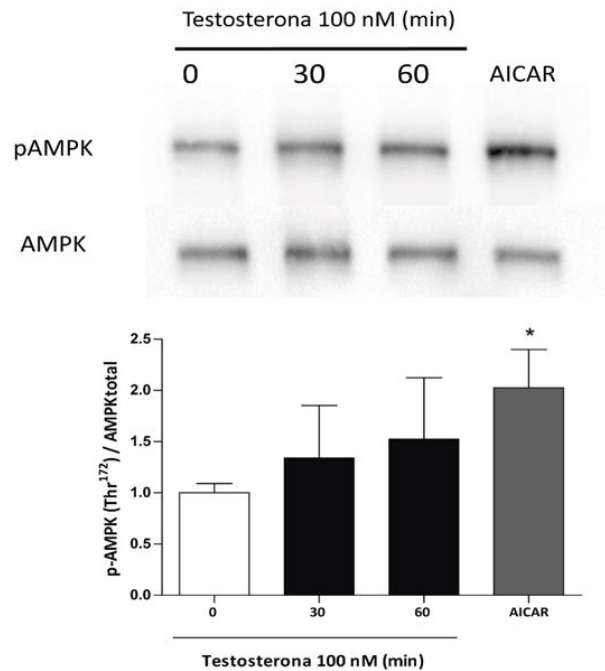


Figura 8: Efecto de la testosterona sobre la fosforilación de AMPK a tiempos cortos. Los cardiomiocitos se estimularon con 100 nM de testosterona por los tiempos indicados (0-60 min) y con 2 mM de AICAR por 30 min (n=3). Los datos corresponden al promedio \pm SEM. El análisis estadístico se realizó con análisis de varianza (ANOVA) para múltiples comparaciones seguido del post-test Dunnett.

11.2.2. Efecto de la testosterona sobre la expresión de AMPK a tiempos largos. Para evaluar los efectos de la testosterona sobre la expresión proteica de AMPK a tiempos largos se realizó una cinética de estimulación desde 0 hasta 24 h (Figura 9). Luego de 24 h de estímulo con 100 nM de testosterona, se observó un aumento en la cantidad de AMPK total ($p < 0,05$ vs basal, n=3).

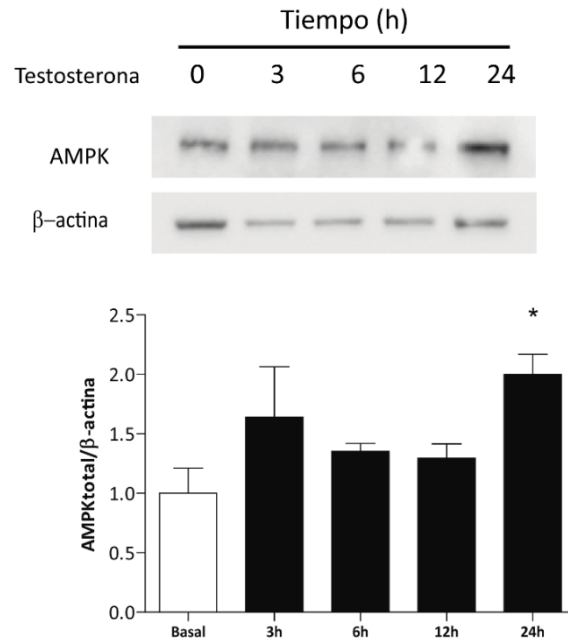


Figura 9: Efectos de la testosterona sobre la expresión de AMPK. Los cardiomiocitos se trataron con 100 nM de testosterona por los tiempos indicados (n=3). Los niveles de proteína de AMPK se determinaron por western blot, se utilizó β -actina como control de carga. Los datos corresponden al promedio \pm SEM. El análisis estadístico se realizó con análisis de varianza (ANOVA) para múltiples comparaciones seguido del post-test Dunnett. *p < 0.05 vs basal.

11.3. Efecto de CaMKII y AMPK sobre PGC-1 α .

11.3.1 Efecto de AMPK sobre la actividad de PGC-1 α . La actividad transcripcional de PGC1 α se evaluó a través del plasmidio PGC-1 α δ MEF (PGC-1 α promoter δ MEF). La participación de AMPK sobre la actividad de PGC-1 α se determinó en cardiomiocitos transfectados con un siRNA contra la isoforma α 2 de AMPK. La Figura 10 muestra que al estimular con testosterona por 24 h y reducir la expresión de AMPK se observa una tendencia al aumento en la actividad de PGC-1 α , sin embargo estos cambios no presentan diferencias estadísticamente significativas (n=3).

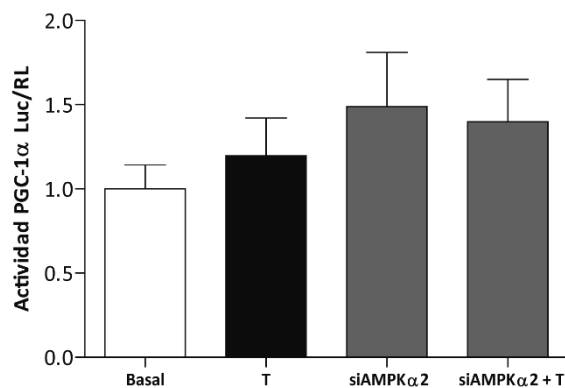


Figura 10: Efecto de AMPK sobre la actividad transcripcional de PGC-1α Las células se co-transfectaron con el plasmidio reportero PGC-1α-luciferasa (PGC-1α-deltaMEF-luc), el plasmidio Renilla-luc (control de transfección) y un siRNA contra AMPKα2 (n=4) por 24 h y luego se estimularon con testosterona (100 nM) por 24 h. Los datos corresponden al promedio ± SEM. El análisis estadístico se realizó con análisis de varianza (ANOVA) para múltiples comparaciones seguido del post-test Bonferroni. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones estudiadas.

11.3.2 Efecto de CaMKII sobre la actividad de PGC-1α. Para determinar la participación de CaMKII sobre la actividad transcripcional de PGC-1α se utilizó *autocamtide-2-related inhibitory peptide* (AIP), un péptido inhibidor de CaMKII. En presencia de este inhibidor el aumento en la actividad transcripcional de PGC-1α-luc inducido por la testosterona fue bloqueado ($p < 0,05$ vs T, n=4) (Figura 11).

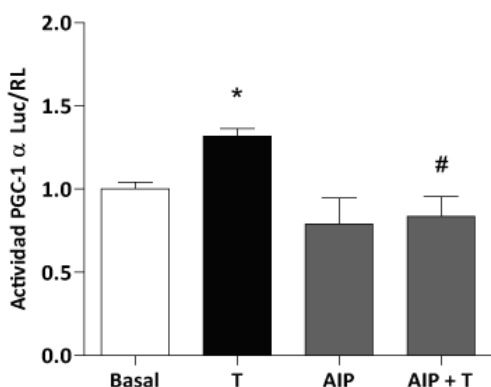


Figura 11: Efecto de CaMKII sobre la actividad transcripcional de PGC-1α: Las células se co-transfectaron con el plasmidio reportero PGC-1α-luciferasa (PGC-1α-luc) y el plasmidio Renilla como control de transfección por 24 h. Los cardiomiocitos se pre-trataron con AIP (1 μM) por 30 min para luego ser estimulados con testosterona por 24 h (100 nM) (n=4). Los datos corresponden al promedio ± SEM. El análisis estadístico se realizó con análisis de varianza (ANOVA) para múltiples comparaciones seguido del post-test Bonferroni. * $p < 0,05$ vs basal. # $p < 0,05$ vs T.

11.3.3. Efecto de CaMKII sobre la localización subcelular de PGC-1 α . Con la finalidad de determinar la participación de CaMKII en la localización intracelular de PGC-1 α , los cardiomiocitos se incubaron con AIP previo al estímulo con testosterona. La Figura 12A muestra que la testosterona aumenta la tinción nuclear de PGC-1 α , efecto que no es observado al utilizar AIP. El gráfico (Figura 12B) muestra que el aumento en la razón núcleo/citoplasma inducido por testosterona fue inhibido con AIP ($p < 0,001$ vs T, $n = 200$ células por condición, 2 cultivos independientes). Este resultado sugiere que CaMKII está involucrada en la regulación de la localización subcelular de PGC-1 α .

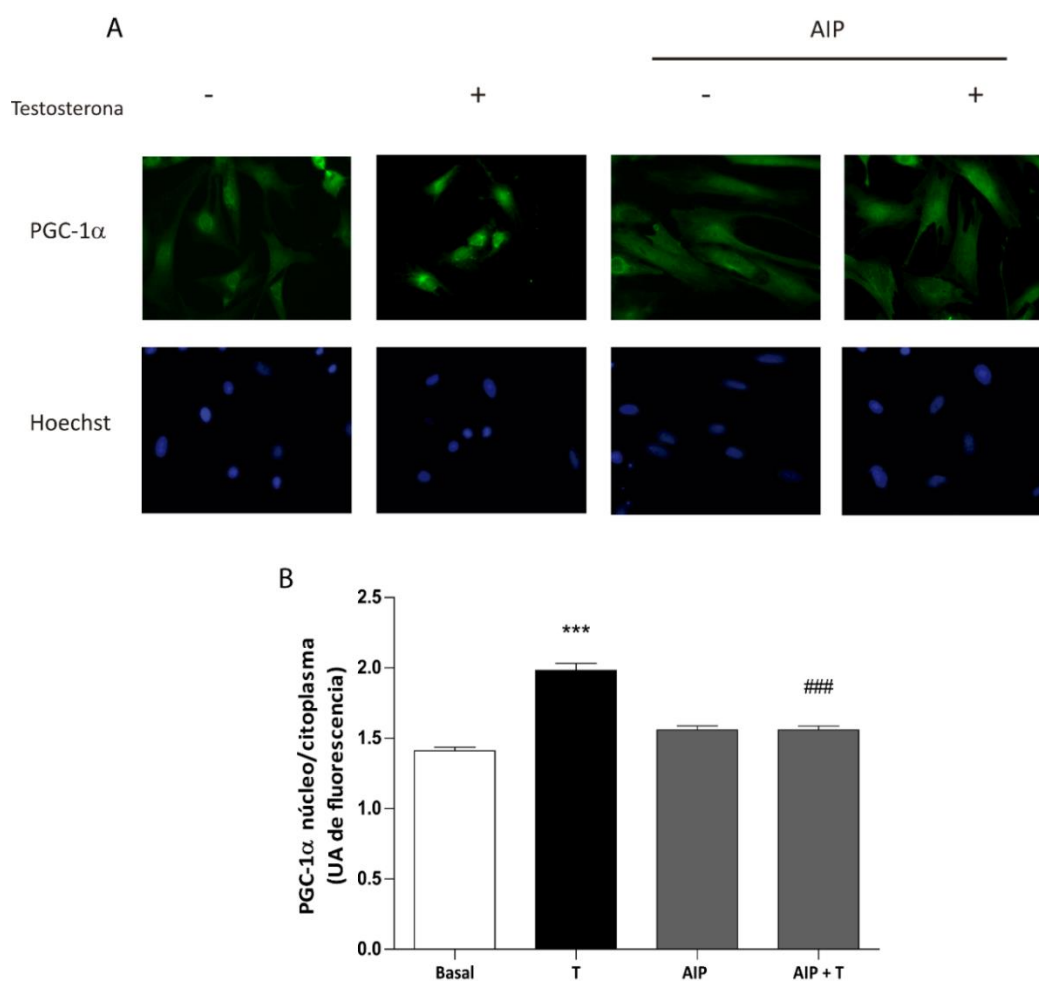


Figura 12: El aumento de la localización nuclear de PGC-1 α estimulado por testosterona depende de CaMKII. Los cardiomiocitos se pre-trataron con AIP (1 μ M) por 30 min para luego ser estimulados con 100 nM de testosterona por 24 h ($n = 200$ células por condición, 2 cultivos independientes). En (A) PGC-1 α en color verde, Hoechst indica los núcleos. En (B) los datos corresponden al promedio \pm SEM. El análisis estadístico se realizó con análisis de varianza (ANOVA) para múltiples comparaciones seguido del post-test Bonferroni. *** $p < 0,001$ vs basal. ### $p < 0,001$ vs T.

11.4. Cambios en la expresión de genes metabólicos inducidos por la testosterona.

Diversos estudios han demostrado que la testosterona induce cambios en el metabolismo cardiaco (Muthusamy *et al*, 2007; Kelly & Jones, 2013). Datos publicados de nuestro laboratorio muestran que a tiempos cortos la testosterona induce un incremento en la captación de glucosa dependiente de GLUT4 (Wilson *et al*, 2013). Esto sugiere el metabolismo de la glucosa es uno de los principales blancos de la acción de la testosterona. Considerando esto se evaluó la expresión de los genes hexoquinasa II (HKII), fosfofructoquinasa 2 (PFK-2) y el transportador de glucosa GLUT4.

La Figura 13A muestra que la estimulación de los cardiomiocitos con 100 nM de testosterona por 12 h incrementa los niveles de mRNA de HKII ($p < 0,01$ vs basal, $n=3$). No se observaron cambios en la expresión de PFK-2 y GLUT4.

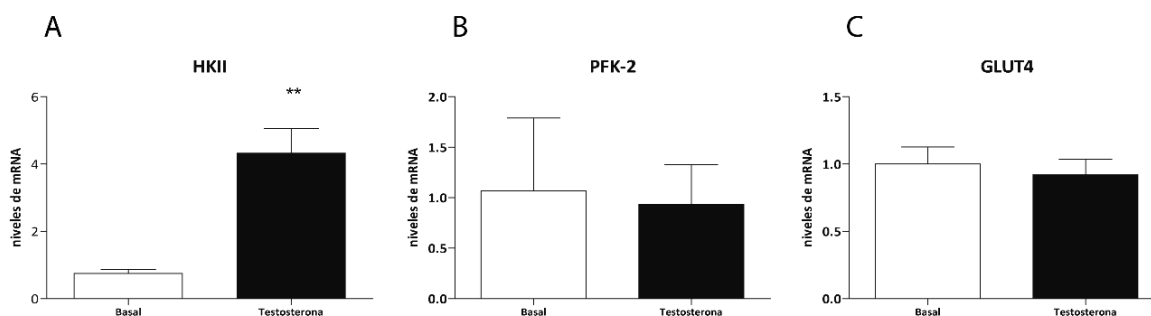


Figura 13: Efecto de la testosterona sobre la expresión de genes del metabolismo glicolítico. Los cardiomiocitos se estimularon con 100 nM de testosterona por 12 h. Se muestran los niveles de mRNA para HKII (A), PFK-2 (B) y GLUT4 (C). Los datos fueron normalizados con el nivel de mRNA de 18S ($n=3$). Los datos corresponden al promedio \pm SEM. El análisis estadístico se realizó con t-test para datos no pareados. $**p < 0,01$ vs basal.

11.5. Participación de GLUT4 en el aumento de la captación de glucosa.

Datos publicados de nuestro grupo de trabajo muestran que testosterona también incrementa la captación de glucosa luego de 24 h de estímulo, por lo que evaluamos la participación de GLUT4 en estas condiciones. La Figura 14 muestra que el incremento en la captación de glucosa inducido por la testosterona fue bloqueado al tratar previamente a los cardiomiocitos con Indinavir, un inhibidor de GLUT4, ($p < 0,05$ vs T, $n=3$), sugiriendo que el aumento de la captación de la glucosa es dependiente de GLUT4.

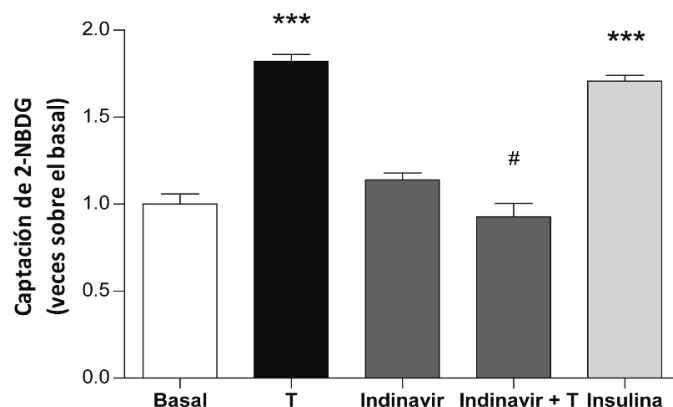


Figura 14: El aumento de la captación de glucosa inducido por testosterona es dependiente de GLUT4. Los cardiomiocitos se incubaron con Indinavir por 30 min (100 μ M) para luego ser estimulados por 24 h con testosterona (100 nM). Como control positivo de la captación de 2-NBDG se utilizó insulina (100 nM) por 15 minutos (n=3). Los datos corresponden al promedio \pm SEM. El análisis estadístico se realizó con análisis de varianza (ANOVA) para múltiples comparaciones seguido del post-test Bonferroni. ***p < 0,001 vs basal. #p < 0,05 vs T.

11.6. Rol de CaMKII y PGC-1 α en el aumento de la captación de glucosa. Para evaluar la participación de PGC-1 α en la captación de glucosa, las células se transfectaron con un siRNA contra PGC-1. La efectividad de este se determinó evaluando la expresión de PGC-1 α por western blot. La Figura 15 muestra que se logró una disminución cercana al 50% en los niveles de la proteína (p < 0,05 vs siRNA scramble, n=3).

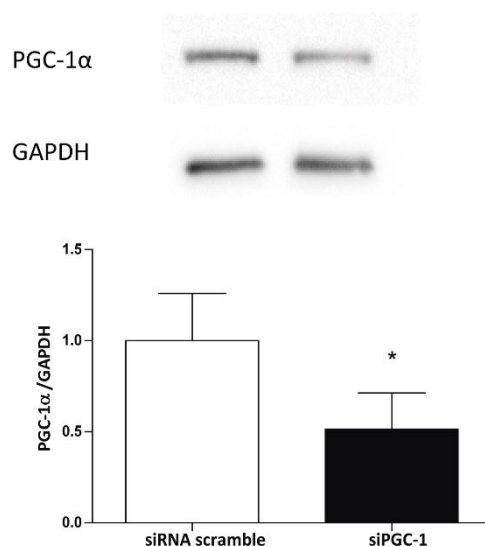


Figura 15: siPGC-1 reduce los niveles de PGC-1 α . Los cardiomiocitos se transfectaron con un siRNA contra PGC-1 por 24 h. La expresión de PGC-1 fue reducida en aproximadamente un 50% respecto a la condición control (siRNA scramble) GAPDH fue utilizado como control de carga (n=3). Los datos corresponden al promedio \pm SEM. El análisis estadístico se realizó con t-test para datos no pareados. *p < 0,05 vs siRNA scramble.

La inhibición de CaMKII con AIP bloqueó el aumento en la captación de glucosa inducido por la testosterona ($p < 0,05$ vs T, $n=3$) (Figura 16A). Más aún, el aumento de la captación de glucosa inducida por la testosterona también es inhibido al disminuir los niveles de PGC-1 α con el siRNA-PGC-1 ($p < 0,05$ vs T, $n=3$) (Figura 16B).

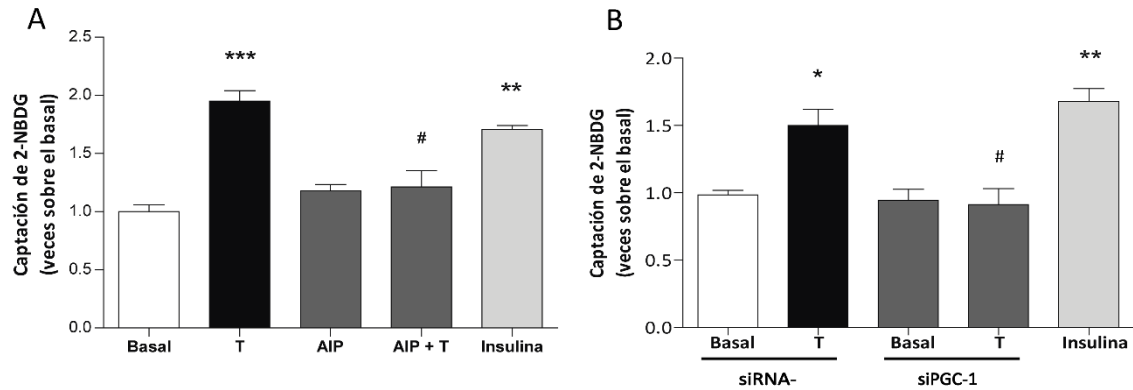


Figura 16: El aumento de la captación de glucosa inducida por testosterona depende de CaMKII y PGC-1 α . Se utilizó 2-NBDG 300 μ M para determinar la captación de glucosa. En (A) los cardiomiocitos se incubaron por 30 min con AIP (1 μ M) ($n=3$) para luego ser estimulados con testosterona (100 nM) por 24h. En (B) los cardiomiocitos se transfectaron con un siRNA control o siRNA contra PGC-1 α por 24 h y luego se estimularon con testosterona por 24 h. Como control positivo de la captación de 2-NBDG se utilizó insulina (100 nM) por 15 minutos ($n=3$). Los datos corresponden al promedio \pm SEM. El análisis estadístico se realizó con análisis de varianza (ANOVA) para múltiples comparaciones seguido del post-test Bonferroni. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs basal. # $p < 0,05$ vs T.

Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que tanto CaMKII como PGC-1 α regulan la acción de la testosterona sobre la captación de glucosa, posiblemente mediante la regulación de la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática.

12. Discusión

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la testosterona sobre parámetros del metabolismo de la glucosa a través de la participación de PGC-1 α en cardiomiocitos. Antecedentes de nuestro grupo de trabajo muestran que la testosterona activa a CaMKII e induce un aumento en la captación de glucosa. Sin embargo el rol de PGC-1 α no ha sido descrito.

En esta tesis se demostró que la testosterona activa a PGC-1 α , lo que es mediado por CaMKII. Además, el aumento en la captación de glucosa inducido por testosterona es dependiente tanto de CaMKII como de PGC-1 α . La Figura 3 muestra que la expresión de PGC-1 α no se modifica luego de 24 h de estimulación con testosterona, lo que sugiere que esta hormona no produce cambios en los niveles de PGC-1 α . Se ha determinado, tanto en miotubos en cultivo como en tejido de músculo esquelético que el tratamiento con testosterona (100 nM) induce aumentos en los niveles de mRNA de PGC-1 α , lo que se correlaciona con aumento en los mRNA de NRF-1 y 2, Tfam y citocromo c, que corresponden a proteínas involucradas en la biogénesis mitocondrial; este efecto fue prevenido tanto al utilizar Flutamida, un inhibidor del RAi, y en ratones *knock out* para el receptor de andrógenos (Usui *et al*, 2014). Además, la testosterona parece ser un regulador clave en patologías metabólicas y cardiovasculares, ya que ratones castrados con infarto del miocardio muestran una disminución en los niveles de PGC-1 α y el tratamiento con testosterona produce aumento de PGC-1 α y disminución del daño al miocardio (Wang *et al*, 2015). Por otro lado, en ratones alimentados con dieta alta en grasas, la deficiencia de testosterona induce una disminución aún mayor en los niveles de PGC-1 α hepáticos y una desregulación de la homeostasis lipídica, lo cual es corregido mediante la suplementación con la hormona (Senmaru *et al*, 2013).

En cardiomiocitos, el aumento en la actividad de PGC-1 α mediado por testosterona podría ser una respuesta clave en patologías como diabetes, obesidad e hipertensión, que impactan al sistema cardiovascular de forma negativa. En estas condiciones la testosterona podría modular los niveles de PGC-1 α de manera de adaptarse a circunstancias que exigen cambios en el metabolismo celular del cardiomiocito. PGC-1 α también es regulado por modificaciones postraduccionales como fosforilación, acetilación y metilación (Knutti & Kralli, 2001; Teyssier *et al*, 2005). De hecho, para

ejercer su acción, PGC-1 α debe estar fosforilada y desacetilada. Por ello, en estudios futuros en esta línea de investigación, sería interesante evaluar los niveles de PGC-1 α fosforilado, acetilado y metilado en cardiomiocitos estimulados con testosterona y si, los posibles cambios en los niveles de fosfo-PGC-1 α pueden ser dependientes de CaMKII o de otras vías como AMPK o p38 MAPK.

Resultados previos de nuestro laboratorio muestran que AMPK es clave para inducir un aumento en la captación de glucosa por testosterona a las 2 h de estimulación (Wilson *et al*, 2013). Sin embargo, evaluar la participación de AMPK sobre el aumento en la captación de glucosa inducido por testosterona a las 24 h no se ha realizado aún. En esta tesis se mostró que testosterona aumenta los niveles de AMPK a 24 h, mismo tiempo en el que existe un aumento en la captación de glucosa. La expresión de la proteína AMPK en corazón aumenta durante el desarrollo fetal, sin embargo comienza a descender luego del nacimiento (Kim *et al*, 2012). El incremento en AMPK podría ser uno de los mecanismos del cardiomiocito para responder a los cambios en las demandas metabólicas generadas durante la hipertrofia inducida por la testosterona.

La Figura 9 muestra que la actividad transcripcional del promotor de PGC-1 α tiende a aumentar en forma basal al transfectar los cardiomiocitos con un siRNA contra AMPK, lo que se podría reflejar un mecanismo compensatorio del metabolismo. Tanto PGC-1 α como AMPK son regulares claves del metabolismo, entonces al disminuir la actividad de uno, el otro podría compensar aumentando su actividad. En un modelo de ratón *knock out* para PGC-1 α se describió que AMPK está constitutivamente activo, lo que refleja un déficit energético que es compensado por otra proteína clave del metabolismo como AMPK (Lin *et al*, 2004). El plasmidio utilizado en estos experimentos presenta una mutación en el sitio de unión de MEF2C en el promotor de PGC-1 α . Resultados del laboratorio muestran que testosterona aumenta la actividad transcripcional de MEF2C, razón por la que no se observaron cambios en el gen reportero en el tratamiento con testosterona. Sin embargo, se necesitan experimentos adicionales para confirmar la participación de AMPK sobre el aumento en la actividad transcripcional de PGC-1 α inducido por la testosterona.

El aumento tanto de la actividad transcripcional como de la localización nuclear de PGC-1 α inducidos por testosterona fueron bloqueados al inhibir CaMKII. Estos datos sugieren que CaMKII está involucrada en la regulación de PGC-1 α . Sin embargo, si este

efecto es a través de una fosforilación directa o mediado por otras proteínas debe ser estudiado en más detalle. Un argumento a favor de este mecanismo es que la testosterona activa a CaMKII, al factor transcripcional MEF2C y a la quinasa p38-MAPK en cardiomiocitos. Además, el aumento en la actividad transcripcional de MEF2C inducido por testosterona es dependiente de CaMKII y p38 MAPK (Tesis Bioquímica Javier Durán 2015). El promotor de PGC-1 α tiene un sitio de unión para MEF2C (Czubryt *et al*, 2003), por lo que las proteínas CaMKII y p38 MAPK podrían ser unas de las vías que la testosterona es capaz de activar para ejercer control sobre los genes regulados por la vía MEF2C/PGC-1 α . Adicionalmente se ha descrito en músculo esquelético que la CaMKIV activa a PGC-1 α promoviendo la unión de CREB a su sitio de unión en el promotor de PGC-1 α . Testosterona también activa a CREB (Estrada *et al*, 2003). Calcineurina activa a PGC-1 α promoviendo la unión de MEF a su sitio en el promotor de PGC-1 α (Handschin *et al*, 2003). Esto demuestra como dos proteínas codificadores de las señales de Ca²⁺ pueden regular el metabolismo a través de PGC-1 α .

En condiciones de ejercicio físico, se produce un aumento en la captación y utilización de glucosa en el músculo, fenómeno que puede ser explicado, en parte, por el aumento en la tasa de transcripción y síntesis proteica de HK-II, lo que produce aumento de la glucosa fosforilada (Devlin, 1992). En esta tesis se muestra que la testosterona induce un aumento en la captación de glucosa y un aumento en la expresión de HK-II, lo que sugiere que la testosterona no solo aumenta la incorporación de glucosa a la célula, sino que además podría estar regulando su utilización mediante un aumento en la expresión de HK-II. El poder determinar cuál será el destino final de la glucosa es sumamente interesante, ya que la testosterona podría estar aumentando la utilización de la glucosa para aumentar la glicólisis o bien estar utilizando la glucosa como sustrato para aumentar el metabolismo oxidativo durante la hipertrofia del cardiomiocito. Resultados no publicados de nuestro laboratorio en colaboración con el laboratorio del Dr. Cristian Ibarra en Suecia indican que la testosterona produce aumento en la tasa de acidificación del medio extracelular y aumenta el consumo de oxígeno en cardiomiocitos, lo que no ocurre utilizando un siRNA contra PGC-1 α . Esto podría apoyar la hipótesis de que el aumento en la captación de glucosa y del mRNA de HKII favorecen la glicólisis. Sin embargo, esto debe ser estudiado en más detalle.

AMPK también regula de la expresión de HK-II. Se ha observado que la activación de AMPK con AICAR produce aumento en la transcripción de HK-II, GLUT4 y proteínas mitocondriales en músculo (Holmes *et al*, 1999; Winder *et al*, 2000; Jessen *et al*, 2003; Jørgensen *et al*, 2007), lo cual no ocurre en ratones *knock out* para la isoforma $\alpha 2$ de AMPK (Jørgensen *et al*, 2005). Además, PGC-1 α es necesario para el aumento en la expresión de GLUT4 y proteínas mitocondriales inducido por AICAR (Leick *et al*, 2010). Esto sugiere un mecanismo diferencial en músculo esquelético, ya que la expresión de estas proteínas parece ser regulado por el eje AMPK/PGC-1 α . Por lo tanto, evaluar si AMPK regula la expresión de los genes antes descritos sería clave para determinar la participación del eje AMPK/PGC-1 sobre los cambios en la expresión de HK-II y la captación de glucosa inducida por testosterona en cardiomiocitos.

Los resultados de esta tesis están de acuerdo a los observados al tratar miotubos de la línea celular C2C12 con dehidroepiandrosterona (DHEA), un precursor de la testosterona. En estas células se observó que existe un aumento en la captación de glucosa, activación de AMPK y aumento en la expresión de PGC-1 α a las 3 y 6 h de tratamiento con DHEA (Yokokawa *et al*, 2015). En otro estudio utilizando tejido muscular proveniente de animales castrados se determinó que existe un aumento en el mRNA de PGC-1 α que es revertido al tratar los animales con nandrolona, un derivado sintético de la testosterona. Sin embargo, no se observaron cambios en la fosforilación de AMPK (White *et al*, 2013). Más aún, al tratar con testosterona miotubos provenientes de biopsias humanas de músculo se observó una disminución en la incorporación de glucosa a glucógeno y aumento en la oxidación de ácidos grasos, aunque no hubo cambios en la fosforilación de AMPK (Garrido *et al*, 2014). En adipocitos se ha descrito que la testosterona aumenta la captación de glucosa y translocación de GLUT4 a través de la vía LKB1/AMPK a las 2 h de tratamiento (Mitsubishi *et al*, 2015). Esto sugiere que los andrógenos regulan el metabolismo a través vías metabólicas comunes como PGC-1 α , ya sea como estímulo agudo (6 h) o a largo plazo (animales castrados), sin embargo el rol de AMPK no está del todo claro.

La mayor parte de los resultados presentados en esta tesis se obtuvieron de cardiomiocitos estimulados con testosterona por 24 h. A este tiempo el cardiomiocito presenta un fenotipo hipertrófico. Se ha descrito que en estas condiciones la hipertrofia del cardiomiocito es dependiente del RAi (Marsh *et al*, 1998). En cáncer de próstata se

ha mostrado que existe una interacción física entre PGC-1 α y el RAI lo que promueve el crecimiento tumoral mediado por el RAI (Shiota *et al*, 2010). Por lo tanto, sería interesante evaluar si los efectos metabólicos de la testosterona observados en estas tesis son dependientes del RAI y si además, esta hormona promueve la interacción de PGC-1 α con el RAI para ejercer sus efectos en el cardiomiocito. Tanto la hipertrofia como los cambios en el metabolismo del cardiomiocito inducidos por la testosterona parecen ser consecuencia de activación de vías genómicas y no-genómicas, lo que sugiere a esta hormona como un modulador global del funcionamiento del cardiomiocito en condiciones fisiológicas y patológicas.

En conclusión, los resultados de esta tesis muestran que la testosterona activa a PGC-1 α a través de CaMKII, lo que regula el aumento en la captación de glucosa durante la hipertrofia del cardiomiocito inducida por esta hormona (Figura 16).

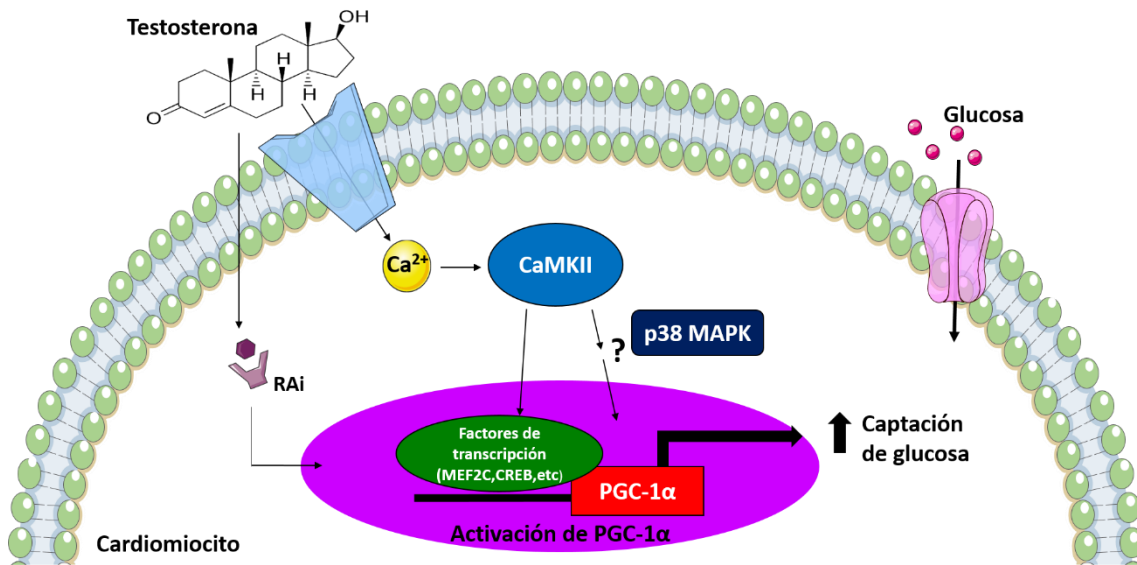


Figura 17: Modelo propuesto de trabajo. Se postula que la testosterona activa a PGC-1 α a través de CaMKII, lo que genera un aumento en la captación de glucosa. Además se determinó que la testosterona aumenta la expresión de HKII.

13. Proyecciones

Producto de las conclusiones de este estudio se destaca que la testosterona produce cambios en el metabolismo de la glucosa durante la hipertrofia del cardiomiocito, lo que es mediado por la vía CaMKII/PGC-1 α . El poder determinar cuáles son los efectos de la testosterona sobre el metabolismo oxidativo resulta un punto clave para conocer el efecto global de esta hormona en los cardiomiocitos.

Otros trabajos han demostrado la relación que existe entre los niveles de testosterona y diversas patologías metabólicas y cardíacas. Por lo tanto, desarrollar investigaciones *in vivo* que permitan dilucidar el mecanismo de acción de la testosterona es el siguiente paso lógico para evaluar el efecto sistémico de la hormona, para así poder observar los beneficios y posibles efectos adversos.

14. Limitaciones del estudio

Los resultados presentados en esta tesis corresponden al trabajo con cardiomiocitos de ratas neonatas. A pesar de las muchas similitudes, las células cardíacas de animales recién nacidos tienen ciertas diferencias con las de animales adultos. Por lo que es necesario evaluar si los efectos de la testosterona observados en esta esta tesis son similares en cardiomiocitos adultos.

Por otro lado, no se determinó si los cambios en metabolismo del cardiomiocito son dependientes del RAi, el mecanismo clásico de acción de la testosterona. Evaluar la participación del RAi y la posible interacción con PGC-1 α es clave para dilucidar el mecanismo de acción la testosterona en el cardiomiocito.

16. Bibliografía

1. Allard MF (2004) Energy substrate metabolism in cardiac hypertrophy. *Curr. Hypertens. Rep.* **6**: 430–435
2. Altamirano F, Oyarce C, Silva P, Toyos M, Wilson C, Lavandero S, Uhlén P & Estrada M (2009) Testosterone induces cardiomyocyte hypertrophy through mammalian target of rapamycin complex 1 pathway. *J. Endocrinol.* **202**: 299–307
3. Arany Z, He H, Lin J, Hoyer K, Handschin C, Toka O, Ahmad F, Matsui T, Chin S, Wu P-H, Rybkin II, Shelton JM, Manieri M, Cinti S, Schoen FJ, Bassel-Duby R, Rosenzweig A, Ingwall JS & Spiegelman BM (2005) Transcriptional coactivator PGC-1 alpha controls the energy state and contractile function of cardiac muscle. *Cell Metab.* **1**: 259–71
4. Balaban RS (2012) Perspectives on: SGP symposium on mitochondrial physiology and medicine: metabolic homeostasis of the heart. *J. Gen. Physiol.* **139**: 407–14
5. Barger PM, Brandt JM, Leone TC, Weinheimer CJ & Kelly DP (2000) Deactivation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha during cardiac hypertrophic growth. *J. Clin. Invest.* **105**: 1723–1730
6. Beato M, Arnemann J, Chalepakis G, Slater E & Willmann T (1987) Gene regulation by steroid hormones. *J. Steroid Biochem.* **27**: 9–14
7. Berridge MJ, Lipp P & Bootman MD (2000) The versatility and Signalling. **1**:
8. Bers DM (2008) Calcium Cycling and Signaling in Cardiac Myocytes. *Annu. Rev. Physiol.* **70**: 23–49
9. Brady NR, Hamacher-Brady A, Yuan H & Gottlieb R a (2007) The autophagic response to nutrient deprivation in the hl-1 cardiac myocyte is modulated by Bcl-2 and sarco/endoplasmic reticulum calcium stores. *FEBS J.* **274**: 3184–97
10. Bround MJ, Wambolt R, Luciani DS, Kulpa JE, Rodrigues B, Brownsey RW, Allard MF & Johnson JD (2013) Cardiomyocyte ATP production, metabolic flexibility, and survival require calcium flux through cardiac ryanodine receptors in vivo. *J. Biol. Chem.* **288**: 18975–86
11. Brownsey RW, Boone a N & Allard MF (1997) Actions of insulin on the mammalian heart: metabolism, pathology and biochemical mechanisms. *Cardiovasc. Res.* **34**: 3–24

12. Cantó C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, Elliott PJ, Puigserver P & Auwerx J (2009) AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature* **458**: 1056–60
13. Carling D, Aguan K, Woods A, Verhoeven AJ, Beri RK, Brennan CH, Sidebottom C, Davison MD & Scott J (1994) Mammalian AMP-activated protein kinase is homologous to yeast and plant protein kinases involved in the regulation of carbon metabolism. *J. Biol. Chem.* **269**: 11442–11448
14. Chen Z, Heierhorst J, Mann RJ, Mitchelhill KI, Michell BJ, Witters LA, Lynch GS, Kemp BE & Stapleton D (1999) Expression of the AMP-activated protein kinase beta1 and beta2 subunits in skeletal muscle. *FEBS Lett.* **460**: 343–348
15. Cook NL & Romashkan S (2011) Why do we need a trial on the effects of testosterone therapy in older men? *Clin. Pharmacol. Ther.* **89**: 29–31
16. Czubryt MP, Mcanally J, Fishman GI & Olson EN (2003) Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor coactivator 1 α (PGC-1 α) and mitochondrial function by MEF2 and HDAC5. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 1711–1716
17. Depré C, Rider MH & Hue L (1998) Mechanisms of control of heart glycolysis. *Eur. J. Biochem.* **258**: 277–290
18. Devlin JT (1992) Effects of exercise on insulin sensitivity in humans. *Diabetes Care* **15**: 1690–3
19. Dolinsky VW & Dyck JRB (2006) Role of AMP-activated protein kinase in healthy and diseased hearts.
20. Elcarpio JOB, Ahinski ANB & Zzo NIJI (1998) HL-1 cells : A cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. **95**: 2979–2984
21. Estrada M, Espinosa A, Müller M & Jaimovich E (2003) Testosterone stimulates intracellular calcium release and mitogen-activated protein kinases via a G protein-coupled receptor in skeletal muscle cells. *Endocrinology* **144**: 3586–97
22. Ewart M-A & Kennedy S (2011) AMPK and vasculoprotection. *Pharmacol. Ther.* **131**: 242–53
23. Fernandez-Marcos PJ & Auwerx J (2011) Regulation of PGC-1 α , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *Am. J. Clin. Nutr.* **93**: 884S–90
24. Foradori CD, Weiser MJ & Handa RJ (2008) Non-genomic actions of androgens.

Front. Neuroendocrinol. **29**: 169–181

25. Garnier a, Fortin D, Deloménie C, Momken I, Veksler V & Ventura-Clapier R (2003) Depressed mitochondrial transcription factors and oxidative capacity in rat failing cardiac and skeletal muscles. *J. Physiol.* **551**: 491–501
26. Garrido P, Salehzadeh F, Duque-Guimaraes DE & Al-Khalili L (2014) Negative regulation of glucose metabolism in human myotubes by supraphysiological doses of 17 β -estradiol or testosterone. *Metabolism.* **63**: 1178–87
27. Guerfali I, Manissolle C, Durieux A-C, Bonnefoy R, Bartegi A & Freyssenet D (2007) Calcineurin A and CaMKIV transactivate PGC-1 α promoter, but differentially regulate cytochrome c promoter in rat skeletal muscle. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* **454**: 297–305
28. Guo Z, Benten WPM, Krücken J & Wunderlich F (2002) Nongenomic testosterone calcium signaling. Genotropic actions in androgen receptor-free macrophages. *J. Biol. Chem.* **277**: 29600–29607
29. Handschin C, Rhee J, Lin J, Tarr PT & Spiegelman BM (2003) An autoregulatory loop controls peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha expression in muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 7111–7116
30. Handschin C & Spiegelman BM (2006) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. *Endocr. Rev.* **27**: 728–35
31. Hardie DG (2011) Sensing of energy and nutrients by AMP-activated protein kinase 1 – 4. **93**:
32. Hawley SA, Davison M, Woods A, Davies SP, Beri RK, Carling D & Hardie DG (1996) Characterization of the AMP-activated protein kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **271**: 27879–27887
33. Heidrich F, Schotola H, Popov AF, Sohns C, Schuenemann J, Friedrich M, Coskun KO, von Lewinski D, Hinz J, Bauer M, Mokashi S a, Sossalla S & Schmitto JD (2010) AMPK - Activated Protein Kinase and its Role in Energy Metabolism of the Heart. *Curr. Cardiol. Rev.* **6**: 337–42
34. Hickson RC, Galassi TM, Kurowski TT, Daniels DG & Chatterton RT (1984) Androgen and glucocorticoid mechanisms in exercise-induced cardiac hypertrophy. *Am.*

J. Physiol. **246**: H761–H767

35. Hoch B, Meyer R, Hetzer R, Krause E-G & Karczewski P (1999) Identification and Expression of α -Isoforms of the Multifunctional Ca^{2+} /Calmodulin-Dependent Protein Kinase in Failing and Nonfailing Human Myocardium. *Circ. Res.* **84**: 713–721
36. Holmes BF, Kurth-Kraczek EJ & Winder WW (1999) Chronic activation of 5'-AMP-activated protein kinase increases GLUT-4, hexokinase, and glycogen in muscle. *J Appl Physiol* **87**: 1990–1995
37. Hong H-M, Song EJ, Oh E, Kabir MH, Lee C & Yoo YS (2011) Endothelin-1 and isoproterenol-induced differential protein expression and signaling pathway in HL-1 cardiomyocytes. *Proteomics* **11**: 283–97
38. Ikeda Y, Aihara K, Sato T, Akaike M, Yoshizumi M, Suzaki Y, Izawa Y, Fujimura M, Hashizume S, Kato M, Yagi S, Tamaki T, Kawano H, Matsumoto T, Azuma H, Kato S & Matsumoto T (2005) Androgen Receptor Gene Knockout Male Mice Exhibit Impaired Cardiac Growth and Exacerbation of Angiotensin II-induced Cardiac Fibrosis. *J. Biol. Chem.* **280**: 29661–29666
39. Ingwall JS (2009) Energy metabolism in heart failure and remodelling. *Cardiovasc. Res.* **81**: 412–9
40. Jenning EH, Schoonjans K & Auwerx J (2010) Reversible acetylation of PGC-1 α : connecting energy sensors and effectors to guarantee metabolic flexibility. *Oncogene* **29**: 4617–4624
41. Jessen N, Pold R, Buhl ES, Jensen LS, Schmitz O & Lund S (2003) Effects of AICAR and exercise on insulin-stimulated glucose uptake, signaling, and GLUT-4 content in rat muscles. *J. Appl. Physiol.* **94**: 1373–9
42. Jørgensen SB, Treebak JT, Viollet B, Schjerling P, Vaulont S, Wojtaszewski JFP & Richter EA (2007) Role of AMPK α 2 in basal, training-, and AICAR-induced GLUT4, hexokinase II, and mitochondrial protein expression in mouse muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **292**: E331–E339
43. Jørgensen SB, Wojtaszewski JFP, Viollet B, Andreelli F, Birk JB, Hellsten Y, Schjerling P, Vaulont S, Neuffer PD, Richter EA & Pilegaard H (2005) Effects of alpha-AMPK knockout on exercise-induced gene activation in mouse skeletal muscle. *FASEB J.* **19**: 1146–1148
44. Kelly DM & Jones TH (2013) Testosterone: a metabolic hormone in health and

disease. *J. Endocrinol.* **217**: R25–45

45. Kim M, Shen M, Ngoy S, Karamanlidis G, Liao R & Tian R (2012) AMPK isoform expression in the normal and failing hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **52**: 1066–1073
46. Knutti D & Kralli A (2001) PGC-1, a versatile coactivator. *Trends Endocrinol. Metab.* **12**: 360–365
47. Knutti D, Kressler D & Kralli a (2001) Regulation of the transcriptional coactivator PGC-1 via MAPK-sensitive interaction with a repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 9713–9718
48. Lehman JJ, Barger PM, Kovacs A, Saffitz JE, Medeiros DM & Kelly DP (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J. Clin. Invest.* **106**: 847–856
49. Lehman JJ & Kelly DP (2002) Gene regulatory mechanisms governing energy metabolism during cardiac hypertrophic growth. *Heart Fail. Rev.* **7**: 175–185
50. Leick L, Fentz J, Biensø RS, Knudsen JG, Jeppesen J, Kiens B, Wojtaszewski JFP & Pilegaard H (2010) PGC-1{alpha} is required for AICAR-induced expression of GLUT4 and mitochondrial proteins in mouse skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **299**: E456–65
51. Li C & Keaney JF (2010) AMP-activated protein kinase: A stress-responsive kinase with implications for cardiovascular disease. *Curr. Opin. Pharmacol.* **10**: 111–115
52. Li Y, Kishimoto I, Saito Y, Harada M, Kuwahara K, Izumi T, Hamanaka I, Takahashi N, Kawakami R, Tanimoto K, Nakagawa Y, Nakanishi M, Adachi Y, Garbers DL, Fukamizu A & Nakao K (2004) Androgen contributes to gender-related cardiac hypertrophy and fibrosis in mice lacking the gene encoding guanylyl cyclase-A. *Endocrinology* **145**: 951–958
53. Lin J, Handschin C & Spiegelman BM (2005) Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab.* **1**: 361–70
54. Lin J, Wu PH, Tarr PT, Lindenberg KS, St-Pierre J, Zhang CY, Mootha VK, Jäger S, Vianna CR, Reznick RM, Cui L, Manieri M, Donovan MX, Wu Z, Cooper MP, Fan MC, Rohas LM, Zavacki AM, Cinti S, Shulman GI, et al (2004) Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1 α null mice. *Cell* **119**: 121–135
55. Malkin CJ, Pugh PJ, Morris PD, Asif S, Jones TH & Channer KS (2010) Low

- serum testosterone and increased mortality in men with coronary heart disease. *Heart* **96**: 1821–1825
56. Marsh JD, Lehmann MH, Ritchie RH, Gwathmey JK, Green GE & Schiebinger RJ (1998) Androgen Receptors Mediate Hypertrophy in Cardiac Myocytes. *Circulation* **98**: 256–261
57. Mitsuhashi K, Senmaru T, Fukuda T, Yamazaki M, Shinomiya K, Ueno M, Kinoshita S, Kitawaki J, Katsuyama M, Tsujikawa M, Obayashi H, Nakamura N & Fukui M (2015) Testosterone stimulates glucose uptake and GLUT4 translocation through LKB1/AMPK signaling in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrine*
58. Mooradian AD, Morley JE & Korenman SG (1987) Biological actions of androgens. *Endocr. Rev.* **8**: 1–28
59. Muthusamy T, Dhevika S, Murugesan P & Balasubramanian K (2007) Testosterone deficiency impairs glucose oxidation through defective insulin and its receptor gene expression in target tissues of adult male rats. *Life Sci.* **81**: 534–42
60. Nahrendorf M, Frantz S, Hu K, Von Zur Mühlen C, Tomaszewski M, Scheuermann H, Kaiser R, Jazbutyte V, Beer S, Bauer W, Neubauer S, Ertl G, Allolio B & Callies F (2003) Effect of testosterone on post-myocardial infarction remodeling and function. *Cardiovasc. Res.* **57**: 370–378
61. Nguyen S V & Claycomb WC (1999) Hypoxia regulates the expression of the adrenomedullin and HIF-1 genes in cultured HL-1 cardiomyocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **265**: 382–6
62. Ojuka EO (2004) Role of calcium and AMP kinase in the regulation of mitochondrial biogenesis and GLUT4 levels in muscle. *Proc. Nutr. Soc.* **63**: 275–8
63. Ojuka EO, Jones TE, Han D-H, Chen M & Holloszy JO (2003) Raising Ca²⁺ in L6 myotubes mimics effects of exercise on mitochondrial biogenesis in muscle. *FASEB J.* **17**: 675–681
64. Patten IS & Arany Z (2012) PGC-1 coactivators in the cardiovascular system. *Trends Endocrinol. Metab.* **23**: 90–7
65. Pi M, Parrill AL & Quarles LD (2010) GPRC6A mediates the non-genomic effects of steroids. *J. Biol. Chem.* **285**: 39953–39964
66. Puigserver P, Rhee J, Lin J, Wu Z, Yoon JC, Zhang CY, Krauss S, Mootha VK, Lowell BB & Spiegelman BM (2001) Cytokine Stimulation of Energy Expenditure

- through p38 MAP Kinase Activation of PPAR γ Coactivator-1. *Mol. Cell* **8**: 971–982
67. Riehle C & Abel ED (2012) PGC-1 proteins and heart failure. *Trends Cardiovasc. Med.* **22**: 98–105
68. Russell RR, Li J, Coven DL, Pypaert M, Zechner C, Palmeri M, Giordano FJ, Mu J, Birnbaum MJ & Young LH (2004) AMP-activated protein kinase mediates ischemic glucose uptake and prevents postischemic cardiac dysfunction, apoptosis, and injury. *J. Clin. Invest.* **114**: 495–503
69. Saad F (2009) The role of testosterone in type 2 diabetes and metabolic syndrome in men. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* **53**: 901–907
70. Saad F & Gooren L (2009) The role of testosterone in the metabolic syndrome: A review. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **114**: 40–43
71. Sachtleben TR, Berg KE, Elias BA, Cheatham JP, Felix GL & Hofschire PJ (1993) The effects of anabolic steroids on myocardial structure and cardiovascular fitness. *Med. Sci. Sports Exerc.* **25**: 1240–5
72. Sakamoto K, Zarrinpashneh E, Budas GR, Pouleur A, Prescott AR, Vanoverschelde J, Ashworth A, Alessi DR & Bertrand L (2007) UKPMC Funders Group Deficiency of LKB1 in heart prevents ischemia-mediated activation of AMPK α 2 but not AMPK α 1. **290**: 1–19
73. Sambandam N & Lopaschuk GD (2003) AMP-activated protein kinase (AMPK) control of fatty acid and glucose metabolism in the ischemic heart. *Prog. Lipid Res.* **42**: 238–256
74. Schaeffer PJ, Wende AR, Magee CJ, Neilson JR, Leone TC, Chen F & Kelly DP (2004a) Calcineurin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase activate distinct metabolic gene regulatory programs in cardiac muscle. *J. Biol. Chem.* **279**: 39593–39603
75. Schaeffer PJ, Wende AR, Magee CJ, Neilson JR, Leone TC, Chen F & Kelly DP (2004b) Calcineurin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase activate distinct metabolic gene regulatory programs in cardiac muscle. *J. Biol. Chem.* **279**: 39593–603
76. Scolletta S & Biagioli B (2010) Energetic myocardial metabolism and oxidative stress: Let's make them our friends in the fight against heart failure. *Biomed. Pharmacother.* **64**: 203–207
77. Senmaru T, Fukui M, Okada H, Mineoka Y, Yamazaki M, Tsujikawa M, Hasegawa G, Kitawaki J, Obayashi H & Nakamura N (2013) Testosterone deficiency

induces markedly decreased serum triglycerides, increased small dense LDL, and hepatic steatosis mediated by dysregulation of lipid assembly and secretion in mice fed a high-fat diet. *Metabolism*. **62**: 851–60

78. Shaw RJ, Kosmatka M, Bardeesy N, Hurley RL, Witters LA, DePinho RA & Cantley LC (2004) The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 3329–3335

79. Shiota M, Yokomizo A, Tada Y, Inokuchi J, Tatsugami K, Kuroiwa K, Uchiumi T, Fujimoto N, Seki N & Naito S (2010) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha interacts with the androgen receptor (AR) and promotes prostate cancer cell growth by activating the AR. *Mol. Endocrinol.* **24**: 114–127

80. Simental JA, Sar M & Wilson EM (1992) Domain functions of the androgen receptor. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **43**: 37–41

81. Stanley WC, Recchia FA & Lopaschuk GD (2005) Myocardial Substrate Metabolism in the Normal and Failing Heart. : 1093–1129

82. Stapleton D, Mitchelhill KI, Gao G, Widmer J, Michell BJ, Teh T, House CM, Fernandez CS, Cox T, Witters LA & Kemp BE (1996) Mammalian AMP-activated Protein Kinase Subfamily. *J. Biol. Chem.* **271**: 611–614

83. St-Pierre J, Lin J, Krauss S, Tarr PT, Yang R, Newgard CB & Spiegelman BM (2003) Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivators 1alpha and 1beta (PGC-1alpha and PGC-1beta) in muscle cells. *J. Biol. Chem.* **278**: 26597–26603

84. Sullivan ML, Martinez CM, Gennis P & Gallagher EJ (1998) Progress in Cardiovascular Diseases The Cardiac Toxicity of Anabolic Steroids. **41**: 1–15

85. Tennakoon JB, Shi Y, Han JJ, Tsouko E, White M a, Burns a R, Zhang a, Xia X, Ilkayeva OR, Xin L, Ittmann MM, Rick FG, Schally a V & Frigo DE (2013) Androgens regulate prostate cancer cell growth via an AMPK-PGC-1 α -mediated metabolic switch. *Oncogene*: 1–11

86. Teyssier C, Ma H, Emter R, Kralli A & Stallcup MR (2005) Activation of nuclear receptor coactivator PGC-1 β by arginine methylation. *Genes Dev.*: 1466–1473

87. Usui T, Kajita K, Kajita T, Mori I, Hanamoto T, Ikeda T, Okada H, Taguchi K, Kitada Y, Morita H, Sasaki T, Kitamura T, Sato T, Kojima I & Ishizuka T (2014) Elevated

mitochondrial biogenesis in skeletal muscle is associated with testosterone-induced body weight loss in male mice. *FEBS Lett.* **588**: 1935–41

88. Vicencio JM, Estrada M, Galvis D, Bravo R, Contreras a E, Rotter D, Szabadkai G, Hill J a, Rothermel B a, Jaimovich E & Lavandero S (2011) Anabolic androgenic steroids and intracellular calcium signaling: a mini review on mechanisms and physiological implications. *Mini Rev. Med. Chem.* **11**: 390–8

89. Vicencio JM, Ibarra C, Estrada M, Chiong M, Soto D, Parra V, Diaz-Araya G, Jaimovich E & Lavandero S (2006) Testosterone induces an intracellular calcium increase by a nongenomic mechanism in cultured rat cardiac myocytes. *Endocrinology* **147**: 1386–95

90. Villena J a (2015) New insights into PGC-1 coactivators: redefining their role in the regulation of mitochondrial function and beyond. *FEBS J.* **282**: 647–72

91. van der Vusse GJ, van Bilsen M & Glatz JF (2000) Cardiac fatty acid uptake and transport in health and disease. *Cardiovasc. Res.* **45**: 279–293

92. van der Vusse GJ, van Bilsen M, Glatz JFC, Hasselbaink DM & Luiken JJFP (2002) Critical steps in cellular fatty acid uptake and utilization. *Mol. Cell. Biochem.* **239**: 9–15

93. Wang F, Yang J, Sun J, Dong Y, Zhao H, Shi H & Fu L (2015) Testosterone replacement attenuates mitochondrial damage in a rat model of myocardial infarction. *J. Endocrinol.* **225**: 101–11

94. Weidemann W & Hanke H (2002) Cardiovascular effects of androgens. *Cardiovasc. Drug Rev.* **20**: 175–98

95. Weiss RG & Maslov M (2004) Normal myocardial metabolism: fueling cardiac contraction —. : 457–463

96. White JP, Gao S, Puppa MJ, Sato S, Welle SL & Carson JA (2013) Testosterone regulation of Akt/mTORC1/FoxO3a signaling in skeletal muscle. *Mol. Cell. Endocrinol.* **365**: 174–186

97. White SM, Constantin PE & Claycomb WC (2004) Cardiac physiology at the cellular level : use of cultured HL-1 cardiomyocytes for studies of cardiac muscle cell structure and function. **70112**: 823–829

98. Wilson C, Contreras-Ferrat A, Venegas N, Osorio-Fuentealba C, Pávez M, Montoya K, Durán J, Maass R, Lavandero S & Estrada M (2013) Testosterone increases

- GLUT4-dependent glucose uptake in cardiomyocytes. *J. Cell. Physiol.* **228**: 2399–407
99. Winder WW, Holmes BF, Rubink DS, Jensen EB, Chen M & Holloszy JO (2000) Activation of AMP-activated protein kinase increases mitochondrial enzymes in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* **88**: 2219–2226
100. Wittnich C, Tan L, Wallen J & Belanger M (2013) Sex differences in myocardial metabolism and cardiac function: An emerging concept. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **465**: 719–729
101. Woods A, Johnstone SR, Dickerson K, Leiper FC, Fryer LGD, Neumann D, Schlattner U, Wallimann T, Carlson M & Carling D (2003) LKB1 Is the Upstream Kinase in the AMP-Activated Protein Kinase Cascade. *Curr. Biol.* **13**: 2004–2008
102. Wright DC, Geiger PC, Han D-H, Jones TE & Holloszy JO (2007) Calcium Induces Increases in Peroxisome Proliferator-activated Receptor Coactivator-1 and Mitochondrial Biogenesis by a Pathway Leading to p38 Mitogen-activated Protein Kinase Activation. *J. Biol. Chem.* **282**: 18793–18799
103. Wu Y, Temple J, Zhang R, Dzhura I, Zhang W, Trimble R, Roden DM, Passier R, Olson EN, Colbran RJ & Anderson ME (2002) Calmodulin kinase II and arrhythmias in a mouse model of cardiac hypertrophy. *Circulation* **106**: 1288–1293
104. Xu W, Hou D, Jiang X, Lu Z, Guo T, Liu Y, Wang D, Zen K, Yu B & Zhang C-Y (2012) The protective role of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α in hyperthyroid cardiac hypertrophy. *J. Cell. Physiol.* **227**: 3243–53
105. Yokokawa T, Sato K, Iwanaka N, Honda H, Higashida K, Iemitsu M, Hayashi T & Hashimoto T (2015) Dehydroepiandrosterone activates AMP kinase and regulates GLUT4 and PGC-1 α expression in C2C12 myotubes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **463**: 42–7
106. Young LH, Li J, Baron SJ & Russell RR (2005) AMP-activated protein kinase: a key stress signaling pathway in the heart. *Trends Cardiovasc. Med.* **15**: 110–8
107. Zhang T, Maier LS, Dalton ND, Miyamoto S, Ross JJ, Bers DM & Brown JH (2003) The deltaC isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ. Res.* **92**: 912–9
108. Zhang T, Miyamoto S & Brown JH (2004) Cardiomyocyte calcium and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II: friends or foes? *Recent Prog. Horm. Res.* **59**: 141–68

109. Zorzano a, Sevilla L, Camps M, Becker C, Meyer J, Kammermeier H, Muñoz P, Gumà a, Testar X, Palacín M, Blasi J & Fischer Y (1997) Regulation of glucose transport, and glucose transporters expression and trafficking in the heart: studies in cardiac myocytes. *Am. J. Cardiol.* **80**: 65A–76A

15. Anexos

15.1. Efectos de la testosterona sobre la línea celular HL-1

Actualmente, las células HL-1 son la única línea celular de cardiomiocitos que se dividen continuamente y se contraen espontáneamente manteniendo un fenotipo cardíaco diferenciado. Esta línea celular proviene de un tumor de aurícula de corazón humano. Mediante diferentes técnicas se ha demostrado su similitud con cardiomiocitos ya que poseen actividad contráctil espontánea y expresión de algunos marcadores cardíacos (Elcarpio *et al*, 1998; White *et al*, 2004). No solo han sido utilizadas para evaluar la función de cardiomiocitos en términos de señalización, regulación transcripcional y metabólica en condiciones normales, además se han realizado diversos estudios en condiciones patológicas como hipoxia, isquemia-reperfusión, hipertrofia y apoptosis (Nguyen & Claycomb, 1999; Hong *et al*, 2011; Brady *et al*, 2007).

Se desconoce la acción de la testosterona sobre las células HL-1, es por esto que se evaluó si los efectos son similares a los observados en cardiomiocitos ventriculares de rata neonata. Al evaluar la localización subcelular de PGC-1 α , se observó un efecto similar a nuestro modelo de estudio. Testosterona produjo un incremento en la localización nuclear de este cofactor, efecto que fue inhibido al tratar las células con AIP, inhibidor de CaMKII (Fig. 17). Este resultado sugiere que testosterona activa vías similares para ejercer su efecto sobre ambos tipos celulares.

A pesar de que esta línea celular presenta varias diferencias con los cardiomiocitos ventriculares, evaluar la acción de la testosterona sobre estas células abre una nueva área de estudio de las acciones de la testosterona en células cardíacas. Es por esta razón que se hacen necesarios más estudios para determinar los efectos de la testosterona sobre este tipo celular.

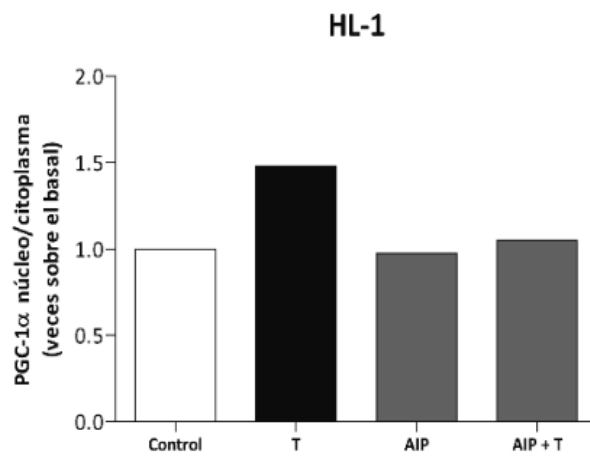
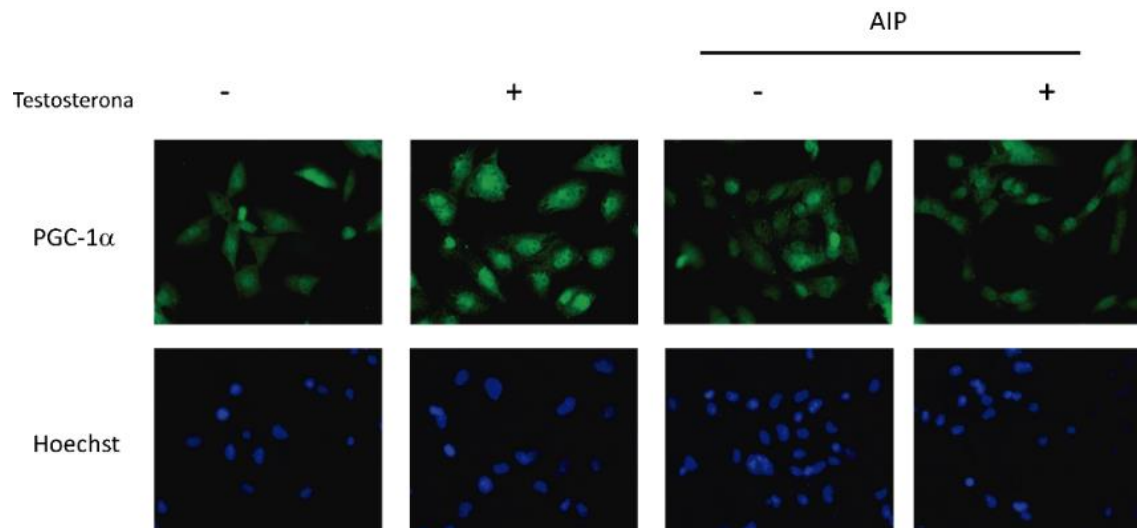


Figura 18: Efecto de la testosterona sobre la localización subcelular de PGC-1 α en células HL-1. Las células se pre-trataron con AIP (1 μ M) por 30 min para luego ser estimulados con testosterona por 24 h (100 nM) (n=1). Los datos corresponden al promedio \pm SEM