



**Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**

**TESTOSTERONA ESTIMULA LA ACTIVIDAD DEL PPAR β EN
CARDIOMIOCITOS DE RATA NEONATA**

PATRICIO ABEL SILVA ANDRADES

MEMORIA PARA OPTAR AL TITULO PROFESIONAL DE BIOQUIMICO

Profesor Patrocinante

Dr. SERGIO LAVANDERO G.
Laboratorio de Transducción de Señales
Departamento de Bioquímica y Biología
Molecular
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas
Universidad de Chile

Director de Memoria

Dr. MANUEL ESTRADA H.
Laboratorio de Endocrinología Celular
Instituto de Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Esta memoria fue financiada por el Proyecto Fondecyt 1090276

Dedico este trabajo a mis Padres y a Marcela

Agradecimientos

En primer lugar a mi Familia, quienes lograron formarme como persona a pesar de las adversidades, y me permitieron obtener un título profesional. Junto con esto agradecer a mis hermanos por su preocupación y apoyo incondicional.

Agradecer a Marcela por su tremendo apoyo y comprensión de mis horarios de trabajo no tan prudentes... por convertirse en el pilar de mi vida. Así mismo a su familia, que son prácticamente la mía también.

Al Laboratorio de Endocrinología Celular, por las experiencias vividas. Al Dr. Manuel Estrada, por la oportunidad y el apoyo al trabajo de esta memoria. A César, por ser mi eterno compañero de micropipetas. A Carlos por su apoyo en la finalización de este trabajo. A Kathy y Rodrigo, por su amistad y críticas constructivas. A Marcia, quien nos alegraba con su forma de ser. Y al flaco, por ser mi compañero de los over-night.

También agradecer a Francisco Altamirano, por su amistad, apoyo y enseñanzas en el laboratorio.

Al núcleo científico Se'P, por la oportunidad de pertenecer a una sociedad de ilustres nuevos investigadores, por su apoyo e ideas constructivas. Así mismo a todas las amistades compartidas durante mi formación como estudiante de bioquímica.

Al Dr. Sergio Lavandero, por su apoyo tanto humano como profesional, como así mismo sus puntos de vista para mejorar este trabajo. Además, agradecer a los profesores de la comisión, Dra. Lorena García y Dr. Hernán Lara, por las críticas constructivas que fortalecieron esta memoria.

Y para finalizar a la Escuela, en especial a los académicos, por su dedicación en la enseñanza de las ciencias.

1 Índice

Página

1	Índice.....	5
2	Tabla de Figuras.....	7
3	Abreviaturas.....	8
4	Resumen.....	9
5	Abstract.....	12
6	Introducción.....	14
6.1	Testosterona e hipertrofia cardiaca.....	14
6.2	Hipertrofia y cambio metabólico en el corazón.....	15
6.3	Los PPARs, reguladores del metabolismo celular.....	17
6.4	Participación de los PPARs en la fisiología cardiaca.....	19
6.4.1	PPAR α	19
6.4.2	PPAR β	20
6.4.3	PPAR γ	21
6.5	Ca ²⁺ y el metabolismo del cardiomiocito.....	23
7	Hipótesis.....	25
7.1	Objetivo general.....	26
7.1.1	Estudiar los efectos de la testosterona sobre el PPAR α y el PPAR β y su regulación, tanto de la actividad transcripcional como de los niveles proteicos, por eventos mediados por el IP ₃ R en cardiomiocitos.....	26
7.2	Objetivos específicos.....	26
7.2.1	Estudiar el efecto de la testosterona sobre la actividad transcripcional y los niveles proteicos de los PPARs en cultivos de cardiomiocitos.....	26
7.2.2	Estudiar la participación de los procesos mediados por el IP ₃ R en la regulación de PPARs específicos activados por testosterona.....	26
7.2.3	Estudiar el efecto de la activación de los PPARs inducida por testosterona sobre los niveles del mRNA de genes del metabolismo del cardiomiocito.....	26
8	Materiales y Métodos.....	27
8.1	Reactivos.....	27
8.2	Cultivo primario de cardiomiocitos ventriculares de rata neonata.....	27
8.3	Plasmidios y Transfecciones.....	28
8.4	Inmunodetección.....	29
8.5	RT-PCR y PCR.....	30

8.6	Expresión de resultados y análisis estadístico	32
9	Resultados	33
9.1	Testosterona incrementa la actividad transcripcional de los PPARs en cardiomiocitos.	33
9.2	Testosterona aumenta la expresión del PPAR β , pero no del PPAR α , en cardiomiocitos. 34	
9.3	Participación del PPAR α o el PPAR β en la activación transcripcional de los PPARs inducida por testosterona.....	36
9.4	Efecto de la inhibición del PPAR α y el PPAR β sobre el aumento en la expresión del PPAR β inducida por testosterona en cardiomiocitos	37
9.5	Participación de los procesos mediados por IP $_3$ R en la activación de los PPARs inducido por testosterona en cardiomiocitos.....	39
9.6	Testosterona aumenta los niveles del MRNA de enzimas involucradas en la glicólisis en cardiomiocitos	41
9.7	Efecto de la inhibición del PPAR β sobre el aumento de los niveles del mRNA de la PFK inducida por testosterona en cardiomiocitos	43
9.8	Participación de los procesos mediados por el IP $_3$ R en el aumento en el mRNA de la PFK inducida por testosterona en cardiomiocitos	44
10	Discusión.....	45
10.1	La testosterona y los resultados transcripcionales de los PPARs.	45
10.2	PPARs y el receptor de andrógenos.....	46
10.3	PPARs y el IP $_3$ R.....	47
10.4	PPAR β y testosterona.	50
10.5	Resultados transcripcionales a las 12 horas de estimulación con testosterona.	51
10.6	PPAR β y el IP $_3$ R.	52
10.7	PPAR β y la PFK.	53
10.8	IP $_3$ R y la PFK.....	54
10.9	PPAR β como agente antihipertrófico del cardiomiocito.	55
11	Conclusiones	57
12	Anexos Curriculares	59
12.1	Estadías en el extranjero	59
	Año 2010: Invitación efectuada por la Dra. Bárbara Erlich para visitar las dependencias de su laboratorio. Hermeneutic's Laboratory, Department of Pharmacology, School of Medicine, Yale University, New Haven, CT, USA.	59
12.2	Publicaciones Científicas	59
12.3	Presentaciones a Congresos Nacionales	59
13	Bibliografía.....	60

2 Tabla de Figuras

Página

Figura 1. Cuadro resumen de los principales efectos de los PPARs sobre el metabolismo cardiaco en estudios <i>in-vivo</i>.	22
Figura 2. Posibles mecanismos de regulación del cambio metabólico en el proceso hipertrófico inducido por la testosterona en cardiomiocitos.	24
Figura 3. Cinética de activación de los PPARs inducida por activadores farmacológicos y por testosterona en cardiomiocitos.	34
Figura 4. Estudio cinético de la expresión del PPARα y PPARβ en cardiomiocitos estimulados con testosterona.	35
Figura 5. Dependencia del PPARα y PPARβ en la activación de los PPARs inducida por testosterona en cardiomiocitos	37
Figura 6. Efecto de la inhibición del PPARα y PPARβ sobre la expresión del PPARβ en cardiomiocitos estimulados con testosterona.	38
Figura 7. Dependencia del IP$_3$R en la activación de los PPARs inducida por testosterona en cardiomiocitos.	40
Figura 8. Aumento del mRNA de la PFK y la HKII inducida por testosterona en cardiomiocitos.	42
Figura 9. Efecto de la inhibición del PPARβ sobre el aumento del mRNA de la PFK en cardiomiocitos estimulados con testosterona.	43
Figura 10. Efecto de la inhibición del IP$_3$R sobre los niveles del mRNA de la PFK en cardiomiocitos estimulados con testosterona.	44
Figura 11. Esquema resumen con los efectos de la testosterona en el cardiomiocito a tiempos tempranos.	49
Figura 12. Esquema resumen de los efectos de la estimulación con testosterona por 12 horas en el cardiomiocito.	55

3 Abreviaturas

2-APB:	2-aminoetoxidifenil borato.
AMPK:	quinasa regulada por adenosina monofosfato
Akt:	proteína quinasa B o PKB
ATP:	adenosina trifosfato
Ca²⁺:	ión calcio
CaMKII:	proteína quinasa dependiente de calmodulina II
ERK1/2:	proteínas quinasas reguladas extracelularmente 1/2
GSK3β:	quinasa de la glicógeno sintasa-3 beta
HKII:	hexoquinasa II
IP₃:	inositol 1,4,5-trifosfato.
IP₃R:	receptor para inositol 1,4,5-trifosfato.
mCPT-1b:	carnitina palmitoil transferasa-1b muscular
MEK1/2:	MAP quinasa quinasa 1/2
mTOR:	proteína blanco para rapamicina en mamíferos
NFAT:	factor nuclear activado en células T
NFκB:	factor nuclear kappa B
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa
PFK:	fosfofructoquinasa
PI3K:	fosfatidil inositol 3-quinasa
PKC:	proteína quinasa C
PPAR:	receptor activado por el proliferador de peroxisomas
RT-PCR:	reacción en cadena de la polimerasa - transcriptasa reversa

4 Resumen

La testosterona, a través de aumentos del Ca^{2+} intracelular mediado por el receptor para inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3R), produce hipertrofia del cardiomiocito. La hipertrofia conlleva un cambio metabólico que se asocia a modificaciones del sustrato energético usado para la generación de ATP. Sin embargo, los efectos metabólicos de la testosterona en la célula cardiaca no han sido estudiados. Los PPARs (*peroxisome proliferator activated-receptors*) son una familia de factores de transcripción que controlan el metabolismo celular y que, activados en forma diferencial, permiten la selección de los sustratos energéticos. **En este trabajo se estudiaron los efectos de la testosterona sobre la actividad de PPARs específicos a través de procesos mediados por el IP_3R y su efecto sobre enzimas metabólicas.**

En este estudio se utilizaron cultivos primarios de cardiomiocitos. Para determinar la actividad transcripcional de los PPARs, los cardiomiocitos se co-transfectaron con el plasmidio PPREx3-tk-Luc y con un plasmidio control de transfección (CMV-Renilla). Primero, la efectividad de este plasmidio se evaluó utilizando activadores farmacológicos para el $\text{PPAR}\alpha$ (Wy 14643, 100 μM) y para el $\text{PPAR}\beta$ (L-165041, 10 μM). El efecto de la testosterona (100 nM) sobre PPARs específicos se determinó estimulando cardiomiocitos transfectados con PPREx-tk-Luc en presencia de inhibidores de $\text{PPAR}\alpha$ (GW6471, 10 μM) o del $\text{PPAR}\beta$ (GSK 0660, 1 μM). Los cambios en la expresión de las proteínas de los PPARs fueron evaluados por inmunodetección. Para determinar el efecto sobre enzimas metabólicas se realizaron RT-PCR para la hexoquinasa II (HKII), la fosfofructoquinasa (PFK) y la carnitina palmitoil transferasa-1b muscular (mCPT-1b). Para investigar la participación de los procesos mediados por el IP_3R se utilizó el 2-aminoetildifenilborato (2-APB).

La estimulación con 100 nM de testosterona por 3 horas aumentó la actividad luciferasa de cardiomiocitos transfectados con el plasmidio PPREx3-tk-Luc. Este efecto fue parcialmente inhibido por el tratamiento previo de las células con el inhibidor del PPAR β , GSK 0660, mientras que el inhibidor del PPAR α , GW6471, tuvo un efecto menor. Este resultado sugiere que la testosterona podría activar preferencialmente el PPAR β . Consecuente con este resultado la testosterona incrementa la expresión del PPAR β , pero no la del PPAR α . Por otra parte, 2-APB aumentó la actividad de los PPARs a las 3 horas de tratamiento. Por el contrario, este inhibidor farmacológico parcialmente previno el incremento de la expresión del PPAR β inducido por testosterona. Estos resultados sugieren una activación diferencial del PPAR β por esta hormona. En diversos modelos celulares se ha demostrado que la activación diferencial de PPARs específicos regula el metabolismo celular, modificando el sustrato energético usado por la célula. Por ello se estudió los niveles del mRNA de la HKII y la PFK, como marcadores de la vía glicolítica, y del mCPT-1b como marcador de la β -oxidación. La testosterona aumentó los niveles del mRNA de la HKII y la PFK, mientras que los niveles del mCPT-1b no fueron modificados. Siendo la PFK un sensor clave de la vía glicolítica, se seleccionó este gen para determinar tanto el efecto de la inhibición de PPAR β como de procesos dependientes del IP $_3$ R. De este modo se demostró que la inhibición del PPAR β anuló el aumento de los niveles del mRNA de la PFK inducidos por la testosterona. Mientras que el 2-APB aumentó los niveles del mRNA de esta enzima. Estos datos muestran una regulación de los niveles del mRNA de la PFK inducida por la testosterona.

Estos resultados sugieren que la testosterona activa al PPAR β . La participación de los procesos mediados por el IP $_3$ R son poco concluyentes, sin embargo es claro la relación entre crecimiento y metabolismo por lo que se requieren estudios más acabados de la vía IP $_3$ para determinar su real participación. Además, esta hormona aumenta el mRNA de las enzimas glicolíticas como la HKII y la PFK, evento dependiente en parte de la activación de la vía del

PPAR β . Estos resultados exploratorios sugieren que la actividad del PPAR β estimulada por la testosterona podría aumentar el metabolismo glicolítico, lo que podría ser relevante en el proceso hipertrófico del cardiomiocito inducido por esta hormona. Los resultados muestran la primera evidencia de la acción de la testosterona sobre PPARs y su posible rol metabólico sobre las células cardiacas.

5 Abstract

Testosterone increases PPAR β activity in rat neonatal cardiomyocytes

Testosterone-induced cardiomyocyte hypertrophy involve intracellular Ca²⁺ increases mediated by the inositol 1,4,5 trisphosphate receptor (IP₃R). Cardiac hypertrophy leads to metabolic changes, which are associated with modifications of energy substrate used for ATP generation. However, metabolic effects of testosterone on cardiomyocytes have not been studied. The PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors) are a family of transcription factors that control cell metabolism and, when they are differentially activated, allow the selection of energy substrates used by the cells. In this work, we study the impact of testosterone on the activation of specific PPARs through process mediated by the IP₃R and its effect on metabolic enzymes.

For this propose we used primary cultures of neonatal cardiomyocytes. To determine the transcriptional activity of PPARs, cardiomyocytes were co-transfected with the plasmid PPREx3-tk-Luc and CMV-Renilla, which was used as control. First, we evaluated the effectiveness of this plasmid using pharmacological activators for either PPAR α (Wy 14643, 100 μ M) or PPAR β (L-165041, 10 μ M). The effects of testosterone (100 nM) on specific PPARs were determined stimulating PPREx-tk-Luc-transfected cardiomyocytes in the presence or absence of inhibitors for either PPAR α (GW6471, 10 μ M) or PPAR β (GSK 0660, 1 μ M). Second, changes in protein expression of PPARs were assessed by immunoblotting. Third, by RT-PCR we determine the effect of testosterone stimulation on metabolic enzymes including: Hexokinase II (HKII), Phosphofructokinase (PFK) and muscular Carnitine Palmitoyl Transferase-1b (mCPT-1b). Finally, to assess the role of process mediated by IP₃R, 2-aminoetildiphenilborate (2-APB, 20 μ M) was used.

Testosterone (100 nM) stimulation of cardiomyocytes transfected with the plasmid PPREx3-tk-Luc by 3 hours increased the luciferase activity. This effect was partially inhibited by pre-treatment of cells with GSK 0660, while GW 6471 had minor effect. These results suggest that testosterone activates preferentially PPAR β . According to these findings, testosterone also increased the expression of PPAR β protein, but not PPAR α . Moreover, 2-APB increased the transcriptional activation of PPARs, and partially inhibited the protein expression of PPAR β . In different cell models have been shown that differential activation of specific PPARs regulate cell metabolism, which can modify the energy substrate used by the cell. Therefore we studied the mRNA levels of HKII and PFK, as markers of glycolysis, and mCPT-1b as β -oxidation marker. Testosterone increased HKII and PFK mRNA levels, whereas mCPT-1b mRNA levels were not modified. Since, PFK is a key sensor for glycolysis, this enzyme was selected to determine the effects of both PPAR β and process mediated by IP $_3$ R on mRNA PFK levels. Thus, inhibition of PPAR β blocked, while 2-APB increased the PFK mRNA induced by testosterone. Accordingly to this, testosterone regulates the mRNA of PFK by PPAR β .

Taken together, these results suggest that testosterone activates PPAR β . Participation of process mediates by IP $_3$ R is poor clear; however it is clear the relationship between growth and metabolism so that further studies of the IP $_3$ pathway are required to determine its participation. Furthermore, testosterone increased the mRNA levels of the glycolytic enzymes HKII and PFK. In addition, increased levels of PFK mRNA require the activation of the PPAR β pathway. These primary findings may suggest that PPAR β activity increase glycolysis, which could be relevant in the process of cardiomyocyte hypertrophy induced by testosterone. These results are the first evidence for the action of testosterone on PPARs and show a possible metabolic role for this hormone on cardiac cells.

6 Introducción

6.1 Testosterona e hipertrofia cardiaca

El corazón es un tejido blanco para la acción de esteroides anabólicos, siendo la testosterona la principal hormona endógena (1). A concentraciones fisiológicas esta hormona tiene efectos benéficos a nivel cardiovascular. Participa en el desarrollo celular y en la mantención de la homeostasis del cardiomiocito (2). Por otra parte, elevadas concentraciones de testosterona se asocian a patologías cardiacas (3), asociadas al aumento en la síntesis de proteínas, lo que contribuye al desarrollo de la hipertrofia de esta célula (4).

El corazón en respuesta a estímulos neurohumorales dirigidos a aumentar el gasto cardiaco desarrolla hipertrofia cardiaca. Esta respuesta inicialmente compensatoria se caracteriza por cambios fenotípicos que incluyen incremento en el tamaño del cardiomiocito, reorganización de su estructura sarcomérica y la reexpresión de un programa de genes fetales (5). Si los estímulos pro-hipertróficos se mantienen en el tiempo, son un factor de riesgo para el desarrollo de insuficiencia cardiaca y muerte súbita (6). Dichos estímulos son variados, pero activan vías de transducción de señales intracelulares comunes, como la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) (7), la vía de la fosfatidil inositol 3-quinasa (PI3K)/proteína quinasa (PKB o Akt) (8), la vía de la proteína quinasa C (PKC) (9) y la vía de la proteína blanco para rapamicina en mamíferos (mTOR) (10).

En modelos *in-vivo* e *in-vitro*, elevadas concentraciones de testosterona producen hipertrofia cardiaca (11,12). En el cardiomiocito, se ha sugerido que el efecto hipertrófico de esta hormona se debe a la activación del receptor intracelular para andrógenos, lo que involucra cambios en la expresión de genes. Este receptor corresponde a una proteína de 110 kDa con dominios de unión a ligando (testosterona y otros andrógenos), localización nuclear, transactivación y de unión al ADN (13). La respuesta de este complejo hormona-receptor es lenta

y se manifiesta a largo plazo. Por otra parte, nuestro laboratorio ha demostrado que la testosterona produce respuestas rápidas, las cuales son independientes del receptor intracelular para andrógenos (14). Uno de estos efectos tempranos es el aumento del Ca^{2+} intracelular (15), evento primario y esencial de todos los estímulos pro-hipertroficantes conocidos (16). El aumento intracelular de este catión permite la activación de vías dependientes de Ca^{2+} que contribuyen al desarrollo del fenotipo hipertrofico (5). Estudios con animales transgénicos que sobreexpresan proteínas que son parte de las vías reguladas por Ca^{2+} producen dichos fenotipos (17), lo que demuestra la importancia de este catión en la generación de la hipertrofia cardiaca.

Recientemente, nuestro Laboratorio ha mostrado que el efecto hipertrofico de la testosterona en el cardiomiocito requiere de aumentos de Ca^{2+} mediados por el receptor para inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3R), activación de proteínas quinasas y factores de transcripción dependientes de Ca^{2+} (10).

6.2 Hipertrofia y cambio metabólico en el corazón

El funcionamiento normal del corazón requiere de un aporte considerable y constante de energía para mantener su función como bomba cardiaca. En condiciones normales el 70% - 90% del ATP que produce la célula cardiaca proviene de la β -oxidación de ácidos grasos y el remanente proviene principalmente del metabolismo de la glucosa (18). Existen mecanismos moleculares en la célula cardiaca que permiten procesar información tanto de las necesidades energéticas como de los nutrientes disponibles con el fin de mantener la homeostasis energética del corazón. De esta manera, este órgano es capaz de responder dinámica y adaptativamente según las condiciones fisiológicas o patológicas en que se encuentre, modificando el sustrato energético a utilizar para la generación del ATP (18-20). Dichos cambios representan respuestas

inicialmente adaptativas, que eventualmente se transforman en maladaptativas si se mantienen en el tiempo y se asocian con el desarrollo de patologías cardíacas (19, 20).

Durante el desarrollo de la hipertrofia cardíaca, los requerimientos energéticos aumentan debido al incremento tanto del trabajo cardíaco como del anabolismo celular, lo cual se acompaña del aumento del consumo de ácidos grasos y/o glucosa disponible (21). Una observación importante es que los efectos sobre el metabolismo celular dependen del estímulo pro-hipertrofico, el cual modifica el metabolismo celular hacia el uso de estos sustratos energéticos en forma preferencial. Ejemplos de esto son: la hipertrofia cardíaca producida por sobrecarga de presión, en donde se produce un cambio hacia una mayor utilización de glucosa como sustrato energético (22), mientras que en la cardiomiopatía diabética se produce una mayor utilización de ácidos grasos como fuente de energía (23). Dicha modificación del metabolismo celular se acompaña íntimamente con los cambios estructurales observados en el fenotipo hipertrofico celular (21).

Uno de los mecanismos por los cuales se modifica el metabolismo celular es a través de la regulación transcripcional de las proteínas que participan tanto en las vías enzimáticas que procesan estos sustratos, como transportadores de membrana que los incorporan a las células. En el cardiomiocito, la regulación transcripcional del metabolismo permite, según las condiciones en que se encuentre, la elección preferencial de un sustrato energético. Así, la modificación en la expresión de proteínas que participan en la vía glicolítica o lipolítica permite la adaptabilidad metabólica tanto en procesos fisiológicos como patológicos (21, 24). Dicho fenómeno ha llevado a múltiples estudios dirigidos a determinar los factores involucrados en el control transcripcional de éstas proteínas. De esta manera se ha determinado que las proteínas receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPARs) representan un nexo clave en el control metabólico celular.

Estos factores de transcripción son activados en forma diferencial, lo que permite la adaptación del cardiomiocito a los sustratos energéticos disponibles (24-26).

6.3 Los PPARs, reguladores del metabolismo celular

Los PPARs (del acrónimo en inglés *Peroxisome Proliferator Activated-Receptors*) son factores de transcripción que pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares para hormonas. Se han identificado tres integrantes de esta familia de factores de transcripción, los que incluyen: PPAR α (NR1C1), PPAR β (también conocido como δ) (NR1C2) y PPAR γ (NR1C3) (27-29). Los tres integrantes de la familia PPARs, tanto en humanos como en ratas, son codificados por tres genes separados que se encuentran en diferentes cromosomas, y actúan como sensores de ácidos grasos y derivados de éstos, además de controlar las vías metabólicas involucradas en la homeostasis energética celular (30). Los PPARs poseen una alta homología entre sus miembros, sin embargo tienen distintos roles en el control del metabolismo energético de los mamíferos (29). Si bien, no se han definido con certeza los ligandos endógenos, estas proteínas son activadas por ácidos grasos de cadena larga y sus metabolitos (25).

Los PPARs dimerizan con el receptor para el ácido 9-*cis* retinoico, RXR (NR2B) y se unen a regiones regulatorias río arriba de los genes blancos, llamadas elementos de respuesta para PPAR (PPRE de la sigla en inglés *Peroxisome Proliferator Response Element*). La secuencia PPRE canónica consiste de dos repeticiones de AGGTCA separados por un nucleótido, llamado DR-1. Dicha conformación permite que el PPAR se una al segmento 5', tomando como referencia el DR-1, mientras que el RXR se une al segmento 3'. En la secuencia descrita anteriormente se unen los tres integrantes de la familia de los PPARs (31).

En ausencia de ligando, el heterodímero PPAR-RXR permanece unido a múltiples proteínas co-represoras, capaces de reclutar complejos proteicos con actividad histona desacetilasa, produciendo la compactación de la cromatina de la región promotora de los genes blancos, inhibiendo su transcripción (32). La unión del ligando cognado al PPAR desencadena un cambio conformacional en esta proteína lo que permite liberar al heterodímero PPAR-RXR de los complejos co-represores, y posteriormente reclutar complejos co-activadores de la transcripción, los cuales poseen actividad histona acetilasa intrínseca (33), que modifican la estructura de la cromatina de la región promotora de los genes blancos. Esto permite la accesibilidad y estabilidad de los complejos proteicos necesarios para la transcripción, como la ARN polimerasa y el complejo Mediator (complejo multiproteico necesario tanto para la modificación de la arquitectura de la cromatina, como también para la estabilización de los complejos basales de la transcripción (34)). Es interesante mencionar que los PPARs también pueden interactuar con receptores de hormonas esteroidales. En cáncer de mama se ha observado que el receptor de estrógenos tipo α es capaz de interactuar físicamente con el PPAR γ , controlando las vías de señalización intracelular activadas por este miembro de la familia de los PPARs (35). En modelos animales en donde se estudió la actividad diferencial de los PPARs, se observó un aumento significativo en la actividad de estas proteínas en el hígado de animales machos, de más de un orden de magnitud al compararlo con las hembras. Este hecho sugiere la regulación de la actividad de los PPARs por el receptor de andrógenos (36). En un modelo animal en donde se sobre-expresó en forma cardio-específica un dominante negativo para el receptor de hormonas tiroideas, se encontró una disminución en la actividad del PPAR α , determinado como una menor expresión de sus genes blanco, la cual no fue recuperada por la activación farmacológica de este PPAR (37). Este antecedente sugiere una potencial regulación entre el receptor de hormonas tiroideas y el PPAR α en el control del metabolismo cardiaco.

6.4 Participación de los PPARs en la fisiología cardiaca

El corazón en etapas fetales consume principalmente glucosa, debido entre otros factores al ambiente hipóxico en el que se encuentra en esta etapa del desarrollo, puesto que por la disponibilidad de O₂ la oxidación de la glucosa es más eficiente que la β -oxidación de ácidos grasos. Sin embargo, este programa metabólico fetal es reemplazado al momento de nacer, debido tanto al incremento en el consumo de ácidos grasos provenientes de la leche materna, como del aumento de la maquinaria mitocondrial y la capacidad aeróbica del individuo, lo que permite un mejor manejo de la β -oxidación de ácidos grasos (31). Por ello, el corazón neonato-adulto consume preferentemente ácidos grasos y establece a estos últimos como la fuente energética primaria en la generación de ATP.

De los tres miembros de la familia de los PPARs, tanto el PPAR α como el PPAR β se expresan en forma considerable en el cardiomiocito, siendo muy bajo y casi indetectable la presencia del PPAR γ en estas células (38).

6.4.1 PPAR α

La activación del PPAR α en el corazón incrementa la expresión de genes relacionados tanto al transporte de ácidos grasos hacia la mitocondria, como también de enzimas que participan en la β -oxidación de ácidos grasos (39). Experimentos en ratones que sobre-expresan cardio-específicamente el PPAR α muestran un incremento en la incorporación y la tasa de β -oxidación de ácidos grasos, junto con una disminución de la expresión de genes involucrados en el metabolismo de la glucosa. Es interesante mencionar que estos animales presentan disfunción cardiaca, la cual es exacerbada cuando son sujetos a dietas altas en grasas, lo que conduce a un fenotipo similar a la cardiomiopatía diabética (40). Modelos animales en los cuales se anula la expresión del PPAR α en el corazón, son viables y completamente normales, salvo que

desarrollan fibrosis cardíaca asociada a la edad. En este modelo, la expresión de genes de la β -oxidación se encuentra disminuida, y presentan un aumento en la masa del GLUT-4 y una mayor incorporación y utilización de glucosa para la generación de ATP (41). Así, el PPAR α parece ser un participante activo en la elección del sustrato energético utilizado por el corazón.

En estudios *in-vitro* se ha observado que la activación farmacológica del PPAR α induce un aumento en los genes involucrados en la β -oxidación e incrementa la oxidación de palmitato, estos datos son consistentes con los antecedentes observados en modelos animales (42). Por otro lado, se ha estudiado la participación de esta proteína en la hipertrofia del cardiomiocito. La activación farmacológica del PPAR α es capaz de inhibir la hipertrofia inducida por endotelina-1 a través de la modulación de la vía del fosfatidil inositol 3-quinasa (PI3K)/proteína quinasa B (Akt)/ y de la glicógeno sintasa quinasa-3 β (GSK-3 β) y el factor nuclear de células T activadas (NFAT) (43). Estos antecedentes indican una importante participación del PPAR α en el control del metabolismo lipídico del cardiomiocito, además de otros procesos tan importantes como la hipertrofia de esta célula.

6.4.2 PPAR β

Para determinar el rol de esta proteína en la fisiología cardíaca se han desarrollado modelos *in-vivo* de ganancia o pérdida de función de este factor de transcripción. Ratones que sobre-expresan en forma cardio-específica el PPAR β son viables y muestran una sobrevivencia comparable a ratones normales, además no desarrollan ningún tipo de disfunción cardíaca incluso bajo una dieta alta en grasas. Estos ratones poseen una tasa de incorporación y oxidación de ácidos grasos comparables al grupo control. Sin embargo al analizar el metabolismo glicolítico se encontró que en estos ratones aumentan tanto la tasa de incorporación de glucosa, como la oxidación de la misma. Además son capaces de incrementar tanto la expresión de transportadores

de glucosa (GLUT-4) como de enzimas claves en la oxidación de este carbohidrato (fosfofructoquinasa), así este modelo de ratón presenta un perfil metabólico contrario al observado con la sobre-expresión cardio-específica del PPAR α (44). Ratones que anulan la expresión del PPAR β cardio-específicamente presentan una severa cardiomiopatía y mueren prematuramente. Estos animales presentan una disminución en la expresión de genes relacionados al metabolismo de ácidos grasos, una disminución de la β -oxidación y un aumento en la acumulación de lípidos intracelulares (45). Estos antecedentes muestran la participación del PPAR β en el control del metabolismo glicolítico del cardiomiocito.

En modelos *in-vitro* se ha observado que la activación farmacológica del PPAR β induce un aumento en los genes involucrados en la β -oxidación con incremento en la oxidación de palmitato (42). Estos antecedentes son contrarios a los observados en modelos *in-vivo*. Además, se ha estudiado la participación de esta proteína en el proceso hipertrófico del cardiomiocito, en este caso la activación farmacológica del PPAR β previene el desarrollo de la hipertrofia cardiaca inducida por fenilefrina y por angiotensina II, a través de la modulación del factor nuclear kappa B (NF κ B) y las quinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK1/2), respectivamente (46, 47).

Si bien en algunas circunstancias se muestran estudios controversiales de los efectos de los PPARs en la célula cardiaca, existe mayor evidencia de la participación del PPAR β en el control metabólico e hipertrofia del cardiomiocito.

6.4.3 PPAR γ

El PPAR γ participa en el almacenaje de grasas y la diferenciación de los adipocitos (25). Como se encuentra en forma abundante en el tejido adiposo, estudios sistémicos de este PPAR son poco representativos de lo que ocurre a nivel cardiaco. En modelos *in-vivo*, la sobre-

expresión cardio-específica del PPAR γ genera una severa cardiomiopatía, la cual se acompaña de un aumento en los genes relacionados con la β -oxidación, efecto similar al modelo de sobre-expresión cardio-específica del PPAR α . Además, estos animales también presentan un aumento en los genes relacionados con el metabolismo glicolítico, similar al modelo de sobre-expresión cardio-específica del PPAR β (48). De este modo, la evidencia experimental sugiere que el PPAR γ no genera una selección del sustrato energético cardiaco, sino más bien una potenciación global del metabolismo. Se ha desarrollado un modelo en el cual se anula específicamente el PPAR γ a nivel cardiaco, y estos animales presentan una leve hipertrofia ventricular con la función sistólica normal (49). Estudios *in-vitro* muestran que el PPAR γ no altera la expresión de genes del metabolismo de ácidos grasos ni de la glucosa (42). Estas evidencias sugieren que este integrante de la familia de los PPARs no genera una respuesta diferencial sobre el metabolismo del cardiomiocito, en el aspecto de la elección preferencial de un sustrato energético, por lo cual no se considera como foco de estudio en este trabajo de memoria.

	PPAR α	PPAR β	PPAR γ
Sobreexpresión	<p>↑ Ácidos Grasos</p> <p>↓ Glucosa</p>	<p>↓ Ácidos Grasos</p> <p>↑ Glucosa</p>	<p>↑ Ácidos Grasos</p> <p>↑ Glucosa</p>
Knockdown	<p>↓ Ácidos Grasos</p> <p>↑ Glucosa</p>	<p>↓ Ácidos Grasos</p>	<p>?</p>

Figura 1. Cuadro resumen de los principales efectos de los PPARs sobre el metabolismo cardiaco en estudios *in-vivo*. Como se observa en la Figura, el PPAR α y el PPAR β comandan programas metabólicos opuestos. PPAR γ potencia el metabolismo tanto glicolítico como la β -oxidación, por lo tanto no genera una diferencia de elección en el sustrato energético.

Con los antecedentes expuestos podemos sugerir que la activación diferencial entre el PPAR α y el PPAR β en el corazón produce la selección de un sustrato energético, lo cual participaría en procesos fisiopatológicos como la hipertrofia cardiaca (40, 44, 50).

6.5 Ca²⁺ y el metabolismo del cardiomiocito

El Ca²⁺ intracelular participa en el acoplamiento excitación-contracción de la célula cardiaca y se ha propuesto que regula la expresión génica a través de factores de transcripción dependientes de Ca²⁺. Nuestro laboratorio ha demostrado que la testosterona produce hipertrofia del cardiomiocito a través de aumentos del Ca²⁺ intracelular y la posterior activación de factores de transcripción dependientes de Ca²⁺ (10), ilustrando así la participación de este catión en la regulación de la transcripción de genes. Una interesante hipótesis implica la convergencia entre las variaciones del Ca²⁺ intracelular y la modificación en la actividad de PPARs específicos (51-53). Esto constituiría un nexo entre una señal primaria inducida por la testosterona y los efectos a nivel de la transcripción de los genes metabólicos.

En el músculo esquelético, aumentos del Ca²⁺ intracelular son capaces de aumentar la expresión del PGC-1 α (un co-activador de los PPARs), lo que daría cuenta de un aumento en la actividad de los PPARs. Además, se ha reportado que aumentos del Ca²⁺ promueven la biogénesis mitocondrial, lo cual aumenta el metabolismo oxidativo celular (53). Junto con esto, la expresión constitutivamente activa de calcineurina, en músculo esquelético, promueve la expresión del PPAR α y PPAR β (51).

En células cardiacas, la expresión constitutivamente activa de calcineurina y CaMK, dos proteínas reguladas por aumentos del Ca²⁺ intracelular, promueven distintos perfiles de expresión de genes relacionados con el metabolismo del cardiomiocito. CaMK aumenta la expresión de

genes relacionados con la vía glicolítica. Por otro lado, es interesante mencionar que en este mismo estudio se determinó que sólo calcineurina promueve la expresión del PPAR α (52).

Tomando en consideración los antecedentes descritos anteriormente, se propone en este trabajo de memoria que los cambios del Ca²⁺ intracelular inducidos por la testosterona modulan la actividad de PPARs específicos y con ello el metabolismo del cardiomiocito.

La Figura 2 ilustra el planteamiento del problema según los antecedentes detallados anteriormente.

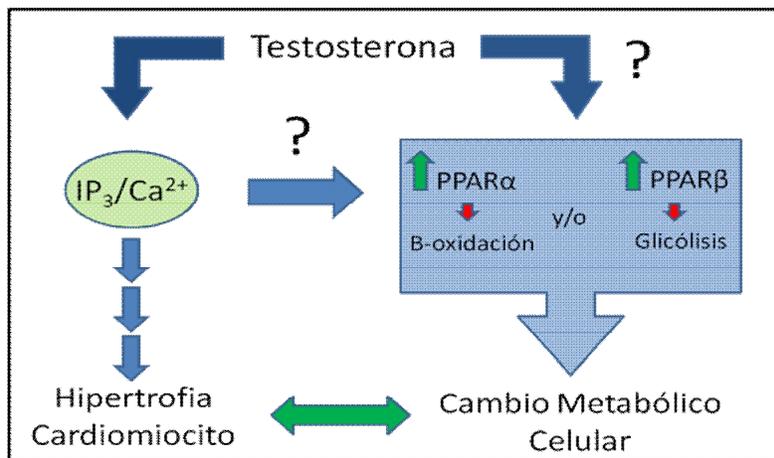


Figura 2. Posibles mecanismos de regulación del cambio metabólico en el proceso hipertrofico inducido por la testosterona en cardiomiocitos. En la Figura se muestra una de las principales vías de señalización activadas por esta hormona, que implica aumentos de Ca²⁺ intracelular. Se propone que la testosterona puede modular la actividad de PPARs específicos, modificando el metabolismo celular, con la participación de aumentos del Ca²⁺ intracelular liberado desde el IP₃R.

Según los antecedentes expuestos, y considerando que:

- La testosterona produce hipertrofia del cardiomiocito.
- El fenotipo hipertrofico se acompaña íntimamente de un cambio metabólico, que implica una mayor utilización de glucosa o ácidos grasos.

- La regulación diferencial de los miembros de la familia de los PPARs da cuenta de la activación de programas metabólicos opuestos en el corazón, produciendo la selección de un sustrato energético.
- La testosterona produce aumentos del Ca^{2+} intracelular mediado por el receptor para IP_3 .
- Los PPARs son regulados por proteínas activadas por el Ca^{2+} intracelular.

Se propone la siguiente hipótesis de trabajo:

7 Hipótesis

“La testosterona activa a PPARs específicos a través de procesos mediados por el IP_3R en el cardiomiocito”

7.1 Objetivo general

7.1.1 Estudiar los efectos de la testosterona sobre el PPAR α y el PPAR β y su regulación, tanto de la actividad transcripcional como de los niveles proteicos, por eventos mediados por el IP₃R en cardiomiocitos.

7.2 Objetivos específicos

7.2.1 Estudiar el efecto de la testosterona sobre la actividad transcripcional y los niveles proteicos de los PPARs en cultivos de cardiomiocitos.

Mediante un plasmidio reportero PPRE-Luc, más el uso de inhibidores específicos, se estudió los cambios en actividad transcripcional del PPAR α y del PPAR β inducidos por testosterona. Los niveles proteicos de estos PPARs se determinaron mediante anticuerpos específicos.

7.2.2 Estudiar la participación de los procesos mediados por el IP₃R en la regulación de PPARs específicos activados por testosterona.

Mediante el uso del inhibidor farmacológico 2-APB se estudió la participación de los eventos mediados por el IP₃R en la actividad transcripcional y los niveles proteicos de los PPARs activados por testosterona.

7.2.3 Estudiar el efecto de la activación de los PPARs inducida por testosterona sobre los niveles del mRNA de genes del metabolismo del cardiomiocito.

A través de RT-PCR utilizando partidores específicos, se estudió el efecto de la testosterona sobre los niveles del MRNA de la fosfofructoquinasa y de la hexoquinasa II como marcadores de la vía glicolítica, y el MRNA del transportador carnitina palmitoil transferasa-1b como marcador de la vía de la β -oxidación.

8 Materiales y Métodos

8.1 Reactivos

Testosterona enantato, 2-aminoetoxidifenil borato, Medio 199, DMEM, HANKS, pancreatina y 5-bromo-2-deoxiuridina se obtuvieron desde *Sigma Chemical Company* (St. Louis, MO). GSK 0660, Wy 14643, GW 6471, L-165041 se adquirieron desde *Tocris Bioscience* (Ellisville, MO). Colagenasa tipo II desde *Worthington Biochemical Corporation* (Lakewood, CA). Membranas de Nitrocelulosa *HyBond-C* y películas fotográficas fueron obtenidas desde *Amersham Biosciences* (Piscataway, NJ). Sustrato quimioluminiscente *Supersignal West Pico* se adquirió desde *Pierce Biotechnology* (Rockford, IL). Los reactivos restantes utilizados fueron de calidad analítica.

8.2 Cultivo primario de cardiomiocitos ventriculares de rata neonata

Los protocolos para la obtención de cardiomiocitos fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Los cardiomiocitos se obtuvieron desde corazones de ratas neonatas Sprague-Dawley de 1 a 3 días de edad, como se ha descrito previamente (10). Los ventrículos de las ratas sacrificadas por decapitación fueron sometidos a disgregación mecánica y luego tratados en digestiones sucesivas en medio HANKS suplementado con colagenasa tipo II (0,15 mg/mL) y pancreatina (0,6 mg/mL) en agitación horizontal durante 15 min a 37°C. Las células en suspensión fueron sedimentadas a 1.000 \times g por 10 min y luego sembradas en frascos de cultivo celular T75 durante 1,5 horas, con el fin de lograr separar fibroblastos de cardiomiocitos. Los cardiomiocitos resultantes, contenidos en el sobrenadante, fueron sembrados en placas cubiertas con gelatina al 1,5%, en medio de cultivo DMEM-M199 (4:1) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 U/L penicilina, 50 mg/L

estreptomycin y 100 μM de bromodesoxiuridina. Este protocolo permite cultivos de cardiomiocitos de alta pureza (15). Para los estudios de *western blot* y de RT-PCR se utilizaron placas de 60 milímetros con células sembradas a una densidad de $\sim 3 \times 10^6$ células/placa de cultivo. Para la determinación de la actividad luciferasa, se utilizaron placas de 24 pocillos sembrando las células a una densidad de $\sim 3 \times 10^5$ células/pocillo.

8.3 Plasmidios y Transfecciones

Se utilizó un plasmidio reportero para evaluar la actividad transcripcional de los PPARs, el cual fue adquirido a través de la empresa Addgene, el cual fue donado por el Dr. Spiegelman (54). Este plasmidio posee 3 elementos de respuesta a PPAR más el promotor base de la timidina quinasa, clonado río arriba del gen reportero *luciferasa* (PPREx3-tk-Luc). Este reportero no es capaz de discriminar la actividad de un PPAR en particular, por lo que se utilizaron inhibidores específicos para determinar la participación de cada uno de ellos. Las células fueron co-transfectadas con el vector que expresa constitutivamente la proteína *Renilla* como control de transfección (CMV-Renilla). Las transfecciones se llevaron a cabo utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. En cada condición se utilizó una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ADN plasmidial, los que fueron incubados durante 20 minutos con lipofectamina en medio de transfección [DMEM-M199 (4:1) sin suero ni antibióticos] a temperatura ambiente. A placas de 24 pocillos que contenían los cardiomiocitos se les retiró el medio de cultivo y se les agregó la mezcla de ADN plasmidial-Lipofectamina y se incubaron durante 4 horas a 37°C y 5% CO_2 , en un volumen final de 200 μL por pocillo. Posteriormente, se adicionó a la mezcla 1 mL de medio completo [DMEM-199 (4:1) suplementado con suero fetal bovino al 10%]. Luego de 24 horas, las células fueron privadas de suero antes de ser estimuladas (aproximadamente 12 horas de deprivación). Los cardiomiocitos

fueron preincubadas o no con inhibidores por 30 minutos, y luego estimulados con testosterona o con activadores farmacológicos por diferentes tiempos (3, 6 y 12 horas). La lisis de las células se realizó al terminar el tiempo de estimulación. La determinación de la actividad *luciferasa* y *Renilla* se realizó mediante el kit Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) en un luminómetro (Berthold F12 luminometer, Alemania) y los datos son expresados como la razón *luciferasa/Renilla*.

8.4 Inmunodetección

Los cardiomiocitos cultivados en placas de cultivo de 60 milímetros de diámetro se preincubaron o no con inhibidores por 30 minutos y luego fueron estimulados con testosterona. Al finalizar los tiempos de estimulación, las células fueron lavadas en tampón fosfato salino frío y se les agregó una solución de lisis consistente en 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1% Tritón X-100, 2 mM EDTA, 20 mM NaF, 1mM Na₂P₂O₇, 10% glicerol, 150 mM NaCl, 10 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF y mezcla de inhibidores de proteasas (*Roche Applied Science*, Indianapolis, IN). Los lisados fueron incubados durante 20 min en hielo y luego centrifugados a 15.000 rpm por 15 min a 4°C. La determinación de proteínas totales se realizó con el reactivo *Comassie Plus Reagent* (*Pierce Biotechnology*, Piscataway, NJ). La separación de proteínas por electroforesis se llevó a cabo según protocolos estándares. Los extractos proteicos totales fueron denaturados a 100°C en una solución tampón conteniendo 62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 10% glicerol, 2% duodecil sulfato de sodio, 100 mM DTT y 0,01% azul de bromofenol. Las proteínas (20 µg) fueron separadas en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 10% utilizando un equipo de electroforesis *Mini-Protean III* (*Bio-Rad*, Hercules, CA). Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa usando un sistema de transferencia húmeda *Mini-Trans Blots* (*Bio Rad*, Hercules, CA) a 400 mA durante 1,5 horas a 4°C. Luego las membranas fueron lavadas tres veces con solución TBS-T (20

mM Tris-HCl [pH 7,6], 150 mM NaCl, 0,05% Tween) y posteriormente incubadas con solución de bloqueo (5% de leche en polvo 0% materia grasa en TBS-T) a temperatura ambiente por 1 hora. Posteriormente, fueron incubadas toda la noche a 4°C con anticuerpos primarios en la solución de bloqueo. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: anti-PPAR α (1:1000; Cayman Chemical) y anti-PPAR β (1:1000; Affinity Bioreagents). Además se utilizó el anti- β -actina como control de carga (1:10000; *Sigma*). Luego, las membranas fueron lavadas tres veces con TBS-T durante 10 minutos a temperatura ambiente, e incubadas con anticuerpos secundarios específicos (1:2000 en solución de bloqueo) conjugados a peroxidasa (*Pierce Biotechnology*, Piscataway, NJ), por 1,5 horas a temperatura ambiente. La reacción quimioluminiscente se realizó con un kit *Supersignal West Pico* (*Pierce Biotechnology*, Piscataway, NJ) y para la detección se usaron películas fotográficas (*Amersham Biosciences*, Piscataway, NJ).

Una vez finalizado este procedimiento las membranas de nitrocelulosa fueron tratadas con una solución consistente en 200 mM Glicina (pH 2), 100 mM β -mercaptoetanol y 0,05 % Tween, a temperatura ambiente por 30 min, para remover los anticuerpos unidos. Las membranas fueron lavadas 3 veces con TBS-T, bloqueadas por 1 hora con solución de bloqueo e incubadas con anticuerpos dirigidos contra la β -actina, como control de carga de proteínas en el gel. Las películas fotográficas de los geles fueron digitalizadas para su posterior análisis densitométrico utilizando el software ImageJ versión 1.44 (NIH, Bethesda, USA).

8.5 RT-PCR y PCR

Los cardiomiocitos cultivados en placas de cultivo de 60 milímetros de diámetro se pre-incubaron o no, con distintos inhibidores por 30 minutos y luego fueron estimulados con testosterona (100 nM). Al finalizar los tiempos de estimulación se extrajo el ARN utilizando 1 mL del reactivo Trizol (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. La pureza del ARN

fue verificada mediante la razón de la medición de la absorbancia a 260nm/280nm y la integridad fue evaluada mediante la visualización de las subunidades de ARNr 28S y 18S en geles de agarosa al 0,8%. Para generar ADNc a partir de ARN mediante la reacción de RT-PCR, se utilizó 1,5 µg de ARN y la enzima SuperScriptII (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Una vez obtenido el ADNc, se tomaron 2 µL del producto de la reacción reversa y se realizó un PCR utilizando partidores específicos para el MRNA de la PFK (producto PCR ~ 300 pares de bases) y GAPDH (producto PCR ~ 150 pares de bases), diseñados con el software *on-line* del MIT primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>, 5 Julio 2009) más la enzima GoTaq Polimerasa (Promega) siguiendo las especificaciones del fabricante. Las muestras se ubicaron en un termociclador y se aplicó el siguiente programa (con temperatura de alineamiento estandarizado para PFK y GAPDH): 94 °C por 2 minutos, seguido de 28 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 60 °C por 40 segundos y 72 °C por 30 segundos, y finalmente una temperatura de extensión de 72 °C por 5 minutos. Las muestras, luego del PCR, fueron analizadas en geles de agarosa al 2% en tampón TAE y bromuro de etidio 0,1 µg/mL. Las imágenes digitalizadas de la separación de los productos de PCR fueron analizadas con el software ImageJ versión 1.44 (NIH, Bethesda, USA).

Datos de los primers utilizados son los siguientes:

Fosfofructoquinasa (PFK):

Sense 5' CTG GAC TGG TCA AGG TGG TT 3'

Anti-sense 5' CAG ACT GCT TGA TTC GGT CA 3'

Temperatura de alineamiento: 60 °C ; Concentración final MgCl₂ = 2 mM ; N° ciclos = 28.

Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (GAPDH):

Sense 5' CTC ATG ACC ACA GTC CAT GC 3'

Anti-sense 5'TTC AGC TCT GGG ATG ACC TT 3'

Temperatura de alineamiento: 60 °C ; Concentración final MgCl₂ = 2 mM ; N° ciclos = 28.

Hexoquinasa II (HKII):

Sense 5' CAC TCC AGA TGG CAC AGA GA 3'

Anti-sense 5' TGA GGA GGA TGC TCT GGT CT 3'

Temperatura de alineamiento: 58 °C ; Concentración final MgCl₂ = 2 mM ; N° ciclos = 30.

Carnitina Palmitoil-transferasa 1 b muscular (mCPT-1b):

Sense 5' CAA AGG TCG CTT CTT CAA GG 3'

Anti-sense 5' ATT TGC CGT AGA GGC TGA GA 3'

Temperatura de alineamiento: 56 °C ; Concentración final MgCl₂ = 2 mM ; N° ciclos = 30.

8.6 Expresión de resultados y análisis estadístico

Los datos experimentales son presentados como el promedio \pm el error estándar de los resultados de al menos 3 experimentos independientes. Los experimentos de más de dos grupos fueron sometidos a un análisis de varianza y las comparaciones entre ellos se llevaron a cabo utilizando el post-test de *Tukey*. Los experimentos de dos grupos se analizaron mediante el test no paramétrico de *Mann-Whitney*. Se utilizó el programa *GraphPad Prism 5* (*GraphPad Software*, San Diego, CA). Un valor $p < 0,05$ fue considerado como una diferencia estadísticamente significativa.

9 Resultados

9.1 Testosterona incrementa la actividad transcripcional de los PPARs en cardiomiocitos.

Para determinar el efecto de la testosterona sobre la actividad de los PPARs, los cardiomiocitos se co-transfectaron con el plasmidio PPREx3-tk-Luc, el cual expresa un gen reportero bajo el control de tres elementos de respuesta para PPAR (54) y con un plasmidio control de transfección (CMV-Renilla). Las células se estimularon con activadores farmacológicos tanto para el PPAR α (Wy 14643, 100 μ M) como para el PPAR β (L-165041, 10 μ M) (31), con el fin de identificar si en el modelo de estudio el plasmidio reportero era capaz de responder a la activación de los PPARs. Como se muestra en la Figura 3A la estimulación con los activadores farmacológicos incrementó la actividad de los PPARs a las 12 horas.

Posteriormente se estimularon las células con testosterona a una concentración de 100 nM. Se utilizó sólo esta concentración de hormona ya que ha sido mostrado previamente que produce hipertrofia del cardiomiocito (10). Como se observa en la Figura 3B, la testosterona aumentó la actividad transcripcional de los PPARs en $1,4 \pm 0,1$ ($n=6$; $p<0,01$) veces respecto a la condición basal, a las 3 horas de estimulación. Luego la actividad medida vuelve a los niveles basales a las 12 horas.

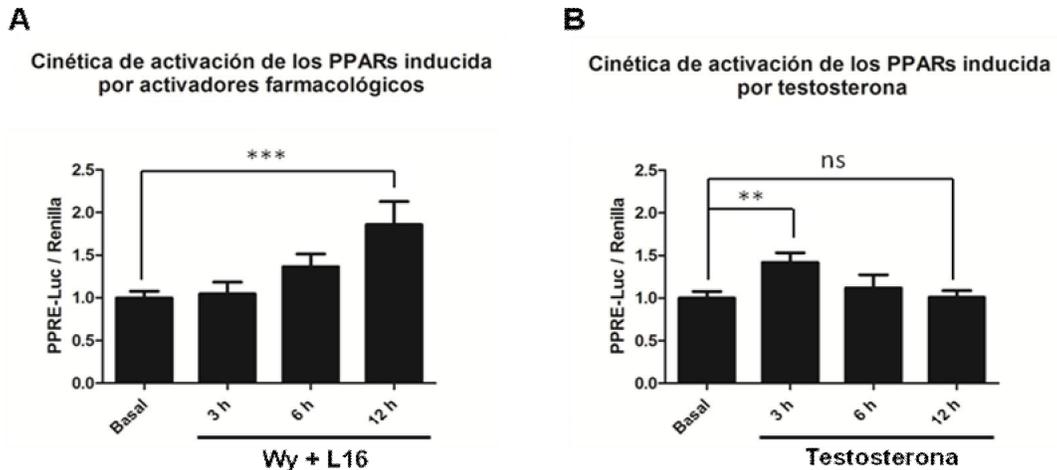


Figura 3. Cinética de activación de los PPARs inducida por activadores farmacológicos y por testosterona en cardiomiocitos. Los cardiomiocitos se co-transfectaron con el plasmidio reportero PPREx3-tk-Luc y CMV-Renilla, luego se estimularon con **A**) Wy 14643 (Wy, 100 μ M) más L-165041 (L16, 10 μ M), activadores farmacológicos del PPAR α y el PPAR β respectivamente o **B**) testosterona (T, 100 nM) por los tiempos indicados. El extracto proteico con la luciferasa se obtuvo al finalizar el tiempo de estimulación. Se observa un máximo de activación a las 12 horas de incubación con los activadores mientras que con testosterona se observa un máximo de activación a las 3 horas de estimulación. Los gráficos muestran el promedio \pm el error estándar de la razón de las unidades de luminiscencia de la luciferasa/renilla en cada condición, de al menos 3 experimentos independientes en cuadruplicado (Estadística: ANOVA con posttest de Tukey). **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; ns=no significativo. *comparado con situación control.

9.2 Testosterona aumenta la expresión del PPAR β , pero no del PPAR α , en cardiomiocitos.

Otro parámetro de activación de los PPARs es el aumento en la expresión de los diferentes miembros de esta familia de proteínas (31). Para determinar los efectos de la testosterona en la expresión del PPAR α o el PPAR β , se estimularon cardiomiocitos por 6 y 12 horas y se determinó mediante inmunodetección los cambios en la expresión de estas proteínas en cada condición, utilizando anticuerpos específicos cada uno de ellos. Como se muestra en la Figura 4, la estimulación con testosterona no afectó los niveles de expresión del PPAR α (Figura 4A). Sin embargo, esta hormona aumentó en $1,8 \pm 0,1$ ($n=6$; $p < 0,001$) veces la expresión del PPAR β respecto a la condición basal a las 12 horas de estimulación. El aumento en los niveles de

expresión del PPAR β y no del PPAR α sugiere un efecto diferencial de la testosterona sobre esta familia de proteínas.

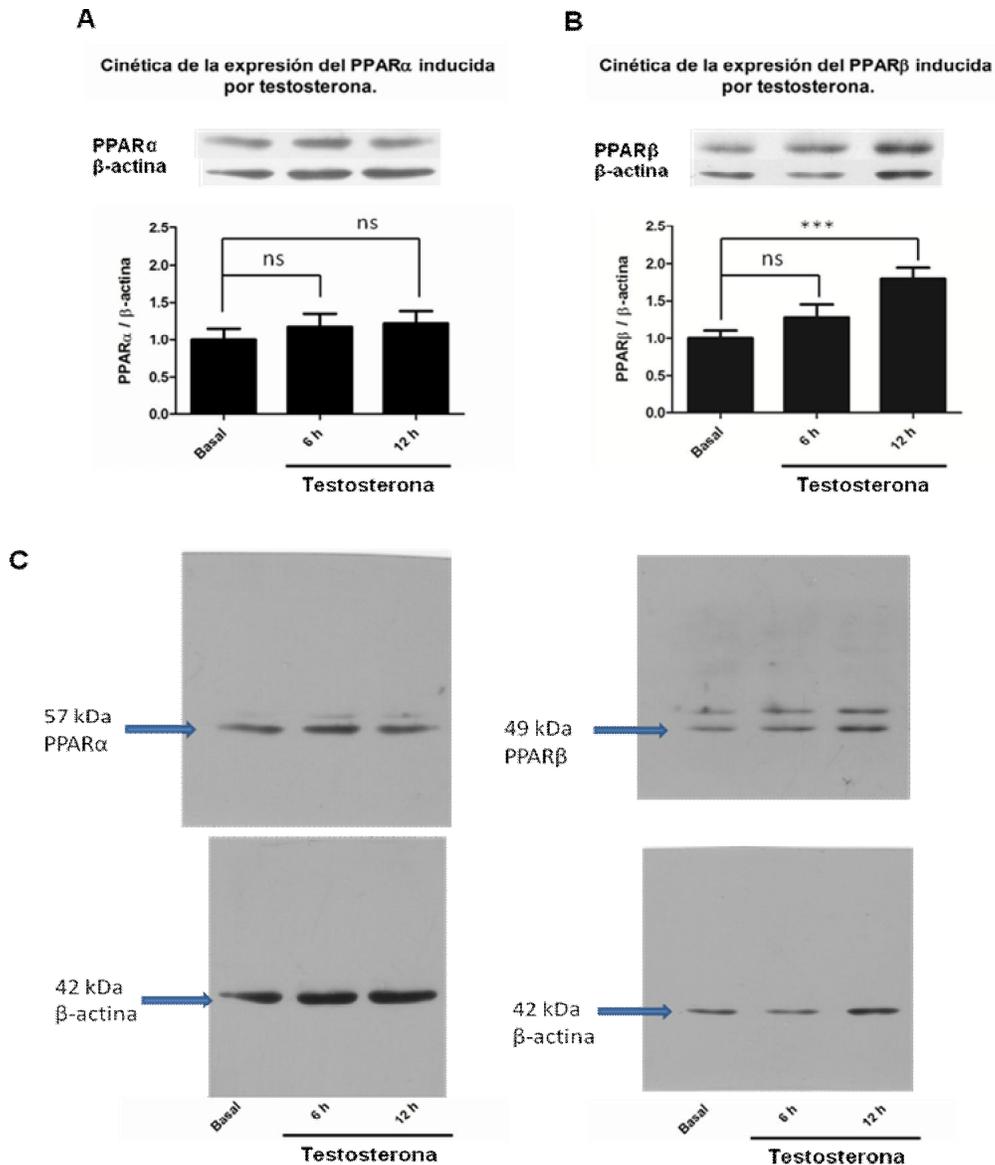


Figura 4. Estudio cinético de la expresión del PPAR α y PPAR β en cardiomiocitos estimulados con testosterona. Los cardiomiocitos se estimularon con testosterona (T, 100 nM) por los tiempos indicados. Los niveles proteicos del PPAR α y PPAR β se determinaron mediante western blot desde extractos proteicos totales usando anticuerpos específicos contra estas proteínas. En **A**) no hay efecto sobre la expresión del PPAR α en células estimuladas con testosterona. En **B**) se observa un aumento en la expresión del PPAR β a las 12 horas de estimulación con esta hormona. En **C**) Imagen digitalizada representativa de la inmunodetección estudiada en A y B. Los gráficos muestran el promedio \pm el error estándar de los resultados del análisis densitométrico de al menos 3 experimentos independientes, normalizados contra los niveles de la β -actina. (Estadística: ANOVA con posttest de Tukey). ***= $p < 0,001$; ns=no significativo. *comparado con situación control.

9.3 Participación del PPAR α o el PPAR β en la activación transcripcional de los PPARs inducida por testosterona.

Debido a que el plasmidio reportero PPREx3-tk-Luc responde tanto a la actividad del PPAR α como del PPAR β , se utilizaron inhibidores farmacológicos específicos para discriminar la participación de estas proteínas en el incremento de la actividad transcripcional de los distintos PPARs inducida por testosterona. Los cardiomiocitos co-transfectados con el plasmidio reportero PPREx3-tk-Luc y CMV-Renilla, fueron estimulados con testosterona por 3 horas (tiempo de máxima actividad determinado en los resultados de la Figura 3B) en presencia de inhibidores farmacológicos específicos. Para la inhibición del PPAR α se utilizó el inhibidor GW 6471 (GW, 10 μ M) (55) y para el PPAR β se usó el inhibidor GSK 0660 (GSK, 1 μ M) (56). Como se muestra en la Figura 5, el tratamiento con estos inhibidores no logró establecer una diferencia estadísticamente significativa entre las células estimuladas con testosterona. Sin embargo, se observa que el efecto de la inhibición del PPAR β tiende a estabilizar la actividad observada, mientras que la inhibición del PPAR α muestra un patrón similar a la condición sin inhibición, es decir, una tendencia al aumento de la actividad al estimular con testosterona. Este resultado es poco concluyente, pero sugiere que el PPAR β podría ser más importante que el PPAR α en el aumento de la actividad transcripcional de los PPARs inducida por testosterona.

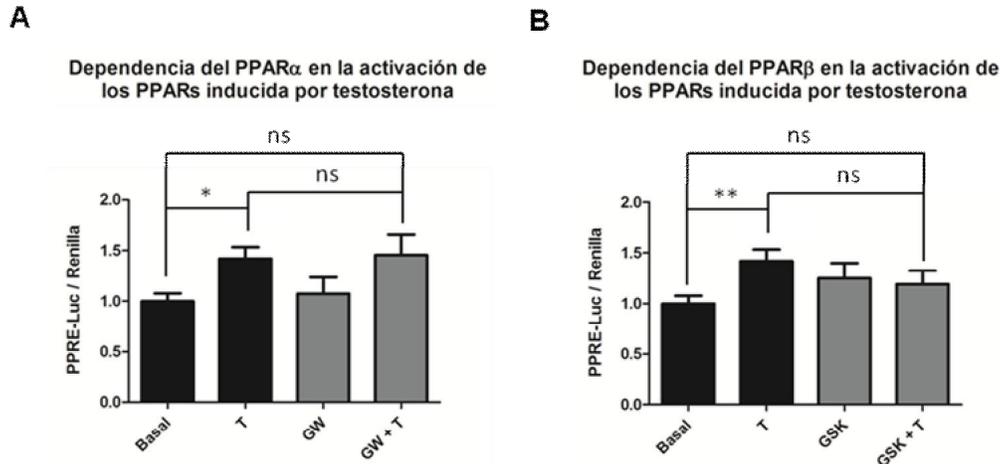


Figura 5. Dependencia del PPAR α y PPAR β en la activación de los PPARs inducida por testosterona en cardiomiocitos. Los cardiomiocitos fueron co-transfectados con el plasmidio reportero PPREx3-tk-Luc y CMV-Renilla. En **A**) las células fueron preincubadas con GW 6471 (GW, 10 μ M), un inhibidor farmacológico del PPAR α , por 30 minutos. Posteriormente se estimuló con testosterona (T, 100 nM) por 3 hrs. Los resultados sugieren que la participación del PPAR α es baja **B**) Las células fueron preincubadas con GSK 0660 (GSK, 1 μ M), un inhibidor farmacológico del PPAR β , por 30 minutos antes de la estimulación con testosterona (T, 100 nM) por 3 hrs. La activación de los PPARs inducida por esta hormona requiere de la actividad del PPAR β . Los gráficos muestran el promedio \pm el error estándar de al menos 3 experimentos independientes, de la razón de las unidades de luminiscencia de la luciferasa/renilla en cada condición. (Estadística: ANOVA con post-test de Tukey). *= p <0,05; **= p <0,01 ; ns=no significativo. *comparado con situación control.

9.4 Efecto de la inhibición del PPAR α y el PPAR β sobre el aumento en la expresión del PPAR β inducida por testosterona en cardiomiocitos

Existen reportes en la literatura indicando que los PPARs pueden auto-regular su expresión (57, 58). Para determinar una potencial participación ya sea del PPAR α o del PPAR β en el aumento en los niveles proteicos del PPAR β inducida por testosterona, se utilizaron inhibidores específicos para estas proteínas en cardiomiocitos estimulados o no con esta hormona por 12 horas. Mediante inmunodetección se analizó los niveles proteicos del PPAR β en cada condición. Como se muestra en la Figura 6, la inhibición del PPAR α bloquea el aumento en la expresión del PPAR β inducido por testosterona, mientras que la inhibición del PPAR β tiende a abolir el aumento en la expresión de esta proteína inducido por la hormona, sin embargo no se logra obtener una diferencia estadísticamente significativa. Este resultado sugiere que es

necesaria tanto la actividad del PPAR α como la del PPAR β para que ocurra el aumento de la expresión del PPAR β inducido por la testosterona, sin embargo es necesario realizar estudios más detallados en esta dirección.

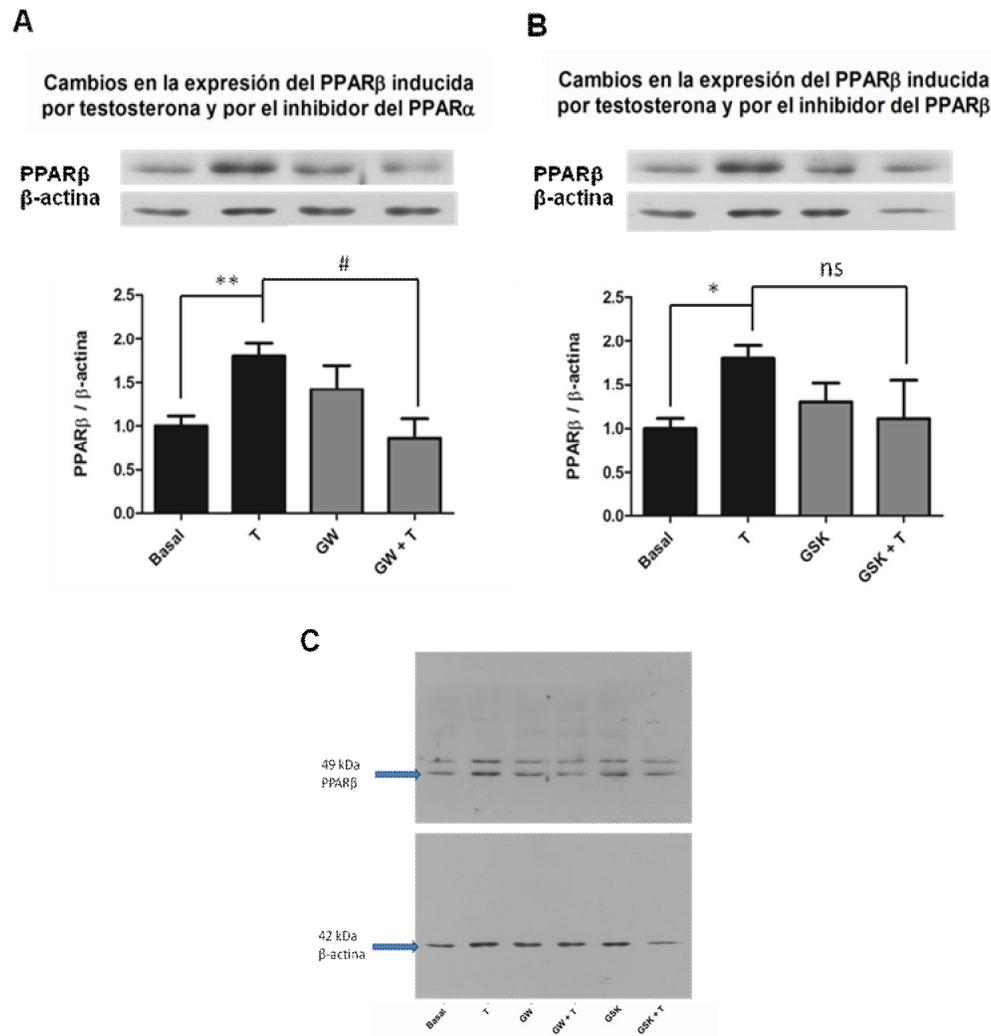


Figura 6. Efecto de la inhibición del PPAR α y PPAR β sobre la expresión del PPAR β en cardiomiocitos estimulados con testosterona. **A)** Los cardiomiocitos fueron preincubados con el inhibidor de PPAR α GW 6471 (GW, 10 μ M), por 30 min. Luego se estimuló con testosterona (T, 100 nM) por 12 hrs. La inhibición del PPAR α bloquea el aumento de la expresión de PPAR β inducido por testosterona. **B)** Los cardiomiocitos fueron preincubados con el inhibidor de PPAR β , GSK 0660 (GSK, 1 μ M) por 30 min antes del estímulo con testosterona por 12 hrs. La inhibición del PPAR β tiende a inhibir la expresión de PPAR β , sin embargo la diferencia no es estadísticamente significativa. En **C)** Imagen digitalizada representativa de la inmunodetección estudiada en A y B. Los gráficos muestran el promedio \pm el error estándar de los resultados del análisis densitométrico de al menos 3 experimentos independientes, normalizados contra los niveles de la β -actina. (Estadística: ANOVA con posttest de Tukey). *= p <0,05 ; **= p <0,01 ; #= p <0,05 ; ns=no significativo. *comparado con situación control. #comparado con situación estimulada.

9.5 Participación de los procesos mediados por IP₃R en la activación de los PPARs inducido por testosterona en cardiomiocitos.

Nuestro laboratorio ha demostrado que la testosterona produce aumentos del Ca²⁺ intracelular liberado desde el IP₃R, y que este evento activa vías de señalización importantes para el desarrollo de la hipertrofia del cardiomiocito (10, 15). Para determinar la participación de los procesos mediados por el IP₃R en el incremento de la actividad transcripcional de los PPARs inducida por testosterona, los cardiomiocitos co-transfectados con el plasmidio reportero PPREx3-tk-Luc y CMV-Renilla, fueron estimulados con testosterona por 3 horas en presencia de 2-aminoetoxidifenil borato (2-APB, 20 μM), un inhibidor farmacológico para el IP₃R, (10). Como se muestra en la Figura 7A, la sola inhibición del IP₃R incrementó la actividad transcripcional de los PPARs en forma similar a la observada en la activación por testosterona. Dicho efecto del 2-APB no logró un patrón sumativo bajo la presencia de la hormona. Este resultado muestra que la actividad transcripcional de los PPARs podría ser regulada por procesos mediados por el IP₃R, en una modulación de tipo negativa (Figura 7A).

Luego se estudió la participación de los procesos mediados por el IP₃R en el incremento de la expresión del PPARβ inducido por testosterona. Para ello se estimularon cardiomiocitos con esta hormona por 12 horas en presencia o no de 2-APB. Mediante inmunodetección se determinó los niveles proteicos del PPARβ. Como se muestra en la Figura 7B la sola inhibición del IP₃R produce una tendencia al aumento en la expresión del PPARβ, lo cual sería concordante con los datos obtenidos en la Figura 7A. Sin embargo, dicha tendencia disminuye bajo la estimulación con testosterona. Si bien no se alcanzan diferencias estadísticamente significativas, este resultado sugiere que los procesos mediados por el IP₃R podrían ser necesarios para el aumento en la expresión del PPARβ inducida por testosterona en cardiomiocitos.

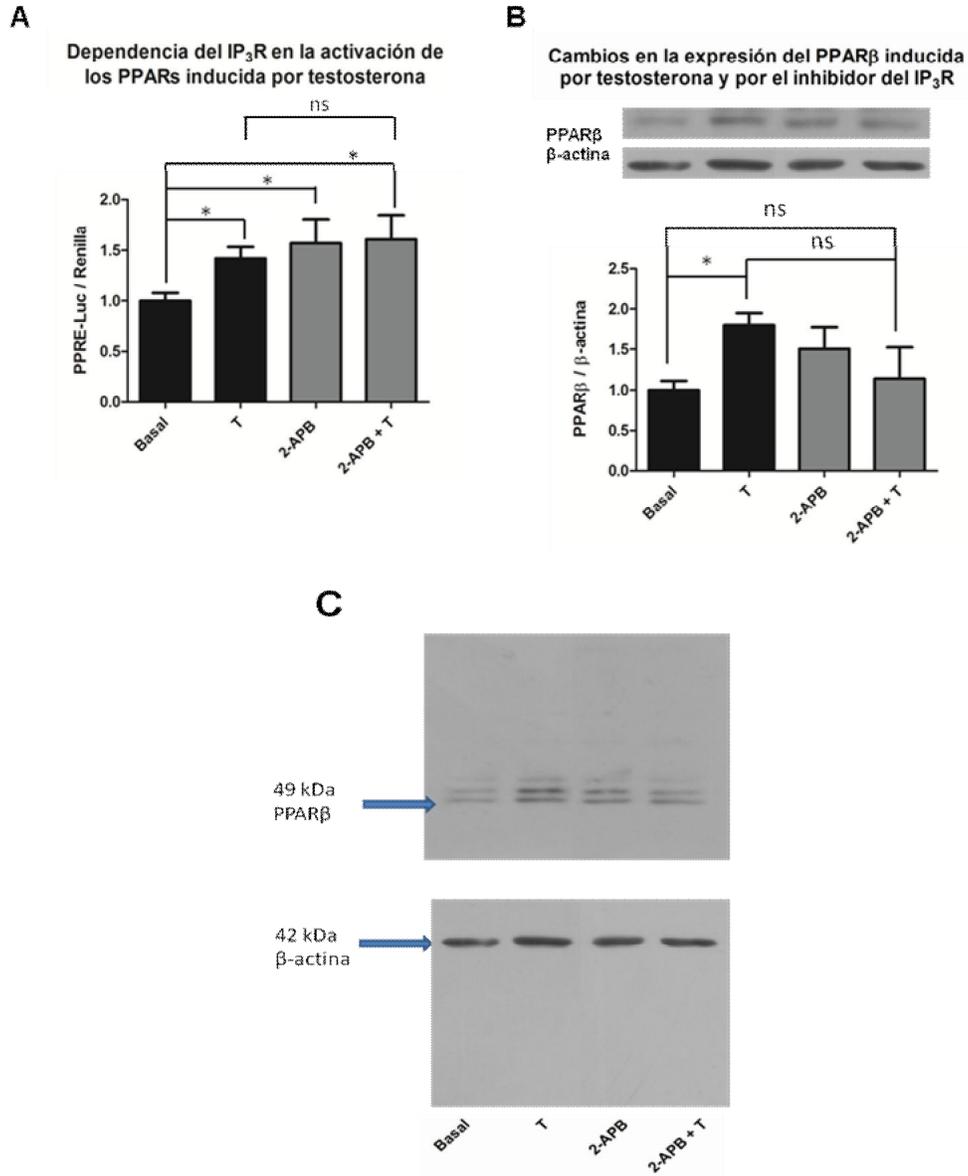


Figura 7. Dependencia del IP₃R en la activación de los PPARs inducida por testosterona en cardiomiocitos. **A)** Los cardiomiocitos fueron co-transfectados con el plasmidio reportero PPREx3-tk-Luc y CMV-Renilla. Luego fueron preincubados con 2-APB (20 μ M), un inhibidor farmacológico del IP₃R, por 30 minutos antes de ser estimulados con testosterona (T, 100 nM) por 3 hrs. La inhibición por sí sola del IP₃R activa a los PPARs de forma similar a la activación producida por testosterona, sin tener un efecto sumativo ambos tratamientos. Los gráficos muestran el promedio \pm la desviación estándar de 3 experimentos independientes, de la razón de la señal luciferasa/renilla en cada condición. **B)** Los cardiomiocitos fueron preincubados con 2-APB (20 μ M), un inhibidor farmacológico del IP₃R, por 30 minutos. Posteriormente se estimuló con testosterona (T, 100 nM) por 12 hrs. La actividad del IP₃R es necesaria para el aumento de la expresión del PPAR β inducida por testosterona. En **C)** Imagen digitalizada representativa de la inmunodetección estudiada en B (Estadística: ANOVA con post-test de Tukey). *= $p < 0,05$; ns=no significativo. *comparado con situación control.

9.6 Testosterona aumenta los niveles del MRNA de enzimas involucradas en la glicólisis en cardiomiocitos

Debido a que los resultados anteriores sugieren que la testosterona activa al PPAR β , y se ha reportado que esta proteína promueve la expresión de genes involucrados en la glicólisis, se procedió a analizar la cantidad del MRNA de enzimas de esta vía metabólica, como la hexoquinasa II (HKII) y la fosfofructoquinasa (PFK). Además se evaluaron los niveles del MRNA del transportador carnitina palmitoil-transferasa 1b muscular (mCPT-1b) como marcador de la β -oxidación. Para esto se estimularon cardiomiocitos por 12 horas y se realizó un RT-PCR convencional para determinar los niveles del MRNA de estas enzimas. Como se muestra en la Figura 8, la testosterona induce un aumento de $1,55 \pm 0,2$ (n=6; p<0,001) y de $1,99 \pm 0,4$ (n=3; p<0,05) en los niveles del transcrito de la PFK (Figura 8A) y la HKII (Figura 8B) respectivamente, comparando con el grupo control (basal). Por otro lado, esta hormona no modifico los niveles del MRNA del mCPT-1b (Figura 8C).

Para los siguientes análisis sólo se utilizó la PFK como marcador de la glicólisis, por tres motivos principalmente. Uno, esta proteína es la enzima marcapaso de la vía glicolítica y por ello es un punto de control muy importante dentro del metabolismo de la glucosa. Segundo, los resultados que se obtuvieron de esta enzima fueron los más reproducibles. Tercero, con un marcador de la glicólisis es suficiente para sólo explorar la participación del PPAR β en el control transcripcional de una de las enzimas claves de la glicólisis. Además de determinar si los procesos mediados por el IP $_3$ R están participando en ello.

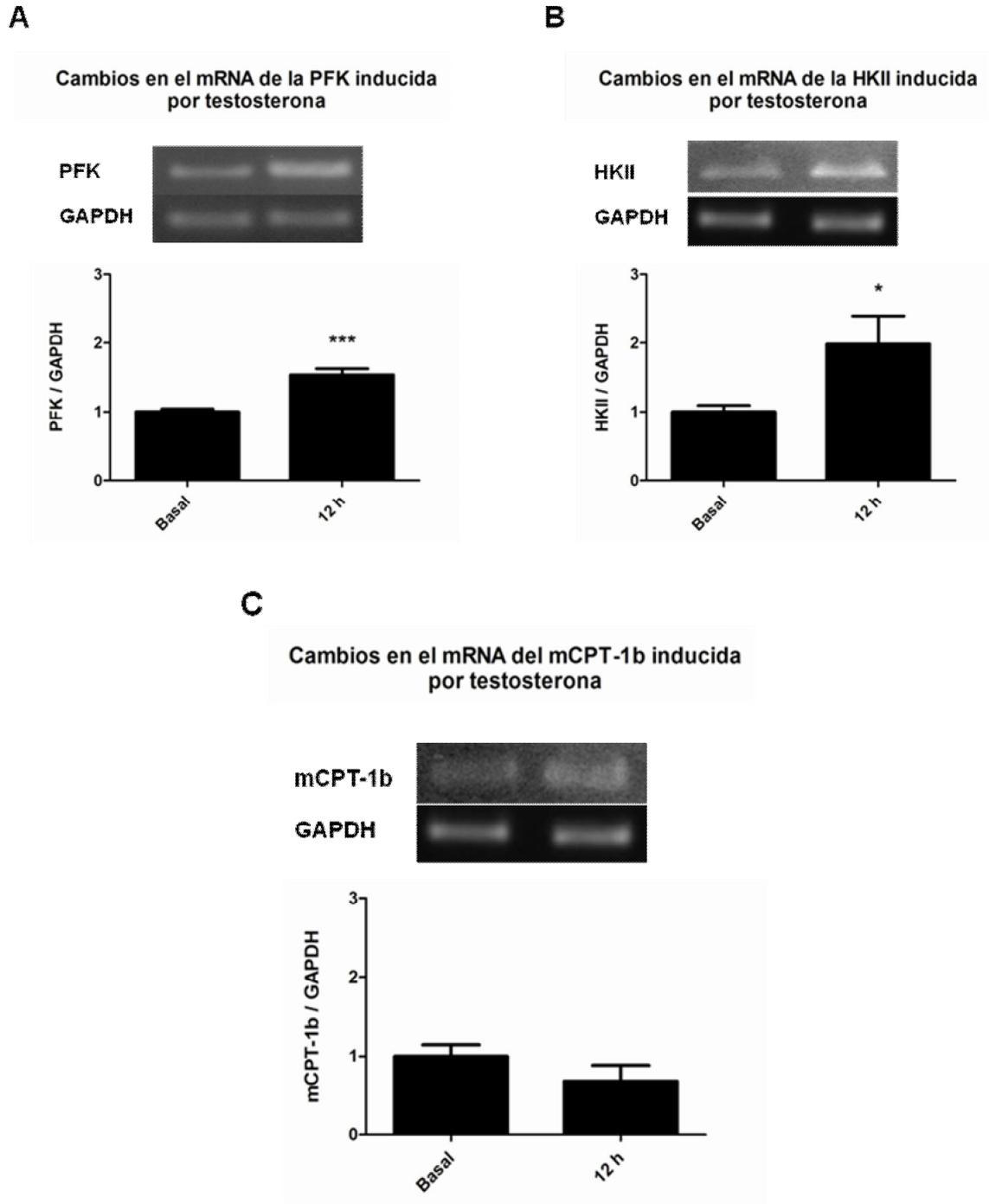


Figura 8. Aumento del mRNA de la PFK y la HKII inducida por testosterona en cardiomiocitos. Los cardiomiocitos fueron estimulados con testosterona (T, 100 nM) por 12 horas. Los niveles del mRNA de la PFK (A), HKII (B) y el mCPT-1b (C) se determinaron mediante RT-PCR convencional utilizando partidores específicos. Se observa un aumento en el mRNA de la PFK y la HKII inducido por la testosterona. Los gráficos muestran el promedio \pm el error estándar de los resultados del análisis densitométrico de al menos 3 experimentos independientes, normalizados contra los niveles de la GAPDH. (Estadística: test no paramétrico de Mann-Whitney). ***= $p < 0,001$; *= $p < 0,05$. *comparado con situación control.

9.7 Efecto de la inhibición del PPAR β sobre el aumento de los niveles del mRNA de la PFK inducida por testosterona en cardiomiocitos

Para determinar la participación del PPAR β en el aumento en los niveles del transcrito de la PFK inducido por testosterona, se realizaron estudios mediante RT-PCR de cardiomiocitos estimulados o no con testosterona por 12 horas en presencia del inhibidor del PPAR β . Como se muestra en la Figura 9, el aumento del transcrito de la PFK inducido por esta hormona fue inhibido en presencia de GSK 0660 (1 μ M). Este resultado sugiere que es necesaria la actividad del PPAR β para el aumento del mRNA de la PFK inducido por testosterona.

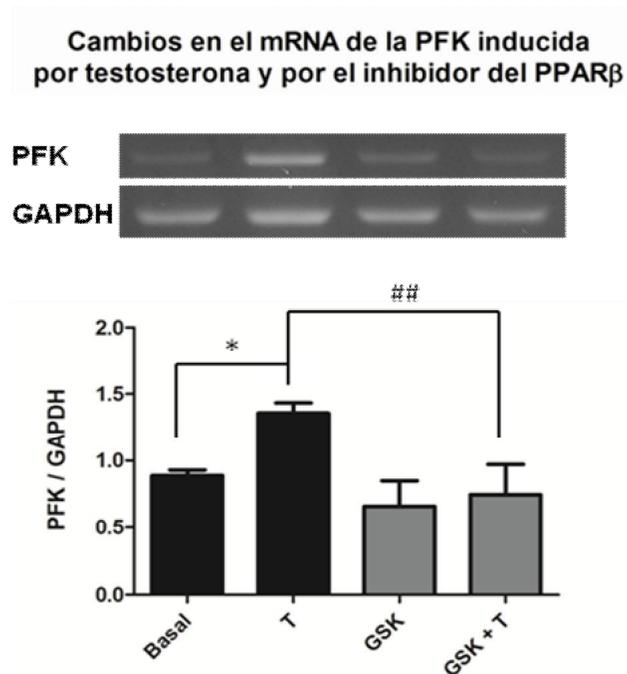


Figura 9. Efecto de la inhibición del PPAR β sobre el aumento del mRNA de la PFK en cardiomiocitos estimulados con testosterona. Los cardiomiocitos fueron preincubados con GSK 0660 (GSK, 1 μ M), un inhibidor farmacológico del PPAR β , por 30 minutos. Posteriormente se estimuló con testosterona (T, 100 nM) por 12 hrs. La actividad del PPAR β es necesaria para el aumento del mRNA de la PFK inducida por testosterona. Los gráficos muestran el promedio \pm el error estándar de los resultados del análisis densitométrico de al menos 3 experimentos independientes, normalizados contra los niveles de la GAPDH. (Estadística: ANOVA con posttest de Tukey). **= $p < 0,01$; ##= $p < 0,01$. *comparado con situación control. #comparado con situación estimulada

9.8 Participación de los procesos mediados por el IP₃R en el aumento en el mRNA de la PFK inducida por testosterona en cardiomiocitos

Para determinar la participación de los procesos mediados por el IP₃R en el aumento en los niveles del transcrito de la PFK inducido por testosterona, se realizó estudios mediante RT-PCR de cardiomiocitos estimulados o no con testosterona por 12 horas en presencia del inhibidor 2-APB. Como se muestra en la Figura 10, la inhibición del IP₃R por sí mismo aumenta los niveles del mRNA de la PFK. No ocurre un efecto sumativo entre la inhibición y la estimulación con testosterona. Este resultado, aún cuando no es concluyente, sugiere un rol de regulación negativa de los procesos mediados por el IP₃R sobre los niveles del mRNA de la PFK.

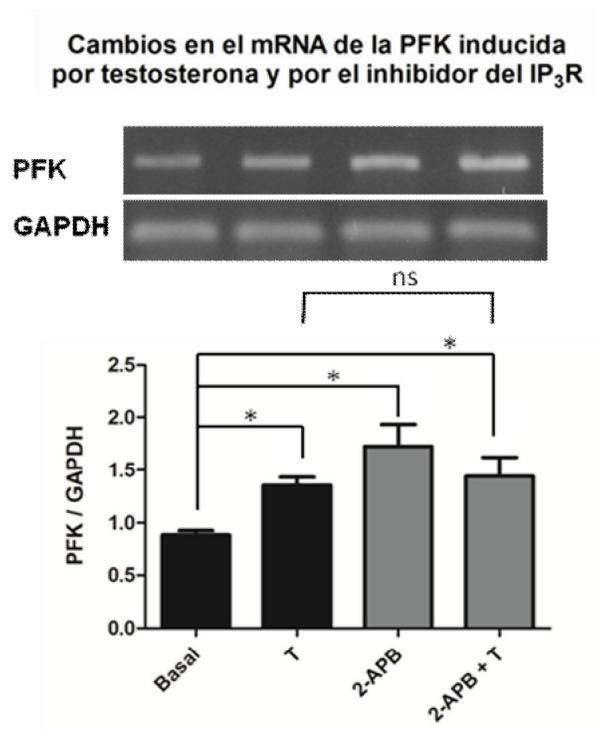


Figura 10. Efecto de la inhibición del IP₃R sobre los niveles del mRNA de la PFK en cardiomiocitos estimulados con testosterona. Los cardiomiocitos fueron preincubados con 2-APB (20 uM), un inhibidor farmacológico del IP₃R, por 30 minutos. Posteriormente se estimuló con testosterona (T, 100 nM) por 12 hrs. La inhibición del IP₃R por sí mismo es capaz de aumentar los niveles del mRNA de la PFK, sin embargo no ocurre un efecto sumado entre la inhibición del IP₃R y la estimulación con testosterona. Los gráficos muestran el promedio \pm el error estándar de los resultados del análisis densitométrico de al menos 3 experimentos independientes, normalizados contra los niveles de la GAPDH. (Estadística: ANOVA con posttest de Tukey). *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; ns=no significativo. *comparado con situación control.

10 Discusión

10.1 La testosterona y los resultados transcripcionales de los PPARs.

En este trabajo muestra por primera vez que la testosterona modifica la actividad de los PPARs a concentraciones que causan la hipertrofia del cardiomiocito. Esta hormona activa a los PPARs, medido por la actividad de un gen reportero, a las 3 horas de estimulación (Figura 3B). Debido a que cualquiera de los tres PPARs se puede unir a los elementos de respuesta del plasmidio reportero (PPREx3-tk-Luc), se utilizaron inhibidores farmacológicos para discriminar entre los potenciales PPARs activados por testosterona, en este estudio PPAR α o PPAR β . De acuerdo a los antecedentes expuestos en la introducción, en esta investigación se desestimó la participación del PPAR γ ; sin embargo, en futuros estudios sería interesante explorar si este miembro de los PPARs es regulado por testosterona o bien si él mismo participa en la regulación de la respuesta de los otros miembros de los PPARs frente a la estimulación con esta hormona. Cabe mencionar en este punto que las cantidades relativas del PPAR α y PPAR β en nuestro modelo, cardiomiocitos de rata neonata, son comparables con las cantidades relativas en los cardiomiocitos de rata adulta. En ambos casos, la presencia de PPAR γ es casi indetectable (42).

Si bien los resultados de este trabajo no fueron plenamente concluyentes (estudios de gen reportero), estos sugieren que la testosterona activa principalmente al PPAR β , a las 3 horas de estimulación (Figura 3B). Dicha respuesta temprana podría reflejar una modificación de la actividad basal de las poblaciones subcelulares de los PPARs, en especial del PPAR β , ya que el aumento en los niveles de expresión de esta proteína se observó a las 12 horas de estimulación (el otro parámetro de activación de la vía) (Figura 4B). Futuros estudios deben sobrellevar algunos motivos técnicos, debido a que no se logró utilizar un control más preciso de esta técnica, como el uso de un plasmidio que contenga el gen reportero sin un promotor inducible (Mock) y/o un

plasmidio que posea el promotor pero con las regiones PPRE mutada con el fin de impedir la unión de los PPARs. Si bien este trabajo carece de dichos controles, el hecho de que los activadores farmacológicos de los PPARs produjeron aumentos de la actividad luciferasa da cuenta de que efectivamente el reportero responde a la activación de los PPARs. Es intrigante el hecho de que los niveles basales de la actividad luciferasa en células estimuladas con testosterona disminuyeran rápidamente después de 6 horas de estimulación, probablemente esto se deba tanto a una rápida degradación de la luciferasa (59) la que sumada a una baja eficiencia de transfección, daría cuenta de una rápida caída de la señal del reportero. Otra posibilidad es que la formación de complejos *de novo* de los PPARs en células estimuladas con testosterona, carecen de las proteínas accesorias necesarias tanto para la remodelación de la cromatina como para la estabilización de los complejos basales de la transcripción (reportero sólo contiene 3 elementos de respuesta a PPAR). Bajo estas observaciones, el uso de inhibidores del proteosoma sería un buen acercamiento para determinar la dinámica de la luciferasa en cardiomiocitos estimulados con testosterona tanto a tiempos cortos como largos.

10.2 PPARs y el receptor de andrógenos.

Existen reportes que relacionan la actividad de los PPARs en forma sexo-dependiente, en donde se observa que los machos tienen más de un orden de magnitud incrementada la actividad de los PPARs a nivel hepático que las hembras (60). Los datos expuestos en esta publicación sugieren la existencia de una relación entre los PPARs y el receptor de andrógenos (ambas proteínas pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares). Además, se han reportado interacciones físicas entre los PPARs y receptores de esteroides nucleares (35). Sería interesante explorar la interrelación que puede existir a tiempos tempranos entre el receptor de andrógenos y los PPARs, de manera de explicar el aumento en la actividad de estos últimos a las 3 horas de

estimulación. Otra posibilidad son las modificaciones post-traduccionales que pueden dar cuenta de variaciones en la actividad de estas proteínas (61, 62). Estudios *in-silico* muestran que los PPARs pueden ser fosforilados por diversas quinasas, entre ellas quinasas dependientes de Ca^{2+} (63, 64). Estos efectos tempranos pueden ser las primeras respuestas metabólicas adaptativas de la célula frente al comienzo en la transformación fenotípica hipertrófica. Datos de nuestro laboratorio demuestran que la quinasa activada por adenosina monofosfato (AMPK), un sensor metabólico intracelular, es activada a la hora de estimulación con testosterona, mostrando así que la reprogramación del metabolismo celular comienza a desarrollarse en forma anticipada. Probablemente dichas respuestas tienen por objeto maximizar las funciones metabólicas con la maquinaria disponible, pero sin duda esta respuesta inicial debe continuar con aumentos en la expresión de proteínas que den cuenta de la mantención de los cambios en el metabolismo observados durante el crecimiento celular. Así, los datos del aumento en los niveles proteicos del PPAR β a las 12 horas de estimulación parecen consecuentes con la cinética de desarrollo del fenotipo hipertrófico en el cardiomiocito, y con el cambio metabólico hacia un metabolismo más glicolítico (44). Nuestro laboratorio ha observado que el aumento en los marcadores moleculares de hipertrofia comienza a las 12 horas de estimulación con testosterona. Este hecho sugiere que la reprogramación metabólica celular se encuentra íntimamente relacionada con los cambios estructurales del cardiomiocito.

10.3 PPARs y el IP₃R.

Los aumentos del Ca^{2+} intracelular son un evento común para todos los estímulos hipertróficos conocidos (16). Por esto es interesante investigar si esta señal primaria puede ser el nexo entre la reprogramación metabólica y la reprogramación estructural el cardiomiocito bajo el estímulo hipertrófico. Nuestro laboratorio ha demostrado que la testosterona produce aumentos

de Ca^{2+} intracelular mediado por el IP_3R en cardiomiocitos (10, 15). Este evento es esencial para el establecimiento del fenotipo hipertrófico celular. En la literatura existen antecedentes que muestran que el metabolismo del cardiomiocito puede ser regulado de forma diferencial por la activación de quinasas y factores de transcripción dependientes de Ca^{2+} (52). Algunos reportes muestran el perfil de expresión de genes metabólicos en cardiomiocitos que sobre-expresan formas de calcineurina o CaMK constitutivamente activa. Los resultados fueron interesantes, ya que por ejemplo sólo la activación de la CaMK produjo aumentos de los genes de la vía glicolítica, mientras que la activación de la calcineurina fue la única que aumentó la expresión del $\text{PPAR}\alpha$. Así la activación de estas proteínas podría comandar cambios diferenciales en el metabolismo cardiaco. Resulta interesante mencionar a este punto que datos no publicados de nuestro laboratorio muestran que la testosterona activa a la CaMKII, en un evento que puede ser el nexo entre el aumento del Ca^{2+} intracelular y modificaciones en la expresión de genes del metabolismo (Distintas tesis desarrolladas por Karen Correa, Giselle Romero y Carlos Wilson).

En este trabajo de memoria se evaluó la participación de los procesos mediados por el IP_3R en la activación de los PPARs en cardiomiocitos. El acercamiento farmacológico utilizado fue el uso del 2-APB, el cual nos permitió determinar que los eventos mediados por el IP_3R controlan en forma negativa la actividad basal de los PPARs , ya que la inhibición por sí sola de este canal y los procesos comandados por éste fueron capaces de aumentar la actividad de estas proteínas medida a través del plasmidio reportero para PPARs (Figura 7A). La adición de la testosterona no produjo un efecto sumativo entre los aumentos de la actividad mediada por la inhibición del IP_3R y el aumento de la actividad mediada por la estimulación con esta hormona (Figura 7A). Probablemente una o varias de las vías de señalización que son reguladas por el IP_3R se encuentran controlando la actividad de los PPARs en forma basal, sugiriendo que dicha regulación posee una cierta jerarquía sobre la actividad de la testosterona en este canal. Sin

embargo, para determinar la participación de los aumentos del Ca^{2+} liberado desde el IP_3R y no otros eventos controlados por este canal liberador de Ca^{2+} intracelular sería interesante realizar este mismo acercamiento experimental utilizando Xestospongina C, un alcaloide capaz de inhibir específicamente la liberación de Ca^{2+} desde el IP_3R con una mayor especificidad que el 2-APB. Además del estudio de la vía de generación del IP_3 , utilizando por ejemplo toxina Pertussis para inhibir la activación de la proteína G necesaria para los eventos no genómicos de esta hormona, como también el uso de U73122, inhibidor de la fosfolipasa C (PLC) (10). Más aún, estudios preliminares de nuestro laboratorio indican que la sobre-expresión de la isoforma II del IP_3R *per se* es capaz de inducir hipertrofia del cardiomiocito (Estrada M, datos no publicados).

Con estos datos se sugiere que a tiempos cortos (3 horas de estimulación) la testosterona aumenta la actividad del $\text{PPAR}\beta$. Además, 2-APB es capaz de aumentar la actividad transcripcional de los PPARs , lo que indicaría que los procesos dependientes del IP_3R regulan negativamente la actividad transcripcional de los PPARs . Aún cuando es necesario realizar nuevas estrategias experimentales para abordar plenamente la participación de IP_3 en la activación de los PPARs , se propone el siguiente esquema para la acción temprana de la testosterona en la vía de los PPARs .

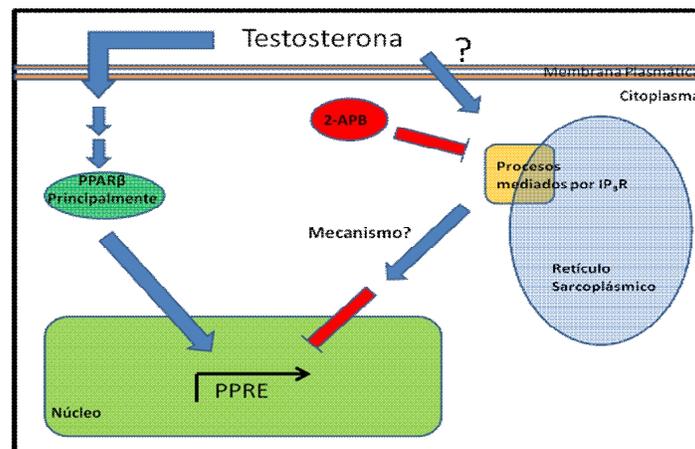


Figura 11. Esquema resumen con los efectos de la testosterona en el cardiomiocito a tiempos tempranos.

10.4 PPAR β y testosterona.

La testosterona aumenta la expresión de sólo el PPAR β en cardiomiocitos estimulados por 12 horas (Figura 4B). Este resultado es concordante con lo observado en los estudios con el plasmidio reportero PPREx3-tk-Luc, lo que sugiere que esta hormona induce la activación de la vía del PPAR β en cardiomiocitos. Estos datos concuerdan con los antecedentes expuestos anteriormente, en donde la activación diferencial de los PPARs permite modular el metabolismo cardiaco, seleccionando un sustrato energético preferencial. En este caso, por el aumento en la vía del PPAR β sugerimos que el cambio metabólico inducido por la estimulación con testosterona en cardiomiocitos debe ser hacia el uso preferente de la glucosa como sustrato energético. Esta respuesta metabólica celular es observada en la hipertrofia del cardiomiocito inducida por angiotensina II, en donde el cambio del metabolismo celular es hacia una mayor utilización de la glucosa como sustrato energético (65). En cuanto a la inmunodetección de esta proteína mediante *western blot*, sólo se utilizó como referencia el peso molecular aparente descrito por el fabricante del anticuerpo, en este caso de 49 kDa. Sin embargo, la inmunodetección siempre se acompañó de otra señal con un peso molecular mayor, la cual se logró resolver modificando los parámetros electroforéticos. Sin embargo, hubiese sido de mucha utilidad usar controles para comprobar la veracidad de la determinación, como por ejemplo muestras de tejidos enriquecidos de un PPAR en particular, como tejido hepático para el PPAR α , tejido cerebral para el PPAR β y tejido adiposo para el PPAR γ (38). Otro acercamiento interesante a utilizar es sobre-expresar los distintos miembros de los PPARs y considerar esto como control positivo, mientras que la transfección con un siRNA contra los miembros de esta familia funcionaría como control negativo. Es necesario en el trabajo futuro, fuera de lo planteado en esta memoria de título, chequear estos controles.

Existen antecedentes en la literatura que muestran que los PPARs pueden regular la expresión de miembros de su misma familia de proteínas o bien proteínas co-activadoras (57, 58). Estos estudios son muy interesantes puesto que la activación diferencial de un PPAR en particular puede generar cambios en los otros, estableciendo mayores puntos de control para el sistema. Para probar si en nuestro modelo la actividad de los PPARs era importante para el aumento en la expresión del PPAR β inducido por testosterona, se determinaron los cambios en la expresión tanto del PPAR α como del PPAR β en presencia de sus inhibidores. La Figura 6 muestra que es necesaria la actividad de ambos PPARs para inducir un aumento del PPAR β inducido por testosterona. Sería interesante estudiar en detalle como ocurre esta conversación cruzada entre el PPAR α y el PPAR β en la respuesta metabólica inducida por testosterona en cardiomiocitos.

10.5 Resultados transcripcionales a las 12 horas de estimulación con testosterona.

La actividad transcripcional del PPAR implica un proceso complejo, en donde participan muchas proteínas en la formación del complejo co-activador. Es probable que el plasmidio reportero utilizado en este trabajo no sea capaz de unir algunas de las proteínas necesarias para la estabilización del complejo co-activador del PPAR en nuestro modelo, y por ello no se aprecie un aumento en la actividad del gen reportero a las 12 horas de estimulación con testosterona, inclusive con el incremento de 1,8 veces los niveles del PPAR β en el sistema. Existen evidencias en la literatura que muestran las múltiples proteínas que participan tanto en el complejo co-activador de los PPARs como del complejo co-represor (32). Dicho proceso es difícil de observar en un plasmidio que sólo posee 3 elementos de respuesta a PPAR, ya que carece de todas las otras señales regulatorias, como proteínas *enhancers*, que pueden estar cientos de pares de bases

alejadas de la zona de unión de estos factores de transcripción, pero que logran estabilizar el complejo para permitir la activación de la transcripción de los genes blanco. Para poder aclarar este punto se podrían realizar ensayos de inmunoprecipitación de cromatina y posterior PCR de los principales genes blanco del PPAR β , para establecer si éste se encuentra unido al ADN, lo que sugiere un aumento en la transcripción. Sin embargo, este tipo de aproximaciones experimentales se alejan del plan de trabajo propuesto para esta memoria.

10.6 PPAR β y el IP $_3$ R.

Es interesante destacar la participación del IP $_3$ R en el aumento del PPAR β estimulado por testosterona. La inhibición del IP $_3$ R tiende a anular el aumento en los niveles proteicos del PPAR β en cardiomiocitos estimulados con testosterona (Figura 7B). Evidencias en la literatura muestran que en el proceso de transformación de fibras musculares rápidas a lentas existe una regulación entre la actividad de los PPARs, medido por la presencia del PGC-1 α y la actividad del IP $_3$ R (66). Sin embargo, este resultado es contrario al observado en la Figura 7A, en donde la inhibición de los procesos mediados por el IP $_3$ R aumentó la actividad transcripcional de los PPARs. Probablemente los eventos moleculares responsables de ambos efectos sean distintos y dependientes del contexto celular, a las 3 horas de estimulación son los eventos iniciales del desarrollo de la hipertrofia, y a las 12 horas de estimulación tenemos el fenotipo hipertrófico más bien consolidado. Además, pueden ser distintos IP $_3$ R ubicados en diferentes compartimentos subcelulares los que estén dando cuenta de esta respuesta diferencial en el control de la vía de los PPARs. En resumen, los resultados sugieren que la testosterona aumenta los niveles del PPAR β en una manera dependiente de la actividad del PPAR β y el PPAR α . Además, se sugiere la participación de una vía mediada por IP $_3$ para que ocurra este aumento inducido por la hormona.

10.7 PPAR β y la PFK.

Como los resultados discutidos hasta el momento indican que la testosterona utiliza la vía del PPAR β , medido tanto por el aumento en la actividad transcripcional utilizando un gen reportero, como por el aumento en los niveles de esta proteína. Por ello se procedió a analizar marcadores de las vías metabólicas, con énfasis en la glicólisis, esta ruta catabólica es favorecida por una mayor actividad del PPAR β en el corazón (44). Los genes escogidos fueron la fosfofructoquinasa (PFK) y la hexoquinasa II (HKII), enzimas claves en las primeras etapas de la glicólisis. Además se analizó el gen de la proteína carnitina palmitoil-transferasa 1-b muscular (mCPT-1b) como marcador de la vía de la β -oxidación. A través de RT-PCR se observó que la testosterona genera un aumento relativo de la cantidad del mRNA de la PFK y la HKII a las 12 horas de estimulación (Figura 8), coincidente con el aumento del PPAR β (Figura 4B). Además, se observa que esta hormona no genera variaciones en el mRNA del mCPT-1b. Este resultado es interesante, puesto que entrega el primer indicio de las posibles modificaciones metabólicas que genera la testosterona en la célula cardiaca. Para los siguientes estudios se utilizó sólo la PFK como marcador de la vía glicolítica, ya que esta proteína es la enzima marcapaso de esta ruta metabólica. El aumento de la PFK requiere de la actividad del PPAR β , puesto que la presencia del inhibidor farmacológico GSK 0660 anula el aumento del mRNA de la PFK inducido por testosterona (Figura 9). Cabe mencionar que con sólo el estudio de los niveles del mRNA de la PFK es imposible concluir una modificación al metabolismo celular, ya que en este trabajo no se corroboró ni los niveles proteicos ni la actividad de dicha enzima, por lo que no se puede concluir algún tipo de alteración al metabolismo celular. Sin embargo, datos del laboratorio no publicados muestran que la estimulación con testosterona produce un aumento en la incorporación de glucosa a las 2 horas de estimulación, y que se mantiene en el tiempo hasta las 12 horas. Este

hallazgo es concordante con la activación del PPAR β , sugiriendo que los efectos metabólicos de la testosterona sobre el cardiomiocito serían hacia una mayor utilización de la glucosa como substrato energético.

10.8 IP₃R y la PFK.

Debido a que la inhibición de los procesos mediados por el IP₃R afectó la expresión del PPAR β bajo estímulo con testosterona, se estudió el efecto del 2-APB sobre el aumento del mensajero de la PFK. Sorpresivamente, observamos que la inhibición del IP₃R aumenta los niveles del mRNA de esta enzima (Figura 10), un resultado contrario a lo esperado según los datos obtenidos con la expresión del PPAR β bajo este mismo tratamiento. Una potencial explicación a ello, con datos obtenidos desde la literatura, sería que la actividad de la CaMKII aumenta los niveles de la PFK en cardiomiocitos (52). Este hecho es interesante de comentar ya que resultados del laboratorio, aún no publicados, muestran que la testosterona regula la actividad de la proteína CaMKII a través de aumentos del Ca²⁺ intracelular. Por lo tanto puede existir esa regulación en nuestro modelo de estudio.

Se propone el siguiente esquema para la acción de la testosterona a 12 horas en el cardiomiocito.

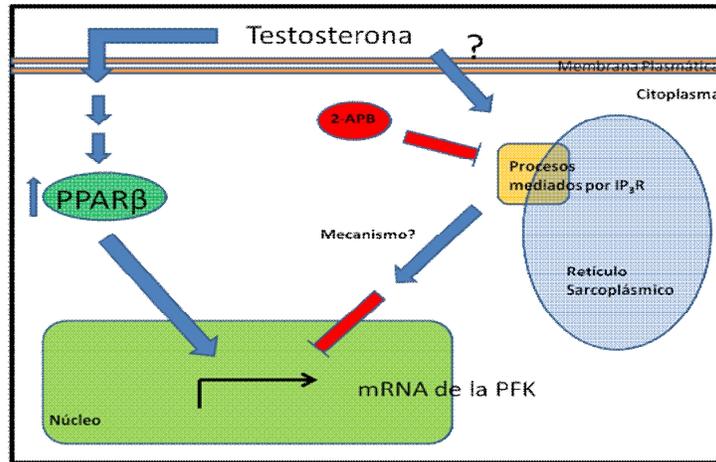


Figura 12. Esquema resumen de los efectos de la estimulación con testosterona por 12 horas en el cardiomiocito.

10.9 PPARβ como agente antihipertrófico del cardiomiocito.

Existen reportes en la literatura que relacionan al PPARβ como un agente anti-hipertrófico en el cardiomiocito (46, 47). Dichos trabajos utilizan estímulos pro-hipertróficos clásicos como angiotensina II y fenilefrina más la acción de un activador farmacológico del PPARβ (L-165041). La sobre-activación de la vía de los PPARs es capaz de inhibir el aumento de los marcadores de hipertrofia clásicos del cardiomiocito. Estos antecedentes son contrarios a lo descrito en este trabajo, en donde la activación del PPARβ es producto de un estímulo prohipertrófico como la testosterona. Sin embargo, el acercamiento experimental utilizado en los antecedentes citados es la de sobre-activar la vía del PPARβ, por ello es muy probable que el aumento en la actividad de esta proteína también evite el desarrollo de la hipertrofia inducida por testosterona. Algo similar ocurre con el estudio de la AMPK y su relación con la hipertrofia del cardiomiocito. La mayor activación de la AMPK tiene claros efectos antihipertróficos (67), sin embargo en nuestro laboratorio hemos demostrado que la testosterona activa a la AMPK a niveles mucho menores que los observados con los clásicos activadores de la AMPK, como la metformina. Nosotros proponemos un efecto similar para la acción sobre los PPARs, en donde la activación del PPARβ

por testosterona es mucho menor comparada con los efectos de los activadores farmacológicos de esta proteína.

11 Conclusiones

La hipótesis fue parcialmente respondida. Los resultados sugieren que la testosterona activa diferencialmente al PPAR β en cardiomiocitos de rata neonata, a concentraciones en las cuales esta hormona induce hipertrofia del cardiomiocito. Sin embargo, la participación de eventos mediados por el IP $_3$ R en la activación de este factor de transcripción no fue plenamente concluyente. Sin duda se requieren de otras metodologías que permitan dilucidar la real participación tanto de los procesos mediados por el IP $_3$ R como por los aumentos del Ca $^{2+}$ intracelular sobre los PPARs.

Los resultados obtenidos sugieren que la testosterona aumenta tanto la actividad transcripcional como de la expresión del PPAR β . Además, la testosterona produce un aumento en los niveles del mRNA de la HKII y de la PFK, enzimas de la vía glicolítica, y no altera los niveles del mRNA del mCPT-1b, enzima marcador de la vía de la β -oxidación. Los resultados no son concluyentes respecto de la participación de los procesos mediados por IP $_3$ R, sin embargo muestran que este canal liberador de Ca $^{2+}$ intracelular podría estar implicado en la regulación de la actividad basal de los PPARs.

La testosterona produce hipertrofia del cardiomiocito, la cual debe ser acompañada de respuestas metabólicas compensatorias durante este proceso. Sin embargo, a la fecha, no existen reportes sobre los efectos de esta hormona en el metabolismo del cardiomiocito. Este trabajo por primera vez sugiere que los efectos metabólicos de la testosterona, a concentraciones hipertróficas, son dirigidos hacia un incremento de la glicólisis. Esto se debería en parte a la activación diferencial del PPAR β con el consecuente aumento en los niveles del mRNA de enzimas de la vía glicolítica. Dicha modificación es concordante con la reexpresión del programa metabólico fetal implicado en el proceso hipertrófico del cardiomiocito, en el cual se debe

aumentar la utilización de la glucosa como sustrato energético, principalmente por el aumento de los requerimientos de energía y la eficiencia en el uso de oxígeno que presenta esta ruta catabólica, en contrario a lo observado con la β -oxidación, siendo así una respuesta compensatoria al aumento del crecimiento celular.

12 Anexos Curriculares

12.1 Estadías en el extranjero

Año 2010: **Invitación efectuada por la Dra. Bárbara Erhlich para visitar las dependencias de su laboratorio. Hermeneutic's Laboratory, Department of Pharmacology, School of Medicine, Yale University, New Haven, CT, USA.**

El Dr. Manuel Estrada patrocinó la visita a través del siguiente financiamiento: Proyecto CONICYT de Apoyo a la Vinculación Internacional de Centros y Grupos de Investigación Asociativa Internacional. Proyecto N° VI-2008-188 (2009), el cual incluyó tanto los pasajes como la estadía en un hotel en los EEUU.

12.2 Publicaciones Científicas

Año 2009: **Co-autor en publicación en la revista Journal of Endocrinology con el título:** Testosterone induces cardiomyocyte hypertrophy through mammalian target of rapamycin complex 1 pathway.

Altamirano F, Oyarce C, Silva P, Toyos M, Wilson C, Lavandero S, Uhlén P, Estrada M.

J Endocrinol. 2009 Aug;202(2):299-307. Epub 2009 May 27.

12.3 Presentaciones a Congresos Nacionales

Año 2009: **Congreso Sociedad de Biología de Chile.**

Primer autor en presentación formato póster con el título: Testosterona aumenta el mRNA de la Hexoquinasa II y la Fosfofructoquinasa a través del PPAR β/δ en cardiomiocitos.

Patricio Silva, César Oyarce, Francisco Altamirano y Manuel Estrada.

13 Bibliografía

- [1] M. Muller, "Endogenous sex hormones and cardiovascular disease in men", *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 88, 2003, pp. 5076-5086.
- [2] K.M. English, R.P. Steeds, T.H. Jones, M.J. Diver, and K.S. Channer, "Low-dose transdermal testosterone therapy improves angina threshold in men with chronic stable angina: A randomized, double-blind, placebo-controlled study", *Circulation*, vol. 102, 2000, pp. 1906-1911.
- [3] M.L. Sullivan, C.M. Martinez, P. Gennis, and E.J. Gallagher, "The cardiac toxicity of anabolic steroids", *Progress in Cardiovascular Diseases*, vol. 41, 1998, pp. 1-15.
- [4] P.Y. Liu, "Androgens and cardiovascular disease", *Endocrine Reviews*, vol. 24, 2003, pp. 313-340.
- [5] N. Frey and E.N. Olson, "Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly", *Annual Review of Physiology*, vol. 65, 2003, pp. 45-79.
- [6] D. Levy, M. Salomon, R.B. D'Agostino, a J. Belanger, and W.B. Kannel, "Prognostic implications of baseline electrocardiographic features and their serial changes in subjects with left ventricular hypertrophy", *Circulation*, vol. 90, 1994, pp. 1786-1793.
- [7] O.F. Bueno, L.J. De Windt, K.M. Tymitz, S. a Witt, T.R. Kimball, R. Klevitsky, T.E. Hewett, S.P. Jones, D.J. Lefer, C.F. Peng, R.N. Kitsis, and J.D. Molkenin, "The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice", *The EMBO journal*, vol. 19, 2000, pp. 6341-6350.
- [8] M. A. Crackower, G.Y. Oudit, I. Koziaradzki, R. Sarao, H. Sun, T. Sasaki, E. Hirsch, A. Suzuki, T. Shioi, J. Irie-Sasaki, R. Sah, H.-Y.M. Cheng, V.O. Rybin, G. Lembo, L. Fratta, A.J. Oliveira-dos-Santos, J.L. Benovic, C.R. Kahn, S. Izumo, S.F. Steinberg, M.P. Wymann, P.H. Backx, and J.M. Penninger, "Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathways", *Cell*, vol. 110, 2002, pp. 737-749.
- [9] A. Clerk, M.A. Bogoyevitch, M.B. Anderson, and P.H. Sugden, "Differential activation of protein kinase C isoforms by endothelin-1 and phenylephrine and subsequent stimulation of p42 and p44 mitogen-activated protein kinases in ventricular myocytes cultured from neonatal rat hearts", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, 1994, pp. 32848-32857.
- [10] F. Altamirano, C. Oyarce, P. Silva, M. Toyos, C. Wilson, S. Lavandero, P. Uhlén, and M. Estrada, "Testosterone induces cardiomyocyte hypertrophy through mammalian target of rapamycin complex 1 pathway.," *The Journal of Endocrinology*, vol. 202, 2009, pp. 299-307.
- [11] J.D. Marsh, M.H. Lehmann, R.H. Ritchie, J.K. Gwathmey, G.E. Green, and R.J. Schiebinger, "Androgen receptors mediate hypertrophy in cardiac myocytes", *Circulation*, vol. 98, 1998, pp. 256-261.
- [12] A.O. Brinkmann, L.J. Blok, P.E. de Ruiter, P. Doesburg, K. Steketee, C.A. Berrevoets, and J. Trapman, "Mechanisms of androgen receptor activation and function", *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 69, 1999, pp. 307-313.
- [13] M. Beato, "Gene regulation by steroid hormones", *Cell*, vol. 56, 1989, pp. 335-344.
- [14] M. Estrada, A. Espinosa, M. Müller, E. Jaimovich, "Testosterone stimulates intracellular calcium release and mitogen-activated protein kinases via a G protein-coupled receptor in skeletal muscle cells," *Endocrinology*, vol. 144, 2003, pp. 3586-3597.

- [15] J.M. Vicencio, C. Ibarra, M. Estrada, M. Chiong, D. Soto, V. Parra, G. Diaz-Araya, E. Jaimovich, and S. Lavandero, "Testosterone induces an intracellular calcium increase by a nongenomic mechanism in cultured rat cardiac myocytes", *Endocrinology*, vol. 147, 2006, pp. 1386-1395.
- [16] H.L. Roderick, D.R. Higazi, I. Smyrnias, C. Fearnley, D. Harzheim, and M.D. Bootman, "Calcium in the heart: when it's good, it's very very good, but when it's bad, it's horrid", *Biochemical Society Transactions*, vol. 35, 2007, pp. 957-961.
- [17] J.D. Molkentin and G.W. Dorn, "Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy.," *Annual Review of Physiology*, vol. 63, 2001, pp. 391-426.
- [18] W.C. Stanley, F.A. Recchia, and G.D. Lopaschuk, "Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart," *Physiological Reviews*, 2005, pp. 1093-1129.
- [19] G.J. van der Vusse, M. van Bilsen, and J.F. Glatz, "Cardiac fatty acid uptake and transport in health and disease", *Cardiovascular Research*, vol. 45, 2000, pp. 279-293.
- [20] C. Depre, M.H. Rider, and L. Hue, "Mechanisms of control of heart glycolysis", *European Journal of Biochemistry*, vol. 258, 1998, pp. 277-290.
- [21] S. Scolletta and B. Biagioli, "Energetic myocardial metabolism and oxidative stress: let's make them our friends in the fight against heart failure", *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 64, 2010, pp. 203-207.
- [22] M. Vanbilsen, P. Smeets, A. Gilde, and G. Vandervusse, "Metabolic remodelling of the failing heart: the cardiac burn-out syndrome?", *Cardiovascular Research*, vol. 61, 2004, pp. 218-226.
- [23] W.C. Stanley, G.D. Lopaschuk, and J.G. McCormack, "Regulation of energy substrate metabolism in the diabetic heart", *Cardiovascular Research*, vol. 34, 1997, pp. 25-33.
- [24] P.M. Barger and D.P. Kelly, "PPAR signaling in the control of cardiac energy metabolism", *Trends in Cardiovascular Medicine*, vol. 10, 2000, pp. 238-245.
- [25] J. A. Madrazo and D.P. Kelly, "The PPAR trio: regulators of myocardial energy metabolism in health and disease", *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 44, 2008, pp. 968-975.
- [26] B.N. Finck, "The PPAR regulatory system in cardiac physiology and disease", *Cardiovascular Research*, vol. 73, 2007, pp. 269-277.
- [27] B. Desvergne, "Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism", *Endocrine Reviews*, vol. 20, 1999, pp. 649-688.
- [28] L. Michalik, J. Auwerx, J.P. Berger, V.K. Chatterjee, C.K. Glass, F.J. Gonzalez, P.A. Grimaldi, T. Kadowaki, M.A. Lazar, S.O. Rahilly, C.N.A. Palmer, J. Plutzky, J.K. Reddy, B.M. Spiegelman, and B. Staels, "Peroxisome proliferator-activated receptors", *Pharmacological Reviews*, vol. 58, 2006, pp. 726-741.
- [29] A.L. Bookout, Y. Jeong, M. Downes, R.T. Yu, R.M. Evans, and D.J. Mangelsdorf, "Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network", *Cell*, vol. 126, 2006, pp. 789-799.
- [30] A. Chawla, J.J. Repa, R.M. Evans, and D.J. Mangelsdorf, "Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files", *Science*, vol. 294, 2001, pp. 1866-1870.
- [31] E. Robinson and D.J. Grieve, "Significance of peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system in health and disease", *Pharmacology & Therapeutics*, vol. 122, 2009, pp. 246-263.

- [32] N. Viswakarma, Y. Jia, L. Bai, A. Vluggens, J. Borensztajn, J. Xu, and J.K. Reddy, "Coactivators in PPAR-regulated gene expression", *PPAR Research*, vol. 2010, 2010, pp. 1-22.
- [33] D. Robyr, A.P. Wolffe, and W. Wahli, "Nuclear hormone receptor coregulators in action: diversity for shared tasks", *Molecular Endocrinology*, vol. 14, 2000, pp. 329-347.
- [34] J. van de Peppel, N. Kettelarij, H. van Bakel, T.T.J.P. Kockelkorn, D. van Leenen, and F.C.P. Holstege, "Mediator expression profiling epistasis reveals a signal transduction pathway with antagonistic submodules and highly specific downstream targets", *Molecular Cell*, vol. 19, 2005, pp. 511-522.
- [35] D. Bonofiglio, S. Gabriele, S. Aquila, S. Catalano, M. Gentile, E. Middea, F. Giordano, and S. Andò, "Estrogen receptor alpha binds to peroxisome proliferator-activated receptor response element and negatively interferes with peroxisome proliferator-activated receptor gamma signaling in breast cancer cells", *Clinical Cancer Research*, vol. 11, 2005, pp. 6139-6147.
- [36] P. Ciana, A. Biserni, L. Tatangelo, C. Tiveron, A.F. Sciarroni, L. Ottobrini, and A. Maggi, "A novel peroxisome proliferator-activated receptor responsive element-luciferase reporter mouse reveals gender specificity of peroxisome proliferator-activated receptor activity in liver", *Molecular Endocrinology*, vol. 21, 2007, pp. 388-400.
- [37] N.E. Buroker, M.E. Young, C. Wei, K. Serikawa, M. Ge, X.-H. Ning, and M. a Portman, "The dominant negative thyroid hormone receptor beta-mutant {Delta}337T alters PPAR{alpha} signaling in heart", *Endocrinology and Metabolism*, vol. 292, 2007, pp. 453-460.
- [38] O. Braissant, F. Fougelle, C. Scotto, M. Dauça, and W. Wahli, "Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat", *Endocrinology*, vol. 137, 1996, pp. 354-366.
- [39] J.M. Brandt, F. Djouadi, and D.P. Kelly, "Fatty acids activate transcription of the muscle carnitine palmitoyltransferase I gene in cardiac myocytes via the peroxisome proliferator-activated receptor alpha", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, 1998, pp. 23786-23792.
- [40] B.N. Finck, J.J. Lehman, T.C. Leone, M.J. Welch, M.J. Bennett, A. Kovacs, X. Han, R.W. Gross, R. Kozak, G.D. Lopaschuk, and D.P. Kelly, "The cardiac phenotype induced by PPARalpha overexpression mimics that caused by diabetes mellitus", *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 109, 2002, pp. 121-130.
- [41] K. Watanabe, H. Fujii, T. Takahashi, M. Kodama, Y. Aizawa, Y. Ohta, T. Ono, G. Hasegawa, M. Naito, T. Nakajima, Y. Kamijo, F.J. Gonzalez, and T. Aoyama, "Constitutive regulation of cardiac fatty acid metabolism through peroxisome proliferator-activated receptor alpha associated with age-dependent cardiac toxicity", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, 2000, pp. 22293-22299.
- [42] A.J. Gilde, K. a J.M. van der Lee, P.H.M. Willemsen, G. Chinetti, F.R. van der Leij, G.J. van der Vusse, B. Staels, and M. van Bilsen, "Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and PPARbeta/delta, but not PPARgamma, modulate the expression of genes involved in cardiac lipid metabolism", *Circulation Research*, vol. 92, 2003, pp. 518-524.
- [43] R. Li, W. Zheng, R. Pi, J. Gao, H. Zhang, P. Wang, K. Le, and P. Liu, "Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha prevents glycogen synthase 3beta phosphorylation and inhibits cardiac hypertrophy", *FEBS Letters*, vol. 581, 2007, pp. 3311-3316.
- [44] E.M. Burkart, N. Sambandam, X. Han, R.W. Gross, M. Courtois, C.M. Gierasch, K. Shoghi, M.J. Welch, and D.P. Kelly, "Nuclear receptors PPARbeta/delta and PPARalpha direct distinct metabolic regulatory programs in the mouse heart", *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 117, 2007, pp. 3930-3939.

- [45] L. Cheng, G. Ding, Q. Qin, Y. Huang, W. Lewis, N. He, R.M. Evans, M.D. Schneider, F.A. Brako, Y. Xiao, Y.E. Chen, and Q. Yang, "Cardiomyocyte-restricted peroxisome proliferator-activated receptor-delta deletion perturbs myocardial fatty acid oxidation and leads to cardiomyopathy", *Nature Medicine*, vol. 10, 2004, pp. 1245-1250.
- [46] A. Planavila, R. Rodríguez-Calvo, M. Jové, L. Michalik, W. Wahli, J.C. Laguna, and M. Vázquez-Carrera, "Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta activation inhibits hypertrophy in neonatal rat cardiomyocytes", *Cardiovascular Research*, vol. 65, 2005, pp. 832-841.
- [47] K.-S. Lee, J.-H. Park, S. Lee, H.-J. Lim, and H.-Y. Park, "PPARdelta activation inhibits angiotensin II induced cardiomyocyte hypertrophy by suppressing intracellular Ca²⁺ signaling pathway.", *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 106, 2009, pp. 823-834.
- [48] N.-H. Son, T.-S. Park, H. Yamashita, M. Yokoyama, L.A. Huggins, K. Okajima, S. Homma, M.J. Szabolcs, L.-S. Huang, and I.J. Goldberg, "Cardiomyocyte expression of PPARgamma leads to cardiac dysfunction in mice", *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 117, 2007, pp. 2791-2801.
- [49] S.Z. Duan, C.Y. Ivashchenko, M.W. Russell, D.S. Milstone, and R.M. Mortensen, "Cardiomyocyte-specific knockout and agonist of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma both induce cardiac hypertrophy in mice", *Circulation Research*, vol. 97, 2005, pp. 372-379.
- [50] L.M. Sanderson, M.V. Boekschoten, B. Desvergne, M. Müller, and S. Kersten, "Transcriptional profiling reveals divergent roles of PPARalpha and PPARbeta/delta in regulation of gene expression in mouse liver", *Physiological Genomics*, vol. 41, 2010, pp. 42-52.
- [51] Y.C. Long, S. Glund, P.M. Garcia-Roves, and J.R. Zierath, "Calcineurin regulates skeletal muscle metabolism via coordinated changes in gene expression", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, 2007, pp. 1607-1614.
- [52] P.J. Schaeffer, A.R. Wende, C.J. Magee, J.R. Neilson, T.C. Leone, F. Chen, and D.P. Kelly, "Calcineurin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase activate distinct metabolic gene regulatory programs in cardiac muscle", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, 2004, pp. 39593-39603.
- [53] D.C. Wright, P.C. Geiger, D.-H. Han, T.E. Jones, and J.O. Holloszy, "Calcium induces increases in peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha and mitochondrial biogenesis by a pathway leading to p38 mitogen-activated protein kinase activation", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, 2007, pp. 18793-18799.
- [54] J.B. Kim, H.M. Wright, M. Wright, and B.M. Spiegelman, "ADD1/SREBP1 activates PPARgamma through the production of endogenous ligand", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, 1998, pp. 4333-4337.
- [55] L. Ding, X.-G. Liang, and Y.-J. Lou, "Time-dependence of cardiomyocyte differentiation disturbed by peroxisome proliferator-activated receptor alpha inhibitor GW6471 in murine embryonic stem cells in vitro", *Acta Pharmacologica Sinica*, vol. 28, 2007, pp. 634-642.
- [56] B.G. Shearer, D.J. Steger, J.M. Way, T.B. Stanley, D.C. Lobe, D. a Grillot, M. a Iannone, M. a Lazar, T.M. Willson, and A.N. Billin, "Identification and characterization of a selective peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (NR1C2) antagonist", *Molecular Endocrinology*, vol. 22, 2008, pp. 523-529.
- [57] E. Barroso, R. Rodríguez-Calvo, L. Serrano-Marco, A.M. Astudillo, J. Balsinde, X. Palomer, and M. Vázquez-Carrera, "The PPARbeta/delta Activator GW501516 Prevents the down-regulation of AMPK caused by a

high-fat diet in liver and amplifies the PGC-1alpha-Lipin 1-PPARalpha pathway leading to increased fatty acid oxidation”, *Endocrinology*, vol. 152, 2011, pp. 1848-1859.

[58] A.V. Leisewitz, C.R. Urrutia, G.R. Martinez, G. Loyola, and M. Bronfman, “A PPARs cross-talk concertedly commits C6 glioma cells to oligodendrocytes and induces enzymes involved in myelin synthesis”, *Journal of Cellular Physiology*, vol. 217, 2008, pp. 367-376.

[59] F. Ataeia, S. Hosseinkhani, K. Khajeh “Luciferase protection against proteolytic degradation: A key for improving signal in nano-system biology”, *Journal of Biotechnology*, vol. 144, 2009, pp. 83-88.

[60] P. Ciana, A. Biserni, L. Tatangelo, C. Tiveron, A.F. Sciarroni, L. Ottobrini, and A. Maggi, “A novel peroxisome proliferator-activated receptor responsive element-luciferase reporter mouse reveals gender specificity of peroxisome proliferator-activated receptor activity in liver”, *Molecular Endocrinology*, vol. 21, 2007, pp. 388-400.

[61] F. Liang, F. Wang, S. Zhang, and D.G. Gardner, “Peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) alpha agonists inhibit hypertrophy of neonatal rat cardiac myocytes”, *Endocrinology*, vol. 144, 2003, pp. 4187-4194.

[62] A. Shalev, C.A. Siegrist-Kaiser, P.M. Yen, W. Wahli, A.G. Burger, W.W. Chin, and C.A. Meier, “The peroxisome proliferator-activated receptor alpha is a phosphoprotein: regulation by insulin”, *Endocrinology*, vol. 137, 1996, pp. 4499-4502.

[63] L. Gelman, L. Michalik, B. Desvergne, and W. Wahli, “Kinase signaling cascades that modulate peroxisome proliferator-activated receptors”, *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 17, 2005, pp. 216-222.

[64] K. a Burns and J.P. Vanden Heuvel, “Modulation of PPAR activity via phosphorylation”, *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1771, 2007, pp. 952-960.

[65] B.J. Stuck, M. Lenski, M. Böhm, and U. Laufs, “Metabolic switch and hypertrophy of cardiomyocytes following treatment with angiotensin II are prevented by AMP-activated protein kinase”, *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, 2008, pp. 32562-32569.

[66] J.R. Crew, K. Falzari, and J.X. DiMario, “Muscle fiber type specific induction of slow myosin heavy chain 2 gene expression by electrical stimulation”, *Experimental Cell Research*, vol. 316, 2010, pp. 1039-1049.

[67] B.-lin Chen, Y.-dong Ma, R.-sen Meng, Z.-jun Xiong, H.-ning Wang, J.-yi Zeng, C. Liu, and Y.-gang Dong, “Activation of AMPK inhibits cardiomyocyte hypertrophy by modulating of the FOXO1/MuRF1 signaling pathway in vitro”, *Acta Pharmacologica Sinica*, vol. 31, 2010, pp. 798-804.