



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

“Efecto de la testosterona en la captación de glucosa dependiente
del transportador GLUT4 a través del eje de señalización
CaMKII/AMPK en cardiomiocitos”

Carlos Antonio Wilson Rodríguez

Memoria de título para optar al título profesional de Bioquímico

Patrocinante
Dr. Mario Chiong
Departamento de Bioquímica y
Biología Molecular
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas
Universidad de Chile

Director
Dr. Manuel Estrada
Programa de Fisiología y
Biofísica
Instituto de Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

2011

Proyecto Fondecyt 1090276

Agradecimientos

Este trabajo no hubiera sido posible sin la labor, apoyo y compromiso de muchas personas. Es imprescindible para mí reconocer a quienes hicieron de este período un tiempo de aprendizaje invaluable.

En primer lugar, agradezco a los profesores miembros de la comisión evaluadora de mi memoria de título, los doctores Mario Chiong, Guillermo Díaz y Sergio Lavandero. Su visión crítica mejoró mi trabajo, destacando los puntos fuertes y mejorando aquellos más débiles. En especial, agradezco al Dr. Mario Chiong por haber asumido la responsabilidad de patrocinar este trabajo.

Extiendo mi más profundo agradecimiento al Dr. Manuel Estrada, director de tesis, quien me instó a desarrollar mis propias ideas, sin restricciones y abrió instancias para mi desarrollo, a cambio de nada. Aprendí que la ciencia debe ser entretenida y que cuando deja de serlo, algo anda mal.

Al Dr. Ariel Contreras, por compartir generosamente su conocimiento, por la experiencia y la ayuda constante.

A Francisco A., quien me orientó al comienzo de mi trabajo y traspasó su nutrida experiencia experimental.

A mis compañeros de laboratorio presentes y pasados. César y Pato, por haberme integrado y enseñado de forma desinteresada cuando me conocieron. A Katherine, Javier y Nathaly por su compromiso y entusiasmo. A Rodrigo, porque en él siempre encontré una visión crítica, apoyo y una voluntad patológica por aceptar mis bromas más impresentables.

A Alejandro C. y los incansables del extinto S.I. Pausa obligada en días buenos y no tan buenos. Excusa inevitable para compartir.

A Camila, Catalina, Dasfne, Anibal, amigos y compañeros de ruta en las ciencias.

A César O. y Alejandra E., por haberme presentado la glucosa fluorescente, compañera inseparable por largos meses, y por haberme tendido una mano siempre que la he necesitado.

Finalmente, agradezco a mi familia, Carlos, Patricia, Natalia y Fernanda. A todos por hacer un esfuerzo sobrehumano por entender lo que hago a diario. Especialmente a Patricia, mi mamá, quien probablemente sin comprender del todo bien, jamás antepuso un prejuicio, sino que muy por el contrario, me alentó siempre a tomar nuevos desafíos, a jamás sentirme demasiado cómodo y siempre ir en busca de nuevas perspectivas. Estos logros, pequeños logros, son de ambos.

Tabla de Contenidos	Página
1. Tabla de figuras -----	7
2. Abreviaturas -----	8
3. Resumen -----	10
4. Abstract -----	12
5. Introducción -----	14
5.1. Testosterona y sus mecanismos de acción. -----	14
5.2. Mecanismos de captación de glucosa en cardiomiocitos. -----	15
5.3. Mecanismos de migración de GLUT4 a la membrana plasmática. -----	16
5.3.1. Eje de señalización PI3K/Akt.-----	16
5.3.2. Eje de señalización Ca ²⁺ /CaMKII/AMPK. -----	17
5.4. Papel de la testosterona en el metabolismo de la glucosa. -----	19
6. Problema -----	20
7. Hipótesis -----	20
8. Objetivo general. -----	21
9. Objetivos específicos. -----	21
9.1. Objetivo específico 1. <i>Estudiar el efecto de la testosterona en la captación de glucosa en cardiomiocitos.</i> -----	21
9.2. Objetivo específico 2. <i>Evaluar la participación de GLUT4 en la captación de glucosa inducida por testosterona.</i> -----	21
9.3. Objetivo específico 3. <i>Estudiar la participación CaMKII y AMPK en la captación de glucosa a través de GLUT4.</i> -----	21
10. Materiales y Métodos. -----	22
10.1. <i>Materiales</i> -----	22
10.2. <i>Cultivo primario de cardiomiocitos.</i> -----	22
10.2.1. <i>Aislamiento de corazones desde ratas neonatas.</i> -----	22
10.3. <i>Transfección del plasmidio GLUT4myc-eGFP.</i> -----	23
10.4. <i>Incorporación de 2-NBDG.</i> -----	24
10.5. <i>Incorporación de 2-deoxi-³H-glucosa (³H-2DG).</i> -----	24
10.6. <i>Detección de GLUT4myc-eGFP en la superficie celular.</i> -----	25
10.7. <i>Extracción de proteínas totales y fosforiladas.</i> -----	25
10.8. <i>Ensayo de Western blot.</i> -----	26
10.9. <i>Determinación del área celular de los cardiomiocitos.</i> -----	27
10.10. <i>Análisis de imágenes.</i> -----	27
10.11. <i>Análisis estadístico.</i> -----	28
11. Resultados -----	29

11.1.	<i>Efecto de la testosterona sobre la captación de la glucosa 2-NBDG y ³H-2DG en cardiomiocitos.</i>	29
11.2.	<i>Efecto de la concentración de testosterona en la captación de 2-NBDG.</i>	31
11.3.	<i>Participación del receptor para andrógenos en la captación de 2-NBDG.</i>	31
11.4.	<i>La incorporación de la glucosa 2-NBDG es específica para la estimulación con testosterona y no a su conversión a estradiol.</i>	32
11.5.	<i>Determinación de las masas totales de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT4 en cardiomiocitos.</i>	33
11.6.	<i>Efecto de la testosterona sobre la translocación del transportador GLUT4 a la superficie celular.</i>	34
11.7.	<i>Participación de la proteína CaMKII en la captación de 2-NBDG a través de GLUT4 por testosterona.</i>	37
11.8.	<i>Participación de CaMKII en la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática por testosterona.</i>	40
11.9.	<i>Efecto de la testosterona y la proteína CaMKII en la fosforilación de la proteína AMPK.</i>	42
11.10.	<i>Participación de la proteína AMPK en la captación de la glucosa 2-NBDG por testosterona.</i>	43
11.11.	<i>Participación de la proteína AMPK en la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática.</i>	44
12.	Discusión	46
13.	Proyecciones	53
14.	Referencias	54
15.	Anexos	58
15.1.	<i>Captación de la glucosa 2-NBDG en cardiomiocitos estimulados de forma prolongada con testosterona.</i>	58
15.2.	<i>Participación del receptor para andrógenos en la captación de la glucosa 2-NBDG por testosterona en cardiomiocitos hipertrofiados.</i>	59
15.3.	<i>Efecto del tratamiento con indinavir en el desarrollo de hipertrofia del cardiomiocito por testosterona.</i>	60
15.4.	<i>Película fotosensible completa de la detección de GLUT4 mediante Western blot en cardiomiocitos.</i>	61
15.5.	<i>Estandarización de la técnica de incorporación de la glucosa 2-NBDG en cardiomiocitos de rata neonata.</i>	61

1. Tabla de figuras

Página

Figura 1. <i>Efecto de la testosterona sobre la captación de la glucosa 2-NBDG y ³H-2DG en cardiomiocitos.</i>	30
Figura 2. <i>Efecto de la concentración de testosterona en la captación de 2-NBDG.</i>	31
Figura 3. <i>Participación del receptor para andrógenos en la captación de 2-NBDG.</i>	32
Figura 4. <i>La incorporación de la glucosa 2-NBDG es específica para la estimulación con testosterona y no a su conversión a estradiol.</i>	33
Figura 5. <i>Determinación de la masa total de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT4 en cardiomiocitos.</i>	34
Figura 6. <i>Efecto de la testosterona sobre la translocación del transportador GLUT4 a la superficie celular.</i>	36
Figura 7. <i>Determinación de la fosforilación de la proteína CaMKII en su residuo Thr 286 por testosterona.</i>	38
Figura 8. <i>Participación de Akt y CaMKII en la captación de 2-NBDG por testosterona.</i>	39
Figura 9. <i>Participación de CaMKII en la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática por testosterona.</i>	41
Figura 10. <i>Efecto de la testosterona y la proteína CaMKII en la fosforilación de la proteína AMPK.</i>	43
Figura 11. <i>Participación de la proteína AMPK en la captación de la glucosa 2-NBDG por testosterona.</i>	44
Figura 12. <i>Participación de la proteína AMPK en la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática.</i>	45
Figura 13. <i>Captación de la glucosa 2-NBDG en cardiomiocitos estimulados de forma prolongada con testosterona.</i>	58
Figura 14. <i>Participación del receptor para andrógenos en la captación de la glucosa 2-NBDG por testosterona en cardiomiocitos hipertrofiados.</i>	59
Figura 15. <i>Efecto del tratamiento con indinavir en el desarrollo de hipertrofia del cardiomiocito por testosterona.</i>	60
Figura 16. <i>Estandarización de la incorporación de la glucosa 2-NBDG por medio de microscopía de epifluorescencia en cardiomiocitos de rata neonata.</i>	61

2. Abreviaturas

2-NBDG:	2-(N-(7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-il)amino)-2-deoxiglucosa). Análogo fluorescente de glucosa.
³H-2DG:	2-deoxi- ³ H-glucosa. Análogo radioactivo de glucosa.
β – MHC:	cadena pesada de la β – miosina.
ADN:	ácido desoxirribonucleico.
Akt:	proteína quinasa B.
AMP:	adenosina monofosfato.
AMPK:	proteína quinasa activada por AMP.
ATP:	adenosina trifosfato.
BrdU:	5-bromo-deoxiuridina.
CaMKII:	proteína quinasa dependiente del complejo Ca ²⁺ /calmodulina.
CPM:	cuentas radiactivas por minuto.
DMEM:	medio <i>Dulbecco</i> modificado por <i>Eagle</i> .
DTT:	ditiotreitól.
EDTA:	ácido etilén diamino tetra acético.
GLUT1:	transportador de glucosa tipo 1.
GLUT4:	transportador de glucosa tipo 4.
GLUT4 – myc – eGFP:	GLUT4 – myc – asociado a la proteína fluorescente verde.
GSK:	proteína quinasa glicógeno sintasa.
eGFP:	proteína fluorescente verde (<i>enhanced Green Fluorescence Protein</i>).
PBS:	amortiguador fosfato salino.
PI3K:	fosfatidilinositol-3-quinasa.
PMSF:	fenil metil sulfonil fluoruro.

p/v: peso/volumen.

ROI: región de interés.

SDS/PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.

SFB: suero fetal bovino.

SKA: α – actina esquelética.

TBS: amortiguador tris salino.

TBS-T: TBS Tween-20.

v/s: versus.

v/v: volumen/volumen.

3. Resumen

La testosterona es la principal hormona sexual masculina, responsable de múltiples efectos en el organismo. Dentro de estos, se ha descrito que es capaz de producir hipertrofia cardíaca tanto *in vitro* como *in vivo*. Una de las etapas claves en el desarrollo de la hipertrofia del cardiomiocito consiste en el aumento del consumo de glucosa, como estrategia para aumentar la producción de energía asociada al crecimiento hipertrófico. Si bien la testosterona es capaz de producir hipertrofia cardíaca, no se ha descrito que además aumente la captación de glucosa en cardiomiocitos.

Como hipótesis a este problema, se planteó que la testosterona aumenta la captación de glucosa en cardiomiocitos a través del transportador de glucosa GLUT4. Para evaluar esta hipótesis, se realizó cultivo primario de cardiomiocitos de ratas neonatas y se evaluó la captación de glucosa por medio de la glucosa fluorescente 2-NBDG (2-(N-(7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-il) amino)-2-deoxiglucosa) y 2-deoxi-[³H] glucosa en cardiomiocitos estimulados con testosterona. Adicionalmente, se evaluó la participación del transportador de glucosa GLUT4, la proteína Akt, la proteína dependiente del complejo Ca²⁺/calmodulina (CaMKII) y la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) en el proceso.

Los resultados obtenidos a través de microscopía de epifluorescencia y centelleo líquido, indican que la testosterona aumentó la captación de la glucosa 2-NBDG y 2-deoxi-[³H] glucosa, respectivamente, alcanzando un valor máximo luego de 2 h de estímulo. La inhibición selectiva del transporte de glucosa a través de GLUT4 con indinavir, bloqueó el aumento en la captación de glucosa por testosterona, sugiriendo la participación de GLUT4 en el proceso. Adicionalmente, cardiomiocitos transfectados con el plasmidio GLUT4myc-eGFP revelaron que la testosterona aumentó la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática. Mediante ensayos de *Western blot* se determinó que la testosterona aumentó la

fosforilación de las proteínas CaMKII y AMPK (alcanzando un máximo en su fosforilación luego de 15 y 60 min de estímulo, respectivamente), las que resultaron ser claves tanto en la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática, como en la captación de glucosa por testosterona.

Finalmente, es posible concluir que la testosterona aumenta la captación de glucosa a través de GLUT4 por medio de la activación de la vía de señalización CaMKII/AMPK. Lo anterior revela el papel de la testosterona en la captación de glucosa en cardiomiocitos, lo cual puede constituir un mecanismo de captación de glucosa destinada a la producción de energía celular, síntesis de componentes necesarios para el crecimiento hipertrófico y otros procesos anabólicos importantes para estas células.

4. Abstract

“Effect of testosterone on GLUT4-dependent glucose uptake through CaMKII/AMPK signaling pathway in rat cardiomyocytes”

Testosterone is the principal male sexual hormone, and plays a key role in the development of male reproductive tissues. It has been reported that testosterone induces cardiac hypertrophy, both *in vivo* and *in vitro*. One critical step during cardiac hypertrophy development is the induction of glucose uptake to improve energy production during cardiac growth. Although it is known that testosterone induces cardiac hypertrophy, its effect on glucose uptake in cardiomyocytes remains unknown.

The hypothesis of this work is that testosterone increases GLUT4-dependent glucose uptake by the activation of the CaMKII/AMPK signaling pathway. Experiments were performed in primary cell culture of neonatal cardiomyocytes. To evaluate testosterone-induced glucose uptake in cardiomyocytes, the fluorescent analog of glucose 2-NBDG (2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-deoxyglucose) and 2-deoxy-[H³] glucose were used. Moreover, participation of the glucose transporter GLUT4, as well as the protein Akt, Ca²⁺/calmodulin complex dependent protein kinase (CaMKII) and AMP-activated protein kinase (AMPK) were assessed.

Testosterone increased both 2-NBDG and 2-deoxy-[H³] glucose uptake (by epifluorescence microscopy and liquid scintillation counting, respectively), reaching a peak after 2 h of testosterone stimulation. Indinavir, a specific GLUT4 blocker, inhibited testosterone-induced glucose uptake in cardiomyocytes. In addition, western blot assays showed that testosterone increased phosphorylation levels of both CaMKII and AMPK, after 15 and 60 min of stimulation, respectively. Moreover, both proteins were crucial for

GLUT4 translocation to the plasma membrane and glucose uptake induced by testosterone in cardiomyocytes.

Taken together, data showed that testosterone increases GLUT4-dependent glucose uptake through CaMKII/AMPK signaling pathway activation. These findings suggest that testosterone increases glucose uptake in cardiomyocytes, which could be necessary for energy production required for cellular homeostasis, cardiomyocyte growth and other important anabolic process in cardiac cells.

5. Introducción

5.1. Testosterona y sus mecanismos de acción.

La testosterona es la principal hormona sexual masculina responsable del desarrollo de los caracteres sexuales primarios y secundarios en el hombre. Adicionalmente, tiene un papel fundamental en el desarrollo de la masa muscular, la producción de glóbulos rojos, mantención de la densidad ósea, entre otras importantes funciones.

La testosterona es una hormona de naturaleza esteroidea, derivada del colesterol, compuesta por 19 átomos de carbono. Su naturaleza química le confiere propiedades altamente hidrofóbicas, lo que resulta clave para uno de sus principales mecanismos de acción. A nivel celular, la testosterona puede ejercer sus efectos a través de dos principales mecanismos. El primero, conocido clásicamente como mecanismo genómico, consiste en la difusión de la hormona a través de la membrana plasmática desde el espacio extra hacia el intracelular. Una vez dentro de la célula, la testosterona se une al receptor para andrógenos, ubicado en el citoplasma (Michel & Baulieu, 1980). La unión de la testosterona a su receptor establece un complejo que migra al núcleo celular, donde se une a sitios específicos del ADN, conocidos como elementos de respuesta a andrógenos, regulando la expresión de diversos genes (Simental *et al.*, 1991).

El segundo mecanismo descrito para la testosterona, consiste en la unión de la hormona a un receptor acoplado a proteína G ubicado en la membrana plasmática, como ha sido descrito para estrógenos (Prosnitz *et al.*, 2001). De esta forma, se desencadenan efectos rápidos, como la liberación de calcio desde el retículo endoplasmático y la activación de diferentes proteínas quinasas (mecanismo no genómico) (Estrada *et al.*, 2003, Estrada *et al.*, 2006, Vicencio *et al.*, 2006).

Los cardiomiocitos, células contráctiles del corazón, son un blanco de acción para estímulos neuro-hormonales, como los andrógenos. Se ha descrito que la testosterona, principal andrógeno en hombres, es capaz de inducir la hipertrofia del cardiomiocito, tanto *in vitro* como *in vivo* (Sullivan *et al.*, 1998, Altamirano *et al.*, 2009). La hipertrofia del cardiomiocito consiste en el aumento del tamaño celular, en un mecanismo cooperativo entre acciones genómicas y no genómicas, como respuesta adaptativa a estímulos que aumentan el gasto cardíaco (Marsh *et al.*, 1998, Frey *et al.*, 2004,).

Una de las etapas críticas en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca, es la mantención de un adecuado suministro energético necesario para el crecimiento celular y las demandas contráctiles. Un cardiomiocito normal consume preferentemente ácidos grasos para producir ATP. Sin embargo, durante el desarrollo de la hipertrofia del cardiomiocito, suele aumentar el consumo de glucosa, lo que sucede principalmente a través de la glicólisis (Stanley *et al.*, 2005). Lo anterior es entendido como un mecanismo de adaptación metabólica para optimizar la producción de ATP durante el desarrollo del fenotipo hipertrófico (Scolleta & Biagioli, 2009).

5.2. Mecanismos de captación de glucosa en cardiomiocitos.

Una de las etapas clave para aumentar el consumo de glucosa consiste en incrementar su incorporación desde el medio extracelular. Para ello, los cardiomiocitos cuentan con dos principales transportadores de glucosa, pertenecientes a la familia de transportadores de difusión facilitada de glucosa “GLUTs”, siendo GLUT1 y GLUT4 los principales en este tipo celular (Zorzano *et al.*, 1998).

GLUT1 y GLUT4 son proteínas integrales con 12 dominios trans-membrana, cuyo peso molecular aproximado es de 50 kDa. GLUT1 se localiza principalmente en la

membrana plasmática, siendo responsable del transporte basal de glucosa en cardiomiocitos. El transportador GLUT4, en cambio, se encuentra la mayor parte del tiempo reclutado dentro de la célula en vesículas de almacenamiento específico para GLUT4 (*GSVs*, *GLUT4 storage vesicles*), compartimento de reciclaje endosomal (*ERC*, *endosome recycling compartments*) y la red del trans-Golgi (*TGN*, *trans-Golgi network*) (Mueckler, 1994, Maher *et al.*, 1994, Dugani & Klip, 2005, Huang & Czech, 2007). El transportador GLUT4 se localiza principalmente dentro de la célula porque su tasa de endocitosis es comparativamente más alta que su tasa de exocitosis, provocando como resultado un mayor tiempo de residencia dentro de la célula. Para ser movilizado a la membrana plasmática y así aumentar la captación de glucosa desde el medio extracelular, requiere de estímulos que aumenten la tasa de exocitosis o bien, disminuyan la de endocitosis, como es el caso de la acción de la hormona insulina y la contracción muscular, respectivamente (Ishikura *et al.*, 2010).

5.3. Mecanismos de migración de GLUT4 a la membrana plasmática.

5.3.1. Eje de señalización PI3K/Akt.

La insulina promueve el aumento de la captación de glucosa a través de GLUT4 (Slot *et al.*, 1991). Luego de la ingesta de comida, la insulina es liberada desde el páncreas para promover la captación de glucosa en diversos tejidos, siendo el músculo esquelético uno de sus principales blancos de acción. Para promover la captación de glucosa en el músculo, la insulina interactúa con el receptor de insulina, el cual presenta actividad tirosina quinasa. La unión al receptor implica la activación de los sustratos de respuesta a insulina (*IRS*, *insulin receptor substrate*), desencadenando la activación de la proteína fosfatidilinositol-3-quinasa (*PI3K*, *phosphatidylinositol-3-kinase*) y posteriormente, la

fosforilación y activación de la proteína Akt (Thong *et al.*, 2005, Klip, 2009). La activación de Akt trae consigo la inactivación, mediante fosforilación, del sustrato de Akt de 160 kDa (AS160) (Deshmukh *et al.*, 2006, Kramer *et al.*, 2006). En condiciones nativas, la proteína AS160 detiene el tráfico de GLUT4 hacia la membrana plasmática. Sin embargo, su inactivación mediante fosforilación, libera el tránsito de GLUT4 hacia la superficie celular, aumentando posteriormente la captación de glucosa (Koumanov *et al.*, 2011, Chen *et al.*, 2011, Hoffman & Elmendorf, 2011).

5.3.2. Eje de señalización Ca^{2+} /CaMKII/AMPK.

La contracción muscular también es capaz de aumentar la captación de glucosa en células musculares (Kramer *et al.*, 2006). Los aumentos transitorios del ión Ca^{2+} en el espacio intracelular, asociados a la contracción del músculo, promueven la migración de GLUT4 a la membrana plasmática por medio de la vía de señalización que involucra el aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular, la proteína dependiente del complejo Ca^{2+} /calmodulina (CaMKII, *Ca²⁺/calmodulin-dependent complex II*) y la proteína quinasa activada por AMP (AMPK, *AMP-activated protein kinase*) (Huang & Czech, 2007).

La proteína CaMKII es un importante decodificador de señales de Ca^{2+} (Zhang & Brown, 2004, Wayman *et al.*, 2011). Su activación requiere de la unión del ión Ca^{2+} y la proteína calmodulina (CaM). El complejo Ca^{2+} /CaM se une a la proteína CaMKII, induciendo un cambio en la conformación de ésta y su posterior autofosforilación en su residuo Thr 286 (Miller *et al.*, 1988, de Konick & Shulman, 1998, Parekh, 2011).

La proteína AMPK es el principal sensor energético celular (Miranda *et al.*, 2007, Hardie *et al.*, 2011). La activación de la proteína AMPK promueve la producción de ATP intracelular, principalmente mediante el aumento del catabolismo celular (Arad *et al.*, 2007).

Se han descrito dos principales mecanismos por medio de los cuales AMPK alcanza su activación. En primer lugar, las proteínas quinasas LKB1 (*Liver Kinase B 1*) y CaMKII son capaces de fosforilar – de forma independiente entre sí – a AMPK en su residuo Thr 172, el cual da cuenta de su total activación como proteína quinasa (Jensen *et al.*, 2007, Arad *et al.*, 2007, Abbot *et al.*, 2009). En segundo lugar, el aumento en la concentración de AMP intracelular por sobre la de ATP, ejerce un control alostérico positivo en la activación de AMPK. Lo anterior sucede en períodos de la vida de la célula donde la velocidad de síntesis de ATP es inferior a la de degradación (Arad *et al.*, 2007).

La activación de AMPK induce la fosforilación e inactivación de la proteína AS160. Esta inactivación libera el tráfico de GLUT4 hacia la membrana plasmática, aumentando la captación de glucosa desde el medio extracelular a través del transportador GLUT4. (Huang & Czech, 2007).

Si bien los mecanismos de captación de glucosa por insulina y la contracción muscular convergen en la fosforilación de la proteína AS160, éstas corresponden a contextos fisiológicos distintos. Mientras que el mecanismo dependiente de insulina y la activación del eje de señalización PI3K/Akt suele estar destinado al almacenamiento de glucosa en forma de glicógeno, el mecanismo dependiente de la contracción muscular y el eje de señalización CaMKII/AMPK está relacionado con el uso inmediato de la glucosa, destinándola a la producción de ATP (Klip *et al.*, 2009).

5.4. Papel de la testosterona en el metabolismo de la glucosa.

Se ha descrito que la testosterona es capaz de aumentar la captación de glucosa a través del aumento en la expresión y translocación de GLUT4 a la membrana plasmática, en músculo esquelético, tejido adiposo e hígado (Sato *et al.*, 2008, Muthusamy *et al.*, 2009). Recientes investigaciones sugieren una correlación positiva entre niveles anormalmente bajos de testosterona plasmática (como en casos de hipogonadismo y andropausia) y el desarrollo de resistencia a la insulina, hiperglicemia y obesidad central, los que en conjunto constituyen un importante factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Cook & Ramashkan, 2011). Sin embargo, el suministro de testosterona en dosis fisiológicas ha mejorado estos parámetros, sugiriendo que la testosterona regula el metabolismo de la glucosa (Kalinchenko *et al.*, 2010, Cook & Ramashkan, 2011, Rubinow *et al.*, 2011, Jeong *et al.*, 2011). No obstante, los mecanismos implicados en los efectos descritos no se han explorado, así como tampoco se ha reproducido un efecto similar en otros modelos celulares, como el cardiomiocito.

El desarrollo y consolidación de hipertrofia en los cardiomiocitos puede estudiarse a través de distintas aproximaciones. Los cambios metabólicos asociados a su desarrollo, así como el aumento en las demandas de ATP pueden entenderse como un escenario de estrés energético. Debido a los efectos de la testosterona tanto en el desarrollo de hipertrofia del cardiomiocito, como sobre el metabolismo de la glucosa en otros modelos celulares, cabe preguntar si este andrógeno ejerce un control metabólico en el cardiomiocito, específicamente sobre la incorporación y consumo de glucosa. Lo anterior puede proporcionar evidencia acerca de los efectos metabólicos de la testosterona en células cardíacas, pudiendo ser clave para la producción de ATP, el desarrollo de hipertrofia cardíaca y otros procesos anabólicos.

6. Problema

La testosterona induce hipertrofia del cardiomiocito. Una de las etapas clave en su desarrollo, es el aumento del consumo de glucosa para aumentar la producción de ATP. Diversas investigaciones sugieren que la testosterona es capaz de aumentar la incorporación de glucosa a través del incremento en la translocación del transportador de glucosa GLUT4 a la membrana plasmática. Sin embargo, no existe evidencia que lo anterior suceda en cardiomiocitos.

Adicionalmente, la hipertrofia del cardiomiocito representa un contexto celular de desbalance energético, donde la tasa de suministro de ATP debe ser alta para permitir tanto el crecimiento celular, como las demandas contráctiles. La vía de señalización celular $Ca^{2+}/CaMKII/AMPK$ se asocia a la captación de glucosa para su uso inmediato destinado a la síntesis de ATP, mientras que la activación de la proteína Akt, se relaciona con mecanismos de almacenamiento de glucosa (Klip, 2009).

Debido a que la testosterona produce hipertrofia en cardiomiocitos y esto requiere un continuo suministro de sustratos con fines energéticos, resulta de interés evaluar el efecto de la testosterona sobre la captación de glucosa en este tipo celular, estudiando la participación de las proteínas CaMKII y AMPK como ejes centrales en el mecanismo de incorporación de glucosa a través de GLUT4.

7. Hipótesis

“La testosterona aumenta la captación de glucosa a través del transportador GLUT4 por medio de la participación del eje de señalización CaMKII/AMPK en cardiomiocitos de ratas neonatas”.

8. Objetivo general.

Estudiar el papel de la testosterona en la captación de glucosa a través GLUT4 en cardiomiocitos de ratas neonatas, evaluando la participación de la vía de señalización CaMKII/AMPK en el proceso.

9. Objetivos específicos.

9.1. Objetivo específico 1. Estudiar el efecto de la testosterona en la captación de glucosa en cardiomiocitos. Se evaluó el efecto de la estimulación con testosterona en la captación de glucosa en cardiomiocitos. Adicionalmente, se estudió la participación del receptor de andrógenos y la acción de la enzima aromatasas en la captación de glucosa inducida por testosterona.

9.2. Objetivo específico 2. Evaluar la participación de GLUT4 en la captación de glucosa inducida por testosterona. Se determinaron las masas totales de los principales transportadores de glucosa en cardiomiocitos (GLUT1 y GLUT4) luego de estimular con testosterona. Adicionalmente, se bloqueó selectivamente el transporte de glucosa a través de GLUT4 y se evaluó la distribución celular de GLUT4 luego de la estimulación con testosterona.

9.3. Objetivo específico 3. Estudiar la participación CaMKII y AMPK en la captación de glucosa a través de GLUT4. Se evaluó la activación de las proteínas quinasas CaMKII y AMPK por testosterona, así como su participación en la captación de glucosa en cardiomiocitos y la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática en cardiomiocitos.

10. Materiales y Métodos.

10.1. *Materiales.* Testosterona, ciproterona, metformina, insulina y anastrozol se obtuvieron desde *Sigma Chemical Company (St Louis, MO, USA)*. Citocalasina B, inhibidor VIII de Akt, compuesto C, KN-93 y su análogo estructural inactivo KN-92 se adquirieron de *Calbiochem (La Jolla, CA)*. Los anticuerpos anti-GLUT1 y anti-c-myc se adquirieron de *Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)*. El análogo fluorescente de glucosa 2-NBDG (2-(N-(7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-il) amino)-2-deoxiglucosa), el colorante fluorescente *Cell Tracker Green* y el anticuerpo secundario *Alexa Fluor 546 anti-mouse* se obtuvieron de *Invitrogen (Eugene, OR, USA)*. La glucosa radioactiva 2-deoxi-D-2,6-[H³] glucosa (³H-2DG) se obtuvo de *NEN Radiochemicals Perkin Elmer (Waltham, MA, USA)*. La colagenasa tipo II se adquirió de *Worthington Biochemical Corporation (Lakewood, CA, USA)*. El plasmidio quimérico GLUT4myc-eGFP y el anticuerpo anti-GLUT4 (*rabbit*) fueron producidos en el laboratorio de la Dra. Amira Klip (*Hospital for sick children, Toronto, Canada*). Todos los otros reactivos utilizados en este trabajo fueron de grado analítico.

10.2. *Cultivo primario de cardiomiocitos.* Se utilizaron ratas Sprague-Dawley neonatas de 1 – 3 días de edad, provenientes del Bioterio Central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, bajo la aprobación del comité de bioética de esta institución.

10.2.1. *Aislamiento de corazones desde ratas neonatas.* El aislamiento y cultivo celular de cardiomiocitos se realizó en conformidad al protocolo descrito por Vicencio *et al.*, 2006. Brevemente, las ratas se sacrificaron por decapitación y posteriormente los corazones se removieron con pinzas y se lavaron en medio Hank's. Luego, los ventrículos izquierdos se separaron de las aurículas, para ser digeridos mecánicamente hasta formar un macerado

homogéneo de células. Se agregó medio de digestión celular que contenía colagenasa tipo II (0,2 mg/mL, actividad específica 207 U/mg) y pancreatina (0,6 mg/mL) disueltas en medio Hank's y se agitó por 30 min a 37°C. Luego, se dejó sedimentar por 5 min el tejido aún no digerido y se rescató el sobrenadante, centrifugándolo a 1000 x g por 10 min a 20 °C. La pella resultante se re-suspendió en medio completo (DMEM:M199 = 4:1, suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) y 1% de penicilina-estreptomicina) hasta pre-plaquear. El tejido sin digerir se sometió a dos procesos de digestión adicionales para el aislamiento de los cardiomiocitos aún remanentes en el tejido. Para descartar los fibroblastos, las células se pre-plaquearon por 90 min a 37°C en incubador con 5% CO₂ y 95% aire. Posteriormente, se rescató el sobrenadante, se añadió 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU) (100 μM), para evitar la proliferación de fibroblastos remanentes. Los cardiomiocitos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ y 95% de aire hasta su sembrado. El cultivo de cardiomiocitos alcanzó un 95% de pureza, en conformidad con lo descrito en Vicencio *et al.*, 2006.

10.3. Transfección del plasmidio GLUT4myc-eGFP. Para introducir el plasmidio GLUT4myc-eGFP (Antonescu *et al.*, 2009) en los cardiomiocitos, las células se sembraron sobre cubreobjetos redondos de vidrios de 12 mm de diámetro en placas de 24 pocillos (500.000 células por cubreobjeto) pre-tratados con gelatina (2% p/v). En el día 2, los cardiomiocitos se transfectaron con el plasmidio GLUT4myc-eGFP en lipofectamina (1:2) en medio de transfección (DMEM: M199 = 4:1, en ausencia de SFB y antibióticos). Luego de 4 h de transfección, las células se suplementaron con igual volumen de 10% de SFB y 1% de penicilina – estreptomicina por 24 h. El porcentaje de transfección obtenido para el plasmidio GLUT4myc-eGFP fue aproximadamente 7-10%.

10.4. Incorporación de 2-NBDG. Para evaluar la captación de glucosa por testosterona, las células se sembraron sobre cubreobjetos de vidrio de 25 mm de diámetro en placas de 6 pocillos (500.000 células por cubreobjeto) pre-tratadas con gelatina (2% p/v). En el día 2 de cultivo, los cardiomiocitos se privaron de SFB por al menos 8 h antes de realizar los experimentos. Luego, los cardiomiocitos se trataron con activadores o inhibidores farmacológicos y posteriormente se estimularon con testosterona. Luego, los cardiomiocitos se incubaron en medio Krebs sin glucosa (NaCl (145 mM), KCl (5 mM), CaCl₂ (6 mM), MgCl₂ (1 mM), HEPES – Na (25 mM), NaHCO₃ (10 mM), pH 7,4) por 15 min y posteriormente se incubaron con el análogo fluorescente de glucosa 2-NBDG (300 μM, disuelto en medio Krebs sin glucosa) por 15 min a 37° C, evitando la exposición a la luz. La emisión fluorescente se determinó en células únicas (al menos 100 células por cada condición experimental por cultivo) a través de un microscopio de epifluorescencia (longitud de onda de excitación $\lambda = \pm 480$ nm), realizando ROI (*Region of interest*) circulares de 30 x 30 píxeles.

10.5. Incorporación de 2-deoxi-³H-glucosa (³H-2DG). Para determinar la captación de ³H-2DG, los cardiomiocitos se sembraron en placas de cultivo de 12 pocillos (1,5 millones de células por pocillo) pre-tratadas con gelatina (2% p/v). En el día 2 de cultivo, los cardiomiocitos se privaron de SFB por al menos 8 h antes de realizar los experimentos. Luego del estímulo con testosterona, las células se lavaron con amortiguador HEPES frío (HEPES (5 g/L), NaCl (8 g/L), KCl (0,37 g/L), Na₂HPO₄·2H₂O (0,135 g/L), dextrosa (1 g/L), pH 7,2) y posteriormente se incubaron con ³H-2DG (1 μCi) disuelto en una solución de HEPES y 2-deoxiglucosa (30 mM) por 10 min a 4° C. Luego se realizaron lavados rápidos con HEPES y los cardiomiocitos se lisaron con NaOH (0,05 M). Se añadió líquido

de centelleo y se leyeron las cuentas radioactivas por minuto (CPM) de cada condición experimental en triplicado, a través de un contador de centelleo líquido Beckman LS-6000TA (*Beckman Instruments Corp., Fullerton, CA*).

10.6. *Detección de GLUT4myc-eGFP en la superficie celular.* Luego de 24 h – 36 h de la transfección del plasmidio GLUT4myc-eGFP, los cardiomiocitos se privaron de SFB por al menos 8 h antes de realizar los experimentos. Luego del tiempo de estimulación con testosterona, las células se lavaron con PBS a 4° C, se fijaron con paraformaldehído al 3% - PBS a 4° C por 10 min y se trataron posteriormente con glicina (100 mM) por 10 min a 4°C. Se realizaron 3 lavados rápidos con PBS, para luego ser bloqueadas con albúmina de suero bovino al 1% en PBS por 1 h a temperatura ambiente. Se incubó el anticuerpo anti – c-myc (*mouse*, 1:100 en albúmina de suero bovino 3% - PBS) durante toda la noche (12-16 h). Luego de la incubación, las células se lavaron e incubaron con el anticuerpo secundario *Alexa Fluor 546 anti – mouse (goat*, 1:500 en albúmina de suero bovino 3% - PBS 1X). A través de microscopía confocal (Carl Zeiss Pascal LSM 5) se realizaron cortes confocales en el eje z (z-stack) en células únicas, para detectar el epítipo c-myc en la membrana plasmática. Se analizaron en promedio 10 células por condición experimental por cultivo celular. Todos los materiales empleados estuvieron libres de cualquier tipo de detergente para evitar la permeabilización de los cardiomiocitos.

10.7. *Extracción de proteínas totales y fosforiladas.* Para determinar la cantidad relativa de proteínas totales y fosforiladas, los cardiomiocitos se sembraron en placas plásticas de 35 mm de diámetro (2.000.000 de células por placa) pre-tratadas con gelatina en el día 1 de cultivo. En el día 2, los cardiomiocitos se privaron de SFB por al menos 8 h previas a la

realización de los experimentos. Luego, las células se removieron mecánicamente con una espátula destinada para este fin (*cell scraper, Orange*) y se trataron con una solución de lisis celular que contuvo Tris-HCl (20 mM, pH 7,5), tritón X-100 (1% v/v), EDTA (2 mM), Na₂P₂O₇ (20 mM), glicerol (10%), NaCl (150 mM), Na₃VO₄ (10 mM), PMSF (1 mM) y mezcla de inhibidores de proteasas (*Roche Applied Science, Indianapolis, IN*) por 20 min a 4° C. El lisado celular obtenido se centrifugó a 15.000 x g por 15 min a 4°C. Se rescató el sobrenadante y se midió concentración de proteínas mediante el *kit Commassie Plus*, de acuerdo a las instrucciones del proveedor (*Thermo Scientific, Rockford, IL*). Las proteínas se denaturaron por 5 min a 95°C y se diluyeron en una solución que contuvo Tris-HCl (52,5 mM, pH 6,8), glicerol (10% v/v), dodecil sulfato de sodio (2% p/v), DTT (100 mM) y azul de bromofenol (0,01% p/v). Las muestras se almacenaron a -20°C hasta el momento de la electroforesis.

10.8. Ensayo de Western blot. Las muestras proteicas obtenidas se separaron electroforéticamente en geles de *SDS-PAGE* al 7% en una cámara Miniprotean (BioRad) y posteriormente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (*Thermo Scientific, Rockford, IL*), por medio de un sistema de electro-transferencia húmeda a 400 mA por 90 min. Las membranas de nitrocelulosa se bloquearon con leche descremada al 5% en TBS-Tween-20 (0,05% v/v) (TBS-T) por 1 h a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes; anti-GLUT1 (*rabbit*, 1:1.000), anti-GLUT4 (*rabbit*, 1:1.000), anti-fosfo-CaMKII (Thr 286) (*rabbit*, 1:2.000), anti-fosfo-AMPK (Thr 172) (*rabbit*, 1:1.000) y anti-β-actina (*mouse*, 1:5.000) disueltos en albúmina de suero bovino al 5% en TBS-T (0,1% v/v) a 4°C durante toda la noche (12-16 h) con agitación. Posteriormente, las membranas se lavaron con TBS-T (0,05% v/v) y luego se incubaron

con los respectivos anticuerpos secundarios (*anti-rabbit* o *anti-mouse*, 1:2.000, conjugados a la enzima peroxidasa de rabanito, *Sigma*) en leche al 5% en TBS-T (0,05% v/v) por 2 h a temperatura ambiente con agitación. La detección de las proteínas se realizó mediante un ensayo de quimioluminiscencia (*Thermo Scientific enhanced chemiluminescence Western blotting detection system*).

10.9. Determinación del área celular de los cardiomiocitos. Los cardiomiocitos se sembraron en placas de 24 pocillos sobre cubreobjetos redondos de vidrio de 12 mm de diámetro pre-tratadas con gelatina (2% p/v) en el primer día de cultivo. En el día 2 fueron privadas de SFB por al menos 8 horas antes de ser estimuladas. Luego de la estimulación con testosterona (48 h), los cardiomiocitos se incubaron con el colorante fluorescente *Cell Tracker Green* (10 μ M) en una solución de ácido plurónico – Krebs (0,025% v/v) por 40 min. Posteriormente, los cardiomiocitos se suplementaron con medio de cultivo por otros 40 min. Se realizaron lavados con Krebs y luego los cardiomiocitos se fijaron con paraformaldehído al 3% y posteriormente se montaron en medio de montaje Dako sobre porta-objetos de vidrio. Las imágenes se adquirieron por medio de microscopía confocal (Carl Zeiss Pascal LSM 5) en células únicas (100 células por cada condición). La determinación del área celular se realizó delimitando el perímetro de las células con el software ImageJ, proporcionado por el *National Institute of Health* (NIH, Bethesda, MA, USA).

10.10. Análisis de imágenes. Todas las imágenes provenientes de microscopía de epifluorescencia y confocal, así como los análisis densitométricos de ensayos de *western blot*, se analizaron mediante ImageJ (NIH, Bethesda, USA).

10.11. Análisis estadístico. Todos los valores se expresaron como el promedio \pm error estándar de la media. Cada medición se realizó al menos 3 veces, correspondientes a 3 cultivos celulares distintos. Las diferencias entre condiciones controles y experimentales se determinaron mediante análisis de varianza (ANOVA), post – test Bonferroni. Se consideró un valor $p < 0,05$ como diferencia estadísticamente significativa. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism 5.

11. Resultados

11.1. Efecto de la testosterona sobre la captación de la glucosa 2-NBDG y ³H-2DG en cardiomiocitos. Para evaluar el efecto de la testosterona sobre la captación de glucosa en cardiomiocitos, se llevaron a cabo dos estrategias experimentales. En primer lugar, se evaluó la captación del análogo fluorescente de glucosa 2-NBDG (300 μM) luego de 15, 30, 60 y 120 min de estimulación con testosterona (100 nM) (Figura 1A). Esta herramienta ha sido validada cinéticamente como un método para estudiar el transporte de glucosa en células únicas en cultivo (Barros *et al.*, 2009). La figura 1 A indica que luego de 2 h de estímulo con testosterona, se alcanzó un valor máximo en la captación de la glucosa 2-NBDG (aproximadamente 1,6 veces el valor de la condición basal (no estimulada), $p < 0,01$ v/s basal). Los experimentos siguientes se realizaron a este tiempo debido a la alta reproducibilidad obtenida. Adicionalmente, como control positivo de la captación de 2-NBDG se utilizó insulina (100 nM) por 15 min (Figura 1A, $p < 0,01$ v/s basal). En segundo lugar, se evaluó la captación de la glucosa radioactiva ³H-2DG tras 2 h de estímulo con testosterona (100 nM) (Figura 1B), donde se obtuvo un aumento estadísticamente significativo con respecto a la condición control (aproximadamente 1,4 veces de aumento, $p < 0,001$ v/s basal). Como control positivo de la captación de ³H-2DG se utilizó insulina (100 nM) por 15 min (Figura 1C, $p < 0,001$ v/s basal). Para determinar la participación de la familia de transportadores GLUT en la captación de glucosa observada, se utilizó citocalasina B (10 μM), un bloqueador inespecífico del transporte de glucosa a través estos transportadores (Figuras 1 B y C). En ambos casos se observó un bloqueo en el incremento de la captación de glucosa inducida por testosterona (Figura 1 B, $p < 0,001$ v/s testosterona), lo que sugiere que la incorporación de glucosa ocurre a través de la familia de transportadores GLUT. Para evaluar la participación específica del transportador

de glucosa GLUT4 en la captación de glucosa inducida por testosterona, los cardiomiocitos se trataron con indinavir, un bloqueador específico del transporte de glucosa a través de GLUT4 (Murata *et al.*, 2002). El tratamiento con indinavir bloqueó el aumento de la incorporación de la glucosa 2-NBDG por testosterona, sugiriendo que la captación ocurre a través de GLUT4 en este modelo de estudio (Figura 1 D, $p < 0,05$ v/s testosterona).

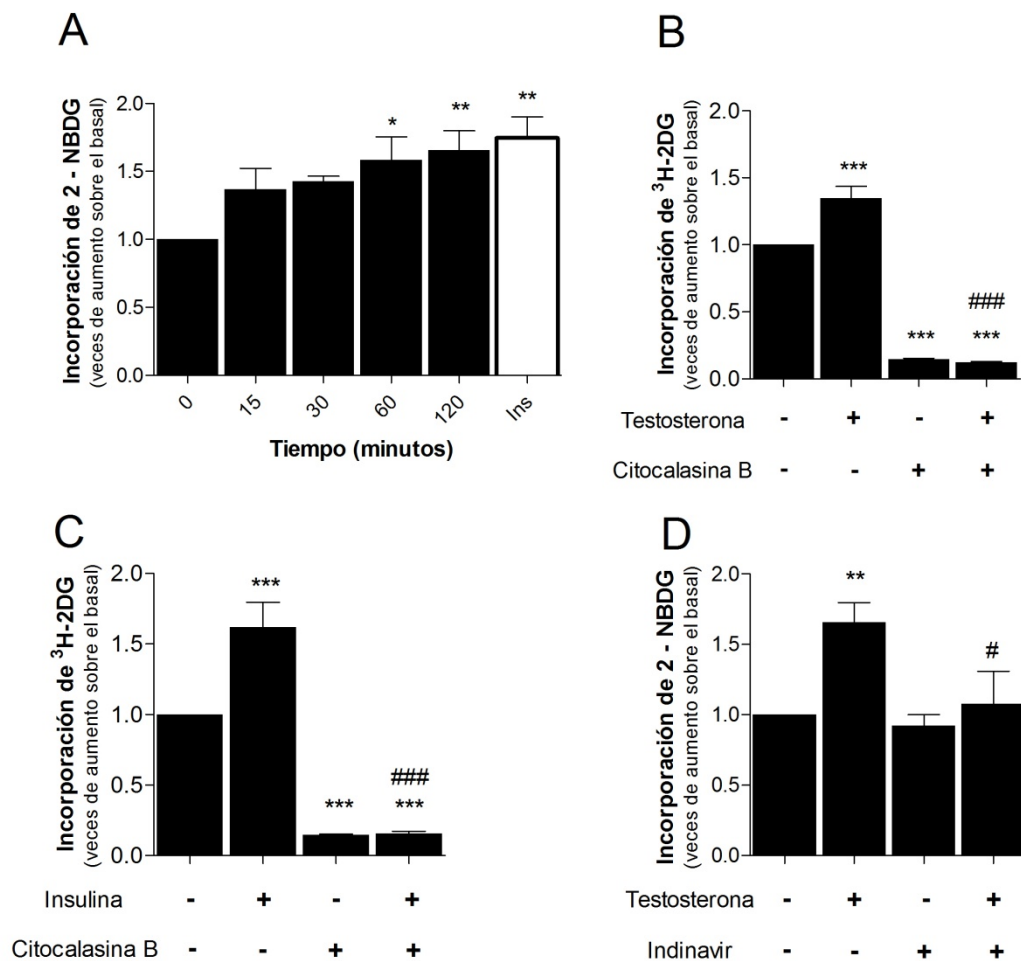


Figura 1. *Efecto de la testosterona sobre la captación de la glucosa 2-NBDG y ³H-2DG en cardiomiocitos.* A) Incorporación de 2-NBDG (300 μ M) luego de la estimulación con testosterona (100 nM). Como control positivo de la captación de 2-NBDG se utilizó insulina (100 nM) por 15 min. B) Incorporación de ³H-2DG en cardiomiocitos luego de la estimulación con testosterona (100 nM) por 2 h. Citocalasina B (10 μ M) se co-incubó con ³H-2DG (1 μ Ci). C) Incorporación de ³H-2DG en cardiomiocitos luego del estímulo con insulina (100 nM) por 15 min. Citocalasina B (10 μ M) se co-incubó con ³H-2DG. D) Los cardiomiocitos se estimularon con testosterona (100 nM) por 2 h y posteriormente se incubó indinavir (100 μ M) por 15 min junto a la glucosa 2-NBDG. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ v/s basal (no estimulado), # $p < 0,05$; ### $p < 0,001$ v/s testosterona. N=3.

11.2. Efecto de la concentración de testosterona en la captación de 2-NBDG. Se evaluó el efecto de la concentración de testosterona utilizada en la captación de 2-NBDG, empleando 3 concentraciones distintas de hormona (10, 100 y 1000 nM) por 2 h de estímulo (Figura 2). Sólo elevadas concentraciones de testosterona en cultivo (100 y 1000 nM) incrementaron la captación de 2-NBDG en cardiomiocitos ($p < 0,01$ y $p < 0,05$ v/s basal, respectivamente), efecto no observado al estimular con testosterona en una concentración más baja (10 nM).

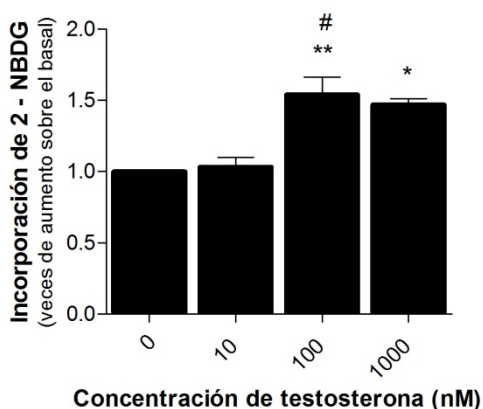


Figura 2. *Efecto de la concentración de testosterona en la captación de 2-NBDG.* Los cardiomiocitos se estimularon con testosterona en 3 concentraciones distintas (10, 100 y 1000 nM) por 2 h. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ v/s 0 nM, # $p < 0,05$ v/s 10 nM. N=3.

11.3. Participación del receptor para andrógenos en la captación de 2-NBDG. Para comenzar a explorar los mecanismos involucrados en la captación de 2-NBDG por testosterona, se evaluó la participación del receptor intracelular para andrógenos en el efecto observado. Los cardiomiocitos se pre-trataron con ciproterona (1 μ M) por 30 min, un inhibidor competitivo del receptor, para luego ser estimulados con testosterona (100 nM) por 2 h (Figura 3). El tratamiento con ciproterona no bloqueó el aumento de la captación de la glucosa 2-NBDG por testosterona ($p < 0,05$ v/s basal), sugiriendo que luego de 2 h de

estímulo, el efecto de esta hormona es independiente de la interacción con el receptor de andrógenos.

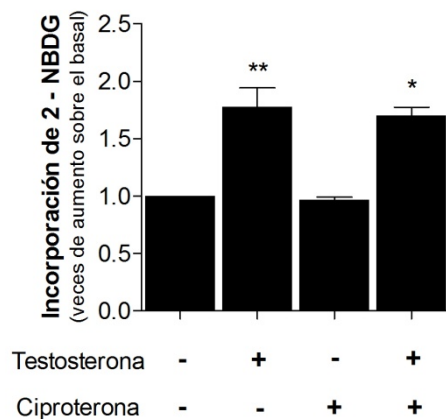


Figura 3. **Participación del receptor para andrógenos en la captación de 2-NBDG.** Los cardiomiocitos se estimularon con testosterona (100 nM) por 2 h. Adicionalmente, se pre-trataron con ciproterona (1 μ M) por 30 min y posteriormente se estimularon con testosterona en el tiempo indicado. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ v/s basal (no estimulado). N=3.

11.4. La incorporación de la glucosa 2-NBDG es específica para la estimulación con testosterona y no a su conversión a estradiol. Para descartar que la captación de 2-NBDG observada fuese debido a la conversión de testosterona a estradiol, reacción catalizada por la enzima aromatasa, los cardiomiocitos se pre-trataron con anastrozol (100 nM) (un inhibidor de la enzima, Mukherjee *et al.*, 2002) por 30 min y posteriormente se estimularon con testosterona (100 nM) por 2 h (Figura 4). El tratamiento con anastrozol no bloqueó la captación de glucosa por testosterona ($p < 0,01$ v/s basal), sugiriendo que la estimulación con testosterona, y no su conversión a estradiol, es la responsable de la captación de la glucosa 2-NBDG.

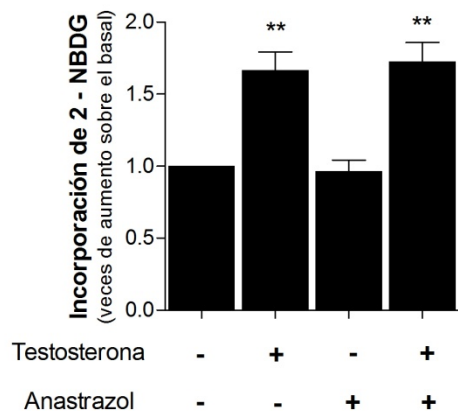


Figura 4. **La incorporación de la glucosa 2-NBDG es específica para la estimulación con testosterona y no a su conversión a estradiol.** Los cardiomiocitos se estimularon con testosterona (100 nM) por 2 h. Adicionalmente, los cardiomiocitos se pre-trataron con anastrozol (100 nM) por 30 min y posteriormente se estimularon con testosterona por el tiempo indicado. **p < 0,01 v/s basal (no estimulado). N=3.

11.5. Determinación de las masas totales de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT4 en cardiomiocitos. GLUT1 y GLUT4 son los principales transportadores de glucosa en el cardiomiocito (Zorzano *et al.*, 1998). Para verificar su presencia en este modelo de estudio, se determinó la masa total de proteínas de ambos transportadores mediante ensayos de *Western blot* en condiciones control y estimulada con testosterona (100 nM) por 2 h (Figura 5). Tanto GLUT1 como GLUT4 están presentes en los cardiomiocitos. Sin embargo, no se encontraron diferencias en el nivel de proteína total de GLUT1 y GLUT4 al comparar la población control con la estimulada con testosterona en estos tiempos de estudio.

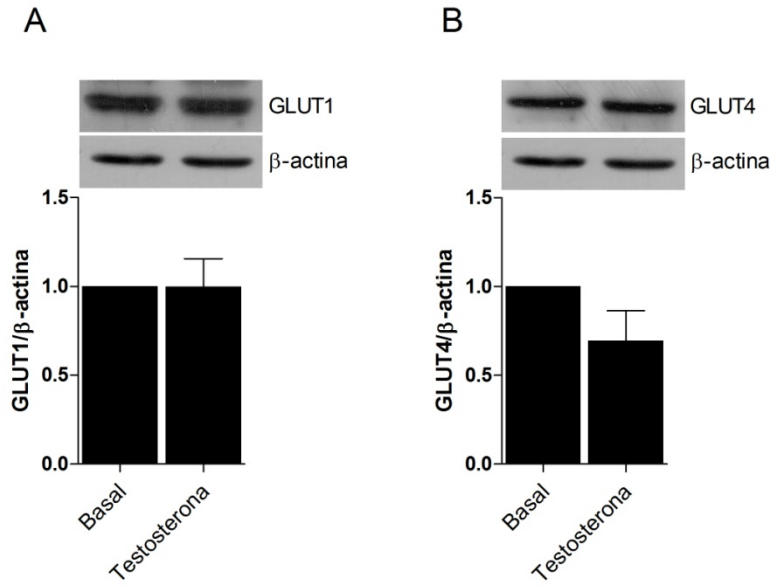


Figura 5. *Determinación de la masa total de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT4 en cardiomiocitos.* A) y B) Detección del nivel de proteína total de GLUT1 y GLUT4 tras 2 h de estímulo con testosterona (100 nM) mediante *Western blot*. No se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar la condición basal con la estimulada con testosterona. N=3.

11.6. Efecto de la testosterona sobre la translocación del transportador GLUT4 a la superficie celular. Para que el cardiomiocito aumente la captación de glucosa desde el espacio extracelular a través del transportador GLUT4, éste debe ser movilizado desde el espacio intracelular a la membrana plasmática. Para determinar la presencia de GLUT4 en la membrana plasmática es posible recurrir a distintas técnicas experimentales, como fraccionamiento sub-celular (a través de centrifugación diferencial) e inmunofluorescencia y microscopía confocal. Se ha determinado por fraccionamiento subcelular que la testosterona aumenta la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática en músculo esquelético, a partir de biopsias de este tejido (Muthusamy et al., 2009, Sato et al., 2009). Sin embargo, obtener fracciones subcelulares (membrana y citosol), a través de centrifugación diferencial, desde cultivo primario de cardiomiocitos, requiere un elevado

número de células, lo que significa un factor limitante para el estudio. Debido a lo anterior, se evaluó la distribución celular del transportador GLUT4 mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal. Para esto, los cardiomiocitos se transfectaron con el plasmidio quimérico GLUT4myc-eGFP (Antonescu *et al.*, 2009) (Figura 6). Este plasmidio contiene el gen humano de la proteína GLUT4, el cual fue modificado para introducir un epítipo c-myc, el cual es expuesto hacia la cara extracelular una vez que la proteína se inserta en la membrana plasmática. Adicionalmente, el plasmidio porta el gen de la proteína fluorescente verde (*green fluorescent protein*, GFP), para verificar la expresión en los cardiomiocitos. En presencia de estímulos que promueven la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática, la detección del epítipo c-myc a través de inmunofluorescencia en células no permeabilizadas, permite diferenciar la población del transportador que se encuentra en la superficie celular de aquella que se encuentra al interior de la célula. Por lo tanto, la exposición del epítipo c-myc se utiliza como indicador de translocación de GLUT4 a la membrana plasmática (Antonescu *et al.*, 2009, Contreras-Ferrat *et al.*, 2010).

La figura 6 A muestra la distribución celular del epítipo c-myc en cardiomiocitos transfectados con el plasmidio GLUT4myc-eGFP, por medio de inmunofluorescencia y microscopía confocal (cortes confocales). Se observa que el estímulo con testosterona (100 nM) por 2 h produjo la movilización del epítipo c-myc a la superficie del cardiomiocito (flechas blancas), distribución que no es observada en el cardiomiocito control (sin estímulo). Como control positivo de la translocación del epítipo c-myc a la superficie celular se utilizó insulina (100 nM) por 15 min. Adicionalmente, se realizó la cuantificación relativa de la población del epítipo c-myc en la superficie celular. Para esto, se sumaron las emisiones fluorescentes de cada plano focal del eje z donde hubo detección del epítipo c-myc, lo cual se normalizó por la suma de la emisión fluorescente de la proteína GFP en los

mismos planos focales, estableciendo la razón c-myc/eGFP como un parámetro de cuantificación relativa del epítipo c-myc en la membrana plasmática (Figura 6 B). La testosterona aumentó la razón c-myc/eGFP con respecto al control (no estimulado) ($p < 0,01$ v/s basal), sugiriendo que este andrógeno es capaz de producir la migración de GLUT4 a la superficie del cardiomiocito.

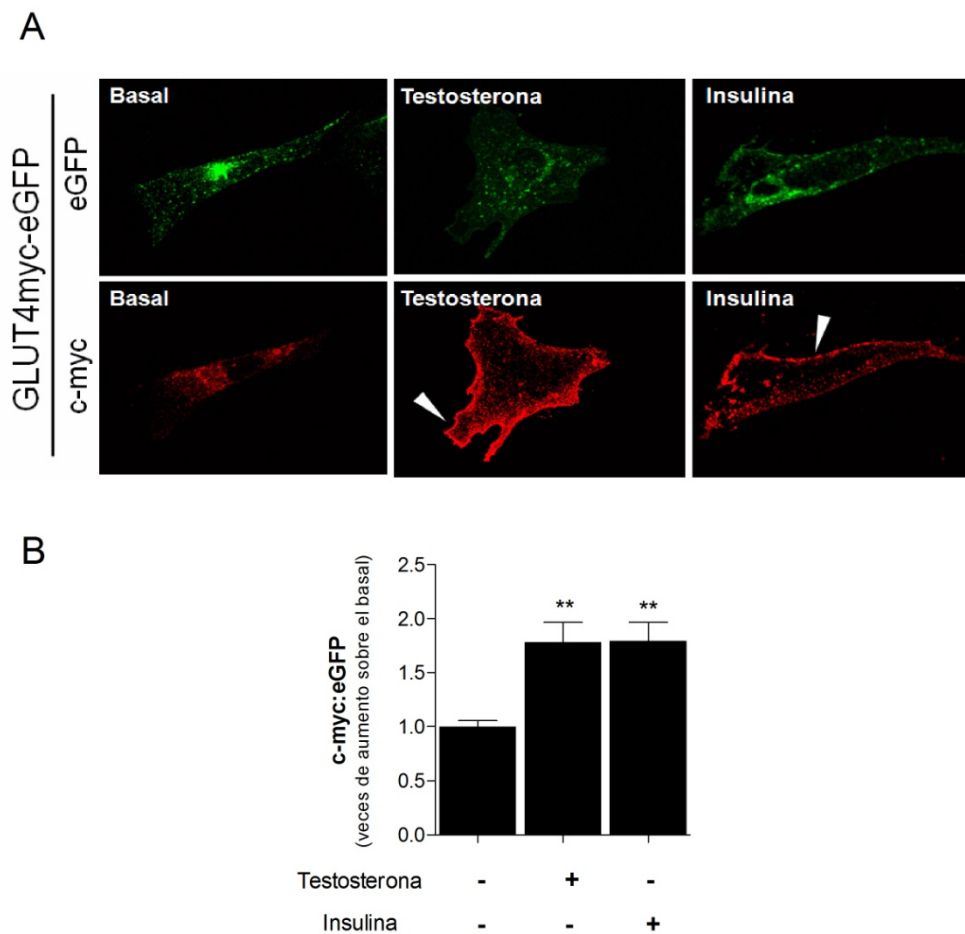


Figura 6. *Efecto de la testosterona sobre la translocación del transportador GLUT4 a la superficie celular.* A) Cortes confocales de cardiomiocitos transfectados con el plasmidio GLUT4myc-eGFP, estimulados con testosterona (100 nM) por 2 h e insulina (100 nM) por 15 min, como control positivo de translocación a la membrana. En el panel superior se observa la expresión de la proteína GFP, mientras que el panel inferior se indica la detección del epítipo c-myc. B) Razón entre la suma de la emisión fluorescente detectada del epítipo c-myc y la proteína GFP en cardiomiocitos transfectados con el plasmidio GLUT4myc-eGFP. (no estimulado). Se alcanzó un 7-10% de transfección del plasmidio. Se analizaron aproximadamente 10 células por cada condición por cultivo celular. ** $p < 0,01$ v/s basal. N=3.

11.7. Participación de la proteína CaMKII en la captación de 2-NBDG a través de GLUT4 por testosterona. Una vez que se determinó que la testosterona aumenta la captación de glucosa a través del transportador GLUT4, se evaluaron los posibles mecanismos a través de los cuales la testosterona podría promover la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática. Existen dos principales vías de señalización responsables de la translocación de GLUT4 a la membrana: la vía de señalización PI3K/Akt y la vía CaMKII/AMPK. Previamente se ha descrito que la testosterona induce la fosforilación de la proteína Akt, posiblemente por la activación de la proteína PI3K (Altamirano *et al.*, 2009). Lo anterior podría dar cuenta de la activación de un blanco río arriba de la movilización de GLUT4 a la superficie celular. Adicionalmente, la testosterona induce liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático en células musculares y cardiomiocitos (Estrada *et al.*, 2003 y Vicencio *et al.*, 2006). Esto podría dar cuenta de la activación, mediante autofosforilación, de la proteína CaMKII, otro blanco clave en la translocación de GLUT4 a la superficie celular. Sin embargo, no existe evidencia acerca de que esto ocurra en cardiomiocitos como consecuencia del estímulo con testosterona. Para evaluar lo anterior, los cardiomiocitos se estimularon con testosterona durante 5, 15, 30, 60 y 120 min, para posteriormente evaluar mediante *Western blot* el estado de la fosforilación de la proteína CaMKII en su residuo Thr 286 (Figura 7). La testosterona (100 nM) fue capaz de inducir un aumento en la fosforilación de CaMKII en Thr 286, alcanzando un máximo de fosforilación luego de 15 min de estímulo ($p < 0,05$ v/s 0 min).

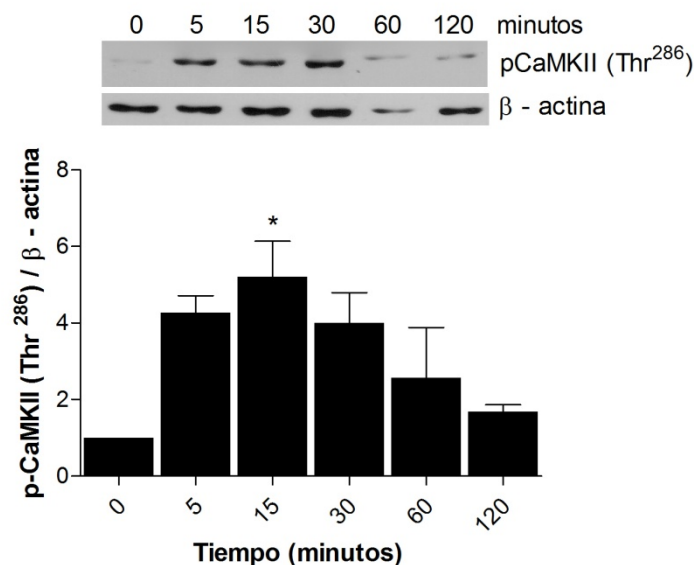


Figura 7. **Determinación de la fosforilación de la proteína CaMKII en su residuo Thr 286 por testosterona.** Los cardiomiocitos se estimularon con testosterona en los tiempos indicados. La detección de la fosforilación de CaMKII en su residuo Thr 286 se realizó mediante *Western blot*. * $p < 0,05$ v/s 0 min. N=4.

Luego de determinar que la testosterona aumenta la fosforilación de la proteína CaMKII, se evaluó la participación de las proteínas quinasas Akt y CaMKII en la captación de la glucosa 2-NBDG por testosterona en cardiomiocitos. Para esto, los cardiomiocitos se pre-trataron con el inhibidor VIII de Akt (10 μ M), el inhibidor de CaMKII, KN-93 (2 μ M) y el análogo de KN-93 sin propiedades inhibitorias, KN92 (2 μ M) por 30 min y luego se estimularon con testosterona (100 nM) por 2 h (Figura 8). El tratamiento con el inhibidor VIII de Akt y testosterona reveló una tendencia a aumentar la captación de la glucosa 2-NBDG con respecto a la condición basal. Sin embargo, no se registraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a la condición basal, ni tampoco con respecto a la estimulación con testosterona (Figura 8 A). El tratamiento con KN-93, en cambio, inhibió completamente el aumento de la incorporación de la glucosa 2-NBDG por testosterona ($p < 0,05$ v/s testosterona) (Figura 8 B). La unión de KN-93 a CaMKII

desplaza la unión del complejo Ca^{2+} /calmodulina de la proteína CaMKII, impidiendo su autofosforilación en Thr 286 y posterior activación. El tratamiento con KN-92 no tuvo efecto en la captación de glucosa inducida por testosterona ($p < 0,01$ v/s basal), sugiriendo que CaMKII participa en el mecanismo de incorporación de glucosa por testosterona en cardiomiocitos.

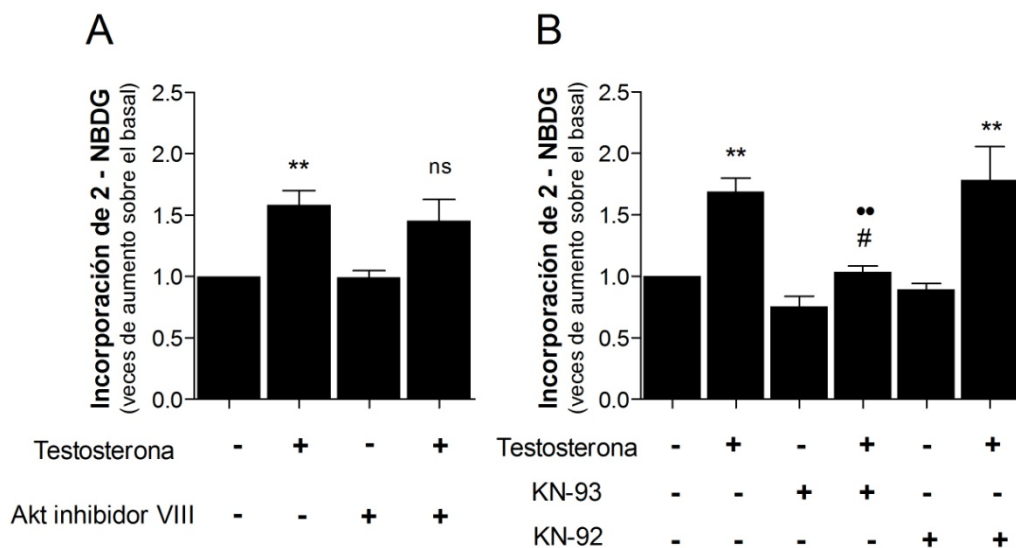


Figura 8. *Participación de Akt y CaMKII en la captación de 2-NBDG por testosterona.* Los cardiomiocitos se pre-trataron con el inhibidor VIII de Akt (10 μ M) (A), KN-93 (2 μ M) y KN-92 (2 μ M) (B) por 30 min y posteriormente se estimularon con testosterona (100 nM) por 2 h. ** $p < 0,01$ v/s basal (no estimulado), # $p < 0,05$ v/s testosterona, •• $p < 0,01$ v/s testosterona + KN-92, ns: no hay diferencia estadística v/s basal ni testosterona. N=3.

11.8. Participación de CaMKII en la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática por testosterona. Considerando que la testosterona aumentó la fosforilación de CaMKII en su residuo de Thr 286 y que CaMKII resultó necesaria para aumentar la captación de glucosa por testosterona, se evaluó la participación de CaMKII en la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática en cardiomiocitos transfectados con el plasmidio GLUT4myc-eGFP. Los cardiomiocitos se pre-trataron con KN-93 (2 μ M) por 30 min y posteriormente se estimularon con testosterona (100 nM) por 2 h (Figura 9). El tratamiento con KN-93 bloqueó la localización del epítipo c-myc en la superficie celular luego del estímulo con testosterona, como muestran las imágenes de microscopía confocal (cortes focales) de la figura 9 A. Adicionalmente, la inhibición de CaMKII con KN-93 bloqueó el aumento de la razón c-myc/eGFP luego de la estimulación con testosterona ($p < 0,01$ v/s testosterona) (Figura 9 B). Lo anterior sugiere que la proteína CaMKII es necesaria para promover la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática por testosterona en cardiomiocitos.

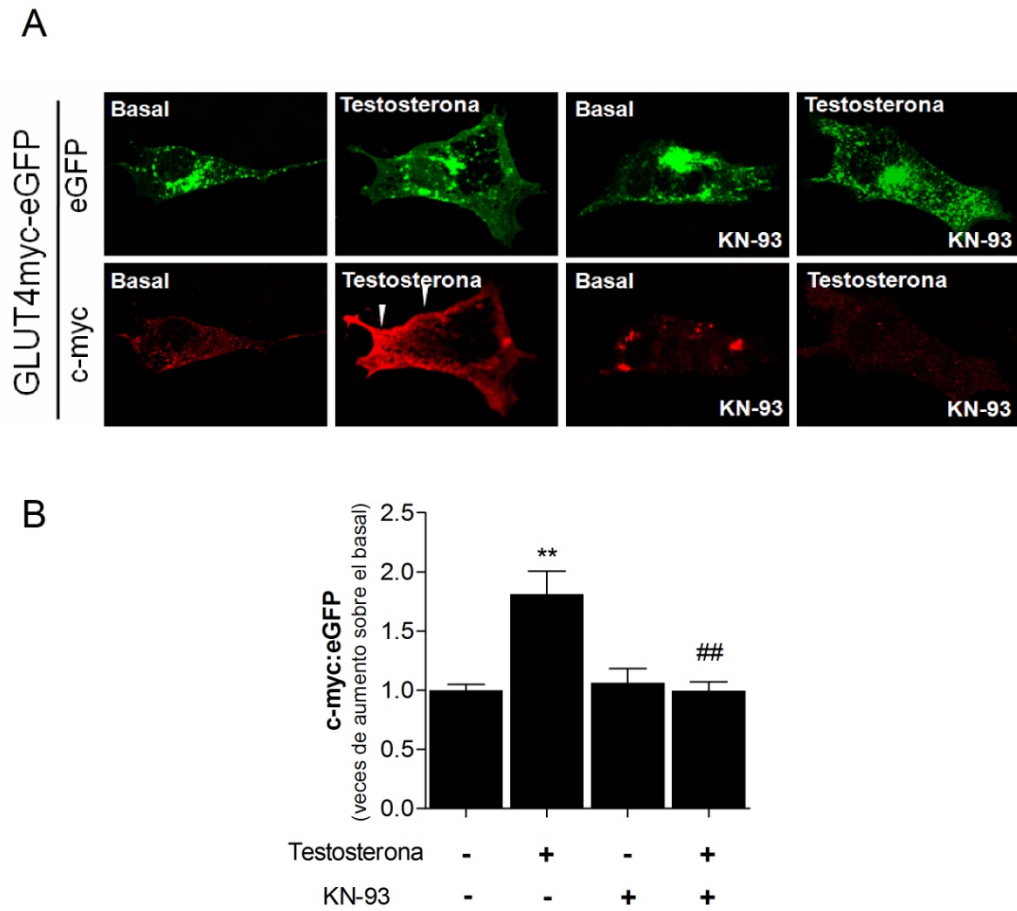


Figura 9. *Participación de CaMKII en la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática por testosterona.* A) Los cardiomiocitos transfectados con el plasmidio GLUT4myc-eGFP se pre-trataron con KN-93 (2 μ M) por 30 min y posteriormente estimularon con testosterona (100 nM) por 2 h. B) Razón c-myc/eGFP luego del estímulo con testosterona (100 nM) por 2 h en cardiomiocitos control y pre-tratados con KN-93 (2 μ M) por 30 min. ** $p < 0,01$ v/s basal (no estimulado), ## $p < 0,01$ v/s testosterona. N=3.

11.9. Efecto de la testosterona y la proteína CaMKII en la fosforilación de la proteína AMPK. La proteína quinasa activada por AMP, AMPK, es el principal sensor energético celular. Entre sus funciones, la proteína AMPK actúa como intermediario entre la activación de la proteína CaMKII y la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática para aumentar la captación de glucosa. Considerando que la proteína CaMKII resulta clave en el mecanismo de captación de glucosa a través de GLUT4 por testosterona en cardiomiocitos, se evaluó la participación de la proteína AMPK como un intermediario entre CaMKII y la captación de glucosa a través de GLUT4 en este modelo de estudio. En primer lugar, se evaluó el estado de fosforilación de la proteína AMPK en su residuo Thr 172 luego de estimular con testosterona (100 nM) durante 60 min (Figura 10). Resultados no publicados del Laboratorio de Endocrinología Celular proponen que la testosterona aumenta la fosforilación de la proteína AMPK en su residuo Thr 172 de manera tiempo – dependiente, alcanzando un máximo luego de 60 min (Wilson *et al.*, 2011, en arbitraje). La fosforilación del residuo Thr 172 representa la activación de AMPK como proteína quinasa (Arad *et al.*, 2007). Adicionalmente, los cardiomiocitos se pre-trataron con KN-93 (2 μ M) por 30 min y luego se estimularon con testosterona (100 nM) por 60 min (Figura 10). El tratamiento con KN-93 bloqueó el aumento de la fosforilación de AMPK por testosterona ($p < 0,001$ v/s testosterona), sugiriendo que es necesaria la activación de CaMKII para la posterior fosforilación – y activación – de la proteína AMPK por testosterona.

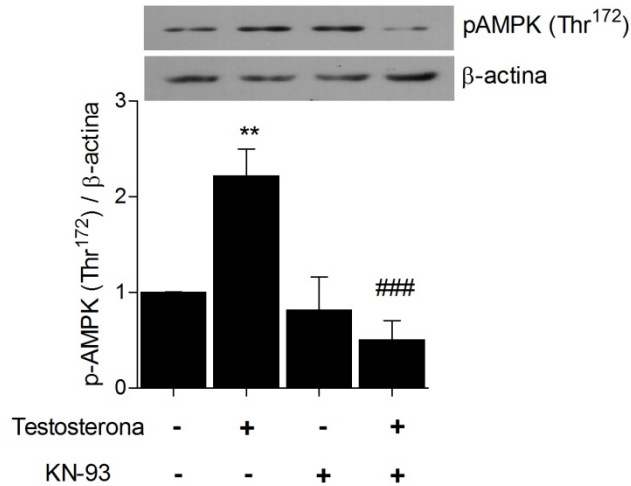


Figura 10. **Efecto de la testosterona y la proteína CaMKII en la fosforilación de la proteína AMPK.** Determinación del nivel de fosforilación de AMPK en su residuo Thr 172 mediante *western blot*, luego de la estimulación con testosterona (100 nM) por 1 h. Adicionalmente, se evaluó el efecto del tratamiento con KN-93 (2 μ M) por 30 min en la fosforilación de AMPK, antes de estimular con testosterona (100 nM) por 1 h. ** $p < 0,01$ v/s basal (no estimulado), ### $p < 0,001$ v/s testosterona. N=3.

11.10. Participación de la proteína AMPK en la captación de la glucosa 2-NBDG por testosterona. Considerando que la proteína AMPK es fosforilada por la acción de la testosterona y que lo anterior depende de la activación de la proteína CaMKII, se evaluó la participación de la proteína AMPK como un intermediario en la captación de la glucosa por testosterona en cardiomiocitos. Para esto, los cardiomiocitos se pre-incubaron con compuesto C (10 μ M) y metformina (5 mM) por 30 min, inhibidor y activador farmacológico de AMPK, respectivamente (Vucicevic *et al.*, 2009, Zhou *et al.*, 2001) (Figura 11). Posteriormente, se estimuló con testosterona (100 nM) por 2 h para evaluar la captación de la glucosa 2-NBDG. El tratamiento con compuesto C bloqueó el aumento de la captación de 2-NBDG por testosterona ($p < 0,01$ v/s testosterona), mientras que con metformina se observó una tendencia a aumentar la captación de la glucosa 2-NBDG en forma basal, así como también se determinó un aumento estadísticamente significativo al

utilizar metformina y testosterona ($p < 0,05$ v/s basal) (Figura 11). Estos resultados sugieren que la captación de glucosa por testosterona también involucra la participación de la proteína AMPK en el mecanismo.

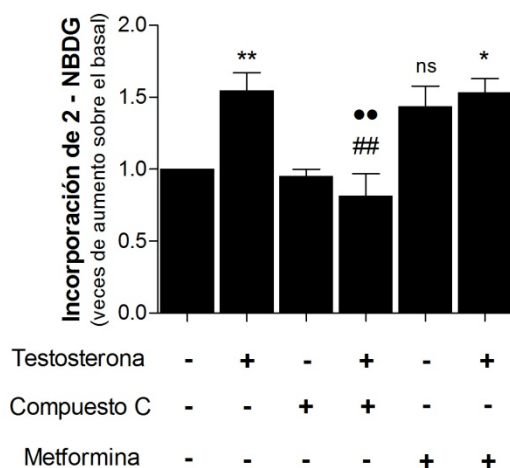


Figura 11. **Participación de la proteína AMPK en la captación de la glucosa 2-NBDG por testosterona.** Para evaluar la participación de AMPK en la captación de la glucosa 2-NBDG por testosterona, los cardiomiocitos se pre-incubaron con compuesto C (10 μ M) y metformina (5 mM) por 30 min y posteriormente se estimularon con testosterona (100 nM) por 2 h. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ v/s basal (no estimulado), ## $p < 0,01$ v/s testosterona, ** $p < 0,01$ v/s testosterona + metformina, ns: no hay diferencia estadística v/s basal ni testosterona. N=3.

11.11. Participación de la proteína AMPK en la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática. Debido a que la proteína AMPK es activada por testosterona y además resulta necesaria para la captación de glucosa por testosterona, se evaluó la participación de AMPK en la translocación del transportador GLUT4 a la membrana plasmática del cardiomiocito. Para esto, se determinó la localización del epítipo c-myc en cardiomiocitos transfectados con el plasmidio GLUT4myc-eGFP. Se pre-incubó el inhibidor de AMPK, compuesto C (10 μ M), por 30 min y posteriormente se realizó la estimulación con testosterona (100 nM) por 2 h, para evaluar la distribución del epítipo c-myc mediante microscopía confocal (Figura 12). El tratamiento con compuesto C bloqueó la migración

del epítipo c-myc hacia la superficie de la célula por testosterona ($p < 0,05$ v/s testosterona) (Figuras 12 A y B) lo cual sugiere que la proteína AMPK también es necesaria para promover la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática por testosterona en cardiomiocitos.

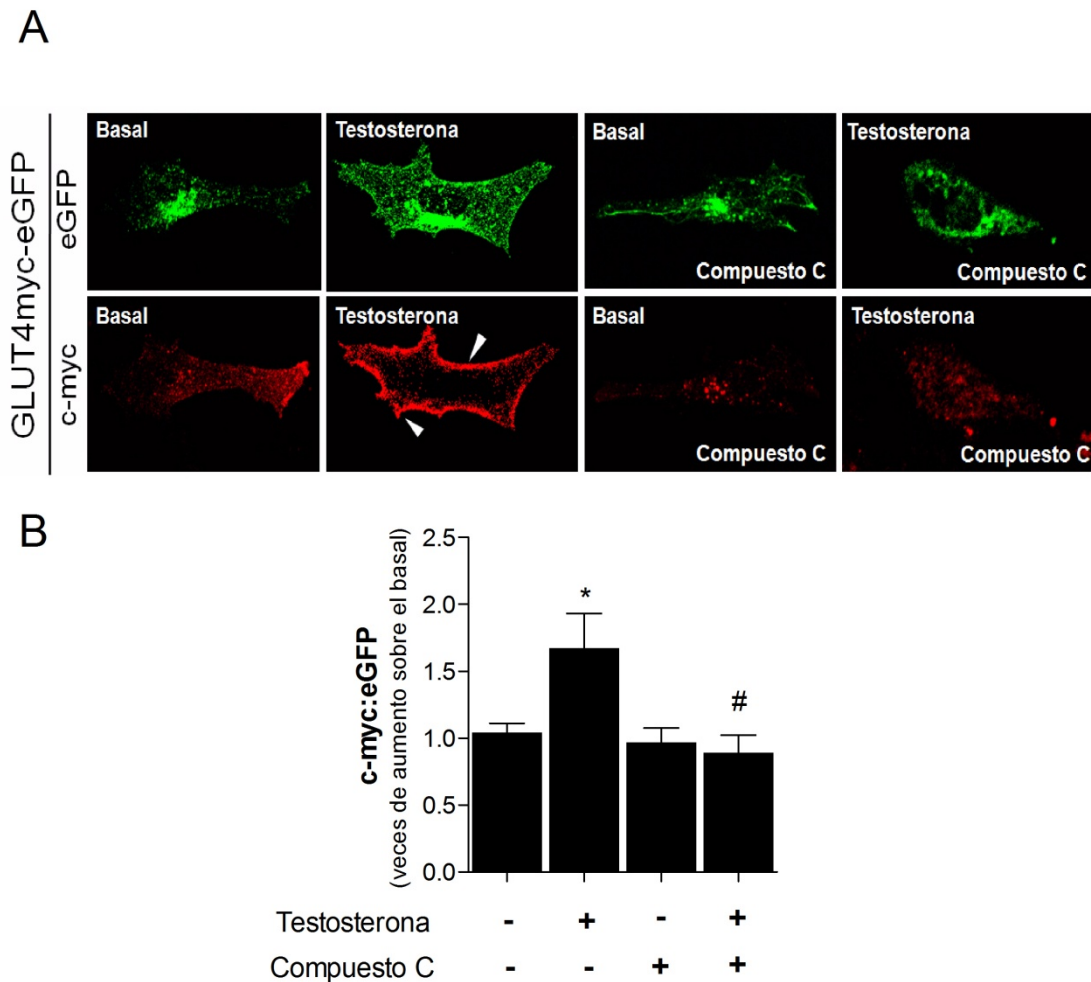


Figura 12. *Participación de la proteína AMPK en la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática.* Se evaluó la localización del epítipo c-myc en cardiomiocitos transfectados con el plasmidio GLUT4myc-eGFP. A) Los cardiomiocitos se pre-trataron con compuesto C (10 μ M) por 30 min y luego se estimularon con testosterona (100 nM) por 2 h. B) Cuantificación relativa del epítipo c-myc en la membrana plasmática por medio de la razón c-myc/eGFP en presencia de compuesto C.. Se alcanzó un 7-10% de transfección del plasmidio. Se analizaron aproximadamente 10 células por cada condición por cultivo celular. * $p < 0,05$ v/s basal (no estimulado), # $p < 0,05$ v/s testosterona. N=3.

12. Discusión

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la testosterona sobre la captación de glucosa a través de GLUT4, por medio de la activación de la vía de señalización celular CaMKII/AMPK en cardiomiocitos.

La testosterona aumentó la captación de la glucosa 2-NBDG y ^3H -2DG, alcanzando un valor máximo luego de 2 h de estímulo. Lo anterior es consistente con recientes investigaciones, donde se postula que la testosterona es capaz de aumentar la incorporación y metabolismo de la glucosa en células de músculo esquelético, tejido adiposo e hígado (Sato *et al.*, 2008, Muthusamy *et al.*, 2009). Paralelamente a estas observaciones, se postula la existencia de una correlación positiva entre niveles de testosterona plasmática anormalmente bajos con el desarrollo de hiperglicemia, resistencia a la insulina y obesidad central (Laughlin *et al.*, 2008, Rubinow *et al.*, 2011). Sin embargo, el suministro de testosterona en dosis fisiológicas, mejora la sensibilidad a insulina y reduce tanto la glicemia como la obesidad, sugiriendo que la testosterona modula el metabolismo de la glucosa *in vivo* (Cook & Ramashkan, 2011), en concordancia con los resultados presentados en el modelo celular de este trabajo.

El tratamiento con ciproterona no bloqueó la captación de glucosa luego de 2 h de estímulo con testosterona. Lo anterior sugiere que la testosterona aumenta la captación de glucosa a través de un mecanismo independiente del receptor intracelular de andrógenos. Los mecanismos que involucran al receptor de andrógenos se asocian al mecanismo genómico de la testosterona. Sin embargo, en este trabajo no es posible descartar que existan mecanismos genómicos involucrados. La independencia del receptor de andrógenos en el mecanismo propuesto puede sugerir la participación de un mecanismo no genómico de la testosterona. No obstante, para verificar lo anterior, es necesario emplear herramientas

que permitan distinguir efectos no genómicos de esta hormona. Un ejemplo de lo anterior es la testosterona conjugada a la proteína albúmina de suero bovino (testosterona-BSA), la cual no es capaz de difundir hacia el medio intracelular (Vicencio *et al.*, 2006). De esta forma, es posible determinar la capacidad de la testosterona de desencadenar efectos celulares rápidos por medio de la interacción con un receptor a nivel de la membrana plasmática, como ha sido descrito para los estrógenos y su receptor acoplado a proteína G, GPR30 (Prossnitz *et al.*, 2011). Interesantemente, investigaciones recientes indican que la delección del receptor GPR30 en ratones hembra induce hiperglicemia y resistencia a la insulina. Estos antecedentes sugieren que este receptor ejercería un control sobre los mecanismos de captación y metabolismo de la glucosa en animales (Martensson *et al.*, 2011).

Adicionalmente, el uso del inhibidor de la enzima aromatasa, anastrozol, no bloqueó la incorporación de la glucosa por testosterona, lo cual sugiere que el efecto observado se debe directamente a la acción de la testosterona y no a su conversión a estradiol.

Al evaluar el nivel de proteína total de los transportadores GLUT1 y GLUT4, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar la población control de cardiomiocitos con la estimulada con testosterona. No obstante, indinavir, bloqueador específico del tráfico de glucosa a través de GLUT4, inhibió la captación de la glucosa 2-NBDG por testosterona. De esta forma, los resultados sugieren que la captación de glucosa por testosterona en cardiomiocitos es mediada por el transportador de glucosa GLUT4 (Murata *et al.*, 2002). La detección del epítipo c-myc en la membrana plasmática en cardiomiocitos transfectados con el plasmidio GLUT4myc-eGFP, proponen que la testosterona es capaz de inducir la translocación del transportador GLUT4 desde el espacio intracelular hacia la membrana plasmática del cardiomiocito. Esto es consistente con

trabajos previos realizados en otros modelos de estudio, donde por medio de fraccionamiento sub-celular, se observa un aumento de la masa del transportador GLUT4 en la fracción correspondiente a la membrana plasmática luego del tratamiento hormonal con testosterona (Sato *et al.*, 2008, Muthusamy *et al.*, 2009).

Interesantemente, es posible observar que la captación de glucosa por testosterona e insulina no se correlaciona directamente con el aumento en la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática por ambos estímulos (Figuras 1 y 6). La figura 1 de este trabajo revela que la testosterona incrementa la captación de glucosa 1,6 veces respecto a la condición basal, mientras que la insulina logra 1,8 veces de aumento. Sin embargo, en la figura 6 se observa que tanto la testosterona como la insulina aumentan la translocación de GLUT4 a la membrana en la misma proporción. Efectivamente, no siempre el aumento de la captación de glucosa se correlaciona con el aumento en la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática. Actualmente se proponen mecanismos que pueden aumentar la actividad intrínseca de este transportador, de forma adicional a la translocación a la membrana plasmática. Por ejemplo, se ha descrito que GLUT4 debe unirse a la enzima gliceraldehído fosfato deshidrogenasa y desplazar al mismo tiempo a la enzima hexoquinasa, evento necesario para alcanzar el máximo en su actividad transportadora (Zaid *et al.*, 2009). Este argumento podría dar cuenta acerca del porqué no hay una correlación exacta entre las captaciones de glucosa y la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática por testosterona e insulina.

La insulina, principal estímulo que promueve la captación de glucosa a través de GLUT4, tarda entre 10-15 min en movilizar el número máximo de transportadores GLUT4 a la superficie celular, para incorporar la glucosa hacia el medio intracelular (Thong *et al.*, 2004). Los resultados de este trabajo indican que la testosterona requiere 2 h para lograr un

máximo en la captación de glucosa, lo cual sucede a través de GLUT4. La diferencia temporal que existe entre la captación de glucosa por la testosterona en comparación a la insulina, puede deberse a que la testosterona utiliza un mecanismo de acción alternativo. El tratamiento con el inhibidor VIII de Akt y testosterona indicó una tendencia a aumentar la captación de la glucosa 2-NBDG (lo que restaría la participación de Akt en el mecanismo). No obstante, no se registraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a la condición basal. Sin embargo, el tratamiento con KN-93, inhibidor de CaMKII, bloqueó completamente el aumento de la captación de glucosa inducida por testosterona, revelando la participación de CaMKII en el mecanismo.

En este trabajo se describe que la testosterona aumenta la fosforilación de CaMKII en su residuo Thr 286. En trabajos previos ha sido demostrado que la testosterona es capaz de producir liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático, lo cual puede constituir un interesante nexo entre las señales de Ca^{2+} inducidas por testosterona y la fosforilación de CaMKII (Estrada *et al.*, 2003, Vicencio *et al.*, 2006).

Como se ha discutido anteriormente, la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática depende de la activación de proteínas quinasas, como Akt, CaMKII y AMPK (Huang & Czech, 2007). AMPK, el principal sensor energético celular, actúa como intermediario entre la activación de la proteína CaMKII por el complejo Ca^{2+} /calmodulina y la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática, generalmente en respuesta a la contracción muscular (Wright *et al.*, 2004). La testosterona provocó el aumento en la fosforilación de AMPK en su residuo Thr 172 tras 60 minutos de estimulación. Adicionalmente, la inhibición de la fosforilación de AMPK por testosterona en presencia de KN-93, sugiere que la testosterona aumenta la fosforilación de AMPK a través de la proteína CaMKII. Lo anterior es consistente con investigaciones previas, donde se

establece que AMPK es un blanco de acción de la proteína CaMKII en otros modelos de estudio (Chan *et al.*, 2004, Hawley *et al.*, 2005). De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, es posible concluir que AMPK es un intermediario entre la activación inicial de CaMKII y la captación de glucosa por testosterona en cardiomiocitos. Adicionalmente, el tratamiento con compuesto C bloqueó la detección del epítotope c-myc en la membrana plasmática en cardiomiocitos transfectados con el plasmidio GLUT4myc-eGFP, sugiriendo que AMPK es necesaria tanto para la captación de glucosa, como para la movilización de GLUT4 a la superficie celular en este modelo de estudio.

Los mecanismos de captación de glucosa dependientes de insulina suelen estar asociados al almacenamiento de este sustrato en forma de glicógeno, principalmente por la activación de la proteína Akt y la consecuente fosforilación e inhibición de la proteína quinasa glicógeno sintasa (GSK, *glycogen synthase kinase*), promoviendo así la síntesis de glicógeno (Embi *et al.*, 1980, Klip, 2009, Harwood *et al.*, 2011). Sin embargo, el eje de señalización CaMKII/AMPK, activado clásicamente por la contracción muscular, promueve la captación de glucosa para su consumo inmediato, destinado a la producción de ATP. Esto es necesario para la mantención de la actividad contráctil del músculo, lo cual puede representar un escenario de desbalance o estrés energético (Klip, 2009).

Independientemente de los mecanismos responsables de la captación de glucosa por testosterona, cabe preguntar qué ventajas otorga el uso de glucosa en cardiomiocitos en un contexto de desarrollo de crecimiento hipertrófico. En primer lugar, la glucosa incorporada puede destinarse a la producción de energía (ATP), necesaria para el crecimiento hipertrófico y la contractilidad celular (Scolleta & Biagioli, 2009). En segundo lugar, la glucosa incorporada puede destinarse como el sustrato inicial de la vía de las pentosas, ruta metabólica clave para la restitución de los niveles celulares de NADPH, necesario para la

biosíntesis reductora de esqueletos carbonados, necesarios a su vez para el crecimiento celular y otros procesos anabólicos (Mayes & Bender, 2003). Para abordar estas preguntas, es necesario realizar aproximaciones experimentales que permitan determinar si la glucosa incorporada por la testosterona es metabolizada en el cardiomiocito con fines energéticos (producción de ATP) o bien, es necesaria para la síntesis de componentes celulares, como ácidos grasos, aminoácidos y proteínas.

Si bien el estudio de la captación de glucosa en cardiomiocitos hipertrofiados por testosterona no estuvo contemplado en la planificación de este trabajo, se realizó una breve aproximación experimental para determinar si en este contexto celular la captación de glucosa se encuentra aumentada (Figuras 13, 14 y 15, ver sección *Anexos*). La figura 13 indica que la captación de glucosa también aumenta en el cardiomiocito hipertrofiado por testosterona (12-24 h de estímulo con este andrógeno). Lo anterior sugiere que tanto en el desarrollo de la hipertrofia, como en su consolidación, el cardiomiocito demanda un mayor consumo de glucosa. Sin embargo, se observó que el tratamiento con ciproterona bloqueó la captación de glucosa por testosterona luego de 24 h de estímulo (Figura 14). Este resultado revela la posible participación del receptor de andrógenos en la captación de glucosa en cardiomiocitos hipertrofiados. Sin embargo, no es posible distinguir si este efecto se debió a la inhibición del desarrollo de hipertrofia (a causa del bloqueo del receptor, Marsh *et al.*, 1998), o bien, a la inhibición de posibles mecanismos genómicos (asociados al receptor) necesarios para la captación de glucosa.

El tratamiento prolongado con testosterona e indinavir previno el aumento del área del cardiomiocito por testosterona, como indica la figura 15. Como se ha descrito anteriormente, el uso de indinavir, en la concentración utilizada en este trabajo (100 μ M), bloquea el transporte de glucosa específicamente a través de GLUT4. La inhibición del

aumento del área del cardiomiocito por testosterona sugiere que la captación de glucosa a través de GLUT4 en cardiomiocitos es necesaria para el desarrollo de hipertrofia inducida por testosterona. Sin embargo, es necesario realizar la medición de otros parámetros de hipertrofia cardíaca que refuercen esta observación, como la re-expresión de genes fetales y el aumento de la síntesis de proteínas, entre otros.

En conclusión, el desarrollo de este trabajo propone un mecanismo de captación de glucosa por testosterona a través de GLUT4 y la activación de la vía de señalización celular CaMKII/AMPK en cardiomiocitos. Lo anterior constituye la primera evidencia sobre los efectos metabólicos de la testosterona en células cardíacas. Estos hallazgos pueden representar un mecanismo de incorporación de glucosa alternativo, destinado a la producción de energía celular, necesaria para la mantención del metabolismo basal, contracción, síntesis proteica, crecimiento hipertrófico y otros procesos anabólicos del músculo cardíaco. Resulta necesario complementar los resultados presentados en este trabajo con futuras investigaciones que permitan establecer si los efectos de la testosterona observados son necesarios para la salud y mantención de los cardiomiocitos, o bien, son parte del desarrollo de un proceso patológico que afecta al músculo cardíaco.

13. Proyecciones

A partir de las conclusiones de este trabajo, es posible destacar que la testosterona, además de controlar funciones anabólicas y androgénicas, es un regulador hormonal de la incorporación de la glucosa en cardiomiocitos. El suministro de testosterona en individuos que sufren trastornos metabólicos, como obesidad, resistencia a la insulina y diabetes, así como falla cardíaca, ha resultado positivo en la prognosis de estas enfermedades. Sin embargo, el uso de este andrógeno despierta incertidumbres en cuanto a los efectos secundarios que puede generar, como es el caso de hipertrofia cardíaca, cáncer de próstata, entre otros. Por lo tanto, es clave desarrollar investigaciones que permitan determinar, en primer lugar, los efectos del suministro de testosterona con respecto a la captación de glucosa *in vivo*, así como también los efectos adversos de la terapia hormonal. Resulta necesario identificar la concentración de testosterona a utilizar, así como las formas de suministro y las posibles consecuencias que esto puede significar para el organismo.

14. Referencias

1. Abbott MJ, Edelman AM, Turcotte LP. 2009. CaMKK is an upstream signal of AMP-activated protein kinase in regulation of substrate metabolism in contracting skeletal muscle. *Am J Physiol* 297:R1724-32.
2. Altamirano F, Oyarce C, Silva P, Toyos M, Wilson C, Lavandero S, Uhlén P, Estrada M. 2009. Testosterone induces cardiomyocyte hypertrophy through mammalian target of rapamycin complex 1 pathway. *J Endocrinol* 202:299-307.
3. Antonescu CN, Randhawa VK, Klip A. 2008. Dissecting GLUT4 traffic components in L6 myocytes by fluorescence-based, single-cell assays. *Methods Mol Biol.* 457:367-78.
4. Arad M, Seidman CE, Seidman JG 2007. AMP-activated protein kinase in the heart: role during health and disease. *Circ Res* 100:474-88.
5. Barros LF, Bittner CX, Loaiza A, Ruminot I, Larenas V, Moldenhauer H, Oyarzún C, Alvarez M. 2009. Kinetic validation of 6-NBDG as a probe for the glucose transporter GLUT1 in astrocytes. *J Neurochem.* 109 Suppl 1:94-100.
6. Chan AY, Soltys CL, Young ME, Proud CG, Dyck JR 2004. Activation of AMP activated protein kinase inhibits protein synthesis associated with hypertrophy in the cardiac myocyte. *The Journal of Biological Chemistry* 279:32771-9.
7. Chen S, Wasserman DH, MacKintosh C, Sakamoto K. 2011. Mice with AS160/TBC1D4-Thr649Ala knockin mutation are glucose intolerant with reduced insulin sensitivity and altered GLUT4 trafficking. *Cell Metab* 13:68-79.
8. Contreras-Ferrat AE, Toro B, Bravo R, Parra V, Vásquez C, Ibarra C, Mears D, Chiong M, Jaimovich E, Klip A, Lavandero S. 2010. An inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃)-IP₃ receptor pathway is required for insulin-stimulated glucose transporter 4 translocation and glucose uptake in cardiomyocytes. *Endocrinology* 151:4665-77.
9. Cook NL, Romashkan S. 2011. Why do we need a trial on the effects of testosterone therapy in older men? *Clin Pharmacol Ther.* 89:29-31.
10. De Koninck P, Schulman H. 1998. Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca²⁺ oscillations. *Science* 279:227-30.
11. Deshmukh A, Coffey VG, Zhong Z, Chibalin AV, Hawley JA, Zierath JR. 2006. Exercise-induced phosphorylation of the novel Akt substrates AS160 and filamin A in human skeletal muscle. *Diabetes* 55:1776-82.
12. Dugani CB, Klip A. 2005. Glucose transporter 4: cycling, compartments and controversies. *EMBO Rep.* 6:1137-42.
13. Embi N, Rylatt DB, Cohen P. 1980. Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *European journal of biochemistry / FEBS Lett* 107:519-27.
14. Estrada M, Espinosa A, Müller M, Jaimovich E. 2003. Testosterone stimulates intracellular calcium release and mitogen-activated protein kinases via a G protein-coupled receptor in skeletal muscle cells. *Endocrinology* 144: 3586-97.
15. Estrada M, Uhlén P, Ehrlich BE. 2006. Ca²⁺ oscillations induced by testosterone enhance neurite outgrowth. *J Cell Sci* 119: 733-43.

16. Frey N, Katus HA, Olson EN, Hill JA. 2004. Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation* 109:1580-9.
17. Hardie DG. 2005 Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell metab* 2:9-19.
18. Harwood AJ. 2001. Regulation of GSK-3: a cellular multiprocessor. *Cell* 105:821-4.
19. Hawley SA, Pan DA, Mustard KJ, Ross L, Bain J, Edelman AM, Frenguelli BG Hardie DG. 2005. Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell metab* 2:9-19.
20. Hoffman NJ, Elmendorf JS 2011. Signaling, cytoskeletal and membrane mechanisms regulating GLUT4 exocytosis. *Trends Endocrinol Metab* 22:110-6.
21. Huang S, Czech MP. 2007. The GLUT4 glucose transporter. *Cell Metab* 5:237-52.
22. Ishikura S, Antonescu CN, Klip A. 2010. Documenting GLUT4 exocytosis and endocytosis in muscle cell monolayers. *Curr Protoc Cell Biol*. Chapter 15: Unit 15.15.
23. Jensen TE, Rose AJ, Jørgensen SB, Brandt N, Schjerling P, Wojtaszewski JF, Richter EA. 2007. Possible CaMKK-dependent regulation of AMPK phosphorylation and glucose uptake at the onset of mild tetanic skeletal muscle contraction. *Am J Physiol* 292:E1308-17.
24. Jeong SM, Ham BK, Park MG, Oh MM, Yoon DK, Kim JJ, Moon du G. 2011. Effect of testosterone replacement treatment in testosterone deficiency syndrome patients with metabolic syndrome. *Korean J Urol*. 52:566-71.
25. Kalinchenko SY, Tishova YA, Mskhalaya GJ, Gooren LJ, Giltay EJ, Saad F. 2010. Effects of testosterone supplementation on markers of the metabolic syndrome and inflammation in hypogonadal men with the metabolic syndrome: the double-blinded placebo-controlled Moscow study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 73:602-12.
26. Klip A. 2009. The many ways to regulate glucose transporter 4. *Appl Physiol Nutr Metab*. 34:481-7.
27. Klip A, Schertzer JD, Bilan PJ, Thong F, Antonescu C. 2009. Regulation of glucose transporter 4 traffic by energy deprivation from mitochondrial compromise. *Acta Physiol (Oxf)* 196:27-35.
28. Koumanov F, Richardson JD, Murrow BA, Holman GD. 2011. AS160 phosphotyrosine-binding domain constructs inhibit insulin-stimulated GLUT4 vesicle fusion with the plasma membrane. *J Biol Chem*. 286:16574-82.
29. Kramer HF, Witczak CA, Taylor EB, Fujii N, Hirshman MF, Goodyear L. 2006. AS160 regulates insulin- and contraction-stimulated glucose uptake in mouse skeletal muscle. *J Biol Chem* 281:31478-85.
30. Laughlin GA, Barrett-Connor E, Bergstrom J. 2008. Low serum testosterone and mortality in older men. *J Clin Endocrinol Metab* 93:68-75.
31. Maher F, Vannucci SJ, Simpson IA. 1994. Glucose transporter proteins in brain. *FASEB J* 8:1003-11.
32. Marsh JD, Lehmann MH, Ritchie RH, Gwathmey JK, Green GE, Schiebinger RJ. 1998. Androgen receptors mediate hypertrophy in cardiac myocytes. *Circulation* 98:256-61.
33. Mårtensson UE, Salehi SA, Windahl S, Gomez MF, Swärd K, Daszkiewicz-Nilsson J, Wendt A, Andersson N, Hellstrand P, Grände PO, Owman C, Rosen CJ, Adamo ML, Lundquist I, Rorsman P, Nilsson BO, Ohlsson C, Olde B, Leeb-Lundberg LM. 2009. Deletion of the G protein-coupled receptor 30

- impairs glucose tolerance, reduces bone growth, increases blood pressure, and eliminates estradiol-stimulated insulin release in female mice. *Endocrinology* 150:687-98.
34. Mayes P, Bender D. The pentose phosphate pathway and other pathways of hexose metabolism in Harper's Illustrated Biochemistry. 26th edition, USA: McGraw Hill-Medical, 2003. ISBN 0-07-138901-6.
 35. Michel G, Baulieu EE. 1980. Androgen receptor in rat skeletal muscle: characterization and physiological variations. *Endocrinology* 107:2088-98.
 36. Miller SG, Patton BL, Kennedy MB. 1988. Sequences of autophosphorylation sites in neuronal type II CaM kinase that control Ca²⁺-independent activity. *Neuron* 1:593-604.
 37. Miranda N, Tovar AR, Palacios B, Torres N. 2007. AMPK as a cellular energy sensor and its function in the organism]. *Rev Invest Clin.* 59:458-69.
 38. Mueckler, M. 1994. Facilitative glucose transporters. *Eur. J. Biochem.* 219: 713-25.
 39. Mukherjee TK, Dinh H, Chaudhuri G, Nathan L. 2002. Testosterone attenuates expression of vascular cell adhesion molecule-1 by conversion to estradiol by aromatase in endothelial cells: implications in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:4055-60.
 40. Murata H, Hruz PW, Mueckler M. 2002. Indinavir inhibits the glucose transporter isoform Glut4 at physiologic concentrations. *AIDS* 16:859-63.
 41. Muthusamy T, Murugesan P, Balasubramanian K. 2009. Sex steroids deficiency impairs glucose transporter 4 expression and its translocation through defective Akt phosphorylation in target tissues of adult male rat. *Metabolism* 58:1581-92.
 42. Parekh AB. 2011. Decoding cytosolic Ca²⁺ oscillations. *Trends Biochem Sci* 36:78-87.
 43. Prossnitz ER, Barton M. 2011. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* doi: 10.1038/nrendo.2011.122.
 44. Rubinow K, Snyder C, Amory J, Hoofnagle A, Page S. 2011. Acute testosterone deprivation reduces insulin sensitivity in men. *Clin Endocrinol (Oxf)* doi: 10.1111/j.1365-2265.2011.04189.x.
 45. Sato K, Iemitsu M, Aizawa K, Ajisaka R. 2008. Testosterone and DHEA activate the glucose metabolism-related signaling pathway in skeletal muscle. *Am J Physiol* 294:E961-8.
 46. Scolletta S, Biagioli B. 2009. Energetic myocardial metabolism and oxidative stress: let's make them our friends in the fight against heart failure. *Biomed Pharmacother* 64:203-7.
 47. Simental JA, Sar M, Lane MV, French FS, Wilson EM. 1991. Transcriptional activation and nuclear targeting signals of the human androgen receptor. *J Biol Chem* 266:510-8.
 48. Slot JW, Geuze HJ, Gigengack S, James DE, Lienhard GE. 1991. Translocation of the glucose transporter GLUT4 in cardiac myocytes of the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7815-9.
 49. Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD 2005. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev* 85:1093-129.
 50. Sullivan ML, Martinez CM, Gennis P, Gallagher EJ. 1998. The cardiac toxicity of anabolic steroids. *Prog Cardiovasc Dis* 41: 1-15.
 51. Thong FS, Dugani CB, Klip A. 2005. Turning signals on and off: GLUT4 traffic in the insulin-signaling highway. *Physiology (Bethesda)* 20:271-84.

52. Vicencio JM, Ibarra C, Estrada M, Chiong M, Soto D, Parra V, Diaz-Araya G, Jaimovich E, Lavandero S. 2006. Testosterone induces an intracellular calcium increase by a nongenomic mechanism in cultured rat cardiac myocytes. *Endocrinology* 147:1386-95.
53. Vucicevic L, Misirkic M, Janjetovic K, Harhaji-Trajkovic L, Prica M, Stevanovic D, Isenovic E, Sudar E, Sumarac-Dumanovic M, Micic D, Trajkovic V. 2009. AMP-activated protein kinase-dependent and -independent mechanisms underlying in vitro antiglioma action of compound C. *Biochem Pharmacol.* 2009 77:1684-93.
54. Wayman GA, Tokumitsu H, Davare MA, Soderling TR. 2011. Analysis of CaM-kinase signaling in cells. *Cell Calcium* 50:1-8.
55. Wright DC, Hucker KA, Holloszy JO, Han DH. 2004. Ca²⁺ and AMPK both mediate stimulation of glucose transport by muscle contractions. *Diabetes* 53:330-5.
56. Zaid H, Talior-Volodarsky I, Antonescu C, Liu Z, Klip A. 2009. GAPDH binds GLUT4 reciprocally to hexokinase-II and regulates glucose transport activity. *Biochem J* 419:475-84.
57. Zhang T, Brown JH. 2004. Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res* 63:476-86.
58. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE. 2001. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 108:1167-74.
59. Zorzano A, Sevilla L, Camps M, Becker C, Meyer J, Kammermeier H, Muñoz P, Gumà A, Testar X, Palacín M, Blasi J, Fischer Y. 1997. Regulation of glucose transport, and glucose transporters expression and trafficking in the heart: studies in cardiac myocytes. *Am J Cardiol* 80:65A-76A.

15. Anexos

15.1. Captación de la glucosa 2-NBDG en cardiomiocitos estimulados de forma prolongada con testosterona. Los resultados presentados proponen que la testosterona es capaz de producir un aumento en la captación de glucosa en un intervalo de tiempo de 2 h. Debido a que la testosterona induce hipertrofia del cardiomiocito, se evaluó la captación de la glucosa 2-NBDG en cardiomiocitos estimulados con testosterona por 12 y 24 h (Figura 13). Como se ha descrito con anterioridad, luego 12 y 24 h de estímulo con testosterona se produce la hipertrofia del cardiomiocito, determinada por el aumento de la expresión de marcadores moleculares de hipertrofia cardíaca, como β -MHC y SKA, aumento del área celular y aumento en la síntesis de proteínas (Altamirano *et al.*, 2009). La estimulación con testosterona (100 nM) durante 12 y 24 h aumentó la captación de la glucosa 2-NBDG ($p < 0,001$ v/s basal), sugiriendo que en cardiomiocitos hipertrofiados, la incorporación de glucosa se encuentra aumentada.

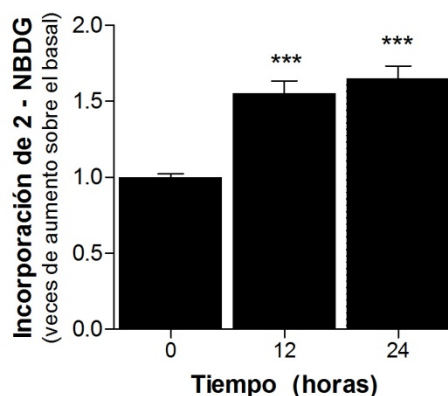


Figura 13. **Captación de la glucosa 2-NBDG en cardiomiocitos estimulados de forma prolongada con testosterona.** Los cardiomiocitos se estimularon con testosterona (100 nM) por 12 y 24 h y se evaluó la incorporación de la glucosa 2-NBDG. *** $p < 0,001$ v/s basal (no estimulado). N=3.

15.2. Participación del receptor para andrógenos en la captación de la glucosa 2-NBDG por testosterona en cardiomiocitos hipertrofiados. Los efectos genómicos de la testosterona, mediados por su unión al receptor de andrógenos, suelen suceder luego de tiempos prolongados, en el intervalo de tiempo de horas y días. Ya que la captación de 2-NBDG se encontró aumentada luego de 12 y 24 h de estímulo, se evaluó la participación del receptor para andrógeno, como un posible intermediario del efecto observado en la figura 13. Los cardiomiocitos se pre-trataron con ciproterona (1 μ M) y posteriormente se estimularon con testosterona (100 nM) por 24 h. Luego, se incubó la glucosa 2-NBDG para evaluar la captación en cardiomiocitos (Figura 14). El tratamiento con ciproterona previno el aumento de la captación de 2-NBDG por testosterona ($p < 0,05$ v/s testosterona), sugiriendo la participación del receptor de andrógenos luego de la estimulación prolongada con este andrógeno.

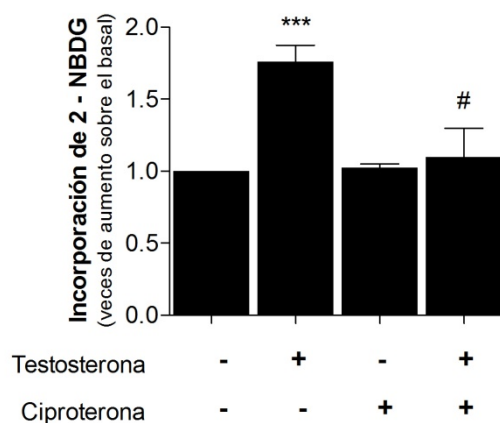


Figura 14. *Participación del receptor para andrógenos en la captación de la glucosa 2-NBDG por testosterona en cardiomiocitos hipertrofiados.* Los cardiomiocitos se estimularon con testosterona (100 nM) por 24 h para evaluar la captación de la glucosa 2-NBDG. Se pre-incubó con ciproterona (1 μ M) durante 30 min antes del estímulo con testosterona. *** $p < 0,001$ v/s basal (no estimulado), # $p < 0,05$. N=3.

15.3. Efecto del tratamiento con indinavir en el desarrollo de hipertrofia del cardiomiocito por testosterona. Las figuras 13 y 14 sugieren que en el contexto de un cardiomiocito hipertrofiado por la estimulación prolongada con testosterona, la captación de glucosa se encuentra aumentada. Debido a estas observaciones, se evaluó el rol funcional del incremento en la captación de glucosa en el cardiomiocito hipertrofico. Para esto, se incubó indinavir (100 μ M) por 48 h para bloquear la captación de glucosa a través de GLUT4, como ha sido descrito anteriormente (Murata *et al.*, 2002). Adicionalmente, se estimuló con testosterona (100 nM) por el mismo período de tiempo y luego se midió el área celular del cardiomiocito mediante microscopía confocal (Figura 15). Este es un parámetro morfológico de la hipertrofia del cardiomiocito. La testosterona aumentó el área celular luego de 48 h de estímulo ($p < 0,01$ v/s basal), como se ha descrito anteriormente (Altamirano *et al.*, 2009). Sin embargo, el tratamiento con indinavir bloqueó el aumento del área celular por testosterona ($p < 0,01$ v/s testosterona).

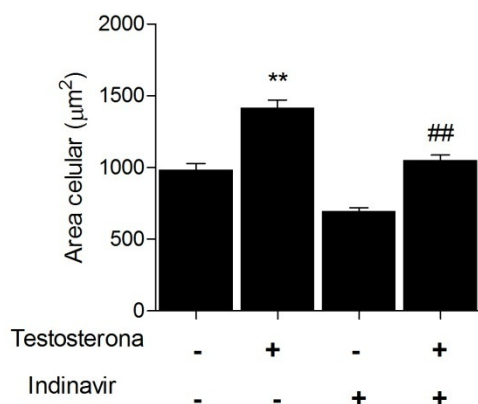
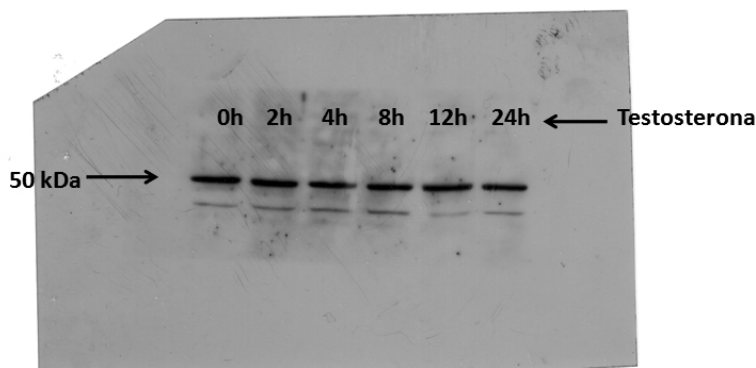


Figura 15. **Efecto del tratamiento con indinavir en el desarrollo de hipertrofia del cardiomiocito por testosterona.** Los cardiomiocitos se co-incubaron con testosterona (100 nM) e indinavir (100 μ M) por 48 h. ** $p < 0,01$ v/s basal (no estimulado), ## $p < 0,01$ v/s testosterona. N=3.

15.4. Película fotosensible completa de la detección de GLUT4 mediante Western blot en cardiomiocitos.



15.5. Estandarización de la técnica de incorporación de la glucosa 2-NBDG en cardiomiocitos de rata neonata.

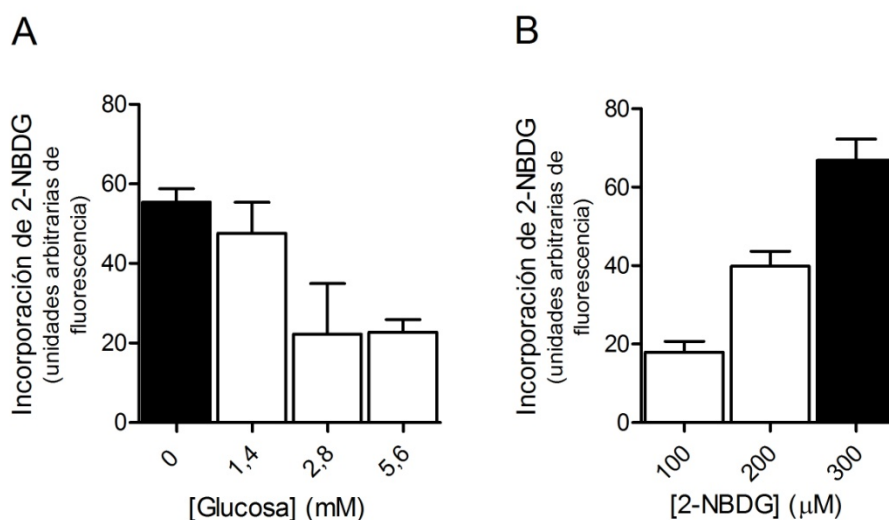


Figura 16. *Estandarización de la incorporación de la glucosa 2-NBDG por medio de microscopía de epifluorescencia en cardiomiocitos de rata neonata.* Incorporación de glucosa 2-NBDG en condiciones basales (no estimuladas). A) Como se indica en la sección materiales y métodos, los cardiomiocitos fueron privados de glucosa (0 mM) en medio Krebs por 15 min antes de la incorporación de la glucosa 2-NBDG. En A se indica el efecto de distintas concentraciones de glucosa utilizada en esta etapa. Se observó un máximo en la incorporación de glucosa 2-NBDG cuando se removió completamente la glucosa del medio Krebs. B) Titulación de la concentración de la glucosa 2-NBDG utilizada. Se observó un máximo en la captación cuando se utilizó la concentración 300 μM. En negro se destacan las condiciones utilizadas en este trabajo. N = 1.