

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS



**“CARDIOTOXICIDAD POR DOXORRUBICINA:
EFECTO SOBRE LA AUTOFAGIA BASAL”**

**Presentada a la Universidad de Chile
para optar al Grado de Doctor en Farmacología**

POR

MARCELA BEATRIZ PIZARRO BARAHONA

Director de Tesis

Dr. Sergio Lavandero

**SANTIAGO- CHILE
2016**

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis presentada por el candidato:

MARCELA BEATRIZ PIZARRO BARAHONA

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Doctor en Farmacología, en el examen de defensa de Tesis rendido el día.....de del 2016.

Director de Tesis:

Dr. Sergio Lavandero G

Comisión Informante de Tesis:

Dr. Ramón Rodrigo S

Dr. Alejandro Álvarez L

Dr. Ricardo Moreno M

Gracias Dios.

*Porque gracias a ti siempre he salido victoriosa
en todas las malas decisiones que he tomado.*

PRESENTACIÓN

La presente tesis de doctorado fue dirigida por el Dr. Sergio Lavandero y se realizó en el Laboratorio de Transducción de Señales Moleculares del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile el cual pertenece al Centro de Estudios Avanzados de Enfermedades Crónicas (*Advanced Center for Chronic Diseases, ACCDiS*).

ACTIVIDADES Y PRODUCTOS GENERADOS EN LA TESIS

Publicaciones

- **Pizarro M**, Troncoso R, Martínez GJ, Castro PF, Chiong M, Lavandero S. Autophagy protects cardiomyocytes from doxorubicin-induced toxicity. *Toxicology* (manuscrito aceptado, 2016).
- Garrido V, Mendoza-Torres E, Díaz A, **Pizarro M**, Bustamante M, Chavez MN, Riquelme JA, Ocaranza MP, Mellado R, Allende ML, Lavandero S. Novel therapies targeting cardioprotection and regeneration. *Curr Pharm Design* (manuscrito en revisión, 2016).
- García L, Bustamante M, **Pizarro M**, Quiroga C, Rodríguez A, Westermeier F, Bernal-Sore I, Castro P, Lavandero S, Troncoso R. Autophagy Networks in Cardiovascular Diseases. In: *Autophagy Networks in Inflammation*, M.C. Maiuri, D. De Stefano (eds.), Springer International Publishing, Switzerland 2016, pages 297-322.

Presentaciones a congresos nacionales e internacionales

- **Pizarro M**, Chiong M, Lavandero S. "Doxorrubicin inhibits autophagy in cultured rat cardiomyocytes". XXXVII Reunión Anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. 30 Septiembre - 4 Octubre, 2014. Puerto Varas, Chile.
- **Pizarro M**, Chiong M, Lavandero S. "Doxorrubicina inhibe la autofagia del cardiomiocito a través de la activación de la vía AKT-mTOR". LI° Congreso

Chileno de Cardiología y Cirugía Cardiovascular. 29 Noviembre - 2 Diciembre, 2014. Viña del Mar, Chile.

- **Pizarro M**, Chiong M, Lavandero S. "Doxorrubicin inhibits autophagy in cultured rat cardiomyocytes". XII Congreso Panamericano de Bioquímica y Biología Molecular, PABMB. 9 -14 Noviembre, 2013. Puerto Varas, Chile.

BECAS Y FINANCIAMIENTO

Becas

- Beca CONICYT para Estudios de Doctorado en Chile
- Beca CONICYT (24120074) de Apoyo a Realización de Tesis Doctoral

Financiamiento

- Proyecto FONDAP 15130011 al Dr. Sergio Lavandero

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Sergio Lavandero**, por darme la oportunidad de concretar un sueño. Por su gran apoyo, dirección e inagotable paciencia.

Gracias a los integrantes de mi comisión por su gran sabiduría, guía y apoyo.

A los **Dres. Mario Chiong y Rodrigo Troncoso** quienes siempre lograron sacar el mejor provecho a mis resultados.

A **mis grandes amigos del "lab del segundo piso"**, porque su amistad fue lo mejor de todo este camino: Elia, Glorita, Roro, Ariel, Tere, Verito, Grace.

A todos **los integrantes del LTSM** desde el 2008 hasta ahora. Gracias por todos los momentos, quizás muchos de ellos ni siquiera percibieron lo importante que fueron para mí.

A **Fidel**, gran amigo. Por tu alegría, apoyo y porque siempre solucionaste todo en el laboratorio, muchas gracias.

A **Gindrita**, más que un técnico, encontré en ti una gran amiga, una persona maravillosa; tu fuerza y confianza en mí, me obligó a no defraudarte y terminar este doctorado, te quiero mucho amiga.

A **David Engel**, amigo de años. Gracias porque tuviste más fe en mí de lo que yo misma tenía para realizar este doctorado. Tu experiencia, tu paciencia para escucharme y por darme fuerza hasta el último momento, fueron fundamentales.

Mis mayores agradecimientos son para mi familia: **mi Mono**, te amaré siempre, porque no fue fácil soportarme todos estos años de doctorado. **Pancho, Paula, Martín**, más que ser un ejemplo, lo que pretendí fue mostrarles que aunque puede ser difícil y a veces tan terrible que quieres renunciar, si quieren que un sueño se cumpla, se puede trabajando mucho.

A mi **Musti, Rigbi, Eva, Raiden** y ahora **Wilo** porque siempre me recibieron con alegría y lograron cambiar mi mal humor y mis penas con su cariño incondicional.

Y gracias a todo el familión que me sostiene siempre: mis padres **Uti y Waldo**, la "**abuelita Magdalena**", mis hermanos, mis sobrinos y sobrinas, cuñados y cuñadas.

INDICE

INDICE	8
INDICE DE FIGURAS.....	11
ABREVIATURAS	13
RESUMEN.....	16
SUMMARY	19
1. INTRODUCCION.....	21
1.1. Generalidades de la doxorubicina	21
1.2. Doxorubicina y cardiotoxicidad	22
1.3. Mecanismo de cardiotoxicidad.....	23
1.4. Muerte celular	25
1.4.1. Apoptosis.....	26
1.4.2. Necrosis	28
1.4.3. Autofagia	29
1.5. Doxorubicina y autofagia	44
2. HIPOTESIS	45
3. OBJETIVO GENERAL.....	45
4. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	45
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
5.1. Reactivos.....	46
5.2. Cultivo primario de cardiomiocitos de rata neonata.....	46
5.2.1. Material biológico.....	46
5.2.2. Aislamiento y cultivo de cardiomiocitos de rata neonata	47
5.3. Obtención de extractos proteicos celulares.....	47
5.4. Determinación de proteínas.....	48
5.5. Electroforesis en gel de poliacrilamida	48
5.6. Electrotransferencia de proteínas	48

5.7.	Western blot	48
5.8.	Determinación de la actividad de LDH	49
5.9.	Determinación del contenido intracelular de ATP	49
5.10.	Detección de fosfatidilserina-ANEXINA V-FITC.....	50
5.11.	Determinación de la muerte por apoptosis mediante fragmentación de caspasa 3	50
5.12.	Silenciamiento de beclin1 mediante siRNA	50
5.13.	Cuantificación del flujo de autofagia	51
5.14.	Expresión de resultados y análisis estadístico	51
6.	RESULTADOS	52
6.1.	Caracterización de la muerte inducida por doxorubicina.....	52
6.1.1.	Efecto de doxorubicina sobre la muerte por necrosis del cardiomiocito	52
6.1.2.	Efecto de doxorubicina sobre los niveles intracelulares de ATP	53
6.1.3.	Efecto de doxorubicina en la apoptosis dependiente de caspasa.....	53
6.2.	Establecer el efecto de doxorubicina sobre la autofagia basal en los cardiomiocitos y su relación con la muerte celular.....	58
6.2.1.	Efecto de doxorubicina sobre la autofagia basal.....	58
6.2.2.	Efecto de doxorubicina sobre la autofagia basal y su relación con la muerte celular	67
6.2.3.	Efecto de la activación de la autofagia sobre la muerte del cardiomiocito provocada por doxorubicina.....	72
6.3.	Determinación la activación de la vía de señalización AKT-mTOR en cardiomiocitos expuestos a doxorubicina	73
6.3.1.	Eefecto de doxorubicina sobre los niveles de beclin1 en cardiomiocitos ...	73
6.3.2.	Efecto de doxorubicina en la activación de la vía de señalización AKT/ mTOR	73
7.	DISCUSIÓN.....	77
7.1.	Doxorubicina y muerte celular	78

7.2.	Doxorrubicina y autofagia	79
7.3.	Doxorrubicina, autofagia y muerte celular.....	81
7.3.1.	Efecto de 3-metiladenina sobre la muerte celular inducida por doxorrubicina 81	
7.3.2.	Efecto de bafilomicina sobre la muerte celular inducida por doxorrubicina .	81
7.3.3.	Efecto de siBeclin sobre la muerte celular inducida por doxorrubicina.....	82
7.3.4.	Efecto de rapamicina sobre la muerte celular inducida por doxorrubicina...	82
7.4.	Efecto de doxorrubicina en la activación de la vía de señalización AKT-mTOR que regula la autofagia en el cardiomiocito	82
7.5.	Efecto de doxorrubicina sobre la actividad del lisosoma	84
8.	CONCLUSIONES	85
9.	BIBLIOGRAFIA.....	86

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de Doxorubicina	22
Figura 2. Formación de ROS por Doxorubicina.	24
Figura 3. Esquema morfológico de la muerte celular por apoptosis.	26
Figura 4. Representación esquemática de las vías de activación de la apoptosis.....	28
Figura 5. Esquema morfológico de la muerte celular por necrosis.	29
Figura 6. Diagrama esquemático de los tipos de autofagia.	30
Figura 7. Principales proteínas ATG en las diferentes etapas de la formación del autofagosoma.	32
Figura 8. Los sistemas de conjugación tipo ubiquitin ligasa en la formación del autofagosoma.	34
Figura 9. Cronología de eventos en la formación del autofagosoma en células de mamífero.	35
Figura 10. Estructura de p62/SQSTM1 y sus principales dominios.	36
Figura 11. El reconocimiento selectivo de componentes celulares para ser degradados por autofagia, es mediado por la proteína adaptadora p62.	37
Figura 12. Esquema del proceso de autofagia.	38
Figura 13. Interacción de mTOR con el complejo ULK en la regulación de la autofagia en células de mamífero.	39
Figura 14. Vías de señalización en la regulación de la autofagia.	41
Figura 15. Esquema de la regulación de la autofagia por AMPK.	43
Figura 16. Efecto de Doxorubicina sobre la actividad de LDH en la cuantificación de la muerte celular.....	54
Figura 17. Efecto de Doxorubicina sobre los cardiomiocitos en la evaluación de la muerte por apoptosis/necrosis.	55
Figura 18. Efecto de Doxorubicina sobre los niveles intracelulares de ATP en cardiomiocitos de rata.....	56
Figura 19. Efecto de Doxorubicina en el procesamiento de caspasa 3 en cardiomiocitos de rata.	57
Figura 20. Efecto en los niveles proteicos de LC3-II inducidos por Doxorubicina en los cardiomiocitos en cultivo.....	59
Figura 21. Efecto de Doxorubicina en los niveles totales de LC3 en los cardiomiocitos en cultivo.	60

Figura 22. Disminución de los niveles de p62 inducido por Doxorrubicina en cardiomiocitos en cultivo.	61
Figura 23. Esquema representativo de los niveles de LC3 I y II.	62
Figura 24. Esquema representativo de los niveles de LC3 I y II en condiciones de flujo autofágico.	63
Figura 25. Esquema representativo de los niveles de LC3 I y II en condición de flujo autofágico para interpretar si hay activación o inhibición del proceso de autofagia... ..	63
Figura 26. Efecto de Doxorrubicina en el procesamiento de LC3 en condición de flujo autofágico.	64
Figura 27. Determinación del efecto de Doxorrubicina sobre los niveles totales de LC3 en condición de flujo autofágico en los cardiomiocitos en cultivo.	65
Figura 28. Efecto de Doxorrubicina sobre la acumulación de p62 en condiciones de flujo autofágico.	66
Figura 29. La inhibición de la autofagia por 3-metiladenina aumenta la citotoxicidad inducida por Doxorrubicina en el cardiomiocito.	68
Figura 30. La inhibición de la autofagia por Bafilomicina A aumenta la toxicidad de Doxorrubicina en cardiomiocitos.	69
Figura 31. Disminución de los niveles de Beclin 1 con un siRNA específico.	70
Figura 32. La inhibición de la autofagia por siBeclin aumenta la toxicidad de Doxorrubicina en los cardiomiocitos.	71
Figura 33. La activación de la autofagia por Rapamicina disminuye la toxicidad de Doxorrubicina en cardiomiocitos.	72
Figura 34. Disminución de los niveles de beclin1 inducido por el tratamiento con Doxorrubicina en cardiomiocitos.	74
Figura 35. Efecto del tratamiento con Doxorrubicina sobre los niveles de AKT en cardiomiocitos.	75
Figura 36. Efecto de Doxorrubicina sobre la actividad de mTOR en los cardiomiocitos. ...	76

ABREVIATURAS

°C	Grado Celsius
3-MA	3-Metiladenina
4E-BP1	Proteína que une el factor iniciador de la traducción 4E
AIF	Factor inductor de la apoptosis
A	Absorbancia
AKT	Proteína serina treonina quinasa 8 o PKB
AMC	Autofagia mediada por chaperonas
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
AMP	Adenosina monofosfato
ANOVA	Análisis de varianza
ANP	Péptido natriurético auricular
Apaf-1	Factor activador de la apoptosis 1
Atg	Proteínas relacionadas a la autofagia
ATP	Adenosina trifosfato
BafA	Bafilomocina A
Bcl-2	Proteína asociada al linfoma de células-B del tipo 2
Bcl-XL	Proteína asociada al linfoma de células-B del tipo XL
BrdU	Bromodeoxiuridina
BSA	Albúmina sérica de bovino
β-MHC	Cadena pesada de la miosina tipo β
CaCl ₂	Cloruro de calcio
Cit-c	Citocromo C
Ca ²⁺	Ion calcio
CO ₂	Dióxido de carbono
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Acido desoxirribonucleico
DNAm	Acido desoxirribonucleico mitocondrial
DNA-PK	Proteína quinasa activada por DNA
DISC	Complejo de señalización inductor de muerte
Dom PH	Dominio PH
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido etilenglicol-bis-(aminoetiléter)-N,N,N',N'-2 etanosulfónico
EZ-ECL	Sustrato quimioluminiscente
FBS	Suero fetal de bovino
FCS	Suero fetal de ternera
FIP200	Proteína que interactúa con la familia FAK de 200 Da
FITC	Isocianato de fluoresceína
FS	Fosfatidilserina
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GATA4	Factor de transcripción GATA4
GSH	Glutatión

h	Hora
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HEPES	Acido N-2-hidroxiethylpiperazina N-2-etanosulfónico
IV	Intravenoso
IgG	Inmunoglobulina G
JNK1	Proteína quinasa del N-terminal de c-Jun
KCl	Cloruro de potasio
Kg	Kilogramo
LAMP-2A	Proteína de membrana del lisosoma
LC3	Proteína de cadena liviana-3 asociada a microtúbulos
LDH	Lactato deshidrogenasa
LIR	Dominio LIR de unión para LC3
mA	mili Ampere
MAPK	Familia de proteínas quinasas activadas por mitógenos
MEF	Fibroblastos embrionarios de ratón
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
mm	Milímetro
min	Minuto
mLTS8	Subunidad LTS8 del complejo blanco de Rapamicina de mamífero
MPTP	Poros de transición de permeabilidad mitocondrial
mTOR	Proteína quinasa blanco de rapamicina
myrAKT	AKT miristolada (constitutivamente activa)
ml	Mililitro
NaCl	Cloruro de sodio
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido fosfato
NaOH	Hidróxido de sodio
nm	Nanómetro
nM	Nano molar
p/v	Porcentaje peso/volumen
P62/SQSTM1	Proteína de 62 KDa o secuestrosoma 1
p70S6K	Proteína quinasa de 70 kDa de la proteína del ribosoma S6K
PARP-1	Poli ADP ribosa polimerasa 1
PB1	Dominio PB1 de polimerización
PBS	Tampón fosfato salino
PDK1	Proteína quinasa 1 dependiente de fosfoinositidos
PE	Fosfatidiletanolamina
PI	Yoduro de propidio
PIKK	Proteína quinasa relacionada con la quinasa fosfatidilinositol
PI3K	Proteína fosfatidilinositol - 3 quinasa
pAKT	Proteína AKT fosforilada
PIP3	Fosfatidilinositol 3 fosfato
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PRAS40	Proteína sustrato de AKT1 rica en prolina

Rap	Rapamicina
RNAM	Ácido ribonucleico mensajero
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SDS	Dodecilsulfato de sodio
seg	Segundo
SEM	Error estándar de la media
siRNA	RNA interferente pequeño
TBS	Tampón tris salino
TCA	Ácido tricloroacético
TNFR1	Receptor 1 del factor de necrosis tumoral
TNF α	Factor de necrosis tumoral tipo α
TORC1/2	Complejo blanco de Rapamicina 1-2
TRAF	Factor asociado al receptor de TNF α
UBA	Dominio de unión de proteínas ubiquitinadas
μ g	Microgramo
ULK	Proteína quinasa tipo UNC-51
μ l	Microlitro
μ m	Micrometro
μ M	Micromolar
V	Volt
VPS 34	Proteína vacuolar 34 (PI3K)
ZZ	Zinc finger, dedos de zinc

RESUMEN

Doxorrubicina es un efectivo agente quimioterápico ampliamente utilizado en el tratamiento de diversos tipos de cáncer. Sin embargo, su cardiotoxicidad es el principal factor limitante y puede presentarse como una cardiomiopatía aguda o crónica. En este último caso, el paciente puede desarrollar cardiomiopatía dilatada e incluso insuficiencia cardíaca.

Múltiples mecanismos participan en la cardiotoxicidad inducida por doxorrubicina, entre los que se incluyen formación de especies reactivas del oxígeno (ROS), alteraciones en la estructura sarcomérica, disfunción mitocondrial, sobrecarga de calcio y un conjunto de alteraciones en diferentes procesos intracelulares que conducen a la muerte de cardiomiocitos por apoptosis y/o necrosis.

Actualmente se ha propuesto a la autofagia como una forma alternativa de muerte celular. Sin embargo, para considerarla como tal, es necesario analizarla en el contexto en el cual se desarrolla y la magnitud y/o duración del estímulo que la provoca.

La autofagia es un proceso fundamental para la célula. La autofagia basal degrada proteínas de vida media larga, organelos envejecidos y material intracelular, permitiendo la reutilización del material citoplasmático. Sin embargo, en condiciones desfavorables, como la privación de nutrientes o carencia de factores de crecimiento, este proceso se activa para proporcionar sustratos para la síntesis de proteínas y ATP para restablecer la homeostasis celular. La autofagia es un proceso dinámico que procede con el secuestro de material citoplasmático dentro de vacuolas de doble membrana llamadas autofagosomas, que al fusionarse con los lisosomas, degradan el material incorporado. Diferentes vías de señalización regulan la autofagia, siendo la vía de la PI3K/AKT/mTOR una de las más importantes para inhibir este proceso.

En la literatura no está claro el efecto de la doxorrubicina sobre la autofagia debido principalmente a las diferencias en los modelos de estudio. Dado el papel fundamental de la autofagia basal en la homeostasis celular, es relevante investigar cómo la doxorrubicina altera este proceso y su relación con la muerte del cardiomiocito.

Para realizar esta investigación, en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata neonata se expusieron a doxorubicina 1 μM por 24 h o curso temporal, para caracterizar el tipo de muerte celular gatillada por doxorubicina y posteriormente determinar el efecto sobre la autofagia.

Los resultados mostraron que el tratamiento con doxorubicina 1 μM por 24 horas produjo un aumento de la muerte de los cardiomiocitos por necrosis, lo que se evidenció por incrementos en la liberación de LDH, disminución del contenido de ATP y por un aumento en la marca anexina V-FITC al compararlos con la condición control. Además se observó muerte por apoptosis, con un aumento máximo en los niveles de la proteína caspasa 3 fragmentada a las 6 horas, respecto de su condición control.

Para investigar el efecto de doxorubicina sobre la autofagia se evaluaron los niveles de las proteínas LC3 y p62 por Western blot. Los resultados mostraron menores niveles de ambas proteínas a las 24 horas de exposición con respecto de la situación control. Estos resultados no son concluyentes para establecer que la autofagia está inhibida. Por lo tanto, para aclarar este punto se determinaron los niveles de LC3 y p62 en condición de flujo autofágico, es decir utilizando el inhibidor de la fusión autofagosoma-lisosoma, bafilomicina A durante el mismo período de tiempo de exposición a doxorubicina. Los resultados mostraron que en la condición doxorubicina más bafilomicina A, los niveles de las proteínas LC3 y p62 fueron menores que en la situación control más bafilomicina A. De acuerdo a las condiciones en que se mantuvieron los cardiomiocitos, los resultados indican que doxorubicina inhibió la autofagia basal.

Para relacionar el efecto inhibitorio de doxorubicina sobre la autofagia con la muerte celular, se determinó el porcentaje de muerte por liberación de LDH, inhibiendo la autofagia con bafilomicina A, 3-metiladenina y con un siRNA para beclin 1. Los resultados mostraron que al inhibir la autofagia en presencia de Doxorubicina aumentó aún más el porcentaje de muerte de los cardiomiocitos. Por el contrario, la utilización del inductor de la autofagia rapamicina disminuyó el porcentaje de muerte. Estos resultados indican que la autofagia es importante para la sobrevivencia del cardiomiocito y que su inhibición con doxorubicina favorece la muerte celular.

Por último, doxorubicina aumentó los niveles de la forma fosforilada de AKT y p70S6K y disminuyó los niveles de Beclin, sugiriendo que la doxorubicina además activa la vía transduccional que regula negativamente a la autofagia.

En conclusión, los resultados indican que la doxorubicina inhibe la autofagia basal y contribuye a la muerte del cardiomiocito. Estos resultados se podrían postular como un nuevo mecanismo que permitiría explicar la cardiotoxicidad de este antineoplásico.

SUMMARY

Doxorubicin is an effective chemotherapeutic drug widely used in the treatment of several types of cancer. However, its cardiotoxicity represents the mayor limiting factor. Cardiotoxicity may develop as either acute or chronic cardiomyopathy. In the last case, the patient developes dilated cardiomyopathy and eventually heart failure.

Multiple mechanisms have been proposed in doxorubicin-induced cardiotoxicity, including reactive oxygen species (ROS) generation, sarcomere structure alterations, mitochondrial dysfunction, calcium overload and a set of other alterations in key intracellular processes. All of them lead to the loss of cardiomyocytes by apoptosis and/or necrosis.

Autophagy has been proposed as alternative form of cell death. However, it is important to bear in mind the context in which it takes place and the magnitude and/or exposure time of the stimulus. Autophagy is an essential cell process. Basal autophagy degrades long half-life proteins, aged and dysfunctional organelles and intracellular materials allowing their reutilization. However, under unfavorable conditions such as starvation or lack of growth factors, this process increases its activity by providing substrates for the synthesis of novel proteins and ATP to restore cell homeostasis. Autophagy is a dynamic process involving the engulfment of cytoplasmic materials within double membrane vacuoles called autophagosomes. Then, they fused with lysosomes to degrade the sequestered material. Different signaling pathways regulate autophagy, being the PI3K/AKT/mTOR pathway one of the most important to inhibit this process.

In the literature, it remains unclear the effect of doxorubicin on cardiomyocyte basal autophagy due to the different experimental models and conditions used in those works. Given the key role of basal autophagy on cell homeostasis, it is important to investigate if doxorubicin can alter this process and its relationship with cardiomyocyte death.

To this end, cultured rat neonatal cardiomyocytes were exposed to doxorubicin 1 μ M per 24 hours to investigate the type of cell death triggered by doxorubicin and subsequently to determine the effect on basal autophagy. The results showed that

doxorubicin treatment for 24 h stimulated cardiomyocyte death by necrosis, as evidenced by increased LDH release, a drop in ATP content and by increased annexin V-FITC staining relative to control. Cardiomyocyte apoptosis was also observed, reaching a peak in the levels of cleaved caspase 3 after 6 h treatment with doxorubicin.

To study the effect of doxorubicin on autophagy, LC3 and p62 protein levels by assessed by Western blot. The results showed that doxorubicin reduced the levels of both proteins after 24 hours of exposure respect to controls. However, we cannot conclude that autophagy is inhibited. To clarify this point we determined LC3 and p62 protein levels under conditions of autophagy flux, using bafilomycin A. The results showed autophagy flux was also inhibits by doxorubicin. These results suggest that doxorubicin inhibits cardiomyocyte basal autophagy.

To investigate the relationship between the inhibitory effect of doxorubicin on autophagy and cardiomyocyte death, the percentage released LDH was evaluated using bafilomycin A, 3-methyladenine or a siRNA for Beclin1. The results showed that the inhibition of autophagy with bafilomycin A, 3-methyladenine or siRNA for beclin 1 in the presence of doxorubicin increased even more the percentage of dead cardiomyocytes. On the other hand, the use of the inductor of autophagy rapamicyn decreased cardiomyocyte death triggered by doxorubicin. These data suggest that basal autophagy is important for cardiomyocyte survival and its inhibition promotes cell death.

Finally, we found that doxorubicin stimulated AKT and p70S6K phosphorylation and decreased beclin 1 protein levels, suggesting that doxorubicin also activates this signaling pathway to negatively regulate cardiomyocyte autophagy.

In summary, the results showed that doxorubicin inhibits basal autophagy and contributes to cardiomyocyte death and represent a new mechanism to explain doxorubicin cardiotoxicity.

1. INTRODUCCION

El **cáncer** es una enfermedad altamente prevalente y una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial, 7,6 millones de defunciones ocurrieron en el año 2008, equivalente al 13 % del total. Se estima que las muertes por cáncer seguirán aumentando y pasarán los 11 millones en el año 2030. En Chile, este aumento también se ha observado, llegando a un 24,8 % de defunciones en el año 2005 **(1)**.

Esta enfermedad se caracteriza por la existencia de células que han experimentado una alteración severa en los mecanismos que regulan su capacidad de diferenciación y proliferación celular. La proliferación excesiva ocasiona la migración de estas células hacia otros territorios, donde mantienen su capacidad de crecer y proliferar.

El objetivo de la **terapia antineoplásica** es la eliminación de estas células anormales. Para ello la farmacoterapia antineoplásica constituye una herramienta que se utiliza para mejorar el pronóstico de la enfermedad, ya sea en forma aislada o combinada con cirugía y/o radioterapia.

La acción de los fármacos antineoplásicos se dirige por lo general a frenar la proliferación y/o crecimiento celular y para ello actúan principalmente sobre el DNA, el mRNA o la síntesis de proteínas. Sin embargo este mecanismo poco específico afecta del mismo modo a órganos y tejidos sanos, dando origen a **toxicidad** o efectos colaterales, los que con frecuencia limitan las posibilidades de administrar la dosis total de medicamento que teóricamente sería conveniente.

Los fármacos antineoplásicos se clasifican de acuerdo a su mecanismo de acción. Dentro de los que actúan sobre el DNA se encuentran los derivados antraciclínicos, una familia de antibióticos muy utilizados como primera línea de tratamiento en leucemias, linfomas y una gran variedad de tumores sólidos, entre los que destaca el cáncer de mama. Su principal exponente de uso actual es la **doxorrubicina**.

1.1. Generalidades de la doxorrubicina

La doxorrubicina (Figura 1) es uno de los compuestos antraciclínicos originales que se aisló de la bacteria *Streptomyces peucetius* en 1960. Hasta la fecha se considera uno de los fármacos antineoplásicos más eficaces para el tratamiento de la leucemia,

linfoma de tipo Hodgkin's y no Hodgkin's, el cáncer de mama **(2)**, sarcoma de Kaposi, cáncer de estómago, ginecológicos y urogenital **(3,4)**. Los mecanismos de toxicidad de Doxorubicina sobre las células neoplásicas incluyen: (a) intercalación entre las pares de bases del DNA, (b) inhibición de los procesos de replicación y transcripción, (c) alquilación del DNA, (d) inhibición de la topoisomerasa II, (e) generación de radicales libres produciendo daño en el DNA (f) lipoperoxidación de membranas, (g) interferir con la apertura de las hebras de DNA e inhibición de la helicasa **(5)**.

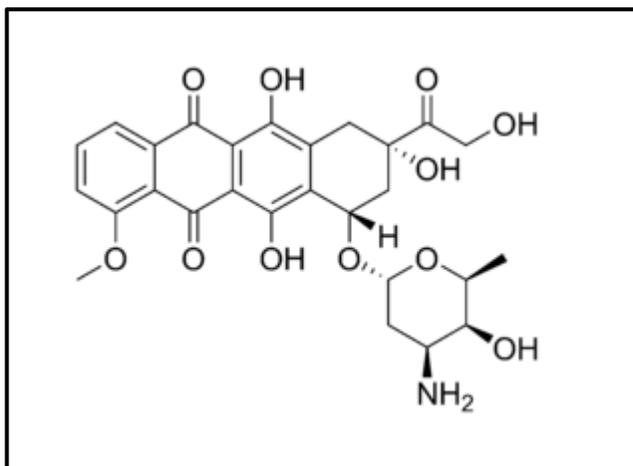


Figura 1. Estructura química de la doxorubicina

1.2. Doxorubicina y cardiotoxicidad

Durante las pruebas preliminares de toxicidad en pacientes se detectaron varios efectos adversos, los cuales incluían: náuseas, vómitos y fiebre, comunes a todos los antineoplásicos **(6)**. Actualmente, se han descrito muchos más, sin embargo, la toxicidad sobre el corazón es el de mayor complejidad.

Los efectos sobre el corazón fluctúan en severidad y se clasifican de acuerdo a la temporalidad en que se presentan. En relación al tiempo de aparición, la cardiotoxicidad por doxorubicina se clasifica en: *aguda*, la cual ocurre inmediatamente después de administrado el medicamento por infusión IV. *Temprana*, cuando se presenta dentro del año de exposición y *crónica*, 1 a 20 años después de terminado el tratamiento **(7)**. La cardiotoxicidad aguda es un proceso reversible y se manifiesta con perturbaciones en la

conducción eléctrica y arritmias. En cambio, la aparición de ambas toxicidades, temprana y crónica, están en función de la dosis total administrada del fármaco y se manifiesta con una disminución en la función ventricular izquierda, lo que se traduce en un deterioro en la capacidad de realizar ejercicio y un progresivo aumento en los síntomas de insuficiencia cardíaca **(8)**.

1.3. Mecanismo de cardiotoxicidad

El mecanismo por el cual los antraciclínicos producen cardiotoxicidad todavía es controversial. Sin embargo, los antecedentes actuales sugieren que este efecto ocurre por mecanismos distintos de los que median su acción antitumoral **(9)**.

Los principales mecanismos propuestos son:

Estrés oxidativo celular

Debido a un aumento en la concentración de especies reactivas del oxígeno (ROS) **(10)**. La formación de ROS se produce por dos vías: una enzimática, en la cual doxorubicina es reducida por la NADPH citocromo P450 reductasa, generando un radical semiquinona que interactúa con el oxígeno generando el radical superóxido. La segunda vía involucra reacciones en las cuales participa el ion hierro en la generación del radical superóxido. Este radical al reaccionar con el H_2O_2 forma el radical hidroxilo, una de las ROS más agresivas **(11, 12)** (Figura 2). La vulnerabilidad del tejido cardíaco al daño por ROS, se debe entre muchos factores a su elevado metabolismo oxidativo y su escasa defensa antioxidante, comparada con la de otros órganos como el hígado y riñones. De hecho las actividades de las enzimas catalasa y superóxido dismutasa son más bajas **(14)**, concomitantemente con una disminución en los niveles de antioxidantes endógenos como GSH **(10)**.

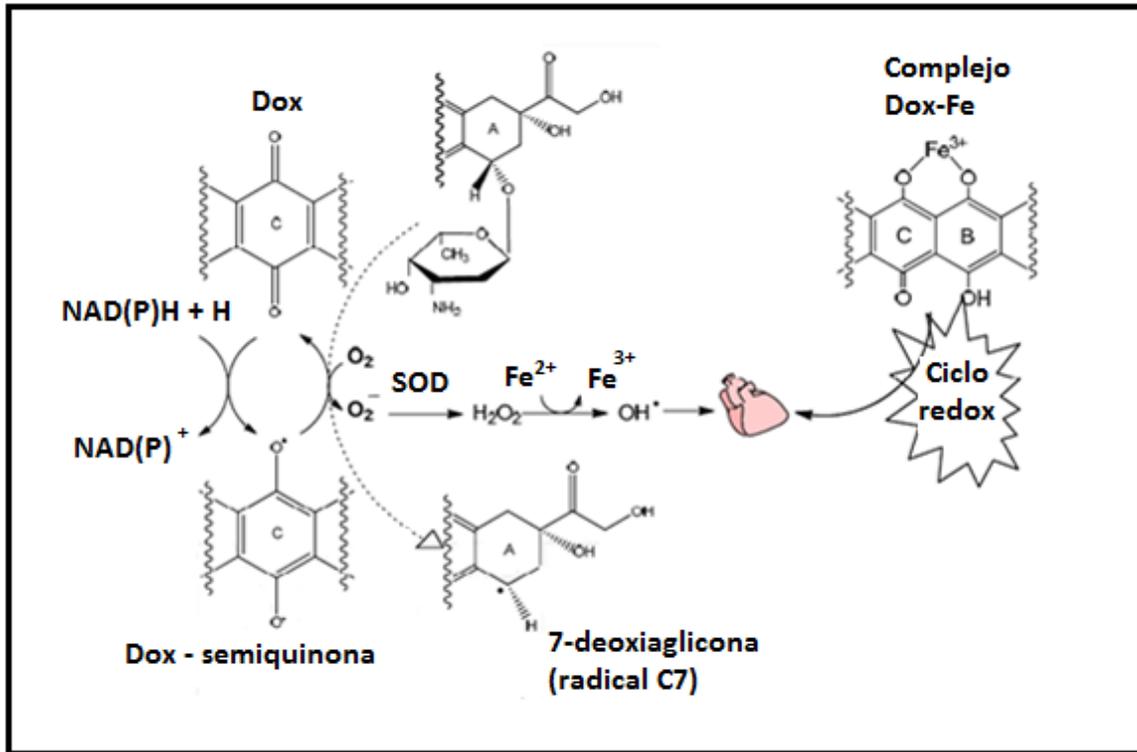


Figura 2. Formación de ROS por doxorubicina. La doxorubicina forma especies reactivas del oxígeno debido a su estructura química. La capacidad de generar un ciclo redox al transitar de quinona a semiquinona utilizando al oxígeno como intermediario y con la participación de la enzima NADPH citocromo P450 reductasa, o bien formando complejos con el ion hierro, son los dos mecanismos propuestos que participarían en la generación de la cardiotoxicidad. Adaptado de Milik y *col* 2012 (13).

Inhibición de la expresión del factor de transcripción GATA4

GATA4 es un factor de transcripción que se expresa en el corazón y regula la síntesis de proteínas del sarcómero, supervivencia celular y controla la expresión de varios genes cardio-específicos (15,16), incluyendo al péptido natriurético auricular (ANP) (17) y la cadena pesada de la α -miosina (18), al igual que genes anti-apoptóticos (19).

Desorganización de la estructura sarcomérica

En pacientes tratados con doxorubicina se han observado cambios en la estructura del sarcómero como desorganización y pérdida de miofibrillas (20, 21). Este cambio en la estructura se produce por la degradación temprana de la proteína Titina frente a la exposición a doxorubicina. Esta proteína sirve como sustento para el anclaje de los miofilamentos al sarcómero (22). La integridad de esta proteína es fundamental para regular la función contráctil (23), este evento también se ha observado en corazones isquémicos e insuficientes, lo que implica que la degradación de esta proteína lleva progresivamente hacia ese tipo de patologías.

Daño mitocondrial y reducción de los niveles de ATP

Una de las características más sorprendentes del corazón es que para realizar la función contráctil requiere de un gran suministro de ATP. Un corazón normal sintetiza diariamente cerca de 6 Kg de ATP (24). Sin embargo, su tasa de hidrólisis es muy elevada por lo que los niveles de ATP se renuevan completamente cada 10 segundos (25). El 95% del ATP generado proviene de la mitocondria a través de la fosforilación oxidativa. Por lo tanto, cualquier alteración que altere el funcionamiento de este organelo impacta en los niveles requeridos de esta molécula y promueve el desarrollo y/o progresión de diversas patologías cardíacas. En corazones de pacientes tratados con antraciclínicos, se observó que presentaban disfunción mitocondrial (26). La evidencia indica que doxorubicina ingresa rápidamente a la mitocondria y produce una serie de alteraciones en el sistema de fosforilación oxidativa, en el DNAm y en el poro de transición de permeabilidad mitocondrial (MPTP) (27). Por lo tanto, el daño que produce doxorubicina en la mitocondria genera alteraciones relacionadas con el metabolismo celular y desencadena procesos relacionados con muerte celular.

1.4. Muerte celular

Históricamente, la apoptosis y la necrosis han sido consideradas como las dos formas fundamentales de muerte celular. Hasta ahora la necrosis se considera un proceso de muerte no controlado, caracterizado por una serie de cambios que culmina con la ruptura de la célula, liberando su contenido al medio provocando una respuesta inflamatoria (28). A diferencia de la necrosis, la muerte por apoptosis es un proceso

secuencial, ordenado y finamente regulado, en el cual no hay ruptura de membrana ni liberación de contenido ni respuesta inflamatoria (29).

1.4.1. Apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada tipo I es un proceso dependiente de energía. Este tipo de muerte se caracteriza morfológicamente por compactación de la cromatina, condensación del citoplasma y disminución del volumen celular, seguido de una fragmentación del núcleo y la célula formando estructuras denominadas cuerpos apoptóticos (Figura 3). Posteriormente estas estructuras son rápidamente fagocitadas por células del sistema inmune (29). Los estímulos inductores de apoptosis en el cardiomiocito son diversos e incluye la exposición a medicamentos antineoplásicos (30).

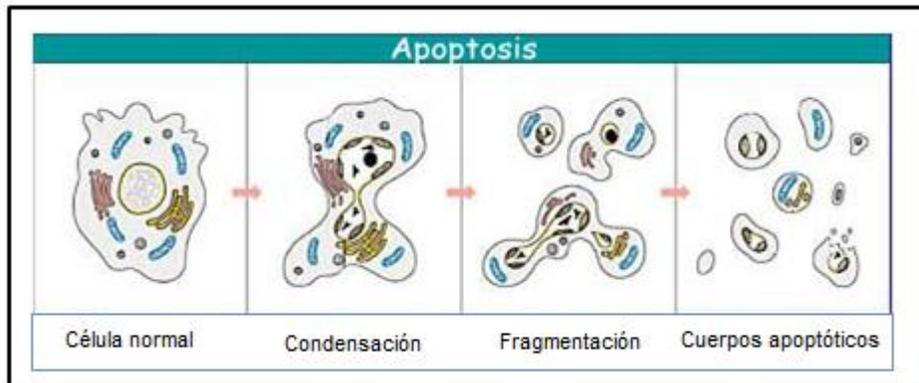


Figura 3. Esquema morfológico de la muerte celular por apoptosis. Cambios morfológicos característicos de la muerte por apoptosis como la compactación de la cromatina, condensación del citoplasma y la formación de los cuerpos apoptóticos.

La activación de la apoptosis ocurre principalmente por dos vías transduccionales independientes. Estas son conocidas como la vía extrínseca y la vía intrínseca de la apoptosis (31-34) (Figura 4).

Vía extrínseca

Esta vía se activa por ligandos externos que se unen a receptores de muerte: Fas y TNFR1, localizados en la superficie celular. Estos receptores, una vez que han sido

activados, a través de los dominios de muerte, forman un complejo denominado DISC, a través del cual se reclutan y activan proteasas intracelulares específicas conocidas como caspasas iniciadoras (31-34). La unión de Fas ligando a su receptor (Fas) y de TNF α a su receptor (TNFR1) conduce a la activación de caspasa-8. La activación de esta caspasa da comienzo a una serie de reacciones proteolíticas que lleva a la activación caspasa 3 y a la ejecución de los procesos característicos de la apoptosis (31-34).

Vía intrínseca

La vía intrínseca o mitocondrial se caracteriza por una alteración de las membranas mitocondriales externa e interna debido a la apertura del MPTP, lo cual produce la liberación de: citocromo c, el factor inductor de apoptosis (AIF), endonucleasa G y las proteínas Smac/Diablo (**32- 34**). El Cit c junto con la procaspasa 9 y la proteína Apaf-1 forman el apoptosoma. En presencia de ATP, se activan secuencialmente el apoptosoma, caspasa-9 y caspasa-3 (**31, 32, 34**).

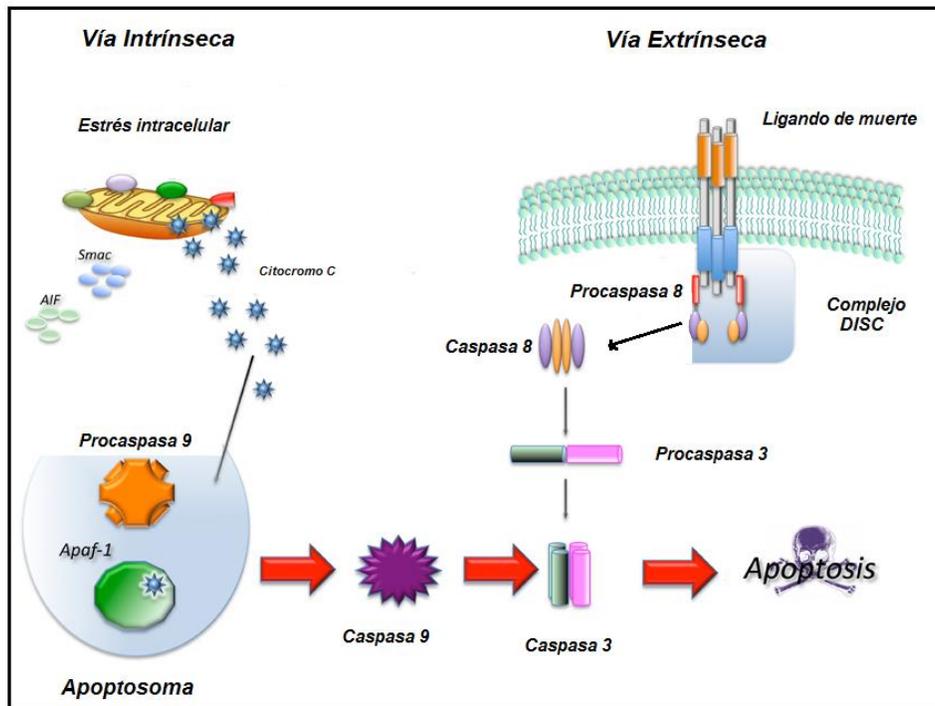


Figura 4. Representación esquemática de las vías de activación de la apoptosis.

La activación del programa de muerte celular, apoptosis, se produce a través de dos vías: la vía extrínseca, mediada por ligandos y receptores de muerte y la vía intrínseca o mitocondrial. Ambas vías convergen en un punto en común, la activación de la caspasa 3. Figura adaptada de Favaloro y col. 2012 (35).

1.4.2. Necrosis

La muerte de una célula puede ser definida como una pérdida irreversible de la integridad de la membrana celular (36) (Figura 5). Históricamente la necrosis se ha definido de acuerdo a las características morfológicas que presenta: temprana ruptura de la membrana plasmática, hinchamiento de algunos organelos como la mitocondria (37, 38), liberación del contenido intracelular al medio lo que alerta al sistema inmune, provocando una respuesta inflamatoria local (38, 39). A pesar de que no hay descrito un mecanismo para este tipo de muerte, se puede delinear una secuencia de eventos específica para la necrosis. Tal secuencia incluye señales tempranas de disfunción mitocondrial, producción de ROS por la mitocondria e hinchamiento de este organelo, reducción drástica de ATP, alteración en la homeostasis del calcio, agrupamiento de

organelos en la zona perinuclear, activación de algunas proteasas: calpaínas y catepsinas, ruptura lisosomal y finalmente ruptura de la membrana plasmática (36).

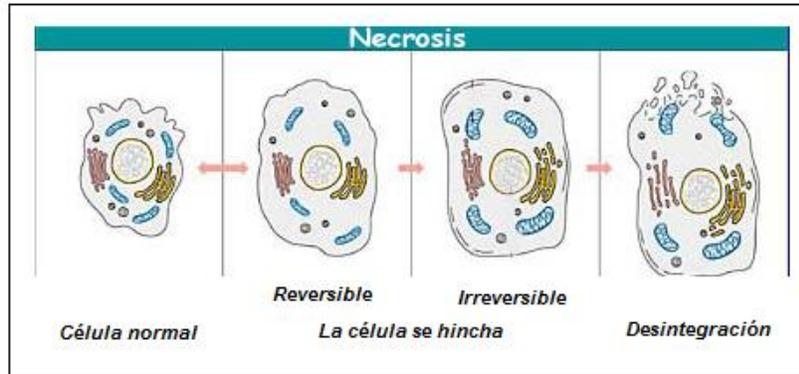


Figura 5. Esquema morfológico de la muerte celular por necrosis. Esquema representativo de los cambios morfológicos presentes en el proceso de muerte celular por necrosis en el cual, la incorporación de líquido llega a un punto irreversible y se produce la ruptura de la membrana plasmática liberando el contenido intracelular.

1.4.3. Autofagia

La autofagia, en términos generales, es la degradación de componentes citoplasmáticos dentro del lisosoma (40). De acuerdo al mecanismo por el cual el lisosoma degrada el material intracelular, la autofagia se clasifica en microautofagia, autofagia mediada por chaperonas (AMC) y macroautofagia (41, 42). Este proceso es esencial para mantener la homeostasis celular y por lo tanto la vida de las células.

Tipos de autofagia

La **microautofagia** es un proceso más simple e involucra la degradación de material celular por medio del secuestro en una vesícula que se forma por la invaginación de la membrana lisosomal (43). La AMC permite la degradación lisosomal de proteínas específicas que poseen la secuencia relacionada al pentapéptido KFERQ, el cual es reconocido por un complejo de proteínas chaperonas, las que regulan la degradación del material a través de la interacción con la proteína LAMP-2A en la membrana lisosomal (43, 44). La macroautofagia (desde aquí referida como autofagia) es una vía para la degradación de proteínas de vida media larga y organelos envejecidos. La ejecución de este proceso involucra el secuestro del material citoplasmático, dentro de una estructura

especial denominada autofagosoma, ya que es una vesícula delimitada por una doble membrana. Los autofagosomas al fusionarse con los lisosomas forman el autolisosoma, en donde el contenido vacuolar es degradado, transportado al citoplasma y reciclado para proveer a la célula de aminoácidos y sustratos para la síntesis de ATP **(45, 46)** (Figura 6).

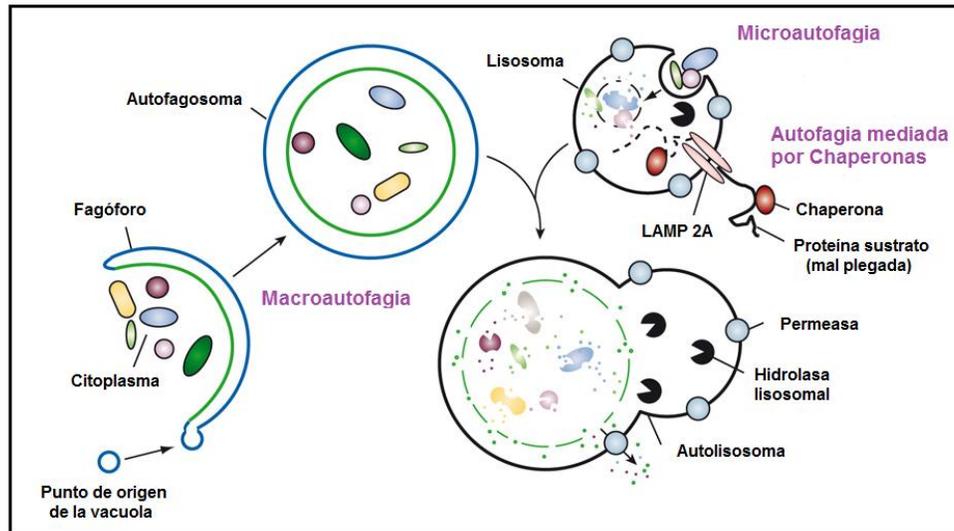


Figura 6. Diagrama esquemático de los tipos de autofagia. La figura muestra un resumen de los tipos de autofagia presentes en la célula. Adaptado de Mizushima y col. (41)

La autofagia consiste en dos etapas consecutivas: una etapa temprana caracterizada por la formación del autofagosoma y una etapa tardía o de maduración, en la cual se produce la fusión del autofagosoma con el lisosoma y ocurre la degradación del material secuestrado por las hidrolasas del lisosoma **(47)**.

El entendimiento de la maquinaria molecular involucrada en la formación del autofagosoma proviene de los estudios genéticos realizados en levaduras. De ellos, se pudieron identificar 35 genes *ATG* (genes relacionados a autofagia). Dentro de ellos, los genes *ATG* 1-10, 12-14, 16-18 que codifican para las proteínas de la misma denominación son esenciales para la formación canónica de los autofagosomas (Tabla 1 y Figura 7) **(58)**.

Tabla 1. Nomenclatura y función de las proteínas ATG en autofagia.

Proteínas Atg

Levaduras	Mamíferos	Funciones
Atg 1	ULK1, ULK2	Proteína quinasa del Complejo ULK
Atg 2	Atg 2	Forma parte del Complejo Atg9/Atg2-Atg18
Atg 3	Atg 3	Enzima tipo E2 para la lipidación de Atg 8
Atg 4	Atg 4	Cisteín proteasa: activación de Atg 8 y su delipidación.
Atg 5	Atg 5	Se conjuga con Atg 12 (Atg5-Atg12). El Complejo tiene actividad tipo E3 para la lipidación de Atg 8
Atg 6	Beclin-1	Subunidad del Complejo Vps34 PI3K.
Atg 7	Atg 7	Enzima tipo E1 para Atg 12 en la conjugación de LC3
Atg 8	LC3	Proteína conjugada con PE para localizarse en el autofagosoma
Atg9	Atg 9	Interactúa con el Complejo Atg2-Atg18 unido a la membrana
Atg 10	Atg 10	Enzima tipo E2 para la conjugación de Atg 12
Atg 12	Atg 12	Se conjuga con Atg 5 (Atg5-Atg12)
Atg 13	Atg 13	Parte del Complejo Atg1-Atg13-Atg17-Atg29
Atg 14	Atg 14	Subunidad del Complejo Vps34 PI3K.
Atg 16	Atg 16	Forma un Complejo con Atg5-Atg12
Atg 17	FIP200	Forma parte del Complejo Atg1-Atg13-Atg29
Atg18	WIPI	Forma parte del Complejo Atg9/Atg2-Atg18

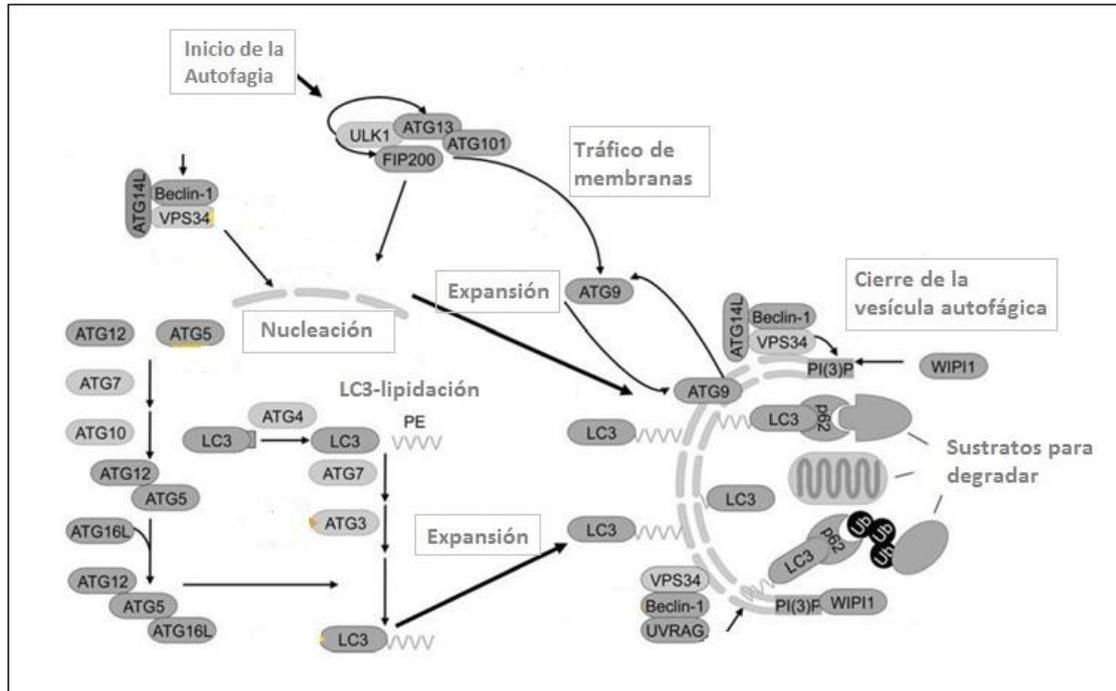


Figura 7. Principales proteínas ATG en las diferentes etapas de la formación del autofagosoma. Participación de las proteínas ATG en la etapa de inicio de la autofagia como parte de los complejos ULK y PI3K-III y en la formación del autofagosoma como un sistema tipo ubiquitinación hasta el completo cierre de la vesícula autofágica.

Formación del autofagosoma

La formación del autofagosoma comprende tres etapas: inicio, nucleación y expansión. En la etapa de **inicio**, las señales de inducción de la autofagia son transmitidas hacia la fuente que proporciona las membranas, en donde se produce el aislamiento de un núcleo membranoso (**nucleación**), denominado fagóforo. Como resultado de este evento, se produce el reclutamiento de diferentes complejos proteicos, claves para la **expansión** de la membrana aislada, hasta la completa formación y cierre del autofagosoma (47). Estos complejos proteicos están conformados en su mayoría por las proteínas Atp.

Etapas de inicio. En esta etapa se requiere el ensamble de dos complejos: el complejo ULK y el complejo PI3K-III. En células de mamífero, el complejo ULK está compuesto por: las quinasas ULK1/2, mAtg13, FIP200 y Atg101. Cuando la autofagia se activa, aumenta la actividad quinasa de ULK1/2 y la porción carboxi-terminal de estas quinasas de une a la membrana que será el inicio de la formación del autofagosoma (48, 49). El

complejo PI3K clase III (también conocido como complejo Beclin1) está formado por PI3K clase III, p150, Beclin1 y Atg14 **(50)** y tiene la función de formar PIP3 el cual servirá como sustrato de reconocimiento y unión de otras proteínas Atg. El complejo PI3K-III y las proteínas Atg reclutan dos sistemas de conjugación tipo Ubiquitina: Atg12-Atg5-Atg16 y el Atg8-PE al fagóforo para permitir la elongación de esta estructura **(51, 52)**.

Etapa de nucleación. Una vez formado el sitio de inicio del autofagosoma, el complejo ULK por una parte fosforila y aumenta la actividad quinasa de PI3K-III **(53)**, para que ésta forme un pool de PIP3 en la membrana aislada que servirá de sitio de reconocimiento de otras proteínas Atg **(47)**.

Etapa de expansión. Luego de la nucleación, dos sistemas son reclutados: Atg12-Atg5-Atg16 y Atg8-PE. La formación de estos dos sistemas requiere de diversas proteínas Atg en un proceso semejante a la ubiquitinación **(54)**. El primero se inicia con la participación de Atg12 y Atg7, mientras que el segundo con Atg8 (LC3) y Atg4 **(55)**. Como se observa en la Figura 8, los productos formados son los complejos: Atg5-Atg12-Atg16 y Atg8-PE que actuarán en forma concertada en la elongación de vacuola autofágica hasta su completa formación **(55-57)**. El primero funciona como un sistema tipo E3-ligasa para mediar la lipidación de Atg8 (LC3) con PE, esto lo capacita para unirse a la membrana autofagosomal **(58)** y esto ocurre mientras se produce la expansión de la membrana. Finalmente, el complejo Atg5-Atg12-Atg6 se disocia de la membrana al completarse la formación del autofagosoma **(45)**. La proteína LC3 o Atg8 se sintetiza como pro-LC3 y rápidamente 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 y se denomina LC3-I, forma en la cual reside principalmente en el citoplasma. Posteriormente en este residuo de glicina se unirá una fosfatidiletanolamina, lo que le permitirá su unión a la membrana del autofagosoma **(59)**. A esta forma se le conoce como LC3-II y permanece unida hasta el completo cierre de la vesícula (Figura 9).

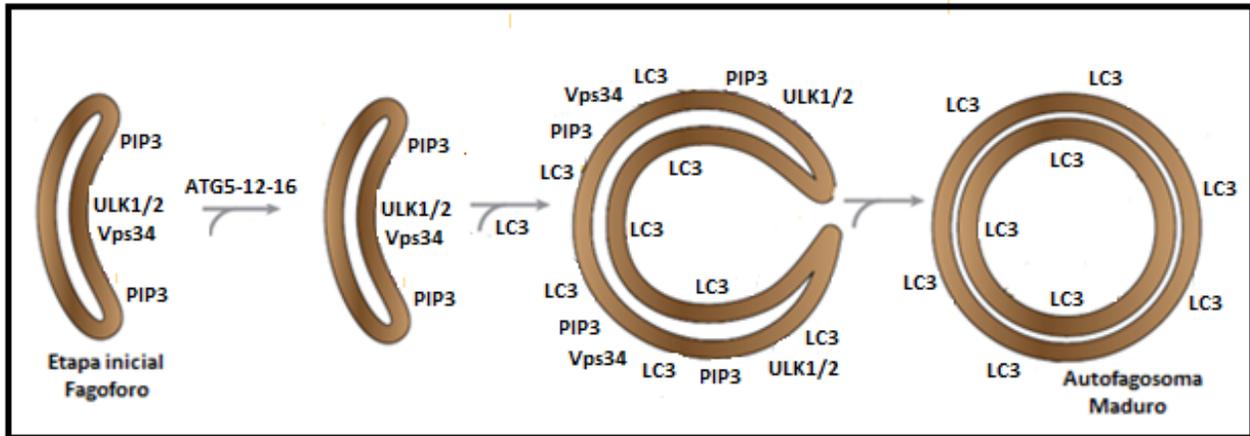


Figura 9. Cronología de eventos en la formación del autofagosoma en células de mamífero. Los complejos ULK1/2 y PI3K-III son reclutados a la membrana del fagoforo lo que lleva a la fosforilación de fosfoinosítidos formando PIP3, el cual sirve de sitio de reconocimiento y unión del sistema tipo ubiquitinación Atg5-Atg12-Atg16 para la unión de la proteína LC3-II a la membrana del autofagosoma hasta su completa formación y cierre. Adaptado de Ding y col, 2011 (60).

Degradación

Por mucho tiempo, la autofagia se consideró como un proceso de degradación no selectivo. Sin embargo, el descubrimiento de la proteína p62/SQSTM1 y su interacción con LC3-II, cambió la visión de no-selectividad de este proceso **(62)**. p62 es una proteína adaptadora multifuncional implicada en diversos procesos biológicos como: señalización celular, internalización de receptores y recambio de proteínas **(63)**. En su estructura se encuentra el dominio UBA el cual reconoce y une ubiquitina; el dominio PB1 responsable de su oligomerización y el motivo LIR con el cual se une a LC3 para ser reclutado dentro del autofagosoma **(62, 64-66)** (Figuras 10-11).

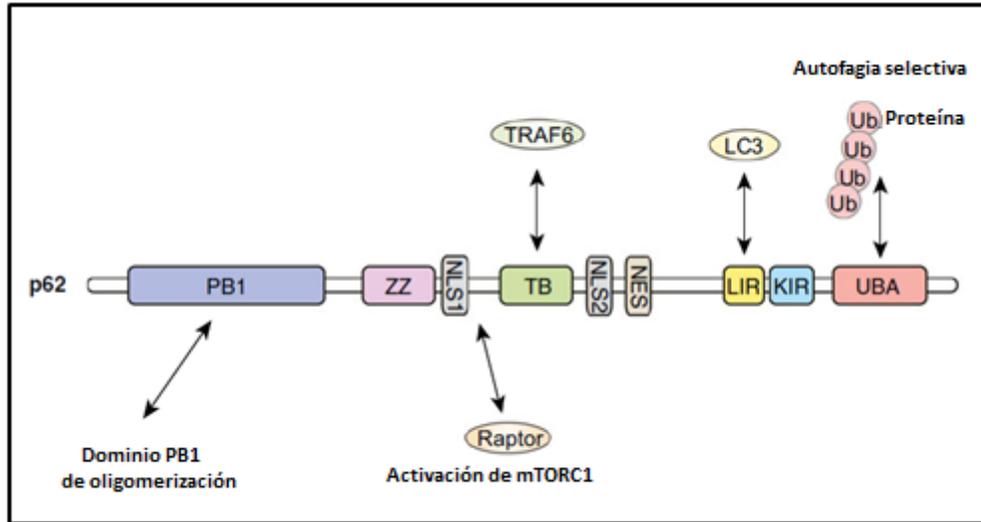


Figura 10. Estructura de p62/SQSTM1 y sus principales dominios. Secuencia aminoacídica de la proteína p62 con sus principales regiones de interacción. Dominio PB1 de oligomerización. La región ZZ (Zinc finger), TB3 es el dominio de unión del factor transcripcional TRAF6 señal de destinación nuclear. Dominio LIR, región donde se une a la proteína LC3. UBA, dominio de reconocimiento y unión de proteínas ubiquitinadas. Adaptado de Katsuragi y col. 2015 (67).

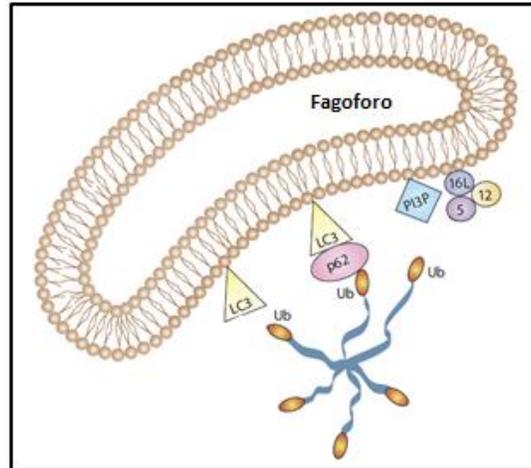


Figura 11. El reconocimiento selectivo de componentes celulares para ser degradados por autofagia, es mediado por la proteína adaptadora p62. Proteínas mal plegadas u organelos envejecidos unidos a ubiquitina son reconocidos por la proteína adaptadora p62 la cual oligomeriza para formar agregados proteicos. Estos agregados son incorporados al interior del autofagosoma a través de la interacción con la proteína LC3-II. Adaptado de Weidberg y *col*, 2011 (61).

Posterior a la formación y secuestro del material a degradar, en la etapa tardía, se produce la fusión del autofagosoma con el lisosoma (autolisosoma) y es en esta etapa en donde la membrana interna y el contenido secuestrado son degradados por las enzimas lisosomales **(40)**. Sin embargo, se ha descrito que previo a la fusión con el lisosoma, el autofagosoma se fusiona con un endosoma formando un amfisoma **(68)**, el cual contiene los elementos necesarios para que se produzca la fusión con el lisosoma **(40)**.

Las denominaciones autofagosoma, amfisoma y autolisosoma son de acuerdo a la funcionalidad y no a características morfológicas, por lo cual en forma general se les denomina vacuolas autofágicas (Figura 12).

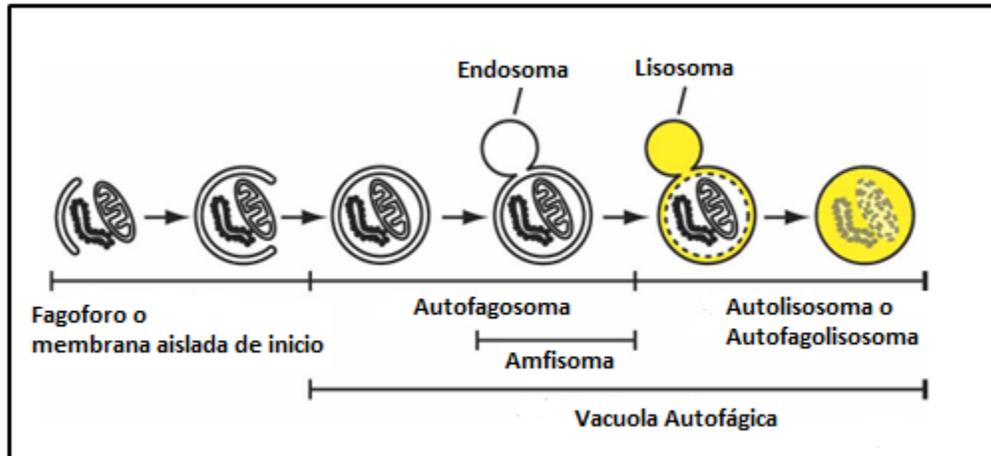


Figura 12. Esquema del proceso de autofagia. En el esquema se muestra la formación del autofagosoma y su posterior fusión con el endosoma para formar la estructura amfiosoma y luego la fusión con el lisosoma para la degradación del material contenido en la vacuola. Adaptado de Mizushima y col. 2007 (40).

Regulación de la autofagia

La autofagia cumple varias funciones dependiendo del estado en que se encuentre la célula y para su mejor entendimiento se distinguen dos tipos: la autofagia basal y la autofagia inducida (69). La **autofagia basal** es constitutiva y se encarga del recambio de componentes celulares como proteínas de vida media larga y organelos envejecidos. Mientras que la **autofagia inducida** se activa luego de una disminución en el aporte de aminoácidos o falta de factores de crecimiento sostenido en el tiempo (40). La privación de nutrientes es el inductor fisiológico más potente de autofagia (70).

mTOR

mTOR es una proteína serina/treonina quinasa que pertenece a la familia de las proteínas quinasas relacionadas con la quinasa fosfatidilinositol (PIKK) (71). Además de su participación en la traducción de proteínas y crecimiento celular (72), su función como sensor del estado energético de la célula hace que sea considerado como el regulador maestro de la autofagia (73). La actividad de mTOR es regulada por los niveles de nutrientes (aminoácidos y glucosa) en células de mamífero (74). Las vías de señalización de Insulina y de los factores de crecimientos convergen en mTOR (75). mTOR forma

parte de dos complejos proteicos, TORC1 y TORC2 (76, 77). El complejo mTORC1 está constituido por mTOR, mLST8, Raptor y PRAS40 (78). mTORC2 está formado por mTOR, mLST8, rictor y protor. Ambos difieren en composición y funciones (79, 80). mTORC1 actúa a través de sus proteínas blanco p70S6K y 4E-BP1 (74). Su actividad quinasa es sensible a la disminución de nutrientes, nitrógeno, ATP o rapamicina (81). Contrariamente al complejo mTORC1, la actividad de mTORC2 no se altera con el tratamiento con rapamicina (82, 83), pero regula la autofagia través de la proteína quinasa AKT (84). A mTORC1 se le atribuye la función de mantener la autofagia en sus niveles basales, ya que mantiene unido y fosforilado al complejo de iniciación ULK1/2-mATG13 de la autofagia y de esta forma inhibe la formación del fagóforo (85) (Figura 13).

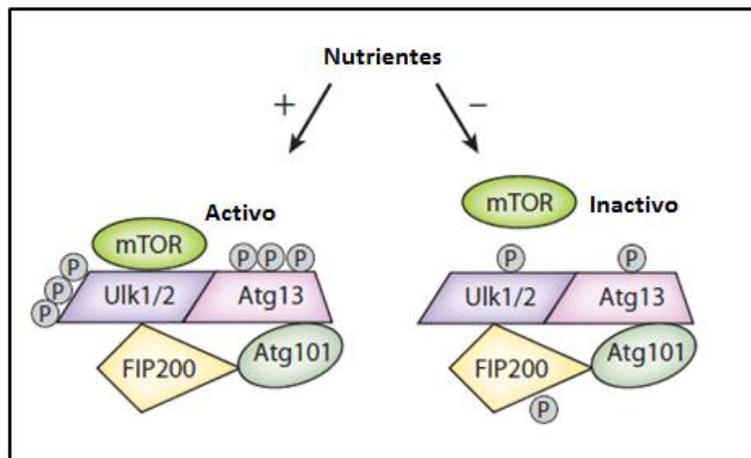


Figura 13. Interacción de mTOR con el complejo ULK en la regulación de la autofagia en células de mamífero. La presencia de nutrientes activa a mTOR incrementando el nivel de fosforilación de ULK1/2 y ATG13 inhibiendo la actividad quinasa de ULK y la inducción de la autofagia. Por el contrario, la falta de nutrientes produce la inactivación de mTOR y su disociación del complejo ULK. Esto produce una disminución en los niveles de fosforilación de ULK y ATG13 lo que lleva a un aumento en la actividad quinasa de ULK1/2 permitiendo que la autofosforilación, la fosforilación de FIP200 y la inducción de la autofagia. Adaptado de Weidberg y col. 2011 (61).

ULK-1/ Atg1

El primer efector de mTOR relacionado con autofagia es ATG1, cuyo homólogo en células de mamífero es la quinasa ULK1/2. Esta quinasa se encuentra formando un complejo con mATG13, ATG101 y FIP200 (61). Esta asociación es esencial para que ocurra la autofagia (86). En condiciones basales en las cuales hay un aporte normal de

nutrientes, mTOR se encuentra activo y unido al complejo ULK. De esta forma mTOR inhibe la actividad quinasa de ULK1/2 y la mantiene fosforilada al igual que a mATG13 (87, 88) con lo cual mantiene unido al complejo y de esta forma la autofagia inhibida. Por el contrario, la inhibición de mTOR por Rap o privación de nutrientes lleva a la separación de mTOR del complejo, con lo cual disminuye el nivel de fosforilación de ULK1/2, lo que permite que aumente su actividad quinasa, favoreciendo su autofosforilación y la fosforilación de mATG13 y FIP200 (87-89).

Familia de las PI3K

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. Basados en su estructura, función y especificidad de sustrato, las PI3K se clasifican en tres clases: la PI3K clase I se activa en respuesta a factores de crecimiento y catalizan la fosforilación de fosfoinositidos en diferentes posiciones para formar: PIP(3)P, PIP(3,4)P₂ o PIP(3,4,5)P₃ (90). Estos segundos mensajeros sirven para reclutar en la membrana a proteínas que contengan dominios tipo PH como la PDK1 y su sustrato AKT, lo cual lleva a su activación (91). La PI3K clase III es requerida en los estadios tempranos de la generación del autofagosoma, interactuando directamente con la proteína Beclin1, mientras que la PI3-K clase I regula la autofagia a través de AKT - mTOR aumentando la actividad de mTOR inhibiendo la autofagia (92).

Beclin 1

Otra proteína de importancia para el desarrollo de la autofagia es Beclin-1/Atg6. De aproximadamente 60 KDa, esta proteína forma parte del complejo proteico PI3K-III necesario para la nucleación y ensamblaje del complejo pre-autofagosomal, conocido como fagóforo. Bcl-2/Bcl-XL es hasta la fecha la única proteína que inhibe la autofagia al asociarse directamente a Beclin-1 (93,94). Se ha propuesto que la interacción de Bcl-2 con Beclin-1 interfiere en la interacción con VPS34, de esta forma impide la formación del complejo PI3K-III (95). Por lo tanto se requiere la disociación de Beclin con Bcl-2 para la activación de la autofagia (93, 96, 97) (Figura 14).

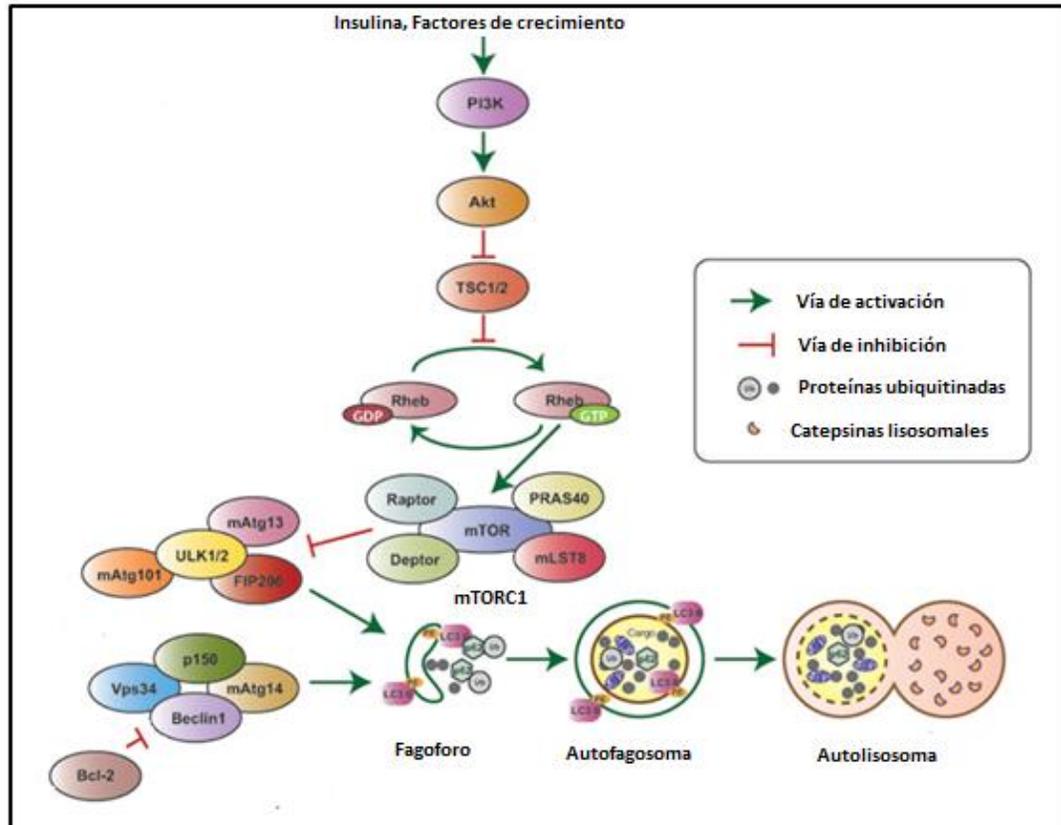


Figura 14. Vías de señalización en la regulación de la autofagia. Esquema representativo de las diferentes vías de señalización involucradas en la regulación de la autofagia. Los factores de crecimiento al activar la vía de la PI3K clase I- AKT lleva a la activación de mTORC1 el cual inhibe al complejo ULK1/2 en la etapa de iniciación de la formación del fagoforo, inhibiendo de esta forma la autofagia. Bcl2 inhibe la autofagia al mantener a la proteína Beclin1 formando un complejo Bcl2-Beclin1 e impedir la interacción con los otros componentes del complejo PI3K-clase III necesarios para el inicio de la formación de la vesícula. Por otra parte AMPK al inhibir a mTOR y fosforilar directamente a ULK activa la autofagia en condiciones en la cuales los niveles de ATP se encuentran bajos a nivel intracelular. Adaptado de Kongara y *col*, 2012 (98).

AMPK

AMPK es una proteína serina/treonina quinasa muy conservada en la evolución, que funciona como un sensor metabólico clave en las células (99). AMPK es rápidamente activada cuando se produce un incremento en la razón intracelular de AMP/ATP (100). Para mantener la homeostasis energética, AMPK inhibe las vías que consumen energía y activa aquellas que llevan a producción de energía, como la autofagia (101). AMPK puede activar autofagia por diferentes mecanismos (Figura 15). La activación de AMPK activa a JNK1 la cual media la fosforilación de Bcl-2 produciendo la disociación del complejo Bcl-2-Beclin1 (102). Esta disociación deja en libertad a Beclin1 para formar el complejo con VPS34 (PI3K-III) e iniciar la formación del fagoforo. AMPK activa al factor de transcripción FoxO1 y FoxO3 lo cual lleva a un aumento en la expresión de la proteína Atg12 (103, 104). Otra manera que AMPK activa la autofagia es a través de la fosforilación de ULK1 en respuesta a una privación de nutrientes (105, 106). Por último, AMPK activa autofagia a través de la fosforilación de TSC2 (107) y por directa fosforilación de Beclin1 (108). Por lo tanto, AMPK es un punto crítico en la integración de señales que censan el estado metabólico de la célula, para activar el proceso de autofagia (101).

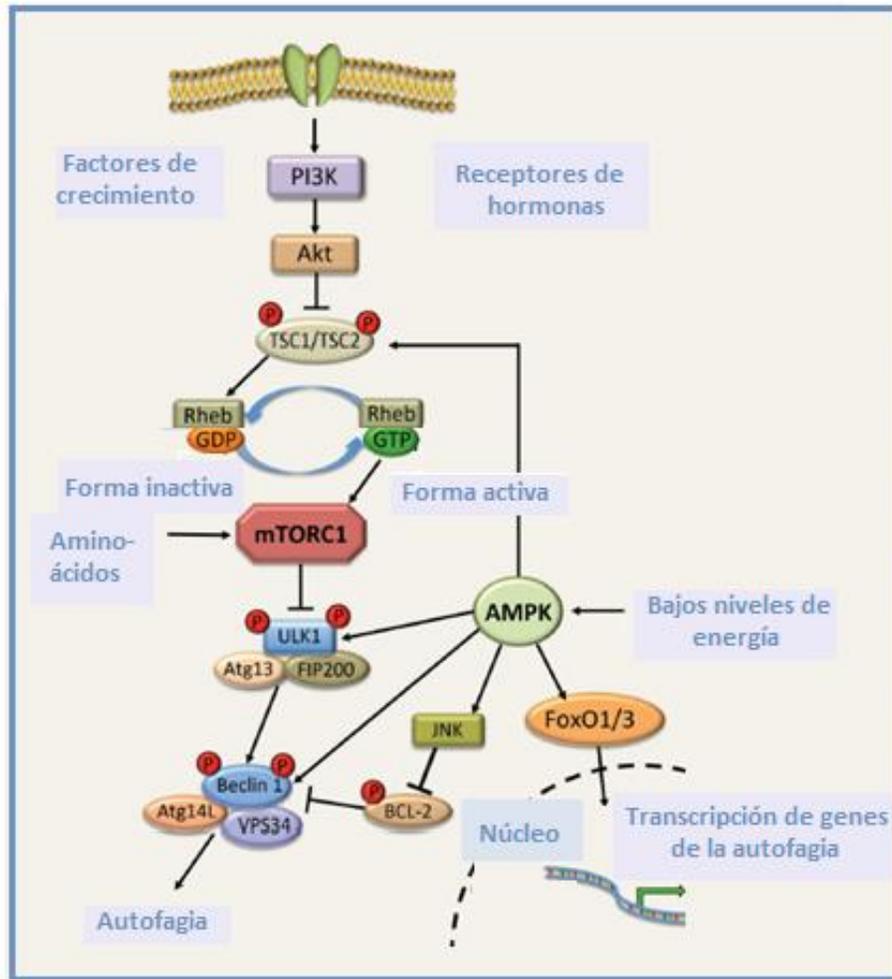


Figura 15. Esquema de la regulación de la autofagia por AMPK. AMPK fosforila diferentes blancos de la vía de regulación de la autofagia y permitir así la inducción del proceso. Además, puede activar la transcripción de genes de proteínas Atg a través de la activación del factor de transcripción FoxO1/3. Activa a la quinasa JNK, la cual fosforila a Bcl-2 produciendo la disociación del complejo Bcl-2-Beclin1, permitiendo que Beclin1 se una al complejo de iniciación PI3K-III. Adaptado de Kubli y *col*/ 2014 (101).

1.5. Doxorubicina y autofagia

Según la literatura, la cardiotoxicidad producida por doxorubicina se puede explicar por la alteración que produce sobre una serie de procesos intracelulares. Por ejemplo, la exacerbada producción de ROS genera la acumulación de estas especies en el núcleo, produciendo daño en el DNA, consecuencia de ello, produce la alteración en la transcripción de varios genes. La acumulación de ROS en la mitocondria produce daño en este organelo, con lo cual hay una disminución drástica en la síntesis de ATP. Ya sea por una o por varias de estas alteraciones, el cardiomiocito muere por apoptosis o necrosis dependiendo de la concentración de doxorubicina, generando en forma crónica una cardiomiopatía que llega a insuficiencia cardíaca.

En un corazón normal, la autofagia basal funciona como un control interno en el recambio de componentes citoplasmáticos. Pero este proceso se induce en estados de enfermedad o cuando la homeostasis celular se altera, ya sea por falta de aporte de nutrientes, factores de crecimiento o algún tipo de estrés como el que generan los ROS o el daño al DNA.

Se ha descrito que se produce un aumento en la intensidad de la autofagia en varias condiciones de estrés cardiovascular, incluyendo isquemia-re perfusión, sobrecarga de presión, cardiomiopatías e insuficiencia cardíaca **(109-114)**.

Dado que la doxorubicina produce daño en organelos (mitocondrias principalmente), estrés metabólico por la disminución del ATP, estrés redox por la producción de ROS y en su conjunto estas alteraciones pueden llegar a generar insuficiencia cardíaca, es interesante estudiar que sucede con la autofagia cuando los cardiomiocitos son expuestos a doxorubicina.

2. HIPOTESIS

Doxorrubicina provoca la muerte del cardiomiocito por inhibición de la autofagia basal.

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de doxorrubicina sobre la autofagia basal en el cardiomiocito y su relación con la muerte celular.

4. OBJETIVOS ESPECIFICOS

Objetivo específico 1. Caracterizar la muerte del cardiomiocito inducida por doxorrubicina.

Objetivo específico 2. Establecer el efecto de doxorrubicina sobre la autofagia basal en cardiomiocitos y su relación con la muerte celular.

Objetivo específico 3. Determinar la activación de la vía de señalización AKT/mTOR en cardiomiocitos expuestos a doxorrubicina.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Reactivos

Los medios de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), Hank's y M199, pancreatina, 5-bromo-2'-deoxiuridina, azul de tripán, EDTA, EGTA, Tritón X-100, dodecilsulfato de sodio (SDS), acrilamida -bis acrilamida, Tris base, glicina, además de otros reactivos bioquímicos se adquirieron en Sigma Chemical Co (St Louis, USA). Colagenasa y tripsina-EDTA, se adquirieron en Gibco BRL (Carlsbad, CA, EEUU). Suero fetal bovino (FBS) se obtuvieron de Hyclone. Doxorubicina (Laboratorio Pfizer). De Invitrogen (Eugene, OR, EEUU) se adquirió la Oligofectamina y OptiMEM. 3-metiladenina (3-MA) y el anticuerpo secundario anti IgG de conejo conjugado a peroxidasa se adquirieron a Calbiochem (La Jolla, USA). Cocktail Inhibidor de proteasas Complete Mini y el cocktail inhibidor de fosfatasa PhosSTOP se adquirieron en Roche Applied Science (Penzberg, Alemania). En BD Pharmigen (EEUU) el kit FITC Annexin Apoptosis Detection kit I. Los kits Cell TiterGlo Luminiscence Cell Viability y The CytoTox 96®Non-Radioactive Cytotoxicity Assay en Promega. En Cell Signaling Technology (Beverly, EEUU) se adquirieron los anticuerpos IgG de conejo anti-caspasa-3, LC3, Beclin1 y para las formas fosforiladas y totales de p70-S6K, y AKT. El anticuerpo IgG de ratón anti p62 se adquirió en Abcam. El reactivo químico luminiscente para western blot EZ-ECL se adquirió en Amersham Bioscience (Buckinghamshire, Inglaterra). 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.

5.2. Cultivo primario de cardiomiocitos de rata neonata

5.2.1. 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.

5.2.2. Aislamiento y cultivo de cardiomiocitos de rata neonata

Los cardiomiocitos se obtuvieron desde corazones de ratas neonatas de 2 a 3 días de edad como se describe en Foncea y col (115). 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 re suspendieron en DME/M199 4:1, FBS al 10 % y se plaquearon 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 re suspendieron 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. Las células se sembraron en placas de diferentes tamaños según las necesidades experimentales en DME/M199 4:1, 5 % FBS y 10 % FCS, en presencia de BrdU (5-bromo-2-deoxiuridina). El fondo de las placas de cultivo se cubrieron con una monocapa de gelatina al 2 % p/v y mantuvieron en incubadores termostregulados a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂ 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 β -MHC.

5.3. Obtención de extractos proteicos celulares

Las células se sembraron en placas de 35 mm a una densidad de $1,5 \times 10^6$ células/placa. Una vez finalizado el estímulo, las células se lavaron tres veces con PBS frío y luego se lisaron con 50 μ 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 Na₃VO₄ 1 mM). El homogeneizado se centrifugó a 12.000 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. Luego se denaturó en tampón de carga 4x (glicerol 20 %, β -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 (30).

5.4. Determinación de proteínas

Se mezcló 1 μ L de muestra con 40 μ L de reactivo de Bradford (Bio-Rad protein assay) y 159 μ L de agua. Las muestras se leyeron a 595 nm. Como estándar para realizar la curva de calibración se utilizó BSA (116).

5.5. Electroforesis en gel 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 Caspasa 3, LC3, p62, Beclin-1, AKT y P70S6K se utilizaron alrededor de 30 μ g 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.

5.6. Electrotransferencia de proteínas

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de Nitrocelulosa de 0,45 μ m a 400 mA durante 90 min en tampón de transferencia.

5.7. Western blot

La membrana se trató con una solución de bloqueo (TBS 1 x; Tween-20 0,1 %; leche descremada 5 % p/v) durante 1 h, con agitación suave a temperatura ambiente. Posteriormente se incubó con los anticuerpos primarios anti: Caspasa 3, LC3, Beclin 1, AKT, pAKT, p70S6K y p-p70S6K (dilución 1:1.000 para todos ellos) o anti p62 (dilución 1:2.000) en tampón de incubación (TBS 1x; Tween-20 0,1 %; leche descremada 5 % p/v) toda la noche a 4 °C y con agitación suave. Posterior a la incubación con el anticuerpo primario, la membrana se lavó durante 5 min en TBS 1x; Tween-20 al 0,1 % por tres veces y luego se incubó nuevamente, durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario; anti-IgG de ratón o conejo conjugado con peroxidasa, según corresponda, en un título de 1:5.000 en tampón de bloqueo TBS 1x; Tween-20 al 0.1 %. Para detectar las proteínas, la membrana, previamente lavada, se incubó durante 1 min en la solución quimio luminiscente para western blot, ECL y se expuso en una película de fotografía Kodak-Biomax. Las películas se digitalizaron y las imágenes se procesaron con el programa computacional UN-SCAN-IT gel 6.1.

Después de realizar los ensayos de western blot, la membrana de nitrocelulosa se incubó por 1 h en una solución de rojo Ponceau (rojo Ponceau 2 %, TCA 30 %, ácido sulfosalicílico 30 %) con agitación moderada para desprender los anticuerpos y ser utilizada en la detección de otra proteína o bien secada y guardada.

Posteriormente, para corregir las posibles diferencias en la cantidad de proteínas cargadas en el gel, se analizaron los niveles de GAPDH, mediante reacciones de inmunodetección iguales a las descritas anteriormente (primero incubación con anticuerpo anti GAPDH en dilución 1:10.000 y luego anticuerpo secundario anti-conejo 1:5.000).

5.8. Determinación de la actividad de LDH

Los cardiomiocitos se cultivaron en placas de 24 pocillos conteniendo 125.000 células por pocillo. Transcurridas 24 h desde el inicio del estímulo se determinó el porcentaje de citotoxicidad utilizando el kit The CytoTox 96® Non Radioactive Cytotoxicity Assay, Promega. Brevemente, 50 µL de medio sobrenadante de cada pocillo se transfirieron a una placa de 96 pocillos, posteriormente se adicionó 50 µL del reactivo Assay y se incubó por 30 min en oscuridad. Al finalizar el tiempo, la reacción se detuvo con la solución stop del kit y se registró la absorbancia a 490 nm. Paralelamente, a la placa de cultivo se le retiró completamente el medio y se les agregó a cada pocillo 300 µL de medio DMEM conteniendo solución de lisis (0,1 % v/v Triton X-100) 1X y se incubaron a 37 °C por 45 min. Transcurrido el tiempo, se realizó el mismo procedimiento antes descrito para el sobrenadante. Se determinó como control blanco la absorbancia del medio conteniendo doxorubicina en concentración 1 µM. El porcentaje de citotoxicidad se calculó en base a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Citotoxicidad} = (A \text{ sobrenadante} / A \text{ total}) \times 100$$

A total= A sobrenadante + A del lisado

A= absorbancia

5.9. Determinación del contenido intracelular de ATP

Para estos experimentos se utilizaron placas de cultivo de 96 pocillos a una concentración de 2×10^4 células/pocillo. Finalizado el tiempo de estimulación, se removió el medio, se lavó la placa con PBS frío por tres veces, retirándose completamente. Se agregaron 20 µL de medio Krebs con Ca²⁺ (NaCl 145 mM, KCl 5 mM, EGTA1 mM, MgCl₂

1 mM, HEPES-Na 10 mM, glucosa 5,6 mM, pH 7,4) y 20 μ L de tampón de lisis del kit Cell Titer-Glo®. Posteriormente se agitó la placa durante 2 min para completar la reacción. Las células lisadas se traspararon a una placa opaca de 96 pocillos y la luminiscencia se detectó en un luminómetro TopCountNXT (Perkin-Elmer, Waltham, MA).

5.10. Detección de fosfatidilserina-ANEXINA V-FITC

Cardiomiocitos se sembraron en placas de cultivo de 24 pocillos a una concentración de 125.000 células por pocillo. Una vez finalizado el tiempo de estimulación con doxorubicina, se recuperó el sobrenadante en tubo eppendorf. Las células en la placa se lavaron tres veces con PBS. Posteriormente, se retira el PBS completamente y las células se soltaron de placa por adición de 300 μ L de Tripsina 1X por 5 min a 37 °C. Una vez que las células se soltaron de la placa, el efecto de la enzima se detuvo por la adición de 30 μ L de suero y se transfirieron a los tubos que contenían el medio sobrenadante. Los tubos se centrifugaron a 12000G por 5 min. Se descartó el sobrenadante y el pellet se suspendió en 500 μ L de la solución tampón de unión 1X (0,1 M HEPES/NaOH (pH 7,4), NaCl 1,4 M, CaCl₂ 25 mM). La operación se repitió tres veces. Después del último lavado las células se mantuvieron en el tampón de unión y se adicionaron 5 μ L de FITC-Anexina V. Los tubos se agitaron suavemente y se incubaron a temperatura ambiente y oscuridad por 15 min. Luego se detectó el nivel fluorescencia por citometría de flujo dentro de 1 h de terminado el proceso de las muestras.

5.11. Determinación de la muerte por apoptosis mediante fragmentación de caspasa 3

La activación de caspasa 3 se determinó por western blot detectando la fragmentación de la procaspasa 3, utilizando un anticuerpo específico.

5.12. Silenciamiento de beclin1 mediante siRNA

Para obtener la reducción en los niveles de una proteína en cardiomiocitos se siguió el protocolo establecido en el Laboratorio de Transducción de Señales Moleculares de la Célula (LTSMC, Facultad Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile). Un siRNA específico para Beclin 1 liofilizado se disolvió en agua nanopura a una

concentración final de 33 μM , el tubo se calentó a 90 $^{\circ}\text{C}$ por 1 min para luego dejarse enfriar a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 20 min. Brevemente, para transfectar una placa de 35 mm con una concentración final de 100 nM de siRNA, 3 μL del siRNA (33 μM) se disolvió en 177 μL de Optimem, mientras que 4 μL de oligofectamina se disolvió en 20 μL de Optimem, ambas soluciones se incubaron por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se mezclaron, agitaron cuidadosamente e incubaron durante 20 min a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agregó lentamente a la placa de 35 mm previamente lavada con PBS y mantenida a en volumen final de 1 mL de medio Optimem sin suero y sin antibióticos. Las células se incubaron a 37 $^{\circ}\text{C}$ y 5% CO_2 por 24 h. Transcurrido el tiempo se lavaron e incubaron en medio completo suplementado con 2 % FBS. Para obtener un silenciamiento satisfactorio de la proteína, las células se mantuvieron en estas condiciones durante 24 h previo al ensayo.

5.13. Cuantificación del flujo de autofagia

Para evaluar el efecto de la doxorrubicina sobre la autofagia basal, los cultivos primarios de cardiomiocitos de rata se estimularon con doxorrubicina 1 μM por 3 y 24 h en medio completo suplementado con FBS al 2 %. Para evaluar el flujo autofágico, los cardiomiocitos se estimularon conjuntamente con doxorrubicina 1 μM y baf A 10 μM por 24 h. En ambas situaciones se analizaron los niveles de las proteínas LC3 y p62 como marcador de inducción de autofagia, los cuales se determinaron por Western blot **(117)**.

5.14. Expresión de resultados y análisis estadístico

Los resultados presentados corresponden al promedio \pm error estándar (SEM) del número de experimentos independientes indicados. Las figuras corresponden a resultados representativos de cada grupo de experimentos repetidos, al menos, 3 veces en forma independiente o lo que indique la figura. Para los cálculos estadísticos se utilizó el programa GraphPad Prism 6.01. La significancia estadística de los datos se realizó mediante Prueba t- Student y prueba ANOVA, seguido de los post-test de Tukey o Dunnett, según se indica el caso. Se consideró como límite de significancia estadística, valores de $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. Caracterización de la muerte inducida por doxorubicina

Una de las hipótesis que permite explicar el mecanismo por el cual doxorubicina produce cardiotoxicidad y genera, en último término, la insuficiencia cardíaca, es que con cada dosis administrada de medicamento hay pérdida de células cardíacas **(118)**. El análisis por microscopía electrónica de biopsias de endocardio de pacientes humanos obtenidas a las pocas horas de haberles administrado el antraciclínico, muestra evidencias de células muertas por apoptosis **(118)**. Según se ha descrito en la literatura, el tipo de muerte celular que produce doxorubicina varía con la concentración: a bajas concentraciones, se produce muerte por apoptosis, mientras que necrosis, a altas concentraciones **(119)**. Para responder al primer objetivo, cultivos primarios de cardiomiocitos de rata neonata se estimularon con doxorubicina 1 μM por un período de 24 h o curso temporal de 3, 6, 18 y 24 h.

6.1.1. Efecto de doxorubicina sobre la muerte por necrosis del cardiomiocito

La necrosis se caracteriza por la liberación del contenido citoplasmático al medio de cultivo por pérdida de la integridad de la membrana plasmática y lisis celular **(28)**. En este trabajo se determinó el porcentaje de muerte celular por necrosis, mediante la cuantificación de LDH liberada al medio de cultivo. Para la determinación de la actividad de la LDH se utilizó el kit The CytoTox 96® Non Radioactive Cytotoxicity Assay, Promega. Cuando las células en cultivo mueren, la LDH se libera al medio sobrenadante. La enzima liberada permite la reducción de una sal de tetrazolio a un producto coloreado soluble que absorbe a 570 nm. La formación de este producto es directamente proporcional a la actividad de la enzima y por ende a muerte celular. El resultado mostrado en la **Figura 16** indica que doxorubicina aumentó el porcentaje de LDH en un 50 % respecto de la condición control. Para sustentar este primer resultado se utilizó una segunda técnica para evaluar la muerte, la detección de fosfatidilserina (FS) a través de la cuantificación de la marca Anexina V-FITC utilizando citometría de flujo. Anexina V es una proteína que se une a los fosfolípidos y tiene gran afinidad por FS. Cuando se produce muerte celular por apoptosis, uno de los eventos más tempranos es la exposición de fosfolípidos como la FS al medio extracelular y esto precede a la pérdida de la integridad de la membrana y muerte de la célula por apoptosis y/o necrosis. Para diferenciar entre estos dos procesos de muerte, se requiere determinar la incorporación de PI por la célula en un curso de

tiempo. Las células viables lo excluyen, en cambio, cuando la integridad de la membrana plasmática se ha perdido, éste ingresa hasta el núcleo donde se intercala entre pares de bases presentando una fluorescencia roja. Por lo tanto, una célula es viable cuando la marca es Anexina (-) / PI (-); una célula se encuentra en apoptosis temprana cuando es Anexina (+) / PI (-) y cuando se encuentra en una etapa de apoptosis más tardía o ya ha muerto por necrosis, es Anexina (+)/PI (+). El resultado de la **Figura 17** muestra que la población de células sometidas a estimulación con doxorubicina presentó una mayor marca de Anexina V-FITC + y fue significativamente mayor que el control a partir de la 18 h, manteniéndose hasta las 24 h. Sin embargo, el resultado sugiere que la muerte producida por doxorubicina podría estar relacionada a procesos tanto de apoptosis como de necrosis. Debido a que no se pudo utilizar la incorporación de PI para discriminar muerte por apoptosis porque doxorubicina interfiere con su detección, ya que ambos son intercalantes en el DNA y sus longitudes de emisión se superponen en el color rojo.

6.1.2. Efecto de doxorubicina sobre los niveles intracelulares de ATP

Se sabe por literatura que la doxorubicina causa daño a nivel mitocondrial, tanto en estructura como en funcionalidad lo que se traduce en: alteraciones en la membrana mitocondrial y disfunción mitocondrial provocando una reducción importante en la síntesis de ATP, todos estos efectos contribuyen a la muerte celular (**26, 27**). Las células viables son metabólicamente activas y por lo tanto sintetizan cantidad suficiente y necesaria de ATP. Una disminución drástica en los niveles de esta molécula se relaciona con una disminución en la viabilidad celular (colapso metabólico). El resultado que se muestra en la **Figura 18** indica que la doxorubicina disminuyó los niveles ATP a las 24 h cerca de un 50 % provocando una reducción en la viabilidad celular concordante con la encontrada por medición de la actividad de LDH.

6.1.3. Efecto de doxorubicina en la apoptosis dependiente de caspasa

Doxorubicina se une e inhibe a enzimas asociadas al DNA y se intercala entre los pares de bases de la doble hélice (**5**) provocando daño al DNA y gatillando muerte celular por apoptosis en un intento fallido de la célula por repararlo. Además la doxorubicina produce un daño directo en la mitocondria causando la muerte celular al activar la vía intrínseca de la apoptosis. El daño en la mitocondria favorece la liberación de Cit C y con ello la formación del apoptosoma, el cual produce la fragmentación y activación de la

caspasa iniciadora 9. Caspasa 9 fragmenta y activa a la Caspasa 3 y se ejecuta la apoptosis (9).

Para determinar si la apoptosis es un tipo de muerte involucrado en el efecto de la doxorubicina sobre los cardiomiocitos, las células se incubaron en medio de cultivo conteniendo doxorubicina 1 μM por 3, 6, 18 y 24 h. Como muestra la **Figura 19** la exposición de las células a la doxorubicina produjo la fragmentación de procaspasa 3, lo que correlacionó con un aumento en los niveles de caspasa 3 a partir de las 3 h, llegando a un máximo a las 6 h para luego disminuir hasta las 24 h.

En resumen, todos estos resultados confirman que doxorubicina 1 μM produjo muerte de los cardiomiocitos en el tiempo. De acuerdo a la temporalidad de los efectos, la muerte por apoptosis sería un evento temprano para luego dar lugar a muerte por necrosis la que claramente se observa a las 24 h de exposición al antraciclínico.

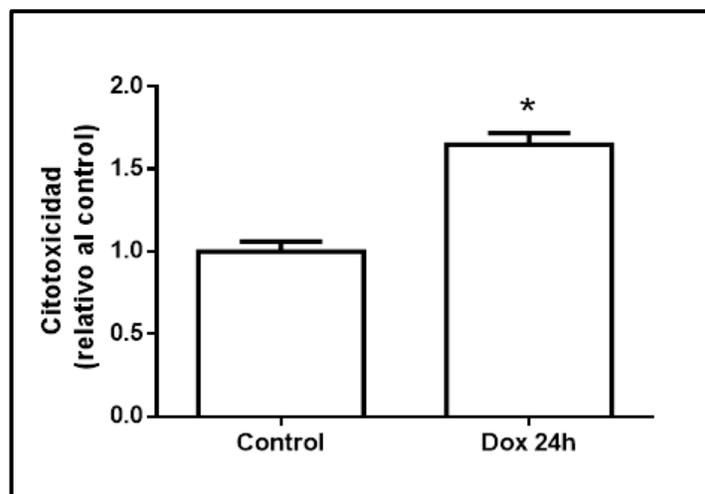


Figura 16. Efecto de doxorubicina sobre la actividad de LDH en la cuantificación de la muerte celular. Cardiomiocitos en cultivo se expusieron a doxorubicina 1 μM en medio completo suplementado con 2 % de FBS. Después de 24 h se determinó la actividad de la LDH en el sobrenadante y en las células adheridas. La actividad de la LDH liberada se calculó como porcentaje entre las actividades del sobrenadante y total. Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM de 4 experimentos independientes. Cada determinación se realizó por triplicado. Análisis por t- Student * $p < 0,05$ relativo al control.

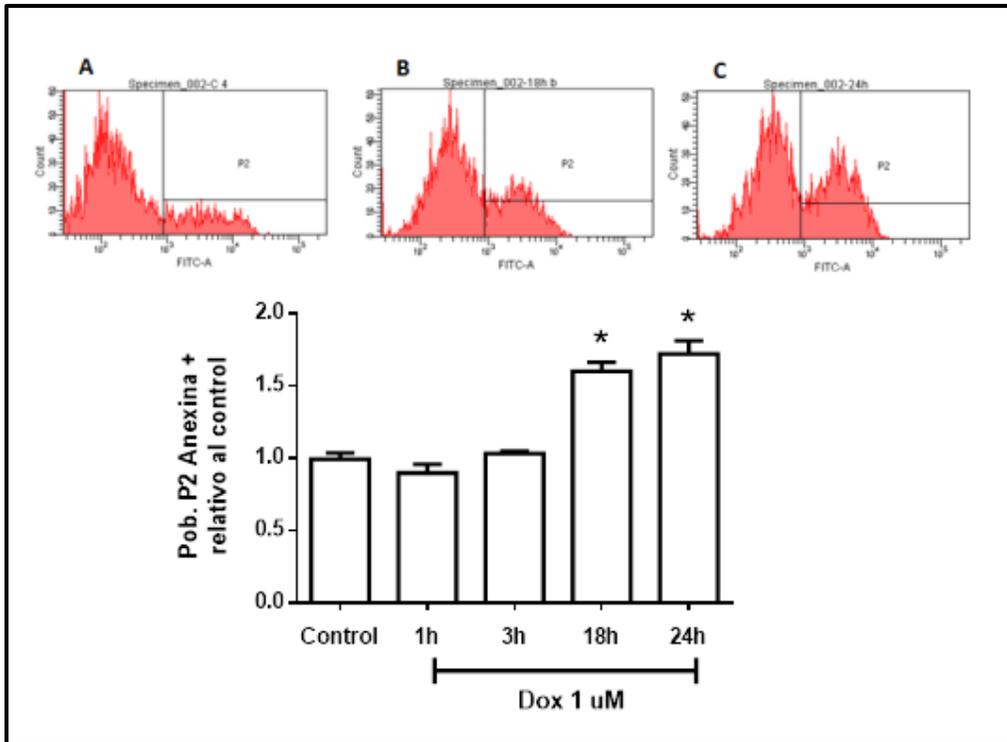


Figura 17. Efecto de doxorubicina sobre los cardiomiocitos en la evaluación de la muerte por apoptosis/necrosis. Cardiomiocitos en cultivo se expusieron a doxorubicina 1 μ M. Después de 24 h las células se soltaron con tripsina, se incubaron con Anexina-FITC y se evaluaron por citometría de flujo. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM de 4 experimentos independientes. Análisis por ANOVA y post test Dunett * p <0,05 estadísticamente significativo respecto al control.

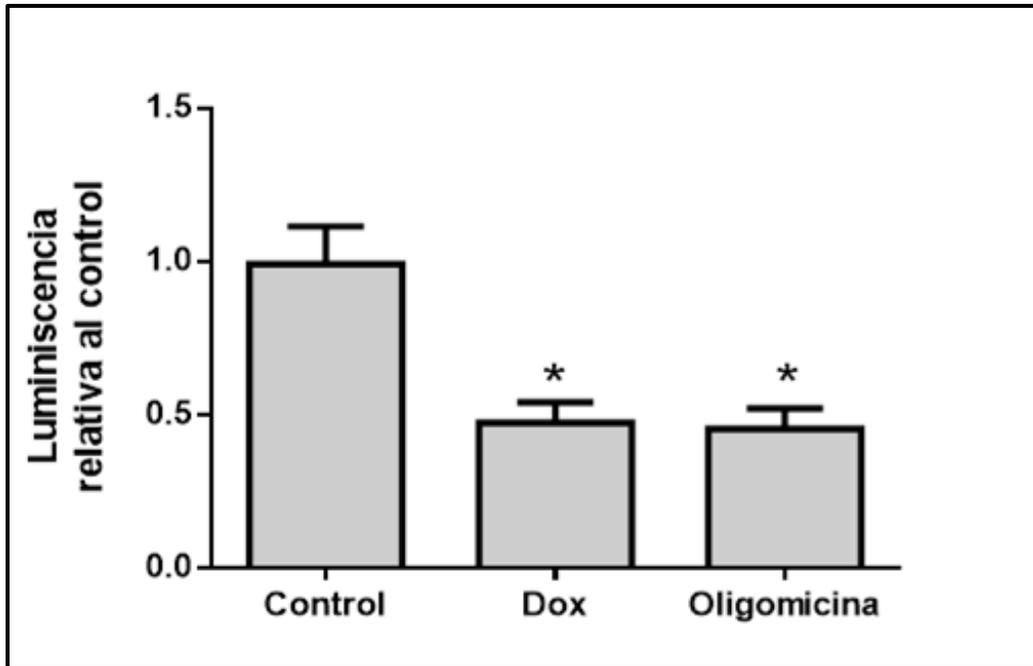


Figura 18. Efecto de doxorubicina sobre los niveles intracelulares de ATP en cardiomiocitos de rata. Cardiomiocitos se expusieron a doxorubicina 1 μ M. Después de 24 h las células se lisaron y se obtuvieron los extractos totales. El contenido de ATP se determinó utilizando la reacción luciferina/luciferasa mediante un kit comercial (CellTiter Glo, Promega). Los resultados se expresan como promedio \pm SEM de 4 experimentos independientes. Los datos se analizaron mediante Anova. Post test Tukey. * $p < 0.05$ respecto al control.

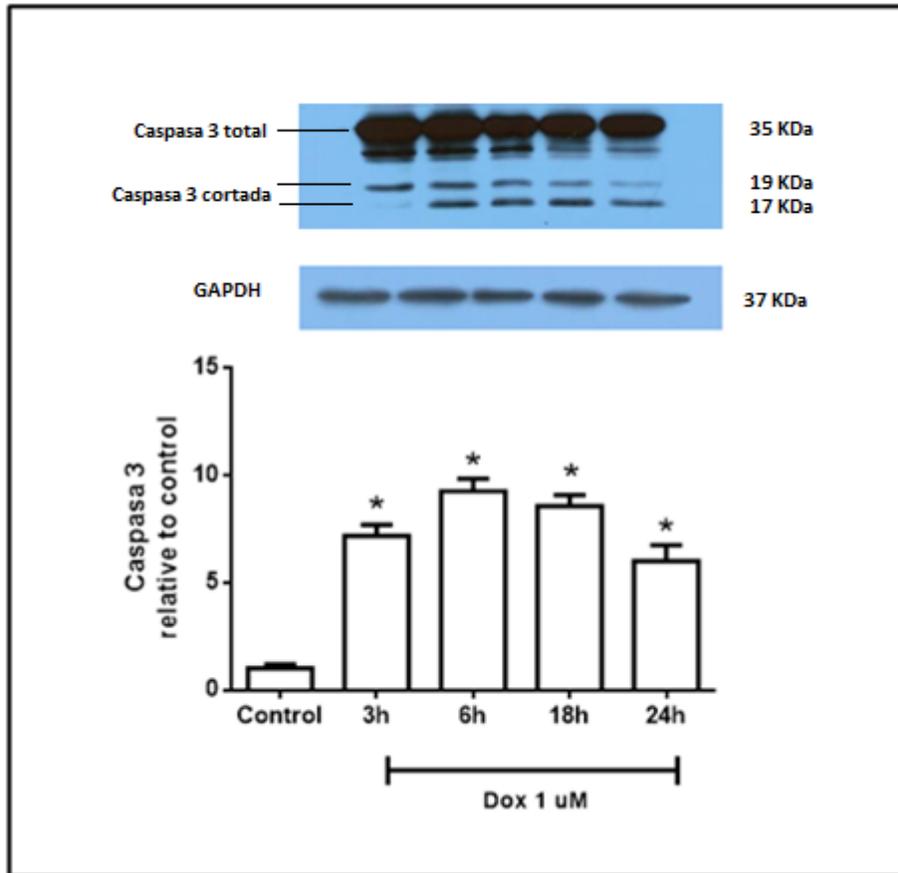


Figura 19. Efecto de doxorubicina en la fragmentación de caspasa 3 en cardiomiocitos de rata. Cardiomiocitos se cultivaron en medio completo suplementado con 2 % de FBS y se expusieron a doxorubicina 1 μ M en curso temporal. Los niveles de Caspasa 3 total, fragmentada y GAPDH se analizaron por western blot previa resolución mediante electroforesis SDS-PAGE en geles al 12 %. El gráfico muestra la cuantificación de los niveles de Caspasa 3 total y fragmentada. La imagen es representativa de 6 experimentos independientes. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM. Análisis por ANOVA. Post test Dunett * p <0.05 estadísticamente significativo respecto al control.

6.2. Establecer el efecto de doxorubicina sobre la autofagia basal en los cardiomiocitos y su relación con la muerte celular

6.2.1. Efecto de doxorubicina sobre la autofagia basal

El efecto de doxorubicina sobre la autofagia ha sido materia de debate y controversia desde la primera publicación, en la cual se relacionó doxorubicina con un aumento en la eficiencia de este proceso, lo que llevaría a la muerte celular y con ello a la generación de la insuficiencia cardíaca **(120)**. Posteriormente, aparecieron varios artículos en los cuales apoyaban este hallazgo **(121-124)** y otros en los cuales sus resultados eran totalmente opuestos **(125, 126)**. Sin embargo, las diferencias en los modelos de estudio dificulta la comparación de los resultados obtenidos. Para evaluar el efecto de doxorubicina sobre la autofagia basal en los cardiomiocitos, se propuso trabajar en un medio de cultivo suplementado con un 2% suero, para evitar la inducción del proceso por falta de factores de crecimiento y se evaluaron los niveles de las proteínas LC3 y p62.

La proteína LC3 se sintetiza como pro-LC3 y rápidamente se procesa por Atg4 formando la proteína LC3-I, la cual se encuentra en el citoplasma. Cuando la autofagia se activa, un complejo formado por las proteínas Atg12 y Atg5 conjuga la proteína LC3-I con fosfatidiletanolamina (PE), formando LC3-II. Esta proteína se une a la membrana naciente de los autofagosomas y permanece unida hasta la completa formación de la vesícula, tanto en su cara externa como interna y lo hace un buen marcador de este proceso, ya que se correlaciona con el número de autofagosomas formados. Para evaluar si doxorubicina inducía el procesamiento del LC3-I, como marcador de autofagia, los cardiomiocitos se expusieron a doxorubicina 1 μ M y se analizaron los niveles de la proteína LC3 a los tiempos de 3 y 24 h. Como se observa la Figura 20, al tiempo de 3 h, la estimulación con doxorubicina disminuyó significativamente los niveles de LC3-II, lo cual se hizo más evidente a las 24 h. La interpretación del resultado indica que doxorubicina no indujo el proceso de autofagia, ya que los niveles de LC3-II no aumentaron. Al analizar los niveles totales de la proteína LC3, también se observó que éstos disminuyeron a las 24 h (Figura 21).

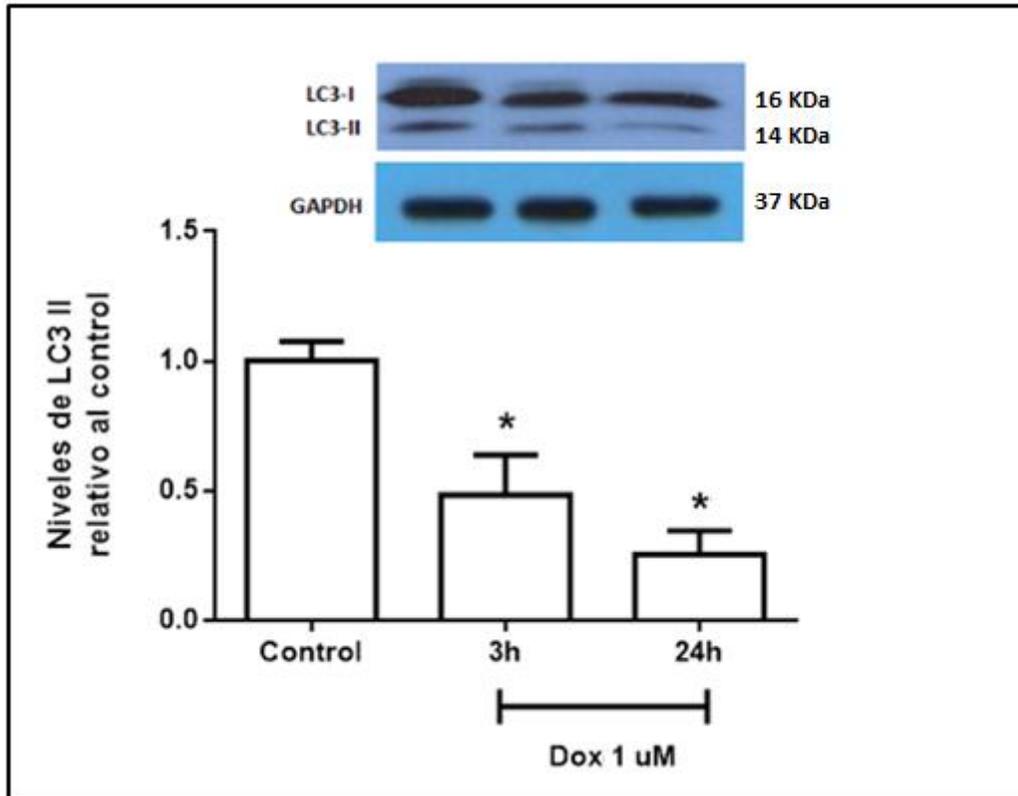


Figura 20. Efecto en los niveles proteicos de LC3-II inducidos por doxorubicina en los cardiomiocitos en cultivo. Cultivos primarios de cardiomiocitos se trataron con doxorubicina 1 μ M. A los tiempos indicados se obtuvieron los extractos proteicos totales. Los niveles de la proteína LC3-II y GAPDH se determinaron por western blot, previa resolución mediante electroforesis SDS-PAGE en geles al 12 %. El gráfico muestra la cuantificación de los niveles de LC3-II. La imagen es representativa de 3 experimentos independientes. Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM. Se realizó análisis estadístico por ANOVA y post test Dunnett. * $p < 0.05$ respecto al control.

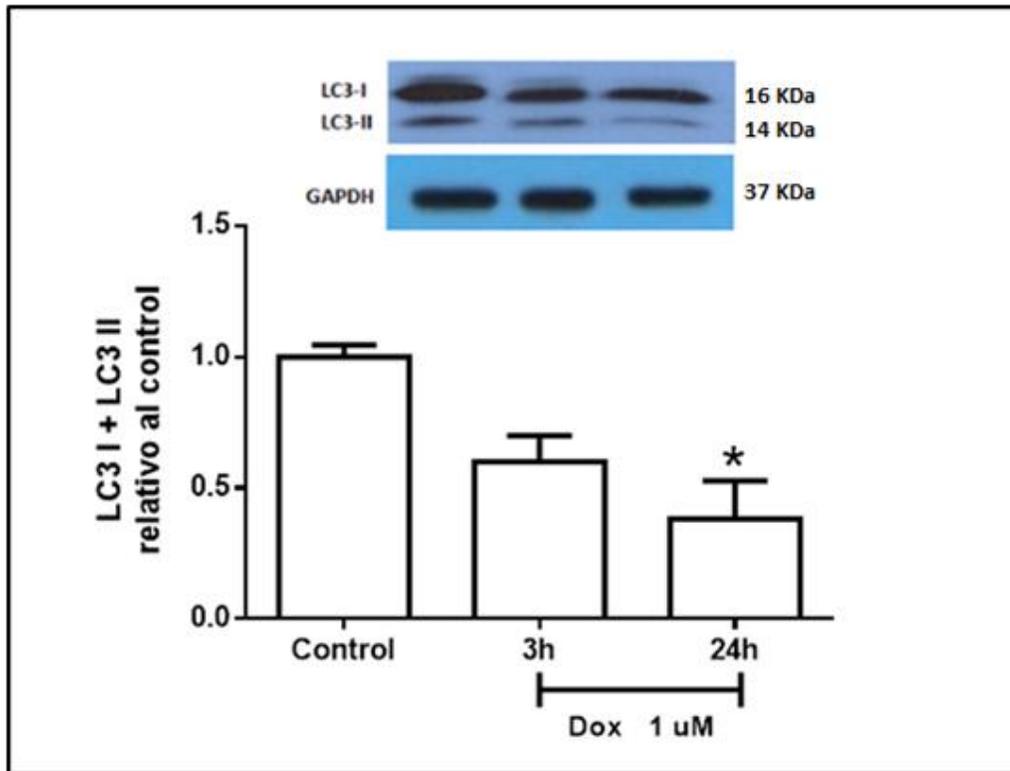


Figura 21. Efecto de doxorubicina en los niveles totales de LC3 en los cardiomiocitos en cultivo. Cardiomiocitos en cultivo en medio de mantención DMEM suplementado con 2 % de FBS, se trataron con doxorubicina 1 μ M. A las 3 y 24 h se obtuvieron los extractos proteicos totales los cuales se resolvieron por electroforesis SDS-PAGE en gels al 12 %. Los niveles de LC3 y GAPDH se determinaron por western blot. El gráfico muestra la cuantificación de los niveles de LC3 total. Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM. El gráfico representa un n=3. Análisis por ANOVA y post test Dunnett. * $p < 0.05$ respecto al control.

p62 es una proteína multifuncional involucrada en la formación de agregados proteicos y su degradación (127). En su estructura se encuentran diferentes dominios, el dominio UBA es un sitio de reconocimiento y unión para proteínas mono y poli-ubiquitinadas. A través del PB1 facilita la agregación de las proteínas y con el dominio LIR se une directamente a la proteína LC3 para que los agregados proteicos sean degradados por autofagia (128). Por lo tanto, se habla de cierta selectividad en la degradación por autofagia gracias a esta proteína. Como p62 se degrada principalmente a través de autofagia, nos entrega un buen marcador de este proceso. La **Figura 22** muestra que transcurrida 3 h de incubación con doxorubicina, los niveles de p62 se mantienen sin cambios significativos respecto del control. Sin embargo, a las 24 h de incubación con

doxorrubicina, los niveles de p62 disminuyeron significativamente. Tomando en cuenta sólo la disminución de p62, la interpretación del resultado indica que el proceso de autofagia está activo, en contraposición al resultado de LC3-II.

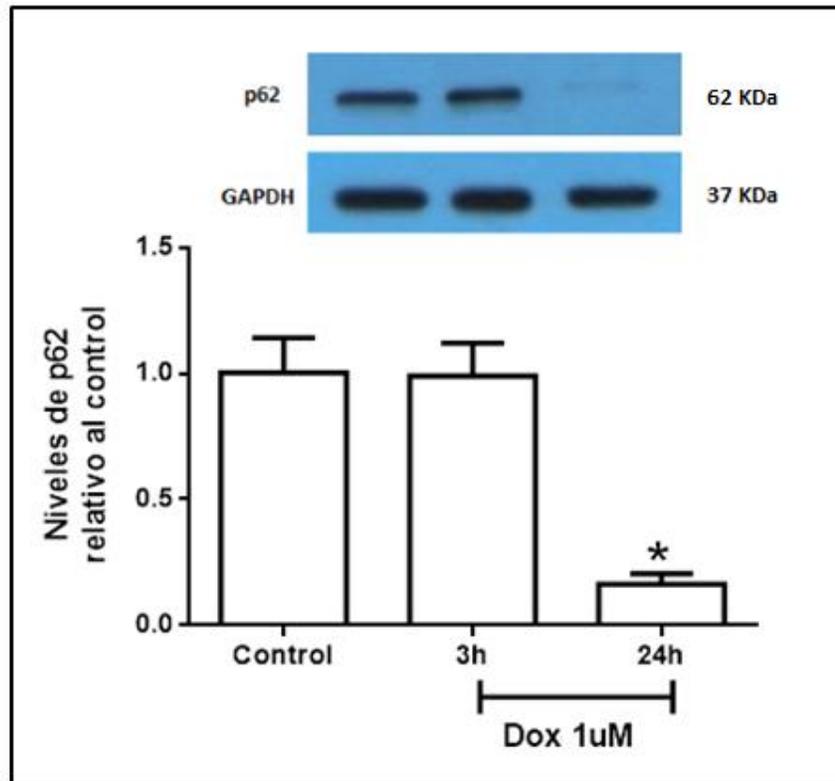


Figura 22. Disminución de los niveles de p62 inducido por doxorrubicina en cardiomiocitos en cultivo. Cardiomiocitos en medio de mantención DMEM con 2 % de FBS, se trataron con doxorrubicina 1 μ M por 3 y 24 horas. Luego se obtuvieron los extractos proteicos totales y los niveles de p62 y GAPDH se determinaron por Western blot previa resolución por electroforesis SDS-PAGE en geles al 12 %. El gráfico muestra la cuantificación de los niveles de p62. Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM. El gráfico representa un n=3. Análisis por ANOVA y post test Dunnett. *p<0.05 respecto al control.

Estudio del flujo autofágico

La proteína LC3-II se une a la membrana naciente de los autofagosomas y permanece unida hasta la completa formación de la vesícula, tanto en su cara externa como interna. Ya que esta proteína LC3-II se degrada junto con el contenido seleccionado por autofagia, su interpretación en un inmunoblot a veces es inadecuada (129). Durante un proceso de autofagia activo, se observa que a tiempos cortos LC3-I disminuye y LC3-II aumenta. Si la duración del estímulo se prolonga se observa que los niveles de ambas proteínas disminuyen. Esto se debe a que la proteína LC3-II que se encuentra hacia el interior de la vesícula se degrada junto con el material dentro del autolisosoma, mientras que la que permanece hacia el exterior de la membrana se disocia de la fosfatidiletanolamina por acción de Atg4 y retorna al citoplasma, degradándose (Figura 23).

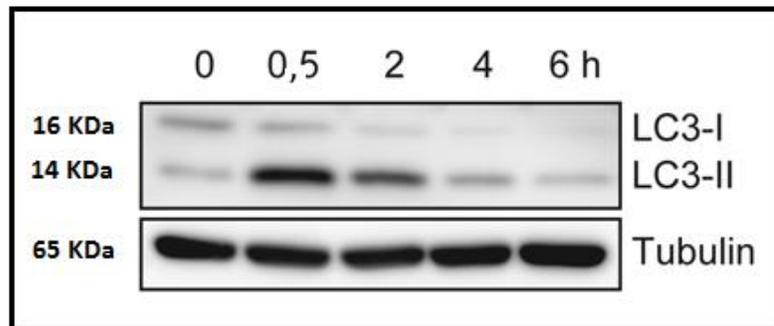


Figura 23. Esquema representativo de los niveles de LC3 I y II. Células MEF se cultivaron en medio DMEM sin aminoácidos ni suero por los tiempos indicados. Los extractos proteicos se resolvieron por inmunoblot y se determinaron los niveles de la proteína LC3 I y II. Adaptado de Mizushima *et al* 2007 (129).

Sin embargo, cuando las células son tratadas con bafilomicina A (Baf A), un inhibidor de la fusión autofagosoma-lisosoma, se bloquea el proceso de degradación, sin afectar los niveles de LC3-I ni la formación de LC3-II, es lo que se denomina **flujo autofágico**. Al inhibir la degradación se produce acumulación de vesículas autofágicas, Figura 24.

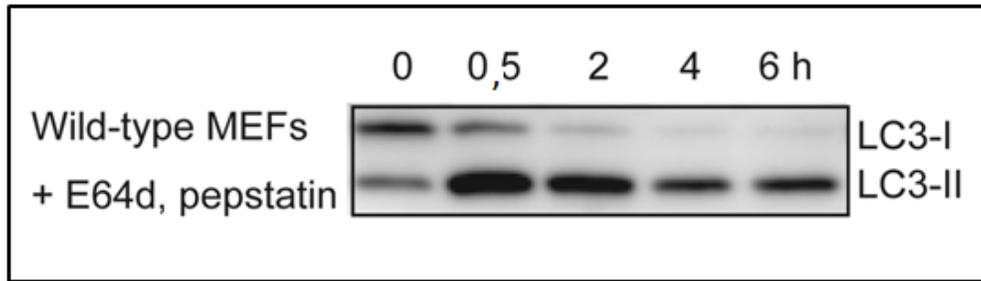


Figura 24. Esquema representativo de los niveles de LC3 I y II en condiciones de flujo autofágico. Células MEF se cultivaron en medio DMEM sin aminoácidos ni suero por los tiempos indicados y se adicionó al medio E64d o pepstatina, inhibidores de las enzimas lisosomales. Los extractos proteicos se resolvieron por inmunoblot y se determinaron los niveles de la proteína LC3 I y II. Adaptado de Mizushima y *col* 2007 (129).

Si el proceso está activo se observa una acumulación de LC3-II y p62 (**Figura 25**). Entonces para interpretar correctamente el proceso de autofagia, la literatura sugiere evaluar el flujo de autofagia, comparando los niveles de LC3-II entre las muestras como el método más adecuado de análisis (**129**).

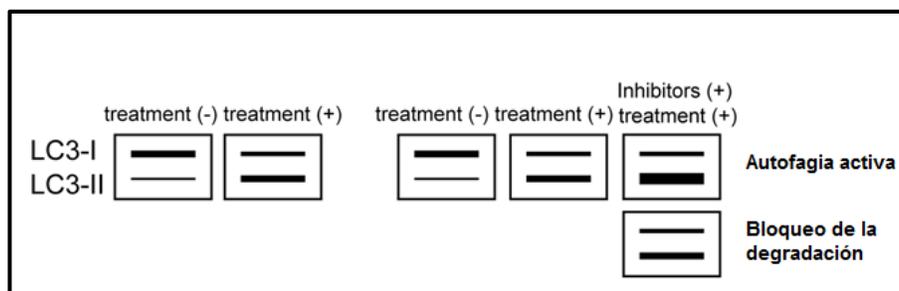


Figura 25. Esquema representativo de los niveles de LC3 I y II en condición de flujo autofágico para interpretar si hay activación o inhibición del proceso de autofagia. Adaptado de Mizushima y *col* 2007 (129).

Experimentos utilizando el inhibidor de autofagia baf A mostraron que el tratamiento con doxorrubicina no indujo el proceso de autofagia, como se observa en la **Figura 26**. En la condición control, al utilizar baf A, los niveles de LC3-II aumentaron debido a la acumulación de vesículas; esto indica un proceso de autofagia activo. Sin

embargo, en la condición doxorrubicina en presencia de baf A, los niveles de LC3-II no aumentaron, e incluso son más bajos que en la condición control (Ctrl+BafA vs Doxorrubicina+BafA). El análisis de los niveles de LC3 total reveló que disminuyeron respecto del control y no se observó acumulación de estas proteínas por efecto de Baf A como muestra la **Figura 27**. En el caso de p62, al inhibir el paso de la degradación con Baf A no se observó su acumulación como muestra la **Figura 28**.

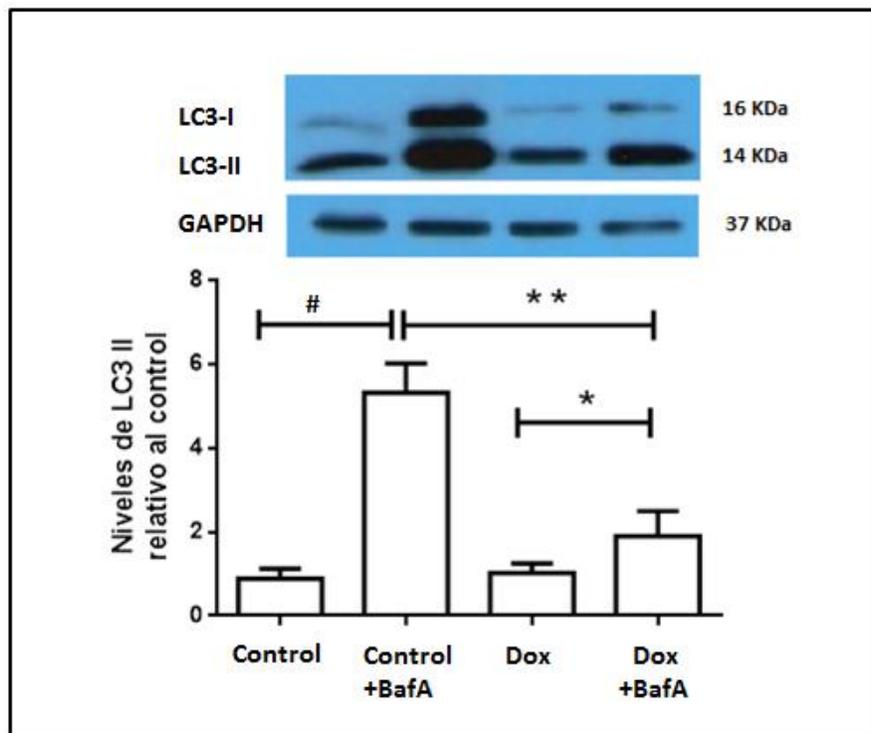


Figura 26. Efecto de doxorrubicina en el procesamiento de LC3 en condición de flujo autofágico. Cardiomiocitos en medio DMEM suplementado con 2 % FBS se trataron con doxorrubicina 1 μ M en presencia o no del inhibidor Baf A. A las 24 horas de estimulación, se obtuvieron los extractos proteicos totales y se resolvieron por electroforesis SDS-PAGE en geles al 12 %. Los niveles de LC3-II y GAPDH se determinaron por western blot. El gráfico muestra la cuantificación de los niveles de LC3-II. Los datos se expresan como el promedio \pm SEM. La figura es representativa de 4 experimentos independientes. Análisis estadístico por ANOVA y post test Tukey. # p <0.05 respecto al control, * p <0.05 respecto doxorrubicina; ** p <0.05 respecto de Ctrl+BafA

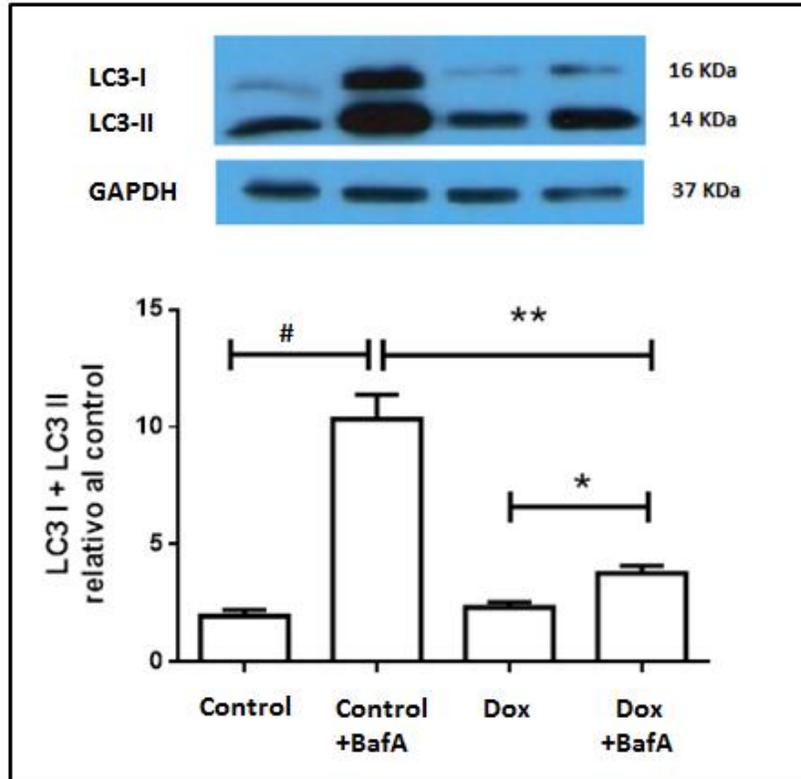


Figura 27. Determinación del efecto de doxorubicina sobre los niveles totales de LC3 en condición de flujo autofágico en los cardiomiocitos en cultivo. Cultivos primarios de cardiomiocitos en medio de mantención DMEM con 2 % de FBS, se trataron con Doxorubicina 1 μ M por 24 h en presencia o no del inhibidor Baf A. Se obtuvieron los extractos proteicos totales y se resolvieron por electroforesis SDS-PAGE en geles al 12 %. Los niveles de LC3-II y GAPDH se determinaron por western blot. El gráfico muestra la cuantificación de los niveles de LC3 total. Los datos se expresan como el promedio \pm SEM. La figura es representativa de 4 experimentos independientes. Análisis estadístico por ANOVA y post test Tukey. # p <0.05 respecto al control, * p <0.05 respecto Doxorubicina; ** p <0.05 respecto de Ctrl+BafA

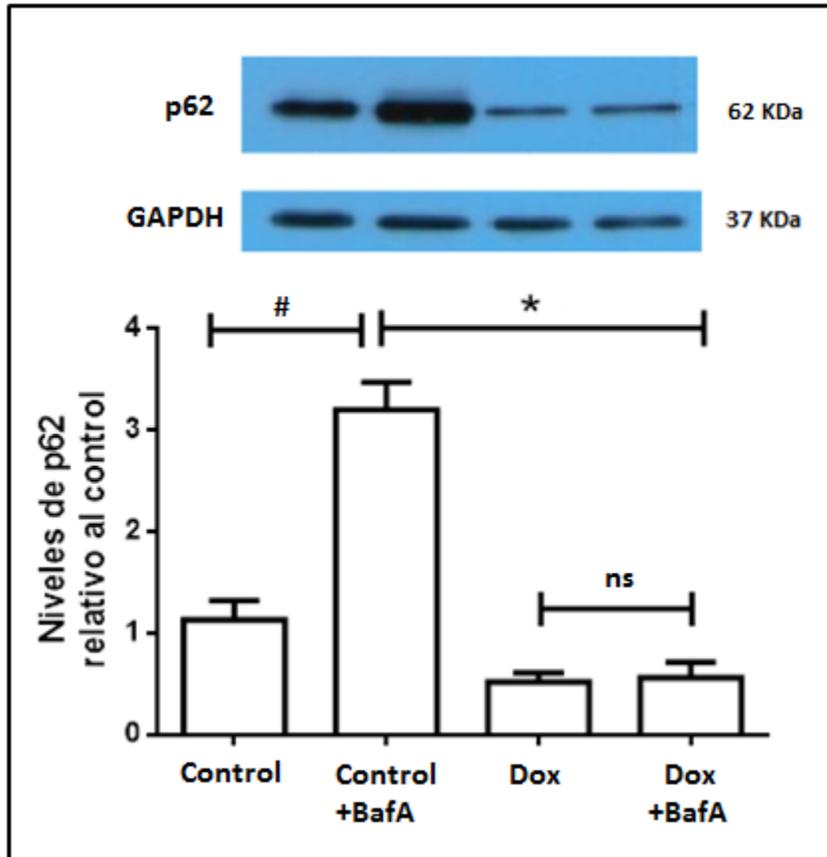


Figura 28. Efecto de doxorubicina sobre la acumulación de p62 en condiciones de flujo autofágico. Cardiomiocitos en cultivo se estimularon con doxorubicina 1 μ M por 24 h en presencia o no de Baf A 10 μ M. Los niveles de la proteína p62 y GAPDH se determinaron por western blot previa resolución por electroforesis SDS-PAGE en geles al 12 %. El gráfico muestra la cuantificación de los niveles de p62. Los datos se expresan como el promedio \pm SEM. La figura representa un n=4. Análisis estadístico por ANOVA, post test Tukey * p <0.05 respecto de Ctrl+BafA, # respecto del control y ns, no significativo.

6.2.2. Efecto de doxorubicina sobre la autofagia basal y su relación con la muerte celular

A pesar de las contradicciones que presenta la literatura respecto del efecto de doxorubicina sobre la autofagia, el punto de concordancia lo encontramos en que la alteración de este proceso ya sea inhibitorio o de inducción, tiene como consecuencia muerte celular. Para determinar en nuestro modelo si es la inhibición de la autofagia el estímulo que desencadena el proceso de muerte o el hecho de que aunque esté inhibida, la autofagia que aún se ejecuta es perjudicial, los cardiomiocitos se incubaron con dos diferentes inhibidores de la autofagia: 3-MA o Baf A, en incubación conjunta con doxorubicina por 24 h. Los resultados mostraron que al inhibir la autofagia, el porcentaje de muerte de cardiomiocitos aumentó en presencia de Doxorubicina (**Figuras 29 y 30**).

Otra estrategia para inhibir la autofagia fue utilizar un RNA interferente de la proteína Beclin 1. Como se observa en la **Figura 31**, el RNA interferente disminuyó los niveles proteicos de Beclin cerca de un 75%.

En presencia de doxorubicina, al inhibir este proceso, aumentó la muerte celular (**Figura 32**). Esto sugiere que la autofagia es un proceso importante para la supervivencia celular y su inhibición actuaría como un efecto tóxico sinérgico con doxorubicina sobre la célula cardíaca.

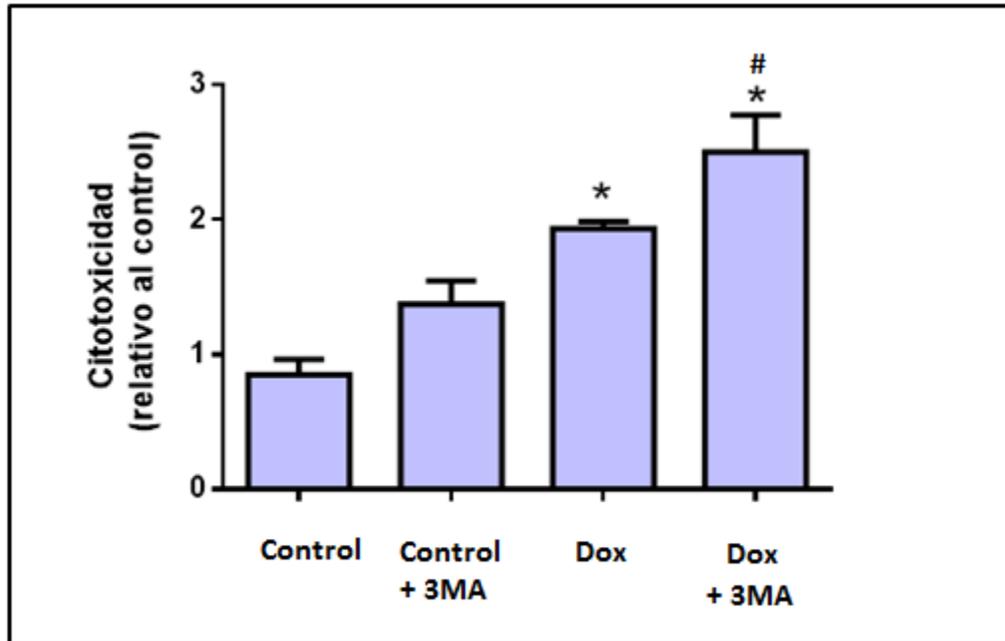


Figura 29. La inhibición de la autofagia por 3-metiladenina aumenta la citotoxicidad inducida por doxorrubicina en el cardiomiocito. Cultivos de cardiomiocitos en medio de mantención DMEM con 2 % de suero se estimularon con doxorrubicina 1 μ M en presencia de 3-MA 10 μ M. Después de 24 h se determinó la actividad de LDH en el sobrenadante y en las células adheridas. La actividad de LDH liberada se calculó como porcentaje de la actividad del sobrenadante sobre la total de LDH. Los resultados están expresados como el promedio \pm SEM. Cada determinación se realizó en triplicado. La figura representa un n=3 Análisis estadístico por ANOVA y post test Tukey. * p <0.05 respecto del control, # p <0.05 respecto de Doxorrubicina.

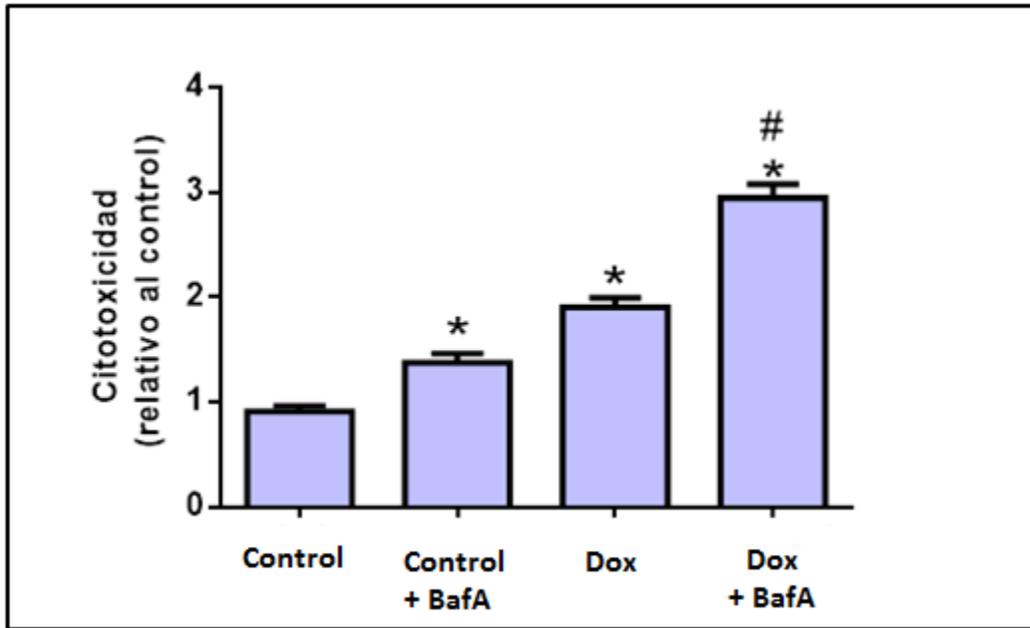


Figura 30. La inhibición de la autofagia por bafilomicina A aumenta la toxicidad de doxorubicina en cardiomiocitos. Cardiomiocitos en medio de mantención DMEM con 2 % de suero, se trataron con doxorubicina 1 μM en presencia bafilomicina A 10 μM . Después de 24 h se determinó la actividad de LDH en el sobrenadante y en las células adheridas. La actividad de LDH liberada se calculó como porcentaje de la actividad del sobrenadante sobre la total de LDH. Los resultados están expresados como el promedio \pm SEM. Cada determinación se realizó en triplicado. El gráfico representa un $n=6$. Análisis por ANOVA y post test Tukey * $p<0.05$ respecto del control. # $p<0.05$ respecto de Doxorubicina.

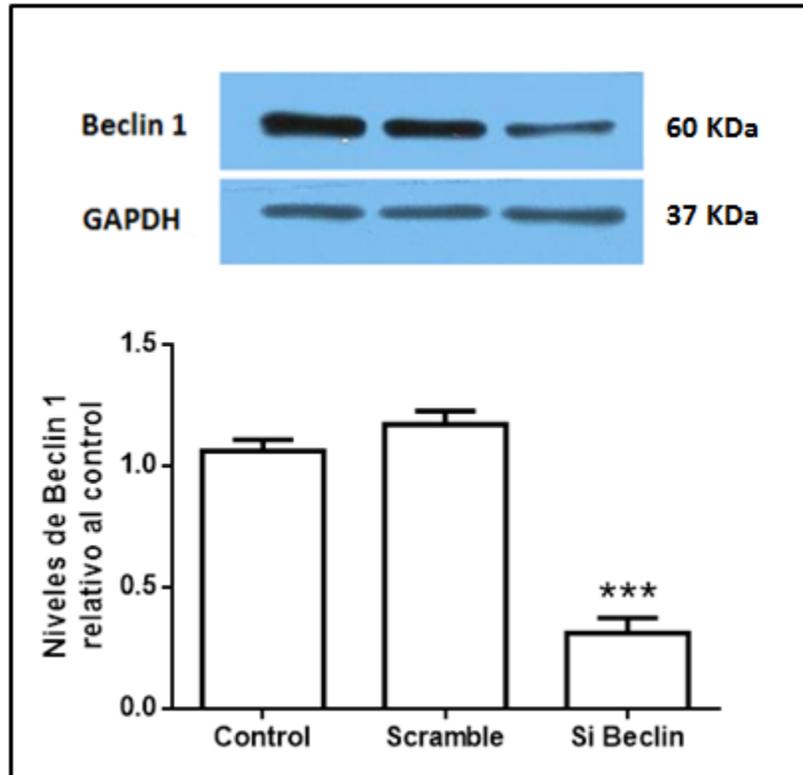


Figura 31. Disminución de los niveles de Beclin 1 con un siRNA específico. Cultivos de cardiomiocitos se transfectaron con un siRNA específico para la proteína Beclin1. Extractos proteicos obtenidos 48 h post transfección se resolvieron por SDS-PAGE y los niveles de Beclin 1 y GAPDH se detectaron por western blot utilizando anticuerpos específicos. Una secuencia scramble se utilizó como control de transfección. La figura corresponde al promedio de 4 experimentos independientes. Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM. ANOVA y post test Dunnett. *** $p < 0.0001$ respecto del control.

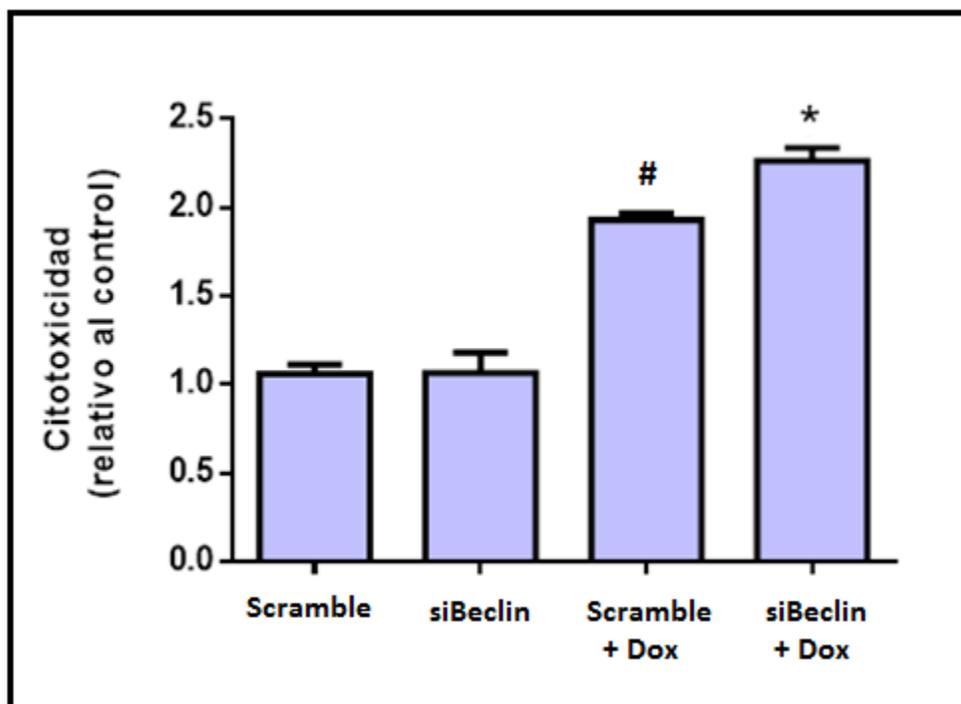


Figura 32. La inhibición de la autofagia por siBeclin aumenta la toxicidad de doxorrubicina en los cardiomiocitos. Cardiomiocitos se transfectaron con un siRNA específico para la proteína Beclin 1. Luego de 24 h de transfección se cambió a medio DMEM suplementado con 2 % FBS y se mantuvieron por 24 h. Luego se estimuló con doxorrubicina 1 μ M por 24 h. Se determinó la actividad de LDH como porcentaje de la actividad del sobrenadante sobre la total de LDH. Los resultados están expresados como el promedio \pm SEM. Cada determinación se realizó en triplicado. El gráfico representa un n=3. Análisis por ANOVA y post test Tukey. [#]p<0.0001 respecto a scramble, ^{*}p<0.05 respecto a scramble + Dox.

6.2.3. Efecto de la activación de la autofagia sobre la muerte del cardiomiocito provocada por doxorubicina

Dado que los resultados previos mostraron que la autofagia es importante para la sobrevivencia celular, ya que el efecto inhibitorio que produce doxorubicina, se relaciona con el aumento de la muerte de los cardiomiocitos, nuestra estrategia fue utilizar un activador de la autofagia y comprobar que este proceso es importante para prevenir la muerte celular.

Para ello utilizamos rapamicina (Rap) antibiótico de múltiples efectos, uno de los cuales es inhibir a la proteína mTOR, activando la autofagia (81). El resultado muestra que efectivamente al utilizar este activador de la autofagia, se previene la muerte celular en presencia de doxorubicina (Figura 33).

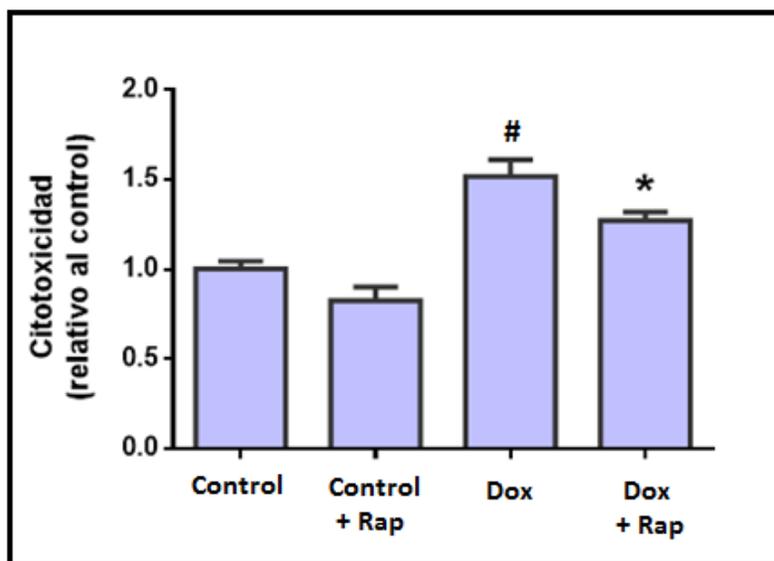


Figura 33. La activación de la autofagia por rapamicina disminuye la toxicidad de doxorubicina en cardiomiocitos. Cardiomiocitos en cultivo en medio de mantención DMEM con 2 % de suero, se expusieron a rapamicina 0,1 μ M por 2 h, previo al estímulo de doxorubicina 1 μ M y se mantuvieron en presencia de Rapamicina por todo el período de estimulación. Después de 24 h se determinó la actividad de LDH en el sobrenadante y en las células adheridas. La actividad de LDH liberada se calculó como porcentaje de la actividad del sobrenadante sobre la total de LDH. Los resultados están expresados como el promedio \pm SEM. Cada determinación se realizó en triplicado. El gráfico representa el promedio de 5 experimentos independientes. Análisis por ANOVA y post test Tukey. # p <0.0004 respecto del control, * p <0.05 respecto de Doxo.

6.3. Determinación la activación de la vía de señalización AKT-mTOR en cardiomiocitos expuestos a doxorrubicina

La autofagia es un proceso que se desarrolla en forma basal en todas las células y cobra mayor relevancia en aquellas en las cuales la tasa de proliferación es muy baja como son los cardiomiocitos. Una alteración de este proceso ya sea por incremento o por defecto, puede ser la causa que favorece la generación de una patología cardíaca. Este proceso es regulado por diferentes vías de señalización que convergen en el regulador maestro de la autofagia, mTOR.

En esta sección, se estudiaron los niveles de diferentes proteínas que intervienen en las distintas etapas del este proceso de autofagia: Beclin-1, AKT y mTOR a través de su proteína blanco de fosforilación, p70S6K.

6.3.1. Efecto de doxorrubicina sobre los niveles de beclin1 en cardiomiocitos

Una de las proteínas claves para que se lleve a cabo el proceso de autofagia es Beclin 1. Esta proteína se ha relacionado directamente con la formación del autofagosoma al formar parte del complejo de iniciación de la autofagia junto con la PI3K clase III (96, 97). Como se observa en la Figura 34, la exposición de los cardiomiocitos a doxorrubicina en el tiempo, hasta las 24 h, disminuyó los niveles de la proteína Beclin 1. Esto concuerda con el resultado de inhibición de la autofagia (Figura 26).

6.3.2. Efecto de doxorrubicina en la activación de la vía de señalización AKT/mTOR

La vía de señalización que involucra a la proteína AKT es una de las vías mejor caracterizada que regula la actividad de la proteína mTOR (130, 131). Toda vez que AKT se activa, una serie de eventos lleva finalmente a la activación de mTOR (132) regulando diferentes procesos celulares, uno de los cuales es la autofagia y en este caso particular su efecto es inhibitorio.

mTOR juega un rol crucial en la homeostasis celular, crecimiento y respuesta frente al estrés, promoviendo la síntesis de proteínas y el crecimiento celular. Uno de los sustratos de la activación de mTOR es la proteína p70S6K. mTOR fosforila y activa a esta proteína y con ello se activa el proceso de traducción para la síntesis de proteínas y el control del metabolismo.

En la Figura 35 se muestra la activación de la proteína AKT en el tiempo. El resultado indica que doxorrubicina produjo una potente activación de esta proteína a partir de las 18 h manteniendo el efecto incluso hasta las 24 h. Por otra parte, la activación de mTOR a través de la fosforilación de su sustrato p70S6K, se observa claramente en la Figura 36 que la estimulación de los cardiomiocitos con doxorrubicina, aumentó los niveles de la proteína fosforilada ya desde las 6h en adelante en forma significativa.

Por lo tanto, los resultados de la vía de señalización concuerdan con el efecto inhibitorio de la autofagia observado a través de la proteína LC3 producido por doxorrubicina a las 24 h de estimulación y esta inhibición de la autofagia estaría relacionada con el aumento en la muerte celular, observado al mismo tiempo de estimulación.

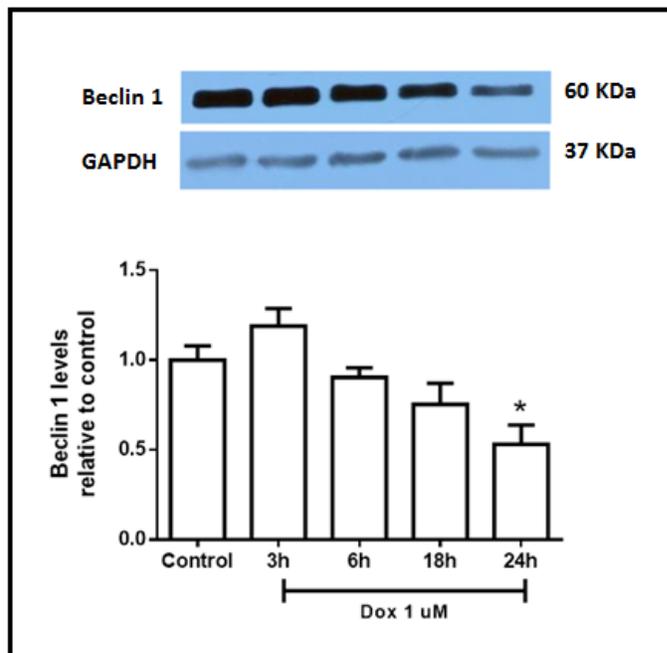


Figura 34. Disminución de los niveles de beclin1 inducido por el tratamiento con doxorrubicina en cardiomiocitos. Cultivos primarios de cardiomiocitos en medio de mantención DMEM con 2 % de FBS, se trataron con doxorrubicina 1 μ M en curso temporal. Se obtuvieron los extractos proteicos totales a los tiempos indicados y se resolvieron por electroforesis SDS-PAGE en geles al 12%. Los niveles de LC3-II y GAPDH se determinaron por western blot. El gráfico muestra la cuantificación de los niveles de LC3 total. Los datos se expresan como el promedio \pm SEM. La figura es representativa de 5 experimentos independientes. Análisis estadístico por ANOVA y post test Tukey. ** $p < 0.05$ respecto del control.

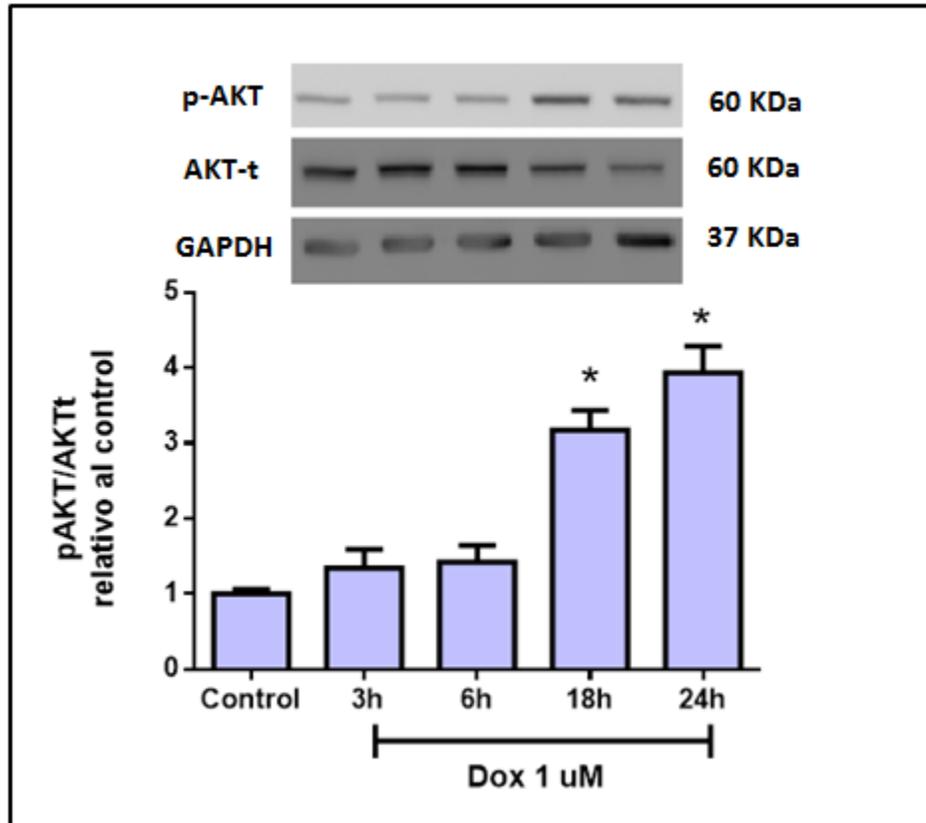


Figura 35. Efecto del tratamiento con doxorubicina sobre los niveles de AKT en cardiomiocitos. Cultivos primarios de cardiomiocitos en medio de mantención DMEM con 2% FBS, se trataron con doxorubicina 1 μ M en curso temporal. Se obtuvieron los extractos proteicos totales a los tiempos indicados y se resolvieron por electroforesis SDS-PAGE en geles al 12 %. Los niveles de AKT total, su forma fosforilada y GAPDH se determinaron por western blot. El gráfico muestra la cuantificación de la razón pAKT/AKT. Los datos se expresan como el promedio \pm SEM. La figura es representativa de 6 experimentos independientes. Análisis estadístico por ANOVA y post test Dunnett. **p<0.05 respecto del control.

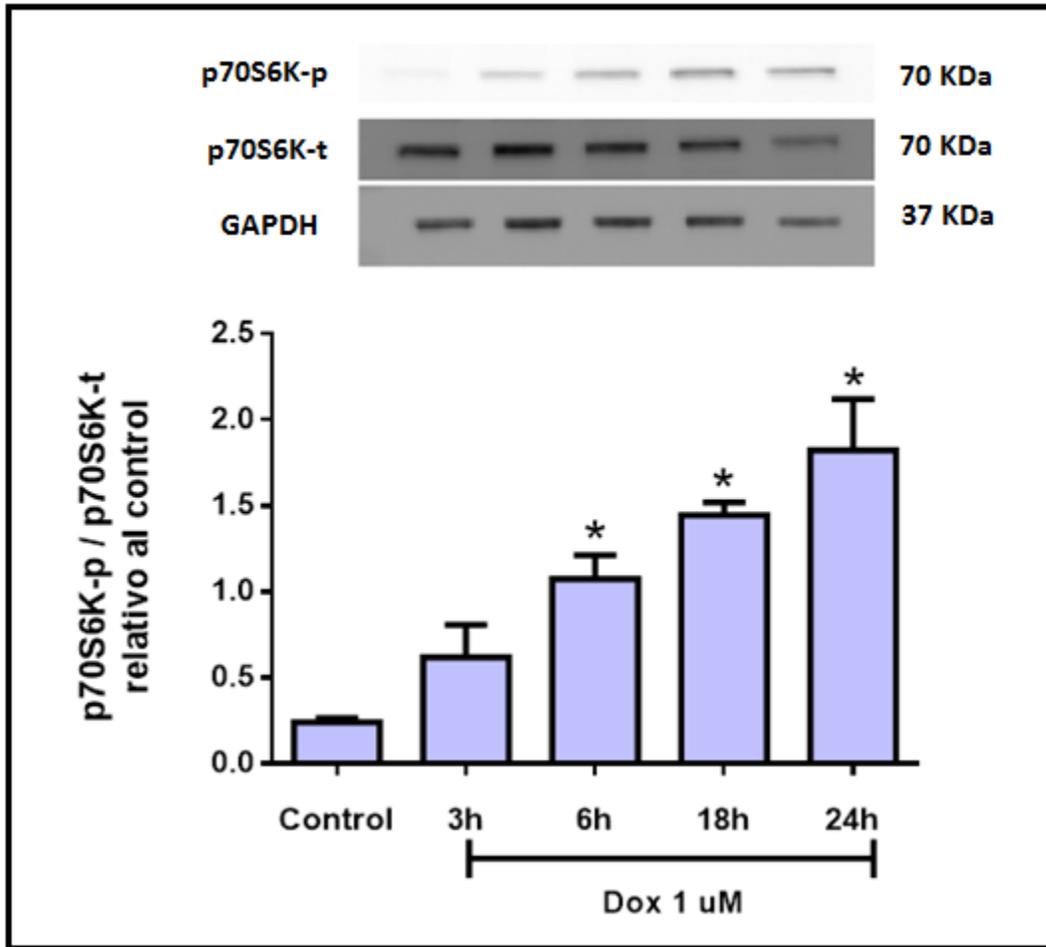


Figura 36. Efecto de doxorubicina sobre la actividad de mTOR en los cardiomiocitos. Cultivos primarios de cardiomiocitos en medio de mantención DMEM con 2% FBS, se trataron con doxorubicina 1 μ M. Se obtuvieron los extractos proteicos totales a los tiempos indicados y se resolvieron por electroforesis SDS-PAGE en geles al 12%. La activación de mTOR se determinó a través de la cuantificación de los niveles de p70S6K fosforilada. Los niveles de p70S6K total su forma fosforilada y GAPDH se determinaron por western blot. El gráfico muestra la cuantificación de la razón p70S6K-p/p70S6Kt. Los datos se expresan como el promedio \pm SEM. La figura es representativa de 3 experimentos independientes. Análisis estadístico por ANOVA y post test Dunnett. ** $p < 0.05$ respecto del control.

7. DISCUSIÓN

La cardio-oncología se refiere a la sub especialidad médica orientada al diagnóstico y tratamiento de las enfermedades cardíacas en pacientes con cáncer **(133, 134)**. Esta especialización se hace necesaria debido a que los agentes antineoplásicos son potencial o directamente cardiotóxicos y los pacientes pueden llegar a desarrollar cardiomiopatías e insuficiencia cardíaca **(134)**.

Esta asociación de disciplinas representa una nueva plataforma de investigación, debido a que los efectos tóxicos sobre el corazón que son causadas por las terapias para el tratamiento del cáncer, pueden revelar nuevas perspectivas sobre la biología de las enfermedades cardíacas **(135)**. Un ejemplo fue el uso de trastuzumab, anticuerpo monoclonal dirigido al receptor HER2 en el cáncer de mama **(135)**. Su uso predispuso a los pacientes a desarrollar cardiomiopatías. Los estudios preclínicos revelaron un papel importante de la señalización del receptor HER2 en la respuesta frente al estrés en los cardiomiocitos. Investigaciones posteriores sugirieron que la activación de la señalización de este receptor por su ligando correspondiente, Neuregulina, podría tener un potencial terapéutico en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca **(136)**.

Dentro de la farmacoterapia disponible para el tratamiento del cáncer, uno de los medicamentos con mayor efectividad es la doxorubicina. Ampliamente se ha descrito su mecanismo de acción como antineoplásico **(5)**, pero a pesar de su gran efectividad, su uso se encuentra limitado por la toxicidad que produce en el corazón. Este efecto adverso se presenta en diferentes temporalidades y con diferente sintomatología. Los efectos más agudos ocurren a los 2-3 días después de la administración y son abordables con una apropiada alternativa terapéutica. Sin embargo, el efecto crónico puede desarrollarse incluso 10-15 años posterior al término de la quimioterapia. La probabilidad de desarrollarla es principalmente dosis-dependiente **(137)**, pero también puede ocurrir a bajas dosis debido a una mayor susceptibilidad individual **(138)** y generar desde una cardiomiopatía dilatada hasta una insuficiencia cardíaca en alrededor del 20 % de los casos **(10)**. El mayor impacto de este efecto crónico se produce en los pacientes pediátricos que han sobrevivido al cáncer.

El corazón está formado por varios tipos celulares, uno de los más importantes son los cardiomiocitos. Estas células, terminalmente diferenciadas, cesan de proliferar poco después del nacimiento y son las unidades contráctiles funcionales del corazón. Esta

restricción del cardiomiocito para proliferar, hace a este órgano muy vulnerable a diferentes situaciones de estrés **(139)**.

A pesar de la amplia investigación, el mecanismo por el cual doxorubicina produce la cardiotoxicidad, aún no se ha aclarado completamente y sugiere, que la alteración de diferentes procesos intracelulares llevaría a la muerte de los cardiomiocitos. La exposición repetida a este medicamento produciría una disminución progresiva de estas células **(140)** llegando a un punto en el cual, la capacidad de adaptación del órgano ya no es capaz de mantener la funcionalidad, generando una insuficiencia cardíaca **(140)**. Debido a que no hay un tratamiento específico para la cardiomiopatía relacionada a la terapia antineoplásica, los pacientes reciben el tratamiento estándar para la Insuficiencia cardíaca congestiva **(141, 142)**.

Los mecanismos descritos por los cuales doxorubicina produce cardiotoxicidad son la formación de ROS, produciendo estrés oxidativo y alteraciones a nivel mitocondrial **(4)**. El tejido cardíaco es muy vulnerable frente a este tipo de estímulos nocivos. Esto se debe a su elevado metabolismo oxidativo y a su escasa defensa antioxidante **(143)**. Sin embargo, el uso de terapias antioxidantes para prevenir el efecto tóxico no ha mostrado efectividad en la práctica clínica **(144)**.

La literatura ha sido prolífica en informar diferentes alteraciones en los procesos celulares a causa de doxorubicina y ante la imposibilidad de abordar todos en su conjunto, lo cual daría una extraordinaria visión del efecto de doxorubicina en el cardiomiocito, nuestro trabajo se centró en el efecto que produce sobre uno de los procesos básicos para mantener la homeostasis, sobre todo en este tipo celular, como es la autofagia basal.

El objetivo de esta tesis fue investigar el efecto de doxorubicina sobre la autofagia basal en cardiomiocitos de rata neonata y su relación con la muerte celular.

7.1. Doxorubicina y muerte celular

Una de las discrepancias en la literatura respecto de los efectos de doxorubicina, es el uso de diferentes concentraciones y tiempo de exposición en los diferentes modelos de estudio. Esto reviste especial cuidado cuando se estudian modelos in vitro, debido a que hay estructuras intracelulares que son capaces de acumular el fármaco **(145)**. Varios estudios han mostrado que doxorubicina es selectivamente almacenada en el núcleo **(146-148)**, en donde ejerce su efecto sobre el DNA. Se ha descrito además que doxorubicina se acumula en la mitocondria llegando a concentraciones mucho más

elevadas de las que se encuentran en el plasma **(149)**. Esto es importante considerar dependiendo del modelo de estudio ya que la literatura sugiere que para cultivo de cardiomiocitos la concentración de doxorubicina no debería exceder de 1 μM **(150)**.

La terapia con antraciclínicos tiene por efecto secundario la muerte de los cardiomiocitos. La evidencia de estudios tanto in vitro como en modelos animales es que: apoptosis y necrosis pueden ocurrir concomitante y ambos tipos de muerte tener un rol en la cardiotoxicidad inducida por doxorubicina **(151)**. Los resultados que muestran las Figuras 16 y 17 deja en claro que doxorubicina 1 μM produce muerte por necrosis a las 24 h. Por otra parte, 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. El efecto de doxorubicina sobre la disminución en los niveles de ATP se sabe que se produce por:

- ❖ El daño en el DNA genera un estrés genotóxico que causa la activación de la enzima PARP-1. En el intento por repararlo se produce un gran gasto de ATP, llegando a una insuficiencia energética irreversible que resulta en muerte celular. Cuando esto sucede, la muerte celular exhibe características de muerte por necrosis **(9)**.
- ❖ Se ha mostrado que doxorubicina también produce daño en el DNA mitocondrial, ruptura de la membrana, disfunción mitocondrial y una reducción de ATP, lo cual también contribuye a la necrosis **(152, 26)**.

Nuestros resultados muestran que doxorubicina redujo en un 50 % el contenido de ATP de los cardiomiocitos, lo que concuerda con el tipo de muerte anteriormente observada (Figura 18).

Al caracterizar la muerte que se produce en nuestro modelo, la estimulación de cardiomiocitos con doxorubicina 1 μM por 24 h produjo, además de muerte por necrosis, muerte celular por apoptosis, con un claro aumento en la fragmentación de procaspasa 3. A partir de las 3 h los niveles de caspasa 3 aumentan y se mantienen elevados hasta las 18 h, para después disminuir como se observa en la Figura 19.

7.2. Doxorubicina y autofagia

En condiciones normales o de estrés leve, la autofagia basal degrada y recicla componentes de citoplasmáticos, tales como proteínas de vida media larga y organelos envejecidos, como mecanismo protector para mantener la homeostasis celular **(153)**.

Debido a que las mitocondrias dañadas liberan factores pro-apoptóticos, como Cit c **(154)**, la autofagia puede prevenir la activación de la apoptosis **(155, 156)**.

Cuando se habla de la relación entre doxorubicina y autofagia, la literatura no entrega información concluyente. Lu y col, 2009 fueron los primeros que mostraron que doxorubicina activa la autofagia y con ello promueve la muerte celular. Sin embargo, su modelo contempla una privación de nutrientes de 24 h previo al estímulo con doxorubicina. La privación de nutrientes es uno de los estímulos más potentes para inducir autofagia **(157)**. Cuatro estudios posteriores describen que doxorubicina estimula la autofagia: Kobayashi 2010, Chen 2011, Xu 2012 y Dimitrakis 2012 **(158, 121-123)**. A diferencia de nuestro modelo, tres de ellos mantienen el tiempo de estimulación hasta las 18 h (Kobayashi 2010, Chen 2011 y Xu 2012), "todos pertenecientes al mismo grupo de investigación" **(121-123)** y el último emplea un modelo de cardiomiocitos adultos (Dimitrakis 2012) **(124)**. Por el contrario, los dos estudios que informaron una inhibición de la autofagia por Doxorubicina (Kawaguchi 2012; Sishi 2013) **(125, 126)** utilizaron como modelo de estudio cardiomiocitos de ratón y la línea celular H9C2, respectivamente. Este último además utilizó una concentración mayor de doxorubicina (3 uM). Por lo tanto, se hace difícil comparar nuestros resultados con los datos aportados por la literatura.

Para evaluar la autofagia, se analizaron los niveles proteicos de LC3-II y p62 como marcadores de autofagia. Nuestros resultados indican que en cardiomiocitos de rata neonata, doxorubicina produce una inhibición de la autofagia, lo que se muestra por la disminución en los niveles tanto de LC3-II, como en los niveles totales de la proteína LC3 (Figuras 20 y 21). Sin embargo, la disminución en los niveles de p62 a las 24 h, no concuerda con la inhibición de la autofagia, ya que los resultados muestran que esta proteína se está degradando (Figura 22). Al analizar los resultados obtenidos en condición de flujo autofágico, es decir en presencia de Baf A, el inhibidor de la fusión autofagosoma-lisosoma, encontramos que los niveles de LC3-II no aumentaron. El resultado muestra que el proceso de autofagia se encuentra inhibido y de acuerdo a las condiciones en que se realizó el experimento, es la autofagia basal la que se encuentra inhibida por efecto de doxorubicina (Figuras 26 y 27). Por el contrario, al analizar el resultado de los niveles de la proteína p62, encontramos que a pesar de estar en presencia de Baf A, se sigue degradando, por lo que contradice el efecto encontrado sobre LC3 (Figura 28). En la literatura se ha informado que p62 también es capaz de entregar proteínas ubiquitinadas al proteosoma para su degradación y se considera un punto de intersección entre las dos principales vías de degradación (autofagia y proteosoma) **(159)** y que podría explicar los

menores niveles proteicos encontrados en presencia de Baf A, aunque claramente esto requiere de mayor investigación.

7.3. Doxorubicina, autofagia y muerte celular

Al analizar como afecta la inhibición de la autofagia por doxorubicina la viabilidad celular, encontramos en la literatura las mismas controversias descritas para la autofagia. Para los estudios que encontraron que doxorubicina activa la autofagia, inhibirla va en relación directa con proteger al cardiomiocito de la muerte celular **(122)**, mientras que en aquellos en los cuales doxorubicina inhibió la autofagia, utilizar un inductor de este proceso previene la muerte del cardiomiocito **(126)**.

7.3.1. Efecto de 3-metiladenina sobre la muerte celular inducida por doxorubicina

3-metiladenina, wortmanina y LY294002 son inhibidores de la enzima PI3K, por lo tanto inhibidores de la autofagia **(160-162)**. Aunque todos ellos inhiben a PI3K clase I y clase III en forma indiscriminada **(163, 164)**, se conocen porque suprime la autofagia al impedir la formación de PIP3 por PI3K clase III **(165)**, lo cual es esencial en las etapas iniciales de la formación de la vesícula **(166, 167)**.

En nuestro modelo, 3-MA claramente aumentó la muerte en presencia de doxorubicina (Figura 29) en contraposición a lo encontrado por Chen y *col*, el cual mostró que al utilizar 3-MA protegía al cardiomiocito de la muerte por doxorubicina **(123)**. Sin embargo, el uso de 3-MA puede no ser específico en la inhibición de la autofagia, debido a su posible efecto sobre PI3K- clase I. Este efecto podría alterar una de las vías clásicas relacionada con sobrevivencia: PI3K-ATK **(168)**.

7.3.2. Efecto de bafilomicina sobre la muerte celular inducida por doxorubicina

Baf A es otra estrategia utilizada para inhibir la autofagia. Baf A es un antibiótico macrólido que inhibe la H(+)-ATPasa vacuolar e inhibe la acidificación de lisosomas y endosomas **(169)**. Una vez formado el autofagosoma, en la etapa final del proceso, la vacuola de doble membrana se une al lisosoma para la degradación del contenido vesicular. Es precisamente en este punto donde se puede inhibir la autofagia con Baf A, ya que altera la actividad de las enzimas proteolíticas contenidas al interior del lisosoma. El resultado de inhibir la autofagia con Baf A en presencia de doxorubicina que muestra la figura 30, claramente aumenta el efecto tóxico del antraciclínico aumentando el porcentaje de muerte. El punto discordante será siempre el hecho de que si la literatura muestra que doxorubicina activa autofagia, cualquier estrategia para inhibirla producirá

un efecto protector de la muerte celular. Sin embargo, nuestros resultados concuerdan con los de Sishi y col., a pesar de las diferencias en los modelos de estudio.

7.3.3. Efecto de siBeclin sobre la muerte celular inducida por doxorubicina

Los resultados anteriores mostraron que inhibir la autofagia va en relación directa con un aumento en muerte celular. Sin embargo, el tratamiento por sí mismo aumentó la muerte, por lo cual utilizamos otra técnica para inhibir la autofagia, disminuir los niveles de Beclin mediante un RNA interferente. Beclin-1 es una de las proteínas indispensable para la activación de la autofagia al ser parte del complejo PI3K-III encargado de la nucleación de la membrana pre-autofagosomal y el reclutamiento de distintas proteínas necesarias para el desarrollo de la autofagia (**170, 171**). El resultado mostró que la transfección no alteró la viabilidad celular y que al igual que en los resultados anteriores, inhibir la autofagia la muerte celular aumenta (Figura 32).

Por lo tanto, todos estos resultados indican que la autofagia es un mecanismo importante que emplea la célula para sobrevivir frente a la exposición de doxorubicina.

7.3.4. Efecto de rapamicina sobre la muerte celular inducida por doxorubicina

Rapamicina es el clásico inductor de autofagia a través de su capacidad de inhibir a mTOR (**81**). Debido a esta inhibición, están bien documentados los efectos en la reducción del crecimiento de varios tipos de cáncer (**172, 173**) y en la inhibición de la hipertrofia ventricular izquierda in vivo (**174, 175**). Por lo tanto, se pensó en su potencial efecto protector frente a la exposición de doxorubicina sobre los cardiomiocitos. Los resultados anteriores mostraron que doxorubicina inhibe la autofagia y que ésta, es importante para la sobrevivencia celular. Por lo tanto, el uso de Rap como inductor de la autofagia surgió como alternativa para activar la autofagia y disminuir la muerte del cardiomiocito. El resultado del tratamiento con Rap efectivamente permitió disminuir la muerte, como muestra la Figura 33. En el artículo de Sishi y col (**126**), el uso de Rap en co-tratamiento con doxorubicina inhibió la actividad de caspasa e impidió la muerte evidenciada como actividad mitocondrial a través del ensayo MTT, apoyando nuestros hallazgos.

7.4. Efecto de doxorubicina en la activación de la vía de señalización AKT-mTOR que regula la autofagia en el cardiomiocito

Los resultados anteriormente expuestos mostraron que doxorubicina inhibe el proceso de autofagia en cardiomiocitos y ello contribuye a la muerte celular como un

mecanismo que permitiría explicar la cardiotoxicidad asociada a este medicamento. La vía de la PI3K/AKT es la vía de señalización que se utiliza para explicar la inducción o inhibición de la autofagia. Por lo tanto, nuestro estudio se enfocó en evaluar específicamente esta vía para relacionar el efecto de doxorubicina sobre este proceso. En el estudio de Chen *y col* mostraron que doxorubicina activa autofagia. Sin embargo, encontraron que doxorubicina marcadamente aumentó la actividad de AKT y mTOR, lo que se observó por el aumento en los niveles de AKT y p70S6K en su forma fosforilada, entre otras proteínas **(122)**. A pesar de mostrar que la vía AKT-mTOR está activa, vía clásica de inhibición de la autofagia, no discuten ese hallazgo, pero concuerda con nuestros resultados (Figuras 35 y 36). En el trabajo de Gratia *y col*, en el cual desarrollaron un modelo in vivo de toxicidad aguda y crónica por doxorubicina, encontraron que doxorubicina produjo la activación de AKT y mTOR **(175)**. Esta activación de AKT se produciría por una proteína quinasa dependiente de DNA (DNA-PK). Esta quinasa se activa cuando se produce un daño genotóxico, es decir, cuando el DNA sufren ruptura de su estructura de doble hebra, un efecto típico de doxorubicina **(176, 177)**. El efecto de doxorubicina sobre la activación de AKT es tan controversial como el efecto sobre la autofagia. El artículo de Chatterjee *y col* **(10)** expone que doxorubicina inhibe las vías de PI3K/AKT y ERK. En el trabajo de Xiang *y col* con un modelo de rata adulta **(178)** encontró que los niveles de AKT fosforilada disminuyeron hasta un 19 % por efecto de la estimulación de doxorubicina. La revisión de la literatura relaciona la activación de AKT como una estrategia para la supervivencia celular, previniendo la muerte por apoptosis. Sin embargo, encontramos que una activación de AKT sostenida en el tiempo puede producir efectos deletéreos. En el artículo de Sun *y col* encontraron que una señalización de AKT sostenida en respuesta a una sobreexpresión de myrAKT llevó a muerte embrionaria, edema y malformaciones vasculares **(179)**. En el trabajo de Nagoshi *y col* también mostraron que la activación crónica de AKT llevó a una respuesta maladaptativa en respuesta al daño por isquemia-reperfusión **(180)**. Estos efectos deletéreos producto de la activación crónica de AKT sustentan el hecho de que doxorubicina al activar AKT e inhibir la autofagia, contribuye a la muerte celular.

En el trabajo de Gratia *y col*, encontraron que en ambos modelos, la quinasa mTOR se encontró activa lo que observaron a través del aumento en los niveles de p70S6K fosforilada **(175)**. En el estudio de Kawagushi *y col* observaron indirectamente la actividad de mTOR a través de la quinasa ULK1. En su modelo de estudio mostraron que los niveles de fosforilación de ULK1 estaban aumentados en condición de privación de

nutrientes y que la actividad de fue significativamente reducida por la presencia de doxorubicina **(125)**. En relación a los trabajos que mostraron que doxorubicina indujo autofagia, en el trabajo de Chen y *col* y en el trabajo de Xu y *col*, observaron una activación de mTOR a través de la fosforilación de su efector p70S6K y aunque no concuerda con sus resultados, apoya los encontrados por nuestro trabajo.

7.5. Efecto de doxorubicina sobre la actividad del lisosoma

Clásicamente el estudio de la autofagia se enfocó en aclarar la formación del autofagosoma y las vías de señalización que regulan todo este proceso. En cambio, la última etapa, la degradación y la función del lisosoma en autofagia, es un aspecto mucho menos estudiado **(181)**.

El lisosoma es punto final de la vía endocítica y es el principal organelo encargado de la digestión de componentes celulares. Su principal característica es el pH ácido que mantiene su lumen, el cual contiene más de 50 hidrolasas, entre ellas: proteasas, peptidasas, fosfatasas, nucleasas, glicosidasas, sulfatasas y lipasas. Este ambiente ácido se mantiene gracias a que en la membrana lisosomal se encuentra la V-ATPasa, la cual ingresa H⁺ al interior acidificando el medio **(182, 183)**.

Recientemente los avances para entender la participación del lisosoma en autofagia se han enfocado en: la biogénesis lisosomal mediada por el factor de transcripción TFEB, la autofagia de lisosomas dañados (lisofagia) y la identificación de las proteínas SNARE las cuales participan en la fusión del autofagosoma con el lisosoma **(181)**. Sin embargo, el estudio de Dan y *col*, sugirió que doxorubicina bloquea el flujo autofágico debido a una alteración a nivel del lisosoma. La disminución de la acidez luminal, elevando el pH de 4,6 a 5,2, afectaría la actividad de las enzimas lisosomales y con ello la degradación del contenido de la vacuola autofágica **(184)**. Esto constituye una nueva arista de investigación para entender y esclarecer el mecanismo de generación de la cardiotoxicidad por doxorubicina.

8. CONCLUSIONES

Doxorrubicina produjo la muerte de los cardiomiocitos, a través de los procesos de apoptosis y necrosis. La muerte por apoptosis comenzó a ser evidente a partir de la 3 h de estímulo, mientras que la necrosis se observó mayoritariamente a las 24 h. Además produjo un importante compromiso en la funcionalidad de la mitocondria, lo que se observó por la disminución en los niveles de ATP.

Doxorrubicina inhibió la autofagia basal dado que produjo una disminución en los niveles de LC3-II, incluso en condición de flujo autofágico (presencia de bafilomicina A). Sin embargo, no hubo una correlación de p62 con LC3 debido a que p62 continuó degradándose incluso en presencia de bafilomicina A.

Al inhibir la autofagia con tres estrategias distintas: 3-metiladenina, bafilomicina A y un siRNA Beclin 1, se observó que el porcentaje de muerte aumentó. Por otra parte, al utilizar rapamicina como inductor de la autofagia, los niveles de muerte disminuyeron, lo cual permite concluir que la autofagia basal es un proceso importante para la supervivencia celular cuando se expone a doxorrubicina.

Doxorrubicina disminuyó los niveles de la proteína Beclin 1; esto es consistente con la menor formación de vacuolas autofágicas.

La inhibición de la autofagia basal por doxorrubicina quedó respaldada por la activación de AKT y mTOR, vía clásica de inhibición de este proceso. La estimulación con doxorrubicina aumentó significativamente los niveles de AKT fosforilada y de p70S6K fosforilada.

Todos estos resultados permiten postular que doxorrubicina produce la inhibición de la autofagia basal y que éste sería uno de los mecanismos que contribuyen a la muerte de los cardiomiocitos en la generación de la cardiotoxicidad por antraciclínicos.

9. BIBLIOGRAFIA

1. MINISTERIO DE SALUD. PRIMER INFORME DE REGISTROS POBLACIONALES DE CÁNCER EN CHILE. QUINQUENIO 2003-2007. AÑO 2012.
2. BONADONNA G, MONFARDINI S, DE LENA M, FOSSATI-BELLANI F. CLINICAL EVALUATION OF ADRIAMYCIN, A NEW ANTITUMOUR ANTIBIOTIC. *BR MED J* 1969; 3(5669):503–506.
3. CARVALHO C, SANTOS RX, CARDOSO S, CORREIA S, OLIVEIRA PJ, SANTOS MS, MOREIRA PI. DOXORRUBICIN: THE GOOD, THE BAD AND THE UGLY EFFECT. *CURR MED CHEM* 2009; 16 (25):3267–3285.
4. HORTOBAGYI GN. ANTHRACYCLINES IN THE TREATMENT OF CANCER. AN OVERVIEW. *DRUGS* 1997; 54 (SUPPL4):1–7.
5. GEWIRTZ D. A CRITICAL EVALUATION OF THE MECHANISMS OF ACTION PROPOSED FOR THE ANTITUMORAL EFFECTS OF THE ANTHRACYCLINE ANTIBIOTICS ADRIAMYCIN AND DAUNORUBICIN. *BIOCHEM PHARMACOL* 1999; 57: 727-741
6. SINGAL PK, ILISKOVICN. DOXORRUBICIN-INDUCED CARDIOMYOPATHY. *N ENGL J MED* 1998; 339(13): 900–905.
7. LIPSHULTZ SE, ALVAREZ JA, SCULLY RE: ANTHRACYCLINE ASSOCIATED CARDIOTOXICITY IN SURVIVORS OF CHILDHOOD CANCER. *HEART* 2008; 94:525–533.
8. SHAN K, LINCOFF AM, YOUNG JB: ANTHRACYCLINE-INDUCED CARDIOTOXICITY. *ANN INTERN MED* 1996; 125:47–58.
9. MINOTTI G., MENNA P., SALVATORELLI E., Y COL. ANTHRACYCLINES: MOLECULAR ADVANCES AND PHARMACOLOGIC DEVELOPMENTS IN ANTITUMOR ACTIVITY AND CARDIOTOXICITY. *PHARMACOL REV.* 2004; 56: 185-229
10. CHATTERJEE K., JIANQUING ZHANG., Y COL. DOXORRUBICIN CARDIOMYOPATHY. *CARDIOLOGY*.2010; 115(2):155-162
11. FERREIRA ALA., MATSUBARA LS., MATSUBARA BB. ANTHRACYCLINE INDUCE CARDIOTOXICITY. *CARDIOV & HEMATOL. AGENTS IN MEDIC CHEM.* 2008; 6:278-281
12. HIDEG K., KÁLAI T. NOVEL ANTIOXIDANTS IN ANTHRACYCLINE CARDIOTOXICITY. *CARDIOVASC TOXICOL.* 2007; 7: 160-164
13. MILIC V, DRAGOJEVIC V. DOXORRUBICIN INDUCED OXIDATIVE INJURY OF CARDIOMYOCYTE. DO WE HAVE RIGHT STRATEGIES FOR PREVENTION? CARDIOTOXICITY OF ONCOLOGIC TREATMENT. 2012 CHAPTER 5 89-130 [HTTP:// WWW.INTECHOPEN.COM](http://www.intechopen.com)

14. ABOU EL, HASSAN M, HEIJIN M. Y COL. THE PROTECTIVE EFFECT OF CARDIAC GENE TRANSFER OF CUZn-SOD IN COMPARISON WITH THE CARDIOPROTECTOR MONOHYDROXYETHYL RUTOSIDE AGAINST DOXORUBICIN-INDUCED CARDIOTOXICITY IN CULTURED CELLS. *CANCER GENE THER* 2003; 10(4):270-277
15. CHARRON F, NEMER M: GATA TRANSCRIPTION FACTORS AND CARDIAC DEVELOPMENT. *SEMIN CELL DEV BIOL* 1999; 10: 85-91.
16. CHARRON F, PARADIS P, BRONCHAIN O, Y COL: COOPERATIVE INTERACTION BETWEEN GATA-4 AND GATA-6 REGULATES MYOCARDIAL GENE EXPRESSION. *MOL CELL BIOL* 1999; 19: 4355-4365.
17. CHEN, S., GARAMI, M., & GARDNER, D. G. DOXORUBICIN SELECTIVELY INHIBITS BRAIN VERSUS ATRIAL NATRIURETIC PEPTIDE GENE EXPRESSION IN CULTURED NEONATAL RAT MYOCYTES. *HYPERTENSION* 1999; 34(6): 1223–1231.
18. SAADANE, N., ALPERT, L., & CHALIFOUR, L. E. TAFII250, EGR-1, AND D-TYPE CYCLIN EXPRESSION IN MICE AND NEONATAL RAT CARDIOMYOCYTES TREATED WITH DOXORUBICIN. *THE AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY* 1999; 276(3 Pt 2): H803–H814.
19. GRILLOT DA, GONZÁLEZ-GARCÍA M, EKHTERAEE D, Y COL: GENOMIC ORGANIZATION, PROMOTER REGION ANALYSIS, AND CHROMOSOME LOCALIZATION OF THE MOUSE BCL-X GENE. *J IMMUNOL* 1997; 158:4750-4757.
20. ROWAN RA, MASEK MA, BILLINGHAM ME: ULTRASTRUCTURAL MORPHOMETRIC ANALYSIS OF ENDOMYOCARDIAL BIOPSIES. IDIOPATHIC DILATED CARDIOMYOPATHY, ANTHRACYCLINE CARDIOTOXICITY, AND NORMAL MYOCARDIUM. *AM J CARDIOVASC PATHOL* 1988; 2: 137-144.
21. MORTENSEN SA, OLSEN HS, BAANDRUP U: CHRONIC ANTHRACYCLINE CARDIOTOXICITY: HAEMODYNAMIC AND HISTOPATHOLOGICAL MANIFESTATIONS SUGGESTING A RESTRICTIVE ENDOMYOCARDIAL DISEASE. *BR HEART J* 1986; 55: 274-282.
22. WANG SM, GREASER ML, SCHULTZ E, Y COL: STUDIES ON CARDIAC MYOFIBRILLOGENESIS WITH ANTIBODIES TO TITIN, ACTIN, TROPOMYOSIN, AND MYOSIN. *J CELL BIOL* 1988; 107: 1075-1083
23. HELMES M, LIM CC, LIAO R, Y COL: TITIN DETERMINES THE FRANK- STARLING RELATION IN EARLY DIASTOLE. *J GEN PHYSIOL* 2003; 121: 97-110.

24. TAEGTMEYER H. ENERGY METABOLISM OF THE HEART: FROM BASIC CONCEPTS TO CLINICAL APPLICATIONS. *CURR PROBL CARDIOL*. 1994; 19:59-113
25. NEELY J, MARGAN H. RELATIONSHIP BETWEEN CARBOHYDRATE AND LIPID METABOLISM AND THE ENERGY BALANCE OF HEART MUSCLE. *ANNU REV PHYSIOL*. 1974; 36:413-459
26. ZHOU S, STARKOV A, FROBERG MK, LEINO RL, WALLACE KB CUMULATIVE AND IRREVERSIBLE CARDIAC MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION INDUCED BY DOXORRUBICIN. *CANCER RES* 2001; 61(2):771-777
27. ASHLEY N, POULTON J MITOCHONDRIAL DNA IS A DIRECT TARGET OF ANTI-CANCER ANTHRACYCLINE DRUGS. *BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN* 2009; 378(3):450-455
28. MAJNO G, JORIS I. APOPTOSIS, ONCOSIS, AND NECROSIS. AN OVERVIEW OF CELL DEATH. *AM J PATHOL* 1995; 146:3-15.
29. KERR JF, WYLLIE AH, CURRIE AR. APOPTOSIS: A BASIC BIOLOGICAL PHENOMENON WITH WIDE-RANGING IMPLICATIONS IN TISSUE KINETICS. *BR J CANCER* 1972; 26:239-257.
30. GALVEZ A, MORALES MP, ELTIT JM, OCARANZA P, CARRASCO L, CAMPOS X, SAPAG-HAGAR M, DÍAZ-ARAYA G, LAVANDERO S. A RAPID AND STRONG APOPTOTIC PROCESS IS TRIGGERED BY HIPEROSMOTIC STRESS IN CULTURED RAT CARDIAC MYOCYTES. *CELL TISSUE RES* 2001; 304; 279-285.
31. BISHOPRIC NH, ANDREKA P, SLEPAK T, WEBSTER KA. MOLECULAR MECHANISMS OF APOPTOSIS IN THE CARDIAC MYOCYTE. *CURR OPIN PHARMACOL* 2001; 1:141-150.
32. HENGARTNER MO. THE BIOCHEMISTRY OF APOPTOSIS. *NATURE* 2000; 407:770-776.
33. DENECKER G, VERCAMMEN D, DECLERCQ W, VANDENABEELE P. APOPTOTIC AND NECROTIC CELL DEATH INDUCED BY DEATH DOMAIN RECEPTORS. *CELL MOL LIFE SCI* 2001; 58:356-370.
34. BRATTON SB, COHEN GM. APOPTOTIC DEATH SENSOR: AN ORGANELLE'S ALTER EGO? *TRENDS PHARMACOL SCI* 2001; 22:306-315.
35. FAVALORO B, ALLOCATTI N, GRAZIANO V, DI ILIO C, DE LAURENZI V. ROL OF APOPTOSIS IN DISEASE. *AGING*. 2012; 4(5): 330-349
36. GOLSTEIN P, KROEMER G. CELL DEATH BY NECROSIS: TOWARS TO MOLECULAR DEFINITION. *TRENDS BIOCHEMICAL SCI* 2006; 32: 37-43

37. KROEMER, G. Y COL. CLASSIFICATION OF CELL DEATH: RECOMMENDATIONS OF THE NOMENCLATURE COMMITTEE ON CELL DEATH. *CELL DEATH DIFFER.* 2005; 12: 1463–1467
38. EDINGER, A.L. AND THOMPSON, C.B. DEATH BY DESIGN: APOPTOSIS, NECROSIS AND AUTOPHAGY. *CURR. OPIN. CELL BIOL.* 2004; 16: 663–669
39. FESTJENS, N. Y COL. NECROSIS, A WELL-ORCHESTRATED FORM OF CELL DEMISE: SIGNALLING CASCADES, IMPORTANT MEDIATORS AND CONCOMITANT IMMUNE RESPONSE. *BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA* 2006; 1757: 1371–1387
40. MIZUSHIMA N. AUTOPHAGY: PROCESS AND FUNCTION. *GENES AND DEVELOP.* 2007; 21: 2861–2873
41. MIZUSHIMA, N. & KLIONSKY, D. J. PROTEIN TURNOVER VIA AUTOPHAGY: IMPLICATIONS FOR METABOLISM. *ANNU REV NUTR* 2007; 27: 19–40.
42. ARÁNGUIZ, P. Y COL. AUTOFAGIA DEL CARDIOMIOCITO: ¿UN NUEVO MECANISMO DE ADAPTACIÓN AL ESTRÉS O DE MUERTE CELULAR? *REVISTA CHILENA DE CARDIOLOGIA* 2006; 25: 331–338.
43. CUERVO, A. M. AUTOPHAGY: MANY PATHS TO THE SAME END. *MOL AND CELL BIOCHEM* 2004; 263: 55–72
44. MAJESKI, A. E. & DICE, J. F. MECHANISMS OF CHAPERONE-MEDIATED AUTOPHAGY. *THE INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOCHEMISTRY & CELL BIOLOGY* 2004; 36: 2435–44
45. KLIONSKY DJ, EMR SD. AUTOPHAGY AS A REGULATED PATHWAY OF CELLULAR DEGRADATION. *SCIENCE* 2000; 290: 1717-21.
46. 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.
47. LAMB C, YOSHIMORI T, TOOZE SH. THE AUTOPHAGOSOME: ORIGINS UNKNOWN, BIOGÉNESIS COMPLEX. *NAT REV MOL CELL BIOL* 2013; 14: 759-774.
48. CHAN E, LONGATTI A, MCKNIGHT N C, TOOZE SH. KINASE INACTIVATED ULK PROTEINS INHIBIT AUTOPHAGY VIA THEIR CONSERVED C-TERMINAL DOMAIN USING AN ATG13-INDEPENDENT MECHANISM. *MOL CELL BIOL.* 2009; 29: 157-171
49. RAGUSA M J, STANLEY R E, HURLEY J H. ARCHITECTURE OF THE ATG17 COMPLEX AS A SCAFFOLD FOR AUTOPHAGOSOME BIOGÉNESIS. *CELL* 2012; 151: 1501-1512

50. CONGCONG H, KLIONSKY D. REGULATION MECHANISMS AND SIGNALING PATHWAYS OF AUTOPHAGY. ANNU REV GENET 2009; 43: 67-93
51. SUZUKI K, KIRISAKO T, KAMADA Y, MIZUSHIMA N, NODA T, OHSUMI Y. THE PRE-AUTOPHAGOSOMAL STRUCTURE ORGANIZED BY CONCERTED FUNCTIONS OF APG GENES IS ESSENTIAL FOR AUTOPHAGOSOME FORMATION. EMBO J 2001; 20: 5971–5981
52. SUZUKI K, KUBOTA Y, SEKITO T, OHSUMI Y. HIERARCHY OF ATG PROTEINS IN PRE-AUTOPHAGOSOMAL STRUCTURE ORGANIZATION. GENES CELLS 2007; 12: 209–218
53. RUSSELL, R. C. ET AL. ULK1 INDUCES AUTOPHAGY BY PHOSPHORYLATING BECLIN-1 AND ACTIVATING VPS34 LIPID KINASE. NATURE CELL BIOL. 2013; 15: 741–750
54. GENG J, KLIONSKY DJ. THE ATG8 AND ATG12 UBIQUITIN-LIKE CONJUGATION SYSTEMS IN MACROAUTOPHAGY. PROTEIN MODIFICATIONS: BEYOND THE USUAL SUSPECTS. EMBO REP. 2008; 9(9):859-64
55. HANADA T, NODA NN, SATOMI Y, ICHIMURA Y, FUJIOKA Y, TAKAO T, INAGAKI F, OHUSMI Y. THE ATG12–ATG5 CONJUGATE HAS A NOVEL E3-LIKE ACTIVITY FOR PROTEIN LIPIDATION IN AUTOPHAGY. J BIOL CHEM 2007; 282: 37298–37302
56. KUMA A, MIZUSHIMA N, ISHIHARA N, OHSUMI Y. FORMATION OF THE APPROXIMATELY 350 KDA APG12–APG5•APG16 MULTIMERIC COMPLEX, MEDIATED BY APG16 OLIGOMERIZATION, IS ESSENTIAL FOR AUTOPHAGY IN YEAST. J BIOL CHEM 2002; 277: 18619–18625
57. MIZUSHIMA N, NODA T, OHSUMI Y. APG16P IS REQUIRED FOR THE FUNCTION OF THE APG12P–APG5P CONJUGATE IN THE YEAST AUTOPHAGY PATHWAY. EMBO J 1999; 18: 3888–3896
58. MIZUSHIMA N, YOSHIMORI T, OHSUMI Y. THE ROL OF ATG PROTEINS IN AUTOPHAGOSOME FORMATION. ANNU REV CELL BIOL 2011; 27: 107-132
59. 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
60. DING W, MANLEY S, NI H. THE EMEGING ROL OF AUTOPHAGY IN ALCOHOLIC LIVER DISEASE. EXP BIOL AND MED 2011; 236: 536-556
61. WEIDBERG H, SHVETS, ELAZAR Z. BIOGENESIS AND CARGO SELECTIVITY OF AUTOPHAGOSOMES. ANNU REV BIOCHEM 2011; 80: 125-156.

62. BJORKOY G, LAMARK T, BRECH A, OUTZEN H, PERANDER M, ET AL. P62/SQSTM1 FORMS PROTEIN AGGREGATES DEGRADED BY AUTOPHAGY AND HAS A PROTECTIVE EFFECT ON HUNTINGTON-INDUCED CELL DEATH. *J. CELL BIOL.* 2005; 171: 603–614
63. MOSCAT J, DIAZ-MECO MT, WOOTEN MW. SIGNAL INTEGRATION AND DIVERSIFICATION THROUGH THE P62 SCAFFOLD PROTEIN. *TRENDS BIOCHEM. SCI.* 2007; 32: 95–100
64. SHVETS E, FASS E, SCHERZ-SHOVAL R, ELAZAR Z. THE N-TERMINUS AND PHE52 RESIDUE OF LC3 RECRUIT P62/SQSTM1 INTO AUTOPHAGOSOMES. *J. CELL SCI.* 2008; 121: 2685–2695
65. ICHIMURA Y, KUMANOMIDOU T, SOU YS, MIZUSHIMA T, EZAKI J, ET AL. STRUCTURAL BASIS FOR SORTING MECHANISM OF P62 IN SELECTIVE AUTOPHAGY. *J. BIOL. CHEM.* 2008; 283: 22847–22857
66. PANKIV S, CLAUSEN TH, LAMARK T, BRECH A, BRUUN JA, ET AL. P62/SQSTM1 BINDS DIRECTLY TO ATG8/LC3 TO FACILITATE DEGRADATION OF UBIQUITINATED PROTEIN AGGREGATES BY AUTOPHAGY. *J. BIOL. CHEM.* 2007; 282: 24131–24145
67. KATSURAGI Y, ICHIMURA Y, KOMATZU M. P62/SQSTM1 FUNCTIONS AS A HUB AND AN AUTOPHAGY ADAPTOR. *FEBS J* 2015; 282: 4672-4678
68. TOOZE, J., HOLLINSHEAD, M., LUDWIG, T., HOWELL, K., HOFACK, B., KERN, H. IN EXOCRINE PANCREAS, THE BASOLATERAL ENDOCYTIC PATHWAY CONVERGES WITH THE AUTOPHAGIC PATHWAY IMMEDIATELY AFTER THE EARLY ENDOSOME. *J. CELL BIOL.* 1990; 111: 329–345.
69. MIZUSHIMA, N. THE PLEIOTROPIC ROLE OF AUTOPHAGY: FROM PROTEIN METABOLISM TO BACTERICIDE. *CELL DEATH DIFFER.* 2005; 12 (SUPPL. 2): 1535–1541.
70. BOYA, P., GONZALEZ-POLO, R.A., CASARES, N., PERFETTINI, J.L., DESSEN, P., LAROCLETTE, N., METIVIER, D., MELEY, D., SOUQUERE, S., YOSHIMORI, T., Y COL. INHIBITION OF MACROAUTOPHAGY TRIGGERS APOPTOSIS. *MOL. CELL. BIOL.* 2005; 25: 1025–1040.
71. MITA, M.M.; MITA, A.; ROWINSKY, E.K. THE MOLECULAR TARGET OF RAPAMYCIN (MTOR) AS A THERAPEUTIC TARGET AGAINST CANCER. *CANCER BIOL. THER.* 2003; 2 (SUPPL. 1): S169-S177.
72. GUERTIN, D.A.; SABATINI, D.M. DEFINING THE ROLE OF MTOR IN CANCER. *CANCER CELL* 2007; 12: 9-22.
73. MENENDEZ-BENITO, V.; NEEFJES, J. AUTOPHAGY IN MHC CLASS II PRESENTATION: SAMPLING FROM WITHIN. *IMMUNITY* 2007; 26: 1-3.

74. SRIDHARAN S, JAIN K, BASU A. REGULATION OF AUTOPHAGY BY KINASES. *CANCER* 2011; 3: 2630-2654
75. HARA K, YONEZAWA K, WENG QP, KOZLOWSKY MT, BELHAM C, AVUCH J. AMINO ACID SUFFICIENCY AND mTOR REGULATE p70 S6 KINASE AND EIF-4E BP1 THROUGH A COMMON EFFECTOR MECHANISM. *J BIOL CHEM* 1998; 273: 14484-14494
76. OPPLIGER, P. JENOE, AND M. N. HALL. TWO TOR COMPLEXES, ONLY ONE OF WHICH IS RAPAMYCIN SENSITIVE, HAVE DISTINCT ROLES IN CELL GROWTH CONTROL. *MOL. CELL* 2002; 10:457-468.
77. WULLSCHLEGER, S., R. LOEWITH, AND M. N. HALL. TOR SIGNALING IN GROWTH AND METABOLISM. *CELL* 2006; 124:471-484.
78. JACINTO E, LOEWITH R, SCHMIDT A, LIN S, RÜEGG MA, HALL A, HALL MN. MAMMALIAN TOR COMPLEX 2 CONTROLS THE ACTIN CYTOSKELETON AND IS RAPAMYCIN INSENSITIVE. *NAT CELL BIOL.* 2004; 6(11):1122-8.
79. KIM, D.H.; SARBASSOV, D.D.; ALI, S.M.; KING, J.E.; LATEK, R.R.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; TEMPST, P.; SABATINI, D.M. mTOR INTERACTS WITH RAPTOR TO FORM A NUTRIENT-SENSITIVE COMPLEX THAT SIGNALS TO THE CELL GROWTH MACHINERY. *CELL* 2002; 110: 163-175.
80. SARBASSOV, D.D.; ALI, S.M.; KIM, D.H.; GUERTIN, D.A.; LATEK, R.R.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; TEMPST, P.; SABATINI, D.M. RICTOR, A NOVEL BINDING PARTNER OF mTOR, DEFINES A RAPAMYCIN-INSENSITIVE AND RAPTOR-INDEPENDENT PATHWAY THAT REGULATES THE CYTOSKELETON. *CURR. BIOL.* 2004; 14: 1296-1302.
81. BALLOU LM, LIN RZ. RAPAMYCIN AND mTOR KINASE INHIBITORS. *J CHEM BIOL.* 2008; 1(1-4):27-36.
82. LOEWITH, R., E. JACINTO, S. WULLSCHLEGER, A. LORBERG, J. L. CRESPO, D. BONENFANT, W. OPPLIGER, P. JENOE, AND M. N. HALL. TWO TOR COMPLEXES, ONLY ONE OF WHICH IS RAPAMYCIN SENSITIVE, HAVE DISTINCT ROLES IN CELL GROWTH CONTROL. *MOL. CELL* 2002; 10:457-468.
83. PEARCE LR, HUANG X, BOUDEAU J, PAWŁOWSKI R, WULLSCHLEGER S, DEAK M, IBRAHIM AF, GOURLAY R, MAGNUSON MA, ALESSI DR. IDENTIFICATION OF PROTOR AS A NOVEL RICTOR-BINDING COMPONENT OF mTOR COMPLEX-2. *BIOCHEM J.* 2007; 405(3):513-22.
84. JUNG C H, RO SH, CAO J, OTTO N M, KIM D H. mTOR REGULATION OF AUTOPHAGY. *FEBS LETTERS* 2010; 584: 1287-1295

85. KIM J, KUNDU M, VIOLLET B, GUAN K-L. AMPK AND MTOR REGULATE AUTOPHAGY THROUGH DIRECT PHOSPHORYLATION OF ULK1. NAT CELL BIOL 2011; 13:132- 41
86. CHAN EY, LONGATTI A, MCKNIGHT NC, TOOZE SA. KINASE-INACTIVATED ULK PROTEINS INHIBIT AUTOPHAGY VIA THEIR CONSERVED C-TERMINAL DOMAINS USING AN ATG13-INDEPENDENT MECHANISM. MOL. CELL BIOL. 2009; 29: 157–171
87. JUNG CH, JUN CB, RO SH, KIM YM, OTTO NM, ET AL. U.K.ATG13-FIP200 COMPLEXES MEDIATE MTOR SIGNALING TO THE AUTOPHAGY MACHINERY. MOL. BIOL. CELL 2009; 20: 1992–2003
88. HOSOKAWA N, HARA T, KAIZUKA T, KISHI C, TAKAMURA A, ET AL. 2009. NUTRIENT-DEPENDENT MTORC1ASSOCIATION WITH THE ULK1-ATG13-FIP200 COMPLEX REQUIRED FOR AUTOPHAGY. MOL. BIOL. CELL 2009; 20: 1981–91
89. GANLEY IG, LAMDH, WANG J, DING X, CHEN S, JIANG X. 2009. ULK1-ATG13-FIP200 COMPLEXMEDIATES MTOR SIGNALING AND IS ESSENTIAL FOR AUTOPHAGY. J. BIOL. CHEM. 2009; 284: 12297–305
90. CANTLEY LC. THE PHOSPHOINOSITIDE-3-KINASE PATHWAY. SCIENCE 2002; 5: 1030-1033
91. LAWLOR MA, ALESS DR. PKB/AKT: A KEY MEDIATOR OF CELL PROLIFERATION, SURVIVAL AND INSULIN RESPONSE? J CELL SCI 2001; 114: 2903-2910
92. PETIOT A, OGIER-DENIS E, BLOMMAART 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.
93. PATTINGRE, S. Y COL. BCL-2 ANTIAPOPTOTIC PROTEINS INHIBIT BECLIN 1-DEPENDENT AUTOPHAGY. CELL 2005; 122, 927–39
94. MAIURI, M. C. Y COL. FUNCTIONAL AND PHYSICAL INTERACTION BETWEEN BCL-X(L) AND A BH3-LIKE DOMAIN IN BECLIN-1. THE EMBO JOURNAL 2007; 26: 2527–39
95. OBERSTEIN, A., Y COL. CRYSTAL STRUCTURE OF THE BCL-XL-BECLIN 1 PEPTIDE COMPLEX: BECLIN 1 IS A NOVEL BH3-ONLY PROTEIN. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 2007; 282: 13123–32
96. KANG, R. Y COL. THE BECLIN 1 NETWORK REGULATES AUTOPHAGY AND APOPTOSIS. CELL DEATH AND DIFFERENTIATION 2011; 18: 571–580
97. SINHA, S. & LEVINE, B. THE AUTOPHAGY EFFECTOR BECLIN 1: A NOVEL BH3-ONLY PROTEIN. ONCOGENE 2008; 27: 1–21
98. KONGARA S, KARANTZA V. THE INTERPLAY BETWEEN AUTOPHAGY AND ROS IN TUMORIGENESIS. FRONT ONCOL 2012; 2: 1-13

99. MIHAYLOVA MM, SHAW RJ. THE AMPK SIGNALLING PATHWAY COORDINATES CELL GROWTH, AUTOPHAGY AND METABOLISM. *NAT. CELL BIOL.* 2011; 13:1016–1023.
100. HARDIE DG, ET AL. AMPK: A NUTRIENT AND ENERGY SENSOR THAT MAINTAINS ENERGY HOMEOSTASIS. *NAT. REV. MOL. CELL BIOL.* 2012; 13:251–262.
101. KUBLI D, GUSTAFSSON A. ADAPTING TO METABOLIC CHANGES THROUGH AUTOPHAGY. *TRENDS ENDOCRINOL METAB.* 2014; 25(3): 156–164.
102. HE C, ET AL. DISSOCIATION OF BCL-2-BECLIN1 COMPLEX BY ACTIVATED AMPK ENHANCES CARDIAC AUTOPHAGY AND PROTECTS AGAINST CARDIOMYOCYTE APOPTOSIS IN DIABETES. *DIABETES.* 2013; 62:1270–1281.
103. MAMMUCARI C, ET AL. FOXO3 CONTROLS AUTOPHAGY IN SKELETAL MUSCLE IN VIVO. *CELL METAB.* 2007; 6:458–471.
104. SENGUPTA A, ET AL. FOXO TRANSCRIPTION FACTORS PROMOTE AUTOPHAGY IN CARDIOMYOCYTES. *J BIOL CHEM.* 2009; 284:28319–28331.
105. EGAN DF, ET AL. PHOSPHORYLATION OF ULK1 (HATG1) BY AMP-ACTIVATED PROTEIN KINASE CONNECTS ENERGY SENSING TO MITOPHAGY. *SCIENCE.* 2011; 331:456–461.
106. KIM J, ET AL. AMPK AND MTOR REGULATE AUTOPHAGY THROUGH DIRECT PHOSPHORYLATION OF ULK1. *NAT. CELL BIOL.* 2011; 13:132–141.
107. INOKI K, ET AL. TSC2 MEDIATES CELLULAR ENERGY RESPONSE TO CONTROL CELL GROWTH AND SURVIVAL. *CELL.* 2003; 115:577–590.
108. KIM J, ET AL. DIFFERENTIAL REGULATION OF DISTINCT VPS34 COMPLEXES BY AMPK IN NUTRIENT STRESS AND AUTOPHAGY. *CELL.* 2013; 152:290–303.
109. S. KOSTIN, L. POOL, A. ELSASSER, S. HEIN, H.C. DREXLER, E. RNAON, Y. HAYAKAWA, R. ZIMMERMANN, E. BAUER, W.P. KLOVEKORN, J. SCHAPER, MYOCYTES DIE BY MULTIPLE MECHANISMS IN FAILING HUMAN HEARTS, *CIRC. RES.* 2003; 92: 715–724.
110. M.W. KNAAPEN, M.J. DAVIES, B.M. DE, A.J. HAVEN, W. MARTINET, M.M. KOCKX, APOPTOTIC VERSUS AUTOPHAGIC CELL DEATH IN HEART FAILURE, *CARDIOVASC. RES.* 2001; 51: 304–312.
111. L. YAN, D.E. VATNER, S.J. KIM, H. GE, M. MASUREKAR, W.H. MASSEVER, G. YANG, Y. MATSUI, J. SADOSHIMA, S.F. VATNER, AUTOPHAGY IN CHRONICALLY ISCHEMIC MYOCARDIUM, *PROC. NATL. ACAD. SCI. U. S. A.* 2005; 102: 13807–13812.
112. A. ELSASSER, A.M. VOGT, H. NEF, S. KOSTIN, H. MOLLMANN, W. SKWARA, C. BODE, C. HAMM, J. SCHAPER, HUMAN HIBERNATING MYOCARDIUM IS JEOPARDIZED BY APOPTOTIC AND AUTOPHAGIC CELL DEATH, *J. AM. COLL. CARDIOL.* 2004; 43: 2191–2199.

113. M. SAIJO, G. TAKEMURA, M. KODA, H. OKADA, S. MIYATA, Y. OHNO, M. KAWASAKI, K. TSUCHIYA, K. NISHIGAKI, S. MINATOGUCHI, K. GOTO, H. FUJIWARA, CARDIOMYOPATHY WITH PROMINENT AUTOPHAGIC DEGENERATION, ACCOMPANIED BY AN ELEVATED PLASMA BRAIN NATRIURETIC PEPTIDE LEVEL DESPITE THE LACK OF OVERT HEART FAILURE, *INTERN. MED.* 2004; 43: 700–703.
114. H. SHIMOMURA, F. TERASAKI, T. HAYASHI, Y. KITaura, T. ISOMURA, H. SUMA, AUTOPHAGIC DEGENERATION AS A POSSIBLE MECHANISM OF MYOCARDIAL CELL DEATH IN DILATED CARDIOMYOPATHY, *JPN. CIRC. J.* 2001; 65: 965–968.
115. FONCEA R, ANDERSSON M, KETTERMAN A, BLAKESLEY V, SAPAG-HAGAR M, SUGDEN PH Y COL. INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-I RAPIDLY ACTIVATES MULTIPLE SIGNAL TRANSDUCTION PATHWAYS IN CULTURED RAT CARDIAC MYOCYTES. *J BIOL CHEM* 1997; 272: 19115–19124
116. BRADFORD MM. A RAPID AND SENSITIVE METHOD FOR THE QUANTITATION OF MICROGRAM QUANTITIES OF PROTEIN UTILIZING THE PRINCIPLE OF PROTEIN-DYE BINDING. *ANAL BIOCHEM* 1976; 72:248-254.
117. JIANG P, MIZUSHIMA N. LC3- AND P62-BASED BICHEMICAL METHODS FOR THE ANALYSIS OF AUTOPHAGY PROGRESSION IN MAMMALIAN CELLS. *METHODS* 2015; 75: 13-18
118. UNVERFERTH DV, MAGORIEN RD, UNVERFRETH BP, TALLEY RL, BALCERZAK SP, BABA N. HUMAN MYOCARDIAL MORPHOLOGIC AND FUNCTIONAL CHANGES IN THE FIRST 24 HOURS AFTER DOXORRUBICINAORUBICIN ADMINISTRATION *CANCER TREAT REP* 1981; 65(11-12):1093-7
119. SAWYER D B, FUKAZAWA R, ARSTALL M A, KELLY R A. DAUNORUBICIN-INDUCED APOPTOSIS IN RAT CARDIAC MYOCYTES IS INHIBITED BY DEXRAZOZANE. *CIRC RES.* 1999; 84: 257-265.
120. LU L, WU W, YAN J, LI X, YU H, YU X. ADRIAMYCIN-INDUCED AUTOPHAGIC CARDIOMYOCYTE DEATH PLAYS A PATHOGENIC ROLE IN A RAT MODEL OF HEART FAILURE. *INT J CARDIOL* 2009;134: 82–90.
121. KOBAYASHI S, VOLDEN P, TIMM D, MAO K, XU X, LIANG Q. TRANSCRIPTION FACTOR GATA4 INHIBITS DOXORRUBICINAORUBICIN-INDUCED AUTOPHAGY AND CARDIOMYOCYTE DEATH. *J BIOL CHEM*, 2010; 285: 793-804
122. CHEN K, XU X, KOBAYASHI S, TIMM D, JEPPEPERSON D, LIANG Q. CALORIC RESTRICTION MIMETIC 2-DEOXYGLUCOSE ANTAGONIZES DOXORRUBICINAORUBICIN-INDUCED CARDIOMYOCYTE DEATH BY MULTIPLE MECHANISMS *J BIOL CHEM*, 2011; 286: 21993–22006

123. XU X, CHEN K, KOBAYASHI S, TIMM D, LIANG Q. RESVERATROL ATTENUATES DOXORRUBICINAORUBICIN-INDUCED CARDIOMYOCYTE DEATH VIA INHIBITION OF P70 S6 KINASE 1-MEDIATED AUTOPHAGY J PHARMACOL EXP THER, 2012; 341: 183–195
124. DIMITRAKIS P, ROMAY-OGANDO MI, TIMOLATI F, SUTER T. M, ZUPPINGER C. EFFECTS OF DOXORRUBICINAORUBICIN CANCER THERAPY ON AUTOPHAGY AND THE UBIQUITIN-PROTEASOME SYSTEM IN LONG-TERM CULTURED ADULT RAT CARDIOMYOCYTES CELL TISSUE RES, 2012; 350: 361–372
125. KAWAGUCHI T, TAKEMURA G, KANAMORI H, TAKEYAMA T, WATANABE T, MORISHITA K, Y COL. PRIOR STARVATION MITIGATES ACUTE DOXORRUBICINAORUBICIN CARDIOTOXICITY THROUGH RESTORATION OF AUTOPHAGY IN AFFECTED CARDIOMYOCYTES CARDIOVASC RES, 2012; 96: 456–465
126. SISHI B J, LOOS B, VAN ROOYEN J, ENGELBRECHT A M. AUTOPHAGY UPREGULATION PROMOTES SURVIVAL AND ATTENUATES DOXORRUBICINAORUBICIN-INDUCED CARDIOTOXICITY BIOCHEM PHARMACOL 2013; 85: 124–134
127. MOSCAT J, DIAZ-MECO MT P62 AT THE CROSSROADS OF AUTOPHAGY, APOPTOSIS, AND CANCER. CELL. 2009; 137(6):1001-4
128. JOHANSEN T, LAMARK T SELECTIVE AUTOPHAGY MEDIATED BY AUTOPHAGIC ADAPTER PROTEINS. AUTOPHAGY. 2011; 7(3):279-96.
129. MIZISHIMA N, YOSHIMORI T. HOW TO INTERPRET LC3 IMMUNOBLOTTING. AUTOPHAGY 2007; 3(6):542-545
130. TAKEUCHI H, KONDO Y, FUJIWARA K, KANZAWA T, AOKI H, MILLS GB, KONDO S. SYNERGISTIC AUGMENTATION OF RAPAMYCIN-INDUCED AUTOPHAGY IN MALIGNANT GLIOMA CELLS BY PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-KINASE/PROTEIN KINASE B INHIBITORS. CANCER RES. 2005; 65(8):3336-46.
131. SHEN W, BROWN NS, FINN PF, DICE JF, FRANCH HA. AKT AND MAMMALIAN TARGET OF RAPAMYCIN REGULATE SEPARATE SYSTEMS OF PROTEOLYSIS IN RENAL TUBULAR CELLS. J AM SOC NEPHROL. 2006; 17(9): 2414-23.
132. DIBBLE CC1, CANTLEY LC. REGULATION OF MTORC1 BY PI3K SIGNALING. TRENDS CELL BIOL. 2015; 25(9):545-55
133. YEH E ONCO CARDIOLOGY: THE TIME HAS COME. ONCO-CARDIOLOGY 2011; 38(3): 246-247
134. HONG R, IIMURA T, SUMISA K, EAGEN R. CARDIO-ONCOLOGY/ ONCO-CARDIOLOGY. CLIN CARDIOL 2010; 33(2): 733-737

135. MOSLEHI J, CHENG S. CARDIO-ONCOLOGY: IT TAKES TWO TO TRANSLATE. WWW.SCIENCETRANSLATIONALMEDICINE.ORG 2013; 5 FS 20
136. COTE G M, SAWYER D B, CHABNERB A, ERBB2 INHIBITION AND HEART FAILURE. N. ENGL. J. MED. 2012; 367: 2150–2153
137. LIPSHULTZ SE, LIPSITZ SR, MONESM, GOORIN AM, SALLAN SE, SANDERS SP, Y COL. FEMALE SEX AND DRUG DOSE AS RISK FACTORS FOR LATE CARDIOTOXIC EFFECTS OF DOXORRUBICIN THERAPY FOR CHILDHOOD CANCER. N ENGL J MED 1995; 332:1738–43.
138. JAIN D. CARDIOTOXICITY OF DOXORRUBICINAORUBICIN AND OTHER ANTHRACYCLINE DERIVATIVES. J NUCL CARDIOL 2000; 7:53–62.
139. CHIEN KR, KNOWLTON KU, ZHU H, CHIEN S. REGULATION OF CARDIAC GENE EXPRESSION DURING MYOCARDIAL GROWTH AND HYPERTROPHY: MOLECULAR STUDIES OF AN ADAPTIVE PHYSIOLOGIC RESPONSE. FASES J. 1991; 5:3037-3046
140. ZHANG V., SHI J., LI Y., WEI L. CARDIOMYOCYTE DEATH IN DOXORRUBICINAORUBICIN INDUCED CARDIOTOXICITY. ARCH IMMUNOL THER EXP. 2009; 57(6): 435-445
141. SIMBRE IV, ADAMS MJ, DESHPANDE SS, DUFFY SA, MILLER TL, LIPSHULTZ SE. CARDIOMYOPATHY CAUSED BY ANTINEOPLASTIC THERAPIES. CURR TREAT OPTIONS CARDIOVASC MED 2001; 3: 493–505
142. TALLAJ JA, FRANCO V, RAYBURN BK, PINDERSKI L, BENZA RL, PAMBOUKIAN S, Y COL. RESPONSE OF DOXORRUBICINAORUBICIN-INDUCED CARDIOMYOPATHY TO THE CURRENT MANAGEMENT STRATEGY OF HEART FAILURE. J HEART LUNG TRANSPLANT 2005; 24: 2196–201.
143. TAKEMURA G, FUGIWARA H. DOXORRUBICINAORUBICIN INDUCES CARDIOMYIOPATHY: FROM THE CARDIOTOXIC MECHANISMS TO MANAGEMENT. PROG CARDIOVASC DIS 2007; 49:330-352
144. LADAS EJ, JACOBSON JS, KENNEDY DD, TEEL K, FLEISCHAUER A, KELLY KM. ANTIOXIDANTS AND CANCER THERAPY: A SYSTEMATIC REVIEW. J CLIN ONCOL 2004; 22:517–28.
145. NICOLAY K, FOK JJ, VOORHOUT W, POST JA, DE KRUIJFF B. CYTOFLUORESCENCE DETECTION OF ADRIAMYCIN-MITOCHONDRIA INTERACTIONS IN ISOLATED, PERFUSED RAT HEART. BIOCHIM BIOPHYS ACTA 1986; 887:35–41.
146. MARAFINO BJ, GIRI SN, SIEGEL DM. PHARMACOKINETICS, COVALENT BINDING AND SUBCELLULAR DISTRIBUTION OF [3H] DOXORRUBICIN AFTER INTRAVENOUS ADMINISTRATION IN THE MOUSE. J PHARMACOL THER 1981; 216: 55-61

147. AMIN AM, LOWE MC, ISMAIL AA. CYTOFLUORESCENCE LOCALIZATION OF ADRIAMYCIN-BINDING SITES OF CARDIAC TISSUE. *ONCOLOGY* 1983; 40: 340-343
148. DESSYPRIS EN, BRENNER DE, BAER MR, HANDE KR UPTAKE AND INTRACELLULAR DISTRIBUTION OF DOXORRUBICINAORUBICIN METABOLITES IN B-LYMPHOCYTES OF CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA. *CANCER RES* 1988; 48: 503-506
149. SOKOLOVE PM. INTERACTIONS OF ADRIAMYCIN AGLYCONES WITH MITOCHONDRIA MAY MEDIATE ADRIAMYCIN CARDIOTOXICITY. *INT J BIOCHEM* 1994; 26:1341-50
150. KNAAPEN MW, DAVIES MJ, DE BIE M, HAVEN AJ, MARTINET W, KOCKX MM. APOPTOTIC VERSUS AUTOPHAGIC CELL DEATH IN HEART FAILURE. *CARDIOVASC RES* 2001; 51:304-12.
151. TOKARSKA-SCHLATTNER M, ZAUGG M, ZUPPINGER C, WALLIMANN T, SCHLATTNER U. NEW INSIGHTS INTO DOXORRUBICINAORUBICIN-INDUCED CARDIOTOXICITY: THE CRITICAL ROLE OF CELLULAR ENERGETICS. *J OF MOL AND CELL CARDIOL* 2006; 41: 389-405
152. LEBRECHT D, WALKER UA. ROLE OF MTDNA LESIONS IN ANTHRACYCLINE CARDIOTOXICITY. *CARDIOVASC TOXICOL* 2007; 7:108-113
153. KIM I, RODRIGUEZ-ENRIQUEZ S, LEMASTERS JJ. SELECTIVE DEGRADATION OF MITOCHONDRIA BY MITOPHAGY. *ARCH BIOCHEM BIOPHYS* 2007; 462: 245-53.
154. GUSTAFSSON AB, GOTTLIEB RA. MECHANISMS OF APOPTOSIS IN THE HEART. *J CLIN IMMUNOL* 2003; 23: 447-59
155. DECKER RS, WILDENTHAL K. LYSOSOMAL ALTERATIONS IN HYPOXIC AND REOXYGENATED HEARTS. I. ULTRASTRUCTURAL AND CYTOCHEMICAL CHANGES. *AM J PATHOL* 1980; 98: 425-44.
156. HAMACHER-BRADY A, BRADY NR, LOGUE SE, SAYEN MR, JINNO M, KIRSHENBAUM LA Y COL. RESPONSE TO MYOCARDIAL ISCHEMIA/REPERFUSION INJURY INVOLVES BNIP3 AND AUTOPHAGY. *CELL DEATH DIFFER* 2007; 14: 146-57.
157. MATSUI Y, TAKAGI H, QU X, ABDELLATIF M, SAKODA H, ASANO T Y COL. 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.
158. DIRKS-NAYLOR AJ. THE ROLE OF AUTOPHAGY IN DOXORRUBICINAORUBICIN-INDUCED CARDIOTOXICITY. *LIFE SCI.* 2013; 93(24): 913-6
159. MYEKU N, FIGUEIREDO-PEREIRA M E. DYNAMICS OF THE DEGRADATION OF UBIQUITINATED PROTEINS BY PROTEASOMES AND AUTOPHAGY. ASSOCIATION WITH SEQUESTROSOME 1/P62. *THE J BIOL CHEM* 2011; 286(25): 22426-22440

160. VLAHOS, C. J., MATTER, W. F., HUI, K. Y., AND BROWN, R. F. A SPECIFIC INHIBITOR OF PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-KINASE, 2-(4-MORPHOLINYL)-8-PHENYL-4H-1-BENZOPYRAN-4-ONE (LY294002). *J. BIOL. CHEM.* 1994; 269: 5241–5248
161. POWIS, G., BONJOUKLIAN, R., BERGGREN, M. M., GALLEGOS, A., ABRAHAM, R., ASHENDEL, C., ZALKOW, L., MATTER, W. F., DODGE, J., AND GRINDEY, G. WORTMANNIN, A POTENT AND SELECTIVE INHIBITOR OF PHOSPHATIDYLINOSITOL-3-KINASE. *CANCER RES.* 1994; 54: 2419–2423
162. BLOMMAART, E. F., KRAUSE, U., SCHELLENS, J. P., VREELING-SINDELA´ROVA´, H., AND MEIJER, A. J. THE PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-KINASE INHIBITORS WORTMANNIN AND LY294002 INHIBIT AUTOPHAGY IN ISOLATED RAT HEPATOCYTES. *EUR. J. BIOCHEM.* 1997; 243: 240–246
163. KONG, D., AND YAMORI, T. PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-KINASE INHIBITORS: PROMISING DRUG CANDIDATES FOR CANCER THERAPY *CANCER SCI.* 2008; 99: 1734–1740
164. KNIGHT, Z. A., AND SHOKAT, K. M. CHEMICALLY TARGETING THE PI3K FAMILY. *BIOCHEM. SOC. TRANS.* 2007; 35: 245–249
165. PETIOT, A., OGIER-DENIS, E., BLOMMAART, E. F., MEIJER, A. J., AND CODOGNO, P. J. *BIOL. CHEM.* 2000; 275: 992–998
166. ZENG, X., OVERMEYER, J. H., AND MALTESE, W. A. FUNCTIONAL SPECIFICITY OF THE MAMMALIAN BECLIN-VPS34 PI 3-KINASE COMPLEX IN MACROAUTOPHAGY VERSUS ENDOCYTOSIS AND LYSOSOMAL ENZYME TRAFFICKING. *J. CELL SCI.* 2006; 119: 259–270
167. PATTINGRE, S., ESPERT, L., BIARD-PIECHACZYK, M., AND CODOGNO, P. REGULATION OF MACROAUTOPHAGY BY MTOR AND BECLIN 1 COMPLEXES. *BIOCHIMIE* 2008; 90: 313–323
168. SONG G, OUYANG G, BAO S. THE ACTIVATION OF AKT/PKB SIGNALING PATHWAY AND CELL SURVIVAL. *J CELL MOL MED* 2005; 9: 59–71.
169. KLIONSKY DJ, ELAZAR Z, SEGLEN PO, RUBINSZTEIN DC. DOES BAFILOMYCIN A1 BLOCK THEFUSION OF AUTOPHAGOSOMES WITH LYSOSOMES. *AUTOPHAGY* 2008; 4:849–950.
170. LIU, B Y COL. AUTOPHAGIC PATHWAYS AS NEW TARGETS FOR CANCER DRUG DEVELOPMENT. *ACTA PHARMACOLOGICA SINICA* 2010; 31: 1154–64
171. HE, C. & KLIONSKY, D. J. REGULATION MECHANISMS AND SIGNALING PATHWAYS OF AUTOPHAGY. *ANNUAL REVIEW OF GENETICS* 2009; 43: 67–93.
172. NAMBA R, YOUNG LJT, ABBEY CA, KIM L, DAMONTE P, BOROWSKY AD, Y COL. RAPAMYCIN INHIBITS GROWTH OF PREMALIGNANT AND MALIGNANT MAMMARY LESIONS IN A MOUSE MODEL OF DUCTAL CARCINOMA IN SITU. *CLIN CANCER RES* 2006; 12: 2613–21.

173. WU Q, KUGUCHI K, KAWANOTO T, AJIKI T, TRAAG J, CARBAJAL S, Y COL. THERAPEUTIC EFFECT OF RAPAMYCIN ON GALLBLADDER CANCER IN A TRANSGENIC MOUSE MODEL. *CANCER RES* 2007; 67: 3794–800.
174. McMULLEN JR, SHERWOOD MC, TRNAVSKI O, ZHANG L, DORFMAN AL, SHIOI T, Y COL. INHIBITION OF mTOR SIGNALING WITH RAPAMYCIN REGRESSES ESTABLISHED CARDIAC HYPERTROPHY INDUCED BY PRESSURE OVERLOAD. *CIRCULATION* 2004; 109: 3050–5.
174. SHIOI T, McMULLEN JR, TRNAVSKI O, CONVERSO K, SHERWOOD MC, MANNING WJ, Y COL. RAPAMYCIN ATTENUATES LOAD-INDUCED CARDIAC HYPERTROPHY IN MICE. *CIRCULATION* 2003; 107: 1664–70.
175. GRATIA S, KAY L, POTENZA L, SEFFOUH A, NOVEL-CHATE V, SCHNEBELEN C, SESTILI P, SCHLATTNER U, TOKARSKA-SCHLATTNER M. INHIBITION OF AMPK SIGNALLING BY DOXORUBICIN: AT THE CROSSROADS OF THE CARDIAC RESPONSES TO ENERGETIC, OXIDATIVE, AND GENOTOXIC STRESS. *CARDIOVASC RES* 2012; 9: 290–299
176. BOZULIC L, SURUCU B, HYNX D, HEMMINGS BA. PKBALPHA/AKT1 ACTS DOWNSTREAM OF DNA-PK IN THE DNA DOUBLE-STRAND BREAK RESPONSE AND PROMOTES SURVIVAL. *MOL CELL* 2008; 30:203–213.
177. BOZULIC L, HEMMINGS BA. PIKING ON PKB: REGULATION OF PKB ACTIVITY BY PHOSPHORYLATION. *CURR OPIN CELL BIOL* 2009; 21:256–261.
178. XIANG P, DENG H Y, LI K, HUANG G, CHEN Y, TU L, NG P CH, PONG N H, ZHAO H, ZHANG L, SUNG R DEXRAZOXANE PROTECTS AGAINST DOXORRUBICINAORUBICIN-INDUCED CARDIOMYOPATHY: UPREGULATION OF AKT AND ERK PHOSPHORYLATION IN A RAT MODEL. *CANCER CHEMOTHER PHARMACOL* 2009; 63:343–349
179. SUN J F, PHUNG T, SHIOJIMA I, FELSKE T, UPALAKALIN J N, FENG D, KORNAGA T, DOR T, DVORAK A M, WALSH K, BENJAMIN L E. MICROVASCULAR PATTERNING IS CONTROLLED BY FINE-TUNING THE AKT SIGNAL. *PNAS* 2005; 102(1): 128–133
180. NAGOSHI T, MATSUI T, AOYAMA T, LERI A, ANVERSA P, LI L, OGAWA W, DEL MONTE F, GWATHMEY J K, GRAZETTE L, HEMMINGS B, KASS D A, CHAMPION H, ROSENZWEIG A. PI3K RESCUES THE DETRIMENTAL EFFECTS OF CHRONIC AKT ACTIVATION IN THE HEART DURING ISCHEMIA/REPERFUSION INJURY. *THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION* 2005; 115(8): 2128-2138
181. SHEN H, MIZUSHIMA N. AT THE END OF THE AUTOPHAGIC ROAD: AN EMERGING UNDERSTANDING OF LYSOSOMAL FUNCTIONS IN AUTOPHAGY. *TRENDS IN BIOCHERM SCI* 2014; 38:61-71.

182. MINDELL, J.A. LYSOSOMAL ACIDIFICATION MECHANISMS. ANNU. REV. PHYSIOL. 2012; 74: 69–86
183. FORGAC, M. VACUOLAR ATPASES: ROTARY PROTON PUMPS IN PHYSIOLOGY AND PATHOPHYSIOLOGY. NAT. REV. MOL. CELL BIOL. 2007; 8: 917–929
184. LI D, WANG Z, DING G, TAN W, LUO X, CRIOLLO A, XIE M, HILL J. DOXORRUBICIN BLOKS CARDIOMYOCYTE AUTOPHAGIC FLUX BY INHIBITING LYSOSOME ACIDIFICATION. CIRCULATION 2016; 133(17): 1668-1687