



## **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

### **Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**EFFECTO DEL RESVERATROL SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES QUE PARTICIPAN EN LA RESPUESTA AL ESTRÉS OXIDANTE Y DE LA BOMBA DE CALCIO SERCA2 EN CARDIOMIOCITOS DE RATA**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**PRESENTA:  
I.BQ. ABIGAIL GUZMÁN BÁRCENAS**

**TUTOR PRINCIPAL: DR. ÁNGEL ALFONSO ZARAIN HERZBERG  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR Y ENTIDAD O INSTITUCIÓN DE ADSCRIPCIÓN**

**DRA. MARTHA ROBLES FLORES  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**DRA. NIMBE TORRES Y TORRES  
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN "SALVADOR  
ZUBIRÁN", UNAM**

**CIUDAD DE MÉXICO, MÉXICO**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## AGRADECIMIENTOS

La presente tesis de maestría se realizó en el laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. El trabajo fue realizado bajo la tutoría del Dr. Ángel Alfonso Zarain Herzberg. Este proyecto fue apoyado por DGAPA-PAPIIT-UNAM número de proyecto IN217216.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haberme otorgado la beca de maestría (No. CVU 630745) y también por su apoyo al proyecto CONACyT No. 164413.

Agradezco al Posgrado de Ciencias Bioquímicas de la Facultad de Química por haberme permitido formar parte de su comunidad estudiantil y por permitirme seguir mi formación académica en su programa de calidad.

Extiendo este agradecimiento al Programa de Apoyo para Estudios de Posgrado (PAEP) por su contribución económica para la presentación de este proyecto en los siguientes congresos:

- V Congreso de Transducción de Señales de la Sociedad Mexicana de Bioquímica
- 35th National Medicinal Chemistry Symposium

Agradezco al Dr. Ángel Zarain por permitirme formar parte de su equipo de investigación; por su asesoría y apoyo durante toda mi estancia en el laboratorio.

Agradezco a la Dra. Martha Robles Flores (Facultad de Medicina) y a la Dra. Nimbe Torres y Torres (INCMNSZ) por formar parte de mi comité tutorial; por sus asesorías y observaciones para mejorar este trabajo.

Agradezco a los miembros de jurado de examen:

- |   |          |
|---|----------|
| • Dr. Armando Roberto Tovar Palacio     | INCMNSZ  |
| • Dr. Juan Carlos Gómora Martínez       | IFC-UNAM |
| • Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade | IFC-UNAM |
| • Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez       | IFC-UNAM |
| • Dra. María Soledad Funes Argüello     | IFC-UNAM |

Por todas sus observaciones y comentarios que sin duda enriquecieron este trabajo.

A la Bióloga Gabriela Rodríguez Rodríguez por su apoyo constante durante la realización de este proyecto y su excelente asesoría técnica.

A la Dra. Cristina Castañeda Patlán por su apoyo incondicional y sus enseñanzas técnicas.

A la Dra. Abril Saint Martin por su amistad, sus consejos y apoyo técnico durante la realización de esta tesis.

## **Agradecimientos personales**

A las ratitas y ratoncitos que donaron sus corazoncitos para este trabajo.

Al Dr. Zarain por haber sido mi tutor durante mi licenciatura, servicio social y maestría. Muchas gracias por todo el apoyo, enseñanzas y regaños que me dio y que ahora son parte de mi formación. Espero en un futuro podamos seguir colaborando.

A mis compañeros y amigos de laboratorio: Eduardo Izquierdo, Rafael Estrada, Jorge Fragoso, Lucy Flores, Lola Hernández, Iván Meneses, Ana Arreola, Gaby Rodríguez, Abril Saint Martin, Cris Castañeda, Osman Franco, Tadeo Pérez, Marco Morquecho (y esposa Karo) por hacerme los días más amenos en el lab entre pláticas científicas y otras no tanto, comidas, pizzas, pozoles, café, cervezas, hora de las complacencias, risas, bullying y sobre todo su apoyo durante este proceso.

A mis amigos Lau, Vic, Emmanuel, Josué, Miguel, Paloms, Danny, Toño, Diego, Iván y muchos otros que no menciono pero que saben que están dentro de este gremio... gracias por su amistad a lo largo de tantos años. A veces lo único que necesitaba era una buena charla “de todo y de nada” con buena compañía.

***Esta tesis está dedicada 100% a los mejores roomies que me pudo dar la vida:***

***Dra. Guadalupe Guzmán Bárcenas: Ma, sin ti, nada hubiera sido posible. No tengo palabras para agradecerte todo lo que has hecho por mi hermano y por mí. Gracias por ser la mejor mamá, mi mejor amiga, confidente, cómplice, Dra. Corazón, roomie y por ser mi soporte todos los días de mi vida. Gracias por siempre escucharme y guiarme. Esta tesis (como sabes) es tuya y mía. Siempre juntas.***

***Dr. Julián Guzmán Bárcenas: Jul, eres el mejor hermano mayor del mundo. Eres mi primer mejor amigo y el único que sé que perdurará hasta la eternidad. Has estado conmigo en las buenas, en las no tan buenas y en las que morimos de risa. Eres mi ejemplo a seguir. Gracias por cederme tu proyecto, apoyarme y aconsejarme en cada momento, creer en mí y hacerme ver que siempre puedo dar más.***

***Por otra parte, y sin restar importancia agradezco enormemente a mis abuelos Julia Bárcenas y José Guzmán por todo su cariño, consejos, historias y bendiciones que me han acompañado y que me acompañarán por el resto de mis días. Por enseñarme que la familia es lo más importante y que en lo único que debo confiar es en Dios y en mí.***

***Por último y no menos importante, agradezco a mis tíos:***

***Dra. Belén Guzmán: Benny, gracias por ser una gran segunda mamá. Gracias por nunca dejar de creer en mí y por tus bendiciones. Dr. José Guzmán: Pepe, gracias por tu apoyo y consejos de vida. Gracias por enseñarme a nunca dejar de soñar y siempre seguirme preparando. Eres un gran MG. Dr. Gerardo Guzmán: Jerry, gracias por todos tus consejos, apoyo y momentos increíbles que hemos pasado juntos. Me has enseñado mucho. Siempre hacia adelante. Ing. David Guzmán: David, colega, gracias por ser un gran tío y consejero; por creer en mí y por acompañarnos en todo momento. Aún nos faltan muchos lugares por visitar.***

***¡Somos una gran familia! Guzmán Power por siempre.***

"A scientist in his laboratory is not only a technician: He is also a child placed before natural phenomena which impress him like a fairy tale" **Marie Curie (1867-1934)**  
**Chemist, physicist and Nobel laureate**

"The true laboratory is the mind, where behind illusions we uncover the laws of truth." **Jagadish Chandra Bose (1858-1937)** **Physicist, biologist, archaeologist and writer**

"This world, after all our science and sciences, is still a miracle; wonderful, inscrutable, magical and more, to whosoever will think of it." **Thomas Carlyle (1795-1881)** **historian and writer**

## ÍNDICE

Página

### Contenido

Abreviaturas.....	IX
RESUMEN.....	XI
ABSTRACT.....	XIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 ATPasa de Ca <sup>2+</sup> del retículo sarcoendoplásmico (SERCA).....	4
1.2 El calcio del RS y su relación con la apoptosis .....	11
1.3 Estrés Oxidante .....	13
1.4 Resveratrol .....	19
2. ANTECEDENTES .....	21
3. HIPÓTESIS. ....	28
4. OBJETIVOS.....	29
4.1 OBJETIVO GENERAL. ....	29
4.2 Objetivos específicos. ....	29
5. METODOLOGÍA.....	30
5.1 Cultivo primario de cardiomiocitos y tratamiento. ....	30
5.2 Extracción de ARN total y cuantificación de ARN mensajeros. ....	33
5.3 Diseño de oligonucleótidos .....	34
5.4 RT-PCR en tiempo real.....	34
5.5 Cuantificación de viabilidad celular. ....	35
5.6 Western blot.....	35
5.7 Análisis estadístico.....	36

6. RESULTADOS .....	37
6.1 El RSV induce el aumento de la expresión del ARNm de SERCA2a en cardiomiocitos de rata neonata. ....	37
6.2 El RSV protege la disminución de la viabilidad celular causada por el estrés oxidante en cultivo de cardiomiocitos de rata neonata. ....	38
6.3 Efecto del RSV en la apoptosis inducida por estrés oxidante en cardiomiocitos de rata neonata. ....	40
6.4 Efecto del RSV y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en la expresión de los genes de estudio en cardiomiocitos de rata neonata en cultivo. ....	42
6.5 Efecto del RSV y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sobre los niveles de proteína de SERCA2a en cardiomiocitos de rata neonata en cultivo. ....	48
7. DISCUSIÓN .....	49
8. CONCLUSIONES.....	55
9. BIBLIOGRAFÍA .....	56

## ÍNDICE DE FIGURAS

Página

<b>Figura 1.</b> Los componentes que participan en el acoplamiento excitación-contracción del cardiomiocito. ....	<b>3</b>
<b>Figura 2.</b> Generación de múltiples isoformas de SERCA por <i>splicing</i> alternativo de los genes humanos <i>ATP2A1-3</i> . ....	<b>4</b>
<b>Figura 3.</b> Estructura tridimensional de la bomba SERCA. ....	<b>8</b>
<b>Figura 4.</b> Cuantificación del flujo de $Ca^{2+}$ durante el acoplamiento excitación-contracción. ....	<b>10</b>
<b>Figura 5.</b> Representación esquemática de los diferentes modelos de la actividad de la familia Bcl-2 en la homeostasis del $Ca^{2+}$ en el RS. ....	<b>12</b>
<b>Figura 6.</b> Defensas antioxidantes en el organismo. ....	<b>18</b>
<b>Figura 7.</b> Estructura química del <i>trans</i> -resveratrol y del <i>cis</i> - resveratrol. ....	<b>19</b>
<b>Figura 8.</b> SIRT1 y AMPK como blancos moleculares del resveratrol.....	<b>23</b>
<b>Figura 9.</b> Modelo propuesto para el resveratrol en la participación de restricción calórica. ....	<b>25</b>
<b>Figura 10.</b> Curva de la concentración de resveratrol [ $\mu$ M] a 24, 48 y 72 horas. ....	<b>37</b>
<b>Figura 11.</b> Determinación de la viabilidad celular en cardiomiocitos después del tratamiento con $H_2O_2$ por 24 horas. ....	<b>38</b>
<b>Figura 12.</b> Determinación de la viabilidad celular en cardiomiocitos en ausencia y presencia de resveratrol $150\mu$ M por 72 horas y después del tratamiento con $H_2O_2$ por 24 horas. ....	<b>39</b>
<b>Figura 13.</b> Efecto del resveratrol y $H_2O_2$ en los niveles de proteína de Bcl-2. ....	<b>40</b>
<b>Figura 14.</b> Efecto del resveratrol y $H_2O_2$ en los niveles de proteína de caspasa-3 ....	<b>41</b>
<b>Figura 15.</b> Efecto del resveratrol y $H_2O_2$ en la expresión del ARNm de <i>SERCA2a</i> ..	<b>43</b>
<b>Figura 16.</b> Efecto del resveratrol y $H_2O_2$ en la expresión del ARNm de <i>SIRT1</i> .....	<b>44</b>
<b>Figura 17.</b> Efecto del resveratrol y $H_2O_2$ en la expresión del ARNm de <i>CAT</i> .....	<b>45</b>
<b>Figura 18.</b> Efecto del resveratrol y $H_2O_2$ en la expresión del ARNm de <i>SOD</i> .....	<b>46</b>
<b>Figura 19.</b> Efecto del resveratrol y $H_2O_2$ en la expresión del ARNm de <i>BIM</i> .....	<b>47</b>
<b>Figura 20.</b> Efecto del resveratrol y $H_2O_2$ en la expresión del ARNm de <i>Bcl-2</i> .....	<b>47</b>

<b>Figura 21.</b> Efecto del resveratrol y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en los niveles de proteína de SERCA2a.....	<b>48</b>
---	-----------

## ÍNDICE DE TABLAS

Página

<b>Tabla 1.</b> Diseño de las secuencias de oligonucleótidos. ....	<b>34</b>
--	-----------

## Abreviaturas

5BrDu: 5-bromo-2'deoxiuridina

AC: Adenil ciclasa

ADN: Ácido desoxiribonucleico

ADNc: ADN complementario

AEC: Acoplamiento Excitación-Contracción

AMP: Adenosín monofosfato

AMPC: Adenosín monofosfato cíclico

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

Asp: aspartato

ATP: Trifosfato de adenosina.

Bcl-2: proteína de las células linfoma  $\beta$

CaMKII: Proteína cinasa dependiente de  $Ca^{2+}$ /calmodulina

CAT: Catalasa

CASQ2: calsequestrina 2

DHPR: canal de calcio activado por voltaje sensible a dihidropiridinas

DMSO: Dimetilsulfóxido

E1: Estado de conformación 1 del ciclo catalítico de SERCA

E1P: Estado de conformación 1 fosforilado del ciclo catalítico de SERCA

E2: Estado de conformación 2 del ciclo catalítico de SERCA

E2P: Estado de conformación 2 fosforilado del ciclo catalítico de SERCA

ERO: especies reactivas de oxígeno

EVC: enfermedades cardiovasculares

GPX: glutatión peroxidasa

GST: glutatión-S-transferasa  
IP<sub>3</sub>: inositol trifosfato

IICR: (IP<sub>3</sub>-induced  $Ca^{2+}$  release)

Liberación de  $Ca^{2+}$  inducido por IP<sub>3</sub>

LDL: lipoproteínas de baja densidad

MCU: uniportador de  $Ca^{2+}$  mitocondrial

NAD<sup>+</sup>: Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido reducido

NCX: intercambiador de  $Na^{+}$  /  $Ca^{2+}$

NFAT: Factor nuclear de células T-activadas

PCR: Reacción en cadena de la polimerasaA

PDE: fosfodiesterasas

P<sub>i</sub>: fosfato inorgánico

PI3K: Fosfoinositol 3-cinasa

PKA: Proteína cinasa activada por AMP

PKC: Proteína cinasa C

PLN: Fosfolamban

PMCA: ATPasa de  $Ca^{2+}$  de la membrana plasmática

RC: restricción calórica

RE: Retículo endoplásmico

RS: Retículo sarcoplásmico

RSV: Resveratrol  
RyR2: Canal de Ca<sup>2+</sup> del RS Cardíaco sensible a rianodina  
SERCA2: ATPasa de Ca<sup>2+</sup> del retículo Sarco(Endo)Plásmico cardíaco  
SFB: Suero fetal bovino  
SIRT1: Sirtuina 1  
SOD: Súperoxido dismutasa  
SP1: Proteína específica 1  
STP: estaurosporina  
STZ: estreptozotocina

TFAM: factor de transcripción mitocondrial A  
TFB2M: factor de transcripción mitocondrial B2  
TM: transmembranal  
TnC: Troponina C  
THR: receptores de la hormona tiroidea  
UPR: respuesta a proteínas desplegadas

## RESUMEN

El retículo sarcoplásmico (RS) es un sistema membranal que juega un papel central en la regulación de la concentración del ion calcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ) durante el ciclo de contracción-relajación del músculo esquelético y cardiaco. La ATPasa de  $Ca^{2+}$  del RS, (Sarco(endo)plasmic reticulum  $Ca^{2+}$  ATPase, SERCA2a) es una proteína clave en el acoplamiento excitación-contracción del cardiomiocito y es responsable del bombeo de  $Ca^{2+}$  hacia el interior del RS durante la relajación del miocardio durante la diástole.

El resveratrol (3,5,4'-trans-trihidroxiestilbeno, RSV) es un polifenol natural que actúa como fitoalexina en diferentes frutos y se ha encontrado que posee efectos benéficos para la salud como prevenir enfermedades cardiovasculares, la diabetes y el cáncer. Particularmente, se ha demostrado que el RSV aumenta la expresión de SERCA2a y por tanto la función cardiaca en ratones diabéticos y se ha sugerido que SIRT1 podría funcionar como activador transcripcional de la expresión del gen *SERCA2*. De igual forma, se ha demostrado que la sobreexpresión del gen *SIRT1* protege al corazón del estrés oxidante a través de la regulación de la actividad de enzimas antioxidantes como son la catalasa (CAT) y la superóxido dismutasa (SOD). También se ha demostrado que el RSV disminuye la  $[Ca^{2+}]_i$ , provocando la disminución de la apoptosis, inhibiendo la actividad de caspasa-3 y aumentando la expresión de Bcl-2 la cual es una proteína anti-apoptótica; también se ha demostrado que el RSV disminuye la expresión de proteínas pro-apoptóticas como Bax y BIM.

En este trabajo se investigó el efecto del RSV sobre la expresión de los genes *CAT* y *SOD* que participan en la respuesta contra el estrés oxidante, *Bcl-2* y *BIM* que participan en la apoptosis y sobre el gen *SERCA2a*; así como, el efecto del RSV sobre los niveles de proteína de SERCA2a, caspasa-3 y Bcl-2 en cultivos de cardiomiocitos de ratas neonatas bajo un tratamiento con peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) para generar estrés oxidante.

Los resultados encontrados en este proyecto consistieron en que el tratamiento con RSV mostró un efecto preventivo contra el daño generado por estrés oxidante mediante la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los cardiomiocitos. Los resultados demuestran que el resveratrol aumenta la expresión del ARNm de *SERCA2a*, *SIRT1*, *CAT*, *SOD*, *Bcl-2* y *BIM*. Así mismo, el tratamiento con RSV mostró un aumento en la viabilidad celular de los cardiomiocitos que fueron tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por otra parte, el RSV indujo un aumento en la expresión de ARNm de los 6 genes de estudio (*SERCA2a*, *SIRT1*, *CAT*, *SOD*, *Bcl-2* y *BIM*) en cardiomiocitos que fueron tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por último, el tratamiento con RSV también aumenta los niveles de proteína de *SERCA2a*, caspasa-3 y *Bcl-2*.

En conclusión, los hallazgos obtenidos en este trabajo contribuyen a entender el efecto del RSV sobre el manejo del Ca<sup>2+</sup> en el cardiomiocito y su efecto protector contra el estrés oxidante.

## **ABSTRACT**

The sarcoplasmic reticulum (SR) is an intracellular membrane network which actively maintains intracellular calcium concentration  $[Ca^{2+}]$  during the contraction-relaxation cycle in skeletal and cardiac muscle. The sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  ATPase (SERCA2a) plays an important role transporting  $Ca^{2+}$  from the cytosol into the lumen of the SR following muscular contraction and facilitating muscular relaxation in cardiac muscle.

Resveratrol (3,5,4'-trans-trihydroxystilbene, RSV) has been reported to provide health benefits, exert a variety of protective effects for prevention of cardiovascular disease, diabetes and cancer. In particular, RSV has been shown to improve SERCA2a expression and cardiac function in diabetic mice, through activation of SIRT1, suggesting that SIRT1 could function as a transcriptional activator of SERCA2 gene expression.

Furthermore, it has been reported that overexpression of SIRT1 protects cardiomyocytes from oxidative stress through regulation of antioxidant enzymes activity such as catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD). Moreover, it has been demonstrated that RSV decreased the number of apoptotic cardiomyocytes and prevented  $H_2O_2$ -induced caspase-3 activation. Also, RSV improves Bcl-2 expression (anti-apoptotic protein) and reduces BIM expression (pro-apoptotic protein).

The aim of the present study was to examine the effect of RSV on the expression of SERCA2a, SIRT1, CAT, SOD, Bcl-2 and BIM mRNA, as well as the expression of SERCA2a, caspase-3 and Bcl-2 protein in presence of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) to generate oxidative stress in cultured cardiomyocytes of neonatal rats.

The results of this study presented that RSV treatment had a protective effect against oxidative stress  $H_2O_2$ -induced in cardiomyocytes of neonatal rats. The results demonstrate that RSV treatment increases SERCA2a, SIRT1, CAT, SOD, Bcl-2 and BIM mRNA expression. Likewise, RSV treatment showed a tendency to improve cell

viability of cardiomyocytes under oxidative stress induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. On the other hand, RSV improved SERCA2a, SIRT1, CAT, SOD, Bcl-2 and BIM mRNA expression in cardiomyocytes treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Finally, RSV treatment induced statistically significant increase in SERCA2a, Caspase-3 and Bcl-2 protein levels.

In conclusion, the findings obtained in this thesis work contribute to understand the effect of resveratrol in Ca<sup>2+</sup> management in the cardiomyocyte and its protective effect against oxidative stress.

## 1. INTRODUCCIÓN

El retículo sarcoplásmico (RS) cardíaco es una red de membranas intracelulares que funciona como un reservorio de iones calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) para después liberarlo y así permitir el aumento de la concentración  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]$ ) en el citosol durante el proceso de contracción/relajación del cardiomiocito. El  $\text{Ca}^{2+}$  juega un papel fundamental en la regulación del mecanismo de acoplamiento excitación-contracción (AEC), tanto en músculo cardíaco como en músculo esquelético (Bers D. , 2002).

El AEC es indispensable para un buen funcionamiento del músculo cardíaco, es por esto, que la expresión y función de las proteínas que participan en el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  deben estar reguladas y acopladas para mantener las  $[\text{Ca}^{2+}]$  adecuadas en el RS y en el sarcoplasma del cardiomiocito. El mecanismo inicia cuando un estímulo despolarizante llega al sarcolema y permite la entrada de una baja  $[\text{Ca}^{2+}]$  al citoplasma a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L o canales sensibles a dihidropiridinas (DHPR) en la región de los túbulos T del RS. El aumento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en el espacio del túbulo T activa los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  llamados receptores sensibles a rianodina cardíacos (RyR2) liberando rápidamente una gran cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  del interior del RS al citoplasma (MacLennan, 1997) (Martonosi, 2003) (Zarain-Herzberg A. , 2006); este proceso se le conoce como liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por  $\text{Ca}^{2+}$  (Bers D. , 2002) (Fabiato A. &, 1979) (Fabiato A. , 1983). Como consecuencia, la  $[\text{Ca}^{2+}]$  citoplásmica aumenta de 20-50 nM hasta  $\sim 1\mu\text{M}$ , lo que permite que el  $\text{Ca}^{2+}$  liberado se una al complejo de troponina C (TnC) que activa el sitio de unión del complejo actina-miosina permitiendo la maquinaria contráctil funcione (Zarain-Herzberg A. , 2006).

La interacción entre la actina y la miosina proporciona la base para el ciclo de formación de puentes cruzados o "*crossbridge cycling*", donde la hidrólisis de ATP por la molécula de la cadena pesada de miosina está acoplada a la generación de la fuerza de contracción o "*power stroke*", la cual, facilita la contracción muscular. Además, la contracción de los cardiomiocitos se produce en ausencia de la estimulación neural, debido a la presencia de una red de marcapaso especializado

formado por células de Purkinje. Por el contrario, las fibras musculares esqueléticas no pueden despolarizarse espontáneamente, ya que requieren la inervación de motoneuronas  $\alpha$  para iniciar la contracción muscular (Stammers, 2015).

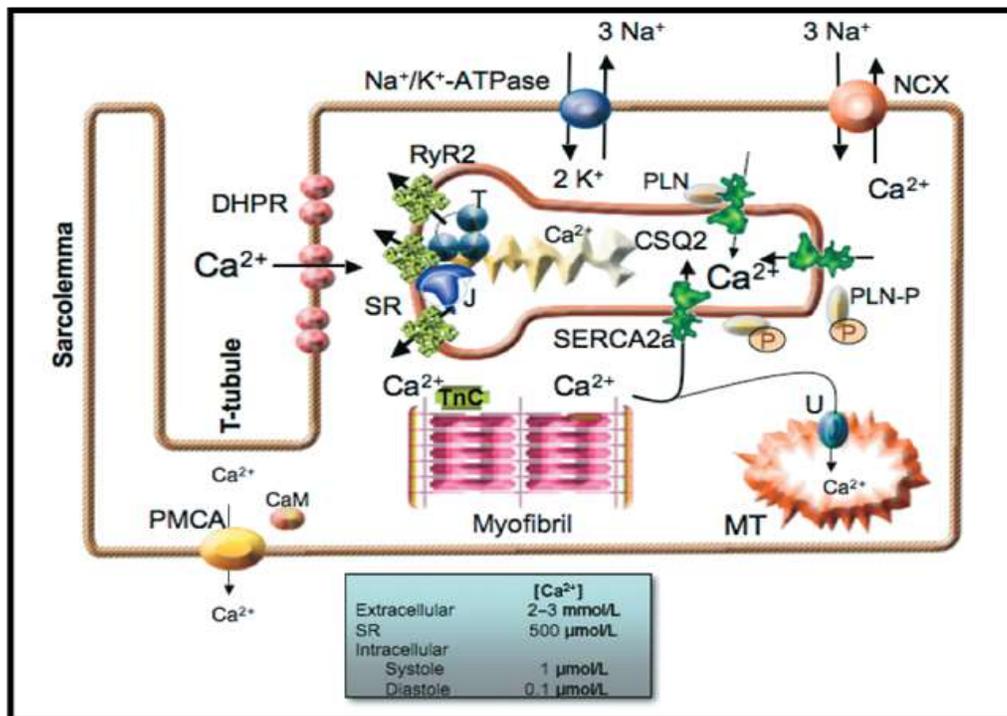
Ahora bien, para que el músculo cardíaco lleve a cabo el proceso de relajación, es necesaria la recaptura del  $\text{Ca}^{2+}$  del citoplasma hacia el interior del RS. Para esto, el cardiomiocito cuenta con proteínas que participan en el proceso de transporte, almacenamiento y liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RS.

En primer lugar se encuentra la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarco(endo)plásmico (SERCA2a) la cual transporta dos iones de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior del RS por molécula de ATP hidrolizado. La regulación de SERCA2a es por medio de una proteína llamada fosfolamban (PLN) de 52 aminoácidos y está asociada a la membrana del RS. En su estado desfosforilado PLN inhibe la actividad de SERCA2a y por tanto el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el interior del RS. En cambio, cuando PLN es fosforilado por la PKA (PLN-P), la inhibición en SERCA2a es liberada, incrementando la velocidad máxima de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  (Periasamy M. B., 2008).

En segundo lugar se encuentra la calsecuestrina 2 (CASQ2), la cual tiene una alta capacidad de unir  $\text{Ca}^{2+}$  (40-50 mol de  $\text{Ca}^{2+}$  / mol proteína) con moderada afinidad (1mM). La CASQ2 tiene también una función en la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  cuando se une a las proteínas junctina (J) y triadina (T) que interaccionan con RyR2 para conformar el complejo CASQ2-RyR2-triadina-junctina que es el encargado de regular la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS al citoplasma (Inesi, 2008) (Martonosi, 2003) (Prasad A. M., 2012) (Zarain-Herzberg A. , 2006) (Figura 1).

Durante la relajación del cardiomiocito, el intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX), permite la salida de un ion  $\text{Ca}^{2+}$  al espacio extracelular a cambio de la entrada de tres iones  $\text{Na}^+$ . Este mecanismo es responsable de reducir la  $[\text{Ca}^{2+}]$  en citoplasma durante la relajación del cardiomiocito. A su vez, la ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  se encarga del bombeo de tres iones  $\text{Na}^+$  hacia el espacio extracelular que son intercambiados por dos iones  $\text{K}^+$  que entran al citoplasma, para que el NCX realice su función

adecuadamente. Además, se encuentran las ATPasas de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática (PMCA) las cuales poseen similitud con las SERCAs y reducen la  $[\text{Ca}^{2+}]$  citoplásmico de forma más localizada (ver Figura 1). Finalmente, también participa el uniportador de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial (MCU) que transporta  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de la mitocondria. De esta forma al término de cada ciclo de contracción-relajación, la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  mantiene la homeostasis dentro del cardiomiocito (Zarain-Herzberg A. , 2006).

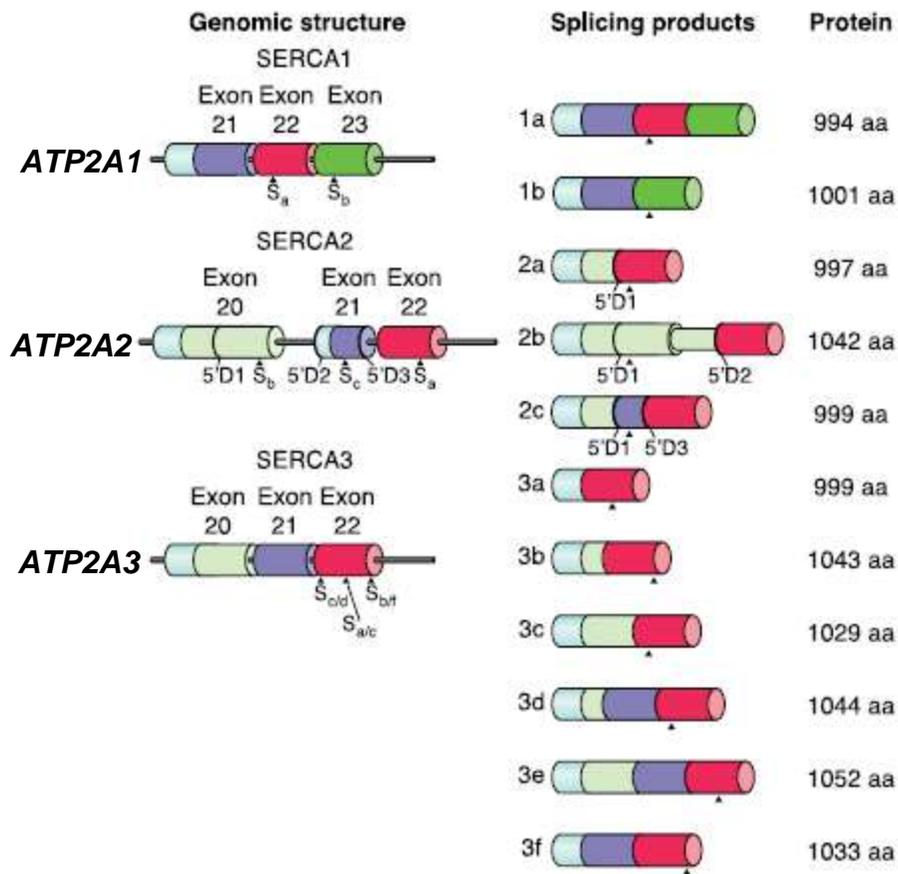


**Figura 1. Los componentes que participan en el acoplamiento excitación-contracción del cardiomiocito.** En este esquema se representan las proteínas que participan en los flujos del  $\text{Ca}^{2+}$  en el cardiomiocito. Después de la despolarización del sarcolema, pequeñas cantidades de  $\text{Ca}^{2+}$  entran al sarcoplasma a través de los canales DHPR del túbulo T y se activa la liberación masiva del  $\text{Ca}^{2+}$  desde el interior del RS por los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  RyR2. El aumento en la  $[\text{Ca}^{2+}]$  en el citosol se une a la troponina C y/o T y activa la contracción de las miofibrillas. Al término de la contracción, el  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol se transporta en su mayoría al interior del RS por SERCA2a y el  $\text{Ca}^{2+}$  restante es recapturado por NCX, PMCA y U. Al término de cada ciclo de contracción-relajación, la cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  debe mantener la homeostasis dentro del cardiomiocito (Tomado de (Zarain-Herzberg A. , 2006)).

## 1.1 ATPasa de Ca<sup>2+</sup> del retículo sarcoendoplásmico (SERCA)

### 1.1.1 Isoformas de SERCA

Las bombas SERCA muestran un alto grado de conservación de la secuencia de aminoácidos entre especies. En mamíferos existen tres genes (*ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3*) que producen por mecanismos de edición o *splicing* alternativo a los diferentes ARNm que codifican para los varios tipos de bombas SERCA, respectivamente (SERCA1, SERCA2, SERCA3) (Figura 2).



**Figura 2. Generación de múltiples isoformas de SERCA por *splicing* alternativo de los genes humanos *ATP2A1-3*.** Los exones están representados por cilindros de colores y los intrones por la línea negra. *S<sub>a-f</sub>* indican la posición de los diferentes codones de terminación para las isoformas correspondientes. (Tomado de (Brini, 2009)).

El gen *ATP2A1* codifica dos isoformas de SERCA1 que se expresan exclusivamente en músculo esquelético de contracción rápida y su expresión está regulada durante el desarrollo; la isoforma SERCA1a se expresa en adultos y la isoforma SERCA1b en neonatos (Schleef, 1996).

El gen *ATP2A2* codifica tres isoformas de SERCA2: la SERCA2a que se expresa en corazón y músculo esquelético de contracción lenta; la SERCA2b que se expresa abundantemente en músculo liso y de forma ubicua en todos los tejidos no musculares; y la SERCA2c que se expresa en células endoteliales y de linaje hematopoyético (Gélébart, 2003).

De las tres isoformas provenientes del gen *ATP2A2*, sólo la isoforma SERCA2a se expresa en cardiomiocitos abundantemente y se ha demostrado que los niveles tanto de ARNm como de proteína para dicha isoforma están reducidos en modelos animales con isquemia del miocardio, hipertrofia cardíaca e insuficiencia cardíaca; ocurriendo lo mismo en pacientes con hipertrofia cardíaca severa e insuficiencia cardíaca (Zarain-Herzberg A. , 2006).

El gen *ATP2A3* codifica para las 6 proteínas de SERCA3 (a-f) las cuales se expresan en células epiteliales y hematopoyéticas (Brini, 2009) (Wray, 2010).

### **1.1.2 Regulación de la expresión del gen *ATP2A2***

El gen humano *ATP2A2* se encuentra en 12q23-q24.1, abarca 65.69 kb y se encuentra organizado en 22 exones (Arai, 1992) (Zarain-Herzberg A. &.-F., 2002).

El transcrito primario de 4.4 kb se edita por *splicing* alternativo y genera el ARNm que codifica para las 3 isoformas de la proteína: SERCA2a, b y c. Las tres isoformas de SERCA2 son idénticas en un ~84% (hasta el aminoácido (aa) 993); pero debido al procesamiento de *splicing* alternativo del exón 20 se generan las isoformas SERCA2a con 997 aa y SERCA2b con 1042 aa (Lytton, Westlin, Burk, Shull, & MacLennan, 1992) (ver Figura 2). Mientras que, la isoforma SERCA2c con 999 aa

se genera debido a la inclusión de una pequeña secuencia codificante dentro del intrón 20 (ahora exón 21) (Gélébart, 2003).

Se han investigado los mecanismos que regulan la transcripción del gen *ATP2A2* y se ha encontrado que algunos factores de transcripción se unen a la región promotora del gen, como son:

- Hormona tiroidea ( $T_3$ ): se ha demostrado que induce la expresión del ARNm y proteína de SERCA2a en cardiomiocitos mediante su unión a los receptores nucleares THR (Thyroid Hormone Receptors por sus siglas en inglés), los cuales son factores de transcripción, cuya unión al promotor de *ATP2A2* activa la transcripción del gen mediante el reclutamiento de complejos remodeladores de la cromatina (Kiss, 1994) (Nagai, 1989) (Reed, 2000) (Zarain-Herzberg A. M., 1994).
- NFAT: se ha demostrado que en corazón humano, la activación de calcineurina (proteína fosfatasa PP2-B dependiente de calcio) regula la actividad de SERCA2a (Münch, 2002). En cardiomiocitos de rata neonata se encontró que a altas concentraciones de  $Ca^{2+}$ , la calcineurina aumenta los niveles de la forma activa del factor de transcripción NFAT y su translocación al núcleo, lo que desencadena niveles elevados del transcrito primario de *ATP2A2*, así como la actividad de distintas cascadas de transducción de señales como PKC, PKD y GSK3 $\beta$  (Prasad & Inesi, 2009). Sin embargo, aún no se ha demostrado que NFAT se una directamente a las secuencias blanco en el promotor del gen *ATP2A2*.
- SP1: esta proteína regula la expresión del gen *ATP2A2* tanto *in vivo* como *in vitro* en distintos tipos celulares, incluidos los cardiomiocitos. Sin embargo, el mecanismo específico de regulación aún no está bien determinado (Takizawa, 2003).
- TFAM y TFB2M: se ha demostrado que estos factores de transcripción aumentan la actividad transcripcional del gen *ATP2A2* protegiendo contra la disminución del ARNm de SERCA2a inducida por estrés (Watanabe, 2011).

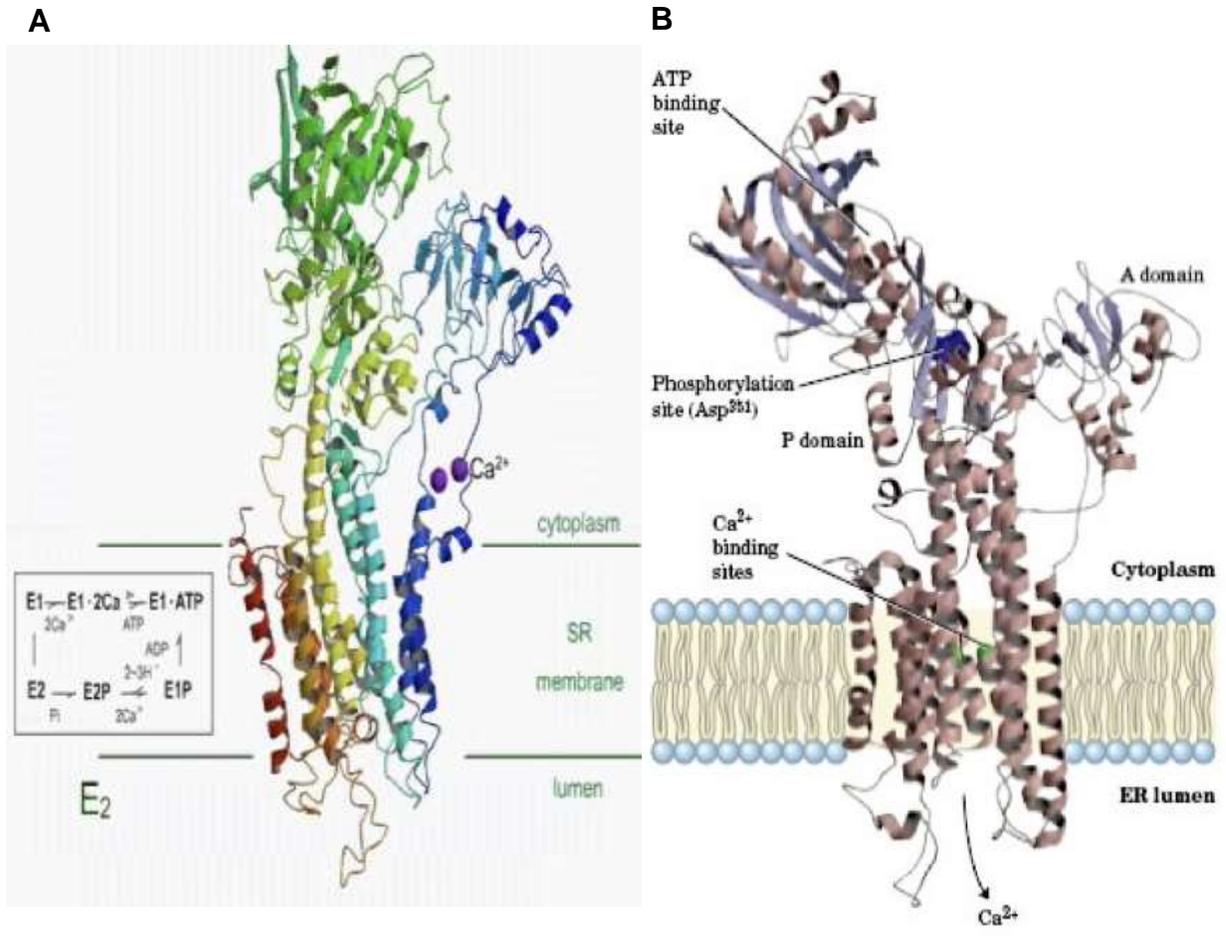
### 1.1.3 Estructura de las bombas SERCA

La ATPasa de calcio (SERCA) fue purificada por primera vez de músculo esquelético por David MacLennan (MacLennan, 1997), su estructura se determinó por cristalografía de rayos X por el grupo de Toyoshima, especificando los cambios conformacionales de la proteína durante la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  (Toyoshima, 2004).

Las bombas SERCA son proteínas que transportan el  $\text{Ca}^{2+}$  mediante la hidrólisis de ATP. Esta característica permite que sean clasificadas como ATPasas de tipo P de clase II (enzimas que transportan iones para el metabolismo celular basal:  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{H}^+$ ), cuyo nombre hace referencia a su ciclo catalítico de reacción en el cual un residuo de aspartato ( $\text{Asp}^{351}$ ) forma un intermediario fosforilado a través de la transferencia de un grupo fosfato proveniente del ATP, con lo cual cambia de una configuración inactiva (de baja afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$ ) a una activa (de alta afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$ ), permitiendo el transporte de dos cationes a través de la membrana (Falson, 1997) (Harper, 1998).

Estructuralmente, las bombas SERCA son proteína transmembranales con una masa molecular de alrededor 110 kDa; se divide en tres regiones distintas que son: el dominio citoplasmático, 10  $\alpha$ -hélices transmembranales o dominio M (Hua, 2002) donde se encuentran los sitios de unión para dos iones  $\text{Ca}^{2+}$  y *loops* (MacLennan, 1997) o bucles en el lumen del RS (Periasamy M. B., 2008).

El conjunto de las hélices transmembranales y los *loops* luminales forman el dominio transmembranal. Mientras que, el dominio citoplasmático se divide en 3 dominios: el dominio A o actuador es el dominio más pequeño y facilita los cambios conformacionales que ocurren cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  se transporta al lumen del RS; el dominio P o dominio de fosforilación y el dominio N o dominio de unión al nucleótido forman el sitio catalítico donde se lleva a cabo la hidrólisis de ATP (Figura 3). Cada ATP que es hidrolizado facilita el transporte de dos iones  $\text{Ca}^{2+}$  al interior del RS (Stammers, 2015).



**Figura 3. Estructura de las bombas SERCA.**

Esta estructura cristalográfica muestra el estado de unión del  $\text{Ca}^{2+}$  y del ADP. En la imagen A se puede apreciar el mecanismo catalítico  $\text{Ca}^{2+}$  al RS. Se muestra el ADP y en morado los dos iones  $\text{Ca}^{2+}$ . En la imagen B se muestran los dominios de fosforilación (P), actuador (A) y de unión al nucleótido (N) que conforman el dominio citoplasmático están señalados, así como las 10  $\alpha$ -hélices transmembranales. (Tomado de (Toyoshima, C., & Mizutani, T., 2004)).

#### 1.1.4 Función de SERCA

Para que las bombas SERCA lleven a cabo el transporte del  $\text{Ca}^{2+}$ , se generan cambios conformacionales en la estructura de la proteína sobre la región citosólica, modificando la estructura de cerrada a abierta.

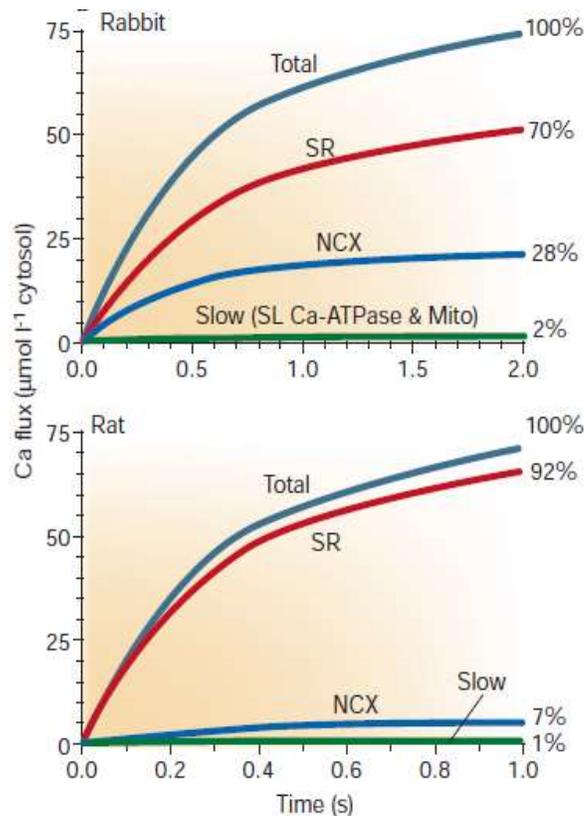
Existen dos sitios de unión al  $\text{Ca}^{2+}$  en el dominio M (sitios I y II) los cuales están localizados en la superficie de la membrana del citosol y pueden encontrarse en alta y baja afinidad (Bayle, 1995). El sitio I permite la entrada del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (estado E1) y el sitio II favorece la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  en el lumen (estado E2) (Brini, 2009). El modelo clásico postula que, en el estado E1 los sitios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  tienen una muy alta afinidad por el catión ( $K_d=10^{-7}\text{M}$ ) y se encuentran accesibles en el citoplasma, sin embargo, en el estado E2 los sitios tienen muy baja afinidad y expuestos hacia el lumen del RS ( $K_d=10^{-3}\text{M}$ ), resultando en la liberación de los dos iones  $\text{Ca}^{2+}$  (MacLennan, 1997) (Wray, 2010).

SERCA2a es la principal proteína de la membrana del RS longitudinal del cardiomiocito y transporta  $\text{Ca}^{2+}$  de forma activa desde el sarcoplasma al interior del RS, regulando así el proceso de contracción-relajación del cardiomiocito. Tiene una alta afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$  ( $K_m \sim 0.1\mu\text{M}$ ), por lo que se estima que sólo se necesitan máximo dos ciclos de transporte para recuperar la  $[\text{Ca}^{2+}]$  en sarcoplasma para la relajación muscular (Wray, 2010).

Las bombas SERCA también participan directamente en las vías de señalización mediadas por  $\text{Ca}^{2+}$  regulando la  $[\text{Ca}^{2+}]$  citoplásmico. En un primer paso, un estímulo inicia varias señales para la movilización del  $\text{Ca}^{2+}$ ; esto permite a los mecanismos de activación transportar el  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el citoplasma. Después, el  $\text{Ca}^{2+}$  actúa como un segundo mensajero ubicuo que estimula varios procesos celulares, como son la diferenciación, la proliferación, la apoptosis y el estrés oxidante; así como la síntesis, procesamiento y plegamiento de proteínas (Monteith, 2007). Finalmente, los mecanismos de desactivación, bombas e intercambiadores eliminan el  $\text{Ca}^{2+}$  del citoplasma para restaurar el estado de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  de reposo (Berridge, 2000).

El principal transportador de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el interior del RS en mamíferos es SERCA2a. El 92% de la recaptura del  $\text{Ca}^{2+}$  en corazón de roedores y el 70% de la recaptura del  $\text{Ca}^{2+}$  en corazón humano es atribuido a la actividad de la bomba SERCA2a (Bers D. M., 1997) (Bers D. , 2002). La actividad de SERCA2a es más alta en el ventrículo de rata que en ventrículo de conejo debido a una mayor densidad de moléculas de la bomba en la membrana del RS.

En el corazón de mamíferos de frecuencia cardiaca rápida como son el ratón y la rata, la participación de la del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  para remover  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular al exterior de la célula es baja, lo que resulta en un balance de 92% para SERCA2a y 7% para el intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  y el 1% para los sistemas lentos; mientras en que el corazón de mamíferos de frecuencia cardiaca lenta como



**Figura 4. Cuantificación del flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  durante el acoplamiento excitación-contracción.** Se representa el flujo del  $\text{Ca}^{2+}$  durante la relajación en miocitos ventriculares de conejo y rata. Los porcentajes muestran datos relativos de la eliminación del  $\text{Ca}^{2+}$ . Abreviaturas: SL: sarcolema, SR: SERCA, Mito: uniporter de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial. (Tomado de (Bers D. , 2002)).

son el conejo y el humano, SERCA2a bombea alrededor de 60-70 del  $\text{Ca}^{2+}$  y la extrusión a través del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  representa alrededor del 30% del total del  $\text{Ca}^{2+}$  movilizado (Bers D. , 2002) (Figuras 1 y 4).

## 1.2 El calcio del RS y su relación con la apoptosis

Bcl-2 (B cell lymphoma-2), está caracterizado como un oncogén que inhibe la muerte celular. Las proteínas de la familia Bcl-2 participan la vía de la apoptosis y se dividen según su función en anti- y pro-apoptóticas. Las proteínas anti-apoptóticas (por ejemplo, Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1) contienen cuatro dominios BH (Homología Bcl-2) y un dominio esencial en la transmembrana (TM) hidrofóbica para su localización dentro de la membrana biológica.

Las proteínas pro-apoptóticas se dividen en dos grupos: el primer grupo posee 4 dominios BH y un dominio TM (por ejemplo, Bax y Bak); mientras que el segundo grupo posee solamente un dominio BH (por ejemplo, Bim, Bid y Bik).

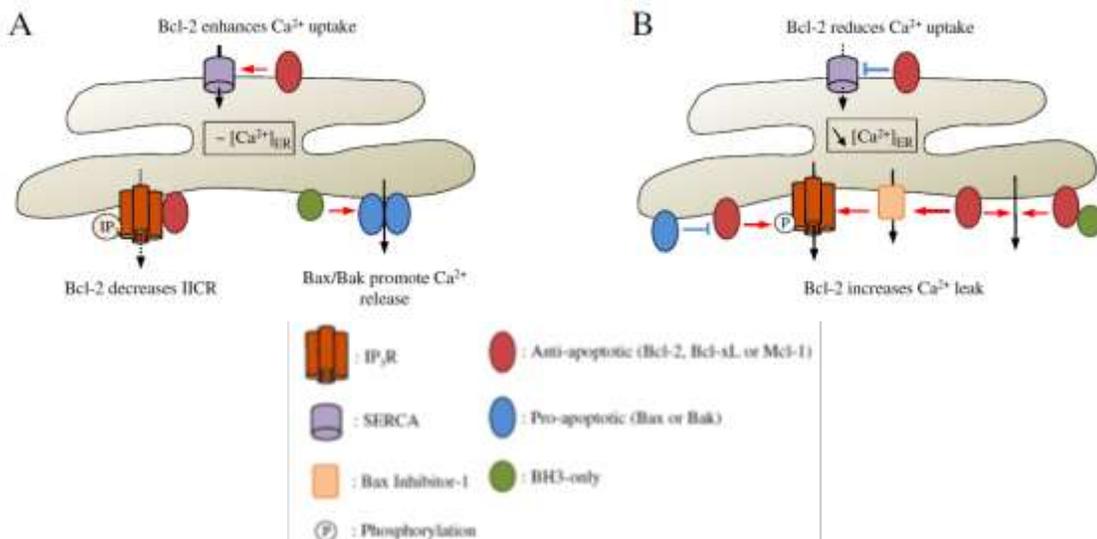
Las proteínas de la familia Bcl-2 tienen un papel principal en la vía de la apoptosis intrínseca o mitocondrial. Este proceso inicia con un estímulo que genera muerte celular como el daño a ADN, activando las proteínas con un solo dominio BH (BIM) y posteriormente se pueden activar las proteínas pro-apoptóticas Bax/Bak o también se pueden inhibir las proteínas anti-apoptóticas. La activación de Bax/Bak permite la oligomerización de la membrana mitocondrial y esto causa la liberación de factores apoptóticos que promueven la activación de la vía de señalización de las caspasas y posteriormente la vía de la apoptosis.

Recientemente, se ha investigado el concepto de que en el RS se encuentran proteínas que pertenecen a la familia Bcl-2 y que pueden controlar la apoptosis por medio de la regulación de homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  en el RS. Lo anterior se refiere a que la célula puede sufrir diferentes tipos de estrés, como el estrés en el RS o estrés oxidante. Estos tipos de estrés causan la liberación masiva de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RS hacia el citoplasma generando la activación de la cascada de señalización intracelular que conducen a la apoptosis. Sin embargo, los mecanismos de acción

de las proteínas de la familia Bcl-2 aún no están claramente descritos (Pinton, 2008) (Bonneau, 2013). Se han propuesto diferentes modelos de la actividad de la familia Bcl-2 en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  en el RS (Figura 5) los cuales se mencionan a continuación.

En el modelo A, Bcl-2 reduce la  $[\text{Ca}^{2+}]$  citoplásmico para prevenir la inducción de apoptosis. Bcl-2 podría aumentar la actividad de SERCA o reducir IICR (liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por  $\text{IP}_3$ ) mediante la inhibición del receptor a  $\text{IP}_3$  ( $\text{IP}_3\text{R}$ ). Por otra parte, las proteínas con un solo dominio BH3 como BIM pueden inducir la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS hacia el citoplasma por medio de la activación de las proteínas Bax y Bak. En el modelo B, Bcl-2 reduce la  $[\text{Ca}^{2+}]$  dentro del RS para prevenir la liberación masiva de  $\text{Ca}^{2+}$  que podría desencadenar la apoptosis. Se propone que Bcl-2 reduce la actividad de SERCA por medio de una interacción directa.

También Bcl-2 puede aumentar la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS ya sea por inducción directa, fosforilando a  $\text{IP}_3\text{R}$  o con ayuda de una proteína con un solo dominio BH3. Bax y Bak pueden contrarrestar el efecto de Bcl-2 interactuando directamente e inhibiéndola.



**Figura 5. Representación esquemática de los diferentes modelos de la actividad de la familia Bcl-2 en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  en el RS. (Tomado de (Bonneau et al., 2013)).**

### **1.3 Estrés Oxidante**

El oxígeno molecular ( $O_2$ ) es una molécula que tiene efectos tanto benéficos como dañinos para los sistemas biológicos. La reactividad del  $O_2$  permite que este participe en la transferencia de electrones de alta energía y por lo tanto contribuya en la generación de grandes cantidades de ATP a través de la fosforilación oxidativa (Quintanar Escorza, 2009) (Burton, 2011).

El término “estrés oxidante” se refiere a un serio desequilibrio entre la producción de especies reactivas y las defensas antioxidantes. Sies, lo define como “una alteración en el equilibrio pro-oxidante / antioxidante, favoreciendo a los primeros y provocando un daño potencial” (Sies H. , 1997). Este daño es conocido como daño oxidante a quien Whiteman y Halliwell lo definen como: “el daño biomolecular causado por el ataque de especies reactivas de oxígeno sobre los componentes de los organismos vivos” (Halliwell B. &, 2004). El incremento en los niveles de daño oxidante es el resultado del estrés oxidante y de la falla en los sistemas de reparación y reemplazo. Uno de los efectos más llamativos del estrés oxidante es en el metabolismo celular del  $Ca^{2+}$  tendiendo al aumento del  $Ca^{2+}$  intracelular libre (Halliwell B. , 2007).

#### **1.3.1 Especies reactivas de oxígeno**

El término “especies reactivas de oxígeno” se aplica tanto a los radicales libres y sus intermediarios no radicales. Un radical libre es un átomo o molécula que tiene uno o más electrones desapareados en sus orbitales externos y es capaz de tener una existencia independiente; sin embargo, es muy reactivo ya que tiende a reducirse, es decir, sustrae un electrón de átomos o moléculas estables, a las cuales oxida, con el fin de alcanzar su propia estabilidad (Quintanar Escorza, 2009).

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) comprenden a los radicales libres como el superóxido y a las especies no radicales como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Gülçin, 2012). Estas moléculas son producidas por la célula continuamente y están involucradas en eventos fisiológicos como la diferenciación celular, respuesta

inmune primaria, y la señalización celular (Gülçin, 2012). En efecto, algunas ERO como el  $H_2O_2$  son jugadores versátiles de la maquinaria de señalización molecular porque son pequeños, altamente difusible, y se pueden generar y degradar rápidamente (Gough, 2011). Tanto las ERO radicales y no radicales son especies pro-oxidantes capaces de oxidar diferentes biomoléculas en la célula (Sies H. , 1999), lo que conduce a una secuencia de reacciones en cadena que pueden terminar en el daño molecular y celular (Gülçin, 2012).

El equilibrio entre efectos benéficos y perjudiciales de las ERO se conserva en la célula por la actividad de un complejo conjunto de mecanismos de desintoxicación no enzimáticos y enzimáticos conocidos colectivamente como antioxidantes (Sies, 1993; Bast, 2015).

### **1.3.2 Acciones biológicas de las especies reactivas de oxígeno**

En homeostasis, se ha estudiado que las ERO tienen diversas acciones en las siguientes funciones celulares:

- Activación de factores de transcripción sensibles al estado RedOx
- Activación de proteínas cinasas
- Lipoperoxidación
- Modificaciones en proteínas
- Oxidación del ADN
- Apertura de canales iónicos

Sin embargo, en el presente trabajo nos enfocamos en los cambios que sufren los canales iónicos cuando el cardiomiocito se encuentra en un ambiente oxidante. Los desequilibrios causados por las ERO conducen a la pérdida de homeostasis del  $Ca^{2+}$  intracelular, liberando iones  $Ca^{2+}$  desde el RS y otros reservorios. La  $[Ca^{2+}]$  dentro del lumen del RS es mucho más alta que en el citoplasma, alcanzando niveles milimolares. Esta concentración se mantiene por medio de SERCA2a, y es necesaria para el correcto funcionamiento de los mecanismos de plegamiento de

proteínas. Las ERO son capaces de activar los canales de liberación de calcio en la membrana del RS, que incluyen al IP3R y a RyR.

La liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RS activa diversos procesos sensibles al  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de la célula, incluyendo muchas vías de señalización. También tiene un profundo efecto sobre la función celular. La pérdida de la actividad de las chaperonas da como resultado la acumulación de proteínas mal plegadas dentro del lumen, lo que lleva a una mayor generación de ERO mientras se hacen intentos para replegar las proteínas. Esta acumulación de proteínas estimulará la respuesta a proteínas desplegadas (UPR), un conjunto de vías de señalización altamente conservadas que tienen como objetivo restaurar la homeostasis, pero, si esto no funciona, va a estimular la apoptosis (Burton, 2011).

### **1.3.3 Mecanismos de defensa antioxidante**

Para contrarrestar el efecto dañino de los radicales libres de oxígeno existen en los sistemas biológicos una gran diversidad de sustancias, de naturaleza enzimática y no enzimática, que constituyen los denominados sistemas de defensa antioxidante. Estos sistemas de defensa antioxidante funcionan muy eficientemente de forma coordinada y su misión es proteger la homeostasis celular frente a la alteración oxidativa causada por radicales libres y otras especies reactivas originadas durante el metabolismo del oxígeno (Figura 6).

#### **a. Sistemas de defensa enzimáticos**

Están presentes en los seres vivos y protegen de las ERO producidas durante el metabolismo. Dentro de éstos, se encuentran tres enzimas principales: la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPX).

**Superóxido dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1):** es una de las enzimas antioxidantes más potentes en la célula y cataliza la conversión de anión superóxido ( $O_2^-$ ) hacia peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y oxígeno molecular ( $O_2$ ).

Su función catalítica fue descubierta por McCord y Fridovich. La velocidad de dismutación es 104 veces superior a la velocidad de la dismutación espontánea que se produce con pH fisiológico. Existen diferentes isoformas de SOD en la naturaleza y se clasifican en función de los grupos prostéticos. Sin embargo, en células



eucarióticas existen tres tipos de SOD: la forma isoenzimática prevalente de las SOD1 es la Cu/Zn-SOD, una proteína dimérica con un peso molecular de 32 kD. El átomo de cobre (Cu) es esencial para la actividad catalítica de la enzima, mientras que el átomo de zinc (Zn) le proporciona estabilidad. Se ha encontrado otra Cu/Zn-SOD en los fluidos extracelulares (EC-SOD) y se ha demostrado que posee una alta afinidad a los glicosaminglicanos.

En este caso se trata de una proteína de 135 kD constituida por cuatro subunidades unidas no covalentemente. Finalmente, se ha identificado una SOD ubicada principalmente en la mitocondria que contiene manganeso (Mn-SOD). La Mn-SOD es una proteína tetramérica de subunidades idénticas que posee un peso molecular de 96 kD y contiene un átomo de manganeso (Mn) por subunidad, permitiendo la ciclación del centro de Mn entre los estados de oxidación (II) y (III) durante la dismutación de  $O_2^-$  (Birben, 2012) (Gülçin, 2012) (Kurutas, 2016).

La actividad de las SOD varía entre los tejidos. En general, se han encontrado los niveles más altos en hígado, glándulas suprarrenales, riñón, bazo y corazón. Estas enzimas se regulan en función de la oxigenación de los tejidos en los que se encuentran, la cual afecta a la síntesis de la proteína (Birben, 2012) (Fukai, 2002).

**Catalasa (CAT) (EC 1.11.1.6):** fue la primera hemoproteína determinada como enzima antioxidante y cataliza la reducción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O y O<sub>2</sub>.



Esta enzima tiene constantes de velocidad elevadas (~10<sup>7</sup>M/s), pero su afinidad es baja; de ahí que su papel resulte fundamental en condiciones de elevadas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. CAT tiene un peso molecular de 240 kD y está constituida por cuatro subunidades, cada una de las cuales contienen un grupo hemo que forma parte de su centro activo y una molécula de NADPH.

La mayoría de las células contienen CAT, aunque en animales ésta abunda en el hígado, riñón y en los eritrocitos. En cuanto a su localización subcelular, la actividad catalasa de las células eucariotas se localiza fundamentalmente en los peroxisomas, orgánulos citoplasmáticos que, por otra parte, contiene muchas de las enzimas generadoras de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de las células aerobias (Birben, 2012) (Kurutas, 2016).

**Glutación peroxidasa (GPX) (EC 1.11.1.9):** La GPX también contribuye a la eliminación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pero, a diferencia de la CAT, que usa el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como dador de electrones, utiliza el glutati6n reducido.



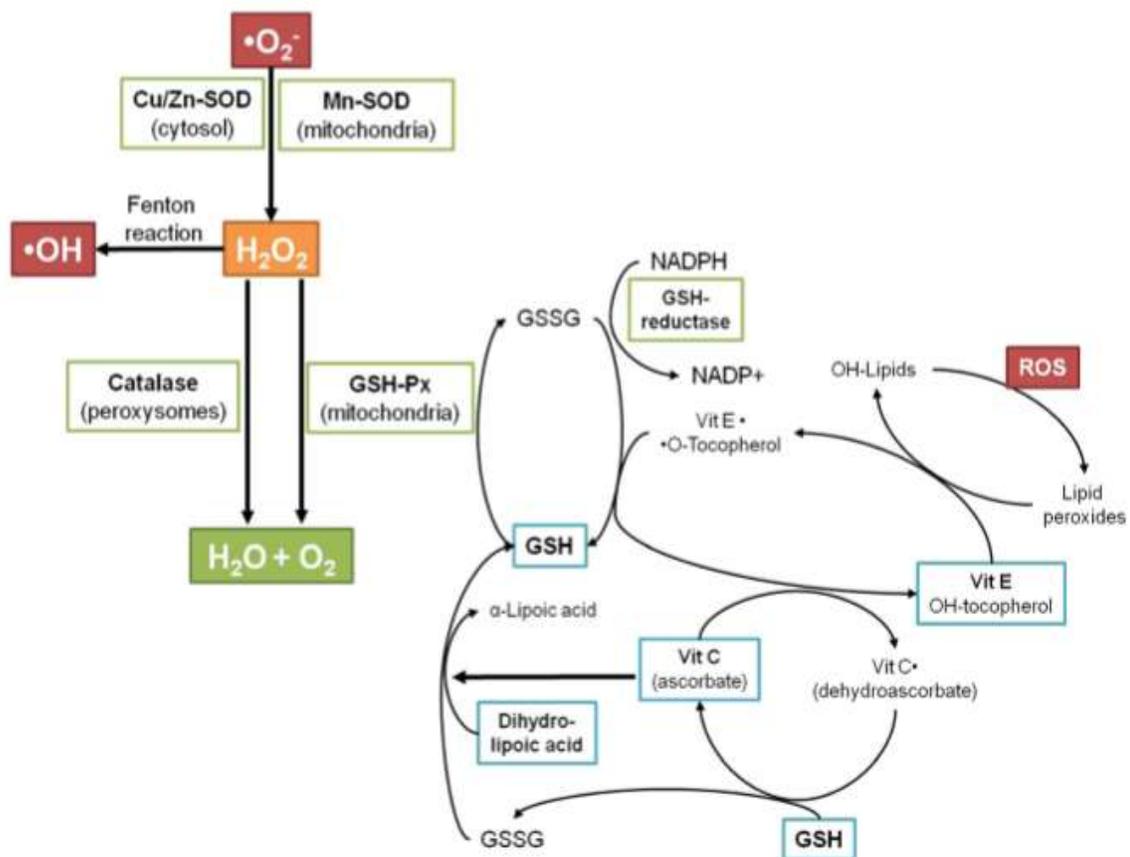
Existen dos formas de GPX: la selenio (Se) dependiente (**GPx, EC 1.11.1.19**) y la selenio independiente (Glutati6n-S-transferasa, **GST, EC 2.5.1.18**) y, en vertebrados, se encuentran en el citoplasma y en las mitocondrias. Entre las principales diferencias est6n el n6mero de subunidades, el mecanismo catal6tico y la uni6n del Se al sitio activo (Birben, 2012) (Kurutas, 2016).

#### **b. Sistemas de defensa no enzim6ticos**

Existen dos formas de adquirir estas defensas antioxidantes, de forma end6gena, es decir, que el organismo las sintetiza como en el caso del glutati6n (GSH) o de manera ex6gena, es decir, est6n presentes en la dieta ingerida, sobre todo en frutas

y verduras, por ejemplo: la vitamina E, vitamina C, carotenoides, flavonoides, resveratrol, etc. (Gülçin, 2012) (Kurutas, 2016).

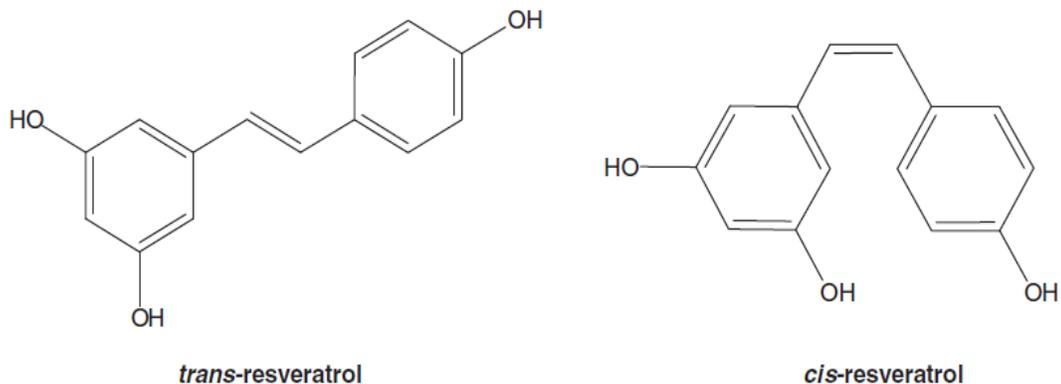
Entre sus principales características se encuentran la capacidad de neutralizar un único radical libre por molécula, sólo actúan a concentraciones elevadas, y tienen un papel menos importante frente a los sistemas de defensa enzimáticos. Sin embargo, algunos antioxidantes pueden interactuar con otros antioxidantes regenerando las propiedades originales; este mecanismo es conocido como “la red antioxidante o *antioxidant network*” (Birben, 2012) (Gülçin, 2012) (Kurutas, 2016).



**Figura 6. Defensas antioxidantes en el organismo.** Se han determinado dos sistemas de defensa antioxidante en células eucariotas: sistema enzimático y sistema no enzimático. Estos sistemas trabajan en sinergia para proteger a las células y órganos del daño causado por ROS. (Tomado de (Kurutas, 2016)).

## 1.4 Resveratrol

El resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno, RSV) es un polifenol que actúa como fitoalexina en algunos frutos. Las fitoalexinas son sustancias químicas producidas como consecuencia de un mecanismo de resistencia a las condiciones adversas, caracterizadas por ser capaces de inhibir el progreso de ciertas infecciones fúngicas al inactivar las ATPasas de ciertos hongos e inducir la disociación de algunas chaperonas de su citoesqueleto (Gambini, 2013). Se ha reportado la presencia del RSV en más de 70 especies de plantas que abarcan 32 géneros. Asimismo, se encuentra en distintos frutos como ciruelas, moras, cacahuates y uvas. La cáscara de las uvas contiene alrededor de 50-100 mg de RSV por gramo de peso húmedo, teniendo una concentración alta de RSV en el vino tinto (0.1–14.3 mg/l) y en el jugo de uva natural. Su estructura base consiste en la unión de dos anillos fenólicos por un doble enlace estireno que forma el 3,5,4'-trans-trihidroxiestilbeno (Figura 7), con un peso molecular de 228.25 g/mol (Gambini, 2013).



**Figura 7. Estructura química del *trans*-resveratrol y del *cis*-resveratrol. (Tomado de (Gambini et al., 2013)).**

El aminoácido precursor del RSV es la fenilalanina y la enzima estilbeno sintetasa es quien cataliza la reacción. Dentro de la familia de las estilbeno sintetasa se encuentra la enzima resveratrol sintetasa, que es codificada por varios genes agrupados de acuerdo a su sensibilidad ante señales externas, como estrés abiótico o señales bióticas originadas por células fúngicas (Gambini, 2013).

El doble enlace estireno que el RSV posee en su estructura permite la existencia de dos formas isoméricas de este compuesto; *cis*-resveratrol y *trans*-resveratrol (Gambini, 2013), de la cual *trans* es la forma más estable. Mediante la exposición de los rayos UV, la forma *trans* es transformada a la forma *cis*, así que el aislamiento es realizado generalmente en condiciones de oscuridad. Algunos estudios han demostrado que, bajo varias condiciones, el *trans*-resveratrol es químicamente estable varios meses en condiciones protegidas a la luz. Además, es altamente soluble en etanol y en dimetilsulfóxido (DMSO) y escasamente soluble en agua (Harikumar, 2008).

Una serie de estudios epidemiológicos han demostrado una relación inversa entre el consumo del vino tinto y la incidencia de enfermedades cardiovasculares llamando a este fenómeno “La paradoja Francesa” (Harikumar, 2008).

A nivel celular y molecular, el RSV inhibe la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Frankel, 1993), promueve la vasodilatación (Cruz, 2006), protege al corazón (Hung, 2004), el cerebro (Huang, 2001) y la médula espinal (Juric, 2007) (Kiziltepe, 2004) de daño por isquemia-reperfusión, estrés oxidante/nitrante y cardiomiopatía diabética. También, se ha ligado a beneficios fisiológicos como la protección contra de las enfermedades cardiovasculares, cáncer, el deterioro relacionado con la edad y las consecuencias patológicas por dietas altas en grasas (Baur J. A., 2010). Por otro lado, el RSV ha mostrado una actividad importante en procesos anti-inflamatorios, anti-proliferativos, el control del ciclo celular, la apoptosis, entre otros (Le Corre, 2005).

## 2. ANTECEDENTES

Una de las principales preocupaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) han sido las enfermedades cardiovasculares (ECV), ya que son la principal causa de muerte en todo el mundo. Cada año mueren más personas por ECV que por cualquier otra causa. Se calcula que en 2015 murieron por esta causa 17.5 millones de personas, lo cual representa un 31% de todas las muertes registradas en el mundo. Las muertes por ECV afectan por igual a ambos sexos, y más del 80% se producen en países de ingresos bajos y medios.

La OMS ha calculado que en 2030 morirán cerca de 23.3 millones de personas por ECV, sobre todo por cardiopatías y accidentes cardiovasculares, y se estima que seguirán siendo la principal causa de muerte (OMS, 2017).

En el caso de la población Mexicana, el INEGI estimó que en el año 2014 fallecieron 121,427 personas a causa de enfermedades del corazón siendo la primera causa de muerte en el país. Específicamente, fallecieron 82,334 personas a causa de enfermedades isquémicas del corazón (INEGI, 2017).

Ha sido descrito en la literatura que a mayor concentración de antioxidantes en el organismo se observa menor presencia y menos complicaciones ECV (Ciancarelli, 2009), así como de diabetes (Opara, 1999), enfermedades respiratorias (Gumral N. C., 2009) (Gumral N. N., 2009) y desórdenes neurológicos (Schrag, 2013).

El RSV es un antioxidante que ha sido considerado como un suplemento para los tratamientos de estas enfermedades (Conti, 2016). Se ha demostrado que el RSV es un activador de SIRT1, aumentando indirectamente la transcripción de ciertas proteínas en el corazón (Sundaresan, 2011) y también aumenta la expresión de SERCA2a y mejora la función cardíaca en ratones con cardiomiopatía diabética (Sulaiman, 2010). Por otra parte, también se ha demostrado que el daño oxidante causado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disminuye los niveles de proteína de SERCA2a (Ma, 1999). Sin embargo, se desconoce si este fenómeno ocurre también a nivel transcripcional,

alterando los niveles de ARNm de SERCA2a, SOD, CAT; además de proteínas que pertenecen a la vía apoptótica, como BIM y Bcl-2.

## **2.1 Estrés oxidante y la insuficiencia cardíaca**

Existen factores de riesgo como el consumo de tabaco, bebidas alcohólicas, alto consumo de grasas y azúcares, así como una compleja interacción multifactorial entre medio ambiente y los factores genéticos conducen al aumento del estrés oxidante, el cual juega un papel importante en la fisiopatología de la disfunción cardíaca (Kumar, Saritha, & Fareedullah, 2010).

Uno de los agentes oxidantes más comunes es el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Este compuesto es permeable a la membrana celular y es usado para inducir estrés oxidante en cardiomiocitos como modelo *in vitro* de daño cardíaco, donde se induce una disminución en los niveles de ARNm y proteína de SERCA2a (Koitabashi, 2005).

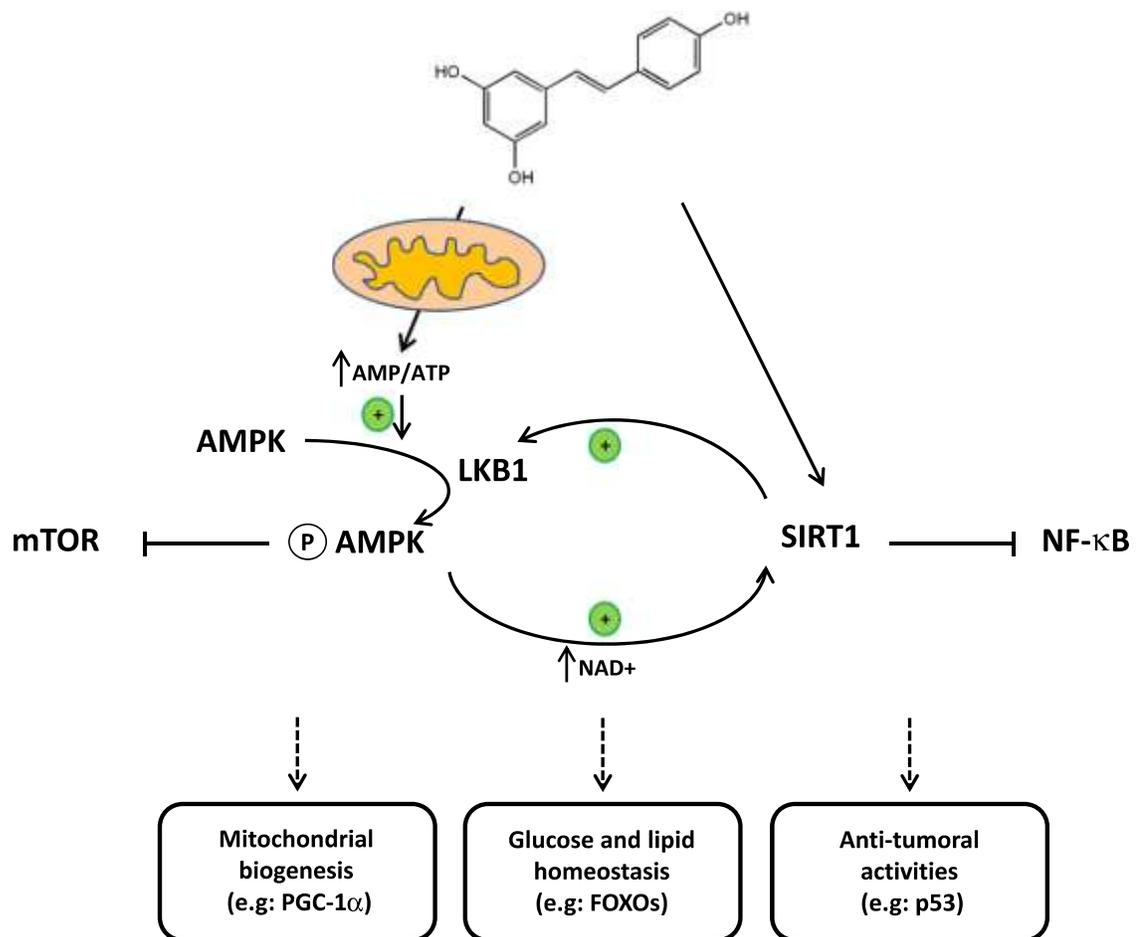
## **2.2 Blancos moleculares del Resveratrol**

Varios grupos de investigación han estudiado los mecanismos moleculares por los cuales el RSV lleva a cabo su acción en las células. Las evidencias indican que el RSV actúa activando a la Sirtuina 1 (SIRT1), inhibiendo a fosfodiesterasas (PDE), y activando a la proteína cinasa dependiente de AMP (AMPK).

SIRT1 es una desacetilasa de histonas (HDAC) clase III,  $NAD^+$  dependiente. Esta enzima está implicada en la prevención de enfermedades relacionadas con el envejecimiento, como el cáncer, la enfermedad de Alzheimer, y la diabetes tipo 2 (Sebastián, 2012). En la célula SIRT1 controla la reparación del ADN y la apoptosis, los relojes circadianos, la vías de señalización inflamatorias, la secreción de insulina, y la biogénesis mitocondrial (Chalkiadaki, 2012) (Haigis, 2010) (Figura 8).

Inicialmente, se encontró que el RSV activa alostericamente a SIRT1 al disminuir su  $K_m$ , y produce cambios farmacológicos consistentes con la activación de la enzima

(Baur J. A., 2006) (Howitz, 2003) (Milne, 2007) (Minor, 2011). Sin embargo, se llegó a cuestionar que el RSV sea realmente un activador directo de SIRT1, debido a que el efecto se observó únicamente cuando se usaron sustratos marcados con un fluoróforo (Flúor de Lys), pero no con sustratos no marcados (Beher, 2009) (Borra, 2005) (Pacholec, 2010). Sin embargo, en un estudio reciente (Hubbard, 2013), donde se usaron péptidos con las secuencias encontradas en los sustratos de SIRT1 como son la PGC-1 $\alpha$  y FOXO3a, se observó activación de SIRT1 por RSV. Más aún, en ese estudio se demostró que el Glu<sup>230</sup>, localizado en la porción N-terminal de SIRT1, es crítico para la activación por RSV, apoyando el mecanismo de activación directa de SIRT1.

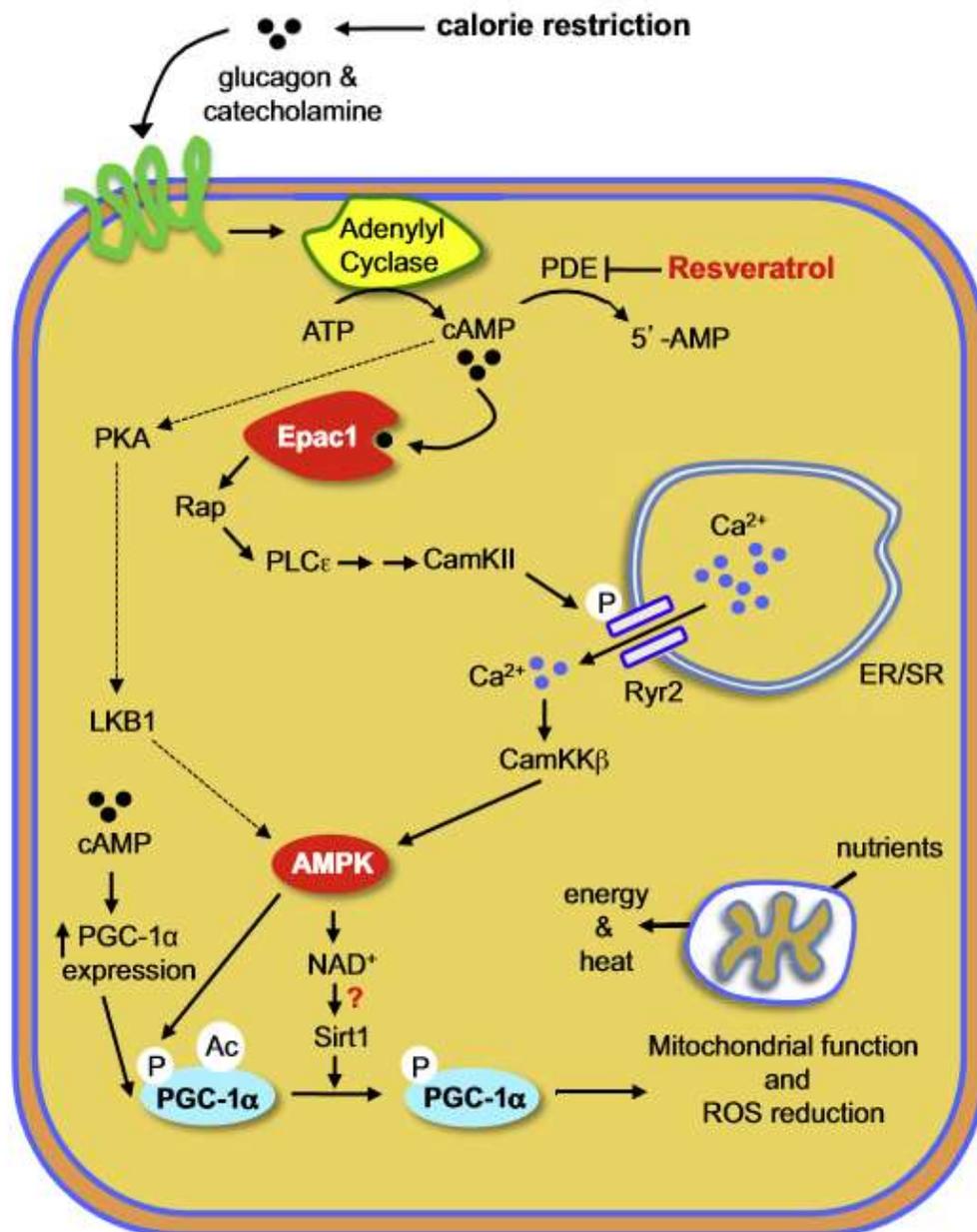


**Figura 8. SIRT1 y AMPK como blancos moleculares del resveratrol. (Tomado de (Kulkarni & Cantó, 2015)).**

Por otra parte, también se ha propuesto que el RSV puede funcionar como un activador indirecto de SIRT1. El grupo de Park en 2012 demostró que el RSV inhibe la actividad de las fosfodiesterasa-5 (PDE5) que forma parte de la vía  $\text{CamKK}\beta$ -AMPK por lo que se ha propuesto un modelo de activación por medio de la vía de cAMP-Epac1-AMPK-SIRT1 (Beher, 2009) (Park, 2012). La restricción calórica (RC), aumenta los niveles de AMPc incrementando así los niveles de glucagón y catecolaminas, los cuales incrementan la actividad de adenil ciclasa y la producción de AMPc.

Se ha observado que el RSV incrementa los niveles de AMPc y activa a la proteína Epac1 (Exchange factor directly activated by cAMP, por sus siglas en inglés), quien puede inducir algunas de las vías que son normalmente estimuladas durante la RC. En la Figura 9 se muestra un esquema donde se propone como el RSV puede actuar simulando la RC.

La AMPK funciona como un sensor energético de la célula y se activa por medio del cociente AMP/ATP (Kulkarni, 2015). Se ha reportado que el RSV es un activador indirecto de la AMPK, pues inhibe a la ATP sintasa mitocondrial, lo que aumenta los niveles de AMP (Kim, 2016). Se ha demostrado que la activación de la AMPK por AMP incrementa la concentración de  $\text{NAD}^+$  a través del aumento en la oxidación de lípidos, y por tanto aumenta la actividad de SIRT1 (Cantó, 2010). La AMPK también incrementa la biogénesis mitocondrial, esto es por el incremento en la función de PGC-1 $\alpha$ . En la Figura 9 se esquematiza una vía alternativa que involucra a la PKA y que se podría también contribuir a la acción del RSV (líneas punteadas) (Sundaresan, 2011).



**Figura 9. Modelo propuesto para el resveratrol en la participación de restricción calórica.**  
(Tomado de (Park, 2012)).

### **2.3 Efecto protector del RSV contra el daño causado por estrés oxidante en cardiomiocitos**

La propiedad antioxidante del RSV es importante ya que sus fenoles bioactivos pueden interferir y evitar daños causados por especies reactivas de oxígeno (ROS) como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y el radical hidroxilo ( $HO^{\cdot}$ ) (Turan, 2012). El RSV incrementa la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX) en la línea celular cardíaca H9C2 (Turan, 2012). Sin embargo, se ha demostrado que la actividad enzimática de GPX no se ve alterada por la exposición a  $H_2O_2$  en cardiomiocitos de rata adulta (Movahed, 2012). También, en células H9C2 se ha demostrado que el tratamiento con  $H_2O_2$  incrementa el número de células apoptóticas y disminuye la actividad de SIRT1,3,4,7 las cuales son importantes en las vías de supervivencia del cardiomiocito (Yu, 2009). Esta disminución puede explicarse por la reducción de  $NAD^+$  a NADH que causa el estrés oxidante e inhibe la actividad de las sirtuinas (Alcendor R. R., 2004). Sin embargo, se ha probado que el RSV puede activar rápidamente a SIRT1, 3, 4,7 y así inhibir la apoptosis y eliminar la actividad de caspasa-3 bajo condiciones de estrés oxidante en células H9C2 (Yu, 2009). También se ha demostrado que la sobreexpresión de SIRT1 inducida por el RSV inhibe la generación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y a la relación que tiene la biogénesis mitocondrial con SIRT1 (Li Y. Z., 2013). Otro estudio indica que el RSV disminuye el calcio intracelular para disminuir la apoptosis, inhibe la actividad de caspasa 3 y conduce a un aumento en la expresión de Bcl-2 la cual es una proteína anti-apoptótica, así como a una baja en la expresión de Bax que es una proteína pro-apoptótica, al igual que BIM (Shen, 2012).

SIRT1 puede desacetilar a p53, NFkB y otros factores de transcripción. Su sobreexpresión ha demostrado proteger al corazón del estrés a través de la regulación de la síntesis de antioxidantes y disminución de radicales libres de oxígeno y nitrógeno. Se ha reportado que una moderada expresión de SIRT1 (2.5-7.5 veces por arriba de los niveles endógenos) protegió contra el incremento de la hipertrofia cardíaca, apoptosis y la disfunción cardíaca mientras que con niveles

mayores a 12.5 veces de la expresión de SIRT1 se indujo dilatación, hipertrofia y la insuficiencia cardíaca (Dolinsky, 2011) (Juric, 2007). Un nivel bajo a moderado de sobreexpresión de SIRT1 demostró la reducción del tamaño del infarto y mejoró las funciones cardíacas en un modelo de ratón con infarto al miocardio. Estas observaciones fortalecen la idea de que SIRT1 es una molécula que mejora el crecimiento y resistencia de cardiomiocitos, así como también, eleva la expresión necesaria para ser controlada y así obtener sus efectos deseados (Park, 2012). La suplementación de la dieta de ratas adultas por 14 días con RSV ha mostrado protección del corazón de los efectos perjudiciales de la hipertrofia cardíaca (Sulaiman, 2010). Igualmente, la alimentación con RSV mejora la función cardíaca en ratón diabético (Sundaresan, 2011).

Se ha demostrado que la actividad de SIRT1 como desacetilasa está vinculada con sus efectos benéficos sobre varias funciones celulares relacionadas con el metabolismo energético. Se reportó que la región comprendida entre -260 y -70 pb del promotor del gen *Atp2a2* podría tener un papel importante en la disminución de la actividad transcripcional de *ATP2A2* que se observó cuando los cardiomiocitos fueron cultivados en medio de cultivo con alta glucosa. El RSV tiene efectos benéficos sobre la expresión disminuida de SERCA2 observada en la cardiomiopatía diabética, aunque no se ha estudiado si ocurre a nivel transcripcional y si es mediada por SIRT1 (Sundaresan, 2011).

En un trabajo realizado anteriormente en el laboratorio se investigó el efecto del RSV en un modelo de ratón transgénico haplo-insuficiente o *knock-out*, al cual se inactivó un alelo del gen *Atp2a2*, removiendo el promotor y los dos primeros exones, los cuales eliminaron la expresión del gen mutante, con el fin de medir y comparar la disminución de la actividad de SERCA2 en la función cardíaca. Sin embargo, la eliminación total de la función de SERCA en animales homocigotos embrionarios es letal, ya que la ruptura de una copia del gen *Atp2a2* resulta una disminución del ARNm de SERCA2 (~45%), proteína (~35%) y la captura de  $Ca^{2+}$  en el RS (~35%) (M Periasamy et al., 1999). Los ratones *Atp2a2*<sup>+/-</sup> (50% 129/Svj, 50% Black Swiss) fueron cruzados para obtener los ratones *wild-type* y ratones *knock-out ATP2A2*<sup>+/-</sup>

. En este trabajo fue administrada una dieta suplementada con RSV (100mg/kg p.c./día) por 90 días a los ratones *wild-type (WT)* y los ratones *knockout Atp2a2+/- (KO)* estudiando cuatro grupos: WT, KO, WT+RSV y KO+RSV. Se encontró que el RSV mejoró la expresión de ARNm de SERCA2a en cardiomiocitos de corazón de ratón WT ( $\approx 22\%$ ) y KO ( $\approx 30\%$ ). Mientras que, en ratones KO alimentados con una dieta normal se obtuvo una disminución en la expresión de ARNm de SERCA2 de  $\approx 40\%$ . Estos resultados sugieren que el RSV tiene un efecto benéfico cuando la expresión de ARNm de SERCA2a se ve disminuida (Guzmán-Bárceñas, 2013).

Con base en estos antecedentes, en este proyecto de tesis se propuso investigar el efecto del RSV sobre la expresión de genes y proteínas que participan en la respuesta contra el estrés oxidante, la apoptosis, y sobre la expresión de la bomba de calcio SERCA2a en cardiomiocitos de ratas neonatas en cultivo.

### **3. HIPÓTESIS.**

El RSV protege del estrés oxidante a los cardiomiocitos mediante cambios en la expresión de ARNm de SERCA2a, enzimas antioxidantes como son la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT), y de proteínas que participan en la apoptosis como son Bcl-2 y BIM.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL.

Analizar los cambios que produce el RSV sobre la expresión del ARNm de *SERCA2a*, *SIRT1*, *SOD*, *CAT*, *Bcl-2* y *BIM*, bajo condiciones de estrés oxidante generado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De igual manera, analizar los cambios que produce el RSV sobre la expresión de proteína de SERCA2, caspasa-3 y Bcl-2, bajo condiciones de estrés oxidante generado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 4.2 Objetivos específicos.

1. Comprobar el efecto del RSV en cardiomiocitos de rata neonata sobre la expresión del ARNm de *SERCA2a* tratados con diferentes concentraciones de RSV.
2. Cuantificar la expresión del ARNm de *SERCA2a*, *SIRT1*, *CAT*, *SOD*, *BIM* y *Bcl-2* en cardiomiocitos de rata neonata en cultivos tratados con diferentes concentraciones de RSV.
3. Cuantificar la viabilidad celular de los cardiomiocitos de rata neonata en cultivo tratados a diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y tratados con/sin RSV.
4. Cuantificar la expresión del ARNm de *SERCA2a*, *SIRT1*, *CAT*, *SOD*, *BIM* y *Bcl-2* en cardiomiocitos de rata neonata en cultivo sin tratamiento, tratados con RSV, tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y tratados con RSV y con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
5. Evaluar los niveles de las proteínas SERCA2, Caspasa-3 y Bcl-2, en cardiomiocitos de rata neonata en cultivo sin tratamiento, tratados con RSV, tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y tratados con RSV y con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## **5. METODOLOGÍA**

### **5.1 Cultivo primario de cardiomiocitos y tratamiento.**

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar Kyoto de 1 a 3 días de edad. Todos los procedimientos de sacrificio de los animales fueron realizados de acuerdo a las regulaciones federales para el uso y cuidado de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural en México y con la aprobación del comité de ética e investigación de la Facultad de Medicina, UNAM (FM/DI/122/2017).

#### **5.1.1 Aislamiento y cultivo de cardiomiocitos ventriculares de ratas neonatas**

En condiciones asépticas, se fijaron las patas delanteras de la rata en una posición suave y se limpió el cuerpo con benzal. Las ratas fueron decapitadas mediante un corte transversal desde el cuello hasta la altura del diafragma con una tijera quirúrgica. Se levantó el corazón fuera de la cavidad torácica, se retiraron las aurículas y se transfirió rápidamente el resto del corazón a una solución amortiguadora ADS 1X compuesto por las siguientes concentraciones finales: NaCl 116mM, Hepes 20mM (pH=7.4),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1mM, Glucosa 5.5mM, KCl 5.4mM y  $\text{MgSO}_4$  0.8mM. Después de la recolección de corazones se remueven las aurículas y se fragmentan los ventrículos en solución ADS para lavar el tejido (3 veces). Posteriormente se centrifugan y se retira el sobrenadante. La digestión enzimática y la disociación de los cardiomiocitos se llevó a cabo según el protocolo estandarizado en el laboratorio, el cual es una modificación de un protocolo previamente reportado (Louch, 2011).

Para la digestión enzimática se utilizó pancreatina al 0.06% y colagenasa tipo II al 0.03% adicionadas en ADS; se mantuvieron los tubos en agitación constante por 15 minutos a 37°C. La disociación de los ventrículos se realizó mecánicamente, se centrifugaron para recuperar el sobrenadante y se agregó medio de cultivo

Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) con 20% de suero fetal bovino (SFB) a 4°C para inactivar la digestión enzimática. Esta última fase se realizó por 4 veces más por 10 minutos cada una, seguidas de la disociación. Posteriormente se recuperó el total de células en DMEM + 20% SFB y se pasó dicha suspensión por una malla de tela de aproximadamente 50 µm de diámetro. Se centrifugó la suspensión celular recuperada a 800 rpm por 3 minutos a 20°C. Se desechó el sobrenadante, se re-suspendió la pastilla en DMEM + 10% SFB como un último lavado y se centrifugó para eliminar el sobrenadante.

Por último, los cardiomiocitos se cultivaron en medio DMEM que contiene 10% (vol/vol) de suero fetal bovino (SFB), 1% (vol/vol) de penicilina-estreptomina y 5-bromo-2'-deoxiuridina (5BrDU; 100 µmol/L) para evitar el crecimiento de fibroblastos. Se utilizaron cajas de cultivo celular tratadas con poli-D-lisina de 6 pozos, 12 pozos y cajas Petri p60 dependiendo del protocolo que se iba a llevar a cabo. Se incubaron a 37°C a una atmosfera de 96% O<sub>2</sub> con 4% de CO<sub>2</sub> a un pH de 7.3 - 7.4.

Se realizó un lavado para remover las células muertas que no habían logrado adherirse al fondo de la placa 24 horas después del aislamiento de cardiomiocitos.

El SFB se utilizó al inicio del cultivo de los cardiomiocitos por un periodo de tiempo de 24 a 48 horas aproximadamente para mejorar la adherencia de las células a las placas, después de este tiempo se cambió de medio DME a medio OPTIMEM con 3% de SFB y 5-BrDU 0.1mM en todos los casos.

### **5.1.2 Tratamientos con resveratrol (RSV) y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

El RSV utilizado en este proyecto de investigación fue de la marca comercial Megaresveratrol® (Danbury, CT, USA), la cual certifica una pureza del 99% de trans-resveratrol. El RSV se disolvió en etanol absoluto, partiendo de una solución stock que contenía 10mg/mL etanol (43.8 mM). El RSV se agregó directamente al medio DME con SFB y 5BrDU en condiciones con poca luz debido a su fotosensibilidad. Los controles consistieron en cultivos con medio DME y otro cultivo

control con medio DME más el vehículo para corroborar que los efectos observados se debieran exclusivamente al tratamiento de RSV.

El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) que se utilizó para generar estrés oxidante a las células fue de grado farmacéutico con una concentración del 3% (3 g de  $H_2O_2$  por cada 100 g de  $H_2O$ ). Se diluyó en agua bi-destilada estéril, partiendo de una solución stock 1:100 y se agregó directamente al medio OPTIMEM en condiciones con poca luz debido a su fotosensibilidad.

El diseño experimental de los tratamientos del RSV y del  $H_2O_2$  surgió de la siguiente forma:

1. Se realizó una curva de concentraciones de RSV de 25, 50, 100, 150 y 200  $\mu M$  por 24, 48 y 72 horas, donde se determinó la concentración final a utilizar.
2. Para demostrar el efecto protector del RSV en los cardiomiocitos de rata neonata contra el estrés oxidante generado por  $H_2O_2$ , se definió que los cardiomiocitos recibirían el tratamiento con RSV y posteriormente un tratamiento con  $H_2O_2$ .
3. Los cardiomiocitos fueron tratados en presencia y ausencia de RSV (150  $\mu M$ ) por 48 horas y posteriormente fueron expuestos a diferentes concentraciones de  $H_2O_2$  (10-100  $\mu M$ ) por 12 horas. Se tomaron fotos al término de los tratamientos y se compararon. Se utilizó estaurosporina (STP) 4  $\mu M$  por 12 horas como control positivo para inducción de apoptosis.
4. Posteriormente, se realizaron curvas de concentración de  $H_2O_2$  para la cuantificación de viabilidad celular. Las concentraciones que se utilizaron fueron 100, 200, 300, 400 y 500  $\mu M$  por 24 horas.
5. Considerando definidas las concentraciones a utilizar, se cuantificó la viabilidad celular de los cardiomiocitos expuestos al tratamiento de RSV seguido del tratamiento con  $H_2O_2$ .
6. Con el objetivo de analizar el efecto del RSV y  $H_2O_2$  en la expresión del ARNm y proteína se crearon seis grupos experimentales:
  - **Grupo Control:** Cardiomiocitos sin tratamiento

- **Grupo Control + EtOH:** Cardiomiocitos sin tratamiento (vehículo=etanol)
- **Grupo A:** Cardiomiocitos tratados con 150  $\mu\text{M}$  RSV por 72 horas.
- **Grupo B:** Cardiomiocitos tratados con 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por 24 horas.
- **Grupo C:** Cardiomiocitos tratados con 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por 24 horas.
- **Grupo D:** Cardiomiocitos tratados con 150  $\mu\text{M}$  RSV por 72 horas y posteriormente 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por 24 horas.
- **Grupo E:** Cardiomiocitos tratados con 150  $\mu\text{M}$  RSV por 72 horas y posteriormente 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por 24 horas.

## 5.2 Extracción de ARN total y cuantificación de ARN mensajeros.

Se realizó la extracción del ARN total del cultivo primario de cardiomiocitos usando Trisure® (Bioline 38033) siguiendo el protocolo del fabricante que está basado en el método descrito por Chomczynski y Sacchi (Chomczynski, 1987). Se cuantificó la concentración de ARN total por espectrofotometría a una absorbancia de 260nm con un equipo Nanodrop 2000®. Se determinó un ARN total de buena calidad si la relación 280/260 nm era  $\leq 1.8$ . Por otra parte, para cerciorarse de que el ARN total no sufrió degradación alguna, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% con formaldehído. Para analizar la expresión del ARNm de los genes de estudio, se llevó a cabo la síntesis de ADNc por el método de la enzima transcriptasa reversa de M-MLV (Invitrogen 28025-013), iniciando con 1  $\mu\text{g}$  de ARN total en un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ .

### 5.3 Diseño de oligonucleótidos

Las secuencias de los oligonucleótidos se diseñaron con el software Primer-Blast de NCBI. La Tabla 1 muestra las secuencias de los pares de oligonucleótidos que se utilizaron para la cuantificación de la expresión del ARNm.

**Tabla 1. Diseño de las secuencias de oligonucleótidos.**

ADNc	# de acceso Genebank	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	RT-PCR tamaño producto
<b>SERCA2a</b>	4847 – 5276	5' GGCTGATGGTGCTGAAAATCTC 3'	5' CAATGTTTAGGAAGCGGTTACTCC 3'	110 pb
<b>SIRT 1</b>	XM_006256146.2	5'GGTCAGGCTGGTTTACAACG 3'	5' TTT GAGGCCGGTTTGGCTTA 3'	132 pb
<b><math>\beta</math>-actina</b>	V01217.1	5'TTGGAGCAAACATCCCCAAA 3'	5' TGCCGTGGATACTTGGAGTG 3'	105 pb
<b>Catalasa</b>	NM_012520.2	5'AGAGGAAACGCCTGTGTGAG 3'	5' TAGTCAGGGTGGACGTCAGT 3'	103 pb
<b>SOD Cu-Zn</b>	X05634.1	5'GTGGTGTGATTGGGATTGCC 3'	5'ACAGTTTAATGGTTTGGTTTCTACA 3'	101 pb
<b>BIM</b>	NM_022612.1	5'GAGAAGGTGGACAATTGCAGC 3'	5' GCTCCTGTCTTGCGATTCTGT 3'	92 pb
<b>Bcl-2</b>	NM_016993.1	5'TGGTGGACAACATCGCTCTG 3'	5' AGTCCACAAGGCATCCCA 3'	97 pb

### 5.4 RT-PCR en tiempo real.

Para cuantificar la abundancia relativa de los ARNm de interés, después de obtener el ADNc se realizó una PCR tiempo real utilizando como marcado fluorescente SYBR® Green en un termociclador Rotor-Gene®. Se lleva a cabo la activación de la Taq ADN polimerasa y desnaturalización del ADN a 95°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificación los cuales consisten de 5 segundos a 95°C y 10 segundos a 60°C, finalizando con la determinación de una curva de fusión desde 50°C a 95°C. Cada muestra se midió por triplicado obteniendo los datos de amplificación en escala logarítmica y se teniendo como resultado valores de Ct (ciclo umbral o threshold), los cuales se fijan con una línea recta en el umbral de 0.02. La normalización de los resultados se realizó utilizando la amplificación de  *$\beta$ -actina* como gen control. Se analizaron las gráficas resultantes de la amplificación de las muestras normalizadas con el control por el método  $\Delta\Delta$ Ct (Pfaffl, 2001).

## 5.5 Cuantificación de viabilidad celular.

Para la cuantificación de viabilidad celular se utilizó el reactivo PrestoBlue®. Es un método fluorescente que utiliza una solución basada en resazurina, la cual es inicialmente azul y sin valor intrínseco fluorescente. Esta solución se reduce a resorufina que cambia a un color rojo y con un alto valor fluorescente. El cambio se mide por fluorescencia con una excitación a 560/590nm y una absorbancia a 570 nm.

Se cultivaron cardiomiocitos de rata neonata en placas de 96 pozos y se llevaron a cabo los tratamientos correspondientes. Al término de los tratamientos, se agregó el reactivo en una relación 1:10 y se incubó a 37°C por un mínimo de 30 min y un máximo de 24 h para determinar el punto de mayor sensibilidad de detección. La medición de fluorescencia se realizó en un Multilabel Counter Victor 2 (Perkin Elmer). Los valores más altos de fluorescencia se correlacionan con mayor actividad metabólica.

Para determinar el % de viabilidad celular se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ viabilidad celular} = \frac{\text{absorbancia pozos problema}}{\text{absorbancia pozos control}} * 100$$

## 5.6 Western blot

La proteína se extrajo de los cultivos de cardiomiocitos por el método de Trisure® y se cuantificó a 280nm con un equipo Nanodrop 2000®. Se desnaturalizó la proteína, se separaron mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) en cantidades iguales (40 µg/carril) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Posteriormente, se bloquearon con 5% de leche descremada en TBS-T por 2 horas a temperatura ambiente, las membranas fueron incubadas toda la noche a 4° C con la dilución del anticuerpo primario de la proteína de interés (SERCA2 1:5000, Caspasa-3 1:1000, Bcl-2 1:1000 y Actina 1:5000),

seguida de una incubación con el anticuerpo secundario por 2 horas a temperatura ambiente. Se usó un kit de detección por quimioluminiscencia y se obtuvo la imagen del blot con un Li-Cor C-Digit® Blot scanner. Se realizó la densitometría con el software Image Studio Digits®. Se utilizaron los valores de  $\beta$ -actina como control de carga de proteína.

## **5.7 Análisis estadístico**

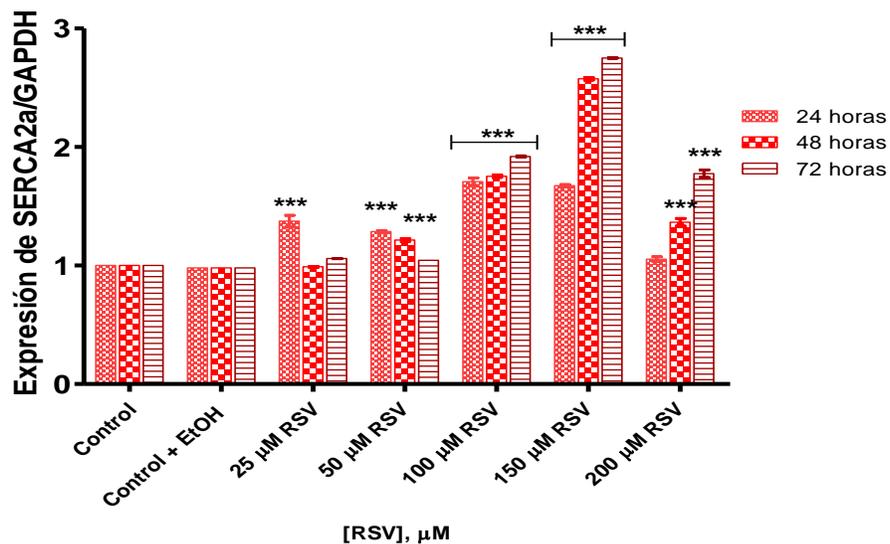
Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar. Las diferencias estadísticas de los ensayos de viabilidad celular y de expresión génica y proteica fueron determinadas mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba Dunnett (expresión génica) o Bonferroni (VC y WB), utilizando un software especializado (GraphPad Prism 5).  $p < 0.005$  (\*\*\*) ,  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.05$  (\*)

## 6. RESULTADOS

### 6.1 El RSV induce el aumento de la expresión del ARNm de SERCA2a en cardiomiocitos de rata neonata.

Con el objetivo de conocer el efecto que tiene el RSV en la expresión de ARNm de SERCA2a y a su vez para establecer la concentración de RSV óptima a usar en este trabajo, se realizó una cinética dosis-respuesta. Se examinó el curso temporal a las 24, 48 y 72 horas, usando concentraciones de 25  $\mu\text{M}$  a 200  $\mu\text{M}$  de RSV. Se observó que el RSV indujo un aumento sobre la expresión de SERCA2a y teniendo un punto máximo de expresión génica a 150  $\mu\text{M}$  de RSV a las 48 y 72 horas (Figura 10).

A las 24 horas se observó el máximo aumento de 1.7 veces a 100  $\mu\text{M}$  en la expresión de SERCA2a, a las 48 horas se obtuvo la máxima expresión de 1.5 veces a 150  $\mu\text{M}$  de RSV comparado con el control; y para el tratamiento por 72 horas se observó una tendencia similar a la de la curva de 48 horas, obteniendo un máximo aumento de de 1.75 veces a 150  $\mu\text{M}$ .

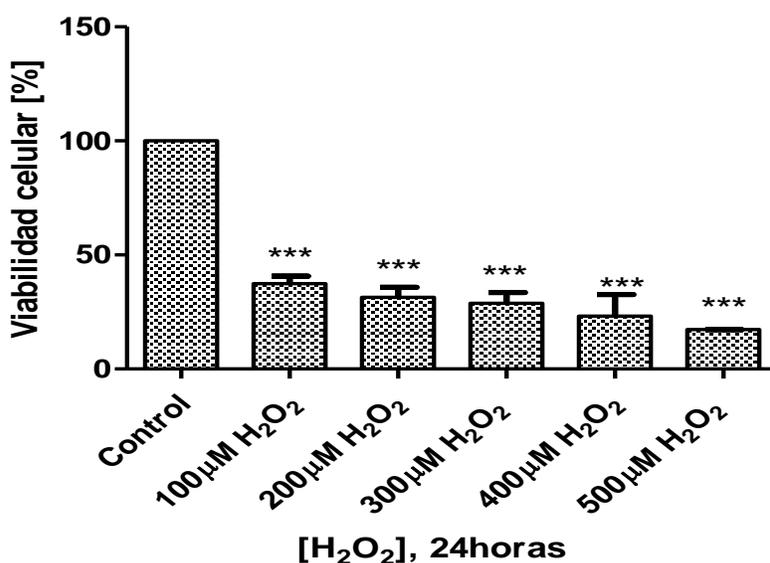


**Figura 10. Curva de la concentración de resveratrol [ $\mu\text{M}$ ] a 24, 48 y 72 horas.**

Para cada condición de cada tiempo se utilizaron 3 cultivos celulares diferentes e independientes. Cada condición se realizó por duplicado en cada cultivo celular ( $n=6$  por cada condición). A cada muestra se le cuantificó el Ct por triplicado del gen de estudio (SERCA2a) y del gen normalizador (GAPDH) mediante RT-PCR. Los resultados mostrados son promedios del  $\Delta\Delta\text{Ct}$   $\pm$  SEM. Se realizó una prueba de ANOVA y posteriormente la prueba de Dunnett \*\*\* $P<0.001$  vs. Control

## 6.2 El RSV protege la disminución de la viabilidad celular causada por el estrés oxidante en cultivo de cardiomiocitos de rata neonata.

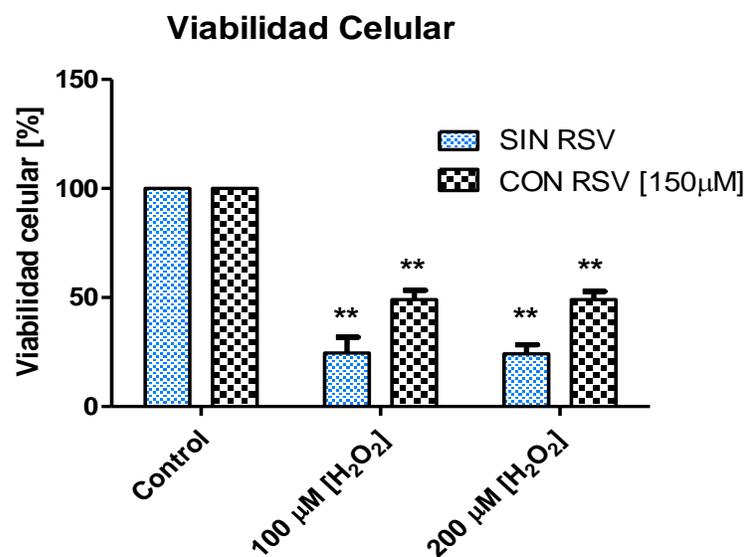
Para entender el papel que tiene el RSV en la supervivencia de los cardiomiocitos de rata neonata en cultivo se midió la viabilidad celular. Como se muestra en la Figura 11 se cuantificó el porcentaje de viabilidad celular en los cardiomiocitos tratados con  $H_2O_2$  (100-500  $\mu M$ ) por 24 horas de exposición y se encontró que a mayor concentración de  $H_2O_2$  fue menor el % de viabilidad celular. Para este trabajo se buscó una concentración de  $H_2O_2$  que permitiera la disminución de la viabilidad celular y al mismo tiempo que permitiera tener la suficiente cantidad de células para llevar a cabo la extracción. La viabilidad celular a 100  $\mu M$  fue de 37.4%; para las siguientes concentraciones fue de 31.4%, 28.78%, 23.22% y 17.27%, respectivamente.



**Figura 11. Determinación de la viabilidad celular en cardiomiocitos después del tratamiento con  $H_2O_2$  por 24 horas.**

Se utilizaron placas de 96 pozos. Se realizaron 3 cultivos celulares diferentes e independientes. Cada condición se realizó 16 veces (16 pozos) en cada cultivo celular ( $n=48$  por cada condición). Se midió absorbancia a 570 nm a cada muestra y se calculó el porcentaje de viabilidad celular. Los resultados que se grafican son promedios de experimentos triplicados,  $\pm$  SEM. Se realizó una prueba de ANOVA y posteriormente la prueba de Bonferroni \*\*\* $P<0.001$ .

En la Figura 12 se muestran los resultados del % de viabilidad celular en cardiomiocitos tratados con RSV a 150  $\mu\text{M}$  por 72 horas y posteriormente un tratamiento con 100 y 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por 24 horas. En esta gráfica se puede apreciar una disminución significativa en los cuatro grupos de cardiomiocitos tratados con  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; sin embargo los cardiomiocitos que recibieron un tratamiento con RSV tuvieron mayor supervivencia. A 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  el % de viabilidad celular en los cardiomiocitos no tratados con RSV disminuyó significativamente a 31.23% y en los cardiomiocitos tratados con RSV disminuyó significativamente a 49%. Mientras que a 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  % de viabilidad celular se calculó en 24.2% para células no tratadas y 49% para células tratadas con RSV. Estos resultados sugieren que el RSV protege la viabilidad de los cardiomiocitos en un ambiente oxidante generado por  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

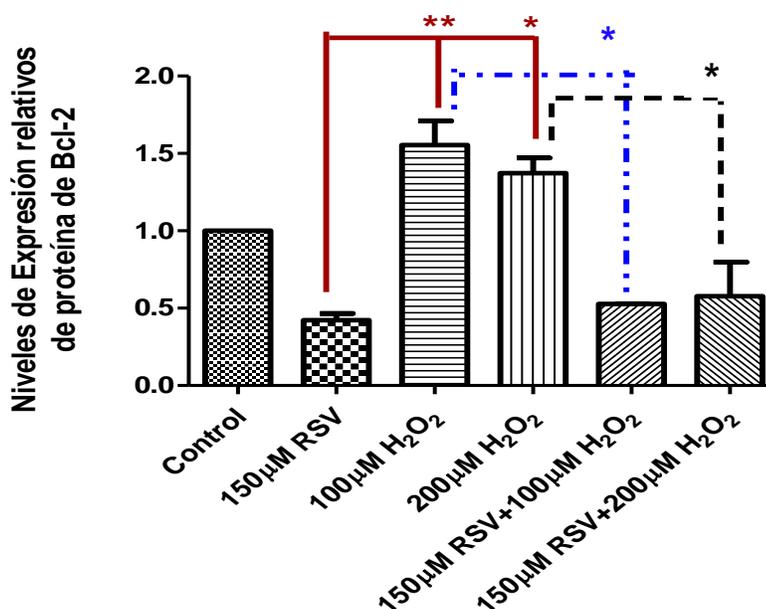


**Figura 12. Determinación de la viabilidad celular en cardiomiocitos en ausencia y presencia de RSV 150 $\mu\text{M}$  por 72 horas y posteriormente tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$  por 24 horas.**

Se utilizaron placas de 96 pozos. Se realizaron 3 cultivos celulares diferentes e independientes. Cada condición se realizó 16 veces (16 pozos) en cada cultivo celular ( $n=48$  por cada condición). Primero se realizó el tratamiento con RSV según la condición y posteriormente se trataron a los cardiomiocitos con  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Se midió absorbancia a 570nm a cada muestra (cada pozo) y se calculó el porcentaje de viabilidad celular (%VC). Los resultados que se grafican son promedios de experimentos triplicados,  $\pm$  SEM. Se realizó una prueba de ANOVA y posteriormente la prueba de Bonferroni \*\*\* $P<0.001$ .

### 6.3 Efecto del RSV en la apoptosis inducida por estrés oxidante en cardiomiocitos de rata neonata.

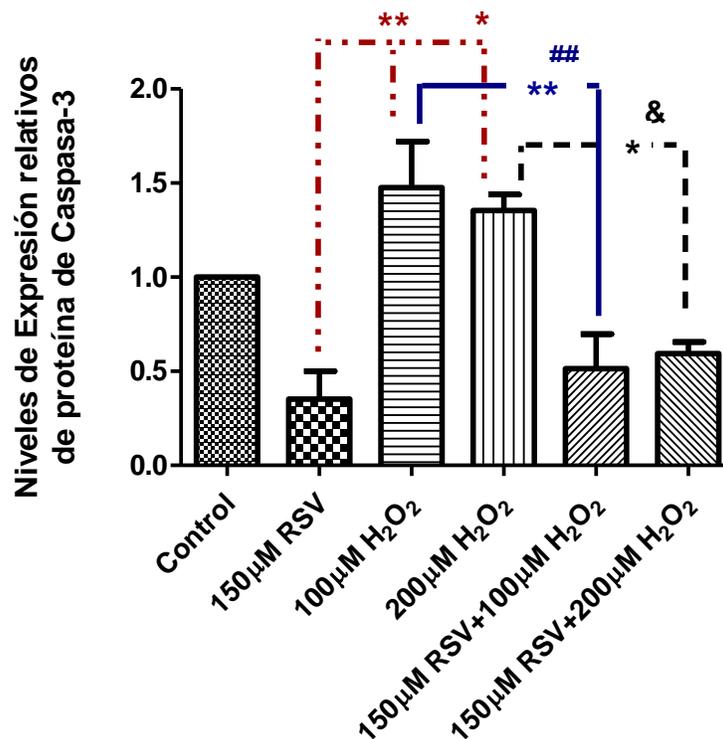
En la Figura 13 se muestra los niveles de expresión de proteína de Bcl-2, enzima que participa en la vía de señalización de la apoptosis como una proteína anti-apoptotica. Se observó que cuando las células son tratadas con RSV, la expresión proteica se redujo a 48% con respecto al control. Mientras que cuando las células son tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> los niveles de proteína aumentaron alrededor de 150% comparados con el grupo control. Cuando se tienen ambos tratamientos los niveles de Bcl-2 disminuyeron a 52% y 57% con respecto al control.



**Figura 13. Efecto del resveratrol y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los niveles de proteína de Bcl-2.**

Para cada condición se utilizaron 3 cultivos celulares diferentes e independientes. Cada condición se realizó por duplicado en cada cultivo celular (n=6 por cada condición). Primero se realizó el tratamiento con RSV según la condición y posteriormente se trataron a los cardiomiocitos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se realizó una electroforesis en gel y posteriormente se realizó Western blot de las muestras. Se detectó la unión antígeno-anticuerpo por quimioluminiscencia y se realizó la densitometría a las bandas de interés. El peso molecular (PM) de Bcl-2 es 24 kDa; el PM de actina (proteína control) es 40kDa. Los resultados que se grafican son promedios de experimentos duplicados, +/- SEM. Se realizó una prueba de ANOVA y posteriormente la prueba de Bonferroni \*\*P<0.001.

En la Figura 14, se encuentran graficados los niveles de expresión de proteína de caspasa-3. En el presente trabajo, se evaluaron las células tratadas con RSV donde los niveles de proteína de caspasa-3 disminuyeron en 65%, de manera que, los cardiomiocitos en condiciones normales no mostraron un cambio en los niveles de caspasa-3. Entonces, cuando las células se encuentran bajo un tratamiento con  $H_2O_2$  se observa un aumento en los niveles de caspasa-3 y una disminución en el % de viabilidad celular.



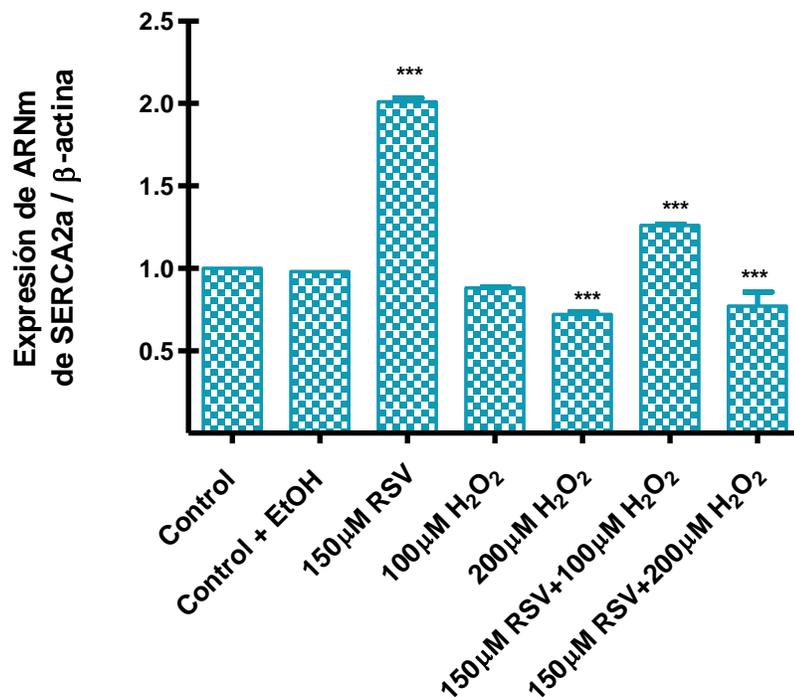
**Figura 14. Efecto del resveratrol y  $H_2O_2$  en los niveles de proteína de caspasa-3.**

Para cada condición se utilizaron 3 cultivos celulares diferentes e independientes. Cada condición se realizó por duplicado en cada cultivo celular ( $n=6$  por cada condición). Primero se realizó el tratamiento con RSV según la condición y posteriormente se trataron a los cardiomiocitos con  $H_2O_2$ . Se realizó una electroforesis en gel y posteriormente se realizó Western blot de las muestras. Se detectó la unión antígeno-anticuerpo por quimioluminiscencia y se realizó la densitometría a las bandas de interés. El PM de cleaved caspasa-3 (activa) es 17 kDa; el PM de actina (proteína control) es 40kDa. Los resultados que se grafican son promedios de experimentos duplicados,  $\pm$  SEM. Se realizó una prueba de ANOVA y posteriormente la prueba de Bonferroni  $**P<0.005$  y  $*P>0.05$

Interesantemente, cuando los cardiomiocitos se tratan con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se observa un aumento de la expresión proteica de caspasa-3 de 1.47 veces para los cardiomiocitos tratados con 100 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 24 horas y de 1.35 veces para los cardiomiocitos tratados con 200 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 24 horas. El tratamiento con RSV impide que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumente los niveles de proteína de caspasa-3; en los cardiomiocitos tratados con 150 µM RSV por 72 horas y posteriormente 100 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 24 horas, se observó con una prevención del aumento de caspasa-3 comparado con los cardiomiocitos tratados con 100 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 24 horas, al igual que en los cardiomiocitos tratados con 150 µM RSV por 72 horas y posteriormente 200 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 24 horas

#### **6.4 Efecto del RSV y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la expresión de los genes de estudio en cardiomiocitos de rata neonata en cultivo.**

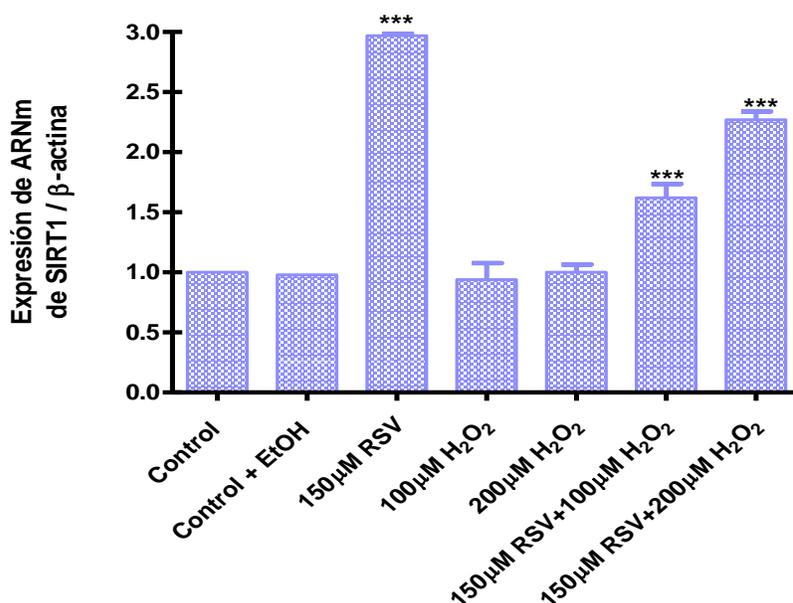
Una vez elegidas las condiciones experimentales para el estudio del efecto del RSV y del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en cardiomiocitos de rata neonata en cultivo, se cuantificó la expresión del ARNm de *SERCA2a*, *SIRT1*, *CAT*, *SOD*, *BIM* y *Bcl-2*. En la Figura 15, se muestran los niveles relativos del ARNm de *SERCA2a*, donde se encontró que el tratamiento con RSV aumenta 2 veces la expresión génica de *SERCA2a*. El estímulo con 100 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 24 horas no mostró cambios en la expresión de *SERCA2a*, aunque el estímulo con 200 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 24 horas disminuyó la expresión de *SERCA2a* 28%. La combinación del pre-tratamiento con RSV seguida del estímulo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> previno dicha disminución.



**Figura 15. Efecto del resveratrol y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la expresión del ARNm de SERCA2a.**

Para cada condición se utilizaron 3 cultivos celulares diferentes e independientes. Cada condición se realizó por duplicado en cada cultivo celular ( $n=6$  por cada condición). A cada muestra se le cuantificó el Ct por triplicado del gen de estudio (SERCA2a) y del gen normalizador ( $\beta$ -actina) mediante RT-PCR. Los resultados mostrados son promedios del  $\Delta\Delta Ct \pm$  SEM. Se realizó una prueba de ANOVA y posteriormente la prueba de Dunnett \*\*\* $P < 0.001$  vs. Control

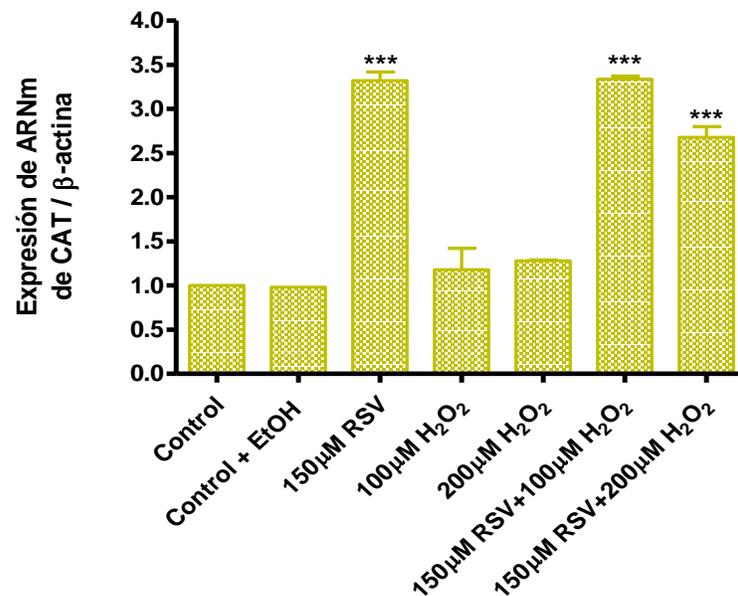
En la Figura 16 se muestran los cambios en la expresión de ARNm de *SIRT1*. En los cardiomiocitos tratados con RSV la expresión de *SIRT1* aumentó 3 veces comparado con el grupo control. El tratamiento con 100 y 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  no alteró los niveles de expresión de *SIRT1*. El pre-tratamiento con RSV seguido de la exposición a  $\text{H}_2\text{O}_2$  mantuvo niveles elevados de *SIRT1* con respecto al control manteniendo sus efectos benéficos en los cardiomiocitos.



**Figura 16. Efecto del resveratrol y del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la expresión del ARNm de *SIRT1*.**

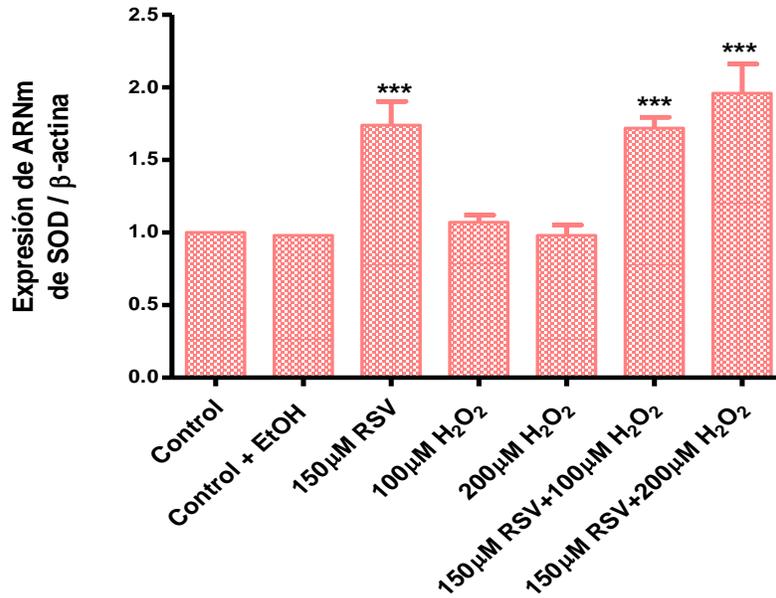
Para cada condición se utilizaron 3 cultivos celulares diferentes e independientes. Cada condición se realizó por duplicado en cada cultivo celular ( $n=6$  por cada condición). A cada muestra se le cuantificó el Ct por triplicado del gen de estudio (*SIRT1*) y del gen normalizador ( $\beta$ -actina) mediante RT-PCR. La expresión de *SIRT1* aumentó 2.97 veces con [150  $\mu\text{M}$  RSV], sin embargo no se mostró una diferencia en la expresión con el tratamiento de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Por otra parte, el tratamiento con RSV y posteriormente el tratamiento con  $\text{H}_2\text{O}_2$  aumenta la expresión de *SIRT1*. Los resultados mostrados son promedios del  $\Delta\Delta\text{Ct} \pm \text{SEM}$ . Se realizó una prueba de ANOVA y posteriormente la prueba de Dunnett \*\*\* $P < 0.001$  vs. Control

Debido a que los mecanismos moleculares subyacentes a la inducción de enzimas antioxidantes no han sido bien determinados, en este trabajo se analizó el ARNm de las enzimas antioxidantes *CAT* y *SOD* (Figuras 17 y 18). La expresión de ambas enzimas aumentó con el tratamiento con RSV; para *CAT* el aumento fue de 3.3 veces y para *SOD* el aumento fue de 1.74 veces, comparado con el control, respectivamente. La exposición a  $H_2O_2$  no alteró la expresión de *CAT* y *SOD*. Cuando los cardiomiocitos fueron pre-tratados con RSV, el  $H_2O_2$  no disminuyó su expresión significativamente.



**Figura 17. Efecto del resveratrol y  $H_2O_2$  en la expresión del ARNm de *CAT*.**

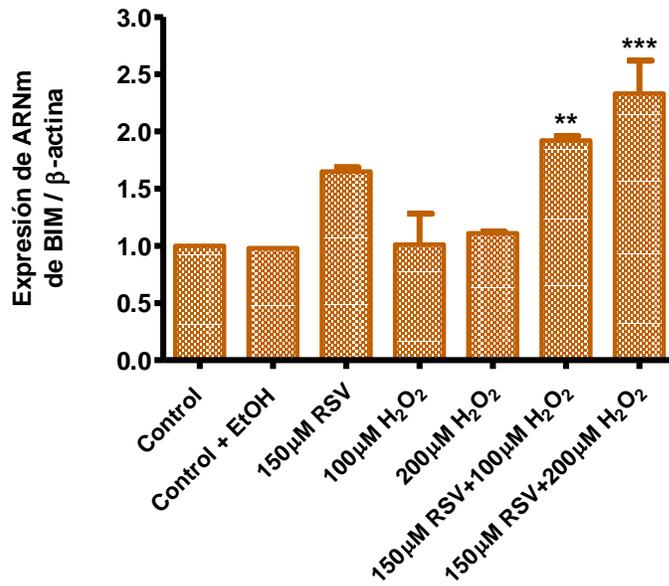
Para cada condición se utilizaron 3 cultivos celulares diferentes e independientes. Cada condición se realizó por duplicado en cada cultivo celular ( $n=6$  por cada condición). A cada muestra se le cuantificó el Ct por triplicado del gen de estudio (*CAT*) y del gen normalizador ( $\beta$ -actina) mediante RT-PCR. La expresión de *CAT* aumentó 3.3 veces con [150  $\mu$ M RSV], sin embargo no se mostró una diferencia en la expresión con el tratamiento de  $H_2O_2$ . Por otra parte, el tratamiento con RSV y posteriormente el tratamiento con  $H_2O_2$  aumenta la expresión de *CAT*. Los resultados mostrados son promedios del  $\Delta\Delta Ct \pm$  SEM. Se realizó una prueba de ANOVA y posteriormente la prueba de Dunnett \*\*\* $P < 0.001$  vs. Control



**Figura 18. Efecto del resveratrol y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la expresión del ARNm de SOD.**

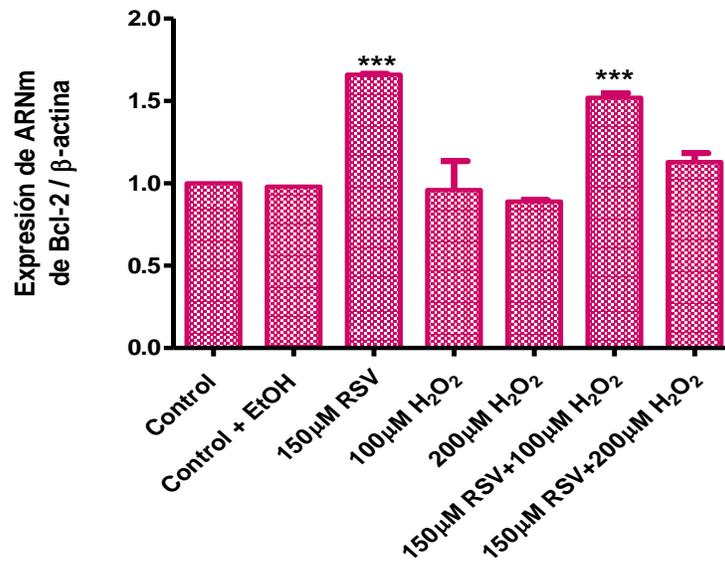
Para cada condición se utilizaron 3 cultivos celulares diferentes e independientes. Cada condición se realizó por duplicado en cada cultivo celular ( $n=6$  por cada condición). A cada muestra se le cuantificó el Ct por triplicado del gen de estudio (SOD) y del gen normalizador ( $\beta$ -actina) mediante RT-PCR. La expresión de SOD aumentó 1.74 veces con [150  $\mu$ M RSV], sin embargo no se mostró una diferencia en la expresión con el tratamiento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por otra parte, el tratamiento con RSV y posteriormente el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumenta la expresión de SOD. Los resultados mostrados son promedios del  $\Delta\Delta Ct \pm$  SEM. Se realizó una prueba de ANOVA y posteriormente la prueba de Dunnett \*\*\* $P < 0.001$  vs. Control

El análisis del ARNm de las proteínas pro y anti-apoptóticas, *BIM* (Figura 19) y *Bcl-2* (Figura 20), reveló un aumento a 150  $\mu$ M de RSV. La expresión de *BIM* aumentó 1.65 veces con respecto al control y *Bcl-2* aumentó 1.66 veces con respecto al control. La exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no alteró la expresión de *BIM* y *Bcl-2*. Cuando los cardiomiocitos fueron pre-tratados con RSV, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no disminuyó su expresión significativamente, manteniéndose niveles elevados con respecto al control.



**Figura 19. Efecto del resveratrol y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la expresión del ARNm de BIM.**

Para cada condición se utilizaron 3 cultivos celulares diferentes e independientes. Cada condición se realizó por duplicado en cada cultivo celular (n=6 por cada condición). A cada muestra se le cuantificó el Ct por triplicado del gen de estudio (BIM) y del gen normalizador (β-actina) mediante RT-PCR. Los resultados mostrados son promedios del ΔΔCt +/- SEM. Se realizó una prueba de ANOVA y posteriormente la prueba de Dunnett \*\*\*P<0.001 vs. Control



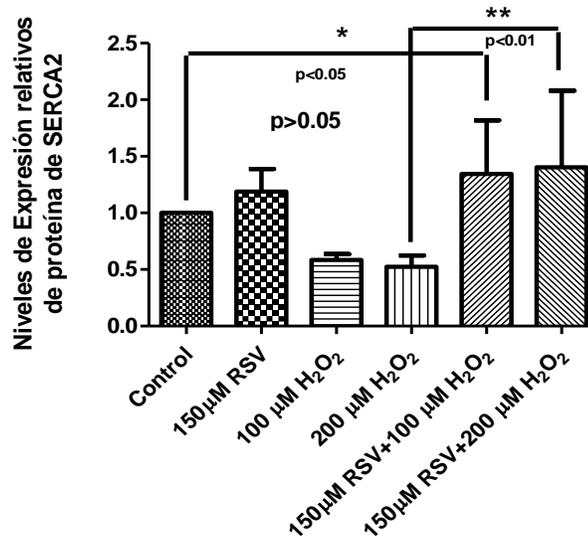
**Figura 20. Efecto del RSV y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la expresión del ARNm de Bcl-2.**

Para cada condición se utilizaron 3 cultivos celulares diferentes e independientes. Cada condición se realizó por duplicado en cada cultivo celular (n=6 por cada condición). A cada muestra se le cuantificó el Ct por triplicado del gen de estudio (Bcl-2) y del gen normalizador (β-actina) mediante RT-PCR. Los resultados mostrados son promedios del ΔΔCt +/- SEM. Se realizó una prueba de ANOVA y posteriormente la prueba de Dunnett \*\*\*P<0.001 vs. Control

## 6.5 Efecto del RSV y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre los niveles de proteína de SERCA2a en cardiomiocitos de rata neonata en cultivo.

En la Figura 21 se observa el nivel de expresión proteica de SERCA2a. El tratamiento de los cardiomiocitos con RSV aumento (20-30%) la abundancia de proteína de SERCA2a. En contraste, el tratamiento de los cardiomiocitos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disminuyó casi 50% los niveles de proteína de SERCA2a. Asimismo, el aumento en los niveles de SERCA2a se mantuvo cuando los cardiomiocitos fueron pre-tratados con RSV y luego expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Estudios anteriores han demostrado que el RSV restablece la expresión génica y mejora la función cardíaca en ratones con cardiomiopatía diabética (Sulaiman et al., 2010). En este trabajo se demostró que el tratamiento con RSV protege a los cardiomiocitos de la disminución de la expresión génica y los niveles de proteína de SERCA2a causado por estrés oxidante inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Este resultado concuerda con los modelos experimentales en cardiomiocitos de corazones con cardiomiopatía diabética y daño por I/R.



**Figura 21. Efecto del RSV y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los niveles de proteína de SERCA2a.**

Para cada condición se utilizaron 3 cultivos celulares diferentes e independientes. Cada condición se realizó por duplicado en cada cultivo celular (n=6 por cada condición). Primero se realizó el tratamiento con RSV según la condición y posteriormente se trataron a los cardiomiocitos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se realizó una electroforesis en gel y posteriormente se realizó Western blot de las muestras. Se detectó la unión antígeno-anticuerpo por quimioluminiscencia y se realizó la densitometría a las bandas de interés. El PM de SERCA2 es 110kDa; el PM de actina (proteína control) es 40kDa. Los resultados que se grafican son promedios de experimentos duplicados, +/- SEM. ANOVA, prueba de Bonferroni \*\*P<0.01 y \*P>0.05.

## 7. DISCUSIÓN

El estrés oxidante en los cardiomiocitos juega un papel importante en la patogénesis de insuficiencia cardíaca y del daño por I/R. Se ha demostrado por muchos grupos de investigación, que en pacientes con hipertrofia cardíaca severa y con insuficiencia cardíaca existe una disminución del 50-60% en la expresión de SERCA2a y su función. Además de modificar la expresión del gen, se ha demostrado una reducción del 50% en la recaptación del  $\text{Ca}^{2+}$  en muestras de tejido del ventrículo derecho (Stammers et al., 2015). En un estudio realizado por Koitabashi en el 2005 se demostró por Northern blot que el tratamiento con  $\text{H}_2\text{O}_2$  disminuye al 50% la expresión de ARNm de SERCA2a en cardiomiocitos (Koitabashi et al., 2005). Sin embargo, no se han realizado estudios buscando tratamientos que puedan proteger a los cardiomiocitos de estos daños celulares.

El Resveratrol (RSV) es un antioxidante que ha sido considerado como un suplemento para los tratamientos de las enfermedades cardiovasculares (Conti, 2016). Cabe mencionar que en investigaciones anteriores han utilizado diversas administraciones a concentraciones micromolares de resveratrol, sin embargo, el tratamiento de RSV a largo plazo mejora la función cardíaca *in vivo*, previene contra el daño oxidante y reduce la apoptosis en corazón diabético de ratón (Sulaiman et al., 2010; Wang et al., 2014).

De acuerdo con Sulaiman en el 2010, el tratamiento con RSV por tres meses mejora la expresión génica de *SERCA2a* en corazón de ratones con diabetes inducida con estreptozotocina (STZ). En ese estudio encontraron que la disminución del ARNm de *SERCA2a* causada por la STZ fue de 7 veces comparado con el control. Mientras que, los corazones de ratones que fueron alimentados con RSV y tratados con STZ simultáneamente, no presentaron esa disminución y la expresión de *SERCA2a* fue muy parecida al control (Sulaiman et al., 2010).

A pesar de que en ese estudio se utilizó un modelo *in vivo*, el aumento en la expresión del ARNm de *SERCA2a* en el modelo *in vitro* que se utilizó en este proyecto es bastante similar. Por otra parte Vahtola, Li y Alcendor (Dolinsky & Dyck,

2011) encontraron que en un rango de 2.5-7.5 veces más que los niveles endógenos de la expresión de SIRT1, existe una protección contra el incremento de la hipertrofia cardíaca, apoptosis y la disfunción cardíaca; mientras que 12.5 veces más de la expresión de SIRT1 induce dilatación, hipertrofia y la insuficiencia cardíaca (Alcendor et al., 2007; L. Li et al., 2009; Vahtola et al., 2008).

Se ha demostrado que el RSV restablece la expresión génica de SERCA2a y de la función cardíaca en ratones con diabetes inducida por STZ y se ha sugerido que puede ser mediante la activación directa de SIRT1 (Stammers et al., 2015; Sulaiman et al., 2010). SIRT1 está implicado en varias funciones celulares como la activación y el silenciamiento de genes, el control del ciclo celular, la apoptosis y la estabilidad de la homeostasis celular. Se ha demostrado que la sobre-expresión de SIRT1 inducida por el RSV protege a los cardiomiocitos de daño celular y de la apoptosis inducido por estrés oxidante (Gorski, Graves, Vangheluwe, & Young, 2013).

Por ejemplo, de una baja a moderada sobreexpresión de SIRT1 (2.5-7 veces) en corazones de ratones transgénicos disminuye la hipertrofia cardíaca generada por la edad, apoptosis/fibrosis, insuficiencia cardíaca y expresión de los marcadores de senescencia (Juric et al., 2007). Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo pertenecen a un nivel bajo de sobre-expresión de SIRT1 (menor a 2.5 veces) y se ha demostrado que a estos valores de sobre-expresión disminuye el tamaño del infarto y mejora la función cardíaca en un modelo de ratón de infarto de miocardio. Mientras que, una expresión elevada de SIRT1 de 12.5 veces o más se induce dilatación, hipertrofia e insuficiencia cardíaca (Dolinsky & Dyck, 2011).

Estos resultados fortalecen la idea de que SIRT1 es una molécula pro-crecimiento y pro-supervivencia de cardiomiocitos y su expresión necesita ser controlada estrictamente para obtener los efectos deseables (Yu, 2009) (Sundaresan, 2011) (Zhang, 2011) (Tennen, 2012) (Park, 2012).

Si bien es sabido que el RSV previene la disminución de la actividad enzimática de CAT y SOD ocasionada por estrés oxidante en cultivos primario de cardiomiocitos

de rata neonata y adulta (Guo et al., 2015; Movahed et al., 2012), aún no ha sido reportado el efecto del RSV sobre el mecanismo molecular de estas proteínas. Asimismo, en modelos *in vivo* se ha demostrado que el RSV aumenta la actividad de las enzimas antioxidantes CAT y SOD, las cuales son de gran importancia en la protección del daño causado por EROs en cardiomiocitos. (Kavas, Ayril, & Elhan, 2013; Tse, Yan, Chan, Tian, & Huang, 2016)

A pesar de que el RSV es un compuesto polifenólico, sus efectos antioxidantes directos son bastante pobres. Se ha determinado que el RSV es menos potente que otros antioxidantes bien establecidos como el ascorbato o la cisteína. Es por esto, que los efectos protectores del RSV contra el daño oxidante son atribuidos a la regulación e inducción positiva de los antioxidantes celulares endógenos, en lugar de una eliminación directa de las ERO. Se ha demostrado que el RSV induce la expresión de las tres principales enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx en tejidos (H. Li, Xia, & Förstermann, 2012). La SOD1 (Cu/Zn-SOD) fue la isoforma que se analizó en este trabajo ya que se expresa en tejido cardíaco. Se ha investigado que el RSV disminuye el estrés oxidante mejorando la actividad de las enzimas antioxidantes SOD1 y CAT en cardiomiocitos de rata adulta tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y con alta glucosa. Sin embargo, la actividad de GPX no se vio modificada en los cardiomiocitos tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Es importante mencionar que el RSV no aumentó la actividad de SOD y CAT en los cardiomiocitos control de rata adulta (Guo et al., 2015; Movahed et al., 2012). También se ha demostrado que la sobre-expresión de CAT peroxisomal que se encuentra en el sarcoplasma previene el daño oxidante y la inhibición de SERCA2 en corazón de ratón (Qin et al., 2014).

Bcl-2 y BIM son proteínas que participan en la vía de la apoptosis y son miembros la familia Bcl-2 las cuales son de gran interés por su relación con la vía de señalización por Ca<sup>2+</sup> (Ureshino, Rocha, Lopes, Bincoletto, & Smaili, 2014). Bcl-2 es una proteína anti-apoptótica y participa en varias enfermedades cardíacas evitando que exista un equilibrio entre las células sobrevivientes y las células apoptóticas (Lin et al., 2016). Sin embargo, Shen en 2012 demostró que el RSV aumenta la expresión de Bcl-2 en cardiomiocitos con daño de isquemia/reperfusión

(I/R). De igual manera, Ma en 1999 concluyó que la sobreexpresión de Bcl-2 inhibe la apoptosis generada por la reducción de  $Ca^{2+}$  en el RS en la línea celular de riñón COS-1 (Ma et al., 1999).

En estudios anteriores se ha demostrado que el RSV posee efectos anti apoptóticos en los cardiomiocitos debido a la regulación de la expresión de proteínas que participan en la vía apoptótica como la familia Bcl-2 (Shen et al., 2012; Q. Xu & Si, 2012). En el RS, se ha reportado que Bcl-2 interactúa con el  $IP_3R$  y reduce la liberación del  $Ca^{2+}$ , mientras que, otros estudios han indicado que Bcl-2 puede incrementar, reducir o no tener efecto en la concentración de  $Ca^{2+}$  del RS. También, se ha demostrado que las alteraciones de Bcl-2 pueden estar relacionadas directamente con el estrés oxidante. Esto se debe a que el incremento en la producción de ERO puede causar una disminución en los niveles de Bcl-2. Sin embargo, se ha demostrado que existe una correlación entre una gran producción de ERO y la disminución de Bcl-2 con el aumento de la actividad de enzimas antioxidantes (Ureshino et al., 2014). También se ha propuesto que Bcl-2 previene el daño oxidativo disminuyendo la liberación de  $Ca^{2+}$  del RS y así evitar la apoptosis (Bonneau et al., 2013).

Por otro lado, BIM es una es una de las proteínas reguladoras de la apoptosis en cardiomiocitos y su expresión puede estar regulada por mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales (Ureshino et al., 2014; Y. Xu et al., 2016).

BIM participa en la regulación de la inducción de la apoptosis que puede ser estimulada en los cardiomiocitos por estrés H/R (Hipoxia/re-oxigenación), por daño de I/R, salida de suero y exposición a glucocorticoides. El silenciamiento de BIM en cardiomiocitos es de gran importancia debido a que disminuye significativamente la apoptosis inducida por ausencia de glucosa y oxígeno (Y. Xu et al., 2016). Con respecto a la relación entre el RSV y BIM, se ha demostrado que la expresión de BIM se consideró casi nula comparado con el grupo control y la expresión de Bcl-2 aumentó un 75% en músculo esquelético en ratones de edad avanzada con dieta suplementada con RSV (Sin et al., 2015).

En un estudio realizado por Shen, Wu y Zhao en el 2012 demostraron que la disminución de la viabilidad celular en un modelo de cultivo primario de cardiomiocitos de ratas neonatas con daño de isquemia/reperfusión (I/R) fue  $\approx 35.7\%$ , mientras que, las células con daño I/R y tratadas con RSV obtuvieron una viabilidad celular de  $\approx 87.8\%$  (Shen et al., 2012). Hay que recordar que el daño I/R es un proceso complicado que involucra varios mecanismos como la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  o la generación de EROs que contribuyen a la muerte celular. Sin embargo, la respuesta del RSV en la viabilidad celular es muy similar en el daño causado por  $\text{H}_2\text{O}_2$  como en el daño por I/R.

Existen antecedentes en los que se han encontrado hallazgos parecidos en la viabilidad celular en modelos celulares semejantes al de este proyecto. Movahed en el 2012 demostró que el pre tratamiento de  $30\ \mu\text{M}$  con RSV por 30 minutos a en cardiomiocitos de rata adulta aumentó el porcentaje de supervivencia ( $\approx 50\%$ ) después de un tratamiento de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por 30 minutos ( $\approx 30\%$ ) (Movahed et al., 2012). Del mismo modo, Wei Yu en el 2009 demostró mediante una curva temporal que el RSV (pre-tratamiento con  $20\ \mu\text{M}$  por 30 minutos) protege la viabilidad celular de las células H9C2 contra la citotoxicidad inducida  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Yu et al., 2009).

Se ha demostrado que la caspasa-3 es una enzima clave en la fase de ejecución de la apoptosis en células de mamífero y es responsable de varias características morfológicas de la muerte celular. La caspasa-3 existe normalmente como una proenzima inactiva, y solo cuando una sección específica de este péptido es fragmentado se puede considerar activa la enzima. Las vías de señalización que permiten la muerte celular programada o apoptosis, inician con la activación de factores pro-apoptóticos, caspasas que inician la cascada de señalización intracelular que conduce finalmente a la apoptosis (Shen et al., 2012).

Shen y su grupo de investigación en el 2012, demostraron mediante un ensayo enzimático TUNEL y microscopía confocal de fluorescencia que en cardiomiocitos con I/R se elevaba la actividad de caspasa-3. Por otra parte, el RSV protegió a las células I/R tratadas inhibiendo la actividad de la caspasa-3 (Shen et al., 2012). En

otro estudio realizado, encontraron que en una curva temporal de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 150 µM por 0,1,3,6, y 12 horas en cardiomiocitos, el corte de la caspasa-3 aumentó conforme al tiempo y que a las 6 y 12 horas se obtuvo la mayor actividad de caspasa-3. Concluyeron que el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a largo plazo es proporcional al aumento de la actividad de caspasa-3 y sucesivamente induce apoptosis (He et al., 2014). Por otra parte Wei Yu en el 2009, concluyó que el RSV inhibe significativamente la apoptosis y elimina la actividad de caspasa-3 en células H9C2 bajo condiciones de estrés oxidante generado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Yu et al., 2009).

La muerte celular generada por apoptosis en cardiomiocitos es responsable de la remodelación anatómica del miocardio que participa en diferentes procesos patológicos (Yu et al., 2009). Sin embargo, para proteger al corazón el RSV reduce la apoptosis causada por hipoxia o daño por I/R (H. Zhang et al., 2010).

Se ha demostrado, que el RSV reduce el porcentaje de apoptosis en corazón diabético sugiriendo una inhibición de apoptosis por una posible mejoría del flujo autofágico detectado por un ensayo TUNEL. El daño oxidante genera la disminución de la actividad de SIRT1 y el daño a la función autofágica. También sugieren que SIRT1 es necesario para que el RSV pueda mejorar el flujo autofágico (Wang et al., 2014).

## 8. CONCLUSIONES

- En este trabajo se identificó el efecto que tiene el RSV previniendo la disminución de la expresión génica y niveles de proteína de SERCA2a causada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en cardiomiocitos de rata neonata.
- Se demostró que el RSV aumenta la expresión génica del regulador transcripcional SIRT1, y de las enzimas antioxidantes SOD, CAT, así como de proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2) y pro-apoptóticas (BIM) en cardiomiocitos de rata neonata bajo condiciones de estrés oxidante generado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- El RSV protege la viabilidad de los cardiomiocitos cultivados en un ambiente oxidante generado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- El RSV disminuye la expresión de caspasa-3 activa en cardiomiocitos de rata neonata y previene el aumento de la enzima observada bajo condiciones de estrés oxidante generado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

Alcendor, R. R., Gao, S., Zhai, P., Zablocki, D., Holle, E., Yu, X., ... Sadoshima, J. (2007). Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. *Circulation Research*, 100(10), 1512-1521. doi:10.1161/01.RES.0000267723.65696.4a

Alcendor, R. R., Kirshenbaum, L.A., Imai, S., Vatner, S. F., & Sadoshima, J. (2004). Silent Information regulator 2alpha, a longevity factor and class III histone deacetylase, is an essential endogenous apoptosis inhibitor in cardiac myocytes. *Circulation Research*, 95(10), 971-980. Doi:10.1161/01.RES.0000147557.75257.ff

Arai, M., Otsu, K., MacLennan, D. H., & Periasamy, M. (1992). Regulation of sarcoplasmic reticulum gene expression during cardiac and skeletal muscle development. *The American Journal of Physiology*, 262(3 Pt 1), C614-20.

Baur, J. A. (2010). Biochemical effects of SIRT1 activators. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804(8), 1626-1634. Doi:10.1016/j.bbapap.2009.10.025

Baur, J. A., Pearson, K. J., Price, N. L., Jamieson, H.A., Lerin, C., Kalra, A., ... Sinclair, D.A. (2006). Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*, 444(7117), 337-342. Doi:10.1038/nature05354

Bayle, D., Weeks, D., & Sachs, G. (1995). The membrane topology of the rat sarcoplasmic and endoplasmic reticulum calcium ATPases by in vitro translation scanning. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(43), 25678-25684.

Beher, D., Wu, J., Cumine, S., Kim, K. W., Lu, S.-C., Atangan, L., & Wang, M. (2009). Resveratrol is not a direct activator of SIRT1 enzyme activity. *Chemical Biology & Drug Design*, 74(6), 619-624. Doi:10.1111/j.1747-0285.2009.00901.x

Berridge, M. J., Lipp, P., & Bootman, M. D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 1(1), 11–21. doi:10.1038/35036035

Bers, D M. (1997). Ca transport during contraction and relaxation in mammalian ventricular muscle. *Basic Research in Cardiology*, 92 Suppl 1, 1–10.

Bers, D.M. (2002). Cardiac excitation–contraction coupling . *Nature*, 415, 198–205.

Bers, Donald M. (2002). Cardiac excitation–contraction coupling. *Insight Review Articles*, 415(Macmillan Magazines Ltd), 198–205.

Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *The World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9–19. doi:10.1097/WOX.0b013e3182439613

Bonneau, B., Prudent, J., Popgeorgiev, N., & Gillet, G. (2013). Non-apoptotic roles of Bcl-2 family: the calcium connection. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1833(7), 1755–1765. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.01.021

Borra, M. T., Smith, B. C., & Denu, J. M. (2005). Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(17), 17187–17195. doi:10.1074/jbc.M501250200

Brini, M., & Carafoli, E. (2009). Calcium pumps in health and disease. *Physiological Reviews*, 89(4), 1341–1378. doi:10.1152/physrev.00032.2008

Burton, G. J., & Jauniaux, E. (2011). Oxidative stress. *Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 25(3), 287–299. doi:10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016

Cantó, C., Jiang, L. Q., Deshmukh, A. S., Matak, C., Coste, A., Lagouge, M., ... Auwerx, J. (2010). Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle. *Cell Metabolism*, 11(3), 213–219. doi:10.1016/j.cmet.2010.02.006

Chalkiadaki, A., & Guarente, L. (2012). Sirtuins mediate mammalian metabolic responses to nutrient availability. *Nature Reviews. Endocrinology*, 8(5), 287–296. doi:10.1038/nrendo.2011.225

Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156–159. doi:10.1016/0003-2697(87)90021-2

Conti, V., Izzo, V., Corbi, G., Russomanno, G., Manzo, V., De Lise, F., ... Filippelli, A. (2016). Antioxidant Supplementation in the Treatment of Aging-Associated Cruz, M. N., Luksha, L., Logman, H., Poston, L., Agewall, S., & Kublickiene, K. (2006). Acute responses to phytoestrogens in small arteries from men with coronary heart disease. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 290(5), H1969–75. doi:10.1152/ajpheart.01065.2005

Dolinsky, V. W., & Dyck, J. R. B. (2011). Calorie restriction and resveratrol in cardiovascular health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1812(11), 1477–1489. doi:10.1016/j.bbadis.2011.06.010

Fabiato, A., & Fabiato, F. (1979). Calcium and cardiac excitation-contraction coupling. *Annual Review of Physiology*, 41, 473–484. doi:10.1146/annurev.ph.41.030179.002353

Fabiato, Alexandre. (1983). Calcium-induced ' ' release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum . *The American Journal of Physiology*, 83, C1–C14. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Falson, P., Menguy, T., Corre, F., Bouneau, L., de Gracia, A. G., Soulié, S., ... le Maire, M. (1997). The cytoplasmic loop between putative transmembrane segments 6 and 7 in sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase binds Ca<sup>2+</sup> and is functionally important. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(28), 17258–17262.

Frankel, E. N., Waterhouse, A. L., & Kinsella, J. E. (1993). Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *The Lancet*, *341*(8852), 1103–1104.

Fukai, T., Folz, R., Landmesser, U., & Harrison, D. (2002). Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. *Cardiovascular Research*, *55*, 239–249.

Gambini, J., López-Gruoso, R., Olaso-González, G., Inglés, M., Abdelazid, K., El Alami, M., ... Viña, J. (2013). [Resveratrol: distribution, properties and perspectives]. *Revista Espanola de Geriatria y Gerontologia*, *48*(2), 79–88. doi:10.1016/j.regg.2012.04.007

Gélébart, P., Martin, V., Enouf, J., & Papp, B. (2003). Identification of a new SERCA2 splice variant reg (Alcendor R. R., 2007; Arai, 1992; Baur J. A., 2010; Baur J. A., 2006)ulated during monocytic differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *303*(2), 676–684. doi:10.1016/S0006-291X(03)00405-4

Gorski, P. A., Graves, J. P., Vangheluwe, P., & Young, H. S. (2013). Sarco(endo)plasmic reticulum calcium ATPase (SERCA) inhibition by sarcolipin is encoded in its luminal tail. *The Journal of Biological Chemistry*, *288*(12), 8456–8467. doi:10.1074/jbc.M112.446161

Gough, D. R., & Cotter, T. G. (2011). Hydrogen peroxide: a Jekyll and Hyde signalling molecule. *Cell Death & Disease*, *2*, e213. doi:10.1038/cddis.2011.96

Gülçin, İ. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, *86*(3), 345–391. doi:10.1007/s00204-011-0774-2

Gumral, N., Caliskan, S., Ozgüner, F., Kaleli, S., Akkaya, A., Yilmaz, H., & Sen, S. (2009). Melatonin levels and enzymatic antioxidant defense system decrease in blood of patients with bronchial asthma. *Toxicology and Industrial Health*, *25*(6), 411–416. doi:10.1177/0748233709106625

Gumral, N., Naziroglu, M., Ongel, K., Beydilli, E. D., Ozguner, F., Sutcu, R., ... Akkaya, A. (2009). Antioxidant enzymes and melatonin levels in patients with

bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease during stable and exacerbation periods. *Cell Biochemistry and Function*, 27(5), 276–283. doi:10.1002/cbf.1569

Guo, S., Yao, Q., Ke, Z., Chen, H., Wu, J., & Liu, C. (2015). Resveratrol attenuates high glucose-induced oxidative stress and cardiomyocyte apoptosis through AMPK. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 412, 85–94. doi:10.1016/j.mce.2015.05.034

Guzmán-Bárceñas, A. (2013). *Efecto del resveratrol en la expresión del gen ATP2A2 en corazón de ratón*. (Undergraduate's thesis). ENCB-IPN.

Haigis, M. C., & Sinclair, D. A. (2010). Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annual Review of Pathology*, 5, 253–295. doi:10.1146/annurev.pathol.4.110807.092250

Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 35(Pt 5), 1147–1150. doi:10.1042/BST0351147

Halliwell, Barry, & Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, 142(2), 231–255. doi:10.1038/sj.bjp.0705776

Harikumar, K. B., & Aggarwal, B. B. (2008). Resveratrol: a multitargeted agent for age-associated chronic diseases. *Cell Cycle*, 7(8), 1020–1035. doi:10.4161/cc.7.8.5740

Harper, J. F., Hong, B., Hwang, I., Guo, H., Stoddard, R., Huang, J. F., ... Sze, H. (1998). A Novel Calmodulin-regulated Ca<sup>2+</sup>-ATPase (ACA2) from *Arabidopsis* with an N-terminal Autoinhibitory domain. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 273(9), 1099–1106. Retrieved from <http://www.jbc.org/content/273/2/1099.long>

He, H., Liu, X., Lv, L., Liang, H., Leng, B., Zhao, D., ... Shan, H. (2014). Calcineurin suppresses AMPK-dependent cytoprotective autophagy in cardiomyocytes under oxidative stress. *Cell Death & Disease*, 5, e997. doi:10.1038/cddis.2013.533

Howitz, K. T., Bitterman, K. J., Cohen, H. Y., Lamming, D. W., Lavu, S., Wood, J. G., ... Sinclair, D. A. (2003). Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*, 425(6954), 191–196. doi:10.1038/nature01960

Hua, S., Ma, H., Lewis, D., Inesi, G., & Toyoshima, C. (2002). Functional role of “N” (nucleotide) and “P” (phosphorylation) domain interactions in the sarcoplasmic reticulum (SERCA) atpase<sup>†</sup>. *Biochemistry*, 41(7), 2264–2272. doi:10.1021/bi015684h

Huang, S. S., Tsai, M. C., Chih, C. L., Hung, L. M., & Tsai, S. K. (2001). Resveratrol reduction of infarct size in Long-Evans rats subjected to focal cerebral ischemia. *Life Sciences*, 69(9), 1057–1065.

Hubbard, B. P., Gomes, A. P., Dai, H., Li, J., Case, A. W., Considine, T., ... Sinclair, D. A. (2013). Evidence for a common mechanism of SIRT1 regulation by allosteric activators. *Science*, 339(6124), 1216–1219. doi:10.1126/science.1231097

Hung, L.-M., Su, M.-J., & Chen, J.-K. (2004). Resveratrol protects myocardial ischemia-reperfusion injury through both NO-dependent and NO-independent mechanisms. *Free Radical Biology & Medicine*, 36(6), 774–781. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2003.12.016

Inesi, G., Prasad, A. M., & Pilankatta, R. (2008). The Ca<sup>2+</sup> ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum: Physiological role and relevance to diseases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 369(1), 182–187. doi:10.1016/j.bbrc.2007.11.161

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (n.d.). Retrieved June 26, 2017, from <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/accesomicrodatos/proyinvdes/economia/cbcgppeom.aspx>

Juric, D., Wojciechowski, P., Das, D. K., & Netticadan, T. (2007). Prevention of concentric hypertrophy and diastolic impairment in aortic-banded rats treated with resveratrol. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 292(5), H2138–43. doi:10.1152/ajpheart.00852.2006

Kaeberlein, M., McDonagh, T., Heltweg, B., Hixon, J., Westman, E. A., Caldwell, S. D., ... Kennedy, B. K. (2005). Substrate-specific activation of sirtuins by resveratrol. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(17), 17038–17045. doi:10.1074/jbc.M500655200

Kavas, G. O., Ayril, P. A., & Elhan, A. H. (2013). The effects of resveratrol on oxidant/antioxidant systems and their cofactors in rats. *Advances in Clinical and Experimental Medicine : Official Organ Wroclaw Medical University*, 22(2), 151–155.

Kim, J., Yang, G., Kim, Y., Kim, J., & Ha, J. (2016). AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities. *Experimental & Molecular Medicine*, 48, e224. doi:10.1038/emm.2016.16

Kiss, E., Jakab, G., Kranias, E. G., & Edes, I. (1994). Thyroid hormone-induced alterations in phospholamban protein expression. Regulatory effects on sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> transport and myocardial relaxation. *Circulation Research*, 75(2), 245–251. doi:10.1161/01.RES.75.2.245

Kiziltepe, U., Turan, N. N. D., Han, U., Ulus, A. T., & Akar, F. (2004). Resveratrol, a red wine polyphenol, protects spinal cord from ischemia-reperfusion injury. *Journal of Vascular Surgery*, 40(1), 138–145. doi:10.1016/j.jvs.2004.03.032

Koitabashi, N., Arai, M., Tomaru, K., Takizawa, T., Watanabe, A., Niwano, K., ... Kurabayashi, M. (2005). Carvedilol effectively blocks oxidative stress-mediated downregulation of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase 2 gene transcription through modification of Sp1 binding. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 328(1), 116–124. doi:10.1016/j.bbrc.2004.12.139

Kulkarni, S. S., & Cantó, C. (2015). The molecular targets of resveratrol. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1852(6), 1114–1123. doi:10.1016/j.bbadis.2014.10.005

kumar, S. V., Saritha, G., & Fareedullah, M. (2010). Role of antioxidants and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Annals of Biological Research*, 1(3), 158–173. Retrieved from (<http://scholarsresearchlibrary.com/archive.html>)

Kurutas, E. B. (2016). The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutrition Journal*, 15(1), 71. doi:10.1186/s12937-016-0186-5

Le Corre, L., Chalabi, N., Delort, L., Bignon, Y.-J., & Bernard-Gallon, D. J. (2005). Resveratrol and breast cancer chemoprevention: molecular mechanisms. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49(5), 462–471. doi:10.1002/mnfr.200400094

Li, H., Xia, N., & Förstermann, U. (2012). Cardiovascular effects and molecular targets of resveratrol. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, 26(2), 102–110. doi:10.1016/j.niox.2011.12.006

Li, L., Zhao, L., Yi-Ming, W., Yu, Y.-S., Xia, C.-Y., Duan, J.-L., & Su, D.-F. (2009). Sirt1 hyperexpression in SHR heart related to left ventricular hypertrophy. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 87(1), 56–62. doi:10.1139/Y08-099

Li, Y., Zhu, W., Tao, J., Xin, P., Liu, M., Li, J., & Wei, M. (2013). Resveratrol protects cardiomyocytes from oxidative stress through SIRT1 and mitochondrial biogenesis signaling pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 438(2), 270–276. doi:10.1016/j.bbrc.2013.07.042

Lin, Y., Zhu, J., Zhang, X., Wang, J., Xiao, W., Li, B., ... Liu, J. (2016). Inhibition of Cardiomyocytes Hypertrophy by Resveratrol Is Associated with Amelioration of Endoplasmic Reticulum Stress. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 39(2), 780–789. doi:10.1159/000447788

Louch, W. E., Sheehan, K. A., & Wolska, B. M. (2011). Methods in cardiomyocyte isolation, culture, and gene transfer. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 51(3), 288–298. doi:10.1016/j.yjmcc.2011.06.012

Lytton, J., Westlin, M., Burk, S. E., Shull, G. E., & MacLennan, D. H. (1992). Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(20), 14483–14489.

Ma, T. S., Mann, D. L., Lee, J. H., & Gallinghouse, G. J. (1999). SR compartment calcium and cell apoptosis in SERCA overexpression. *Cell Calcium*, 26(1-2), 25–36. doi:10.1054/ceca.1999.0049

MacLennan, D. H., Rice, W. J., & Green, M. N. (1997a). The mechanism of  $\text{Ca}^{2+}$  transport by Sarco(endo)plasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPases. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(46), 28815–28818.

MacLennan, D. H., Rice, W. J., & Green, N. M. (1997b). The Mechanism of  $\text{Ca}^{2+}$  Transport by Sarco(Endo)plasmic Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  -ATPases. *Journal of Biological Chemistry*, 272(46), 28815–28818. doi:10.1074/jbc.272.46.28815

Martonosi, A. N., & Pikula, S. (2003). The network of calcium regulation in muscle. *Acta Biochimica Polonica*, 50(1), 1–30. doi:035001001

Milne, J. C., Lambert, P. D., Schenk, S., Carney, D. P., Smith, J. J., Gagne, D. J., ... Westphal, C. H. (2007). Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature*, 450(7170), 712–716. doi:10.1038/nature06261

Minor, R. K., Baur, J. A., Gomes, A. P., Ward, T. M., Csiszar, A., Mercken, E. M., ... de Cabo, R. (2011). SRT1720 improves survival and healthspan of obese mice. *Scientific Reports*, 1, 70. doi:10.1038/srep00070

Monteith, G. R., McAndrew, D., Faddy, H. M., & Roberts-Thomson, S. J. (2007). Calcium and cancer: targeting Ca<sup>2+</sup> transport. *Nature Reviews. Cancer*, 7(7), 519–530. doi:10.1038/nrc2171

Movahed, A., Yu, L., Thandapilly, S. J., Louis, X. L., & Netticadan, T. (2012). Resveratrol protects adult cardiomyocytes against oxidative stress mediated cell injury. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 527(2), 74–80. doi:10.1016/j.abb.2012.05.002

Münch, G., Bölck, B., Karczewski, P., & Schwinger, R. H. G. (2002). Evidence for calcineurin-mediated regulation of SERCA 2a activity in human myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 34(3), 321–334. doi:10.1006/jmcc.2001.1515

Nagai, R., Zarain-Herzberg, A., Brandl, C. J., Fujii, J., Tada, M., MacLennan, D. H., ... Periasamy, M. (1989). Regulation of myocardial Ca<sup>2+</sup>-ATPase and phospholamban mRNA expression in response to pressure overload and thyroid hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(8), 2966–2970.

OMS | Enfermedades cardiovasculares. (n.d.). Retrieved June 26, 2017, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/>

Opara, E. C., Abdel-Rahman, E., Soliman, S., Kamel, W. A., Souka, S., Lowe, J. E., & Abdel-Aleem, S. (1999). Depletion of total antioxidant capacity in type 2 diabetes. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 48(11), 1414–1417.

Pacholec, M., Bleasdale, J. E., Chrunyk, B., Cunningham, D., Flynn, D., Garofalo, R. S., ... Ahn, K. (2010). SRT1720, SRT2183, SRT1460, and resveratrol are not

direct activators of SIRT1. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(11), 8340–8351. doi:10.1074/jbc.M109.088682

Park, S.-J., Ahmad, F., Philp, A., Baar, K., Williams, T., Luo, H., ... Chung, J. H. (2012). Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases. *Cell*, 148(3), 421–433. doi:10.1016/j.cell.2012.01.017

Periasamy, M, Reed, T. D., Liu, L. H., Ji, Y., Loukianov, E., Paul, R. J., ... Shull, G. E. (1999). Impaired cardiac performance in heterozygous mice with a null mutation in the sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase isoform 2 (SERCA2) gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(4), 2556–2562.

Periasamy, Muthu, Bhupathy, P., & Babu, G. J. (2008). Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase pump expression and its relevance to cardiac muscle physiology and pathology. *Cardiovascular Research*, 77(2), 265–273. doi:10.1093/cvr/cvm056

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45. doi:10.1093/nar/29.9.e45

Pinton, P., Giorgi, C., Siviero, R., Zecchini, E., & Rizzuto, R. (2008). Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca<sup>2+</sup> transfer in the control of apoptosis. *Oncogene*, 27(50), 6407–6418. doi:10.1038/onc.2008.308

Prasad, A. M., & Inesi, G. (2009). Effects of thapsigargin and phenylephrine on calcineurin and protein kinase C signaling functions in cardiac myocytes. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 296(5), C992–C1002. doi:10.1152/ajpcell.00594.2008

Prasad, A. M., & Inesi, G. (2012). Analysis of calcium transients in cardiac myocytes and assessment of the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase contribution. *Methods in Molecular Biology*, 798, 411–421. doi:10.1007/978-1-61779-343-1\_24

Qin, F., Siwik, D. A., Pimentel, D. R., Morgan, R. J., Biolo, A., Tu, V. H., ... Colucci, W. S. (2014). Cytosolic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediates hypertrophy, apoptosis, and decreased SERCA activity in mice with chronic hemodynamic overload. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 306(10), H1453–63. doi:10.1152/ajpheart.00084.2014

Quintanar Escorza, M. A., & Calderón Salinas, J. V. (2009). LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL. BASES Y APLICACIONES. *Revista de Educación Bioquímica*, 28(3), 89–101.

Reed, T. D., Babu, G. J., Ji, Y., Zilberman, A., Ver Heyen, M., Wuytack, F., & Periasamy, M. (2000). The expression of SR calcium transport ATPase and the Na(+)/Ca(2+)Exchanger are antithetically regulated during mouse cardiac development and in Hypo/hyperthyroidism. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 32(3), 453–464. doi:10.1006/jmcc.1999.1095

Schleef, M., Simon-Chazottes, D., Lengeling, A., Klocke, R., Jockusch, H., Yarden, Y., & Guénet, J. (1996). The gene encoding sarcoplasmic reticulum calcium ATPase-1 (Atp2a1) maps to distal mouse chromosome 7. *Mammalian Genome*, 7(10), 788.

Schrag, M., Mueller, C., Zabel, M., Crofton, A., Kirsch, W. M., Ghribi, O., ... Perry, G. (2013). Oxidative stress in blood in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a meta-analysis. *Neurobiology of Disease*, 59, 100–110. doi:10.1016/j.nbd.2013.07.005

Sebastián, C., Satterstrom, F. K., Haigis, M. C., & Mostoslavsky, R. (2012). From sirtuin biology to human diseases: an update. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(51), 42444–42452. doi:10.1074/jbc.R112.402768

Shen, M., Wu, R.-X., Zhao, L., Li, J., Guo, H.-T., Fan, R., ... Pei, J.-M. (2012). Resveratrol attenuates ischemia/reperfusion injury in neonatal cardiomyocytes and

its underlying mechanism. *Plos One*, 7(12), e51223.  
doi:10.1371/journal.pone.0051223

Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82(2), 291–295. doi:10.1113/expphysiol.1997.sp004024

Sies, H. (1999). Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology & Medicine*, 27(9-10), 916–921. doi:10.1016/S0891-5849(99)00177-X

Sin, T. K., Yu, A. P., Yung, B. Y., Yip, S. P., Chan, L. W., Wong, C. S., ... Siu, P. M. (2015). Effects of long-term resveratrol-induced SIRT1 activation on insulin and apoptotic signalling in aged skeletal muscle. *Acta Diabetologica*, 52(6), 1063–1075. doi:10.1007/s00592-015-0767-3

Stammers, A. N., Susser, S. E., Hamm, N. C., Hlynsky, M. W., Kimber, D. E., Kehler, D. S., & Duhamel, T. A. (2015). The regulation of sarco(endo)plasmic reticulum calcium-ATPases (SERCA). *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 93(10), 843–854. doi:10.1139/cjpp-2014-0463

Sulaiman, M., Matta, M. J., Sunderesan, N. R., Gupta, M. P., Periasamy, M., & Gupta, M. (2010). Resveratrol, an activator of SIRT1, upregulates sarcoplasmic calcium ATPase and improves cardiac function in diabetic cardiomyopathy. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 298(3), H833–43. doi:10.1152/ajpheart.00418.2009

Sundaresan, N. R., Pillai, V. B., & Gupta, M. P. (2011). Emerging roles of SIRT1 deacetylase in regulating cardiomyocyte survival and hypertrophy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 51(4), 614–618. doi:10.1016/j.yjmcc.2011.01.008

Takizawa, T., Arai, M., Tomaru, K., Koitabashi, N., Baker, D. L., Periasamy, M., & Kurabayashi, M. (2003). Transcription factor Sp1 regulates SERCA2 gene expression in pressure-overloaded hearts: a study using in vivo direct gene transfer

into living myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 35(7), 777–783.

Tennen, R. I., Michishita-Kioi, E., & Chua, K. F. (2012). Finding a target for resveratrol. *Cell*, 148(3), 387–389. doi:10.1016/j.cell.2012.01.032

Toyoshima, C., & Mizutani, T. (2004). Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue. *Nature*, 430(6999), 529–535. doi:10.1038/nature02680

Tse, G., Yan, B. P., Chan, Y. W. F., Tian, X. Y., & Huang, Y. (2016). Reactive Oxygen Species, Endoplasmic Reticulum Stress and Mitochondrial Dysfunction: The Link with Cardiac Arrhythmogenesis. *Frontiers in Physiology*, 7, 313. doi:10.3389/fphys.2016.00313

Turan, B., Tuncay, E., & Vassort, G. (2012). Resveratrol and diabetic cardiac function: focus on recent in vitro and in vivo studies. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 44(2), 281–296. doi:10.1007/s10863-012-9429-0

Ureshino, R. P., Rocha, K. K., Lopes, G. S., Bincoletto, C., & Smaili, S. S. (2014). Calcium signaling alterations, oxidative stress, and autophagy in aging. *Antioxidants & Redox Signaling*, 21(1), 123–137. doi:10.1089/ars.2013.5777

Vahtola, E., Louhelainen, M., Merasto, S., Martonen, E., Penttinen, S., Aahos, I., ... Mervaala, E. (2008). Forkhead class O transcription factor 3a activation and Sirtuin1 overexpression in the hypertrophied myocardium of the diabetic Goto-kakizaki rat. *Journal of Hypertension*. Retrieved from <https://insights.ovid.com/pubmed?pmid=18192848>

Wang, B., Yang, Q., Sun, Y., Xing, Y., Wang, Y., Lu, X., ... Zhao, Y. (2014). Resveratrol-enhanced autophagic flux ameliorates myocardial oxidative stress injury in diabetic mice. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 18(8), 1599–1611. doi:10.1111/jcmm.12312

Watanabe, A., Arai, M., Koitabashi, N., Niwano, K., Ohyama, Y., Yamada, Y., ... Kurabayashi, M. (2011). Mitochondrial transcription factors TFAM and TFB2M regulate Serca2 gene transcription. *Cardiovascular Research*, 90(1), 57–67. doi:10.1093/cvr/cvq374

Watson, H. (2015). Biological membranes. *Essays in Biochemistry*, 59, 43–69. doi:10.1042/bse0590043

Wray, S., & Burdyga, T. (2010). Sarcoplasmic reticulum function in smooth muscle. *Physiological Reviews*, 90(1), 113–178. doi:10.1152/physrev.00018.2008

Xu, Q., & Si, L.-Y. (2012). Resveratrol role in cardiovascular and metabolic health and potential mechanisms of action. *Nutrition Research (New York, N.Y.)*, 32(9), 648–658. doi:10.1016/j.nutres.2012.07.002

Xu, Y., Xing, Y., Xu, Y., Huang, C., Bao, H., Hong, K., & Cheng, X. (2016). Pim-2 protects H9c2 cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis via downregulation of Bim expression. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 48, 94–102. doi:10.1016/j.etap.2016.10.011

Yu, W., Fu, Y.-C., Zhou, X.-H., Chen, C.-J., Wang, X., Lin, R.-B., & Wang, W. (2009). Effects of resveratrol on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis and expression of SIRT6 in H9c2 cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 107(4), 741–747. doi:10.1002/jcb.22169

Zarain-Herzberg, A. (2006). Regulation of the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase expression in the hypertrophic and failing heart. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 84(5), 509–521. doi:10.1139/y06-023

Zarain-Herzberg, A., & Alvarez-Fernández, G. (2002). Sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase-2 gene: structure and transcriptional regulation of the human gene. *TheScientificWorldJournal*, 2, 1469–1483. doi:10.1100/tsw.2002.228

Zarain-Herzberg, A., Marques, J., Sukovich, D., & Periasamy, M. (1994). Thyroid hormone receptor modulates the expression of the rabbit cardiac sarco (endo) plasmic reticulum Ca(2+)-ATPase gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(2), 1460–1467.

Zhang, C., Feng, Y., Qu, S., Wei, X., Zhu, H., Luo, Q., ... Xiao, X. (2011). Resveratrol attenuates doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis in mice through SIRT1-mediated deacetylation of p53. *Cardiovascular Research*, 90(3), 538–545. doi:10.1093/cvr/cvr022