



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**IGF-1 INHIBE *IN VITRO* E *IN VIVO* LA AUTOFAGIA  
CARDIACA INDUCIDA POR ESTRÉS  
NUTRICIONAL**

**Tesis entregada a la Universidad de Chile para optar al  
grado de Doctor en Bioquímica**

**POR**

**RODRIGO HERNÁN TRONCOSO COTAL**

**DIRECTOR DE TESIS**

**Dr. Sergio Lavandero González**

**SANTIAGO-CHILE**

**2009**

A mí hijo Lucas

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi tutor el Dr. Sergio Lavandero, por su confianza, buena onda y perseverancia en enderezar mi camino. Gracias por las oportunidades.

A mis Padres por el apoyo incondicional y Andrea por querer caminar junto a mí.

A Guillermo y Mario por el soporte, la simpatía y enseñanzas.

A mis amigos, sin nombres ni orden, los buenos momentos, todo el apoyo y buena onda; gracias por tantas idas a la catedral. A los que ya no están, fueron parte y se les recuerda con cariño. A la piscola; por no fallar nunca.

A los compañeros del Lab por aguantarme a mí y a mi desorden; a los eventos, las comidas, las risas, las burlas y a los nuevos que me ayudaron a desarrollar mi lado más perverso.

A Fidel por la ayuda, el buen humor y ser un grande.

Al Dr. LeRoith por la gran estadía y a Yuki por su gran ayuda.

Y a todos los que tuvieron parte en esta formación, espero haber aprendido de todos.

## TABLA DE CONTENIDOS

|  | Página |
|--|--------|
| TABLA DE CONTENIDOS.....   | 4      |
| INDICE DE FIGURAS.....   | 7      |
| ABREVIATURAS.....  | 9      |
| RESUMEN.....   | 13     |
| SUMMARY.....   | 16     |
| <br>   |        |
| 1. INTRODUCCIÓN.....   | 19     |
| 1.1. Metabolismo.....  | 19     |
| 1.2. Estrés nutricional.....   | 20     |
| 1.3. Corazón.....  | 22     |
| 1.4. Autofagia.....  | 24     |
| 1.5. Tipos de autofagia.....   | 24     |
| 1.6. Formación de la vacuola.....  | 26     |
| 1.7. Regulación de la autofagia.....   | 28     |
| 1.8. Autofagia como muerte celular programada.....                               | 30     |
| 1.9. Autofagia y patologías cardiovasculares.....                                | 33     |
| 1.10. Factor de crecimiento análogo a insulina tipo-1 (IGF-1).....               | 35     |
| 1.11. Vías transduccionales activadas por IGF-1.....                             | 36     |
| 1.12. IGF-1 en la comunicación endocrina, autocrina y paracrina del corazón..... | 37     |
| 1.13. IGF-1 en la regulación de la muerte del miocardio.....                     | 38     |
| 1.14. IGF-1 y autofagia.....   | 40     |
| <br>   |        |
| 2. HIPOTESIS.....  | 42     |
| <br>   |        |
| 3. OBJETIVO GENERAL.....   | 42     |
| <br>   |        |
| 4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....  | 42     |
| <br>   |        |
| 5. DISEÑOS EXPERIMENTALES.....   | 43     |
| <br>   |        |
| 6. MATERIALES Y MÉTODOS.....   | 45     |
| 6.1. Materiales.....   | 45     |
| 6.2. Cultivo primario de cardiomiocitos de ratas neonatas.....                   | 45     |
| 6.2.1. Material biológico.....   | 45     |
| 6.2.2. Aislamiento y cultivo de cardiomiocitos de ratas neonatas.....            | 46     |
| 6.2.3. Modelo animal.....  | 47     |
| 6.3. Estrés nutricional.....   | 47     |
| 6.4. Preparación de extractos de proteínas totales.....                          | 49     |
| 6.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida.....                              | 50     |
| 6.6. Electrotransferencia de proteínas.....                                      | 50     |

|   |            |
|---|------------|
| 6.7. Western blot .....   | 50         |
| 6.8. Determinación del contenido intracelular de ATP.....   | 51         |
| 6.9. Determinación de potencial mitocondrial.....   | 51         |
| 6.10. Ensayo de actividad reductasa MTT .....   | 52         |
| 6.11. Ensayos de viabilidad celular y de población sub-G1 .....   | 52         |
| 6.12. Tratamiento adenoviral.....   | 52         |
| 6.13. Cuantificación de autofagia .....   | 53         |
| 6.14. Microscopia de fluorescencia .....  | 53         |
| 6.15. Determinación de tejido graso y muscular total.....   | 54         |
| 6.16. Determinación de glucosa, insulina y ácidos grasos libres.....  | 54         |
| 6.17. Representación de datos y análisis estadístico.....   | 54         |
| <b>7. RESULTADOS.....</b>   | <b>55</b>  |
| 7.1. Estudiar <i>in vitro</i> si la vía transduccional proteína kinasa B/mTOR es activada por IGF-1 en cardiomiocitos expuestos a estrés nutricional ..     | 55         |
| 7.2. Investigar <i>in vitro</i> el efecto del IGF-1 en el metabolismo y viabilidad del cardiomiocito expuesto a estrés nutricional.....                     | 60         |
| 7.2.1. Efecto del IGF-1 en metabolismo celular .....  | 60         |
| 7.2.2. Efecto del IGF-1 en la muerte del cardiomiocito inducida por estrés nutricional .....  | 65         |
| 7.3. Determinar <i>in vitro</i> si el IGF-1 regula negativamente la autofagia inducida por estrés nutricional.....  | 68         |
| 7.3.1. Estudiar <i>in vitro</i> si el estrés nutricional inducido por privación suero/glucosa o suero/aminoácidos induce autofagia en el cardiomiocito..... | 68         |
| 7.3.2. Efecto del IGF-1 en la autofagia inducida por estrés nutricional   | 70         |
| 7.4. Estudio <i>in vivo</i> del papel del IGF-1 en la autofagia inducida por privación de nutrientes .....  | 79         |
| 7.4.1. Características ratón transgénico LID .....  | 79         |
| 7.4.2. Estrés nutricional.....  | 79         |
| 7.4.3. Efecto <i>in vivo</i> del ayuno en la inducción de la autofagia .....  | 84         |
| <b>8. DISCUSIÓN.....</b>  | <b>90</b>  |
| 8.1. IGF-1 y vías transduccionales asociadas a la regulación del metabolismo energético .....   | 93         |
| 8.2. IGF-1 y metabolismo energético .....   | 96         |
| 8.3. IGF-1 y muerte celular.....  | 98         |
| 8.4. IGF-1 y autofagia.....   | 100        |
| 8.5. Papel de IGF-1 en la autofagia <i>in vivo</i> .....  | 106        |
| <b>9. CONCLUSIONES .....</b>  | <b>109</b> |

10. BIBLIOGRAFÍA ..... 110

## INDICE DE FIGURAS

|   | Página |
|---|--------|
| Figura 1. Diferentes tipos de autofagia .....   | 25     |
| Figura 2. Etapas del proceso de formación del autolisosoma.....   | 27     |
| Figura 3. Regulación de la autofagia .....  | 30     |
| Figura 4. Diferencias morfológicas y bioquímicas entre apoptosis y necrosis ..  | 31     |
| Figura 5. Vías transduccionales activadas por IGF-1 en el cardiomiocitos.....   | 36     |
| Figura 6. Vías transduccionales activadas por IGF-1 en cardiomiocitos<br>expuestos a estrés nutricional por privación de suero y glucosa .....                                  | 56     |
| Figura 7. Cuantificación de las vías transduccionales activadas por IGF-1 en<br>cardiomiocitos expuestos a estrés nutricional por privación de suero y<br>glucosa.....          | 57     |
| Figura 8. Vías transduccionales activadas por IGF-1 en cardiomiocitos<br>expuestos a estrés nutricional por privación de suero y aminoácidos<br>.....                           | 58     |
| Figura 9. Cuantificación de las vías transduccionales activadas por IGF-1 en<br>cardiomiocitos expuestos a estrés nutricional por privación de suero y<br>aminoácidos.....      | 59     |
| Figura 10. Efecto del IGF-1 en los niveles intracelulares de ATP de<br>cardiomiocitos expuestos a estrés nutricional por privación de<br>suero/glucosa o suero/aminoácidos..... | 61     |
| Figura 11. Efecto del IGF-1 en los cambios inducidos por el estrés nutricional<br>por 24 h en la actividad reductasa MTT .....  | 62     |
| Figura 12. Efecto agudo del estrés nutricional en la actividad reductasa MTT .  | 63     |
| Figura 13. Efectos de la privación de suero/glucosa e IGF-1 en el potencial<br>mitocondrial de cardiomiocitos en cultivo .....  | 64     |
| Figura 14. Efecto del IGF-1 en la muerte inducida por estrés nutricional .....  | 66     |
| Figura 15. Efecto de la privación de nutrientes e IGF-1 en la apoptosis.....  | 67     |
| Figura 16. Efecto del IGF-1 en la muerte producida por privación de nutrientes<br>.....   | 67     |
| Figura 17. Efecto del estrés nutricional por privación de suero y glucosa en el<br>procesamiento de caspasa 3 .....   | 68     |
| Figura 18. Efecto del estrés nutricional en el procesamiento de LC3-I endógeno<br>.....   | 69     |
| Figura 19. Presencia de vacuolas autofágicas en cultivos primarios de<br>cardiomiocitos expuestos a estrés nutricional por privación de<br>suero/glucosa.....                   | 70     |
| Figura 20. Efecto del IGF-1 en la autofagia inducida por estrés nutricional o<br>rapamicina .....   | 71     |
| Figura 21. Efecto del IGF-1 en la autofagia inducida por estrés nutricional .....   | 72     |
| Figura 22. Efectos del estrés nutricional por privación de suero/glucosa y<br>3-metiladenina en la degradación de GFP .....   | 73     |

|  |     |
|--|-----|
| Figura 23. Efecto del IGF-1 en la degradación de GFP inducida por estrés nutricional por privación de suero/glucosa.....                 | 74  |
| Figura 24. Efecto del IGF-1 en el procesamiento de LC3-I inducido por estrés nutricional por privación de suero/glucosa.....             | 75  |
| Figura 25. Efecto de la privación de nutrientes en los niveles de Beclin-1 .....   | 76  |
| Figura 26. Efecto del estrés nutricional por privación de suero/glucosa y de 3-metiladenina en los niveles intracelulares de ATP.....    | 77  |
| Figura 27. Efecto de la 3-metiladenina en la muerte producida por privación de nutrientes .....  | 78  |
| Figura 28. Efecto del IGF-1 y 3-metiladenina en la muerte producida por privación de nutrientes.....                                     | 78  |
| Figura 29. Comparación de los niveles basales de IGF-1, insulina, glucosa y el peso corporal en ratones control y LID. ....              | 80  |
| Figura 30. Comparación del peso corporal, grasa y masa muscular en ratones WT y LID sometidos a estrés nutricional.....                  | 81  |
| Figura 31. Efecto del estrés nutricional en los niveles séricos de glucosa, insulina y ácidos grasos libres en ratones WT y LID.....     | 83  |
| Figura 32. Efecto del estrés nutricional en el procesamiento de LC3 en el hígado de ratones WT y LID .....                               | 85  |
| Figura 33. Efecto del estrés nutricional en el procesamiento de LC3 en la grasa subcutánea de ratones WT y LID.....                      | 86  |
| Figura 34. Efecto del estrés nutricional en el procesamiento de LC3 en el corazón de ratones WT y LID .....                              | 87  |
| Figura 35. Efecto de la privación de nutrientes en la fosforilación de AMPK en el hígado.....  | 88  |
| Figura 36. Efecto de la privación de nutrientes en la fosforilación de AMPK en el corazón .....  | 89  |
| Figura 37. Caracterización de fibras sarcoméricas mediante microscopía electrónica en cardiomiocitos sometidos a estrés nutricional..... | 92  |
| Figura 38. Modelo propuesto para la acción del IGF-1 en el estrés nutricional por privación de suero/glucosa .....                       | 104 |
| Figura 39. Modelo propuesto para la acción del IGF-1 en el estrés nutricional por privación de suero/aminoácidos.....                    | 105 |



## ABREVIATURAS

|              |   |
|--------------|---|
| 3-MA         | : 3-metiladenina  |
| A            | : Amperes   |
| Ad-LC3-GFP   | : Adenovirus LC3 acoplado a proteína fluorescente verde               |
| ADN          | : Acido desoxirribonucleico   |
| ADP          | : Adenosin difosfato  |
| AICAR        | : 5-Aminoimidazol-4-carboxamida-1- $\beta$ -ribosa                    |
| AMP          | : Adenosin monofosfato  |
| AMPK         | : Proteína kinasa activada por AMP                                    |
| ANF          | : Factor natriurético auricular                                       |
| APS          | : Persulfato de amonio  |
| ATP          | : Adenosin trifosfato   |
| $\beta$ -MHC | : Cadena pesada de beta-miosina                                       |
| BSA          | : Albúmina de suero de bovino   |
| BrdU         | : Bromo deoxiuridina  |
| BSA          | : Albúmina de suero de bovino   |
| CaMK         | : Calmodulina kinasa  |
| CREB         | : Factor de transcripción activado por AMP cíclico                    |
| DME          | : Dulbecco's Modified Eagle Medium                                    |
| DTT          | : Ditiotreitól  |
| EDTA         | : Acido etilendiaminotetraacético                                     |
| EGTA         | : Acido etilenglicol-bis-( aminoetil éter)-N,N,N',N'-2 etanosulfónico |
| EGFR         | : Receptor de EGF   |
| EN-A         | : Estrés nutricional por privación de suero/aminoácidos               |
| EN-G         | : Estrés nutricional por privación de suero/glucosa                   |
| ERK          | : Proteína kinasa regulada extracelularmente                          |
| FBS          | : Suero fetal de bovino   |
| FCS          | : Suero fetal de ternera  |
| GFP          | : Proteína fluorescente verde   |
| GH           | : Hormona del crecimiento   |
| Glut-4       | : Transportador de glucosa tipo-4                                     |

|         |   |
|---------|---|
| h       | : Horas   |
| HEPES   | : Acido N-2-hidroxietilpiperazina N-2-etanosulfónico          |
| IGF-1   | : Factor de crecimiento análogo a insulina tipo-1             |
| IGF-1R  | : Receptor de IGF-1   |
| IR      | : Receptor de insulina  |
| IRS-1   | : Sustrato-1 del receptor de insulina                         |
| JNK     | : Kinasa N-terminal de <i>c-Jun</i>                           |
| kDa     | : Kilo Dalton   |
| LAMP-2  | : Proteína tipo 2a asociada al lisosoma                       |
| LC3     | : Proteína asociada a microtúbulos 1, cadena liviana 3 o Atg8 |
| LC3-GFP | : LC3 unido a GFP   |
| LID     | : Deficiencia del gen de IGF-1 en el hígado                   |
| M       | : Molaridad   |
| M199    | : Medio 199   |
| MAPK    | : Proteína kinasa activada por mitógenos                      |
| MC      | : Medio completo  |
| MEK     | : Proteína MAP kinasa kinasa (MAPKK)                          |
| MRI     | : Imagen por resonancia magnética                             |
| mTOR    | : Proteína blanco de rapamicina                               |
| MTT     | : Sal de tetrazolium  |
| min     | : Minuto  |
| mg      | : Miligramo   |
| mg/dL   | : Miligramo/decilitro   |
| mL      | : Mililitro   |
| mm      | : Milímetro   |
| mM      | : Milimolar   |
| mOsm    | : Miliosmolar   |
| MOI     | : Multiplicidad de infección                                  |
| NaCl    | : Cloruro de sodio  |
| NADH    | : Nicotinamida-adenina-dinucleótido                           |
| NADPH   | : Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato                   |
| nM      | : Nanomolar   |

|                |   |
|----------------|---|
| nm             | : Nanómetro   |
| O <sub>2</sub> | : Oxígeno   |
| PBS            | : Tampón fosfato salino                             |
| P <sub>i</sub> | : Fosfoinositol                                     |
| PI             | : Ioduro de propidio                                |
| PI3-K          | : Fosfatidilinositol 3-kinasa                       |
| PFK-2          | : Fosfofructokinasa 2                               |
| PMSF           | : Fenilmetilsulfonilfluoruro                        |
| PKB            | : Proteína kinasa B                                 |
| PKC            | : Proteína kinasa C                                 |
| PTEN           | : Fosfatasa PTEN                                    |
| p/v            | : Porcentaje peso-volumen                           |
| PTX            | : Toxina pertusis                                   |
| Rheb           | : Proteína homóloga a ras enriquecida en el cerebro |
| ROS            | : Especies reactivas derivadas del oxígeno          |
| Rp             | : Rapamicina  |
| r.p.m          | : Revoluciones por minuto                           |
| SDS            | : Dodecil sulfato de sodio                          |
| SDS-PAGE       | : Gel de poliacrilamida desnaturante                |
| SEM            | : Error estándar de la media                        |
| TBE            | : Tris-Borato-EDTA                                  |
| TBS            | : Tampón tris salino                                |
| TCA            | : Ácido tricloroacético                             |
| TE             | : Tris-EDTA   |
| TEMED          | : <i>N,N,N',N'</i> -tetrametil-etilendiamina        |
| TMR            | : Tetrametilrodamina                                |
| TNF- $\alpha$  | : Factor de necrosis tumoral alfa                   |
| Tris           | : Tris-(hidroximetil)-aminoetano                    |
| TSC1           | : Proteína 1 de la esclerosis tuberosa              |
| TSC2           | : Proteína 2 de la esclerosis tuberosa              |
| V              | : Volt  |
| $\mu$ g        | : Microgramo  |

|               |                  |
|---------------|------------------|
| $\mu\text{L}$ | : Microlitro     |
| $\mu\text{m}$ | : Micrómetro     |
| $\mu\text{M}$ | : Micromolar     |
| WT            | : Tipo silvestre |

## **IGF-1 INHIBE *IN VITRO* E *IN VIVO* LA AUTOFAGIA CARDIACA INDUCIDA POR ESTRÉS NUTRICIONAL**

### **RESUMEN**

La autofagia es un proceso fisiológico clave para la supervivencia celular durante la privación de nutrientes (estrés nutricional), diferenciación celular y desarrollo. La autofagia se define como un proceso dinámico y programado que procede con el secuestro de proteínas citoplasmáticas y organelos dentro de vacuolas de doble membrana, que se contactan y fusionan con los lisosomas para formar los autolisosomas. Diferentes vías transduccionales regulan la autofagia, siendo la vía de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3-K) una de las más importantes. La PI3-K clase III se requiere en los estadios tempranos de la generación del autofagosoma, mientras que la de clase I tiene un efecto inhibitorio dependiente de la proteína quinasa mTOR. En los últimos años, la autofagia también se ha definido como un proceso de muerte programada.

El factor de crecimiento análogo a insulina tipo-1 (IGF-1), tiene diversas acciones sobre el corazón, destacando sus efectos prohipertrofico e inotrópico. Nuestro Laboratorio y otros grupos de investigación han demostrado que IGF-1 protege a los cardiomiocitos de la apoptosis inducida por distintas formas de estrés. Las acciones prohipertroficas y antiapoptóticas del IGF-1 son mediadas por un receptor de membrana que posee actividad tirosina quinasa intrínseca y una red transduccional compleja, integrada por las siguientes vías de señalización: a) PI3-K/PKB/mTOR, b) Raf/MEK/ERK y c) calcio.

En la literatura existen evidencias contradictorias respecto a las acciones del IGF-1 sobre la autofagia y sus mecanismos en varios tipos celulares. Dado que prácticamente se desconoce si este factor de crecimiento regula la autofagia cardiaca, en esta tesis se postuló como hipótesis que "IGF-1 inhibe la autofagia cardiaca inducida por estrés nutricional".

Los objetivos específicos propuestos fueron:

- Estudiar *in vitro* si la vía transduccional PKB/mTOR es activada por IGF-1 en cardiomiocitos expuestos a estrés nutricional.
- Investigar *in vitro* el efecto del IGF-1 en el metabolismo y viabilidad del cardiomiocito expuesto a estrés nutricional.
- Determinar *in vitro* si IGF-1 regula negativamente la autofagia inducida por estrés nutricional.
- Estudiar *in vivo* el papel del IGF-1 en la autofagia inducida por estrés nutricional.

Los modelos experimentales utilizados fueron cultivos primarios de cardiomiocitos de ratas neonatas expuestos a dos formas de estrés nutricional (privación de suero/glucosa o privación de suero/aminoácidos) y ratones transgénicos LID (“Liver IGF-1 deficiency”) y controles, ayunados por 48 h. Los ratones LID presentan una deficiencia selectiva en el gen de IGF-1 en el hígado que determina niveles plasmáticos de IGF-1 muy bajos en comparación a sus controles.

Los resultados mostraron que el estrés nutricional por privación de suero/glucosa estimuló temprana y progresivamente la autofagia en cultivos primarios de cardiomiocitos determinada por el procesamiento de la proteína endógena LC3-I, efecto que no se observó en los cardiomiocitos expuestos al estrés nutricional por privación de suero/aminoácidos. El estrés nutricional por privación de suero/glucosa también incrementó la distribución punteada de LC3-GFP, disminuyó la fluorescencia de LC3-GFP en los cardiomiocitos transducidos con el adenovirus LC3-GFP pero no modificó los niveles de la proteína proautofágica beclin-1. La privación de suero/glucosa produjo una caída significativa en los niveles intracelulares de ATP y un aumento de la muerte celular, la cual que no tuvo las características bioquímicas de apoptosis. Sin embargo, el bloqueo de la inducción de autofagia con el inhibidor selectivo de PI3-K clase III 3-metiladenina incrementó la muerte de los cardiomiocitos expuestos a ambos tipos de estrés nutricional.

Los dos tipos de estrés nutricionales disminuyeron tempranamente (1 h) los niveles basales de las formas fosforiladas de las proteínas PKB, p70-S6K y ERK, observándose sólo una recuperación paulatina de la fosforilación de ERK1 en los cardiomiocitos expuestos a privación de suero/glucosa.

IGF-1 inhibió la autofagia, la muerte y recuperó los niveles intracelulares de ATP en los cardiomiocitos expuestos a estrés nutricional por privación de suero/glucosa. Este efecto fue selectivo ya que IGF-1 no recuperó los niveles intracelulares de ATP y la viabilidad de los cardiomiocitos privados de suero y aminoácidos. Por otra parte, IGF-1 estimuló las fosforilaciones de la PKB y p70-S6K en cardiomiocitos expuestos a estrés nutricional por privación de suero/glucosa, revelando que la vía transduccional mTOR está activa. Sin embargo, el efecto del IGF-1 sobre p70-S6K no se observó en los cardiomiocitos privados de suero y aminoácidos.

En un modelo *in vivo* de estrés nutricional en el ratón, el ayuno por 48 h indujo autofagia en el corazón, siendo este efecto mayor en los ratones transgénicos LID en comparación a los controles silvestres. Además, estos ratones LID sometidos a estrés nutricional por 48 h presentaron mayor fosforilación de la proteína AMPK en el tejido cardiaco, efecto que podría estar asociado a una mayor inducción de autofagia.

Finalmente, los resultados obtenidos con el desarrollo de esta tesis permiten concluir que IGF-1 es un regulador negativo de la autofagia del cardiomiocito inducida por privación de nutrientes.

## **IGF-1 INHIBITS *IN VITRO* AND *IN VIVO* NUTRITIONAL STRESS-INDUCED CARDIAC AUTOPHAGY**

### **SUMMARY**

Autophagy is a key physiological process for cell survival during nutrient deprivation, cell differentiation and development. Autophagy is a dynamic and programmed process that involves the engulfment of cytoplasmic proteins and organelles within a double membrane vacuole, which are fused with lysosomes to form the autolysosomes. Autophagy is regulated by different signaling pathways being the most important the PI3-K pathway. PI3-K class III is required in the early steps of autophagosome formation, while PI3-K class I has an mTOR protein kinase-mediated inhibitory effect. In recent years autophagy has also been identified as a type II programmed cell death.

Insulin-like growth factor type 1 (IGF-1) has different actions on the heart, being the most important its pro-hypertrophic and positive inotropic effects. Moreover, our laboratory and other research groups have shown that IGF-1 protects cardiac myocytes from apoptosis induced by different cell stresses. Pro-hypertrophic and antiapoptotic IGF-1 actions are mediated by a membrane receptor with intrinsic tyrosine kinase activity and a complex signaling network, integrated by a) PI3-K/PKB/mTOR, b) Raf/MEF/ERK and c) Ca<sup>2+</sup>.

In the literature conflicting evidence exists about the IGF-1 effects on autophagy and the mechanisms involved. Moreover, no information is available whether this growth factor regulates cardiac autophagy. Therefore, this thesis proposed as hypothesis that "IGF-1 inhibits the nutritional stress-induced cardiac autophagy".

The specific aims were:

- To study *in vitro* whether PKB/mTOR transductional pathway is activated by IGF-1 in cardiac myocytes exposed to nutritional stress.



- To investigate IGF-1 *in vitro* effects on metabolism and viability in cardiac myocytes exposed to nutritional stress.
- To determine *in vitro* whether IGF-1 negatively regulates nutritional stress-induced autophagy.
- To study *in vivo* the role of IGF-1 on nutritional stress-induced autophagy.

The experimental models were primary cultures of neonatal rat cardiac myocytes exposed to two forms of nutritional stresses (serum/glucose or serum/aminoacid deprivation), and transgenic mice LID (Liver IGF-1 Deficiency) on control mice starved for 48 h. The LID mice have a selective liver deficiency in IGF-1 gene that results in a lower IGF-1 plasma level than in control mice.

Our results showed that nutritional stress by serum/glucose deprivation stimulated an early and progressive autophagy in primary cultures of neonatal rat cardiac myocytes, as determined by the processing of endogenous protein LC3-I. This effect was not observed in cardiac myocytes exposed to nutritional stress by serum/aminoacid deprivation. Nutritional stress by serum/glucose deprivation increased GFP-LC3 dot pattern and decreased GFP-LC3 fluorescence in cardiac myocytes transduced with an adenovirus overexpressing GFP-LC3, but any change was observed in the levels of the pro-autophagic protein beclin-1. The serum/glucose deprivation induced a significant decrease in intracellular ATP levels and an increase in cell death, which lacks the apoptotic biochemical features. However, inhibition of the induction of autophagy by 3-MA increased cell death in cardiac myocytes exposed to both types of nutritional stresses.

Both types of nutritional stresses produced an early decrease (1 h) in phosphorylated forms of PKB, p70-S6K and ERK. Only a gradual recovery of ERK1 phosphorylation in cardiac myocytes exposed to deprivation of serum/glucose was observed.

IGF-1 inhibited both autophagy and cell death, and recovered intracellular ATP levels in cardiac myocytes exposed to nutritional stress by serum/glucose deprivation.

This effect was selective to this stress because IGF-1 did not recover intracellular ATP levels and viability in serum/aminoacid deprived cardiac myocytes. Moreover, IGF-1 stimulated PKB and p70-S6K phosphorylation in cardiac myocytes exposed to nutritional stress by serum/glucose deprivation, suggesting that mTOR transductional pathway was active. However, IGF-1 effect on p70-S6K was not observed in serum/aminoacid deprived cardiac myocytes.

In an *in vivo* nutritional stress model produced by 48 h fasting, cardiac autophagy was induced. This induction was higher in transgenic LID mice as compared to control mice. In addition, the levels of phosphorylation of AMPK increased in cardiac tissue from 48 h fasted LID mice, effect that could be associated with a larger autophagy induction.

Finally, these results allow us to conclude that IGF-1 inhibits nutrient deprivation-induced cardiac autophagy.

## 1. INTRODUCCIÓN

El suministro adecuado de diversos nutrientes acordes a las necesidades del organismo es crítico para la mantención de sus funciones y sobrevivencia. Para cumplir las necesidades, los sustratos oxidables como glucosa, los ácidos grasos y aminoácidos sostienen la mayoría de los procesos vitales celulares, incluyendo la generación de ATP y la producción de precursores para la síntesis de macromoléculas a través de reacciones bioquímicas que ocurren en el citoplasma y en las mitocondrias (1).

La fuente de metabolitos intracelulares tiene dos orígenes. Uno dependiente de la adquisición de nutrientes externos y regulación por factores de crecimiento en las células de mamíferos. En particular la vía transduccional fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3-K)/proteína quinasa B (PKB o Akt) tiene un papel crítico y su estimulación por insulina, factores de crecimientos y otras señales extracelulares proveen a la célula de sustratos oxidables para la generación de ATP y biosíntesis mediante el metabolismo anabólico (2). El segundo mecanismo requiere de la activación del metabolismo catabólico para degradar macromoléculas. Existen varias vías catabólicas a disposición, siendo la autofagia la forma más extrema, en la cual los componentes citoplasmáticos, incluyendo proteínas y organelos son secuestrados en vacuolas para su degradación (1).

### 1.1. Metabolismo

Los carbohidratos, proteínas y grasas son los principales combustibles obtenidos de la dieta. Cuando estos combustibles son oxidados a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  en las células, se libera energía por la transferencia de electrones al  $\text{O}_2$ . La energía generada por este proceso de oxidación genera calor y ATP. El  $\text{CO}_2$  viaja en la sangre hasta los pulmones, donde es expirado, y el agua es excretada en la orina, sudor y otras secreciones. A pesar que el calor generado por la oxidación de los combustibles se usa para mantener la temperatura corporal, su principal propósito es la generación de ATP. El ATP provee la energía para realizar los procesos celulares que incluyen las reacciones biosintéticas, la contracción muscular y transporte activo a través de las

membranas celulares. Como estos procesos utilizan ATP, éste es nuevamente convertido a adenosin difosfato (ADP) y fosfato inorgánico ( $P_i$ ).

La oxidación de combustibles para generar ATP se llama respiración. Antes de la oxidación, los carbohidratos son convertidos a glucosa, la grasa a ácidos grasos y las proteínas en aminoácidos. Las vías para la oxidación tienen características en común, lo primero es la oxidación a acetilCoA, un precursor del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). Este ciclo es una serie de reacciones que completa la oxidación de acetilCoA a  $CO_2$ . Los electrones generados durante las reacciones oxidativas son transferidas al  $O_2$  por una serie de proteínas de la cadena de transportadora de electrones. La energía de la transferencia de electrones se usa para convertir ADP y  $P_i$  a ATP por un proceso llamado fosforilación oxidativa.

## **1.2. Estrés nutricional**

En las etapas iniciales de ayuno, los combustibles almacenados se utilizan para generar energía. El hígado desempeña un papel clave por mantener los niveles de glucosa en el rango de 80 a 100 mg/dL, primero por glicogenólisis y posteriormente por gluconeogénesis. El lactato, glicerol y los aminoácidos sirven de fuentes de carbono para la gluconeogénesis. Los aminoácidos son suministrados por el tejido muscular. El nitrógeno se convierte en el hígado a urea, la cual es excretada por los riñones.

Los ácidos grasos liberados desde el tejido adiposo por el proceso de lipólisis son el combustible principal durante el ayuno. El hígado oxida la mayoría de los ácidos grasos sólo parcialmente, convirtiéndolos en cuerpos cetónicos, que son liberados en la sangre. Por lo tanto, durante las etapas iniciales de ayuno, comienzan aumentar los niveles de ácidos grasos y cuerpos cetónicos en la sangre. Los músculos utilizan ácidos grasos, cuerpos cetónicos y glucosa del glicógeno muscular. Muchos otros tejidos utilizan ácidos grasos o cuerpos cetónicos. Sin embargo, los glóbulos rojos y el cerebro usan principalmente glucosa.

Si la utilización de combustible que ocurre durante un breve ayuno persiste por un período prolongado, las proteínas pueden ser rápidamente consumidas hasta el punto en el que podrían verse comprometidas funciones críticas. Afortunadamente, se presentan cambios metabólicos durante el ayuno prolongado que conservan las proteínas musculares.

Después de 3 a 5 días de ayuno, el músculo disminuye el uso de cuerpos cetónicos y depende principalmente de ácidos grasos como combustible. Sin embargo, el hígado, sigue convirtiendo ácidos grasos en cuerpos cetónicos, elevando sus concentraciones plasmáticas. El cerebro comienza a tomar estos cuerpos cetónicos de la sangre y los oxida para generar energía. Por consiguiente, el cerebro usa menos glucosa.

La glucosa es todavía necesaria, como fuente de energía para los glóbulos rojos, y el cerebro sigue utilizando una cantidad limitada de glucosa, la que se oxida para obtener energía y utiliza como una fuente de carbono para la síntesis de neurotransmisores. Menos glucosa es utilizada por nuestro organismo bajo estas condiciones, por lo tanto, el hígado debe producir menos glucosa por hora durante el ayuno prolongado que durante los períodos más cortos de ayuno. Debido a que depósitos de glicógeno en el hígado están agotados después de aproximadamente 30 horas de ayuno, la gluconeogénesis es el único proceso mediante el cual el hígado puede suministrar glucosa a la sangre en un ayuno continuo. Los aminoácidos producidos por la descomposición de proteínas sigue siendo una fuente importante de carbono para la gluconeogénesis. También, se utiliza una fracción de este grupo de aminoácidos para funciones biosintéticas (por ejemplo, la síntesis del grupo Hem y neurotransmisores) y nuevas proteínas, procesos que deben continuar durante el ayuno. Sin embargo, como resultado de la disminución de la gluconeogénesis durante el ayuno prolongado, menos proteína se degrada para suplir los aminoácidos para la gluconeogénesis.

En el caso del tejido adiposo, este órgano continúa degradando sus depósitos de triglicéridos que proveen los ácidos grasos y glicerol a la sangre. Estos ácidos

grasos son la principal fuente de combustible para el organismo. El glicerol se convierte en glucosa, mientras que los ácidos grasos se oxidan a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  por tejidos como el muscular. En el hígado, los ácidos grasos se convierten en cuerpos cetónicos, que son oxidados por diversos tejidos.

Una serie de factores determina cuánto tiempo podemos estar en ayuno y sobrevivir. La cantidad de tejido adiposo es un factor clave dado que el organismo usa los suministros del tejido adiposo como fuente principal de combustible. Sin embargo, los niveles de proteína corporales también pueden determinar la magnitud del tiempo que podemos ayunar. La glucosa todavía se utiliza durante el ayuno prolongado, pero en cantidades muy reducidas. Aunque, se degrada proteína para suministrar los aminoácidos para la gluconeogénesis a un ritmo más lento durante el ayuno prolongado que durante los primeros días, todavía se pierden proteínas necesarias para las funciones vitales. Los niveles de proteínas pueden disminuir en el corazón, riñón y otros tejidos vitales, pudiendo dejar de funcionar, o desarrollar una infección y no disponer suficientes reservas para desplegar una inmunorespuesta apropiada. Además de los problemas de combustible, también hay privación de vitaminas y minerales que son precursores de coenzimas y otros compuestos necesarios para las funciones tisulares. Debido a estos cambios en los patrones de utilización de combustible en los diversos tejidos, se puede sobrevivir por períodos prolongados sin ingerir alimentos.

### **1.3. Corazón**

El corazón depende de un suministro constante de  $\text{O}_2$  para producir la energía suficiente para mantener los procesos celulares esenciales. El consumo de  $\text{O}_2$  está entre  $60\text{-}150 \mu\text{L min}^{-1} \text{g}^{-1}$  en el corazón en reposo y puede aumentar 5 veces durante el ejercicio (3;4). El oxígeno se usa como cofactor en la fosforilación oxidativa, la cual cuenta del 90% de la producción cardiaca de ATP (5).

El corazón puede utilizar ácidos grasos, glucosa y lactato como combustible metabólico (6;7). Los ácidos grasos son catabolizados por  $\beta$ -oxidación y dan cuenta de

un 60-90% de la producción total de energía (8). Para el caso de la glucosa, metabolizada a través de la glicolisis, da cuenta de un 10-40% de la producción total de energía (9).

Los cardiomiocitos son las únicas células responsables de la función contráctil del corazón. Por ser células terminalmente diferenciadas, no se reproducen y, por lo tanto, se nace con un número determinado de cardiomiocitos y cualquier evento que comprometa su vida, afecta la función cardíaca. Dentro de la fisiopatología cardíaca, los cardiomiocitos deben adaptarse a distintas noxas y formas de estrés que comprometen su integridad y funcionalidad celular. Las patologías cardiovasculares constituyen un problema de salud pública principal para los países desarrollados y en vías de modernización, como Chile. En condiciones patológicas se desencadenan cambios como aumento de la presión arterial, aumento de factores humorales tales como angiotensina II, angiotensina-(1-7) y catecolaminas, y cambios en los niveles circulantes de O<sub>2</sub>, factores de crecimiento, nutrientes, insulina, etc.

Tanto los cardiomiocitos como los fibroblastos, células que constituyen el soporte estructural del corazón, responden a estímulos externos a través de procesos compensatorios como el aumento del tamaño de los cardiomiocitos, evento conocido como hipertrofia, aumento en el número de fibroblastos y síntesis de colágeno elevada, desencadenando fibrosis cardíaca o muerte celular a través de procesos muerte como apoptosis, necrosis o la emergente muerte por autofagia.

La adaptación al estrés requiere de la expresión de un determinado programa genético para responder frente a los cambios del medio ambiente y así compensar una injuria con una respuesta de defensa celular o finalmente definir el destino de la misma: sobrevivir para conservar la funcionalidad del tejido o morir para que otras células del tejido cardíaco sobrevivan y se adapten. En la respuesta adaptativa del cardiomiocito participan vías transduccionales y segundos mensajeros como los radicales libres que pueden servir como una señal de alerta para la célula o que modifican blancos moleculares ya sea en forma reversible (alteración del microambiente oxidante) o irreversible (modificaciones covalentes). Los factores transcripcionales son los

intermediarios entre un estímulo y la respuesta celular, determinando el funcionamiento de los programas génicos que deben expresarse para responder al estímulo, ya sea compensándolo o respondiendo.

#### **1.4. Autofagia**

La autofagia se describió inicialmente como un proceso fisiológico clave para la supervivencia celular durante la privación de aminoácidos, diferenciación celular y desarrollo. Además, cumple un importante papel tanto en el recambio de macromoléculas y organelos como en patologías neurodegenerativas (Síndrome de Parkinson y Enfermedad de Alzheimer). La autofagia se define como un proceso dinámico y programado que procede con el secuestro de proteínas citoplasmáticas y organelos enteros dentro de vacuolas de doble membrana, que se contactan y posteriormente, se fusionan con los lisosomas formando los autolisosomas. Todos estos elementos capturados en las vacuolas son degradados por proteasas lisosomales y reutilizados (3,4).

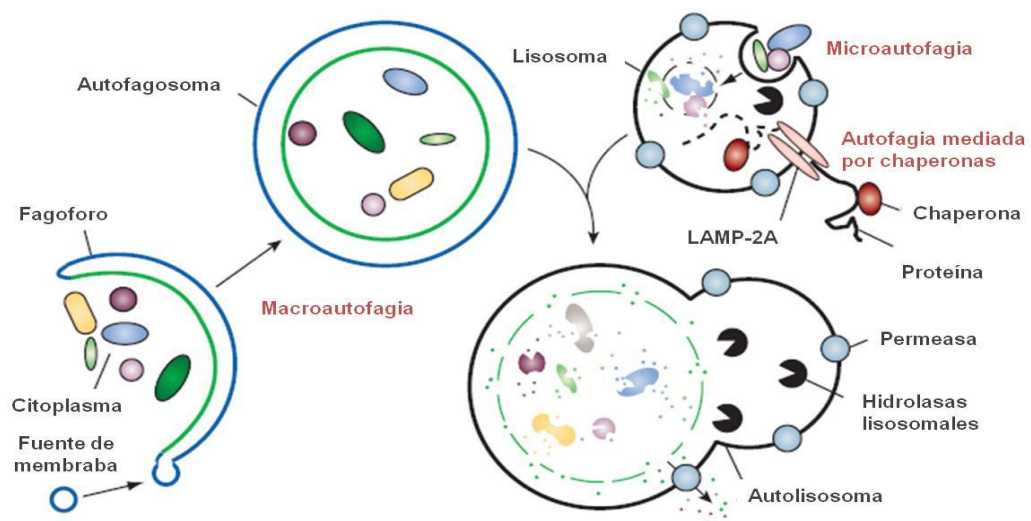
La autofagia participa en la degradación de proteínas normales en respuesta a la privación de nutrientes, en el remodelado celular, diferenciación, metamorfosis, envejecimiento, transformación celular. También se la ha implicado en el crecimiento del útero durante la gestación y su atrofia después del parto; en la remoción de componentes celulares anormales acumulados durante la toxicidad celular y recientemente, con el ayuno que experimenta el recién nacido en sus primeras horas de vida (5). Además, la inhibición de la autofagia se correlaciona con una disminución en la degradación de proteínas y el crecimiento celular neto (6).

#### **1.5. Tipos de autofagia**

La autofagia se clasifica en: microautofagia, macroautofagia y autofagia mediada por chaperonas (Figura 1). La microautofagia involucra la captación de citoplasma o de organelos directamente por la membrana lisosomal. Este mecanismo puede ocurrir por invaginación. La microautofagia cumple una función muy importante



en la degradación de los peroxisomas (7) y en la renovación de la cromatina nuclear (8). La autofagia mediada por chaperonas difiere de la vía mencionada anteriormente en que el tráfico vesicular no está involucrado. En cambio, las proteínas sustratos de esta ruta presentan el motivo peptídico KFERQ, el cual es reconocido por un complejo de chaperona molecular para luego ser transportadas a los lisosomas, molécula por molécula. La proteína sustrato y el complejo de chaperona se unen a la membrana lisosomal a través de LAMP-2A (proteína tipo 2a asociada al lisosoma). Luego la proteína sustrato se despliega y empuja hacia el lumen del lisosoma para su degradación y el complejo de chaperona reciclado (9).



**Figura 1. Diferentes tipos de autofagia**

La microautofagia se refiere al secuestro de componentes citosólicos directamente por lisosomas a través de la invaginación de sus membranas. En el caso de la macroautofagia, el cargo es secuestrado dentro de una vesícula de doble membrana única, el autofagosoma. El secuestro puede ser no específico o específico envolviendo ciertos organelos o microbios invasivos. El autofagosoma se forma por la expansión del fagoforo. La fusión con el lisosoma provee las hidrolasas. La degradación de la membrana interna del autofagosoma y del contenido ocurre en el autolisosoma y las macromoléculas resultantes son liberadas al citosol a través de permeasas. La autofagia mediada por chaperonas involucra la translocación directa de proteínas sustrato a través de la membrana lisosomal mediante la acción de la chaperona hsc70 y un receptor de membrana, LAMP-2A.

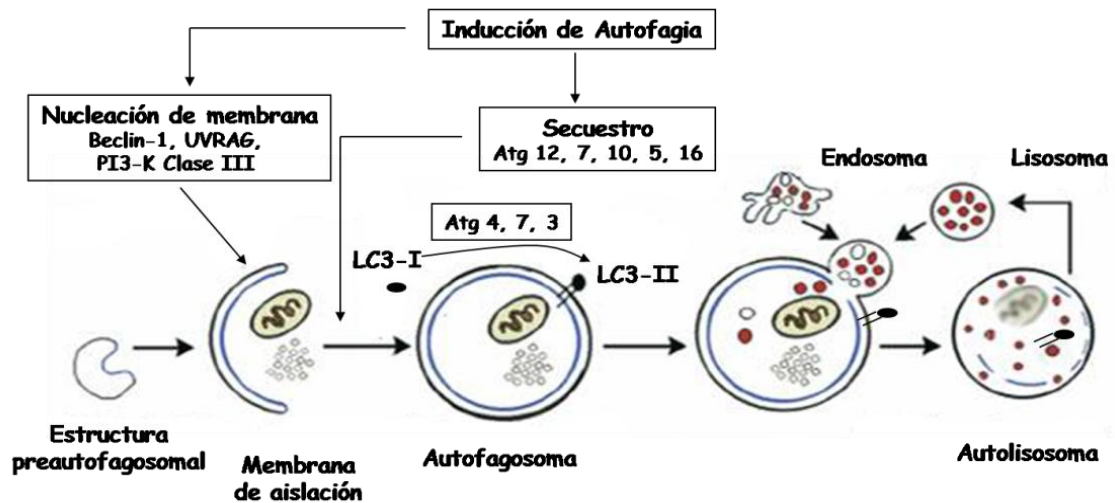
La macroautofagia (desde aquí referida como autofagia) es una vía para la degradación de proteínas de vida media larga y se induce bajo condiciones de privación de aminoácidos y estrés celular. Diversas investigaciones han demostrado que la autofagia es un proceso de múltiples pasos: primero comienza con el secuestro de material citoplasmático para formar el autofagosoma, estas estructuras son

usualmente delimitadas por una doble membrana. La membrana delimitante de los autofagosomas, tanto de hígado de rata como de levaduras, contienen muy pocas proteínas de transmembrana y periféricas. Luego el autofagosoma se fusiona con los endosomas, formando una estructura híbrida que se acidifica por la adquisición de la bomba de protones, llamada el autofagosoma intermediario, el cual contiene además una membrana única. Finalmente, existe una interacción directa de los autofagosomas con los lisosomas. La estructura final se denomina comúnmente autolisosoma. El contenido vacuolar es digerido y reciclado para proveer a la célula de aminoácidos y energía (4,10).

## **1.6. Formación de la vacuola**

La formación del autofagosoma requiere la elongación de la membrana de aislamiento, proceso en el cual participan distintas proteínas Atg. En un primer paso, el extremo carboxilo terminal del residuo de glicina de Atg12 se activa por acción de Atg7 ("E1-like"), resultando en un intermediario Atg12-Atg7. Posteriormente, Atg12 se transfiere a Atg10 para formar el complejo Atg12-Atg10. Finalmente, el carboxilo terminal de la glicina de Atg12 se une covalentemente a la lisina 130 del Atg5. Luego este complejo (Atg12-Atg5) se une en forma no covalente a Atg16L, una proteína de 63-74 kDa con diversas isoformas y de tamaño superior a su homólogo de levadura de 17 kDa (11). El complejo Atg12-Atg5/Atg16L aunque reside mayoritariamente en el citosol, una pequeña fracción se ubica en la membrana. En el proceso de elongación su distribución es asimétrica, asociándose gran parte de ella a la membrana externa. Finalmente, este complejo se disocia de la membrana al completarse la formación del autofagosoma (Figura 2) (12). La proteína LC3 o Atg8 experimenta algunas modificaciones post-traduccionales antes de unirse a la membrana. Inmediatamente, después de la síntesis se remueven los 22 aminoácidos en rata y los 5 aminoácidos en humanos, correspondientes al COOH-terminal. Este procesamiento es catalizado por el homólogo de Atg4. La forma procesada conserva un residuo de glicina en el C-terminal. La forma resultante se denomina LC3-I que reside principalmente en el citosol. Luego de la activación por Atg7, la cual funciona también como una enzima activadora de Atg12, LC3-I se transfiere a una enzima equivalente a E2 del sistema de

ubiquitinación (homólogo Atg3). El producto final llamado LC3-II se asocia al precursor de membrana y, a diferencia de Atg12-Atg5/Atg16L permanece unido a la membrana después de haberse completado la formación del autofagosoma (Figura 2). LC3-II migra más rápido que LC3-I en geles SDS-PAGE, consecuentemente el Western blot de LC3 presenta dos bandas características: LC3-I con movilidad aparente de 18 kDa y LC3-II de 16 kDa. Debido a que la cantidad de LC3-II se correlaciona con el número de autofagosomas, este análisis se ha constituido en una metodología simple y confiable para determinar la actividad autofágica en células animales (12-15).



**Figura 2. Etapas del proceso de formación del autolisosoma**

Diferentes estímulos como eventos de isquemia/reperfusión, privación de nutrientes, ceramidas y estrés osmótico inducen la autofagia. La etapa de nucleación o formación de la estructura membranosa preautofagosomal requiere el concurso de las proteínas Beclin-1 (Atg 6) y PI3-K clase III. El progresivo desarrollo de esta estructura ocurre conjuntamente con la captura tanto elementos del citoplasma como organelos subcelulares (mitocondria, retículo endoplásmico, etc). Con la participación de distintas proteínas de la familia Atg se forma el autofagosoma, estructura esférica de doble membrana, que se fusiona con el endosoma y, posteriormente, con el lisosoma para dar origen al autolisosoma. LC3-II es un marcador específico del autofagosoma.

## 1.7. Regulación de la autofagia

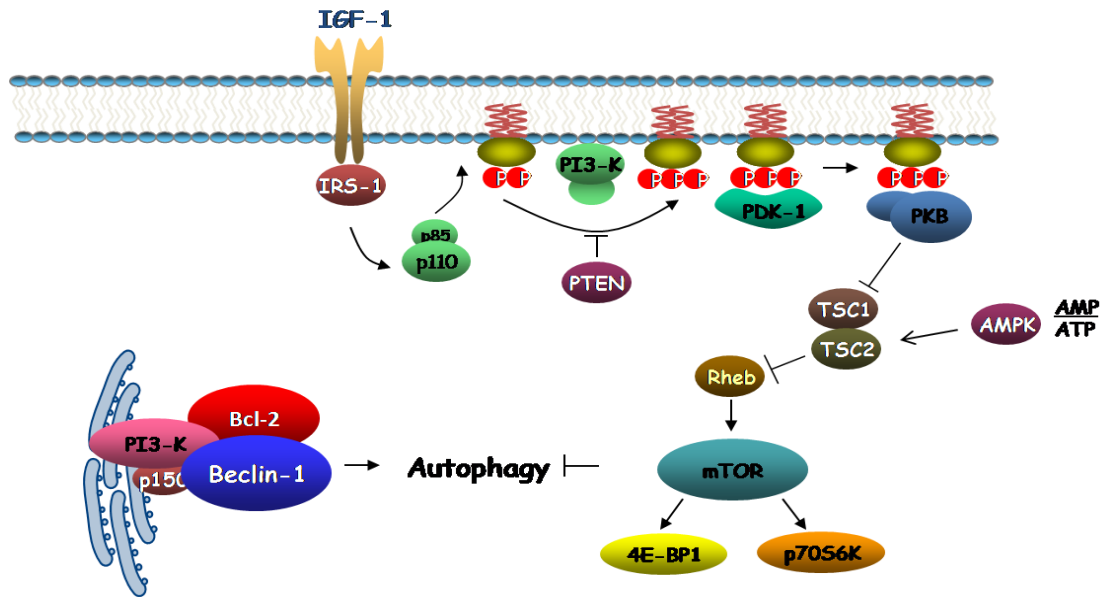
Diferentes condiciones de estrés pueden activar la autofagia y distintas vías transduccionales están involucradas en su regulación. Las PI3-K constituyen una familia de enzimas que catalizan la fosforilación del grupo hidroxilo en la posición 3' del anillo inositol de los fosfoinositidos. Las PI3-K son muy importantes en la vía autofágica en mamíferos. Mientras la PI3-K clase III se requiere en los estadios tempranos de la generación del autofagosoma, la PI3-K clase I tiene un efecto inhibitor dependiente en algunos sistemas de la proteína kinasa mTOR (“mammalian target of rapamycin”) (16). La inhibición de la PI3-K clase III por wortmanina, 3-metiladenina (3-MA) o LY294002 previene la formación de los precursores de autofagia. En células animales mediante estudios de coprecipitación y cross-linking se encontró que PI3-K clase III se asocia a Beclin-1 (17). Este complejo a través de la generación de PIP3 juega un papel en el reclutamiento de proteínas desde el citosol para su posterior degradación por autofagia o proveer a la vía autofágica de los componentes de membrana. Beclin-1 es el ortólogo animal de Atg6 y se ha implicado como un importante regulador de la autofagia y un gen esencial para la supervivencia bajo condiciones nutricionales adversas. La expresión de Beclin-1 correlaciona directamente con la formación del autofagosoma y está reducida en la mayoría de cáncer de ovarios y mamaros (18,19).

Los aminoácidos y el ATP son reguladores negativos de la autofagia, siendo esta inhibición mediada en gran parte por el sensor de energía, mTOR, una proteína kinasa que censa los niveles energéticos (20). En células animales, p70-S6K se postuló como candidato para el control de la vía de señalización de la autofagia río abajo de mTOR (10). mTOR es una proteína kinasa, relacionada a PI3-K, que promueve la progresión del ciclo celular en respuesta a la disponibilidad de nutrientes. La función de mTOR está conservada desde la levadura hasta los mamíferos. La inhibición de mTOR por rapamicina remedia varias de las características fenotípicas de las células privadas de nutrientes (21).

La proteína kinasa activada por AMP (AMPK) también actúa como un sensor de energía que responde a cambios en la razón intracelular de AMP/ATP (22). La activación de AMPK resulta en la estimulación de una variedad de procesos intracelulares involucrados en la producción de ATP, como la incorporación de glucosa y la oxidación de ácidos grasos (22) y la reducción de procesos que consumen energía como la síntesis de proteínas y ácidos grasos (22). La represión de la síntesis de proteínas por AMPK se debe a una disminución de la señalización de mTOR (23).

La AMPK genera un cambio las vías de generación de energía, incrementando la incorporación de ácidos grasos (24) y también de glucosa por un aumento de la translocación de los transportador de glucosa 4 (GLUT-4) de manera independiente a PI3-K/PKB (25), al mismo tiempo aumenta la glicolisis vía activación de PFK-2 (fosfofructoquinasa-2) (26).

El reciente descubrimiento que AMPK inhibe a mTOR por fosforilación del complejo de esclerosis tuberosa 1/2 (TSC 1/2) (23) y que es activada por pequeños cambios en los niveles de ATP citosólico o un incremento del AMP, ha posicionado a la AMPK como un interesante candidato como regulador de la autofagia. Recientemente en cardiomiocitos, se demostró que la privación de glucosa induce una fuerte activación de AMPK e inactivación de mTOR, acciones que correlacionan con la estimulación de la autofagia. Además *in vivo*, la inducción de autofagia durante una isquemia aguda se acompaña por la activación de AMPK en el corazón, siendo esta activación de autofagia inhibida por un dominante negativo de AMPK (27).



**Figura 3. Regulación de la autofagia**

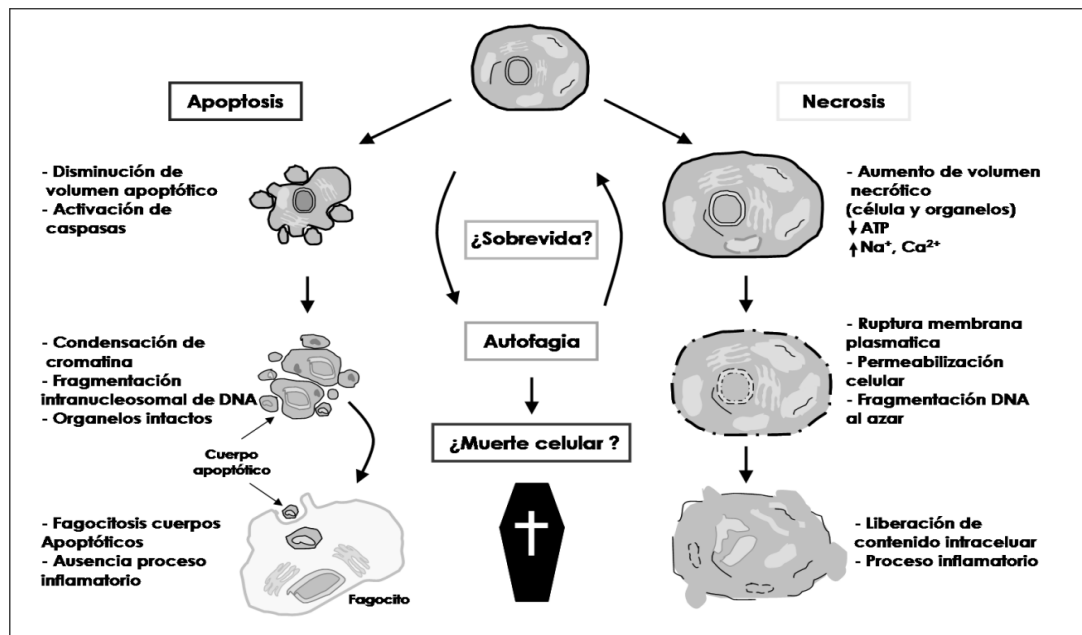
En células de mamíferos, la proteína quinasa PI3-K clase I se activa en respuesta a la unión del ligando (ejemplo insulina o factores de crecimiento) a su receptor. PI(3,4)P<sub>2</sub> y PI(3,4,5)P<sub>3</sub> generados en la membrana plasmática activan a PDK1 y la proteína quinasa B (PKB), mientras que la proteína fosfatasa PTEN antagoniza esta vía. PKB inhibe la actividad GTP-asa del complejo proteico TSC1/TSC2, estabilizando a Rheb-GTP, proteína que estimula a mTOR, concluyendo todo en inhibición de la autofagia. Tanto mTOR como PDK1 estimulan a la proteína quinasa p70-S6K. En abundancia de nutrientes, la actividad de p70-S6K inhibe la actividad de PI3-K, resultando en bajos niveles de autofagia, suficientes para mantener la homeostasis. Bajo condiciones de limitación de nutrientes, p70-S6K se inactiva y se estimula la activación de PI3-K clase I para prevenir una excesiva autofagia. En cambio, la proteína PI3-K clase III es un estimulador de la autofagia a través de su acción sobre beclin-1.

### 1.8. Autofagia como muerte celular programada

La muerte celular autofágica es principalmente una definición morfológica (muerte celular asociada con autofagosomas/autolisosomas) y aún no existe evidencia concluyente de que sea un mecanismo específico de muerte. Sin embargo, se acepta que la autofagia eventualmente puede destruir una célula (28). Una pregunta que constantemente se presenta, es si la actividad autofágica en células en proceso de muerte es la causa de muerte, o por el contrario, un mecanismo de supervivencia. Los estudios morfológicos e histoquímicos no han podido probar una relación de causa-efecto entre la autofagia y la muerte celular. Sin embargo, argumentos recientes

refuerzan la idea de que la actividad autofágica en células en proceso de muerte puede actuar como un mecanismo de sobrevida (29).

En la apoptosis clásica, o muerte celular programada tipo I, existe un colapso de los elementos del citoesqueleto pero una preservación de los organelos hasta etapas tardías del proceso. En contraste, en autofagia, o muerte celular programada II, existe una degradación temprana de organelos pero una preservación de elementos del citoesqueleto hasta estados tardíos. Mientras que la muerte apoptótica puede ser dependiente o independiente de caspasas y caracterizada por una proteólisis intranucleosomal del DNA. Estos dos eventos (activación de las caspasas y fragmentación del DNA) ocurren muy tarde en la muerte por autofagia. En contraste con la necrosis, tanto la apoptosis y autofagia no presentan respuesta inflamatoria (Figura 4) (30).



**Figura 4. Diferencias morfológicas y bioquímicas entre apoptosis y necrosis**

Las células normales pueden morir por necrosis y apoptosis. En el proceso necrótico la membrana celular se rompe, provocando el vaciamiento del contenido citoplasmático al espacio extracelular y posterior desarrollo de un proceso inflamatorio en el sitio de la necrosis. En cambio, el proceso apoptótico se caracteriza por una disminución del volumen celular, fragmentación del DNA y formación de cuerpos apoptóticos, manteniendo la estructura de la membrana plasmática intacta. Este proceso es programado genéticamente y requiere de energía en la forma de ATP. Los restos celulares son fagocitados por macrófagos o células vecinas, sin originar inflamación. La autofagia se menciona como un probable proceso de sobrevida o una forma alternativa de muerte celular programada.

Existen múltiples evidencias de muerte celular autofágica en varios tipos celulares. Algunos ejemplos, son las células MCF-7 tratadas con tamoxifeno, las cuales mueren por un tipo de muerte en la cual hay acumulación de vacuolas autofágicas en el citoplasma, en ausencia de apoptosis (31). También en células HL-60, una disminución en los niveles de Bcl-2 lleva a eventos de muerte independientes de señales mitocondriales y activación de caspasas que se caracteriza por la presencia de vacuolas autofágicas (32). La inhibición de la caspasa-8 induce muerte autofágica, siendo severamente afectada por la ausencia de Atg-7 y Beclin-1, dos proteínas esenciales en la autofagia (33). Las células MEF (Bax/Bak <sup>-/-</sup>) se caracterizan por ser resistentes a la apoptosis pero mueren por autofagia, requiriendo para ello de Atg-5 y Beclín-1 funcionales (34).

Existen distintas señales proapoptóticas que inducen autofagia, componentes de la vía apoptótica extrínseca, TRAIL, TNF y ceramidas (30). De otro modo, vías antiapoptóticas inhiben la autofagia, como la vía transduccional PI3-K/PKB/mTOR. La mitocondria integra las señales de muerte celular y autofagia, y además genera señales apoptóticas. Sin embargo, ellas son removidas por autofagia cuando están dañadas; por lo tanto, la mitocondria representa un nodo de interacción para apoptosis y autofagia. En células mamíferas, las proteínas de la familia Bcl-2 localizadas en la membrana interna de la mitocondria modulan la autofagia. La disminución de Bcl-2 aumenta la autofagia por un mecanismo independiente de caspasas en células leucémicas humanas (32) y la sobreexpresión de Bcl-2 inhibe la autofagia y muerte independientemente de caspasas en células progenitoras neuronales privadas de factores de crecimiento (35). Evidencias recientes sugieren que Bcl-2 inhibe la autofagia a través de una directa interacción con Beclin-1 y que esta interacción puede funcionar como un reóstato que mantiene a la autofagia en niveles compatibles con la supervivencia celular (36). En contraste, la sobreexpresión de Bcl-2 o Bcl-XL potencia la autofagia en células MEF (Bax/Bak<sup>-/-</sup>) tratadas con el estímulo proapoptótico etoposido (34). Las bases para estos efectos opuestos de la familia de proteínas Bcl-2 en diferentes condiciones no están claras ni tampoco que estas proteínas Bcl-2 funcionen a nivel de la mitocondria para regular la autofagia. Pattingre y cols. (36) mostraron que la autofagia es inhibida por Bcl-2 localizado en el retículo endoplásmico más que el



dirigido a la mitocondria y que esta inhibición es dependiente de su interacción con Beclin-1. Por otra parte, la caída del potencial mitocondrial puede desencadenar la degradación de la mitocondria por autofagia (37). Sin embargo, no se conoce si la inhibición de la autofagia incrementa el número de mitocondrias despolarizadas o que este estado las haga blanco del autofagosoma. La caída del potencial mitocondrial presenta un punto de convergencia entre la apoptosis y la autofagia, a través de las proteínas de la familia Bcl-2 que regulan el potencial mitocondrial. Así la relación entre caída del potencial mitocondrial, apoptosis y autofagia mitocondrial es un blanco interesante de investigación, como también la interacción de las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 y Beclin-1.

### **1.9. Autofagia y patologías cardiovasculares**

Uno de los primeros reportes que describieron la autofagia en el corazón se publicó a mediados de la década de los 70. En este estudio se demostró que corazones fetales en cultivo continúan latiendo por un par de semanas produciéndose algunos cambios degenerativos. La microscopia electrónica reveló la formación de vacuolas autofágicas que contienen organelos dañados después del primer día de cultivo. Este proceso fue acelerado mediante una privación transitoria de glucosa (38). Pocos años después, se observó la inducción de autofagia en corazones de conejo sometidos a isquemia/reperfusión (I/R) en un modelo de reperfusión de Langerdoff. Los resultados mostraron que 20 min de isquemia no induce autofagia, pero que el número de autofagosomas se incrementa con la reperfusión. Sin embargo, 40 min de isquemia aumenta la autofagia que se ve incrementada durante la reperfusión. Cuando se extiende la isquemia a 60 min, los autores observaron la presencia de lisosomas mas largos y probablemente disfuncionales durante la reperfusión, sugiriendo que la isquemia prolongada puede afectar la vía autofagolisosomal (39,40). Evidencia reciente indica que la isquemia cardiaca induce autofagia en una condición donde la AMPK es también activada (27). AMPK probablemente induce autofagia a través de la inhibición de mTOR (41).

Los estudios *in vitro* e *in vivo* sugieren que la autofagia puede tener diferentes funciones en el corazón. Estas funciones son beneficiosas o perjudiciales para la morfología y función cardíaca. En primer lugar, la autofagia en condiciones basales tiene un papel en la degradación de componentes citoplasmáticos, como lo demuestra la disfunción cardíaca grave en los pacientes y ratones que presenta una degradación autofágica defectuosa por una deficiencia de la proteína lisosomal (42,43), un trastorno, también conocido como enfermedad de Danon (44). De conformidad con estos resultados, la deficiencia de Atg5 en el corazón induce hipertrofia cardíaca, dilatación ventricular izquierda y disfunción contráctil en ratones adultos (45). Además, los corazones con deficiencia de Atg5 tienen aumentados los niveles de ubiquitinación, una estructura sarcomérica desorganizada y agregación mitocondrial (45). Es posible que la autofagia proporciona protección al degradar proteínas mal plegadas que pueden ser tóxicas para los cardiomiocitos, Tannous *et al.* (46) reportaron que la agregación de proteínas poliubiquitinadas después de un aumento de presión es suficiente para inducir autofagia. La atenuación de la actividad autofágica aumenta la abundancia y el tamaño, consistente con su papel en la eliminación de agregados proteicos. Además, la autofagia puede proporcionar protección eliminando las mitocondrias dañadas y disfuncionales. Muchos estudios han observado las mitocondrias secuestradas dentro de autofagosomas en el miocardio después de estrés celular (38,39,47).

Aparte de su papel fundamental en la eliminación de agregados proteicos y organelos dañados, la autofagia sirve como una fuente catabólica de generación de energía en tiempos de ayuno. De hecho, se ha sugerido que la autofagia de los cardiomiocitos entre el nacimiento y el primer amamantamiento puede proporcionar una fuente necesaria de energía (5) y en un modelo de ratón transgénico GFP-LC3, los cardiomiocitos de animales en ayuno tienen altos números de autofagosomas para sobrevivir a las condiciones adversas de privación de nutrientes (14). En concordancia con esta idea, la autofagia promueve la supervivencia durante la isquemia manteniendo una homeostasis energética. Durante la isquemia se inhibe la generación de la ATP a través de la fosforilación oxidativa y estos niveles reducidos de ATP han demostrado inducir autofagia (48).

En general, estos resultados claramente indican que la autofagia tiene en primer lugar un papel pro-vida en el corazón. Este hecho es contradictorio con los altos niveles de autofagia encontrados en los corazones insuficientes, los cuales soportan la teoría que una inducción excesiva de autofagia subyace muerte celular por autofagia y pérdida de cardiomiocitos. De hecho, se ha reportado cardiomiocitos con características autofágicas en insuficiencia cardíaca causada por miocardiopatía dilatada (49,50), cardiomiopatía valvular e hipertensiva (51), isquemia crónica (52) y miocardio hibernante (53,54), pero no en el corazón normal (50,53).

Se asume que la autofagia actúa en el corazón como una vía pro-vida durante la privación de nutrientes y otras formas de estrés celular. Sin embargo, cuando existe una activación severa de la autofagia, la maquinaria autofágica podría ser autodestructiva.

#### **1.10. Factor de crecimiento análogo a insulina tipo-1 (IGF-1)**

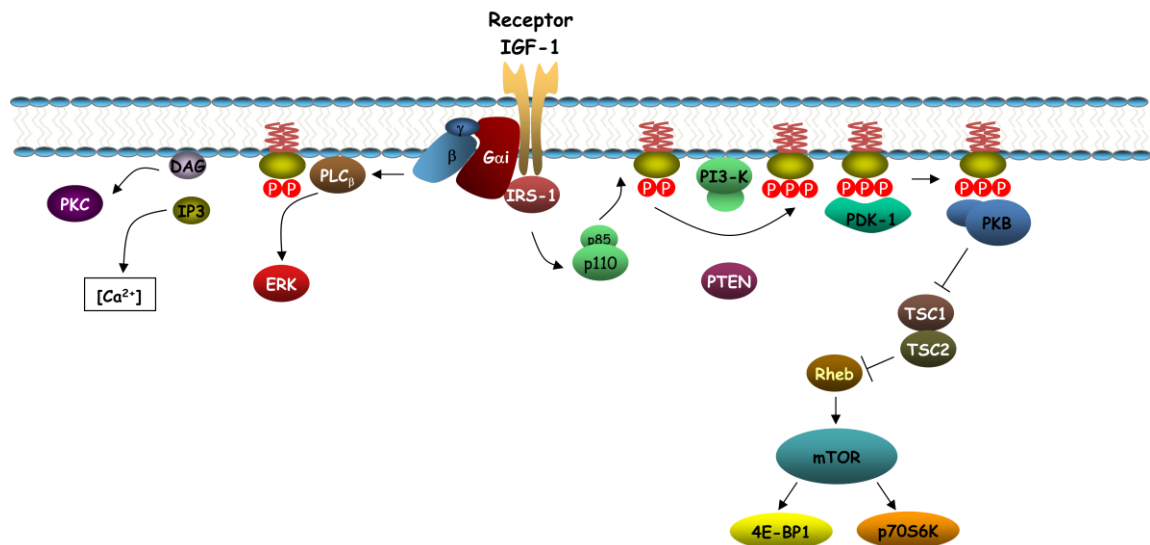
Los IGFs son integrantes de una familia de péptidos relacionados a la insulina que también incluye a la relaxina (55). El IGF-1 es un péptido pequeño de 70 aminoácidos con una masa molecular de 7.649 Dalton (56) y dos puentes disulfuro en residuos de cisteínas le otorgan una estructura tridimensional semejante a la insulina y que explica su propiedad de interactuar con el receptor de insulina (IR), aunque esta interacción sea de baja afinidad (57).

El receptor de IGF-1 (IGF-1R) integra la superfamilia de receptores con actividad tirosina kinasa intrínseca, la cual también incluye al IR y al receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) (58,59). Tanto IGF-1R como su homólogo cercano IR son dímeros unidos por puentes disulfuro de la forma  $(\alpha\beta)_2$ , localizados en la superficie celular, donde cada monómero está compuesto por una cadena  $\alpha$  que mira al espacio extracelular y una cadena  $\beta$  de transmembrana, con un dominio hacia el extracelular y otro hacia el citoplasma celular (60). La porción intracelular de cada monómero

consiste en dominios de transmembrana y de yuxtamembrana, seguidos por un dominio con actividad enzimática tirosina kinasa y una cola citoplasmática (61).

### 1.11. Vías transduccionales activadas por IGF-1

Las vías transduccionales activadas por IGF-1, involucran la fosforilación del sustrato-1 del receptor de insulina (IRS-1), llevando a la activación de la PI3-K. La activación de esta proteína se requiere en diferentes procesos celulares como la protección de la apoptosis vía PKB (62). La otra vía activada por IGF-1 es c-Raf-MEK1-ERK1/2 (63) (Figura 5). Recientemente nuestro laboratorio ha descrito que el IGF-1R no sólo señala a través de su actividad tirosina kinasa sino también a través de una proteína G heterotrimérica sensible a toxina pertusis (PTX) (64). IGF-1 a través de esta nueva vía transduccional aumentó rápida y transitoriamente los niveles intracelulares de  $Ca^{2+}$ , mediado por la vía fosfolipasa C y la activación de ERK, pero no de PI3-K/PKB, siendo este efecto dependiente de las subunidades  $\beta\gamma$  de la proteína Gi/o (64).



**Figura 5. Vías transduccionales activadas por IGF-1 en el cardiomiocitos**

La activación del receptor de IGF-1 en cardiomiocitos estimula diferentes vías transduccionales dentro de las cuales están la fosforilación de PKB, mTOR y ERK y liberación de calcio por IP3.

### **1.12. IGF-1 en la comunicación endocrina, autocrina y paracrina del corazón**

La hormona del crecimiento (GH) puede ejercer efectos metabólicos directos. Sin embargo, sus efectos biológicos más relevantes son indirectos y en su mayoría mediados por la estimulación de la expresión hepática de IGF-1 (acción endocrina) y en tejidos periféricos (acción autocrina y paracrina). En animales transgénicos con expresión de IGF-1 en tejido específico, Sjögren *et al.* y Yakar *et al.* mostraron la importancia del IGF-1 producido localmente respecto del de origen circulante, en sus efectos sobre el crecimiento del músculo cardíaco. Aunque el IGF-1 hepático es el principal contribuyente de los niveles de IGF-1 circulantes, éste no es tan crítico en la etapa postnatal normal. Se ha evidenciado que una fina regulación entre los efectos endocrinos y/o autocrino-paracrino del IGF-1, son fundamentales para el mantenimiento de la homeostasis de las células cardíacas (65,66). En este sentido, nuevas evidencias apuntan a fortalecer el concepto de un eje GH-IGF-1 a nivel del corazón (67-70). El receptor de la hormona de crecimiento se expresa ampliamente en el miocardio y la interacción con su ligando, estimula la biosíntesis de IGF-1, actuando de manera auto y paracrina en el corazón (68). Estudios tanto en animales como en humanos han proporcionado abundante evidencia de que el eje GH-IGF-1 participa en la regulación de la estructura y función de las células cardíacas. De esta manera, una célula cardíaca estimulada con GH activa un sistema de transducción orientado principalmente a la expresión local del gen *igf-1*. Posteriormente, el IGF-1 sintetizado y secretado hacia el espacio extracelular puede actuar de manera autocrina y/o paracrina sobre las células circundantes, modificando su función.

También en el corazón, IGF-1 promueve la hipertrofia, mejora la contractibilidad y fracción de eyección (71). Nuestro Laboratorio y otros grupos de investigación han mostrado que IGF-1 protege a los cardiomiocitos de la apoptosis inducida por diferentes tipos de estrés, incluido el estrés hiperosmótico (72-74). Además, se ha descrito que IGF-1 estimula directamente la hipertrofia en cultivos primarios de cardiomiocitos neonatos de rata, la cual se ha evidenciado a través de un aumento del área celular, una mayor síntesis de proteínas contráctiles y totales; y la inducción de la

transcripción de genes cardiacos específicos (ANF y  $\beta$ -MHC), en ausencia de proliferación celular (63).

### **1.13. IGF-1 en la regulación de la muerte del miocardio**

En animales adultos, la pérdida de cardiomiocitos produce una permanente reducción del número de unidades funcionales del miocardio, constituyendo un factor importante en el desarrollo de insuficiencia cardiaca. Por décadas se asumió que los cardiomiocitos morían exclusivamente por necrosis (75). Sin embargo hoy en día, se reconoce que la apoptosis juega un rol protagónico en la muerte de este tipo celular. La apoptosis ha sido implicada en diversas patologías cardiacas entre las que destacan cardiomiopatías dilatadas, insuficiencia cardiaca, infarto agudo al miocardio, displasia ventricular derecha y daño por isquemia/reperfusión (76-78). La inhibición de la pérdida de cardiomiocitos a través de la supresión de vías apoptóticas representa una potencial estrategia terapéutica para prevenir el desarrollo de la insuficiencia cardiaca (73).

Posterior a los estudios que documentaron al IGF-1 como un agente prohipertrófico, diversos investigadores mostraron que este factor de crecimiento también puede prevenir la pérdida de células cardiacas por disminución de la apoptosis inducida por diversos estímulos tales como privación de suero, exposición a doxorubicina, angiotensina II, hipoxia, estiramiento mecánico y estrés osmótico (73,79). Se ha demostrado en diferentes tejidos que IGF-1 previene la apoptosis y prolonga la supervivencia celular (80). Además el IGF-1R se ha propuesto como un regulador central del ciclo de vida de mamíferos superiores (81). La protección de los cardiomiocitos a través de la supresión de las vías de muerte celular puede representar una estrategia para prevenir la insuficiencia cardiaca. En este sentido, varios estudios experimentales *in vitro* han demostrado que IGF-1 disminuye la apoptosis del cardiomiocito post-infarto al miocardio en el ratón (82), en injuria por I/R en la rata (77) y en modelos *in vitro* de cultivos de cardiomiocitos de rata (79). A diferencia de otros factores de crecimiento, IGF-1 previene la apoptosis del cardiomiocitos a concentraciones fisiológicas (79). Uno de los primeros estudios que vinculó al IGF-1

con la apoptosis fue el realizado por el grupo de Buerke *et al.*, quienes utilizando un modelo de isquemia/reperfusión, registraron que el marcado aumento en la fragmentación del DNA fue significativamente atenuado por acción del IGF-1 (77). Diversas investigaciones posteriores han mostrado el efecto antiapoptótico del IGF-1 en células cardíacas expuestas a una amplia variedad de estímulos inductores de apoptosis. Dentro de estos modelos, el de ligación de la arteria coronaria de ratón ha establecido que la sobreexpresión transgénica del IGF-1 disminuyó tanto la muerte del miocardio como la dilatación ventricular (76). En el mismo sentido, en un modelo canino de insuficiencia cardíaca inducido por sobrecarga mecánica, IGF-1 redujo el número de cardiomiocitos apoptóticos y aumentó la función contráctil (79).

Entre distintos modelos *in vitro*, destaca el nuestro de inducción de apoptosis por estrés osmótico. Hemos observado que IGF-1 previene la apoptosis inducida por aumento de la osmolaridad externa. Además, este modelo nos ha ayudado a dilucidar tanto las vías de señalización involucradas en la estimulación y prevención de la apoptosis (72). Por ejemplo, IGF-1 estimula la fosforilación de ERK-1 y ERK-2 y la translocación de isoformas  $\alpha$ ,  $\varepsilon$  y  $\delta$  de PKC hacia la membrana plasmática de cardiomiocitos expuestos a un aumento del estrés osmótico. Con el uso de inhibidores químicos selectivos y específicos para PKC y ERK se observó que sólo el bloqueo de la vía ERK antagonizó completamente el efecto antiapoptótico de IGF-1 (72). El estudio de factores transcripcionales y su relación con el efecto antiapoptótico de IGF-1 también ha sido un tema abordado por nuestro Laboratorio, destacando el factor transcripcional CREB. Este factor es activado por estímulos pro- y antiapoptóticos e IGF-1 protege al cardiomiocito de la muerte por activación de CREB (83). La activación de las caspasas 3 y 9 fue atenuada por IGF-1. Sin embargo en aquellas células transducidas con un adenovirus que expresa una forma dominante negativa de CREB, el efecto protector del IGF-1 se anuló (83). La inhibición de la apoptosis por IGF-1 también se ha asociado con un aumento en la expresión de integrantes de la familia de proteínas antiapoptóticas Bcl-2 (84).

#### 1.14. IGF-1 y autofagia

Son escasos los trabajos en la literatura en los que se ha abordado la regulación de la autofagia por IGF-1. El trabajo de Gu y cols. (85) estudió los mecanismos responsables de la remoción de mitocondrias con mutaciones deletéreas en su DNA por autofagia. La privación de suero en una línea celular de osteocarcinoma humano estimula la autofagia de mitocondrias con mutaciones deletéreas que producen una excesiva generación de radicales libres del oxígeno, este efecto de eliminación de mitocondrias defectuosas se previno por IGF-1. La sobreexpresión de Bcl-2 en estas células también produce una disminución de la autofagia de las mitocondrias con mutaciones en el DNA (85). La función del IGF-1 en la autofagia no ha sido aclarada, mientras hay estudios que le asignan una función inhibitoria, por ejemplo la autofagia de mitocondrias disfuncionales en una línea celular de osteocarcinoma humano (85), o en células vasculares de pacientes con lesiones ateroscleróticas estimuladas con TNF- $\alpha$  a través de la vía PKB y JNK (86), y en células epiteliales de glándulas mamarias en un modelo de involución de la glándula mamaria a través de su acción sobre la vía transduccional PKB/mTOR (87). Otros señalan que este factor de crecimiento favorece la inducción de autofagia producida por privación de glucosa como fue demostrado en un estudio hecho en una línea celular H9c2 derivada de miocito de rata (88) y en un trabajo recientemente publicado muestra que IGF-1 previene la acumulación de la vacuolas autofagicas en neuronas de Purkinje privadas del soporte trófico es debido a un aumento en las tasas de fusión autofagosoma-lisosoma y degradación (89). No hay antecedentes en la literatura acerca del papel del IGF-1 sobre la autofagia del cardiomiocito, ni tampoco por qué vías transduccionales este factor de crecimiento modula diferencialmente este proceso de los asociados a sus acciones hipertróficas y antiapoptóticas. En base a todos estos antecedentes, surgieron las siguientes preguntas:



- ¿Cuál es el papel del IGF-1 en la autofagia cardiaca inducida por privación de nutrientes?
- ¿Cuáles son las vías transduccionales que podrían modular diferencialmente este proceso de las asociadas a sus efectos hipertróficos y antiapoptoticos?
- ¿Cuál es el papel del IGF-1 en la muerte celular inducida por privación de nutrientes?

## **2. HIPOTESIS**

*“IGF-1 inhibe la autofagia cardiaca inducida por estrés nutricional mediante la activación de la vía trasduccional PKB/mTOR”*

## **3. OBJETIVO GENERAL**

Establecer el papel del IGF-1 en la regulación de la autofagia producida por estrés nutricional en el cardiomiocito.

## **4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Estudiar *in vitro* si la vía transduccional proteína kinasa B/mTOR es activada por IGF-1 en cardiomiocitos expuestos a estrés nutricional.
- Investigar *in vitro* el efecto del IGF-1 en el metabolismo y viabilidad del cardiomiocito expuesto a estrés nutricional.
- Determinar *in vitro* si el IGF-1 regula negativamente la autofagia inducida por estrés nutricional.
- Estudiar *in vivo* el papel del IGF-1 en la autofagia inducida por estrés nutricional.

## 5. DISEÑOS EXPERIMENTALES

- *Para el objetivo específico 1:* “Estudiar *in vitro* si la vía transduccional proteína quinasa B/mTOR es activada por IGF-1 en cardiomiocitos expuestos a estrés nutricional”. El modelo experimental utilizado correspondió a cultivos primarios de cardiomiocitos de rata neonatas, los cuales se incubaron con medios de cultivo carentes de suero y glucosa (EN-G) o suero y aminoácidos (EN-A) entre 0 y 6 h en presencia o ausencia de IGF-1 (10 nM) y luego se evaluó la activación de la vía transduccional PKB/mTOR mediante Western blot, utilizando anticuerpos comerciales que reconocen las formas fosforiladas y totales de PKB, ERK y p70-S6K. Esta última proteína quinasa es sustrato de la proteína quinasa mTOR y se usó como marcador su actividad.
- *Para el objetivo específico 2:* “Investigar *in vitro* el efecto del IGF-1 en el metabolismo y viabilidad del cardiomiocito expuesto a estrés nutricional”. El modelo experimental empleado fue el mismo al descrito en el punto anterior. Los cardiomiocitos se cultivaron en medios carentes de suero y glucosa (EN-G) o suero y aminoácidos (EN-A) entre 1 y 24 h en presencia o ausencia de IGF-1. Luego se evaluó el metabolismo celular mediante la determinación del ATP intracelular, el potencial mitocondrial y la actividad reductasa MTT. En el caso de la viabilidad celular se midió la incorporación de PI en células vivas por citometría de flujo mientras que la muerte por apoptosis se evaluó a través de la determinación de la población sub-G1 por citometría de flujo y el procesamiento de caspasa 3 por Western blot.
- *Para el objetivo específico 3:* “Determinar *in vitro* si el IGF-1 regula negativamente la autofagia inducida por estrés nutricional”. Con este fin, los cardiomiocitos se cultivaron en medios carentes de suero y glucosa (EN-G) o de suero y aminoácidos (EN-A) entre 0 y 24 h en presencia o ausencia de IGF-1. La activación de la autofagia se determinó por microscopia de fluorescencia después de transducir las células con un adenovirus que porta una construcción génica que codifica de la proteína de fusión LC3-GFP. Las células autofágicas presentan

un incremento significativo de las vacuolas autofágicas GFP positivas. Además el curso del proceso autofágico se determinó por la conversión de la proteína LC3-I a LC3-II evaluada por Western blot. La etapa final degradativa del proceso autofágico se determinó por la degradación de la proteína LC3-GFP por citometría de flujo.

- *Para el objetivo específico 4:* “Estudiar *in vivo* el papel del IGF-1 en la autofagia inducida por estrés nutricional”. El modelo experimental correspondió al ratón transgénico LID caracterizado por la deficiencia específica del gen de IGF-1 en hígado, lo que produce una disminución del 75% de los niveles plasmáticos de IGF-1. Estos animales se ayunaron por 48 h, determinándose su peso corporal, cantidad de grasa y masa muscular antes y después del ayuno. Además se recolectó sangre para determinar los niveles de insulina, IGF-1, glucosa y ácidos grasos libres. Posterior al sacrificio, se extrajeron diversos órganos (corazón, hígado, grasa subcutánea y músculo esquelético) y se prepararon extractos proteicos. La autofagia se determinó por el procesamiento de la proteína LC3-I y la actividad de AMPK se determinó por Western blot.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1. Materiales**

Los medios de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco (DME), Hank's y M199, pancreatina, 5-bromo-2'-deoxiuridina, azul de tripán, EDTA, EGTA, 3-metiladenina (3-MA), Tritón X-100, además de otros reactivos bioquímicos se adquirieron en Sigma Chemical Co (St Louis, USA). Colagenasa y tripsina-EDTA, Earle's media balanced salts solution (EBSS) y RPMI Medium 1640 se adquirieron a Gibco BRL (Carlsbad, CA, EEUU). Suero fetal bovino (FBS) y de ternero (FCS) se obtuvieron de Hyclone. Los anticuerpos secundarios anti IgG de conejo conjugados a peroxidasa se adquirieron a Calbiochem (La Jolla, USA). En Cell Signaling Technology (Beverly, EEUU) se adquirieron los anticuerpos IgG de conejo anti-caspasa-3, LC3 y para las formas fosforiladas y totales de p70-S6K, PKB, AMPK y ERK. El anticuerpo anti-Beclin-1 se adquirió en Santa Cruz Biotechnology. El reactivo Western Lightning se adquirió en Perkin Elmer Life Sciences, Inc (Boston, MA). De MERCK (Dasnstadt, Alemania) se adquirieron gelatina, compuestos inorgánicos y orgánicos, sales, ácidos y solventes. El material de plástico estéril para la obtención y cultivo de cardiomiocitos se adquirió a Falcon.

### **6.2. Cultivo primario de cardiomiocitos de ratas neonatas**

#### **6.2.1. Material biológico**

Se utilizaron ratas neonatas Sprage-Dawley (2-3 días de edad) provenientes del Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Todos los estudios se realizaron con la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

Los ratones transgénicos LID provinieron del Bioterio del Mount Sinai School of Medicine, New York (USA) y su utilización contó con la aprobación del Comité de Uso y Mantenición de Animales del Mount Sinai School of Medicine.

### **6.2.2. Aislamiento y cultivo de cardiomiocitos de ratas neonatas**

Los cardiomiocitos se obtuvieron desde corazones de ratas neonatas de 2 a 3 días de edad. Las ratas se sacrificaron por decapitación e inmediatamente se les extrajo el corazón bajo condiciones de esterilidad. Los corazones aislados se lavaron en medio Hank's estéril y luego de remover las aurículas, los ventrículos se picaron en pequeños trozos para finalmente ser traspasados a botellas de cultivo de 50 mL y ser sometidas a digestiones sucesivas con 0.2 mg/mL de colagenasa tipo II y 0.6 mg/mL pancreatina en tampón Hank's. Las células aisladas obtenidas se resuspendieron en DME/M199 4:1, FBS al 10% y se preplaquearon por 2 h a 37°C, procedimiento que permite la remoción de los fibroblastos y así obtener una fracción enriquecida en cardiomiocitos. Transcurridas 2 h, las células se recolectaron, centrifugaron a 1.000 rpm por 5 min y resuspendieron en medio de mantención (DME/M199: 4:1) que contenía FBS al 5% y FCS al 10%. Se utilizó el método de exclusión de azul de tripán para determinar la concentración celular de cardiomiocitos, los cuales se sembraron según las necesidades experimentales en DME/M199 4:1, 5% FBS y 10% FCS, en presencia de 5-bromo-2-deoxiuridina, sobre placas de cultivo cubiertas con una monocapa de gelatina al 2% p/v y mantenidas en incubadores termorregulados a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% aire. Los cardiomiocitos así obtenidos se dejaron por 24 h en medio con suero antes de exponerlos a cualquier estímulo. La pureza de los cultivos fue mayor al 95% determinado por tinción celular con  $\beta$ -MHC.

### **6.2.3. Modelo animal**

Se utilizaron ratones LID y ratones WT ambos con un fondo genético FVB/N. La generación del ratón LID ha sido descrita previamente (66). Los ratones denominados como WT y LID en este estudio expresan el exón 4 del gen de IGF-1 flanqueado por dos sitios *lox P*, denominados como LL en el trabajo de Yakar *et al.* (66). Los ratones LID también expresan el transgen CRE bajo el control de la secuencia del enhancer del promotor de albumina, exclusivamente en el hígado (LL1 en el trabajo de Yakar *et al.* (66)). El genotipo de los animales se determinó usando DNA extraído de cola según protocolos convencionales y la reacción de la polimerasa en cadena anteriormente descrita (90).

### **6.3. Estrés nutricional**

El estrés nutricional se indujo mediante dos procedimientos: el primero consistió en la privación de suero y glucosa (EN-G) y el segundo por privación de suero y aminoácidos (EN-A). Las células incubadas con medio completo (DME/M199 4:1 + 10% FBS) se usaron como control. Para inducir el estrés nutricional por privación de glucosa y suero se utilizó el medio RPMI 1640 sin glucosa (Tabla 1) o el medio EBSS (Tabla 2) para el estrés nutricional de privación de suero y aminoácidos por diferentes tiempos en presencia o ausencia de IGF-1 o inhibidores. Para el modelo *in vivo* los ratones se sometieron a ayuno por 48 h.

**Tabla 1. Composición medio RPMI 1640 para privación de suero/glucosa (Gibco catálogo número 11879)**

| <b>Composición</b> | <b>mg/dL</b> | <b>Composición</b>  | <b>mg/dL</b> |
|--------------------|--------------|---|--------------|
| <b>Aminoácidos</b> |              |   |              |
| Glicina            | 0.133        | Pantotenato de calcio   | 0.000524     |
| Arginina           | 1.15         | Ácido fólico  | 0.00227      |
| Asparagina         | 0.379        | Niacinamida   | 0.0082       |
| Ácido aspártico    | 0.15         | Ácido para-aminobenzoico  | 0.0073       |
| Cisteína           | 0.208        | Piroxidina  | 0.00485      |
| Ácido glutámico    | 0.136        | Riboflavina   | 0.000532     |
| Glutamina          | 2.05         | Tiamina   | 0.00297      |
| Histidina          | 0.0968       | Vitamina B12  | 0.0000037    |
| Hidroxiprolina     | 0.153        | Inositol  | 0.194        |
| Isoleucina         | 0.382        | <b>Sales inorgánicas</b>  |              |
| Leucina            | 0.382        | Nitrato de calcio (Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O)         | 0.424        |
| Lisina             | 0.274        | Sulfato de magnesio (MgSO <sub>4</sub> )  | 0.407        |
| Metionina          | 0.101        | Cloruro de Potasio (KCl)  | 5.33         |
| Fenilalanina       | 0.0909       | Bicarbonato de Sodio (NaHCO <sub>3</sub> )                                      | 23.81        |
| Prolina            | 0.174        | Cloruro de Sodio (NaCl)   | 103.45       |
| Serina             | 0.286        | Fosfato dibásico de Sodio (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O) | 5.64         |
| Treonina           | 0.168        | <b>Otros componentes</b>  |              |
| Triptofano         | 0.0245       | Glutation (reducido)  | 0.00326      |
| Tirosina           | 0.111        | Rojo fenol  | 0.0133       |
| L-Valine           | 0.171        |   |              |
| <b>Vitaminas</b>   |              |   |              |
| Biotina            | 0.00082      |   |              |
| Colina             | 0.0214       |   |              |



**Tabla 2. Composición medio EBSS para privación de suero/aminoácidos (SIGMA catálogo número E2888)**

| <b>Componentes</b>                   | <b>g/L</b> |
|--------------------------------------|------------|
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 0,265      |
| MgSO <sub>4</sub>                    | 0,09767    |
| KCl                                  | 0,4        |
| NaHCO <sub>3</sub>                   | 2,2        |
| NaCl                                 | 6,8        |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>     | 0,122      |
| Glucosa                              | 1          |
| Rojo Fenol                           |            |

#### **6.4. Preparación de extractos de proteínas totales**

Se prepararon extractos de proteínas totales para:

- Evaluar la actividad autofágica a través del procesamiento de la proteína LC3, así como también de los niveles de Beclin-1, tubulina y  $\beta$ -actina en respuesta al estrés nutricional.
- La fosforilación de las proteínas PKB, p70-S6K, ERK y AMPK para evaluar la vía transduccional en respuesta al estrés nutricional.

Las células se sembraron en placas de 35 mm a una densidad de  $1,5 \times 10^6$  células/placa. Una vez estimuladas, las células se lavaron tres veces con PBS frío y luego se lisaron con 50  $\mu$ L de tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 7,4; EDTA 5 mM; NaCl 50 mM; Tritón X-100 1% v/v; aprotinina 20 mg/mL; leupeptina 1 mg/mL; PMSF 1 mM y Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM). El homogeneizado se centrifugó a 10.000 x g durante 10 min a 4°C y el sobrenadante o extracto de proteínas se recuperó en un tubo nuevo, determinándose la concentración de proteínas por el método de Bradford (Bio-Rad protein assay) y se desnaturó en tampón de carga 4x (glicerol 20%,  $\beta$ -mercaptoetanol 20%, SDS 5%, 125 mM Tris y 0,01% azul de bromofenol, pH 6,8), para ser almacenado a -20°C hasta su uso.

### 6.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida

La separación de las proteínas de acuerdo a su masa molecular se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida preparados a partir de una solución 29,2:0,8 de acrilamida:bisacrilamida. En todos los casos, tanto para la detección de LC3, Beclin-1, PKB, P70S6K, ERK y AMPK se utilizaron alrededor de 30 µg de extracto proteico. Los geles concentrador y separador fueron de 5 y 12%, respectivamente. La electroforesis se realizó a voltaje constante de 100 V en tampón de electroforesis.

### 6.6. Electrotransferencia de proteínas

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de PDVF de 0,45 µm a 100 V durante 60 min en tampón de transferencia.

### 6.7. Western blot

Una vez transferidas, las membranas se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios toda la noche a 4°C y agitación suave en las siguientes condiciones:

| Anticuerpo        | Tampón de bloqueo   | Dilución | Tampón de incubación |
|-------------------|---------------------|----------|----------------------|
| p-PKB, PKB        | TBS 1x              | 1:1.000  | TBS 1x               |
| p-p70-S6K, p70S6K | Tween-20 0,1%       | 1:1.000  | Tween-20 0,1%        |
| p-ERK, ERK        | Leche descremada 5% | 1:1.000  | Leche descremada     |
| p-AMPK, AMPK      | p/v                 | 1:1.000  | 0.5% p/v             |
| LC3               |                     | 1:2.000  |                      |
| Beclin-1          |                     | 1:2.000  |                      |
| Tubulina          |                     | 1:5.000  |                      |
| β-actina          |                     | 1:5.000  |                      |

Posterior a la incubación, las membranas se lavaron durante 30 min en TBS 1x que contenía Tween-20 al 0,1% o PBS 1x/Tween-20 al 0,1%, según fuera el caso, e incubadas durante 2 h a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo anti-IgG de

conejo conjugado con peroxidasa, título 1:5.000 en tampón de bloqueo TBS 1x/Tween-20 al 0,1%.

Para detectar las proteínas, las membranas, previamente lavadas, se incubaron durante 1 min con el reactivo "Western Lightning" y se expusieron a la película de fotografía Kodak-Biomax. Las películas se digitalizaron y las imágenes se procesaron con ayuda de los programas computacionales Adobe Photoshop y USI (Un-Scan-It gel, Silk Scientific Corporation).

### **6.8. Determinación del contenido intracelular de ATP**

Para estos experimentos se utilizaron placas de cultivo de 96 pocillos a una concentración de  $2 \times 10^4$  células/pocillo. Finalizados los tiempos de estimulación, se removió el medio y se agregaron 20  $\mu$ L de medio Krebs con  $\text{Ca}^{2+}$  (145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM EGTA, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM HEPES-Na, 5.6 mM glucosa, pH 7.4). Posteriormente se adicionó el tampón de lisis del kit Cell Titer-Glo® en una relación 1:1 y finalmente se agitó la placa durante 2 min para completar la reacción. Finalmente, las células lisadas se traspasaron a una placa opaca de 96 pocillos y la luminiscencia se midió en un luminómetro TopCountNXT (Perkin-Elmer, Waltham, MA).

### **6.9. Determinación de potencial mitocondrial**

Para este experimento se utilizaron placas de cultivo de 12 pocillos a una concentración de  $3 \times 10^5$  células/pocillo. La sonda utilizada para medir el potencial de membrana mitocondrial se utilizó la tetrametilrodamina (TMR), para corregir el potencial por la masa mitocondrial se utilizó la sonda MitoTrackerGreen®. Ambas sondas se cargaron 30 min antes de la medición. Una vez terminado el estrés nutricional, el medio se removió y las células se suspendieron con 300  $\mu$ L de tripsina-EDTA 1x disuelta en PBS por 5 min a 37°C. Una vez finalizados los 5 min, la reacción de tripsinización se detuvo con FBS en una proporción 1:10. Posteriormente, las células se analizaron por citometría de flujo.

### **6.10. Ensayo de actividad reductasa MTT**

La actividad reductasa MTT se determinó en cardiomiocitos sembrados en placa de 96 pocillos con una densidad de 25.000 células/pocillo, estimulados por 24 h, ocupando inhibidores en algunos casos. Para ello el medio de estímulo se retiró y reemplazó por 100 µL de reactivo MTT 0,5 mg/mL en PBS 1x para luego ser incubado por 1 h a 37°C. Luego de aspirar el medio, las células se disolvieron con la adición del formazan en 100 µL de isopropanol. La absorbancia se midió a 550 nm en un Lector de placa BIO-RAD Modelo 550 (91).

### **6.11. Ensayos de viabilidad celular y de población sub-G1**

La integridad de la membrana plasmática de los cardiomiocitos controles o privadas de glucosa se determinó por la capacidad de las células vivas de excluir el yoduro de propidio (PI). Los cardiomiocitos se lavaron con PBS, desprendieron con tripsina, recolectados por centrifugación, lavados una vez con PBS y resuspendidos en una solución 0,1 mg/mL de PI. La incorporación de PI se cuantificó en un citómetro de flujo FACScan. La población Sub-G1 se determinó en cardiomiocitos recolectados, centrifugados y permeabilizados con etanol 100% por 24 h. Las células se trataron con RNasa por 1 h y se les agregó PI (0,1 mg/mL) y se analizaron por citometria de flujo (92).

### **6.12. Tratamiento adenoviral**

Las células se sembraron a distintas densidades dependiendo de las necesidades experimentales. Luego de 24 h, las células se transdujeron con el adenovirus GFP-LC3 a una multiplicidad de infección (MOI) de 30 partículas virales por célula y mantenidas en esas condiciones alrededor de 24 h, antes de lavarlas y exponerlas al estrés nutricional.

### **6.13. Cuantificación de autofagia**

Para evaluar el efecto del IGF-1 en la autofagia inducida por privación de nutrientes, los cultivos primarios de cardiomiocitos de rata se transdujeron con el Ad-GFP-LC3 (MOI 30) por 24 h. Luego los cardiomiocitos se estimularon por 6 y 24 h en medio completo, estrés nutricional o rapamicina (inhibidor de mTOR que induce autofagia), con o sin IGF-1 (10 nM, preincubado por 1 h). Se contaron aproximadamente 150 células por condición, clasificándose en positivas o negativas para autofagia. Además se determinó la degradación de GFP como medida de autofagia, para esto los cardiomiocitos se transdujeron con el Ad-GFP-LC3 y se estimularon con el estrés nutricional por 6 y 24 h y se determinó la fluorescencia relativa GFP-LC3 por citometría de flujo (93). También se utilizó el procesamiento de la proteína LC3-I como marcador de inducción de autofagia (3).

### **6.14. Microscopia de fluorescencia**

La técnica de microscopía de fluorescencia se utilizó para visualizar la distribución de la proteína LC3 en cardiomiocitos transducidos con el Ad-GFP-LC3 y fueron sometidos a estrés nutricional en presencia o ausencia de IGF-1. Para ello, los cardiomiocitos se sembraron a una densidad de  $2,5 \times 10^5$  células/placa, sobre cubreobjetos de vidrio cubiertos de gelatina (2% p/v). Luego del estímulo, las células se lavaron con PBS frío, se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS por 10 min, las células se montaron sobre DAKO en portaobjetos, para retardar el decaimiento de la fluorescencia y se observaron en un microscopio confocal Zeiss LSM510.

### **6.15. Determinación de tejido graso y muscular total**

La masa total de grasa y músculo se determinó en ratones concientes usando un método de resonancia magnética (Echo MRI 3-in-1; Echo Medical System, Houston, TX, USA).

### **6.16. Determinación de glucosa, insulina y ácidos grasos libres**

Se tomó una muestra de sangre desde el seno retroorbital de ratones de machos de 8 semanas. Los niveles séricos de ácidos grasos libres se determinaron usando el kit “fatty acid assay kit” (Roche, Indianapolis, IN, USA). Los niveles séricos de insulina se determinaron usando un kit de radioinmunoensayo (Linco Reseach, St Charles, MO, USA). La glucosa se determinó usando un sistema de monitoreo de glucosa (Abbott, Abbott Park, IL, USA).

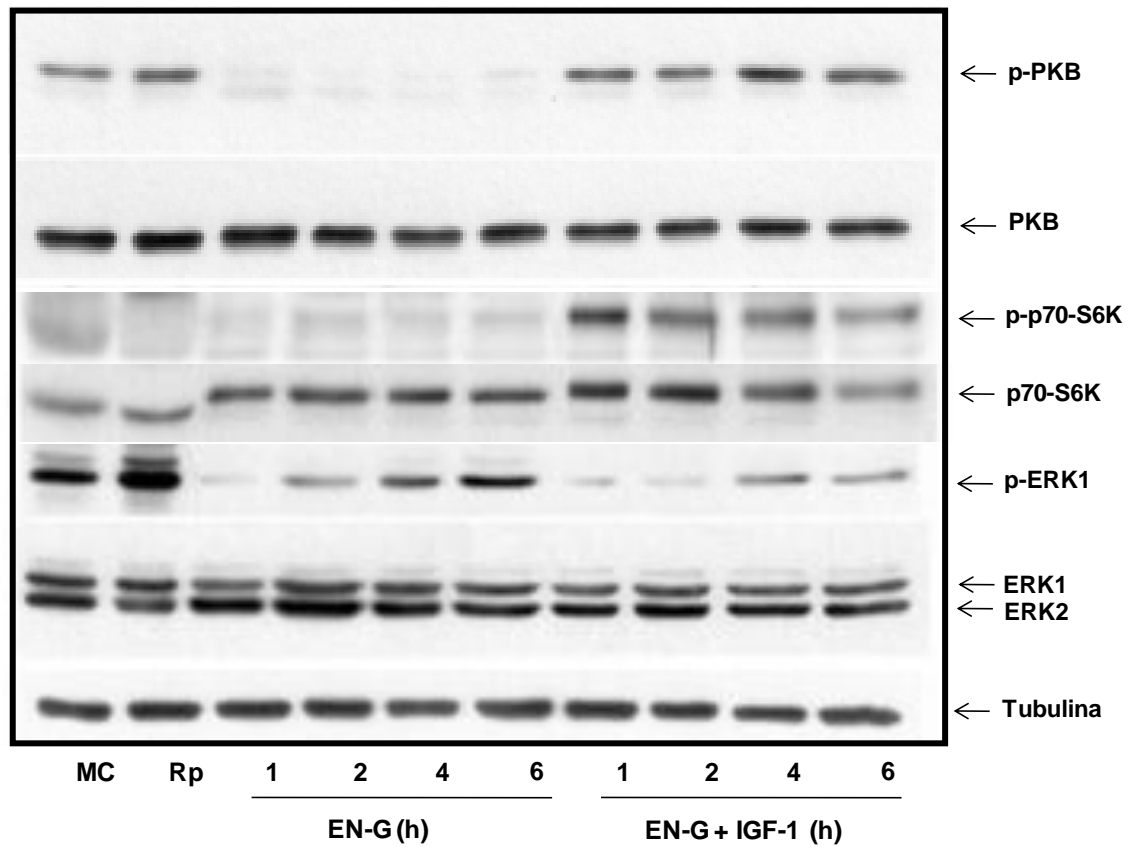
### **6.17. Representación de datos y análisis estadístico**

Dependiendo del tipo de experimento, los resultados se muestran como figuras representativas o como promedios  $\pm$  SEM para el número de experimentos independientes señalados. Las diferencias entre los grupos experimentales se evaluaron por análisis de varianza ANOVA de una o dos vías seguido de prueba de Tukey. En cada figura se señala el análisis aplicado.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Estudiar *in vitro* si la vía transduccional proteína kinasa B/mTOR es activada por IGF-1 en cardiomiocitos expuestos a estrés nutricional

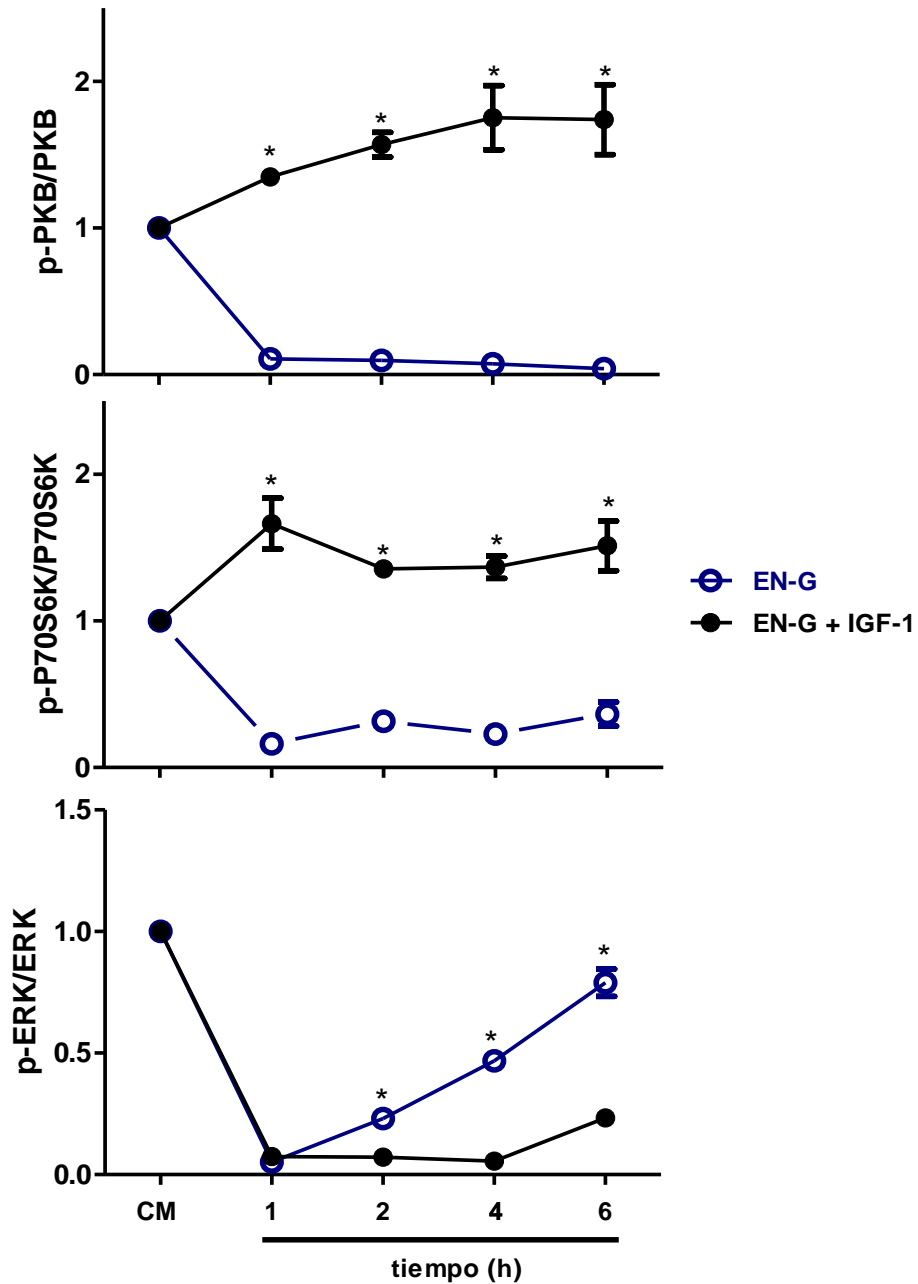
Las vías transduccionales activadas por IGF-1 involucra en forma secuencial la unión del ligando a la subunidad  $\alpha$  del receptor, autofosforilación de la subunidad  $\beta$  del receptor en tirosina y transfosforilación del IRS-1 y posterior activación de los nodos transduccionales PI3-K y PKB/mTOR (62). La otra vía activada por IGF-1 es c-Raf-MEK1-ERK1/2 a través de la proteína Shc (63). En este trabajo el primer evento evaluado fue el nodo transduccional PKB/mTOR en los cardiomiocitos expuestos a estrés nutricional. Con este fin, cardiomiocitos en cultivo se expusieron a estrés nutricional por privación de suero y glucosa (EN-G) en presencia y ausencia de IGF-1 entre 1 y 6 h. La Figura 6 muestra que el EN-G disminuyó la fosforilación de la proteína PKB y p70-S6K (proteína sustrato río abajo de mTOR) mientras que IGF-1 previno tal disminución en los cardiomiocitos sometidos a estrés nutricional. En el caso de la proteína kinasa ERK1, el estrés nutricional generó un aumento temporal en su fosforilación, observándose un ligero retardo temporal de esta fosforilación por acción del IGF-1 (Figura 7). Adicionalmente, se investigó si el IGF-1 sobre la vía PKB/mTOR también ocurría en cardiomiocitos expuesto al otro estrés nutricional, como fue la privación de suero y aminoácidos (EN-A). La Figura 8 muestra que el EN-A también disminuyó la fosforilación de la proteínas kinasas PKB y p70-S6K y que IGF-1 sólo previno el efecto sobre PKB y sorpresivamente no sobre p70-S6K en los cardiomiocitos expuestos a EN-A. En el caso de la vía transduccional ERK1, EN-A disminuyó la fosforilación basal de ERK1 (Figura 9). Dado los efectos de IGF-1 en activar la vía transduccional PKB/mTOR el siguiente paso fue evaluar si esta activación manifiesta cambios en la actividad metabólica de los cardiomiocitos expuestos al estrés nutricional.



**Figura 6. Vías transduccionales activadas por IGF-1 en cardiomiocitos expuestos a estrés nutricional por privación de suero y glucosa**

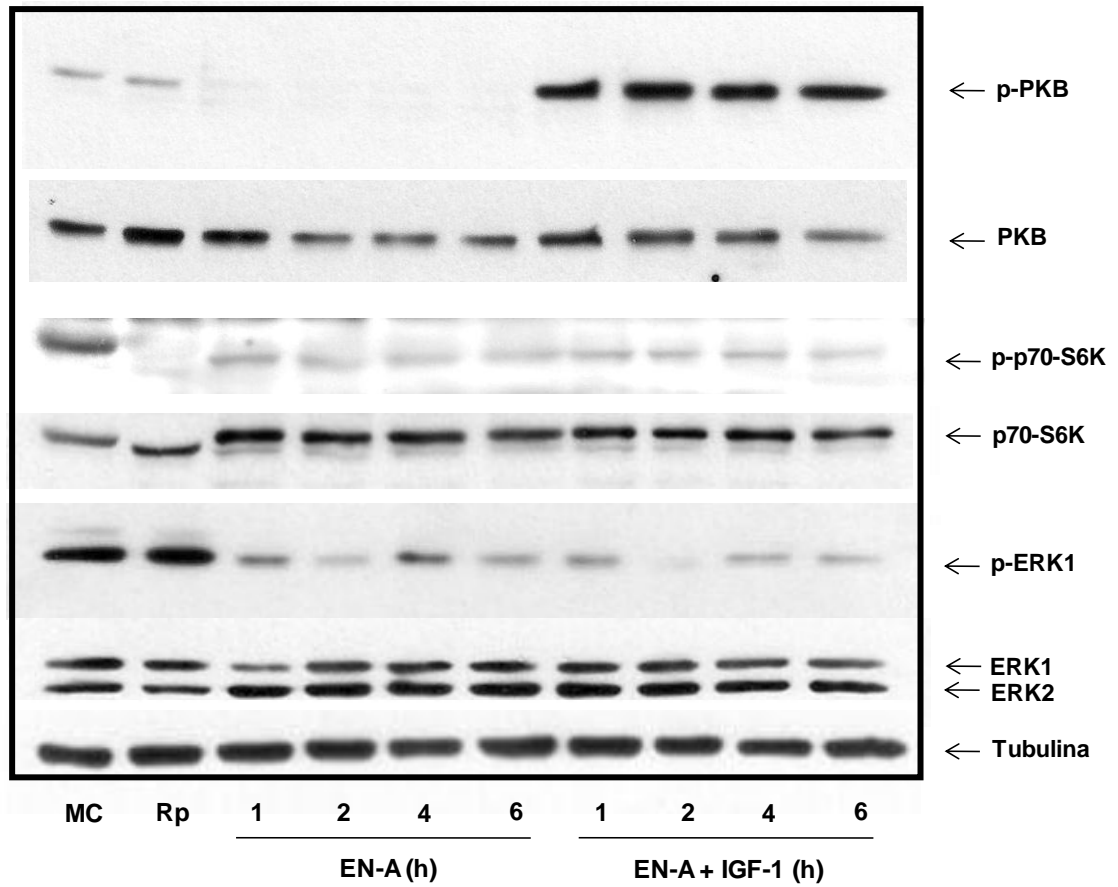
Las células se incubaron entre 1-6 h en medio completo (MC) o se expusieron a estrés nutricional por privación de suero y glucosa (EN-G) o rapamicina (Rp, 100 nM) en presencia o ausencia de IGF-1 (10 nM). Se prepararon lisados celulares y los niveles de las formas fosforiladas y totales de PKB, ERK y p70-S6K se determinaron por Western blot así como también los de tubulina. Imagen representativa de tres experimentos independientes.





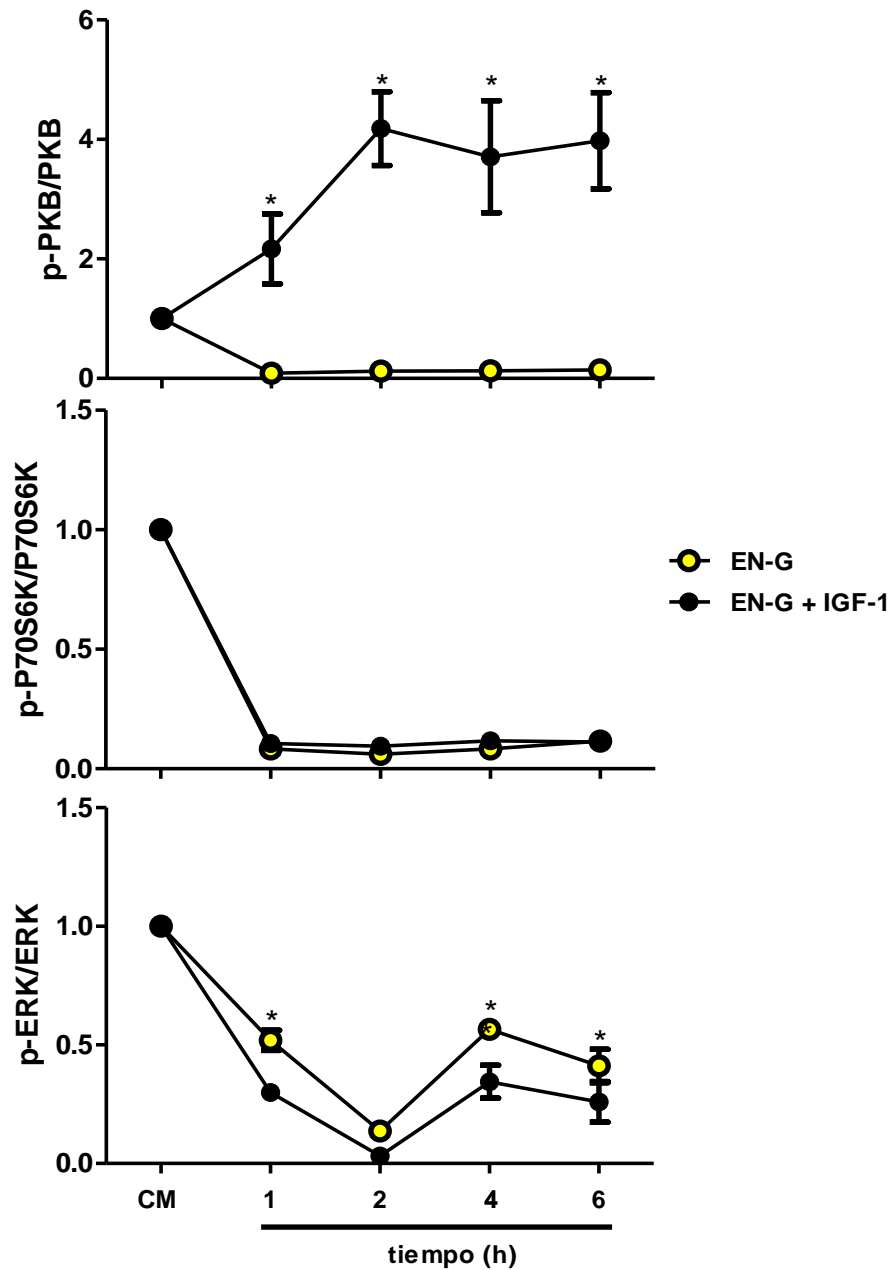
**Figura 7. Cuantificación de las vías transduccionales activadas por IGF-1 en cardiomiocitos expuestos a estrés nutricional por privación de suero y glucosa**

Las células se incubaron entre 1-6 h en medio completo (MC) o se expusieron a estrés nutricional por privación de suero y glucosa (EN-G) o rapamicina (Rp, 100 nM) en presencia o ausencia de IGF-1 (10 nM). Se prepararon lisados celulares y los niveles de las formas fosforiladas y totales de PKB, ERK y p70-S6K se determinaron por Western blot así como también los de tubulina. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM, (n=3), ANOVA de dos vías \*p < 0,05 vs estímulo.



**Figura 8. Vías transduccionales activadas por IGF-1 en cardiomiocitos expuestos a estrés nutricional por privación de suero y aminoácidos**

Las células se incubaron entre 1-6 h en medio completo (MC) o se expusieron a estrés nutricional por privación de suero y aminoácidos (EN-A) o rapamicina (Rp, 100 nM) en presencia o ausencia de IGF-1 (10 nM). Se prepararon lisados celulares y los niveles de las formas fosforiladas y totales de PKB, ERK y p70-S6K se determinaron por Western blot así como también los de tubulina. Imagen representativa de tres experimentos independientes.



**Figura 9. Cuantificación de las vías transduccionales activadas por IGF-1 en cardiomiocitos expuestos a estrés nutricional por privación de suero y aminoácidos**

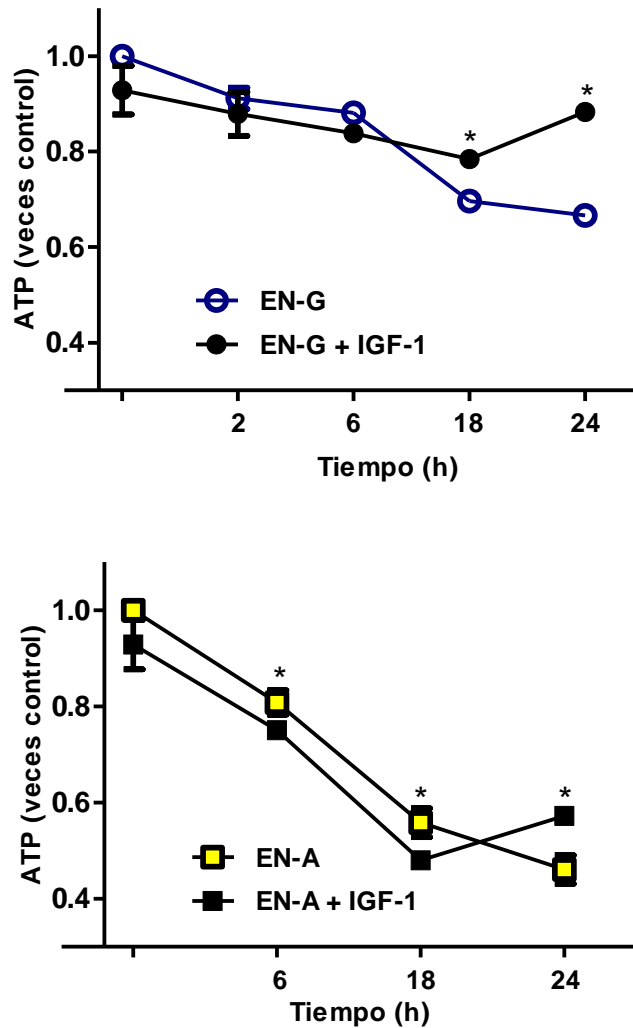
Las células se incubaron entre 1-6 h en medio completo (MC) o se expusieron a estrés nutricional por privación de suero y aminoácidos (EN-A) o rapamicina (Rp, 100 nM) en presencia o ausencia de IGF-1 (10 nM). Se prepararon lisados celulares y los niveles de las formas fosforiladas y totales de PKB, ERK y p70-S6K se determinaron por Western blot así como también los de tubulina. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM, (n=3), ANOVA de dos vías \*p < 0,05 vs estímulo.

## **7.2. Investigar *in vitro* el efecto del IGF-1 en el metabolismo y viabilidad del cardiomiocito expuesto a estrés nutricional**

### **7.2.1. Efecto del IGF-1 en metabolismo celular**

Uno de los efectos obvios del estrés nutricional por privación de nutrientes es a nivel del metabolismo celular. Para evaluar si IGF-1 modifica los cambios metabólicos inducidos por el estrés nutricional se estudiaron los siguientes parámetros: niveles intracelulares de ATP, actividad reductasa MTT y potencial de la membrana mitocondrial.

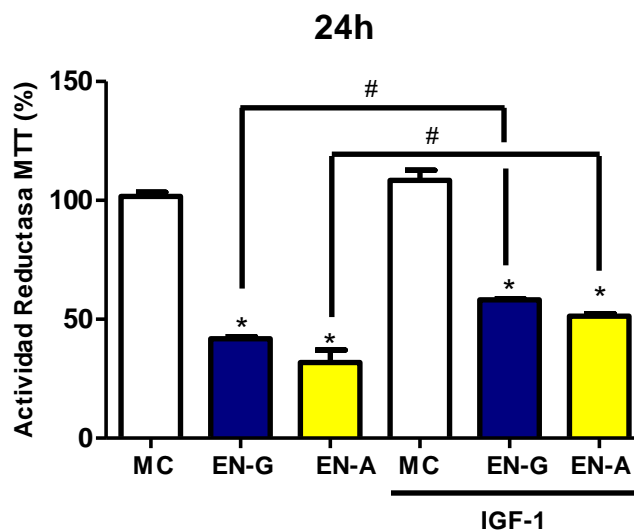
La Figura 10 muestra que el EN-G disminuyó los niveles intracelulares de ATP desde las 2 primeras horas de estímulo, observándose una caída del 30% a las 24 h. IGF-1 produjo una recuperación significativa de estos niveles, registrándose este efecto ya desde las 18 h. Por otra parte, el EN-A disminuyó aún más los niveles intracelulares de ATP, encontrándose una reducción cercana al 50% a las 24 h. La Figura 10 muestra que IGF-1 también produjo una recuperación significativa (cercana al 10%) en los niveles intracelulares de ATP a las 24 h.



**Figura 10. Efecto del IGF-1 en los niveles intracelulares de ATP de cardiomiocitos expuestos a estrés nutricional por privación de suero/glucosa o suero/aminoácidos**

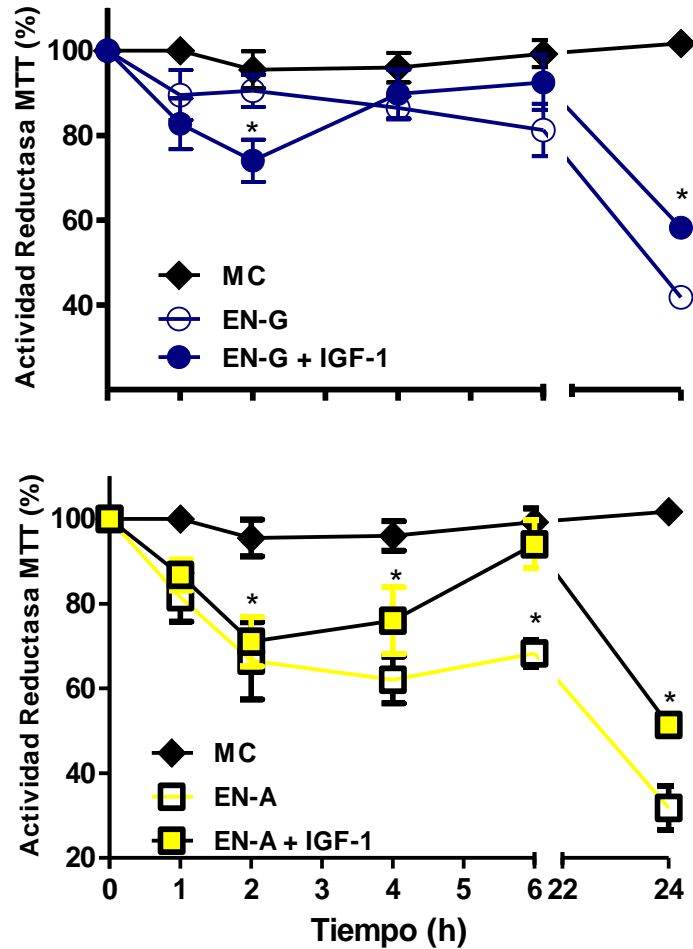
Los niveles de ATP se determinaron en cardiomiocitos incubados entre 2 y 24 h en cardiomiocitos con medio completo (MC) o expuestos a estrés nutricional por privación de suero y glucosa (EN-G) o de suero y aminoácidos (EN-A) en presencia o ausencia de IGF-1 (10 nM). Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM, (n=4). ANOVA de dos vías \* $p < 0,05$  vs MC.

La reducción del MTT es una técnica ampliamente utilizada para evaluar viabilidad celular basada en la capacidad de las mitocondrias para reducir la sal de tetrazolium MTT. En general en estos casos, el porcentaje de la actividad reductasa correlaciona directamente con el número de células viables (91). En nuestro estudio se evaluó el efecto del IGF-1 en la capacidad de los cardiomiocitos expuestos a estrés nutricional para reducir al MTT. Los resultados mostraron que tanto la exposición de los cardiomiocitos por 24 h al EN-G o al EN-A disminuyó significativamente la actividad reductasa celular en relación a las células cultivadas en medio completo. IGF-1 revirtió significativamente esta caída, independientemente del estrés nutricional utilizado (Figura 11). Además como en nuestro caso, el estímulo tiene un efecto directo en el metabolismo celular, se evaluó la reducción del MTT dentro las primeras 6 h de estrés nutricional para disminuir el efecto de la pérdida de células viables. La Figura 12 muestra que dentro las primeras 6 h sólo el EN-A disminuyó significativamente la actividad reductasa celular, siendo revertida por IGF-1 a las 4 h de estímulo y llevándola a los niveles del control a las 6 h. En el caso del EN-G no hubo diferencias significativas.



**Figura 11. Efecto del IGF-1 en los cambios inducidos por el estrés nutricional por 24 h en la actividad reductasa MTT**

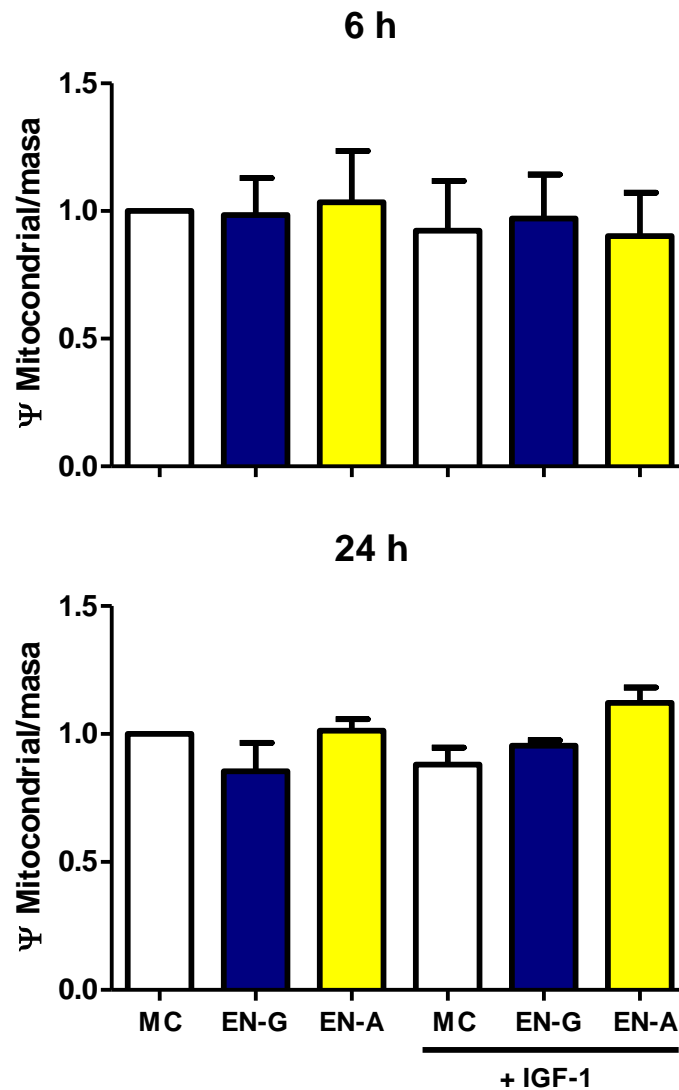
La actividad reductasa se determinó en cardiomiocitos cultivados por 24 h en medio completo (MC) o expuestos a estrés nutricional por privación de suero y glucosa (EN-G) o por privación de suero y aminoácidos (EN-A) en presencia o ausencia de IGF-1 (10 nM). Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM, (n=3). ANOVA \* $p < 0,05$  vs MC y # $p < 0,05$  vs estímulo.



**Figura 12. Efecto agudo del estrés nutricional en la actividad reductasa MTT**

La actividad reductasa se determinó por la reducción de MTT en cardiomiocitos cultivados hasta por 6 h con medio completo (MC) o expuestos a estrés nutricional por privación de suero y glucosa (EN-G) o por privación de suero y aminoácidos (EN-A) en presencia o ausencia de IGF-1 (10 nM). Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM, (n=4). ANOVA de dos vías \*p < 0,05 vs MC.

También se evaluó el potencial mitocondrial en los cardiomiocitos sometidos a estrés nutricional. Los resultados muestran que los dos tipos de estrés nutricional no presentaron diferencias significativas respecto a las células cultivadas en medio completo por 6 y 24 h (Figura 13).



**Figura 13. Efectos de la privación de suero/glucosa e IGF-1 en el potencial mitocondrial de cardiomiocitos en cultivo**

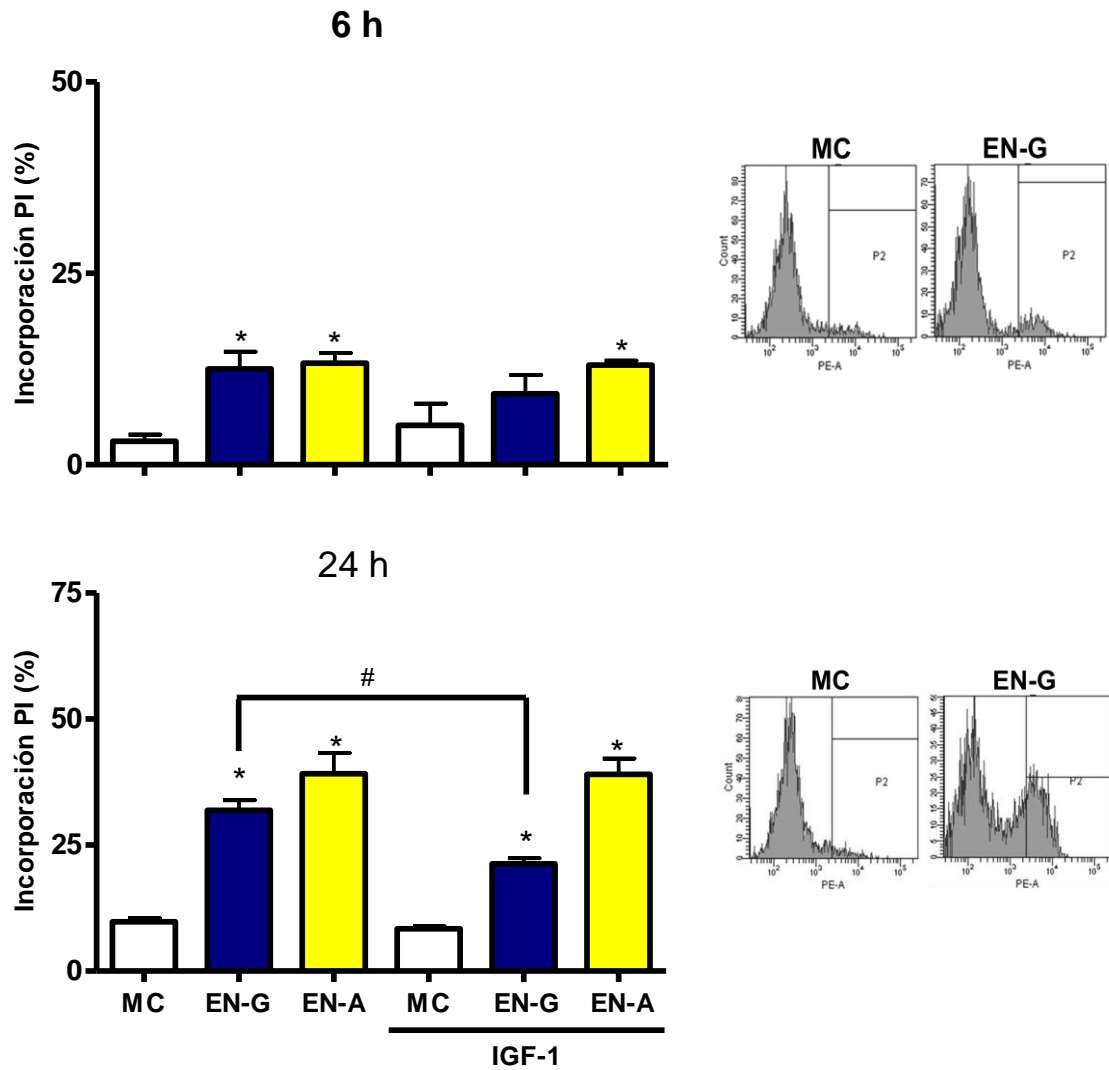
El potencial mitocondrial se determinó en cardiomiocitos cultivados por 6 y 24 h en medio completo (MC) o expuestos a estrés nutricional por privación de suero y glucosa (EN-G) en presencia o ausencia de IGF-1 (10 nM). Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM, (n=4). ANOVA.



### **7.2.2. Efecto del IGF-1 en la muerte del cardiomiocito inducida por estrés nutricional**

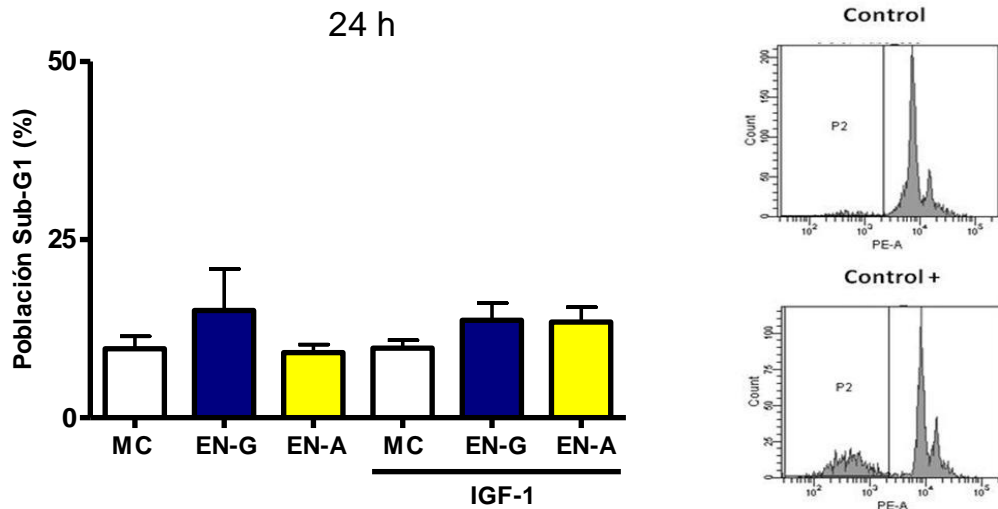
Para determinar si el estrés nutricional inducía muerte celular, los cardiomiocitos se privaron de nutrientes por 6 ó 24 h y se determinó la viabilidad por la capacidad de las células vivas de excluir el PI. Los resultados mostrados en la Figura 14 indican que el estrés nutricional por 6 h aumentó significativamente la incorporación de PI en un 10% tanto el EN-G como el EN-A. La privación de nutrientes por EN-G y EN-A por 24 h aumentó en un 30 y 40% aproximadamente la incorporación de PI, respectivamente (Figura 12). Sin embargo, IGF-1 disminuyó la incorporación de PI sólo en los cardiomiocitos expuestos a EN-G (Figura 14).

Para determinar si los cardiomiocitos sometidos a estrés nutricional mueren por apoptosis se evaluó la población sub-G1 por citometría de flujo en células permeabilizadas e incubadas con PI. Los resultados mostrados en la Figura 15 indican que el estrés nutricional no aumentó la población sub-G1. Para confirmar ese hallazgo y descartar el desarrollo de apoptosis, los cardiomiocitos se expusieron a estrés nutricional previo tratamiento con el inhibidor general de caspasas Z-VAD. La Figura 16 muestra que Z-VAD no tuvo efecto en la incorporación de PI inducida por estrés nutricional. Estos resultados concordaron con la ausencia de procesamiento de caspasa 3 en cardiomiocitos expuestos a EN-G entre 0 y 24 h (Figura 17). Colectivamente estos datos sumados a aquellos de ausencia de efecto del estrés nutricional sobre el potencial de membrana mitocondrial (Figura 13), sugieren que la apoptosis no es el mecanismo de muerte que explica la pérdida de viabilidad observada en los cardiomiocitos expuestos a estrés nutricional.



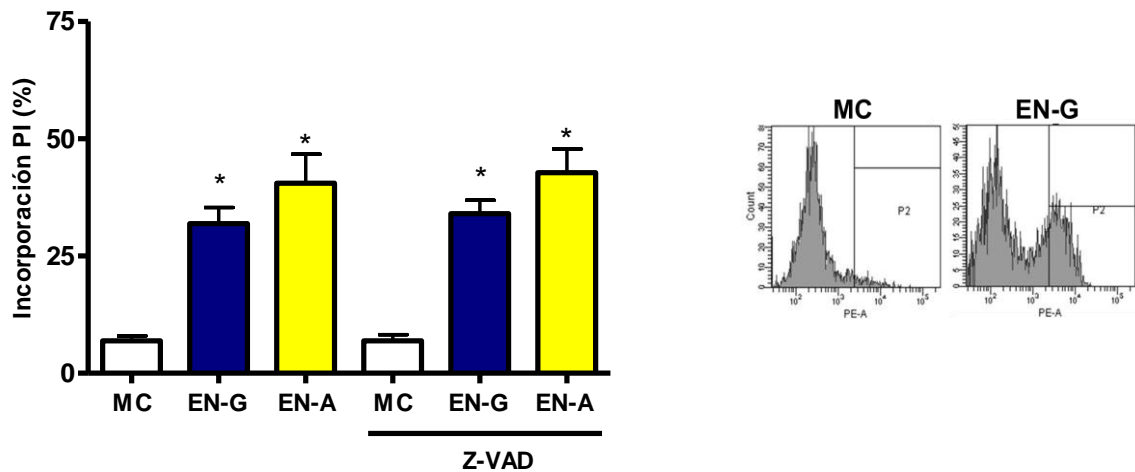
**Figura 14. Efecto del IGF-1 en la muerte inducida por estrés nutricional**

Los cardiomiocitos se cultivaron por 6 y 24 h con medio completo (MC) o se expusieron por los mismos tiempos a estrés nutricional por privación de suero y glucosa (EN-G) o de suero y aminoácidos (EN-A) en presencia o ausencia de IGF-1 (10 nM) y se evaluó su viabilidad mediante la incorporación de yoduro de propidio (PI) a células vivas y posterior análisis por citometría de flujo. Las imágenes muestran un histograma representativo que muestra el aumento de la población celular en P2 como característica de la incorporación del marcador fluorescente PI. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM, (n=5), ANOVA \* $p < 0,05$  vs MC y # $p < 0,05$  vs estímulo.



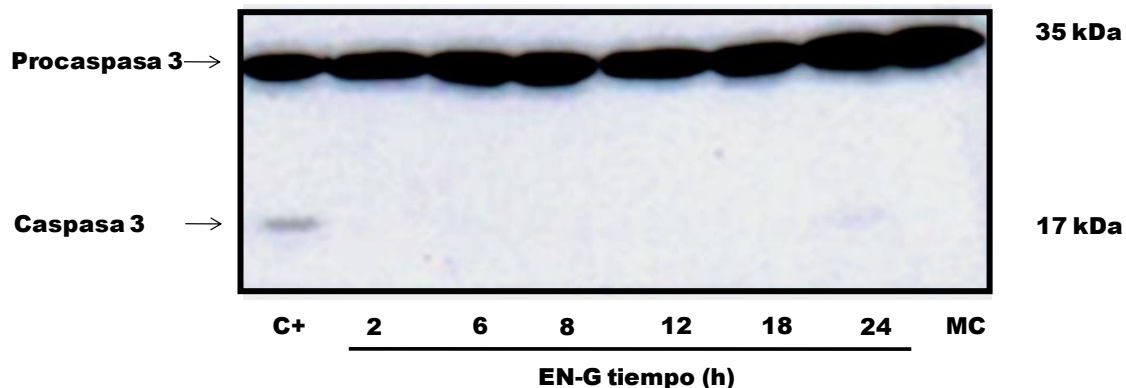
**Figura 15. Efecto de la privación de nutrientes e IGF-1 en la apoptosis**

Cardiomiocitos neonatos estimulados por 24 h con medio completo (MC), sometidos a estrés nutricional por privación de suero y glucosa (EN-G), sometidos a estrés nutricional por privación de suero y aminoácidos (EN-A) en presencia o ausencia de IGF-1 (10 nM). Para determinar la apoptosis, las células se fijaron y permeabilizaron en etanol y se incubaron en yoduro de propidio, por citometría de flujo se evaluó la disminución de la fluorescencia (población sub-G1). Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM, (n=5), ANOVA.



**Figura 16. Efecto del IGF-1 en la muerte producida por privación de nutrientes**

Cardiomiocitos estimulados por 24 h con medio completo (MC), sometidos a estrés nutricional por privación de suero y glucosa (EN-G), sometidos a estrés nutricional por privación de suero y aminoácidos (EN-A) en presencia o ausencia de Z-VAD. La incorporación de PI se evaluó por citometría de flujo por exclusión de yoduro de propidio en células vivas. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM, (n=5), ANOVA \* $p < 0,05$  vs MC.



**Figura 17. Efecto del estrés nutricional por privación de suero y glucosa en el procesamiento de caspasa 3**

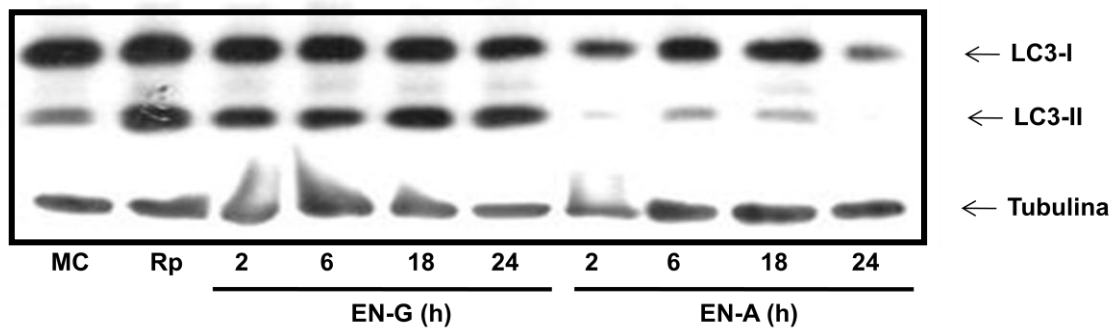
Cardiomiocitos se cultivaron en medio completo por 24 h (MC) o se expusieron entre 2 y 24 h a estrés nutricional por privación de suero y glucosa (EN-G) o por 2 h a estrés hiperósmotico (control positivo, C+). El procesamiento de la caspasa 3 se estudió por Western blot en la forma indicada en Materiales y Métodos. Imagen representativa de 3 experimentos independientes.

### **7.3. Determinar *in vitro* si el IGF-1 regula negativamente la autofagia inducida por estrés nutricional**

#### **7.3.1. Estudiar *in vitro* si el estrés nutricional inducido por privación suero/glucosa o suero/aminoácidos induce autofagia en el cardiomiocito**

Para evaluar si el estrés nutricional por privación de suero/glucosa o de suero/aminoácidos induce la autofagia de cardiomiocitos neonatos de rata, se utilizó la proteína LC3 o Atg 8 endógena o exógena unida a GFP como marcador de este proceso. Esta proteína experimenta modificaciones post-traduccionales antes de unirse a la membrana del autofagosoma. Inmediatamente después de su síntesis, 22 ó 5 aminoácidos en la rata y el humano se remueven de su extremo carboxilo terminal, respectivamente, por acción de la proteasa Atg 4. La forma resultante se denomina LC3-I, la cual reside principalmente en el citosol. Luego de la activación por Atg 7, LC3-I se une a Atg 3, la cual le transfiere el lípido fosfoetanolamina. El producto final llamado LC3-II se asocia a la membrana naciente de la vacuola autofágica y permanece unido a la membrana después de haberse completado la formación del

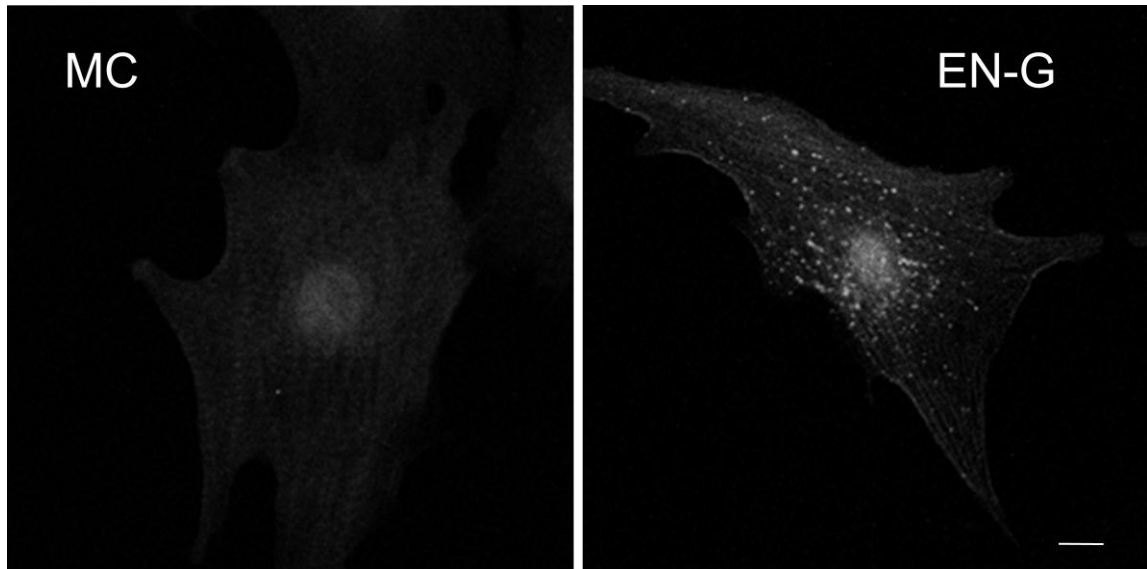
autofagosoma (13). Para evaluar si el estrés nutricional inducía el procesamiento de la LC3-I endógena como marcador de autofagia, los cardiomiocitos se expusieron a estrés nutricional entre 2 y 24 h. La Figura 18 muestra que sólo el EN-G indujo un procesamiento de la proteína LC3-I similar al observado por rapamicina (conocido inductor de autofagia). El EN-A presentó un menor procesamiento de la proteína LC3-I (Figura 18).



**Figura 18. Efecto del estrés nutricional en el procesamiento de LC3-I endógeno**

Cardiomiocitos neonatos se cultivaron entre 2 y 24 h con medio completo (MC) o se expusieron a estrés nutricional por privación de suero y glucosa (EN-G) o de suero y aminoácidos (EN-A) o se trataron con Rapamicina (Rp). Después de preparar extractos proteicos, el procesamiento de la proteína LC3-I a LC3-II (marcador de autofagia) se determinó por Western blot en la forma indicada en Materiales y Métodos. Imagen representativa de resultados idénticos.

Debido a que la cantidad de LC3-II se correlaciona con el número de autofagosomas, la proteína GFP-LC3 exógena se ha constituido como un marcador bioquímico confiable para predecir la actividad autofágica en células animales (15). Esta proteína se expresa mediante la transducción de las células con un plasmidio o un adenovirus que porta el gen quimérico GFP-LC3 y permite a través de microscopía de fluorescencia estimar la inducción de autofagia mediante la redistribución de la proteína GFP-LC3 desde un patrón difuso a uno punteado. La Figura 19 muestra que en los cardiomiocitos previamente transducidos con el adenovirus GFP-LC3 (MOI = 30) y expuestos a estrés nutricional por privación de suero/glucosa por 6 h se observó un significativo aumento de puntos verdes que representa las vacuolas que tienen unidas las proteínas GFP-LC3-II respecto a la situación control (cardiomiocitos transducidos con Ad-GFP-LC3 e incubados con medio completo (MC)).



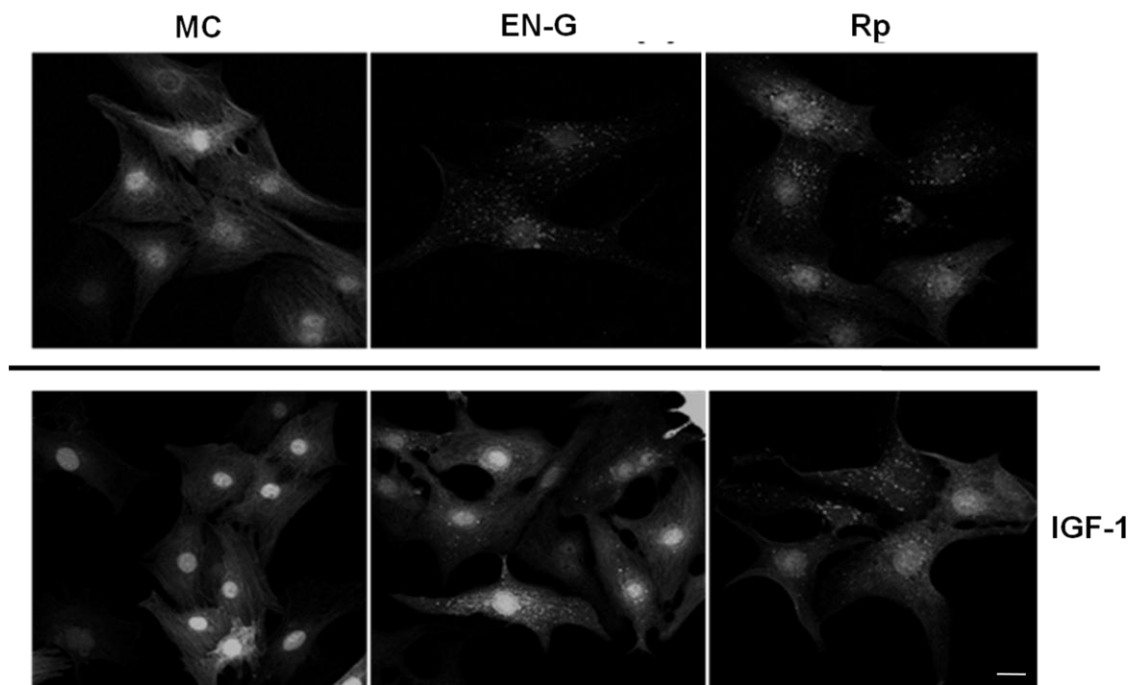
**Figura 19. Presencia de vacuolas autofágicas en cultivos primarios de cardiomiocitos expuestos a estrés nutricional por privación de suero/glucosa**

Las células se transdujeron por 24 h con un adenovirus GFP (proteína fluorescente verde) unido a LC3 (GFP-LC3) y luego se cultivaron en medio completo (MC) o se expusieron a estrés nutricional por privación de suero y glucosa (EN-G) por 6 h. En las células control (MC) se observa distribución homogénea de la proteína GFP-LC3. En cambio, en los cardiomiocitos sometidos a EN-G se observa redistribución del GFP a un patrón punteado, dando cuenta de formación de vacuolas autofágicas enriquecidas en proteína GFP-LC3-II, (n=4). Barra 10  $\mu\text{m}$ .

### 7.3.2. Efecto del IGF-1 en la autofagia inducida por estrés nutricional

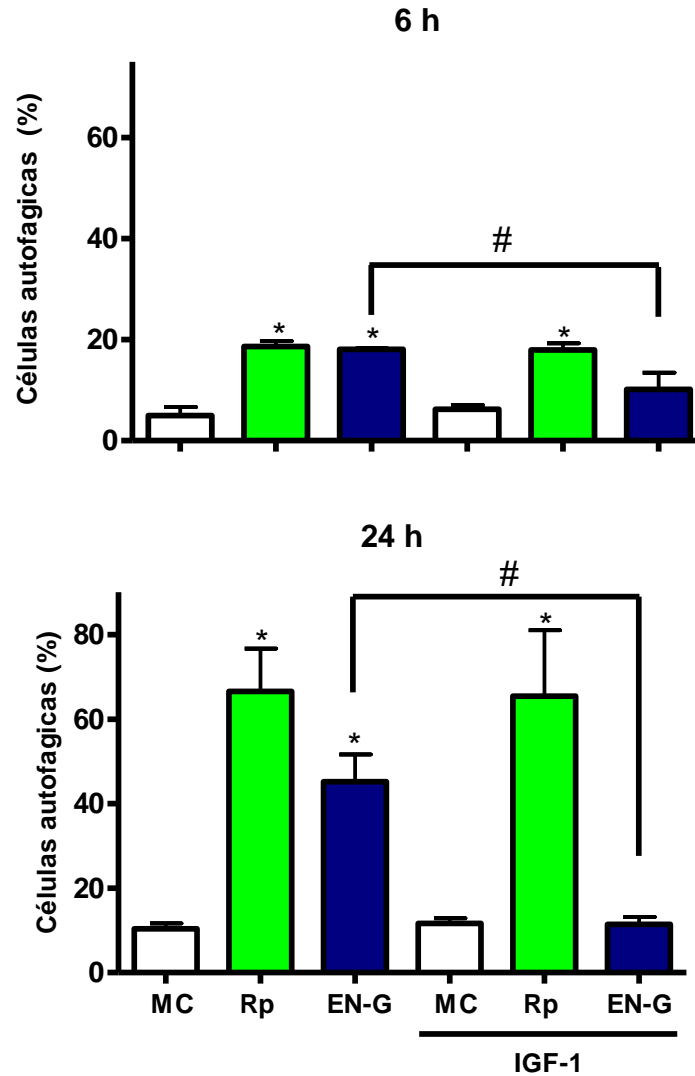
Para evaluar el efecto del IGF-1 en la autofagia inducida por estrés nutricional, cultivos primarios de cardiomiocitos de rata se transdujeron con Ad-GFP-LC3 (MOI 30) por 24 h. Luego los cardiomiocitos se cultivaron por 6 ó 24 h en medio completo y se expusieron a rapamicina (inhibidor de mTOR e inductor de autofagia) y sólo a estrés nutricional por privación de suero/glucosa por o con o sin IGF-1 (10 nM, preincubado por 1 h). Se descartó el uso del estrés nutricional por privación de glucosa/aminoácidos por no presentar efectos en el procesamiento del LC3-I que indicaran la inducción de autofagia. Luego se contaron aproximadamente 150 células por condición y se clasificaron en positivas o negativas para autofagia. Las Figuras 20 y 21 muestran imágenes representativas y las cuantificaciones de las distintas condiciones

experimentales ensayadas, respectivamente. La cuantificación de la autofagia muestra que a las 6 y 24 h hubo un aumento significativo del patrón de autofagia en cardiomiocitos expuestos a estrés nutricional por privación de suero/glucosa o a rapamicina en relación a los que se mantuvieron en medio completo. IGF-1 previno significativamente la autofagia en los cardiomiocitos expuestos a EN-G por 6 ó 24 h. Sin embargo, en los cardiomiocitos estimulados con rapamicina, IGF-1 no inhibió la autofagia. Estos resultados sugieren que el efecto inhibitor del IGF-1 sobre la inducción de la autofagia por estrés nutricional es a través de la proteína kinasa mTOR (Figura 21).



**Figura 20. Efecto del IGF-1 en la autofagia inducida por estrés nutricional o rapamicina**

Fotos representativas de cardiomiocitos neonatos transducidos con el Ad-GFP-LC3 (MOI 30) en medio completo (MC) o expuestos a estrés nutricional por privación de suero y glucosa (EN-G) o tratados con Rapamicina (Rp, 100 nM) en presencia o ausencia de IGF-1 (10 nM) por 24 h. (n=4). Barra 10  $\mu$ m.

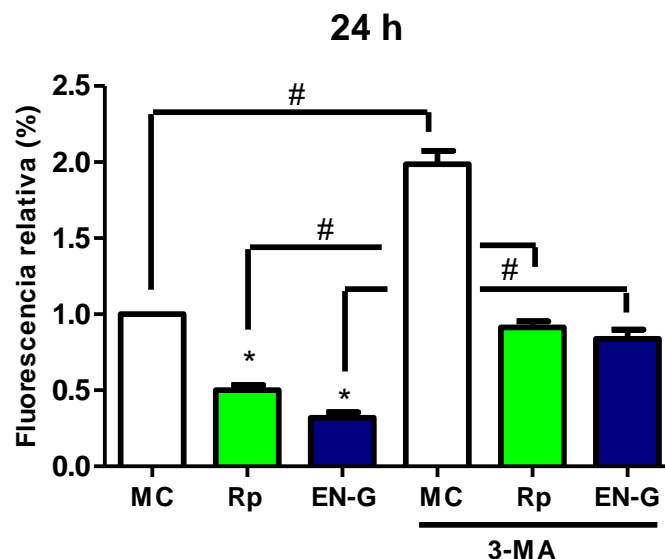


**Figura 21. Efecto del IGF-1 en la autofagia inducida por estrés nutricional**

Cardiomiocitos neonatos transducidos con el Ad-GFP-LC3 (MOI 30) se incubaron por 6 ó 24 h con medio completo (MC) o se expusieron a estrés nutricional por privación de suero/glucosa (EN-G) o tratados con Rapamicina (Rp, 100 nM) en presencia o ausencia de IGF-1 (10 nM). Los gráficos representan la cuantificación promedio de células con patrón autofágica. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM, (n=4), ANOVA \* $p < 0,05$  vs MC y # $p < 0,05$  vs estímulo.

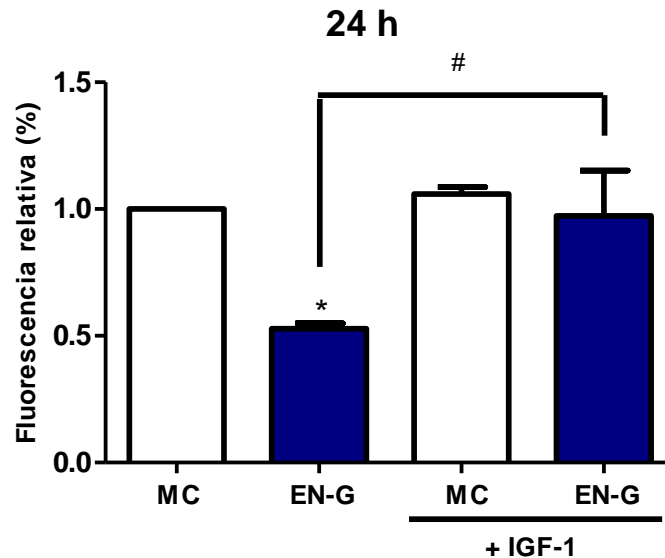


Como la autofagia es un proceso catabólico, una de las aproximaciones experimentales para su evaluación es la degradación de proteínas. La proteína LC3 se incorpora en el autofagosoma y se ha demostrado que células que expresan GFP-LC3 presentan una disminución de la intensidad de fluorescencia durante la privación de nutrientes, determinado por citometría de flujo (93). En base a este trabajo se evaluó la autofagia en cardiomiocitos transducidos con Ad-GFP-LC3, utilizando la disminución de la intensidad de fluorescencia determinada por citometría de flujo. Se utilizó 3-metiladenina (3-MA, inhibidor de la inducción de la autofagia) para evaluar si la disminución en el contenido celular de GFP-LC3 era debido a la degradación por autofagia. Los resultados muestran que la fluorescencia relativa del GFP-LC3 disminuyó en los cardiomiocitos expuestos a EN-G, proceso que fue inhibido por 3-MA. Estos hallazgos muestran que la autofagia inducida por estrés nutricional por privación de suero/glucosa estimuló la degradación de la proteína GFP-LC3 (Figura 22), siendo este efecto prevenido significativamente por IGF-1 (Figura 23).



**Figura 22. Efectos del estrés nutricional por privación de suero/glucosa y 3-metiladenina en la degradación de GFP**

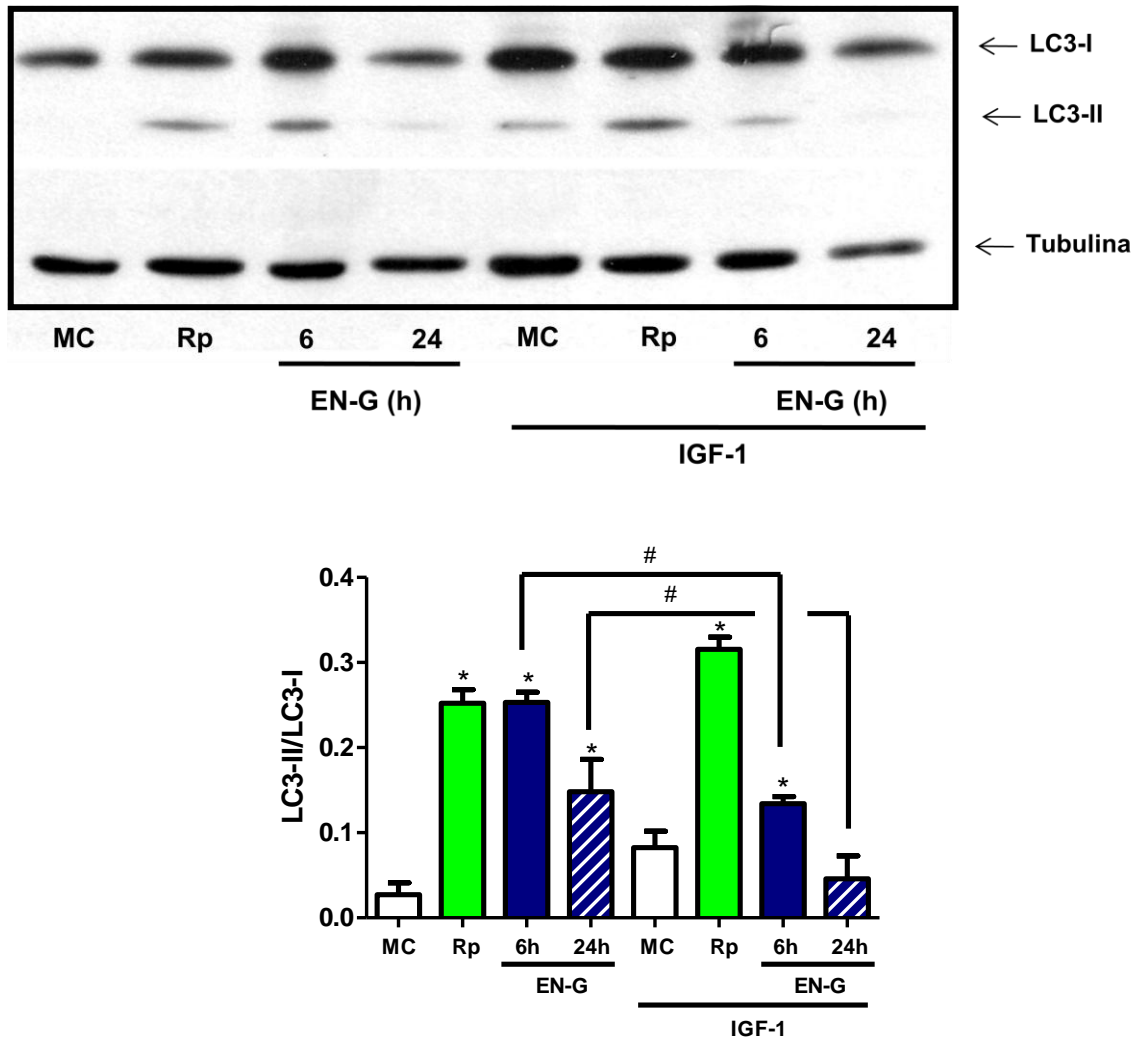
Cardiomiocitos neonatos transducidos con el Ad GFP-LC3 (MOI 30) se incubaron por 24 h con medio completo (MC) o se expusieron a estrés nutricional por privación de suero y glucosa (EN-G) o Rapamicina (Rp, 100 nM) en presencia o ausencia de 3-MA (10 mM). Luego se determinó la degradación de la proteína GFP por citometría de flujo en la forma indicada en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM, (n=4), ANOVA \*p < 0,05 vs MC y #p < 0,05 vs estímulo.



**Figura 23. Efecto del IGF-1 en la degradación de GFP inducida por estrés nutricional por privación de suero/glucosa.**

Cardiomiocitos neonatos transducidos con el Ad-GFP-LC3 (MOI 30) se cultivaron por 24 h con medio completo (MC) o se expusieron a estrés nutricional por privación de suero y glucosa (EN-G) en presencia o ausencia de IGF-1 (10 nM). Posteriormente la degradación de la proteína GFP se determinó por citometría de flujo en la forma indicada en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM, (n=4.), ANOVA \* $p < 0,05$  vs MC y # $p < 0,05$  vs estímulo.

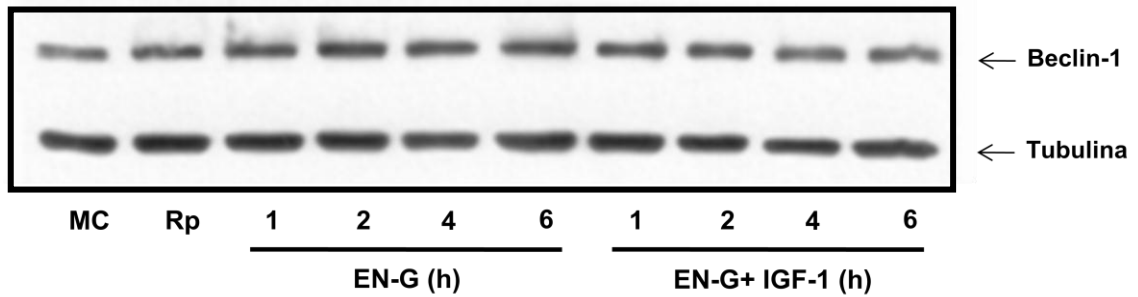
Tal como se mencionó previamente, otra manera de evaluar la autofagia en el sistema es el procesamiento de la proteína LC3-I a LC3-II por Western blot. La Figura 24 muestra el procesamiento de la proteína LC3-I en los cardiomiocitos expuestos a EN-G o rapamicina, evidenciándose un aumento en el procesamiento de la proteína LC3, lo que correlaciona con el aumento de autofagia (3). La misma Figura 24 indica que a las 6 y 24 h IGF-1 inhibió parcialmente el procesamiento del LC3-I inducido por estrés nutricional por privación de suero/glucosa.



**Figura 24. Efecto del IGF-1 en el procesamiento de LC3-I inducido por estrés nutricional por privación de suero/glucosa.**

Cardiomiocitos neonatos incubados por 6 ó 24 h con medio completo (MC) o expuestos a estrés nutricional por privación de suero/glucosa (EN-G) o a Rapamicina (Rp, 100 nM) en presencia o ausencia de IGF-1 (10 nM). Después de preparar los extractos proteicos, el procesamiento de la proteína LC3-I se determinó por Western blot en la forma indicada en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM, (n=3), ANOVA \* $p < 0,05$  vs MC y # $p < 0,05$  vs estímulo.

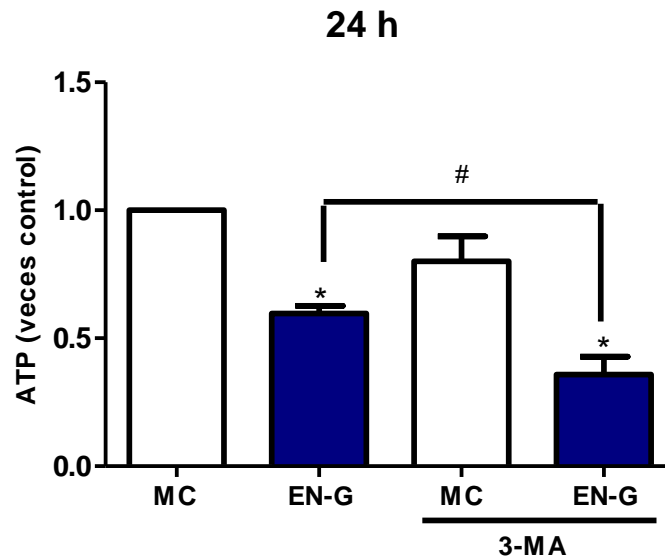
Uno de los complejos reguladores de la formación del autofagosoma es el formado por Beclin, PI3K y Bcl-2. Como aproximación se evaluó si los niveles de Beclin eran modificados por los estímulos o IGF-1. Los resultados muestran que no hay cambios significativos en los niveles de Beclin-1 por el estrés nutricional (Figura 25).



**Figura 25. Efecto de la privación de nutrientes en los niveles de Beclin-1**

Cardiomiocitos neonatos incubados entre 1 y 6 h con medio completo (MC) o expuestos a estrés nutricional por privación de suero/glucosa (EN-G) o a Rapamicina (Rp, 100 nM) en presencia o ausencia de IGF-1 (10 nM). Después de preparar los extractos proteicos, los niveles de beclin-1 y tubulina se determinaron por Western blot en la forma indicada en Materiales y Métodos. Imagen representativa de 3 experimentos independientes.

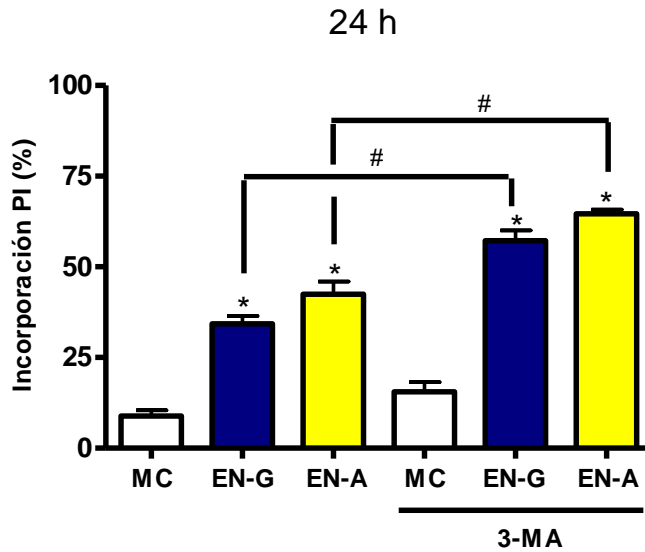
Los niveles de ATP intracelulares se determinaron para evaluar el estado energético celular de los cardiomiocitos expuestos a estrés nutricional. Para evaluar si la autofagia era importante en la mantención de los niveles intracelulares de ATP, se utilizó 3-MA. Los resultados mostraron que al usar esta estrategia experimental la caída en los niveles de ATP era mayor, mostrando el papel de la autofagia en la mantención de los niveles de ATP en un rango que son compatibles con la vida (Figura 26).



**Figura 26. Efecto del estrés nutricional por privación de suero/glucosa y de 3-metiladenina en los niveles intracelulares de ATP**

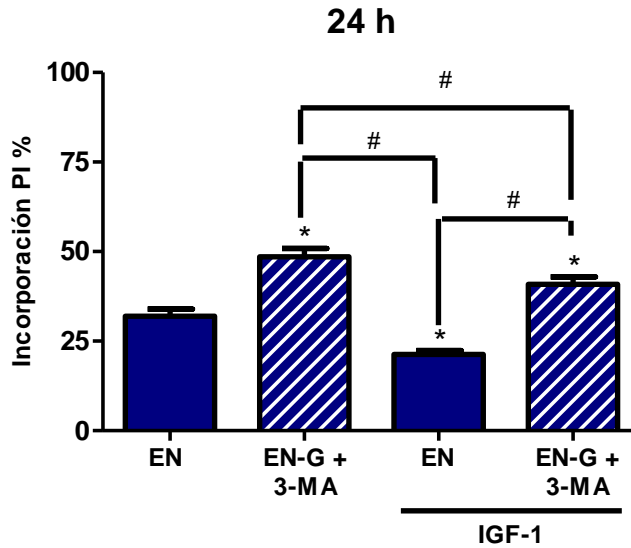
Los niveles de ATP se determinaron en cardiomiocitos neonatos incubados por 24 h con medio completo (MC) o expuestos a estrés nutricional por privación de suero/glucosa (EN-G), en presencia o ausencia de 3-MA (10 mM). Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM, (n=4). ANOVA \*p<0,05 vs MC y #p<0,05 vs estímulo.

Hoy en día está en pleno debate si la autofagia también es un mecanismo de muerte programada de tipo II, la cual ha sido caracterizada principalmente por ser independiente de caspasas. Dentro de este tipo de muerte, la autofagia se presenta como un mecanismo de muerte debido a las características morfológicas presentes, células muertas sin fragmentación del DNA y sin permeabilización de la membrana plasmática, pero con un gran contenido de vacuolas autofágicas (28). Nuestros resultados muestran que el estrés nutricional induce una disminución de la viabilidad. Para evaluar si esta pérdida de viabilidad era causada por autofagia, los cardiomiocitos se expusieron a estrés nutricional en presencia o ausencia del inhibidor autofágico 3-MA. La Figura 27 muestra que la inhibición de la autofagia incrementa la muerte, demostrando que la autofagia inducida por privación de nutrientes es necesaria para mantener la viabilidad celular. Sin embargo, IGF-1 un factor que protege significativamente de la muerte celular inducida por EN-G, este efecto protector es independiente de la autofagia (Figura 28).



**Figura 27. Efecto de la 3-metiladenina en la muerte producida por privación de nutrientes**

Cardiomiocitos se cultivaron por 24 h en medio completo (MC) o se expusieron a estrés nutricional por privación de suero y glucosa (EN-G) o de suero y aminoácidos (EN-A) en presencia o ausencia de 3-MA. Luego se agregó yoduro de propidio (PI) y se determinó su incorporación a células vivas por citometría de flujo en la forma indicada en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM, (n=5), ANOVA \*p < 0,05 vs MC y #p<0,05 vs estímulo.



**Figura 28. Efecto del IGF-1 y 3-metiladenina en la muerte producida por privación de nutrientes**

Cardiomiocitos se incubaron por 24h con medio completo (MC) o se expusieron a estrés nutricional por privación de suero/glucosa (EN-G) en presencia o ausencia de 3-metiladenina (3-MA) o IGF-1. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM, (n=5), ANOVA \*p < 0,05 vs MC y #p<0,05 vs estímulo.

## **7.4. Estudio *in vivo* del papel del IGF-1 en la autofagia inducida por privación de nutrientes**

### **7.4.1. Características ratón transgénico LID**

Para evaluar el papel del IGF-1 en un modelo *in vivo* se realizó una estadía de investigación por 4 meses en el Laboratorio del Dr. Derek LeRoith (Mount Sinai School of Medicine, Department of Endocrinology, Diabetes and Bone Diseases, New York) donde se profundizaron los objetivos esenciales de mi tesis en un modelo animal modificado genéticamente caracterizado por una delección del gen de IGF-1 en el hígado (ratón “Liver IGF-1 Deficient” o LID). Estos ratones se generaron usando el sistema Cre/LoxP y presentan una reducción del 75% en los niveles circulantes de IGF-1 y niveles altos de GH (66). A la edad de 8-10 semanas, los ratones LID muestran una mayor secreción de insulina, niveles normales de glucosa, tolerancia a la insulina e insensibilidad a insulina en el músculo esquelético al nivel de la fosforilación del receptor de insulina (94). La caracterización del genotipo de estos ratones se realizó por PCR a partir del DNA extraído desde la cola. Este modelo animal representa una excelente herramienta para determinar el papel de este factor en la regulación de la autofagia *in vivo* por privación de nutrientes (Figura 29) (95).

### **7.4.2. Estrés nutricional**

Para estudiar el papel del IGF-1 en la autofagia cardiaca inducida por privación de nutrientes se utilizó ratones controles y transgénicos LID. Se utilizaron animales machos de 8 semanas, los cuales se pesaron y se determinaron la cantidad de grasa y masa muscular por MRI. Luego, los animales se sometieron a ayuno por 48 h, siendo nuevamente pesados y se les determinó la grasa y masa muscular. Además, se les tomó una muestra de sangre desde el seno retroorbital para las determinaciones de los niveles séricos de insulina, glucosa y ácidos grasos libres y luego se sacrificaron por dislocación cervical, extrayéndoseles el hígado, la grasa subcutánea, el corazón y una

muestra de músculo esquelético. Los resultados muestran que el ayuno por 48 h indujo una disminución del peso corporal, grasa corporal y la masa muscular, independiente de la cepa (Figura 30).

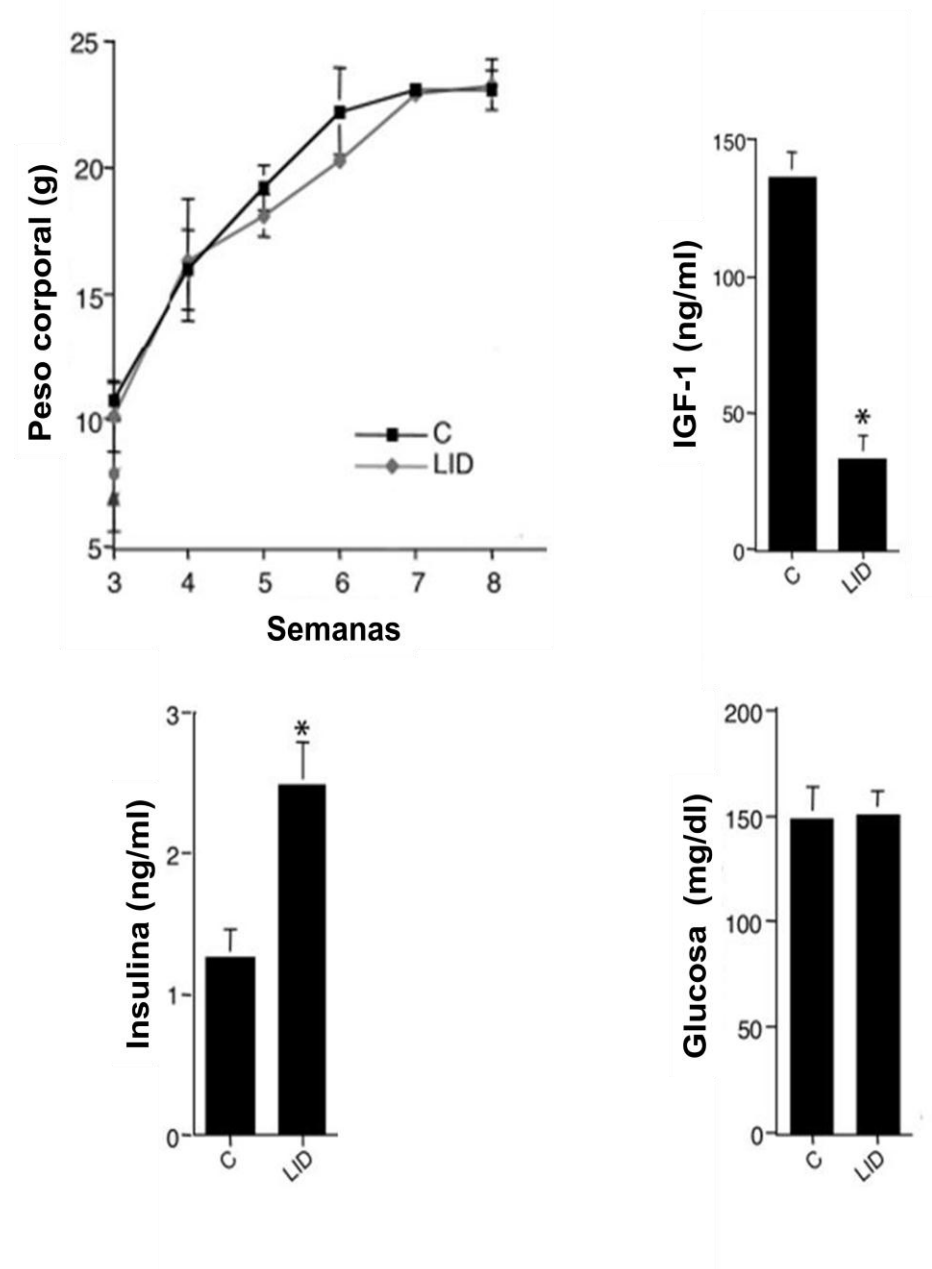
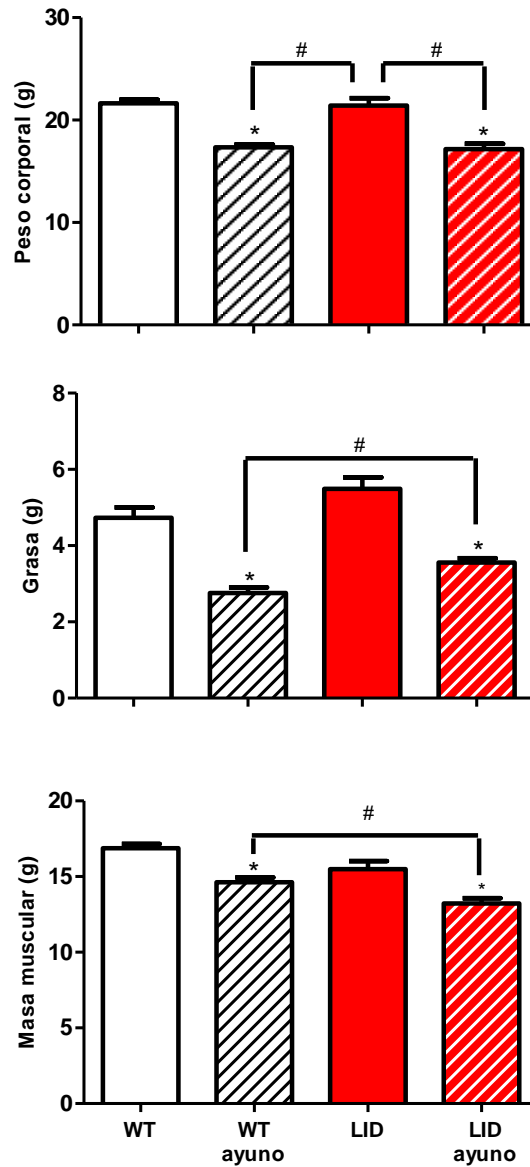


Figura 29. Comparación de los niveles basales de IGF-1, insulina, glucosa y el peso corporal en ratones control y LID.

Datos extraídos de Yakar et al. (Diabetes, 2001).





**Figura 30. Comparación del peso corporal, grasa y masa muscular en ratones WT y LID sometidos a estrés nutricional**

El peso corporal, la grasa total y la masa muscular se determinaron por MRI. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM, (n=5), ANOVA \*p < 0,05 vs WT y #p < 0,05 vs cepa.

Al evaluar el efecto del ayuno por 48 h en los pesos absolutos y relativos de órganos específicos (hígado, grasa subcutánea y corazón), se observó una disminución en los pesos absolutos y relativos del hígado y de la grasa subcutánea

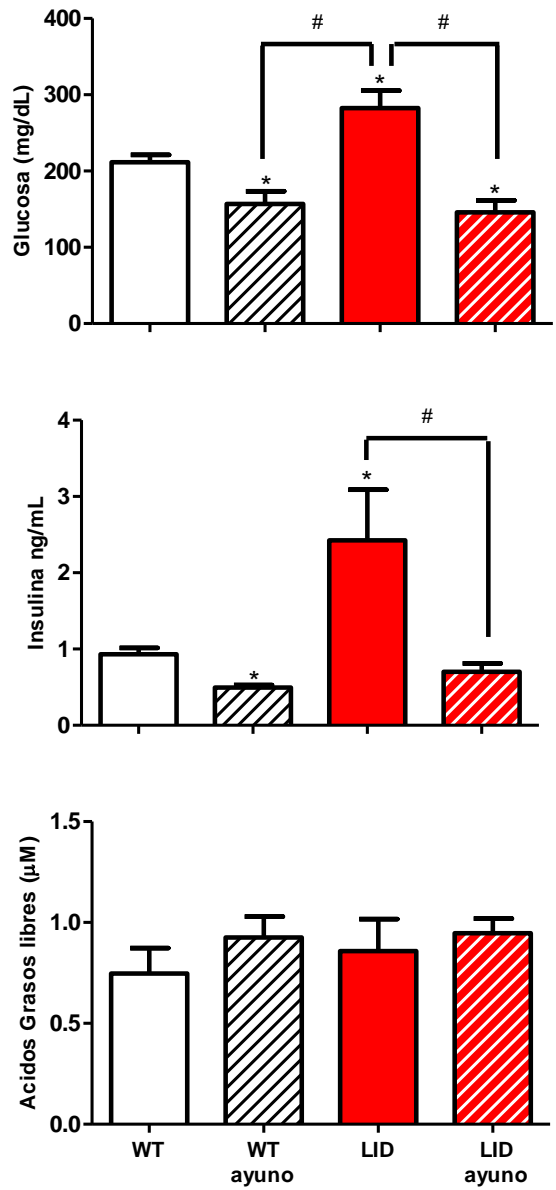
(Tabla 1). Sin embargo, el ayuno no modificó el peso absoluto del corazón de los ratones LID ni en los WT. Sin embargo, al relativizar los pesos de los órganos respecto al peso corporal, los ratones controles mostraron un aumento del peso relativo del tejido cardiaco, no así en los ratones LID. Los pesos relativos del hígado y grasa corporal disminuyeron por efecto del ayuno en forma similar tanto en los WT como los LID (Tabla 3).

**Tabla 3. Efecto del estrés nutricional en el peso corporal de animales WT y LID**

|                                  | WT        | WT<br>ayuno 48h | LID                     | LID<br>ayuno 48h       |
|----------------------------------|-----------|-----------------|-------------------------|------------------------|
| <b>N</b>                         | 6         | 7               | 5                       | 7                      |
| <b>Semanas</b>                   | 8         | 8               | 8                       | 8                      |
| <b>Peso corporal (g)</b>         | 21,6±0,35 | 17,3±0,27*      | 21,4±0,74               | 17,2±0,52*             |
| <b>Hígado (g)</b>                | 1,15±0,10 | 0,75±0,05*      | 1,26±0,21               | 0,88±0,05*             |
| <b>Grasa subcutánea (g)</b>      | 0,51±0,08 | 0,21±0,06*      | 0,72±0,20* <sup>#</sup> | 0,40±0,09*             |
| <b>Corazón (g)</b>               | 0,13±0,01 | 0,13±0,02       | 0,13±0,03               | 0,11±0,01              |
| <b>Hígado/Peso (%)</b>           | 5,32±0,41 | 4,33±0,19*      | 5,86±0,58               | 5,16±0,40*             |
| <b>Grasa subcutánea/Peso (%)</b> | 2,33±0,28 | 1,21±0,38*      | 3,33±0,77*              | 2,37±0,33 <sup>#</sup> |
| <b>Corazón/Peso (%)</b>          | 0,61±0,04 | 0,73±0,11*      | 0,61±0,11               | 0,65±0,55              |

Los resultados se expresan como promedio ± SEM. ANOVA \*p < 0,05 vs WT y <sup>#</sup>p < 0,05 vs cepa.

Los niveles de glucosa en la sangre se determinaron para estudiar el efecto del ayuno por 48 h y establecer si los ratones LID presentaban un patrón diferente de respuesta al estrés nutricional. Los resultados mostraron que los ratones LID en estado basal presentan mayores niveles de glucosa circulante que los controles, y que el estrés nutricional disminuyó los niveles de glucosa, efecto que fue independiente de la cepa. Además se evaluaron los niveles circulantes de insulina, donde los ratones LID presentaron una mayor cantidad de insulina en el estado basal que los controles y el estrés nutricional disminuyó significativamente los niveles de insulina de manera independiente de la cepa. Los niveles de ácidos grasos libres no se modificaron por el estrés nutricional (Figura 31).



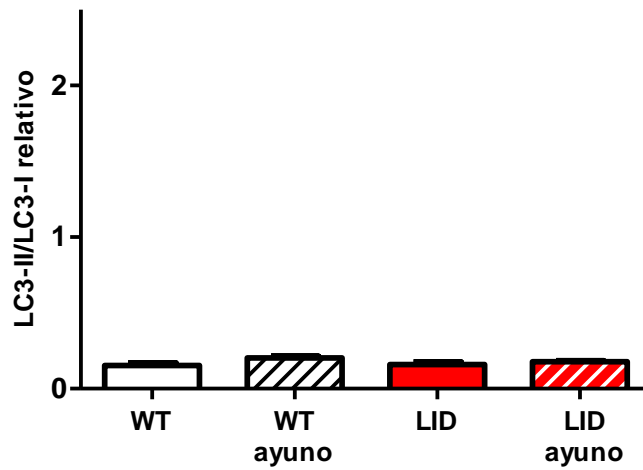
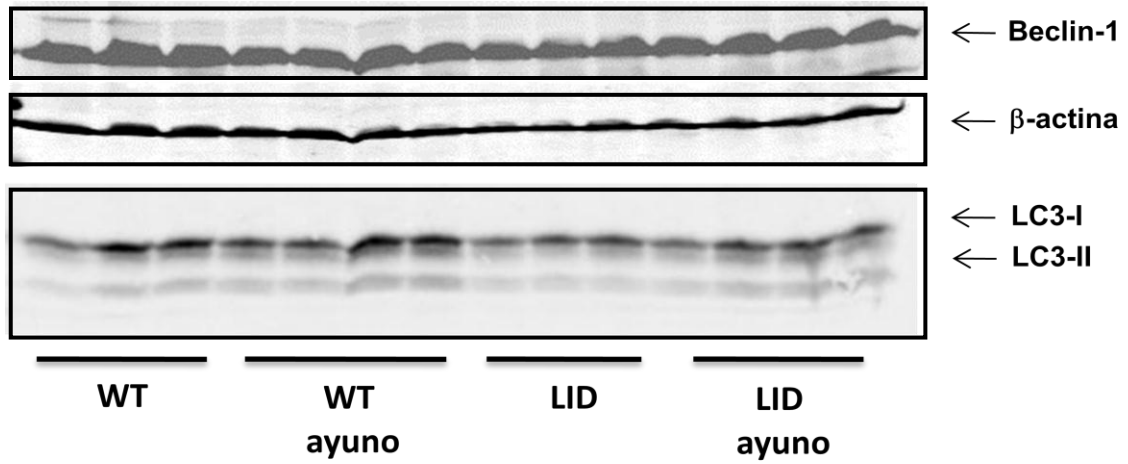
**Figura 31. Efecto del estrés nutricional en los niveles séricos de glucosa, insulina y ácidos grasos libres en ratones WT y LID**

Se tomó una muestra de sangre y se determinaron las concentraciones mediante los procedimientos descritos en materiales y métodos. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM. (n=5), ANOVA \*p<0,05 vs WT y #p<0,05 vs cepa.

### 7.4.3. Efecto *in vivo* del ayuno en la inducción de la autofagia

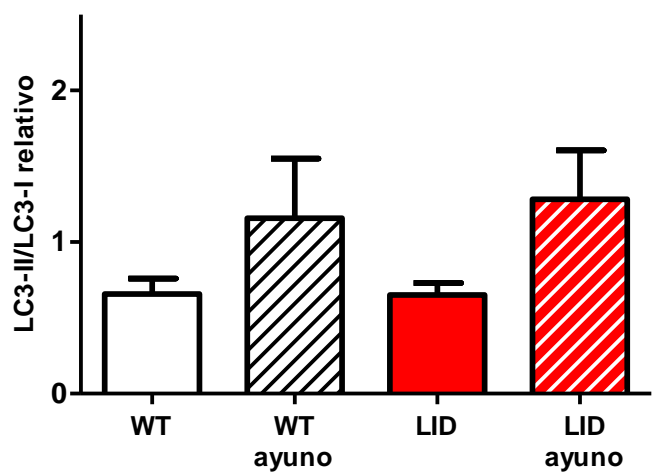
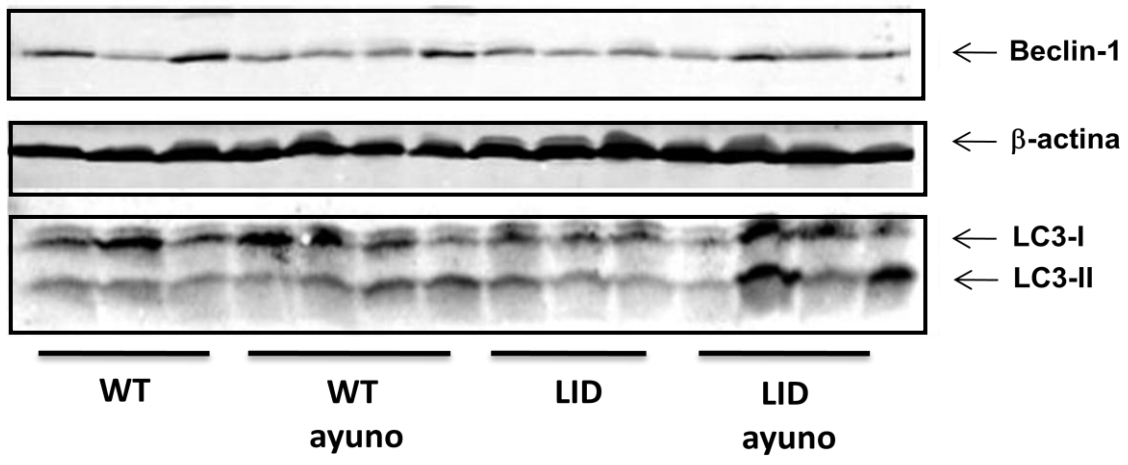
Para evaluar la autofagia se extrajeron las proteínas totales de hígado, grasa subcutánea y el corazón, determinándose el procesamiento de proteína LC3-I y los niveles de Beclin-1 por Western blot. Con esta finalidad, los ratones se sacrificaron a las 48 h de ayuno y los extractos se analizaron por Western blot. Los resultados muestran que en el hígado y la grasa subcutánea, el ayuno por 48 h no modificó el nivel de procesamiento de la proteína LC3 respecto al basal, indicando una baja actividad autofágica (Figuras 32 y 33). Sin embargo, en los ratones privados de nutrientes se observó un aumento significativo del procesamiento de LC3-I a nivel del corazón, siendo mayor en los ratones LID respecto a los ratones controles. Esta observación concordó con una mayor actividad autofágica en los corazones de estos ratones (Figura 34).

De los resultados obtenidos en los cultivos primarios de cardiomiocitos neonatos de rata se estableció que la vía transduccional PKB/mTOR, y en particular la proteína mTOR, tiene un papel clave en la inducción de la autofagia. Dado que es muy difícil evaluar la fosforilación de PKB y mTOR en tejidos sin estimular, se buscó una proteína sensor de respuesta al estrés, entre las cuales la proteína AMPK podría tener un rol en la inducción de autofagia (27). Los resultados mostrados en la Figura 36 indican que la fosforilación de la proteína AMPK aumenta en el hígado de los ratones controles producto del estrés nutricional, efecto que no se presenta en los ratones LID. Sin embargo, el estrés nutricional aumentó la fosforilación de AMPK en el corazón de los ratones LID, correlacionando este evento con una mayor inducción de la autofagia en el corazón de estos ratones y su pérdida de peso (Figura 36).



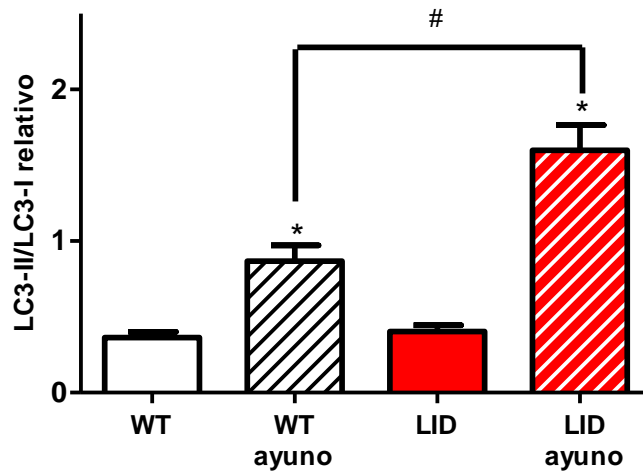
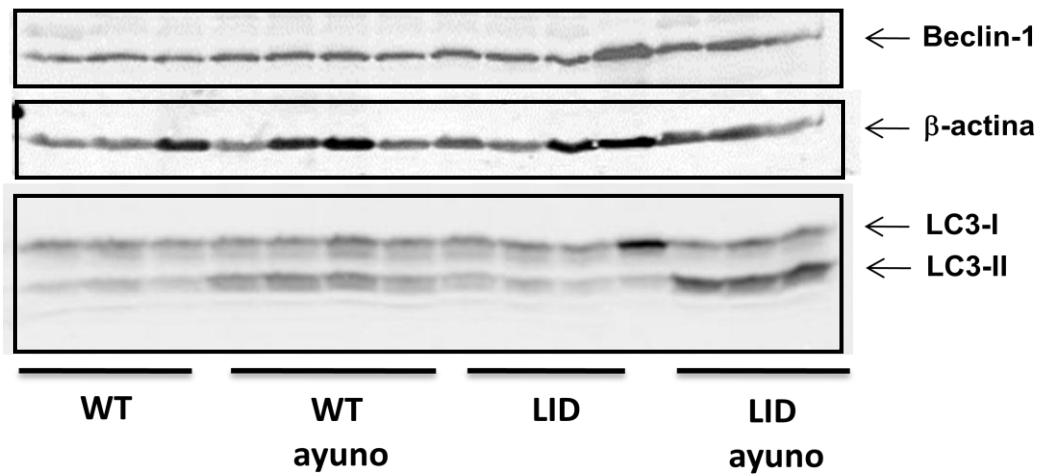
**Figura 32. Efecto del estrés nutricional en el procesamiento de LC3 en el hígado de ratones WT y LID**

Después de preparar los extractos proteicos, el procesamiento de la proteína LC3-I se determinó por Western blot en la forma indicada en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM. (n=5), ANOVA.



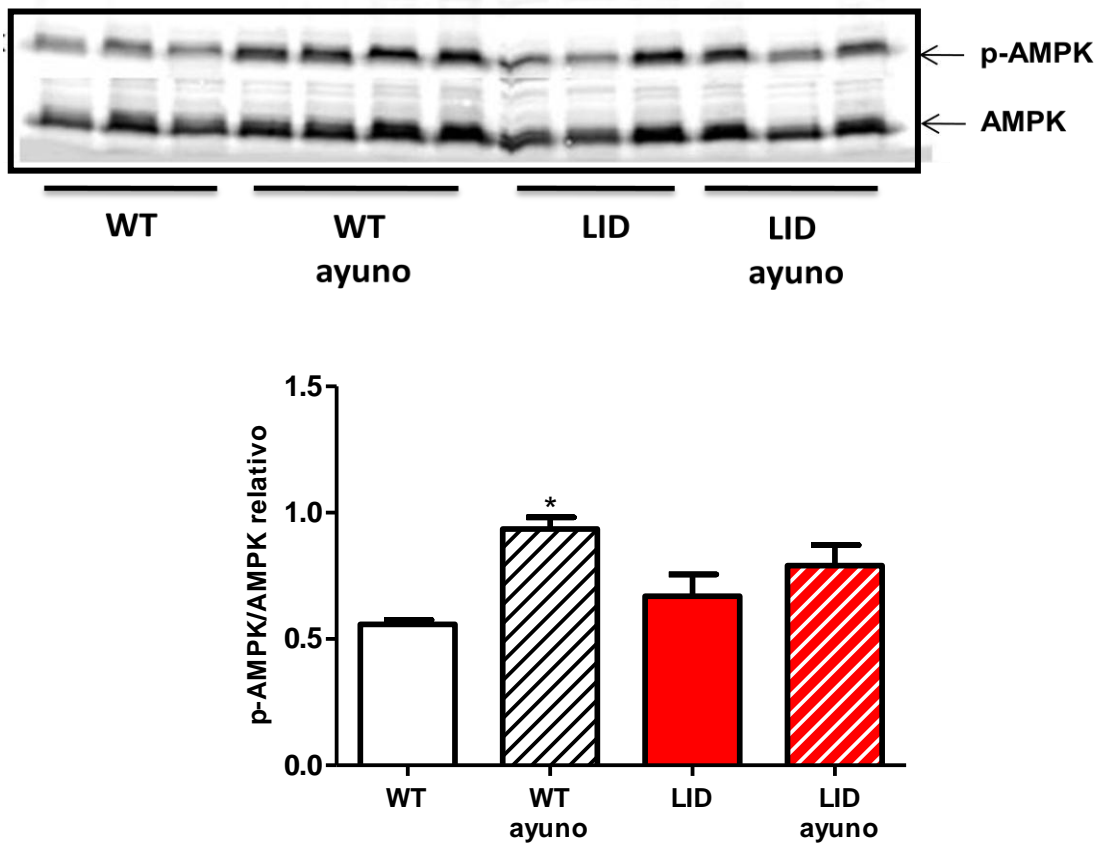
**Figura 33. Efecto del estrés nutricional en el procesamiento de LC3 en la grasa subcutánea de ratones WT y LID**

Después de preparar los extractos proteicos, el procesamiento de la proteína LC3-I se determinó por Western blot en la forma indicada en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM. (n=5), ANOVA.



**Figura 34. Efecto del estrés nutricional en el procesamiento de LC3 en el corazón de ratones WT y LID**

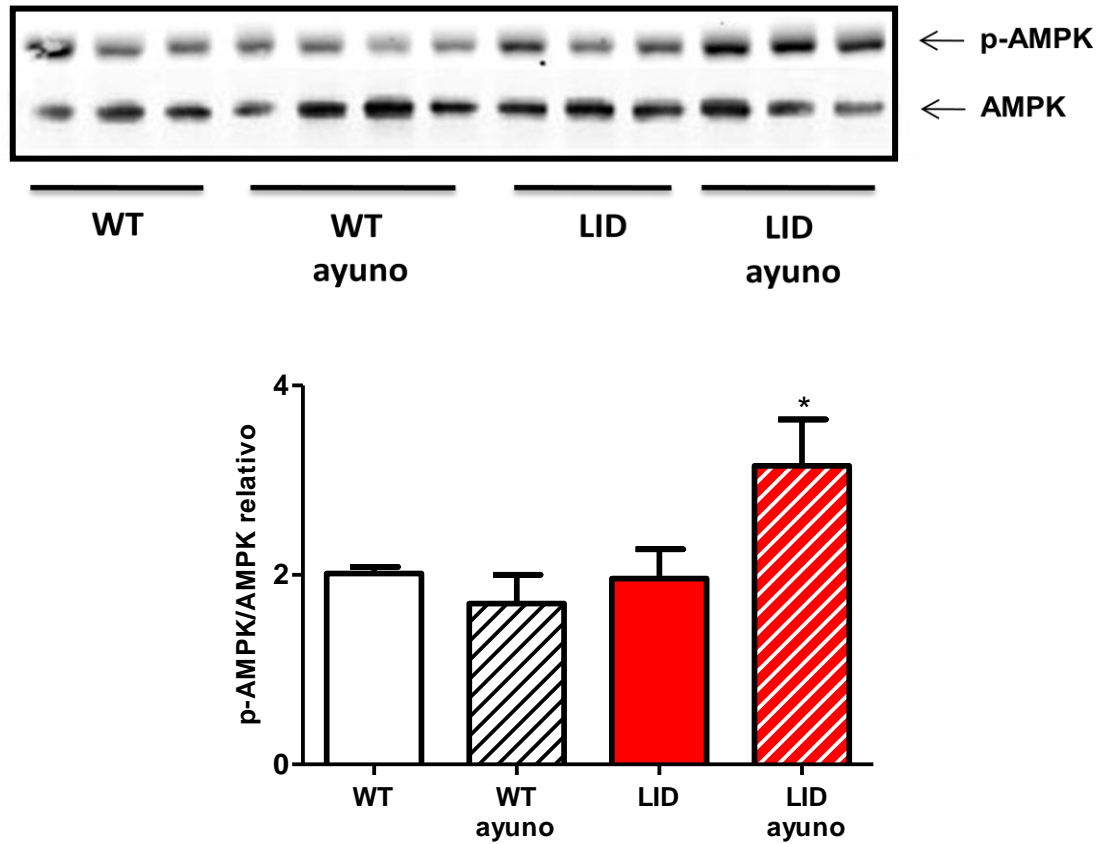
Después de preparar los extractos proteicos, el procesamiento de la proteína LC3-I se determinó por Western blot en la forma indicada en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM. (n=5), ANOVA \*p < 0,05 vs WT y #p<0,05 vs cepa.



**Figura 35. Efecto de la privación de nutrientes en la fosforilación de AMPK en el hígado**

Después de preparar los extractos proteicos, la proteína total y fosforilada se determinó por Western blot en la forma indicada en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM, (n=5), ANOVA \*p < 0,05 vs WT.





**Figura 36. Efecto de la privación de nutrientes en la fosforilación de AMPK en el corazón**

Después de preparar los extractos proteicos, la proteína total y fosforilada se determinó por Western blot en la forma indicada en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM. (n=5), ANOVA \*p < 0,05 vs WT y #p < 0,05 vs cepa.

## 8. DISCUSIÓN

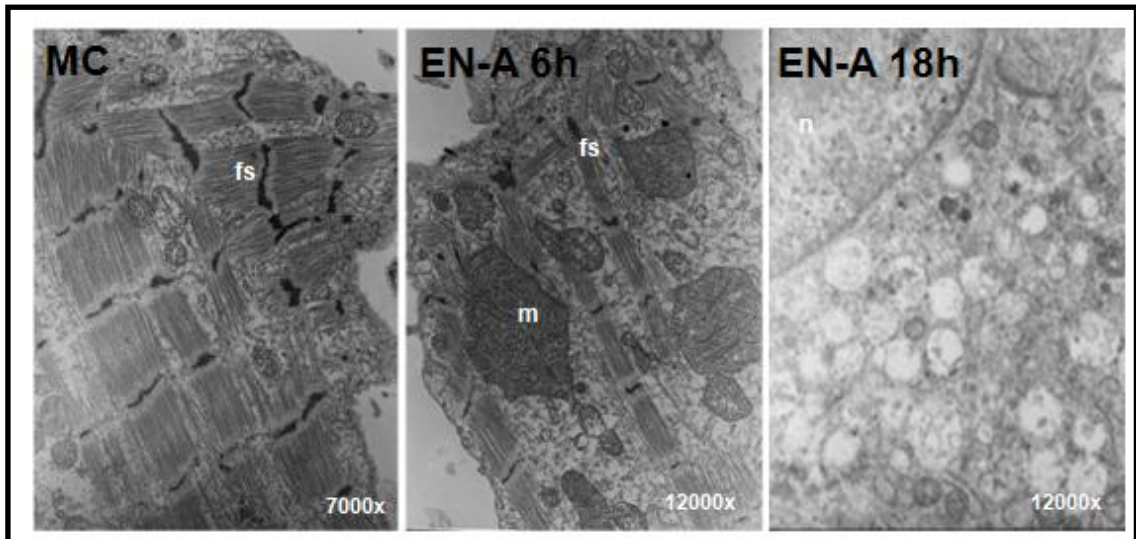
En condiciones fisiológicas, la glucosa y ácidos grasos son los sustratos principales para la conversión de energía en el corazón (96,97). En condiciones en las cuales se generan cambios metabólicos en todo el cuerpo, la contribución relativa de sustratos individuales para la producción de energía puede modificarse. Por ejemplo, durante el ayuno o diabetes la contribución de ácidos grasos a la producción de energía cardíaca aumenta, mientras que se reduce la utilización de glucosa (98,99). En ambas condiciones, aumentan las concentraciones circulantes de ácidos grasos (100,101), lo que implica un mayor suministro de estos sustratos para el miocardio. Recientemente, se ha demostrado que la exposición a largo plazo de cultivos de cardiomiocitos neonatales de rata a ácidos grasos da lugar a una mayor capacidad de oxidar este sustrato (102). Este efecto se acompaña por un aumento específico y coordinado de genes implicados en el transporte y metabolismo de ácidos grasos, mientras que disminuye la expresión del transportador de glucosa sensible a insulina (Glut-4) (102). Estos datos apuntan a la plasticidad metabólica de las células del músculo cardíaco, es decir, la capacidad para responder a cambios en el suministro de sustrato, ajustando la expresión de genes de las proteínas implicadas en el transporte y metabolismo.

El objetivo de esta tesis fue investigar el papel del IGF-1 en el estrés nutricional inducido por privación de nutrientes, para lo cual se utilizaron dos estrategias experimentales de estrés nutricional, la privación de suero/glucosa (EN-G) que consiste en cultivar los cardiomiocitos en un medio que esta libre de suero y glucosa, pero manteniendo los aminoácidos, vitaminas y otros factores presentes, la segunda condición experimental fue la privación de suero/aminoácidos (EN-A), la cual consiste en cultivar los cardiomiocitos en un medio que solo contiene sales de fosfato y glucosa.

Los resultados mostraron que al exponer los cultivos de cardiomiocitos de rata neonatas a los dos tipos de estrés nutricional, disminuyeron la fosforilación de las proteínas PKB, p70-S6K y ERK, los niveles intracelulares de ATP, y se indujo muerte

celular sin características apoptóticas. Estos resultados apuntan al papel de los factores de crecimiento, la glucosa, los ácidos grasos y los aminoácidos en la mantención de las vías anabólicas celulares, donde la mantención de la actividad de mTOR es la responsable de esta acción (103). Los cardiomiocitos como células encargadas de la función contráctil del corazón, poseen una gran cantidad de mitocondrias para mantener los niveles de ATP acordes con los requerimientos cardiacos, la privación de nutrientes induce una disminución de la entrada de combustibles a la célula disminuyendo la generación de ATP, esto finalmente desencadena un colapso energético que produce un tipo de muerte celular que no presenta características de apoptosis, las evidencias que colectivamente apoyan esta aseveración son: escaso aumento en la población sub-G1 que evalúa fragmentación del DNA (evento central en la apoptosis), ausencia de caída importante en el potencial mitocondrial, procesamiento de caspasa 3 e insensibilidad al inhibidor inespecífico de caspasas Z-VAD, todos estos marcadores característicos de apoptosis. Además, El estrés nutricional por privación de suero/aminoácidos produjo una caída mayor de los niveles intracelulares de ATP en comparación con cardiomiocitos expuestos al otro estrés nutricional. Recientemente, en la literatura se ha describiendo un nuevo tipo de muerte celular, la muerte programada tipo II o muerte por autofagia (30). Este tipo de muerte celular se caracteriza por la presencia de vacuolas autofagicas y la capacidad de ser inhibida por 3-MA o por algún RNAi contra proteínas esenciales en la maquinaria autofagica. Sin embargo, este tipo de muerte ha sido evidenciada en modelos celulares donde genes proapoptoticos han sido silenciados. En cambio, la autofagia es un mecanismo de sobrevivencia en células con su maquinaria apoptotica intacta (30). En el caso de los cardiomiocitos, nuestro grupo y otros (27) han demostrado que la privación de nutrientes induce un aumento de la muerte celular que no presenta características de muerte del tipo autofagica, ya que al usar un inhibidor de la autofagia como 3-MA, en vez de prevenirse la pérdida de viabilidad esta aumentaba. Esto asociado a que la autofagia es un mecanismo catabólico para la generación de energía, ya que al someter los cardiomiocitos a privación de nutrientes en presencia de 3-MA los niveles intracelulares de ATP caen aun más. Además, en nuestro laboratorio se ha mostrado que en los cardiomiocitos, los sarcomeros son blancos de autofagia para la generación de aminoácidos, como lo demuestra la microscopía electrónica de

cardiomiocitos expuesto a estrés nutricional por privación de suero/aminoácidos, donde podemos ver la progresiva pérdida de sarcomeros (Figura 37) (Tesis Doctoral Paola Marambio).



**Figura 37. Caracterización de fibras sarcoméricas mediante microscopía electrónica en cardiomiocitos sometidos a estrés nutricional.**

En la figura (A) fibras sarcoméricas de cardiomiocitos controles, (B) fibras sarcoméricas de cardiomiocitos privados de suero/aminoácidos por 6 h, (C) cardiomiocitos bajo estrés nutricional sin suero/aminoácidos por 18 h, las fibras sarcoméricas son reemplazadas completamente por estructuras autofágicas. fs indica fibras sarcoméricas, m: mitocondrias, n: núcleo. Las fotografías son representativas de todos los estímulos estudiados.

La privación de nutrientes se ha descrito como el principal inductor de autofagia, la estrategia más utilizada es incubar las células con un medio que presenta sólo una combinación de sales y glucosa. Sin embargo al igual que el trabajo de Matsui *et al.* (27) nosotros decidimos utilizar además un medio que fuere sólo deficiente en suero y glucosa con la intención de generar una autofagia menos extrema y evaluar la importancia de la glucosa en los cardiomiocitos de rata neonata. Evaluamos la autofagia a tres niveles, el primero fue el procesamiento de la proteína endógena LC3-I por WB; el segundo y el tercero se realizó mediante la transducción adenoviral de la proteína GFP-LC3, para lo cual evaluamos la redistribución de esta proteína exógena a un patrón punteado como marcador de la presencia de los autofagosomas y finalmente, para evaluar que se completo el proceso de autofagia se evaluó la

desaparición de la proteína exógena GFP-LC3 como marcador de la degradación en los autolisosomas. El estrés nutricional por privación de suero/glucosa activó la autofagia evaluada por el procesamiento de la proteína endógena LC3-I, fenómeno que no es observado en los cardiomiocitos expuestos al estrés nutricional por privación de suero/aminoácidos. También, el estrés nutricional por privación de suero/glucosa incremento la distribución punteada de GFP-LC3 y disminuyo de la fluorescencia de GFP-LC3 en los cardiomiocitos transducidos con el Ad-GFP-LC3. La falta de procesamiento de la proteína endógena LC3-I en los cardiomiocitos expuestos al estrés nutricional por privación de suero/aminoácidos se debe a lo extremo del estímulo evidenciándose en la caída de los niveles intracelulares de ATP y en la viabilidad celular. Sin embargo, esto no quiere decir que este estímulo no induzca autofagia, ya que al evaluar la degradación de GFP-LC3 se observa una disminución en la fluorescencia (resultados no mostrados). Una de las alternativas para evaluar el real grado de inducción de autofagia en este modelo es la evaluación del flujo autofagico, esto nos permite tener un parámetro del total de los autofagosomas formados, al inhibir la degradación y así acumular los autofagosomas. Teniendo un modelo funcional de inducción de autofagia, nos preguntamos el papel de IGF-1, un péptido análogo a la insulina, que ha demostrado tener efectos beneficiosos en diferentes tipos de estrés en el corazón, pero que su papel en la autofagia es controversial.

### **8.1. IGF-1 y vías transduccionales asociadas a la regulación del metabolismo energético**

El IGF-1 es esencial para la respuesta anabólica, mitogénicas y diferenciación en el músculo esquelético y miocardio, estas acciones requieren la integridad de la maquinaria transduccional del IGF-1 (104). Nuestro estudio se focalizó en evaluar específicamente dos vías trasduccionales, la vía PKB y ERK, ambas vías han sido ampliamente descritas como efectoras del IGF-1R (104). La importancia del IGF-1R se ha descrito en ratones que carecen de un receptor funcional de IGF-1, dado que mueren inmediatamente después del nacimiento de insuficiencia respiratoria y

presentan importantes deficiencias en su crecimiento (45% de su tamaño normal), caracterizada por hipoplasia de sus órganos (105). En contraste, la sobreexpresión del IGF-1R en mioblastos L6 se asocia a proliferación y diferenciación dependiente de ligando; específicamente, a niveles bajos de IGF-1 existe una tasa normal de diferenciación, mientras que niveles elevados de IGF-1 generan mayor proliferación e inhibición de la diferenciación. Además, IGF-1 parece cumplir un papel crítico en preservar las funciones cardíacas normales, previniendo daños cardíacos relacionados con la edad y el estrés, incluyendo alteraciones secundarias del infarto cardíaco. En resumen, IGF-1 protege las células cardíacas de la degeneración y muerte celular y estimula la regeneración celular en modelos *in vivo* y en cultivos celulares de cardiomiocitos de rata (77,79). Las acciones antiapoptóticas del IGF-1 se observan a concentraciones fisiológicas y dependen de manera específica de la señalización a través de su receptor. IGF-1 activa las vías ERK y PI3-K en el tejido cardíaco (71,106) y, en particular, la activación de la vía PI3-K/PKB promueve la supervivencia de los cardiomiocitos tanto *in vivo* como *in vitro* (63,107).

Nuestros datos mostraron que IGF-1 activó la vía PKB en los cardiomiocitos expuestos a estrés nutricional, sin importar si éste era causado por la falta de suero/aminoácidos o suero/glucosa. Interesantemente, cuando se evaluó la proteína p70-S6K, un blanco directo de la proteína kinasa mTOR, sólo aquellos cardiomiocitos expuestos a EN-G e IGF-1 mostraron un aumento de la fosforilación de p70-S6K y, por ende, la activación de mTOR (103). Al contrario, los cardiomiocitos expuestos a EN-A e IGF-1 no hubo fosforilación de p70-S6K. Este resultado se podría explicar por la dependencia de mTOR a la disponibilidad de ciertos aminoácidos (108) ya que cuando éstos están ausentes mTOR no se activa independiente de factores de crecimiento o glucosa. Estudios recientes de dos grupos independientes proponen un mecanismo donde aparecen como actores las proteínas RAG (familia de cuatro GTPasas) que interactúan con mTOR dependiente de aminoácidos, de manera que en células privadas de aminoácidos mTOR está distribuido homogéneamente en el citoplasma. En cambio, con una breve re-estimulación con aminoácidos, mTOR se encuentra en los mismos compartimientos intracelulares que Rheb, siendo esta recolocalización dependiente de RAG (109). Otras señales conocidas que regulan a mTOR son

variadas y van desde factores de crecimiento, aminoácidos, glucosa, estado energético celular hasta diferentes formas de estrés (ej. osmótico, daño al DNA). Los trabajos iniciales en *drosophila* y confirmados posteriormente en cultivos celulares de mamíferos han identificado al heterodímero TSC1/TSC2 como un importante integrador de diversas señales que regulan a mTOR. El complejo TSC1/TSC2 es la proteína GAP ("GTPase-activating protein) de la proteína de unión a GTP Rheb perteneciente a la familia ras (110,111), la cual une directamente y activa al complejo raptor-mTOR (112). Diferentes kinasas como AMPK, PKB, RSK1 y ERK modulan la señalización de mTOR a través de la fosforilación de TSC2, regulando la actividad GAP del complejo TSC1/TSC2. La razón AMP/ATP aumenta en condiciones de privación de energía, activando directamente a AMPK, la cual fosforila a TSC2 y estimula su actividad GAP (23). Por otra parte, PKB (113-115), RSK1 (116) y ERK (114) regulan al complejo raptor-mTOR cuya activación depende de factores de crecimiento, a nivel de TSC2. Todas estas proteínas kinasas fosforilan e inhiben la actividad GAP de TSC2. Sin embargo, PKB también puede regular indirectamente a mTOR ya que al disminuir la razón AMP/ATP (es decir aumentar el ATP), se previene la activación de AMPK (117). En resumen, PKB regula el influjo de nutrientes que regulan la vía raptor/mTOR (118).

En esta tesis se observó que tanto la privación de suero/glucosa como de suero/aminoácidos disminuyeron ya a la hora la fosforilación basal de ERK1, observándose posteriormente su recuperación progresiva, alcanzando los niveles del control a las 6 h sólo en los cardiomiocitos expuestos a estrés nutricional por privación de suero/glucosa. Interesantemente los cambios descritos sólo se observaron para ERK1 y no ERK2. Previamente, nuestro Laboratorio demostró que IGF-1 estimula tempranamente la fosforilación a ERK, alcanzado un máximo a los 15 min post-estímulo (63). En la presente tesis dado que nos interesó investigar los efectos tardíos de la acción de IGF-1, la fosforilación de ERK se comenzó a evaluar a partir de la primera hora post-pulso de IGF-1 y se extendió hasta las 6 h. Bajo estas condiciones, IGF-1 redujo la recuperación de la fosforilación de ERK1 inducida por la privación de suero/glucosa. Recientemente, se ha descrito que ERK regula la autofagia a través de un incremento en los niveles de beclin-1 mediante la vía de señalización AMPK/MEK/ERK/TSC/mTOR (119). En este sentido en nuestro modelo por privación

de suero/glucosa, la recuperación de la fosforilación de ERK podría asociarse al desarrollo de autofagia. Sin embargo, futuros experimentos con inhibidores de MEK1 o antisentidos dirigidos a ERK deberían aclarar si ERK se requiere para la activación de la autofagia por estrés nutricional y cómo IGF-1 la regula.

## **8.2. IGF-1 y metabolismo energético**

Las mitocondrias constituyen cerca de la tercera parte del volumen de los cardiomiocitos y es el soporte exclusivo de los requerimientos energéticos del acoplamiento excitación-contracción, interacción de filamentos y la homeostasis de diferentes iones (incluido el  $\text{Ca}^{2+}$ ) durante el ciclo de trabajo cardiaco. Los fosfatos de alta energía (ATP y fosfocreatina) son mayoritariamente producidos por la oxidación de combustibles en la mitocondria a través de la cadena transportadora de electrones. Además, el  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial modula el ciclo de Krebs y a las deshidrogenasas de la matriz mitocondrial que mantienen la síntesis de ATP y NADH (potencial redox).

Se ha establecido que la síntesis de ATP y la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  son dependientes del gradiente electroquímica de protones, resultando en la generación de un potencial de membrana a través de la membrana interna mitocondrial. La mantención de la gradiente electroquímica y el potencial de membrana es clave para la mantención de la integridad de membrana, un metabolismo aeróbico suficiente y una fosforilación oxidativa normal.

Existe escasa información en relación al papel del IGF-1 y la función mitocondrial. Davani *et al.* (120) observaron en un modelo de I/R *ex vivo* que el tratamiento con IGF-1 mejora la función cardiaca. Usando cultivos de cardiomiocitos de rata, Lai *et al.* mostraron que IGF-1 previene la pérdida de la gradiente electroquímica y la depolarización de membrana inducida por doxorubicina (121). Recientemente, se describió que IGF-1 puede estabilizar la función mitocondrial en un modelo de daño por hipoxia/reoxigenación (122).



En nuestro modelo de estrés nutricional, IGF-1 recuperó los niveles intracelulares de ATP disminuidos por efecto del EN-G. Sin embargo, este efecto fue relativamente específico dado que en los cardiomiocitos expuestos a EN-A sólo hubo una recuperación parcial de los niveles intracelulares de ATP por acción del IGF-1. Este efecto en los niveles de ATP puede relacionarse con los cambios observados en la capacidad reductora al MTT dado que su transformación requiere de niveles altos de NADH y NADPH, el primero producido en la glicolisis y ciclo de Krebs y el segundo producido principalmente en la vía de las pentosas. La reducción del MTT se ha utilizado principalmente para evaluar la viabilidad celular. Sin embargo es importante recordar que la viabilidad evaluada es en realidad una determinación del funcionamiento mitocondrial. En nuestro caso, hubo discrepancia en los resultados obtenidos en el ensayo MTT y los ensayos de viabilidad celular por incorporación de PI a las 24 h de privación de nutrientes, siendo los valores mayores con el primer método que con el segundo. Estos resultados sugieren que existe un grupo de células que todavía se mantienen viables pero su estado redox está alterado y por ello se evaluó la reducción del MTT dentro las primeras 6 h de estrés nutricional. Los resultados mostraron que el EN-G no induce cambios en la reducción de MTT a diferencia del EN-A que indujo una caída de un 40% en la reducción de MTT desde las 2h.

Por otra parte los resultados de evaluación del potencial mitocondrial, EN-G y EN-A indujeron una hiperpolarización del potencial de membrana mitocondrial que estuvo asociado a un aumento de la masa mitocondrial, los resultados obtenidos se relativizaron por la razón de potencial/masa donde no hubo diferencias significativas entre las diferentes condiciones. Además, estos efectos en el potencial de membrana han sido asociados a un aumento en la generación de ROS acompañada de una fragmentación de la red mitocondrial (Tesis Doctoral Barbra Toro, en curso). El tamaño, forma, volumen, distribución y orientación celular de las mitocondrias varían continuamente, dependiendo del tejido en particular y su actividad funcional. Las mitocondrias corresponden a organelos complejos, rodeados por una doble membrana, con una morfología y distribución intracelular característica para cada tipo celular. Las fotografías clásicas de microscopía electrónica, las muestran como organelos individuales debido a que estas imágenes sólo muestran una sección individual de la

célula. Sin embargo, esta imagen está sobresimplificada dado que las mitocondrias constituyen un complejo retículo, es decir, una red interconectada y altamente dinámica, mantenida por eventos permanentes, opuestos y balanceados de fusión y fisión (123). El número de túbulos, sus conexiones, y la completa morfología del organelo, así como su distribución subcelular está, por lo tanto, dinámicamente controlada. Evidencias recientes muestran que la maquinaria que gobierna la morfología y dinámica mitocondrial también participa en la regulación temporal del metabolismo (124,125). Así, los cambios morfológicos también coinciden con un amplio número de procesos fisiológicos, siendo un excelente ejemplo de ello, las transiciones entre diferentes estados respiratorios y remodelado de las crestas mitocondriales observadas durante la apoptosis (126,127). En el corazón es posible encontrar estos organelos organizados como una red compleja de filamentos largos e interconectados, mientras que en el hígado, las mitocondrias se presentan como organelos aislados y con forma circular (128). Estas características morfológicas muestran una posible relación entre la demanda energética a la que está sometido un determinado tejido y la estructura que presentan las mitocondrias. A partir de estos hallazgos surgen nuevas interrogantes, Una de ellas es si IGF-1 regula el metabolismo energético a través de una modulación de los procesos de fusión-fisión mitocondrial.

### **8.3. IGF-1 y muerte celular**

IGF-1 regula diversos procesos celulares, destacando entre ellos el tamaño celular, metabolismo intermediario, apoptosis, contractibilidad y la regulación del  $Ca^{2+}$  en el corazón, posiblemente por diferentes vías transduccionales (129). Buerke *et al.* fueron los primeros en estudiar la acción cardioprotectora del IGF-1, usando como modelo de estudio la oclusión de la arteria coronaria izquierda (77). Sus resultados mostraron que IGF-1, a concentraciones farmacológicas, disminuyó el daño necrótico y apoptótico inducido por la isquemia. Similares resultados se encontraron con ratones que sobreexpresan IGF-1 en el corazón. Este ratón transgénico se caracteriza por el desarrollo de hipertrofia cardíaca debido al aumento de tamaño de sus cardiomiocitos en comparación a los controles (76). Estos animales transgénicos también son más resistentes a los efectos deletéreos del infarto al miocardio y exhiben menor daño

necrótico (82). Otra evidencia que apoya el papel cardioprotector del IGF-1 es el hallazgo que la perfusión con IGF-1 disminuye la apoptosis inducida por isquemia/reperfusión (130). Además, de las acciones antiapoptóticas del IGF-1 durante la isquemia/reperfusión, existe variada evidencia que muestra que el efecto cardioprotector del IGF-1 es amplio ya que protege de la apoptosis inducida por otras noxas entre las que se incluyen a ceramida, doxorubicina (79) o estrés hiperosmótico (83), siendo estos efectos antiapoptóticos dependiente de PKB.

En esta tesis se evaluó la capacidad cardioprotectora del IGF-1 en la muerte celular inducida por estrés nutricional. Tal como se mencionó anteriormente, la privación de nutrientes no indujo el desarrollo de apoptosis. Por otra parte, IGF-1 previno la muerte de los cardiomiocitos expuestos sólo a EN-G. Sin embargo, es importante destacar que esta acción del IGF-1 fue selectiva ya que sólo se observó en los cultivos privados de suero/glucosa y no en aquellos privados de suero/aminoácidos. Estos resultados sugirieron que la activación de mTOR podría ser responsable de los efectos beneficios del IGF-1. Dentro estos efectos beneficiosos puede encontrarse la generación de ATP a través de PKB/mTOR, la estabilización de la mitocondria vía la sobreexpresión de las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 o la inhibición de una autofagia exacerbada que puede causar la muerte celular. Dada las limitaciones metodológicas presentes en el desarrollo de esta tesis la vía transduccional de IGF-1 no pudo ser evaluada con los inhibidores clásicos de la PI3-K como la wortmanina y LY294002 también inhiben la inducción de la autofagia o Rapamicina, inhibidor de mTOR, induce autofagia, produciendo que no pudiéramos evaluar la causalidad de los efectos del IGF-1. Otras herramientas como la inhibición de PKB podrían demostrar el papel de IGF-1 en los efectos cardioprotectores en este modelo de privación de nutrientes.

Estos resultados apuntan a que el papel protector de IGF-1 en la privación de nutrientes, parece depender de la disponibilidad específica de ciertos nutrientes o de la posibilidad de activar a mTOR, la reincorporación de aminoácidos en el estrés por privación de suero/aminoácidos permitiría revelar la importancia de la actividad de mTOR en los efectos cardioprotectores del IGF-1. En apoyo a esta posibilidad,

resultados en líneas celulares que sobreexpresan el receptor de IGF-1 han mostrado que la glucosa es un nutriente crítico para los efectos protectores del IGF-1, propiedad que lo diferencia de los cardiomiocitos (Troncoso *et al.* resultados no publicados).

#### **8.4. IGF-1 y autofagia**

En condiciones normales o de estrés leve, la autofagia degrada y recicla componentes de citoplasmáticos, tales como las proteínas de vida media larga y organelos, selectivamente remueve mitocondrias como mecanismo citoprotector (131). Como las mitocondrias dañadas liberan factores pro-apoptóticos tales como citocromo c (132), la autofagia puede prevenir la activación de la apoptosis (39,47). La inducción de la autofagia por sobreexpresión de beclin-1 reduce la activación bax y protege contra el daño por I/R en células cardiacas HL-1 (133). Ratones deficientes en LAMP-2 muestran una acumulación excesiva de vacuolas autofágicas y deterioro de la degradación de proteínas de vida media larga por autofagia, resultando en cardiomiopatía (42,43). Además, cardiomiocitos de rata neonatas transducidos con un adenovirus que expresa un RNAi contra Atg7, proteína esencial para la formación de la vacuola, reduce el número de células viables en comparación a un RNAi no específico (45). También, los cardiomiocitos aislados de un ratón transgénicos con una deficiencia específica de Atg5 en el corazón son más susceptibles al efecto del isoprotenerol (45). El control temporal de la deficiencia de Atg5 bajo un sistema controlado por tamoxifeno produce dilatación del ventrículo izquierdo y disfunción contráctil, el análisis ultraestructural de estos corazones revela una desorganización en la estructura de los sarcómeros, mitocondria desalineadas y agregadas (45). La inactivación de Atg5 causa la acumulación de proteínas y organelos anormales y promueve estrés de retículo y la apoptosis (45). Estos resultados indican que la autofagia es necesaria en forma basal y que opera como un control de calidad de proteínas y organelos en el corazón.

La autofagia es estimulada por privación de nutrientes y factores de crecimiento cuando las células son incapaces de incorporar nutrientes externos (1). En el caso de los cardiomiocitos, el estrés nutricional por privación de suero/glucosa induce más autofagia que por privación de suero/aminoácidos por los resultados comparativos del

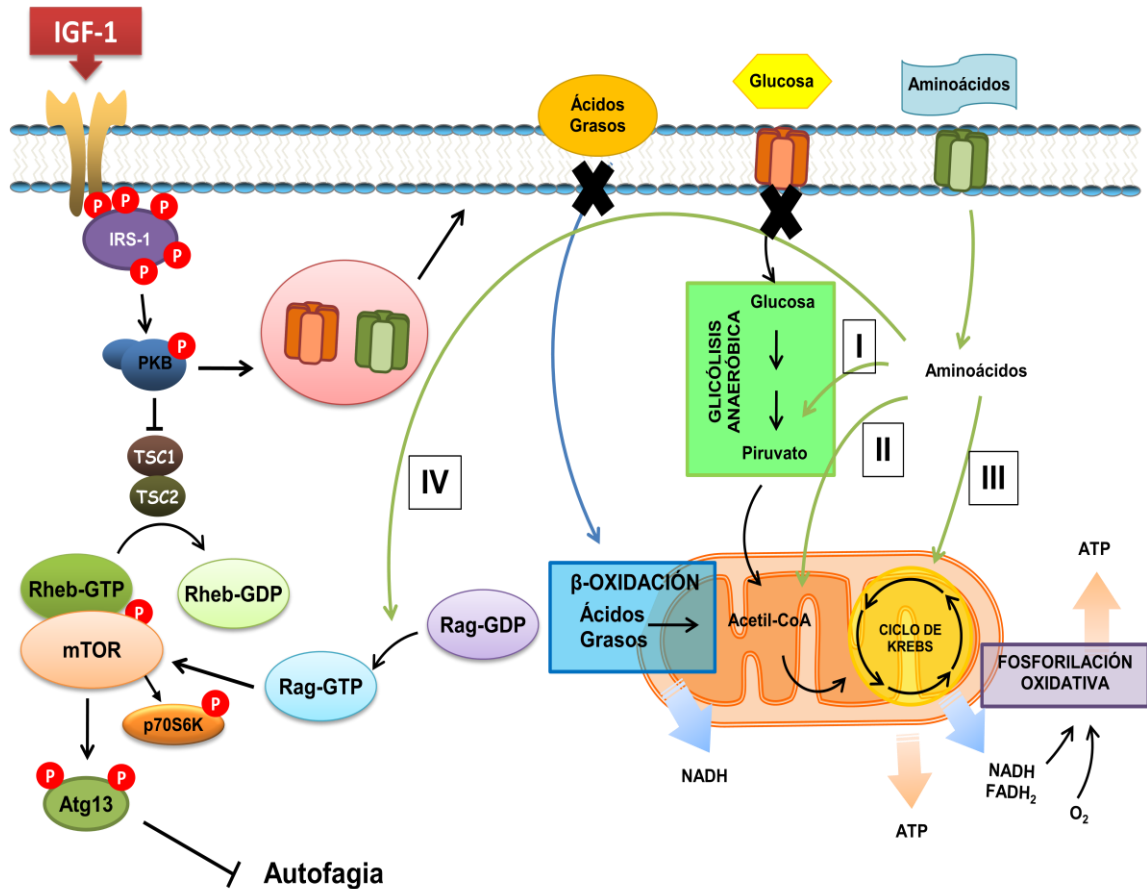
procesamiento de LC3-I. Matsui *et al.* observaron un resultado similar en la inducción de autofagia en cardiomiocitos sujetos a privación de nutrientes, donde la privación de glucosa indujo un mayor grado de autofagia que la privación de aminoácidos (27). Nuestros resultados sugieren que el proceso autofágico es más extremo en el caso de los cardiomiocitos expuestos a privación de suero/aminoácidos dado una mayor caída en los niveles de ATP y mayor pérdida de viabilidad al inhibir la autofagia.

A similitud del trabajo de Matsui *et al.* (27), en nuestro trabajo se continuó y focalizó al estrés nutricional por privación de suero/glucosa por dos motivos: a) Hubo escaso procesamiento de la proteína LC3-I endógena por la privación de suero/aminoácidos, concordando con lo descrito por Matsui *et al.* (27). b) IGF-1 no fosforilo a p70-S6K ni previno la muerte celular. Para evaluar la autofagia se usaron los tres criterios antes descritos (procesamiento de LC3-I por Western blot, visualización por microscopía de la redistribución de la proteína GFP-LC3 previa transducción de los cardiomiocitos con un adenovirus que porte el gen GFP-LC3 y degradación de la proteína GFP-LC3 por citometría de flujo). Usando tales marcadores, los resultados sistemáticamente mostraron que el estrés nutricional por privación de suero/glucosa estimuló la autofagia en forma similar a la producida por rapamicina. Además, tanto rapamicina como el estrés nutricional disminuyeron la fluorescencia relativa de la proteína GFP. Esta última técnica se está utilizando para verificar si el proceso autofágico llega hasta su etapa final degradativa (134). Estos resultados además sugieren que hubo inducción de la autofagia por estrés nutricional ya que la degradación de la proteína GFP-LC3 se inhibió al utilizar 3-MA, la cual también inhibió la degradación basal en los cardiomiocitos cultivados en medio completo. Sin embargo, ninguna de las dos formas de estrés nutricional aumentó los niveles de Beclin-1, resultado que concuerda con los obtenidos por Matsui *et al.* (27).

Una de las principales preguntas de esta tesis fue estudiar el papel del IGF-1 en la regulación de la autofagia inducida por privación de nutrientes. Nuestros primeros resultados muestran que IGF-1 activa a la vía PKB/mTOR en los cardiomiocitos expuestos a privación de nutrientes, recuperando los niveles intracelulares de ATP y protegiendo a los cardiomiocitos de la muerte celular, sólo cuando se expusieron a privación de suero/glucosa. Teniendo en cuenta estos efectos beneficiosos del IGF-1 se evaluó a continuación cómo afectaba a la autofagia. Los resultados mostraron que IGF-1 inhibió la autofagia del cardiomiocito, determinada por cambios de distribución y fluorescencia de GFP-LC3 y procesamiento de la proteína LC3-I. Al evaluar el efecto de 3-MA en presencia de IGF-1 se observó que IGF-1 seguía protegiendo a los cardiomiocitos de la muerte celular a pesar de estar inhibida la autofagia con 3-MA. En la literatura los efectos del IGF-1 sobre la autofagia son diversos y contradictorios. Mientras algunos reportes muestran al IGF-1 como un inhibidor de la autofagia dependiente de su actividad sobre la vía PKB (85-87), otros lo señalan como un factor de crecimiento que favorece la autofagia producida por privación de glucosa en la línea celular H9c2 derivada de miocito de rata (88). Un trabajo recientemente publicado muestra que IGF-1 previene la acumulación de la vacuolas autofágicas en neuronas de Purkinje privadas de factores de crecimiento debido a un aumento en las tasas de fusión autofagosoma-lisosoma y de degradación (89). Por otra parte nuestros resultados sugieren que IGF-1 incrementa el ATP, mejora la viabilidad e inhibe la autofagia en los cardiomiocitos expuestos a estrés nutricional, efectos que concuerdan con el papel cardioprotector que le ha sido asignado a este factor de crecimiento. Pero queda la pregunta de cómo el IGF-1 inhibe la autofagia, siendo este mecanismo protector, e inhibe la muerte celular. Una de las explicaciones plausibles es la mantención de la actividad de mTOR. En la literatura existe información acerca de que la privación de factores de crecimiento induce una disminución de los transportadores de glucosa, aminoácidos y lipoproteínas, desencadenando un estado catabólico, y donde formas activas de PKB mantienen estos transportadores en membrana por un mecanismo que es dependiente de mTOR (118). Además, se ha relacionado a IGF-1 con un aumento de la respiración mitocondrial en células de cáncer de próstata privadas de suero (135). Esto permitiría sugerir un mecanismo donde el IGF-1 aumenta el transporte de aminoácidos los que entrarían a la respiración celular para generar

energía y de esta manera compensar la disminución de ATP inducida por la privación de suero/glucosa (Figura 38). Al contrario, de lo que sucedería en los cardiomiocitos expuestos a la privación de suero/aminoácidos (estrés más extremo), donde el IGF-1 es incapaz de activar a mTOR, inhibir la autofagia o proteger a los cardiomiocitos de la pérdida de viabilidad (Figura 39).

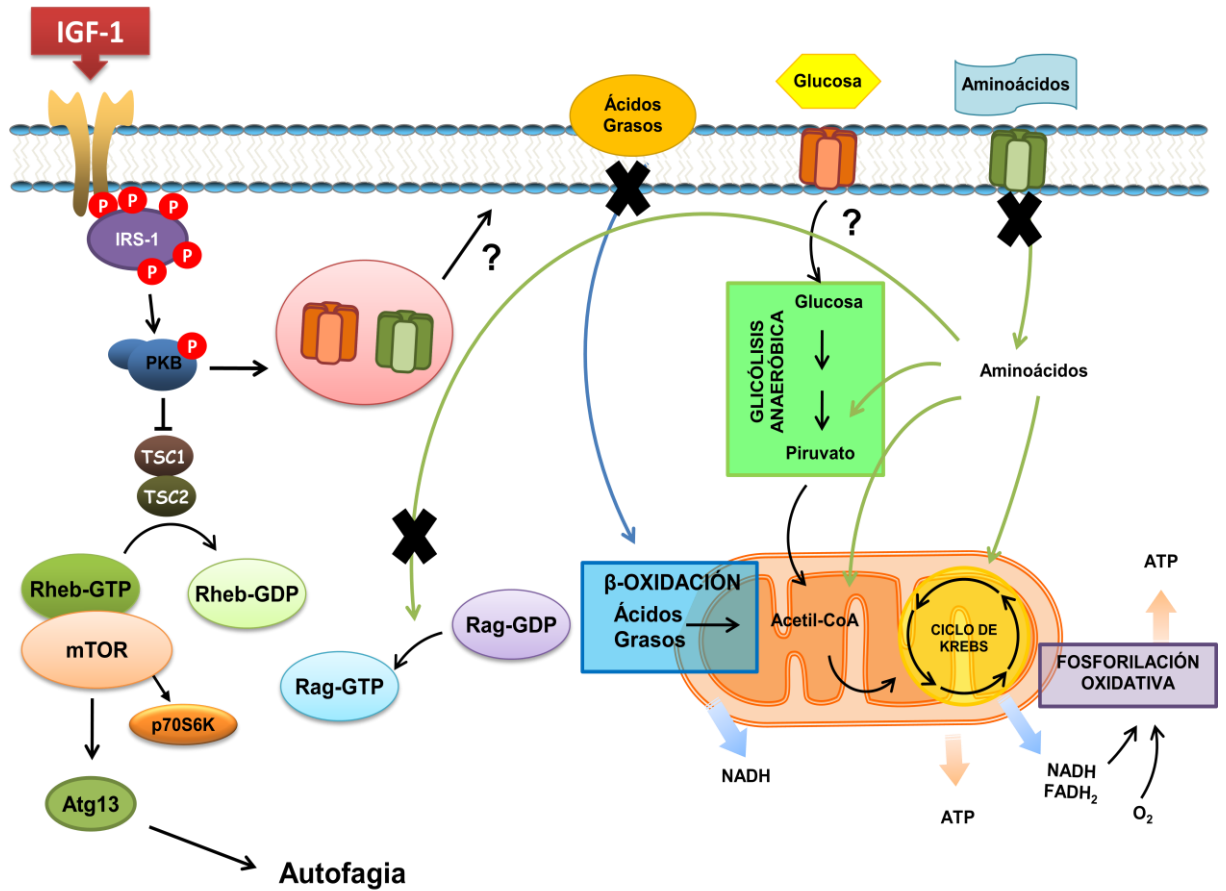
Por otra parte, todos estos resultados fueron obtenidos de un modelo *in vitro* sugieren el papel protector de IGF-1 en los cardiomiocitos. Pero surge la pregunta de si estos resultados *in vitro* son extrapolables a un modelo *in vivo*, donde ya no hablamos de la célula aislada, sino del corazón y los cambios fisiológicos inducidos en ayuno. Para responder esta pregunta se obtuvo la colaboración del Dr. Derek LeRoith, experto en la señalización de IGF-1. El Dr. LeRoith ha desarrollado una gran cantidad de ratones transgénicos, dentro de estos destaca el ratón LID que presenta niveles circulantes de IGF-1 reducidos a un 25% en comparación con un ratón silvestre, esto causado por una deficiencia en el gen de IGF-1 en el hígado (principal productor de este factor de crecimiento), pero sin afectar la producción local de IGF-1. Los ratones LID han sido un excelente modelo para estudiar los efectos del IGF-1 en el desarrollo, diabetes y cáncer. Para los efectos de esta tesis, se realizó una estadía de investigación en el Hospital Mount Sinai en New York donde se comprobó en un modelo *in vivo* el papel de IGF-1 en la autofagia cardiaca.



**Figura 38. Modelo propuesto para la acción del IGF-1 en el estrés nutricional por privación de suero/glucosa**

Se propone que en el estrés nutricional por privación de suero/glucosa, IGF-1 mantiene los transportadores de glucosa y aminoácidos en la membrana a través de la fosforilación de PKB. La mantención de estos transportadores de membrana permiten la entrada de aminoácidos desde el extracelular. Estos aminoácidos pueden entrar a la respiración celular de tres formas : I) transformando se a piruvato como la alanina, serina y cisteína; II) transformándose a AcetilCoa como treonina, lisina, isoleucina y triptófano; III) o transformándose como un intermediario del ciclo de Krebs como aspartato, asparagina, tirosina, fenilalanina, glutamato, valina y metionina. La activación de mTOR por IGF-1 depende de la disponibilidad de aminoácidos que mantienen la forma Rag-GTP que mantiene activa a mTOR y de la fosforilación de PKB del complejo TSC para inhibir su actividad "GAP" sobre Rheb. Además, la activación de mTOR fosforila a Atg13 lo que inhibe la inducción de la autofagia.





**Figura 39. Modelo propuesto para la acción del IGF-1 en el estrés nutricional por privación de suero/aminoácidos**

Se propone que en el estrés nutricional por privación de suero/aminoácidos se desconoce si IGF-1 mantiene los transportadores de glucosa y aminoácidos en la membrana a través de PKB. Además IGF-1 no activa a mTOR, quizás por la disminución en la disponibilidad de aminoácidos. Resultando en que el IGF-1 no inhibe la autofagia ni aumenta los niveles intracelulares de ATP.

### 8.5. Papel de IGF-1 en la autofagia *in vivo*

Los resultados obtenidos en el modelo *in vitro* de estrés nutricional por privación de nutrientes, sugieren que IGF-1 tienen un papel protector en los cardiomiocitos. Pero quedaba por responder si estos efectos podrían ocurrir *in vivo*. Para responder esta pregunta se utilizó un modelo transgénico caracterizado por la eliminación selectiva del gen de IGF-1 en el hígado. Este modelo se generó mediante el sistema CRE/loxP basado en la actividad recombinasa de la proteína CRE que puede ser expresada de manera específica en tejidos. La generación de ratones LID se logró por la inserción de dos secuencias de sitio de loxP a ambos lados del exón 4 del gen IGF1. Estos dos sitios son reconocidos por la recombinasa CRE y son escindidos después de activar a la enzima. La recombinasa CRE bajo el control del promotor de albúmina se expresó específicamente en el hígado y, por lo tanto, la recombinación genética del IGF-1 ocurrió solamente en el hígado. Esta recombinación resulta en la eliminación completa del mRNA para IGF-1, sin cambios compensatorios en otros tejidos (66). Los niveles circulantes de IGF-1 se redujeron en un 75% en los ratones LID, en consecuencia los niveles plasmáticos de hormona GH se elevaron aproximadamente 4 veces, a consecuencia de sistema de retroalimentación negativa a nivel del hipotálamo o la hipófisis.

Los ratones LID, también muestran un aumento en los niveles de insulina de aproximadamente 4 veces respecto al control (94). Sin embargo, los niveles de glucosa en los ratones LID son normales en el estado de saciedad, lo que sugiere la presencia de resistencia a la insulina. Pruebas de tolerancia a la insulina muestran que los ratones LID responden menos a la administración exógena de insulina que los correspondientes controles, confirmando la existencia de un cuadro de resistencia periférica a insulina. Sin embargo, los test de tolerancia a la glucosa no son diferentes entre los ratones LID y controles silvestres (66,94).

El ayuno por 48 h disminuyó el peso corporal, contenido de grasa y masa muscular en la misma proporción en los ratones LID y controles. Sin embargo, al analizar el peso absoluto de ciertos tejidos, sólo en los ratones LID hubo disminución del peso del corazón, a diferencia de lo observado en hígado y grasa subcutánea, en los cuales el peso absoluto disminuyó en igual proporción que los ratones controles. El ayuno por 48 h también disminuyó los niveles plasmáticos de glucosa e insulina. No se observaron cambios en los niveles séricos de los ácidos grasos producto del ayuno en los ratones LID y controles; sin embargo en la literatura se ha informado que ellos aumentan a consecuencia del ayuno (136).

La autofagia inducida por ayuno se evaluó a las 48 h teniendo en cuenta el trabajo de Mizushima *et al.* (14). Estos investigadores observaron que a este tiempo de ayuno, el corazón presentaba un alto grado de autofagia a diferencia de otros órganos como el hígado que presentaban un efecto máximo a las 24 h. El ayuno por 48 h aumentó la autofagia del corazón tanto en los ratones LID como controles, siendo más intensa la inducción de este proceso en los animales LID. En los otros tejidos analizados no se encontraron diferencias significativas en el nivel de autofagia. Esta diferencia en el nivel de inducción, nos motivó a averiguar qué molécula transduccional podría explicar tal diferencia. En la literatura existen diversas evidencias que muestran que AMPK se activa por privación de suero/glucosa (27) y que ella es una proteína kinasa particularmente sensible a los niveles energéticos intracelulares. Sin embargo a su vez, ella modifica el metabolismo intermediario cuando los niveles de AMP/ATP aumentan. En base a estos antecedentes se investigó si AMPK podría estar diferencialmente activa en los ratones LID respecto a sus controles. Tal como se mencionó, las AMPKs pertenecen a una familia de proteínas kinasas heterotriméricas que se activan principalmente como resultado del cambio en la razón AMP/ATP (137). AMPK activa fosforila múltiples enzimas metabólicas y factores de transcripción, suprimiendo principalmente vías anabólicas y estimulando aquellas catabólicas. Tanto la captación de glucosa como la oxidación de ácidos grasos son estimuladas por AMPK con el propósito de restaurar los niveles intracelulares de ATP (138). Aunque la privación de suero/glucosa produce la activación de AMPK en cultivos primarios de cardiomiocitos (27), la actividad de AMPK no es altera por la restricción aguda o

crónica de alimentos en modelos *in vivo* (139). Se sabe que estímulos como el ejercicio físico, pueden activar la AMPK en el corazón, músculo esquelético e hígado de una manera específica en intensidad e isoformas (140-144). Diversas evidencias muestran que AMPK puede ser un sensor *in vivo* de energía nutricional (145,146). Sin embargo, en otro estudio indica que el ayuno no cambia la actividad de AMPK en el músculo esquelético (147). Aunque tales diferencias podrían explicarse por los diversos enfoques experimentales empleados, también existe la posibilidad que la respuesta AMPK a la privación de alimentos sea órgano específica. En nuestro modelo de estudio, el ayuno por 48 h activó a la proteína AMPK sólo en el hígado de los ratones controles. Sin embargo en los animales LID, el ayuno por 48 h indujo selectivamente la fosforilación de AMPK a nivel cardiaco, efecto no observado en los ratones silvestres ayunados. Tanto la disminución del peso del corazón, su mayor nivel de autofagia como la activación de AMPK, sugieren que el IGF-1 regula la autofagia en el corazón. Esta mayor actividad de AMPK podría explicarse debido a la menor actividad de PKB presente en estos ratones carentes de IGF-1 circulantes ya que ellos presentan resistencia a la insulina. Estos hallazgos permiten postular que los ratones LID podrían presentar una autofagia desregulada debido a una alteración a nivel de la regulación de la actividad de AMPK.

La pregunta si los ratones LID son más sensibles a nivel cardiaco a la inducción de autofagia por ayuno por los menores niveles de IGF-1 o por un efecto asociado al fenotipo de estos ratones, como por ejemplo la resistencia a la insulina, no fue respondida en esta tesis debido a una imposibilidad que tuvimos para medir los niveles circulantes de IGF-1. Pero los datos en la literatura muestran que el ayuno por 48 horas disminuye los niveles de la hormona del crecimiento acompañado de una disminución de los niveles de circulantes de IGF-1 de aproximadamente un 40% (148), los cuales no alcanzan a llegar al 75% de reducción de los ratones LID en saciedad, los cuales podrían disminuir aún más en el ayuno. Esta diferencia en los niveles circulantes en ayuno sugiere que el IGF-1 tiene un papel en la autofagia cardiaca *in vivo*.

## 9. CONCLUSIONES

- Nuestros hallazgos *in vitro* permiten postular a la autofagia como un mecanismo de protección en los cardiomiocitos expuestos a privación de nutrientes. Siendo más extremo el estrés nutricional por privación de suero/aminoácidos. IGF-1 protegió a los cardiomiocitos de la privación de suero/glucosa, donde la vía transduccional PKB/mTOR juega un papel principal por sus acciones sobre en el transporte de nutrientes, regulación de metabolismo y finalmente la generación de ATP proveyendo la energía necesaria para los procesos celulares. De esta manera, IGF-1 al inhibir la activación de una vía catabólica de generación de energía como la autofagia, podría proteger a la célula de un colapso energético que desencadene la muerte del cardiomiocito.
- En un modelo *in vivo* de estrés nutricional en el ratón, el ayuno aumentó la autofagia en el corazón, siendo este efecto mayor en los ratones transgénicos LID en comparación a los controles. Los ratones LID se caracterizan por presentar niveles circulantes reducidos de IGF-1 debido a su escasa producción en el hígado, aumento de los niveles circulantes de insulina y resistencia a la insulina en el musculo. Además, los ratones LID sometidos a ayuno presentaron un aumento de la actividad de la proteína AMPK en el tejido cardiaco. Todos estos marcadores sugieren que los menores niveles de IGF-1 presentes en el ratón LID permiten una inducción exagerada de autofagia por el ayuno, lo que puede inducir un aumento de la degradación de las proteínas musculares causando insuficiencia cardiaca.
- En resumen, nuestros resultados *in vitro* e *in vivo* permiten sugerir a IGF-1 como un regulador negativo de la autofagia cardiaca inducida por privación de nutrientes.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Lum JJ, DeBerardinis RJ, Thompson CB. Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; **6**: 439-48.
- (2) Alessi DR, Downes CP. The role of PI 3-kinase in insulin action. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1436**: 151-64.
- (3) Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* 2000; **19**: 5720-8.
- (4) Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 2000; **290**: 1717-21.
- (5) Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T et al. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 2004; **432**: 1032-6.
- (6) Dunn WA, Jr. Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole. *J Cell Biol* 1990; **110**: 1923-33.
- (7) Subramani S. Self-destruction in the line of duty. *Dev Cell* 2001; **1**: 6-8.
- (8) Roberts P, Moshitch-Moshkovitz S, Kvam E, O'Toole E, Winey M, Goldfarb DS. Piecemeal microautophagy of nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 2003; **14**: 129-41.
- (9) Majeski AE, Dice JF. Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; **36**: 2435-44.
- (10) Petiot A, Pattingre S, Arico S, Meley D, Codogno P. Diversity of signaling controls of macroautophagy in mammalian cells. *Cell Struct Funct* 2002; **27**: 431-41.
- (11) Mizushima N, Noda T, Yoshimori T, Tanaka Y, Ishii T, George MD et al. A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* 1998; **395**: 395-8.
- (12) Mizushima N, Sugita H, Yoshimori T, Ohsumi Y. A new protein conjugation system in human. The counterpart of the yeast Apg12p conjugation system essential for autophagy. *J Biol Chem* 1998; **273**: 33889-92.

- (13) Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, Satomi Y, Shimonishi Y, Ishihara N et al. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* 2000; **408**: 488-92.
- (14) Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* 2004; **15**: 1101-11.
- (15) Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; **36**: 2503-18.
- (16) Petiot A, Ogier-Denis E, Blommaert EF, Meijer AJ, Codogno P. Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *J Biol Chem* 2000; **275**: 992-8.
- (17) Kihara A, Kabeya Y, Ohsumi Y, Yoshimori T. Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO Rep* 2001; **2**: 330-5.
- (18) Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 1999; **402**: 672-6.
- (19) Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ, Heintz N. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100**: 15077-82.
- (20) Raught B, Gingras AC, Sonenberg N. The target of rapamycin (TOR) proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**: 7037-44.
- (21) Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, Nagano K, Ohsumi M, Ohsumi Y. Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol* 2000; **150**: 1507-13.
- (22) Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* 2005; **1**: 15-25.
- (23) Inoki K, Zhu T, Guan KL. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 2003; **115**: 577-90.
- (24) Luiken JJ, Coort SL, Willems J, Coumans WA, Bonen A, van der Vusse GJ et al. Contraction-induced fatty acid translocase/CD36 translocation

in rat cardiac myocytes is mediated through AMP-activated protein kinase signaling. *Diabetes* 2003; **52**: 1627-34.

- (25) Russell RR, III, Bergeron R, Shulman GI, Young LH. Translocation of myocardial GLUT-4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR. *Am J Physiol* 1999; **277**: H643-H649.
- (26) Marsin AS, Bertrand L, Rider MH, Deprez J, Beauloye C, Vincent MF et al. Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Curr Biol* 2000; **10**: 1247-55.
- (27) Matsui Y, Takagi H, Qu X, Abdellatif M, Sakoda H, Asano T et al. Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy. *Circ Res* 2007; **100**: 914-22.
- (28) Bursch W. The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ* 2001; **8**: 569-81.
- (29) Tsujimoto Y, Shimizu S. Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death Differ* 2005; **12**: 1528-34.
- (30) Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest* 2005; **115**: 2679-88.
- (31) Marino G, Lopez-Otin C. Autophagy: molecular mechanisms, physiological functions and relevance in human pathology. *Cell Mol Life Sci* 2004; **61**: 1439-54.
- (32) Saeki K, Yuo A, Okuma E, Yazaki Y, Susin SA, Kroemer G et al. Bcl-2 down-regulation causes autophagy in a caspase-independent manner in human leukemic HL60 cells. *Cell Death Differ* 2000; **7**: 1263-9.
- (33) Yu L, Alva A, Su H, Dutt P, Freundt E, Welsh S et al. Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science* 2004; **304**: 1500-2.
- (34) Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Thompson CB et al. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol* 2004; **6**: 1221-8.
- (35) Cardenas-Aguayo MC, Santa-Olalla J, Baizabal JM, Salgado LM, Covarrubias L. Growth factor deprivation induces an alternative non-



apoptotic death mechanism that is inhibited by Bcl2 in cells derived from neural precursor cells. *J Hematother Stem Cell Res* 2003; **12**: 735-48.

- (36) Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N et al. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 2005; **122**: 927-39.
- (37) Elmore SP, Qian T, Grissom SF, Lemasters JJ. The mitochondrial permeability transition initiates autophagy in rat hepatocytes. *FASEB J* 2001; **15**: 2286-7.
- (38) Sybers HD, Ingwall J, DeLuca M. Autophagic response to sublethal injury in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1979; **11**: 331-8.
- (39) Decker RS, Wildenthal K. Lysosomal alterations in hypoxic and reoxygenated hearts. I. Ultrastructural and cytochemical changes. *Am J Pathol* 1980; **98**: 425-44.
- (40) Decker RS, Poole AR, Crie JS, Dingle JT, Wildenthal K. Lysosomal alterations in hypoxic and reoxygenated hearts. II. Immunohistochemical and biochemical changes in cathepsin D. *Am J Pathol* 1980; **98**: 445-56.
- (41) Horman S, Beauloye C, Vertommen D, Vanoverschelde JL, Hue L, Rider MH. Myocardial ischemia and increased heart work modulate the phosphorylation state of eukaryotic elongation factor-2. *J Biol Chem* 2003; **278**: 41970-6.
- (42) Tanaka Y, Guhde G, Suter A, Eskelinen EL, Hartmann D, Lullmann-Rauch R et al. Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature* 2000; **406**: 902-6.
- (43) Nishino I, Fu J, Tanji K, Yamada T, Shimojo S, Koori T et al. Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease). *Nature* 2000; **406**: 906-10.
- (44) Saftig P, Tanaka Y, Lullmann-Rauch R, von FK. Disease model: LAMP-2 enlightens Danon disease. *Trends Mol Med* 2001; **7**: 37-9.
- (45) Nakai A, Yamaguchi O, Takeda T, Higuchi Y, Hikoso S, Taniike M et al. The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat Med* 2007; **13**: 619-24.

- (46) Tannous P, Zhu H, Nemchenko A, Berry JM, Johnstone JL, Shelton JM et al. Intracellular protein aggregation is a proximal trigger of cardiomyocyte autophagy. *Circulation* 2008; **117**: 3070-8.
- (47) Hamacher-Brady A, Brady NR, Logue SE, Sayen MR, Jinno M, Kirshenbaum LA et al. Response to myocardial ischemia/reperfusion injury involves Bnip3 and autophagy. *Cell Death Differ* 2007; **14**: 146-57.
- (48) Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, Lindsten T et al. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* 2005; **120**: 237-48.
- (49) Kostin S, Pool L, Elsasser A, Hein S, Drexler HC, Arnon E et al. Myocytes die by multiple mechanisms in failing human hearts. *Circ Res* 2003; **92**: 715-24.
- (50) Knaapen MW, Davies MJ, De BM, Haven AJ, Martinet W, Kockx MM. Apoptotic versus autophagic cell death in heart failure. *Cardiovasc Res* 2001; **51**: 304-12.
- (51) Hein S, Arnon E, Kostin S, Schonburg M, Elsasser A, Polyakova V et al. Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms. *Circulation* 2003; **107**: 984-91.
- (52) Yan L, Vatner DE, Kim SJ, Ge H, Masurekar M, Masover WH et al. Autophagy in chronically ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**: 13807-12.
- (53) Elsasser A, Vogt AM, Nef H, Kostin S, Mollmann H, Skwara W et al. Human hibernating myocardium is jeopardized by apoptotic and autophagic cell death. *J Am Coll Cardiol* 2004; **43**: 2191-9.
- (54) Depre C, Vatner SF. Cardioprotection in stunned and hibernating myocardium. *Heart Fail Rev* 2007; **12**: 307-17.
- (55) Blundell TL, Humbel RE. Hormone families: pancreatic hormones and homologous growth factors. *Nature* 1980; **287**: 781-7.
- (56) Brissenden JE, Ullrich A, Francke U. Human chromosomal mapping of genes for insulin-like growth factors I and II and epidermal growth factor. *Nature* 1984; **310**: 781-4.

- (57) Rotwein P. Structure, evolution, expression and regulation of insulin-like growth factors I and II. *Growth Factors* 1991; **5**: 3-18.
- (58) Adams TE, Epa VC, Garrett TP, Ward CW. Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Cell Mol Life Sci* 2000; **57**: 1050-93.
- (59) De MP, Whittaker J. Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design. *Nat Rev Drug Discov* 2002; **1**: 769-83.
- (60) LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT, Jr. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev* 1995; **16**: 143-63.
- (61) Favelyukis S, Till JH, Hubbard SR, Miller WT. Structure and autoregulation of the insulin-like growth factor 1 receptor kinase. *Nat Struct Biol* 2001; **8**: 1058-63.
- (62) Leininger GM, Backus C, Uhler MD, Lentz SI, Feldman EL. Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt effectors mediate insulin-like growth factor-I neuroprotection in dorsal root ganglia neurons. *FASEB J* 2004; **18**: 1544-6.
- (63) Foncea R, Andersson M, Ketterman A, Blakesley V, Sapag-Hagar M, Sugden PH et al. Insulin-like growth factor-I rapidly activates multiple signal transduction pathways in cultured rat cardiac myocytes. *J Biol Chem* 1997; **272**: 19115-24.
- (64) Ibarra C, Estrada M, Carrasco L, Chiong M, Liberona JL, Cardenas C et al. Insulin-like growth factor-1 induces an inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent increase in nuclear and cytosolic calcium in cultured rat cardiac myocytes. *J Biol Chem* 2004; **279**: 7554-65.
- (65) Sjogren K, Liu JL, Blad K, Skrtic S, Vidal O, Wallenius V et al. Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**: 7088-92.
- (66) Yakar S, Liu JL, Stannard B, Butler A, Accili D, Sauer B et al. Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**: 7324-9.
- (67) D'Ercole AJ, Stiles AD, Underwood LE. Tissue concentrations of somatomedin C: further evidence for multiple sites of synthesis and

paracrine or autocrine mechanisms of action. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; **81**: 935-9.

- (68) Mathews LS, Enberg B, Norstedt G. Regulation of rat growth hormone receptor gene expression. *J Biol Chem* 1989; **264**: 9905-10.
- (69) Sacca L, Cittadini A, Fazio S. Growth hormone and the heart. *Endocr Rev* 1994; **15**: 555-73.
- (70) Thorner MO, Vance ML. Growth hormone, 1988. *J Clin Invest* 1988; **82**: 745-7.
- (71) Ren J, Samson WK, Sowers JR. Insulin-like growth factor I as a cardiac hormone: physiological and pathophysiological implications in heart disease. *J Mol Cell Cardiol* 1999; **31**: 2049-61.
- (72) Foncea R, Galvez A, Perez V, Morales MP, Calixto A, Melendez J et al. Extracellular regulated kinase, but not protein kinase C, is an antiapoptotic signal of insulin-like growth factor-1 on cultured cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **273**: 736-44.
- (73) Morales MP, Galvez A, Eltit JM, Ocaranza P, Diaz-Araya G, Lavandero S. IGF-1 regulates apoptosis of cardiac myocyte induced by osmotic-stress. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **270**: 1029-35.
- (74) Galvez A, Morales MP, Eltit JM, Ocaranza P, Carrasco L, Campos X et al. A rapid and strong apoptotic process is triggered by hyperosmotic stress in cultured rat cardiac myocytes. *Cell Tissue Res* 2001; **304**: 279-85.
- (75) Chen DB, Wang L, Wang PH. Insulin-like growth factor I retards apoptotic signaling induced by ethanol in cardiomyocytes. *Life Sci* 2000; **67**: 1683-93.
- (76) Li Q, Li B, Wang X, Leri A, Jana KP, Liu Y et al. Overexpression of insulin-like growth factor-1 in mice protects from myocyte death after infarction, attenuating ventricular dilation, wall stress, and cardiac hypertrophy. *J Clin Invest* 1997; **100**: 1991-9.
- (77) Buerke M, Murohara T, Skurk C, Nuss C, Tomaselli K, Lefer AM. Cardioprotective effect of insulin-like growth factor I in myocardial ischemia followed by reperfusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**: 8031-5.

- (78) Anversa P, Olivetti G, Leri A, Liu Y, Kajstura J. Myocyte cell death and ventricular remodeling. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1997; **6**: 169-76.
- (79) Wang L, Ma W, Markovich R, Chen JW, Wang PH. Regulation of cardiomyocyte apoptotic signaling by insulin-like growth factor I. *Circ Res* 1998; **83**: 516-22.
- (80) Matthews CC, Feldman EL. Insulin-like growth factor I rescues SH-SY5Y human neuroblastoma cells from hyperosmotic induced programmed cell death. *J Cell Physiol* 1996; **166**: 323-31.
- (81) Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, Leneuve P, Geloën A, Even PC et al. IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* 2003; **421**: 182-7.
- (82) Li B, Setoguchi M, Wang X, Andreoli AM, Leri A, Malhotra A et al. Insulin-like growth factor-1 attenuates the detrimental impact of nonocclusive coronary artery constriction on the heart. *Circ Res* 1999; **84**: 1007-19.
- (83) Maldonado C, Cea P, Adasme T, Collao A, Diaz-Araya G, Chiong M et al. IGF-1 protects cardiac myocytes from hyperosmotic stress-induced apoptosis via CREB. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **336**: 1112-8.
- (84) Parrizas M, LeRoith D. Insulin-like growth factor-1 inhibition of apoptosis is associated with increased expression of the bcl-xL gene product. *Endocrinology* 1997; **138**: 1355-8.
- (85) Gu Y, Wang C, Cohen A. Effect of IGF-1 on the balance between autophagy of dysfunctional mitochondria and apoptosis. *FEBS Lett* 2004; **577**: 357-60.
- (86) Jia G, Cheng G, Gangahar DM, Agrawal DK. Insulin-like growth factor-1 and TNF-alpha regulate autophagy through c-jun N-terminal kinase and Akt pathways in human atherosclerotic vascular smooth cells. *Immunol Cell Biol* 2006; **84**: 448-54.
- (87) Sobolewska A, Gajewska M, Zarzynska J, Gajkowska B, Motyl T. IGF-I, EGF, and sex steroids regulate autophagy in bovine mammary epithelial cells via the mTOR pathway. *Eur J Cell Biol* 2009; **88**: 117-30.
- (88) Aki T, Yamaguchi K, Fujimiya T, Mizukami Y. Phosphoinositide 3-kinase accelerates autophagic cell death during glucose deprivation in

the rat cardiomyocyte-derived cell line H9c2. *Oncogene* 2003; **22**: 8529-35.

- (89) Bains M, Florez-McClure ML, Heidenreich KA. IGF-I prevents the accumulation of autophagic vesicles and cell death in Purkinje neurons by increasing the rate of autophagosome-to-lysosome fusion and degradation. *J Biol Chem* 2009.
- (90) Liu JL, Grinberg A, Westphal H, Sauer B, Accili D, Karas M et al. Insulin-like growth factor-I affects perinatal lethality and postnatal development in a gene dosage-dependent manner: manipulation using the Cre/loxP system in transgenic mice. *Mol Endocrinol* 1998; **12**: 1452-62.
- (91) Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 1986; **89**: 271-7.
- (92) Oancea M, Mazumder S, Crosby ME, Almasan A. Apoptosis assays. *Methods Mol Med* 2006; **129**: 279-90.
- (93) Shvets E, Fass E, Elazar Z. Utilizing flow cytometry to monitor autophagy in living mammalian cells. *Autophagy* 2008; **4**: 621-8.
- (94) Yakar S, Liu JL, Fernandez AM, Wu Y, Schally AV, Frystyk J et al. Liver-specific igf-1 gene deletion leads to muscle insulin insensitivity. *Diabetes* 2001; **50**: 1110-8.
- (95) Yakar S, Setser J, Zhao H, Stannard B, Haluzik M, Glatt V et al. Inhibition of growth hormone action improves insulin sensitivity in liver IGF-1-deficient mice. *J Clin Invest* 2004; **113**: 96-105.
- (96) van der Vusse GJ, Glatz JF, Stam HC, Reneman RS. Fatty acid homeostasis in the normoxic and ischemic heart. *Physiol Rev* 1992; **72**: 881-940.
- (97) Taegtmeyer H. Energy metabolism of the heart: from basic concepts to clinical applications. *Curr Probl Cardiol* 1994; **19**: 59-113.
- (98) Opie LH, Evans JR, Shipp JC. Effect of fasting on glucose and palmitate metabolism of perfused rat heart. *Am J Physiol* 1963; **205**: 1203-8.

- (99) Montessuit C, Papageorgiou I, Tardy I, Lerch R. Effect of nutritional state on substrate metabolism and contractile function in postischemic rat myocardium. *Am J Physiol* 1996; **271**: H2060-H2070.
- (100) Brass EP, Hoppel CL. Carnitine metabolism in the fasting rat. *J Biol Chem* 1978; **253**: 2688-93.
- (101) Reaven GM, Hollenbeck C, Jeng CY, Wu MS, Chen YD. Measurement of plasma glucose, free fatty acid, lactate, and insulin for 24 h in patients with NIDDM. *Diabetes* 1988; **37**: 1020-4.
- (102) van der Lee KA, Vork MM, De Vries JE, Willemsen PH, Glatz JF, Reneman RS et al. Long-chain fatty acid-induced changes in gene expression in neonatal cardiac myocytes. *J Lipid Res* 2000; **41**: 41-7.
- (103) Asnaghi L, Bruno P, Priulla M, Nicolini A. mTOR: a protein kinase switching between life and death. *Pharmacol Res* 2004; **50**: 545-9.
- (104) Laviola L, Natalicchio A, Giorgino F. The IGF-I signaling pathway. *Curr Pharm Des* 2007; **13**: 663-9.
- (105) Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 1993; **75**: 59-72.
- (106) Wu W, Lee WL, Wu YY, Chen D, Liu TJ, Jang A et al. Expression of constitutively active phosphatidylinositol 3-kinase inhibits activation of caspase 3 and apoptosis of cardiac muscle cells. *J Biol Chem* 2000; **275**: 40113-9.
- (107) Fujio Y, Nguyen T, Wencker D, Kitsis RN, Walsh K. Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart. *Circulation* 2000; **101**: 660-7.
- (108) Tokunaga C, Yoshino K, Yonezawa K. mTOR integrates amino acid- and energy-sensing pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **313**: 443-6.
- (109) Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; **10**: 307-18.
- (110) Zhang Y, Gao X, Saucedo LJ, Ru B, Edgar BA, Pan D. Rheb is a direct target of the tuberous sclerosis tumour suppressor proteins. *Nat Cell Biol* 2003; **5**: 578-81.

- (111) Tee AR, Manning BD, Roux PP, Cantley LC, Blenis J. Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. *Curr Biol* 2003; **13**: 1259-68.
- (112) Long X, Lin Y, Ortiz-Vega S, Yonezawa K, Avruch J. Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Curr Biol* 2005; **15**: 702-13.
- (113) Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol* 2002; **4**: 648-57.
- (114) Ma L, Chen Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pandolfi PP. Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell* 2005; **121**: 179-93.
- (115) Potter CJ, Pedraza LG, Xu T. Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. *Nat Cell Biol* 2002; **4**: 658-65.
- (116) Roux PP, Ballif BA, Anjum R, Gygi SP, Blenis J. Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101**: 13489-94.
- (117) Hahn-Windgassen A, Nogueira V, Chen CC, Skeen JE, Sonenberg N, Hay N. Akt activates the mammalian target of rapamycin by regulating cellular ATP level and AMPK activity. *J Biol Chem* 2005; **280**: 32081-9.
- (118) Edinger AL, Thompson CB. Akt maintains cell size and survival by increasing mTOR-dependent nutrient uptake. *Mol Biol Cell* 2002; **13**: 2276-88.
- (119) Wang J, Whiteman MW, Lian H, Wang G, Singh A, Huang D et al. A non-canonical MEK/ERK signaling pathway regulates autophagy via regulating Beclin 1. *J Biol Chem* 2009.
- (120) Davani EY, Brumme Z, Singhera GK, Cote HC, Harrigan PR, Dorscheid DR. Insulin-like growth factor-1 protects ischemic murine myocardium from ischemia/reperfusion associated injury. *Crit Care* 2003; **7**: R176-R183.
- (121) Lai HC, Liu TJ, Ting CT, Sharma PM, Wang PH. Insulin-like growth factor-1 prevents loss of electrochemical gradient in cardiac muscle



- mitochondria via activation of PI 3 kinase/Akt pathway. *Mol Cell Endocrinol* 2003; **205**: 99-106.
- (122) Pi Y, Goldenthal MJ, Marin-Garcia J. Mitochondrial involvement in IGF-1 induced protection of cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation injury. *Mol Cell Biochem* 2007; **301**: 181-9.
- (123) Westermann B. Merging mitochondria matters: cellular role and molecular machinery of mitochondrial fusion. *EMBO Rep* 2002; **3**: 527-31.
- (124) Hackenbrock CR. Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. I. Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady state in isolated liver mitochondria. *J Cell Biol* 1966; **30**: 269-97.
- (125) Scalettar BA, Abney JR, Hackenbrock CR. Dynamics, structure, and function are coupled in the mitochondrial matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; **88**: 8057-61.
- (126) Mannella CA, Marko M, Penczek P, Barnard D, Frank J. The internal compartmentation of rat-liver mitochondria: tomographic study using the high-voltage transmission electron microscope. *Microsc Res Tech* 1994; **27**: 278-83.
- (127) Scorrano L, Ashiya M, Buttle K, Weiler S, Oakes SA, Mannella CA et al. A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev Cell* 2002; **2**: 55-67.
- (128) Zorzano A, Bach D, Pich S, Palacin M. [Role of novel mitochondrial proteins in energy balance]. *Rev Med Univ Navarra* 2004; **48**: 30-5.
- (129) Suleiman MS, Singh RJ, Stewart CE. Apoptosis and the cardiac action of insulin-like growth factor I. *Pharmacol Ther* 2007; **114**: 278-94.
- (130) Yamashita K, Kajstura J, Discher DJ, Wasserlauf BJ, Bishopric NH, Anversa P et al. Reperfusion-activated Akt kinase prevents apoptosis in transgenic mouse hearts overexpressing insulin-like growth factor-1. *Circ Res* 2001; **88**: 609-14.
- (131) Kim I, Rodriguez-Enriquez S, Lemasters JJ. Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch Biochem Biophys* 2007; **462**: 245-53.
- (132) Gustafsson AB, Gottlieb RA. Mechanisms of apoptosis in the heart. *J Clin Immunol* 2003; **23**: 447-59.

- (133) Hamacher-Brady A, Brady NR, Gottlieb RA. Enhancing macroautophagy protects against ischemia/reperfusion injury in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 2006; **281**: 29776-87.
- (134) Shvets E, Elazar Z. Flow cytometric analysis of autophagy in living mammalian cells. *Methods Enzymol* 2009; **452**: 131-41.
- (135) Unterluggauer H, Hutter E, Viertler HP, Jansen-Durr P. Insulin-like growth factor-induced signals activate mitochondrial respiration. *Biotechnol J* 2008; **3**: 813-6.
- (136) van der Lee KA, Willemsen PH, Samec S, Seydoux J, Dulloo AG, Pelsers MM et al. Fasting-induced changes in the expression of genes controlling substrate metabolism in the rat heart. *J Lipid Res* 2001; **42**: 1752-8.
- (137) Hardie DG, Carling D, Halford N. Roles of the Snf1/Rkin1/AMP-activated protein kinase family in the response to environmental and nutritional stress. *Semin Cell Biol* 1994; **5**: 409-16.
- (138) Hardie DG, Carling D, Carlson M. The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu Rev Biochem* 1998; **67**: 821-55.
- (139) Gonzalez AA, Kumar R, Mulligan JD, Davis AJ, Weindruch R, Saupe KW. Metabolic adaptations to fasting and chronic caloric restriction in heart, muscle, and liver do not include changes in AMPK activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; **287**: E1032-E1037.
- (140) Carlson CL, Winder WW. Liver AMP-activated protein kinase and acetyl-CoA carboxylase during and after exercise. *J Appl Physiol* 1999; **86**: 669-74.
- (141) Coven DL, Hu X, Cong L, Bergeron R, Shulman GI, Hardie DG et al. Physiological role of AMP-activated protein kinase in the heart: graded activation during exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; **285**: E629-E636.
- (142) Park H, Kaushik VK, Constant S, Prentki M, Przybytkowski E, Ruderman NB et al. Coordinate regulation of malonyl-CoA decarboxylase, sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, and acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase in rat tissues in response to exercise. *J Biol Chem* 2002; **277**: 32571-7.

- (143) Winder WW, Hardie DG. Inactivation of acetyl-CoA carboxylase and activation of AMP-activated protein kinase in muscle during exercise. *Am J Physiol* 1996; **270**: E299-E304.
- (144) Wojtaszewski JF, Nielsen P, Hansen BF, Richter EA, Kiens B. Isoform-specific and exercise intensity-dependent activation of 5'-AMP-activated protein kinase in human skeletal muscle. *J Physiol* 2000; **528**: 221-6.
- (145) Munday MR, Milic MR, Takhar S, Holness MJ, Sugden MC. The short-term regulation of hepatic acetyl-CoA carboxylase during starvation and re-feeding in the rat. *Biochem J* 1991; **280**: 733-7.
- (146) Witters LA, Kemp BE. Insulin activation of acetyl-CoA carboxylase accompanied by inhibition of the 5'-AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1992; **267**: 2864-7.
- (147) Kaushik VK, Young ME, Dean DJ, Kurowski TG, Saha AK, Ruderman NB. Regulation of fatty acid oxidation and glucose metabolism in rat soleus muscle: effects of AICAR. *Am J Physiol* 2001; **281**: E335-E340.
- (148) Frystyk J, Delhanty PJ, Skjaerbaek C, Baxter RC. Changes in the circulating IGF system during short-term fasting and refeeding in rats. *Am J Physiol* 1999; **277**: E245-E252.