

TESIS DE MAESTRÍA EN BIOLOGÍA
Sub-área: Biología Celular y Molecular

Efecto del resveratrol en el corazón de ratones diabéticos

Lic. Ana Inés Zambrana

Orientador: Juan Claudio Benech

2016



TESIS DE MAESTRÍA EN BIOLOGÍA

Sub-área: Biología Celular y Molecular

Efecto del resveratrol en el corazón de ratones diabéticos

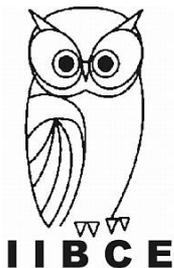
Lic. Ana Inés Zambrana

Orientador: Dr. Juan. C. Benech

Junio de 2016

Tribunal de Defensa de Tesis:

Dra. Mónica Brauer
Dr. Gustavo Brum
Dra. Leonor Thomson



Dedicatoria

Para Guillermo, por su amor y apoyo incondicionales.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	1
ABREVIATURAS.....	3
RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	5
Diabetes Mellitus	5
Diabetes Mellitus 1.....	5
Diabetes y patologías cardíacas	6
Diabetes y homeostasis de Ca ²⁺	7
El rol de SERCA2a en la contracción del cardiomiocito.....	9
NCX1, homeostasis de Ca ²⁺ y corazón diabético.....	10
Fibrosis e hipertrofia	11
Actina	12
Resveratrol	12
Antecedentes Específicos.....	17
Hipótesis.....	18
OBJETIVOS.....	19
Objetivos específicos.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
Modelo de trabajo.....	20
Inducción de diabetes tipo 1 y creación de grupos.....	20
Western Blot	21
Preparación muestras para cortes histológicos.....	22
Tinción con Hematoxilina y Eosina.....	23
Cuantificación de colágeno total en cortes de corazón	23
Tinción con faloidina de cortes de corazón.....	23
Aislamiento de cardiomiocitos.....	24
Microscopía de Fuerza Atómica	25
Tinción con faloidina de células aisladas.....	27
Análisis Estadístico	27
RESULTADOS	28
Caracterización de los ratones utilizados.....	28
Expresión de la bomba de Ca ²⁺ SERCA2a y de NCX1.....	30
Efecto del resveratrol en la acumulación de colágeno en el corazón.....	33
Estudio de F-Actina en cortes de corazón.....	35
Efecto del Resveratrol en el Modulo Elástico Aparente de Cardiomiocitos Aislados.....	37
Efecto de la diabetes en la F-Actina de cardiomiocitos diabéticos.....	39
Efecto del Resveratrol en la Sobrevida de los ratones.....	40
DISCUSIÓN.....	41
Efecto del resveratrol en la expresión de SERCA2a y NCX1.....	41

El resveratrol disminuye depósitos de colágeno en corazones diabéticos.....	43
Efecto del Resveratrol en las propiedades nanomecánicas de los cardiomiocitos y su posible relación con la F-actina.	46
CONCLUSIONES	49
PERSPECTIVAS	50
AGRADECIMIENTOS.....	51
REFERENCIAS.....	52
ANEXO A.....	60
ANEXO B	61

ABREVIATURAS

AGE.....	Productos finales de glicosilación avanzada
Ca ²⁺	Calcio
C	Control
CRSV.....	Control con resveratrol
D	Diabético
DM	Diabetes Mellitus
DRSV.....	Diabético con resveratrol
ECM	Matriz extracelular
IP	Ioduro de Propidio
NCX1	Intercambiador Sodio-Calcio
PBS.....	<i>Buffer</i> fosfato salino
PFA	Paraformaldehído
rpm	revoluciones por minuto
RS	Restículos sarcoplasmático
RSV	Resveratrol
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SD	Desviación estándar
SERCA2a	Bomba de calcio de retículo sarcoplásmico
STZ	Estreptozotocina
TBS	Tris <i>Buffer</i> Salino
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
VI	Ventrículo izquierdo
WB	Western Blot

RESUMEN

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica y sistémica que afecta actualmente a millones de personas en todo el mundo. Se caracteriza por una producción insuficiente de insulina y hasta el momento no se conoce ningún tratamiento preventivo. Las patologías cardíacas asociadas a la DM incluyen cardiomegalia, disfunción del Ventrículo Izquierdo (VI) y remodelamiento eléctrico ventricular, entre otros. Se ha considerado por mucho tiempo que las disfunciones diastólicas asociadas a la DM son principalmente atribuidas a la fibrosis del VI y la hipertrofia, causando el aumento de rigidez en el miocardio. Uno de los mayores cambios patológicos observados en la DM es una anomalía en la homeostasis de Ca^{2+} intracelular, atribuida a la alteración de la expresión de SERCA2a y NCX1 entre otras. A su vez, el estrés oxidativo, la inflamación y las modificaciones en el citoesqueleto de actina causados por la hiperglicemia, están altamente involucrados en la génesis de enfermedades cardíacas y su progresión a falla cardíaca. El Resveratrol (RSV), es un flavonoide que se encuentra en la cáscara de uvas rojas, el vino tinto y el maní. Las propiedades antioxidantes de este polifenol han probado tener diversos efectos cardioprotectores, al disminuir la inflamación, y regularizar la expresión de proteínas involucradas con la fibrosis cardíaca y la homeostasis de Ca^{2+} . En el presente trabajo de tesis, se estudió el efecto del RSV en los niveles de expresión de proteínas involucradas en la señalización por Ca^{2+} y el depósito de colágeno en el corazón de ratones diabéticos. También, utilizando Microscopía de Fuerza Atómica, se estudió el efecto de este flavonoide en las propiedades nanomecánicas y viscoelásticas en cardiomiocitos aislados de corazones obtenidos de ratones diabéticos tratados con RSV. Confirmamos que el tratamiento con RSV restableció los niveles de expresión de SERCA2a y NCX1, disminuyó la acumulación de colágeno en la matriz extracelular del corazón diabético. Por otra parte, constatamos por primera vez que el tratamiento con resveratrol, disminuyó la rigidez de los cardiomiocitos de ratones diabéticos y restableció la estructura del citoesqueleto de actina. En su conjunto todos estos aspectos podrían explicar que el tratamiento con RSV haya aumentado la supervivencia de los ratones diabéticos. Por lo tanto, este trabajo muestra evidencias experimentales de que el tratamiento con RSV de ratones con DM1, puede ayudar a prevenir o mejorar varios de los mecanismos patogénicos cardíacos, vinculados con la enfermedad.

INTRODUCCIÓN

Diabetes Mellitus

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica y sistémica que afecta actualmente a millones de personas en todo el mundo. Los estudios de proyección de la Federación Internacional de Diabetes estiman que el número de adultos a ser afectados aumentará a 552 millones para el año 2030 (Whiting et al., 2011).

La DM es un desorden metabólico caracterizado por hiperglicemia, insulino-deficiencia y/o resistencia (Boudina & Abel, 2010b). La DM está asociada con muchas complicaciones como retinopatía, nefropatía, neuropatía periférica y enfermedad cardiovascular, los cuales son patofisiológicamente similares tanto en DM tipo 1 (DM1) y DM tipo 2 (DM2) (Waddingham et al., 2015). La enfermedad cardiovascular es la patología asociada más común de la DM, y la causa principal de mortalidad en los pacientes (Candido et al., 2003). En un estudio internacional, el 50% de los pacientes con diabetes fallecieron por enfermedades cardiovasculares (principalmente enfermedad cardíaca e infarto) (Morrish et al., 2001). La DM1 es resultado de un mecanismo autoinmune y representa aproximadamente 5%-10% de los casos de diabetes. La DM2 representa el 90%-95% de los casos de DM y se inicia por la interacción entre genotipo, el ambiente y factores de estilo de vida (Laakso & Kuusisto, 2014).

Diabetes Mellitus 1

La DM1 se caracteriza por una producción insuficiente de insulina y requiere la administración diaria de la misma. Los síntomas ocurren de forma repentina y los principales son: excesiva excreción de orina (poliuria), sed constante (polidipsia), apetito constante, descenso de peso, visión borrosa y fatiga (OMS, 2015).

Las causas exactas de la DM1, son aún desconocidas (Association et al., 2013; Singh et al., 2015) y hasta el momento no se conoce ningún tratamiento preventivo (OMS, 2015). Sin embargo, es etiológicamente considerada una enfermedad auto inmune crónica, en la que la infiltración de células inmunes innatas y adaptativas destruyen las células β del páncreas (Atkinson, Eisenbarth, & Michels, 2014; Coppieters et al., 2012; Diana et al., 2013). Recientes

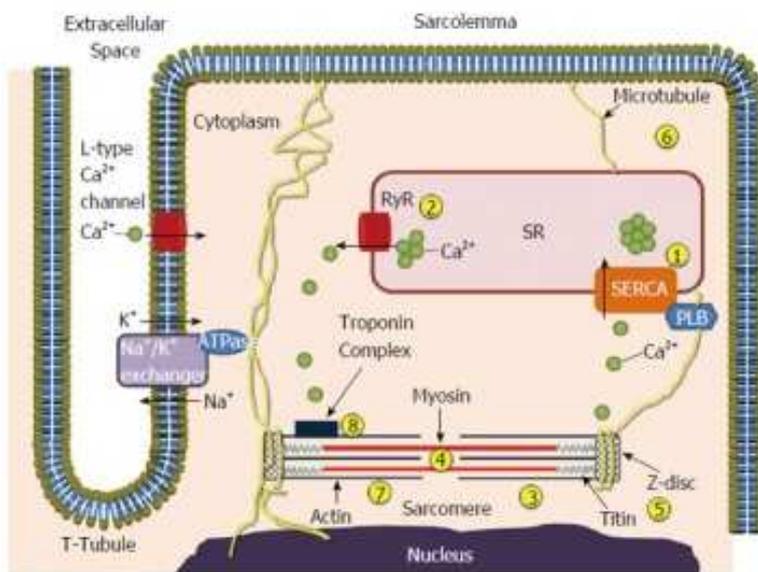
investigaciones sugieren que la DM1, como otras enfermedades autoinmunes, (ej. artritis reumatoidea o esclerosis múltiple), es causada por una falla en la tolerancia inmune como consecuencia de un defecto en las células T regulatorias (T_{reg}) (Tan et al., 2014). Estas células son esenciales para el control del sistema inmune que previene tanto respuestas autoinmunes como enfermedades inflamatorias (Bluestone & Tang, 2005; Ehrenstein et al., 2004; Lindley et al., 2005; Viglietta, Baecher-Allan, Weiner, & Hafler, 2004). En DM1, una infección u otros factores desconocidos probablemente desencadenan una respuesta autoinmune, lo cual resulta en una producción insuficiente de insulina (Singh et al., 2015).

Diabetes y patologías cardíacas

Las patologías cardíacas asociadas a la DM incluyen cardiomegalia, disfunción del Ventrículo Izquierdo (VI) y remodelamiento eléctrico ventricular, entre otros. Por lo tanto, las complicaciones cardiovasculares, como la arterosclerosis de grandes arterias (carótidas, aorta, y arterias femorales) y la arterosclerosis coronaria, contribuyen al riesgo de infarto de miocardio y paro cardíaco (Boudina & Abel, 2007; Garcia et al., 1974). Datos clínicos y experimentales, sugieren que la diabetes promueve la cardiomiopatía en ausencia de arteriosclerosis coronaria e hipertensión (Galderisi et al., 1991; Mizushige et al., 2000; Regan et al., 1977). Los mecanismos patogénicos principales vinculados a esta enfermedad se dividen en: alteraciones metabólicas, fibrosis intersticial, enfermedad microvascular y disfunción autonómica (Arieta, 2011), así como la presencia de hipertrofia del miocardio, falla en las proteínas contráctiles, acumulación de proteínas de la matriz extracelular (fibrosis), alteración de la homeostasis iónica, formación de productos glicosilados y disminución de la función del VI (Battiprolu et al., 2010; Boudina & Abel, 2010; Gil-Ortega & Carlos Kaski, 2006).

Se ha considerado por mucho tiempo que las disfunciones diastólicas asociadas a la DM son principalmente atribuidas a la fibrosis del VI y la hipertrofia del corazón, causando el aumento de rigidez en el miocardio. Sin embargo, recientes investigaciones proveen evidencia de que la resistencia a la insulina y la hiperglicemia también alteran los procesos intracelulares de los cardiomiocitos, responsables de iniciar y regular la contracción cardíaca (Waddingham et al.,

2015). Entre estos procesos alterados se encuentran un descenso en la habilidad de los cardiomiocitos de regular el Ca^{2+} , en la producción de energía aeróbica que lleva a la correcta actividad enzimática, y por último en la integridad de las estructuras del citoesqueleto y la disfunción de los sarcómeros (Figura 1) (Waddingham et al., 2015). Todas estas alteraciones subcelulares contribuyen a una disfunción contráctil con los consecuentes problemas cardíacos (Waddingham et al., 2015).



- 1- Reducción en expresión y actividad de SERCA
- 2- Reducción en expresión y actividad del receptor RyR
- 3- Disminución en la actividad de ATPasa de miosina y miofibrilar
- 4- Cambios (*Switch*) en la cadena pesada de la miosina
- 5- Cambio (*Switch*) en la isoforma de Titina e hipofosforilación
- 6- Pérdida de flexibilidad de microtúbulos
- 7- Alteraciones en las dinámicas actina-miosina
- 8- Disminución en la sensibilidad de sensibilidad de miofilamentos al Ca^{2+}

Figura 1. Alteraciones subcelulares en varios compartimentos de cardiomiocitos en condición de diabetes. PLB: Fosfolamba; SERCA: ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico; SR: Retículo sarcoplásmico; RyR: Receptor de Ryanodina. Figura extraída de Waddingham et al. (2015)

Diabetes y homeostasis de Ca^{2+}

Uno de los mayores cambios patológicos observados en la DM es una anomalía en la homeostasis de Ca^{2+} intracelular. Esto se atribuye a la alteración funcional de múltiples proteínas involucradas en la liberación y captación de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática y la membrana del retículo sarcoplásmico (RS) (Rao et al., 2008). Para el mantenimiento de la

función cardíaca se requiere de un transporte de Ca^{2+} suficiente y coordinado hacia fuera y adentro del cardiomiocito y del RS (Waddingham et al., 2015). Durante la sístole, el Ca^{2+} entra por canales de Ca^{2+} tipo L del sarcolema y cúmulos (*clusters*) de Ca^{2+} son liberados espontáneamente por el RS *via* el receptor de ryanodina (RyR). La liberación de los cúmulos de Ca^{2+} causa chispas (*sparks*) de Ca^{2+} e inician el acoplamiento excitación-contracción. En la diástole, el Ca^{2+} es bombeado nuevamente al RS por la bomba SERCA y fuera de los espacios citosólicos por el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, llevando a una relajación del miocardio (Figura 2) (Waddingham et al., 2015).

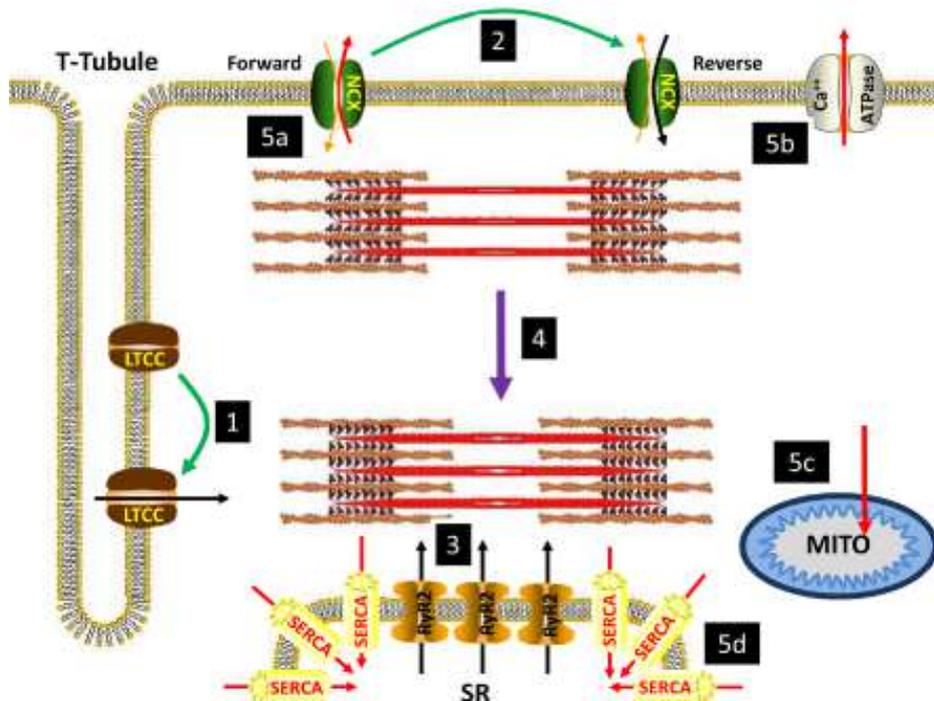


Figura 2. Diagrama esquemático del acoplamiento excitación-contracción en el cardiomiocito ventricular.(1) La despolarización del sarcolema causa la apertura de los canales de Ca^{2+} del tipo L (LTCC), resultando en la entrada de Ca^{2+} durante la diástole. El Ca^{2+} entra inicialmente a través del LTCC. (2) Durante las etapas tempranas del potencial de acción, el intercambiador de $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ (NCX1) también pasa a permitir el ingreso de Na^+ y expulsión de Ca^{2+} , al modo invertido (ingreso de Ca^{2+} , expulsión de Na^+) para permitir el aumento del $[\text{Ca}^{2+}]_i$. (3) El aumento inicial de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induce un aumento en la liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplasmático (SR) a través de los receptores de rianodina (RyR2), lo cual resulta en un gran aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. (4) El aumento de Ca^{2+} causa la contracción de los miofilamentos. (5) $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es reducido para dar lugar a la diástole a través de su expulsión (a) a través de NCX1 en su modo inicial y (b) la ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático. (c) Ca^{2+} también es tamponado por las mitocondrias. (d) La mayor parte del movimiento de Ca^{2+} en la diástole es hacia el SR *via* SERCA2a. Las flechas verdes marcan las transiciones causadas por la despolarización del sarcolema. Las flechas negras marcan las rutas de influjo del Ca^{2+} al citosol durante la sístole. Las flechas violetas muestran la contracción de los miofilamentos. Las flechas rojas muestran las rutas de eflujo de Ca^{2+} durante la diástole Imagen obtenida de Sikkel et al. (2014).

Algunos de los mecanismos reportados por los cuales la homeostasis de Ca^{2+} está alterada incluyen: habilidad reducida del RS de captar Ca^{2+} (X.-Y. Zhao et al., 2006), actividad reducida del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y de la bomba de calcio de la membrana plasmática (Lopaschuk, Tahiliani, Vadlamudi, Katz, & McNeill, 1983; G N Pierce & Dhalla, 1981). Sin embargo, en otros estudios realizados en diabetes tipo 1, se ha encontrado tanto una disminución en la expresión de SERCA2a como un aumento en la expresión del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Hattori et al., 2000; Kashihara et al., 2000) y 2 (Belke et al., 2004). Las disfunciones sistólicas y diastólicas a causa de una alteración de la homeostasis de Ca^{2+} son características en la DM1, incluso en los estadios tempranos de la enfermedad. Tres semanas luego de la inyección de streptozotocina (STZ), el retorno del Ca^{2+} al RS se prolonga, y la actividad de SERCA disminuye en comparación al grupo control de ratas (A Zarain-Herzberg et al., 1994). Más recientemente, se ha demostrado que una pérdida progresiva de la homeostasis de Ca^{2+} ocurre antes de la disfunción del VI en ratas diabéticas (Zhao et al., 2014).

El rol de SERCA2a en la contracción del cardiomiocito

SERCA2a es un regulador clave de la fuerza contráctil. Un aumento en la función de SERCA2a aumenta el contenido de Ca^{2+} en el RS, lo cual aumenta la amplitud de las transientes de Ca^{2+} (cambios en las concentraciones de Ca^{2+}). Esto ocurre pues la liberación de Ca^{2+} desde el RS es dependiente del contenido de Ca^{2+} en el RS. La función de SERCA2a en un organismo es dinámica, coordinada con la función cardíaca y las demandas fisiológicas por ejercicio u otras formas de estrés (Sikkel et al., 2014).

Como fue explicado previamente, una disminución en la expresión de SERCA2a lleva a serias complicaciones en la homeostasis de Ca^{2+} y traen en consecuencia problemas cardíacos. Es por esto que se han realizado numerosos esfuerzos para poder revertir esta expresión deficiente de la bomba. Ratones transgénicos en los cuales se sobre expresó SERCA2a, mostraron estar protegidos contra disfunciones cardíacas observadas en animales con diabetes inducidas por STZ (Sikkel et al., 2014; Trost et al., 2002). En este momento se encuentran en fase de estudio preclínico terapias génicas para SERCA2a, y es esperable que pronto se vean los resultados a nivel clínico (Sikkel et al., 2014).

NCX1, homeostasis de Ca^{2+} y corazón diabético

El intercambiador sodio-calcio o NCX es una proteína de membrana con 11 dominios transmembrana, que transporta el Ca^{2+} de las células. Está presente en células excitables y no excitables. Utiliza la energía acumulada en el gradiente electroquímico de sodio (Na^+) para catalizar el contratransporte de Ca^{2+} contra el gradiente electroquímico. La mayoría de los NCX tienen una estequiometría de transporte de $3 \text{Na}^+ : 1 \text{Ca}^{2+}$, es decir que son electrogénicos (alteran el potencial de membrana), moviendo una carga positiva neta hacia adentro en cada ciclo hacia adelante. NCX puede funcionar transportando Ca^{2+} en ambas direcciones dependiendo de los gradientes en una misma célula (Yu & Choi, 1997).

En el corazón, NCX1 (970 aminoácidos, ~110 kDa) es la única isoforma de NCX presente. En los cardiomiocitos, NCX1 se localiza principalmente en los túbulos T. Sin embargo, no está claro aún si está presente en las uniones entre el sarcolema y la membrana del RS, donde ocurre la mayor parte de la liberación de Ca^{2+} inducido por Ca^{2+} . NCX1 transporta rápidamente Ca^{2+} durante el acoplamiento excitación-contracción (Despa & Bers, 2013).

En ratones con diabetes tipo 1 se observó una disminución en la expresión de SERCA2a y un aumento en la expresión del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Hattori et al., 2000; Kashihara et al., 2000). Por su parte, LaRocca (2012) ha encontrado en ratas diabéticas un aumento en la expresión de NCX1. En base a sus resultados, sugiere que esto ocurre por un mecanismo compensatorio por el descenso en la expresión de SERCA2a y en respuesta a una alteración de la homeostasis de Ca^{2+} en el corazón. Durante la diástole, 95% del Ca^{2+} citosólico de miocitos murinos es re-secuestrado por el RE por SERCA2a, disminuyendo por lo tanto el Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), lo cual permite la relajación del miocito. Para mantener el balance latido-a-latido del Ca^{2+} , este tiene que ser transportado por NCX1, con una contribución de la Ca^{2+} -ATPasa del plasmolema (LaRocca et al., 2012). A su vez, se piensa que el aumento en la expresión de NCX1 y el adelanto de la corriente de NCX1 (Incx) contribuye en hasta un 50% del eflujo de calcio para mantener los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ diastólicos, como mecanismo compensatorios al descenso de la actividad de SERCA2a (Reuter et al., 2005; Szentesi, et al. 2004; Wang et al., 2009). Por lo tanto de acuerdo con su trabajo con ratas diabéticas, LaRocca

et al., 2012 han propuesto un rol de adaptación de NCX1 para promover la función contráctil en la patología diabética.

Fibrosis e hipertrofia

En biopsias de corazones de pacientes diabéticos, se han encontrado fibrosis intersticial, hipertrofia de miocitos y un aumento en la glicosilación de proteínas contráctiles. Estos factores contribuyen a un menor rendimiento diastólico y a la hipertrofia del ventrículo izquierdo en estos pacientes (Das et al., 1987; Nunoda et al., 1985; Syrový & Hodný, 1992). Van Heerebeek et al., (2008), reportaron que en pacientes diabéticos, la deposición de productos finales de glicosilación avanzada (*Advanced Glycation End products* o AGEs) y la deposición de colágeno son determinantes importantes en una mayor rigidez de ventrículo izquierdo en pacientes con una fracción de eyección (EF) reducida, mientras que una mayor tensión en reposo es el principal determinante de una mayor rigidez del ventrículo izquierdo en pacientes que tienen falla cardíaca con una EF normal. Los AGEs se forman cuando la glucosa o metabolitos de glucosa producen modificaciones covalentes estables en proteínas (Wang et al., 2006). Estas proteínas modificadas no sólo causan daños directamente, sino que también contribuyen a la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Wang et al., 2006). Estos, a su vez, causan estrés oxidativo ante la ausencia de defensas antioxidantes suficientes para degradarlos (Murarka & Movahed, 2010). Proteínas extracelulares como el colágeno y la elastina son particularmente vulnerables a la glicosilación. Esto podría disminuir la degradación del colágeno, lo cual contribuye a una acumulación del mismo (fibrosis intersticial). Los *crosslinks*, productos de la glicación no enzimática del colágeno y la elastina en el corazón diabético, junto con la fibrosis resultante, también causan un aumento en la rigidez del miocardio y dificulta la relajación cardíaca, fenómenos típicos en la diabetes (Wang et al., 2006). Por lo tanto, la utilización de antioxidantes se está convirtiendo en un método terapéutico como estrategia para normalizar la homeostasis de glucosa y mejorar el metabolismo energético, disminuyendo a su vez la generación de ROS y AGEs (Dos Santos et al., 2014).

Actina

La actina, es el componente principal del citoesqueleto en todas las células eucariotas, y juega un rol fundamental en una gran variedad de procesos celulares. La proteína globular G (G-actina), polimeriza en filamentos (F-actina) para cumplir la mayoría de sus funciones biológicas (Korn et al., 1987). Existen evidencias experimentales de que la diabetes afecta el citoesqueleto de actina (Cooper et al., 2004). Nemoto et al., 2006, observaron por tinción de faloidina que la actina estaba reducida en corazones de ratas diabéticas, sugiriendo que su expresión estaba disminuida en los corazones con la patología. Cooper et al. (2004), relacionaron la falla cardíaca y rigidez de ventrículo izquierdo por remodelamientos de la F-actina en corazones de ratas. En este estudio, observaron una disminución de la rigidez del corazón tratando a las ratas con Trientina, un quelante del Cu, y observaron un restablecimiento de la estructura de la F-actina en cortes de corazón las ratas con dicho tratamiento (Cooper et al., 2004).

Resveratrol

El Resveratrol (RSV), es un flavonoide natural que se encuentra en la cáscara de uvas rojas, el vino tinto y el maní (Figura 3). Se le han atribuido una gran variedad de efectos biológicos (revisado en Baur & Sinclair, 2006; Baur et al., 2006). A través de sus propiedades antioxidantes, ha sido demostrado que previene o retarda la progresión de una variedad de enfermedades que incluyen enfermedades cardiovasculares, del cerebro y cáncer (Anton et al., 2014; Bresciani et al., 2014; Hung et al., 2000; Shigematsu et al., 2003). En diabetes tipo 2, prolonga la supervivencia de ratones, al prevenir la resistencia a la insulina y mejorar el número de mitocondrias en el músculo esquelético (Baur et al., 2006; Lagouge et al., 2006). En etapas tempranas de DM1, el RSV se ha mostrado capaz de disminuir los niveles de glucosa y triglicéridos (Su et al., 2006) y mejorar la actividad cardíaca después de un daño isquémico, al aumentar la capacidad anti-oxidativa del corazón (Thirunavukkarasu et al., 2007). Por otro lado, Sulaiman et al., 2010, en estudios con modelo de ratón diabético, reportaron resultados de 12 semanas de tratamiento de ratones con diabetes tipo 1, en los que los niveles de glucosa no se vieron modificados luego de un tratamiento con RSV (Sulaiman et al., 2010). También se ha

encontrado que en el miocardio de ratas diabéticas, el RSV mantiene los niveles energéticos y metabólicos similares a los de las ratas control. Se ha reportado que el RSV es un antioxidante eficiente (Park & Pezzuto, 2015) que reduce la generación de ROS por la degradación directa de radicales de oxígeno y por el aumento de las defensas antioxidantes enzimáticas de las células. Diversos estudios han mostrado que el posible efecto cardioprotector del RSV es mediado por la atenuación del estrés oxidativo celular (Dos Santos et al., 2014).

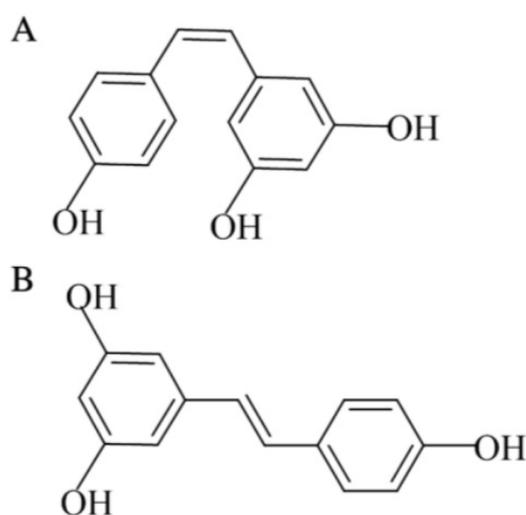


Figura 3. Estructura química del Resveratrol. A- *cis*-resveratrol, B- *trans*-resveratrol. Figura extraída de Raj et al.(2014).

El estrés oxidativo y la inflamación están altamente involucrados en la génesis de enfermedades cardíacas y su progresión a falla cardíaca (Raj et al., 2014). Las propiedades antiinflamatorias del RSV están bien documentadas (Švajger & Jeras, 2012). El factor nuclear kappa B (NFκB) es un factor de transcripción clave que se activa en respuesta a citoquinas y radicales libres en el citosol. IκB es la proteína que previene la activación de NFκB en entornos normales (Raj et al., 2014). Se ha reportado que el tratamiento con RSV previene la degradación de IκB e inhibe la activación de NFκB (Shadfar et al., 2011), y la translocación hacia el núcleo, dando lugar a la transcripción de una variedad de genes. Al mismo tiempo, se sabe que el RSV reduce los niveles de TNF alpha e IL-6 (Louis et al., 2012), dos citoquinas liberadas por macrófagos, las cuales pueden desencadenar la activación de NFκB (Raj et al., 2014). También, se ha reportado que RSV reduce la expresión de iNOS (L.-M. Hung, Su,

&Chen, 2004), el cual es uno de los genes transcriptos por NFκB. El tratamiento con RSV puede aumentar la expresión de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (Tanno et al., 2010), catalasa (Movahed et al., 2012) y la glutatión peroxidasa, a la vez que reduce la expresión de la NADPH oxidasa (NOX) (Xia et al., 2010). El factor de transcripción Nrf2 (*nuclear factor erythroidrelated factor 2*) es vital para una la inducción de la respuesta al estrés oxidativo, que se une al elemento de respuesta antioxidante (ARE) y resulta en la transcripción de la NADPH quinona oxidoreductasa 1 (Nqo1), heme oxigenasa-1 (HO-1) y otros genes antioxidantes. Se ha encontrado que el RSV promueve la activación de Nrf2 en el corazón (Hao et al., 2013). Tomados en conjunto, estos cambios ayudan a reducir la generación de radicales libres, a la vez que aumentan su erradicación en condiciones patológicas. Por lo tanto, las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias del RSV contribuyen significativamente a la prevención, atenuación o reversión de enfermedades cardíacas en animales. Aunque la terapia con antioxidantes no ha tenido mucho éxito en estudios clínicos humanos, el RSV puede ser un candidato potencial para futuros ensayos (Raj et al., 2014).

Otro mecanismo clave involucrado en la cardioprotección mediada por RSV es la habilidad de disminuir la expresión de proteínas involucradas con la fibrosis cardíaca (Tanno et al., 2010). Los fibroblastos liberan la mayor parte de los factores profibróticos en el corazón. Hasta el momento, se ha observado que RSV reduce la fibrosis en el corazón al asociarse con la disminución de niveles de colágeno. La citoquina TGFB (*Tumor growth factor beta*) es una citoquina que estimula la respuesta de fibrogénesis en el corazón. La habilidad del RSV de controlar los niveles de TGFB puede resultar en un paso más para prevenir la fibrosis (Lin et al., 2008). Como fue mencionado previamente, la fibrosis causa rigidez en el tejido del músculo cardíaco, resultando en anormalidades diastólicas y hasta cierto punto disfunción sistólica. Por lo tanto, prevenir la fibrosis con RSV puede ayudar a preservar las funciones diastólicas y sistólicas en casos de enfermedad cardíaca (Raj et al., 2014).

Además de las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, muchos de los efectos del RSV, parecen estar relacionados con su capacidad de inducir la actividad de SIRT1 (silent information regulator Sir 2 alpha). SIRT1 regula una gran variedad de procesos celulares como apoptosis, sobrevivencia celular, señalización endócrina, remodelación de la cromatina,

transcripción génica, etc. (Imai, Armstrong et al., 2000; Rogina & Helfand, 2004). Sulaiman et al., 2010, demostraron que la actividad reducida de SIRT1 durante la DM1, contribuye a la represión de la expresión de SERCA2a observada en esta patología. Los mismos autores demuestran, que el RSV, al activar SIRT1, mejora los niveles de expresión de SERCA2a y las funciones cardíacas en los ratones diabéticos. Ratones *knockout* para SIRT1 son muy sensibles a la diabetes resultando en una disminución en los ARNm de SERCA2a. Adicionalmente, los autores muestran que SIRT1 actúa como un activador transcripcional de la expresión del gen SERCa2 en condiciones de alta glucosa (similar a la condición diabética).

Una cantidad significativa de trabajos acerca de los mecanismos cardioprotectores del RSV se han documentado en la literatura. A partir de estos estudios se ha realizado una lista de moléculas que podrían mediar la cardioprotección del RSV (Raj et al., 2014). (Figura 4). En resumen, el RSV es un polifenol único, pues tiene las características de un fuerte antioxidante y antiinflamatorio, mientras que también puede regular componentes celulares clave para proteger el organismo. La combinación de estos efectos benéficos la hacen una molécula más efectiva y exitosa en comparación con otras moléculas bioactivas exploradas previamente (Raj et al., 2014).

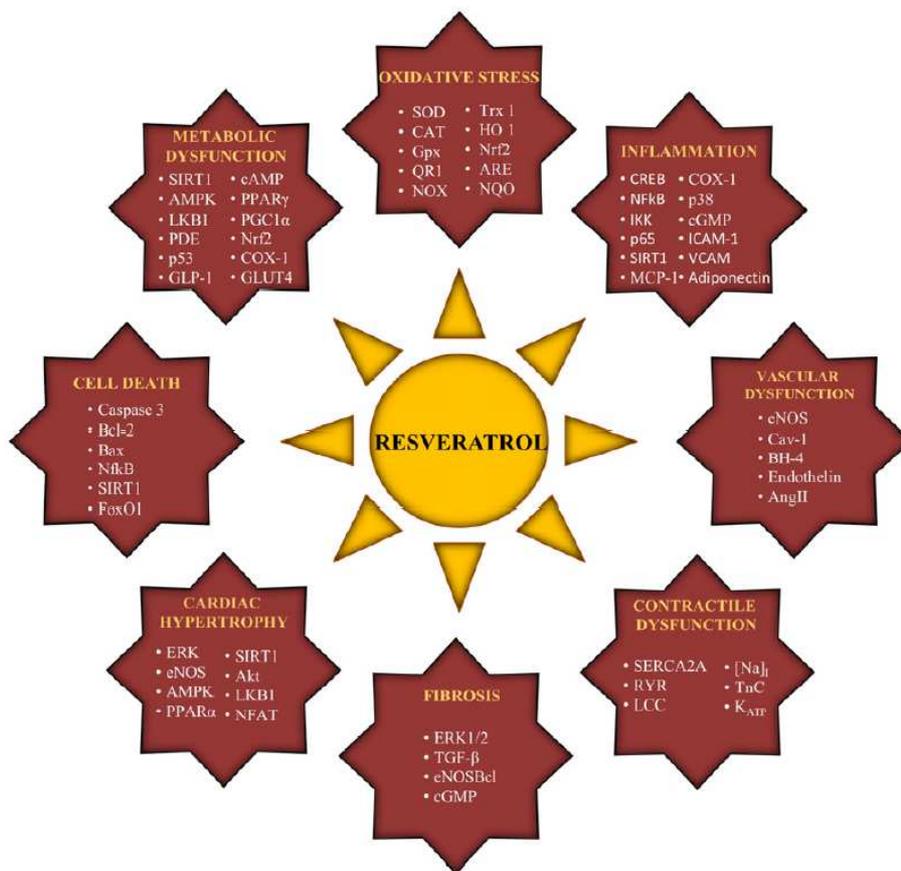


Figura 4. Blancos moleculares que median los efectos del resveratrol. Imagen extraída de Raj et al.(2014).

Antecedentes Específicos

La Microscopía de Fuerza Atómica (AFM), es una herramienta muy poderosa en la investigación en general, particularmente aplicada a las ciencias biológicas y biomédicas. El microscopio de fuerza atómica tiene como base la interacción entre una sonda y una superficie. La principal característica del AFM incluye su habilidad de obtener imágenes de muestras no conductoras y de medir la topografía de superficie de muestras biológicas a una resolución nanométrica (Kuznetsova et al., 2007), además de poder funcionar en condiciones fisiológicas (Graham et al., 2010). Por AFM se pueden estudiar las propiedades dinámicas y mecánicas de células vivas. Diferentes tipos de eventos celulares como la locomoción, la diferenciación, el envejecimiento, la activación fisiológica, la electromotilidad, así como la patología celular, pueden ser analizados con esta técnica de investigación en microscopía (Kuznetsova et al., 2007; Müller & Dufrêne, 2011). Las propiedades visco-elásticas de diferentes tipos celulares ya han sido analizadas por AFM (Kuznetsova et al., 2007; Müller & Dufrêne, 2011). En el campo del estudio de la diabetes por esta técnica, se ha estudiado el efecto de la patología en los glóbulos rojos (Buys et al., 2013; Chen et al., 2009). Nuestro grupo ha sido pionero en el estudio del efecto de la diabetes sobre las propiedades nanomecánicas de cardiomiocitos vivos utilizando AFM (Benech et al., 2014).

Recientemente, utilizando AFM con el método de nanoindentación, constatamos que la diabetes tipo 1 (inducida en ratones por inyección de streptozotocina), altera las propiedades nanomecánicas y viscoelásticas de cardiomiocitos vivos (los hace más rígidos y adhesivos), al ser comparados con cardiomiocitos vivos obtenidos de corazones de ratones control de la misma edad, sin diabetes inducida (Benech et al., 2014). A su vez, hemos observado una disminución de la expresión de SERCA2a en VI de ratones diabéticos y una acumulación de colágeno en cortes de VI (Benech et al., 2014).

Como fue mencionado anteriormente, diversos estudios han mostrado un posible efecto cardioprotector del RSV, un flavonoide con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y activador de SIRT1. A su vez, se le atribuyen numerosos efectos benéficos para disminuir la fibrosis y regular la homeostasis de Ca^{2+} .

En el presente trabajo de tesis, se estudia el efecto del RSV en los niveles de expresión de proteínas involucradas en la señalización por Ca^{2+} y el depósito de colágeno en el corazón de ratones diabéticos. También se estudia el efecto de este flavonoide en las propiedades nanomecánicas y viscoelásticas, utilizando AFM en cardiomiocitos aislados de corazones obtenidos de ratones diabéticos tratados con RSV.

Hipótesis

En base a la literatura consultada y los antecedentes presentados, planteamos la hipótesis de que el Resveratrol, administrado a ratones con diabetes tipo 1:

- 1) Restablece los niveles de expresión de SERCA2a y NCX1
- 2) Disminuye la acumulación de colágeno total
- 3) Restablece la disposición de la F-actina
- 4) Disminuye la rigidez de los cardiomiocitos

OBJETIVOS

Estudiar el efecto del resveratrol en los niveles de expresión de proteínas involucradas en la señalización por Ca^{2+} en el corazón de ratones con diabetes tipo 1 experimental, así como en las propiedades nanomecánicas de cardiomiocitos aislados.

Objetivos específicos

- 1) Evaluar los niveles de expresión de SERCA2a y NCX1
- 2) Evaluar la presencia de colágeno total en cortes del ventrículo izquierdo de corazón
- 3) Estudiar la disposición de F-actina en cortes del ventrículo izquierdo del corazón
- 4) Determinar el Módulo Elástico Aparente (E^*) de cardiomiocitos aislados de los diferentes grupos de ratones.
- 5) Estudiar la disposición de F-actina en cardiomiocitos aislados de ratones control y diabético.

MATERIALES Y MÉTODOS

Modelo de trabajo

En este trabajo se utilizaron ratones machos CD1 adultos. Los animales fueron mantenidos en un ambiente controlado con un ciclo de 12 h luz y 12 h de oscuridad y una temperatura promedio de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ con acceso libre a agua y ración. Los ratones fueron destetados a los 21 días y organizados en cajas de 4 o 5 ratones cada una. El protocolo de experimentación fue aprobado por la Comisión de Ética Animal del IIBCE, de acuerdo con las reglamentaciones nacionales de manipulación de animales.

Inducción de diabetes tipo 1 y creación de grupos

A un grupo de ratones CD1 de 1,5 meses de edad ($n=12$), se le indujo la diabetes por inyección intra-peritoneal de streptozotocina (STZ, Sigma, St. Louis, MO, USA) 150 mg/kg, resuspendida en buffer citrato salino ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ 0.1M, pH 4,5). Esta droga produce necrosis selectiva de las células beta del páncreas y produce en los animales un estado de insuficiencia a la insulina, induciendo diabetes de tipo 1. A otro grupo de ratones CD1 de igual edad ($n=12$), grupo control, se les administró sólo el buffer citrato. Semanalmente, los animales fueron pesados, y su glicemia fue medida utilizando ACCU-CHECK Compact Plus System (Indianápolis, USA). Una semana posterior al tratamiento con STZ, los animales con valores de glicemia > 250 mg/dl fueron considerados diabéticos.

Una vez confirmada la diabetes, fueron creados cuatro grupos (cada uno con $n=6$), agrupados por edad y peso corporal. El grupo de ratones diabéticos fue dividido aleatoriamente en dos sub-grupos: diabéticos (D) y diabéticos con Resveratrol (DRSV). Se procedió en forma similar con el grupo control, el cual se subdividió (aleatoriamente) en dos grupos: controles (C) y controles a los que se les inyectó resveratrol (CRSV). El resveratrol (BML-FR104, Enzo Life Sciences, Inc.), resuspendido en DMSO a razón de 40mg/kg, con una concentración de 65

mg/ml, fue inyectado cada dos días en forma intra-peritoneal, como descrito en Damián, JP et. al., 2014. Los animales C fueron inyectados únicamente con DMSO.

Para la caracterización morfológica de la diabetes, los animales fueron observados a lo largo de los tres meses de experimento, a modo de constatar los efectos secundarios ya reportados en la literatura consultada. Se siguió un control de los decesos de ratones a lo largo de tres meses para establecer un control de la viabilidad de cada grupo.

A los tres meses de tratamiento (4,5 meses de edad), se realizó eutanasia de los ratones por dislocación cervical. Se fraccionó el ventrículo izquierdo para los diferentes experimentos. Fue necesario repetir los diferentes grupos de animales, para obtener un número suficiente de los mismos a los 4,5 meses de edad.

Western Blot

Se llevó a cabo el estudio de la expresión de las proteínas SERCA2a y NCX1 en homogenizados de corazón obtenidos de los cuatro grupos. Análisis por Western Blot: muestras de VI, congeladas a -80°C de los diferentes grupos de ratones fueron utilizadas. Estas muestras fueron homogeneizadas en Buffer de lisis en una relación 1.5 ml buffer lisis / 50 mg corazón [Para 20 ml: 4 ml EGTA 100 mM, 800 µl DTT 100 mM, HEPES 0.5 M, 200 µl Tritón X-100, 2 ml Glicerol, 80 µl PMSF 100 mM (inhibidor de proteasas de serina y cisteína), 200 µl Ortovanadato de sodio 100 mM (inhibidor de fosfatasa de tirosinas) y 20 µl (Coctel inhibidor de proteasas] utilizando homogeneizadores de vidrio. El homogenizado fue centrifugado 5 min a 14.000 xg, y se conservó el sobrenadante. Finalmente, se sonicó la muestra 3 segundos dos veces con %DUTY CYCLE 40 Y OUTPUT CONTROL MACRO TIP LIMIT 3 (Ultrasonic Homogenizer 4710 Series, Cole Parmer Instrument Co.). La concentración de proteínas fue determinada por el método de Bradford (BRADFORD, 1976). Posteriormente, se sembraron 50 µg de proteína total por carril de cada una de las muestras, las cuales fueron corridas a 100 V en geles de SDS con 10% de poliacrilamida. Como referencia de los pesos moleculares se utilizó el marcador estándar de peso molecular *Precision Plus Protein Standard Dual Color*(161-

0374, Bio-Rad Laboratories, Inc.). Posteriormente, las muestras fueron transferidas a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) Immobilon-Psq Transfer membrane (ISEQ00010, MILIPORE) a 350 mA por una hora y 15 minutos. Para su análisis con anticuerpos específicos, se siguió el protocolo reportado en (Aksoy et al., 2006; Calliari et al., 2002). Para esto, se utilizaron anticuerpos comerciales monoclonales específicos para SERCA2a de retículo endoplasmático (SERCA2a) y la isoforma 1 del Intercambiador Na⁺/Ca⁺ (NCX1), y sus anticuerpos secundarios correspondientes. Todas las diluciones se realizaron con TBST (Ver Tabla1). Brevemente, se bloquearon las membranas con buffer de bloqueo (TBS-T con leche descremada 5%) por 1 hora e incubaron toda la noche a 4 °C en agitación con el anticuerpo primario correspondiente. Luego, se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente. La señal obtenida fue analizada en un *High Performance Luminescent Image Analyser* (FLA-9000 Fujifilm) y cuantificada por densitometría, utilizando el programa Image J (NIH, USA).

Tabla1. Lista de anticuerpos usados en los procedimientos de la tesis		
ANTICUERPOS PRIMARIOS		
Nombre	Código	Dilución
anti-SERCA2a	ab2861	1:500
anti-NCX1	ab6495	1:100
anti-β-Actin	ab8227	1:1000
ANTICUERPOS SECUNDARIOS		
Nombre	Código	Dilución
Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG (H+L)	A11001	1:1000
Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG (H+L)	A11008	1:5000

Preparación muestras para cortes histológicos

Se fijaron las muestras de VI con paraformaldehído 3% en PBS por 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Luego se realizó la crioprotección de la muestra con sacarosa 15%, *overnight* a 4°C, seguido de sacarosa 30%. Se realizó la infiltración en el medio de

congelamiento con sacarosa 30% y medio de congelamiento (1:1) por 1 h a T ambiente en agitación, y luego en iguales condiciones 1 h en medio de inclusión puro (0201 08926, Jung). Las muestras fueron preservadas a -80°C. Por último se armaron las piezas y se realizaron los cortes en un crióstato ECO, modelo MEV (SLEE Technical GmbH, Mainz, Alemania) y se dispusieron los cortes en portaobjetos tratados previamente con gelatina (Ver Anexo 1).

Tinción con Hematoxilina y Eosina

Se estudió la presencia de colágeno total en cortes de corazón de 10 µm, montados en portaobjetos tratados con gelatina. Se utilizó la técnica de Hematoxilina y Eosina, siguiendo las especificaciones del fabricante. Se analizaron cuatro animales de cada condición. Se realizaron entre dos y cuatro cortes por cada animal y se obtuvieron imágenes de cada corte de forma tal que las imágenes obtenidas cubrieran el área total de cada corte.

Cuantificación de colágeno total en cortes de corazón

Se cuantificó el colágeno en 3 animales por condición a partir de entre dos y cuatro cortes por cada animal, de los cuales se analizó un promedio de 3 campos cada uno, a partir de imágenes 40X obtenidas del microscopio por luz transmitida.

La cuantificación de colágeno se realizó con el MATLAB (The MathWorks, Inc.), el cual fue programado para análisis de imágenes como descrito en software comerciales para este propósito (González and Woods, 2004). Se calculó el área total de cada corte y luego se obtuvo la diferencia de área entre el colágeno y el área total. Los niveles de sensibilidad de análisis se ajustaron caso a caso, estableciendo un criterio de observación para ajustar los niveles de los filtros y evitar saturación de la imagen (Ver Anexo 2 B).

Tinción con faloidina de cortes de corazón

Se estudió la Actina-F en cortes de 10 µm depositados en montados en portaobjetos tratados con gelatina. Se separaron los cortes con el lápiz hidrofóbico SuperPap Pen Liquid Blocker for

IHC (SPM0928, IHCWORLD) y se hizo una incubación con faloidina fluorescente 633 (50 µg/ml-Sigma Aldrich), 40 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron tres veces con PBS para eliminar exceso de faloidina. Se montaron los cubreobjetos y se obtuvieron imágenes con el microscopio láser confocal de fluorescencia invertido BX61, con módulo confocal FV3000 y con una cámara DP70 acoplada (Olympus). Se realizaron entre dos y cuatro cortes por cada animal. Se obtuvieron imágenes de cada corte de forma tal que las imágenes obtenidas cubrieran el área total de cada corte. Se obtuvieron imágenes de por lo menos 18 cortes por condición.

Para analizar los datos obtenidos, se realizó el método del observador independiente mediante una tabla comparativa de morfología de muestras Control y Diabético, para determinar el marco de referencia de comparación de los grupos con tratamiento. Para esto se realizó una grilla, con cada corte y campo fotografiado, y cuatro observadores la respondieron. Los criterios a responder sobre los cortes fueron: “Observo fibras alineadas”, “Observo fibras espaciadas” y “Observo Fibras rotas”. A partir de las respuestas de los observadores sobre todas las muestras de animales diabéticos y control, se fijó un criterio de referencia y se comparó DRSV y CRSV en base a este. Se le asignó valor 1 a una afirmación y 0 a una negativa a cada categoría. A partir de allí se definió como muestra “tipo” aquella que contara con mayor puntaje en cada grupo de ratones.

Aislamiento de cardiomiocitos

Los cardiomiocitos aislados de los diferentes grupos de ratones fueron obtenidos adaptando el protocolo de Brum et al., (1983) como descrito en Benech et al, 2014. Brevemente, el protocolo utilizado para obtener los cardiomiocitos consistió en: 1) El animal fue sacrificado por dislocación cervical, el corazón removido rápidamente y colocado en 3 ml de Buffer Tyrode (CaCl₂ 1.8 mM, NaCl 135mM, KCl 5.4 mM, MgCl₂ 1 mM, Glucosa 10 mM, HEPES 5 mM, pH 7,4) y lavado un par de veces para remover los restos de sangre; 2) el corazón latiendo, fue trasferido a un Buffer Tyrode libre de Ca²⁺ hasta que dejara de latir. Luego se procedió a cortar y separar el VI (30-40 mg); 3) se transfirió el corte de VI a una placa de petri conteniendo Buffer

Tyrode con 50 μM de Ca^{2+} y la sección de VI fue cortada en pequeños trozos con tijera; 5) los trozos de ventrículo seleccionados para el aislamiento se incubaron en 15 ml de solución Buffer Tyrode (*Tyrode Buffer Solution*: TyBS) conteniendo 30 mg de colagenasa tipo I y 50 μM de Ca^{2+} por 5 minutos; 6) finalizado los 5 minutos de incubación, los trozos de ventrículo izquierdo se transfirieron a tubos eppendorf con 1 ml de Buffer Tyrode con Ca^{2+} 50 μM y fueron agitados para promover el desprendimiento de los cardiomiocitos; 7) los trozos de ventrículo izquierdo que permanecían, fueron removidos y el eppendorf conteniendo los cardiomiocitos fue centrifugado a 800 x g por 5 minutos. 8) se resuspendió el pellet en 1 ml de Buffer Tyrode con Ca^{2+} 0.5 mM y se centrifugó nuevamente 5 minutos a 800 xg; 9) este proceso fue repetido utilizando TyBS con 1 mM CaCl_2 y finalmente 1,8 mM CaCl_2 . Durante el aislamiento de los cardiomiocitos, todas las soluciones utilizadas fueron mantenidas a 37°C y oxigenadas. Para cuantificar la viabilidad de los cardiomiocitos obtenidos, los mismos fueron incubados con Ioduro de Propidio en placa de Petri y fotografiados utilizando un microscopio invertido Olympus IX81. El total de cardiomiocitos aislados así como los que presentaban marca de Ioduro de propidio fueron contados. Los resultados mostraron ~ 70% de viabilidad en los cardiomiocitos controles y ~ 60% en los cardiomiocitos diabéticos. Si bien la viabilidad de los cardiomiocitos diabéticos tratados con resveratrol y cardiomiocitos control tratados con RSV no fue cuantificada, estimamos por las observaciones realizadas durante los experimentos que la misma fue superior al 60% en ambos casos.

Microscopía de Fuerza Atómica

En el presente proyecto, se utilizó el Microscopio de Fuerza Atómica (MFA) del IIBCE (Modelo Bioscope Catalyst Veeco, ahora Bruker). Los cardiomiocitos aislados de corazones provenientes de los diferentes grupos de ratones fueron depositados 10 minutos en portaobjetos de vidrio tratados con polilisina 1X (Sigma). Luego de un lavado con PBS, los cardiomiocitos adheridos fueron incubados 5 minutos con Ioduro de Propidio (IP) en oscuridad y luego lavados tres veces con TyBS. El portaobjeto con células adheridas se ubicó en el microscopio Olympus invertido IX81, acoplado al MFA. El microscopio invertido, fue utilizado para localizar los cardiomiocitos en los cuales se realizarían las curvas de fuerza para la

determinación del MEA. Los cardiomiocitos aislados vivos (sin marca de IP) fueron analizados utilizando un *fluid cantilever holder* a 25°C, por el método de nano-hendiduras, como descrito en Benech et al., 2014. El método de nano-hendiduras consiste en penetrar una cierta distancia en la muestra y registrar la relación entre la fuerza ejercida y la indentación. A la gráfica de fuerza en función de indentación se le denomina curva de fuerza.

La ecuación que relaciona la fuerza con la indentación para una punta piramidal (Sirghi et al., 2008; Benech et al., 2014) es:

$$F = 2E * h^2 \sqrt{\frac{tg17.5(tg15 + tg25)}{\pi}}$$

donde F es la fuerza de indentación, h es la profundidad de indentación, y tg es la tangente de los diferentes ángulos presentes en la punta piramidal utilizada. En nuestro caso, para realizar las medidas, fue utilizada una punta de nitruro de silicio código DNP-10 de la compañía Bruker, con un radio de punta de 20-60nm, contenida en un *cantilever* triangular de 200-µm (*cantilever* D), con una constante elástica de 0.06 N/m, de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Para posicionar el *cantilever* sobre la superficie celular se utilizaron las magnificaciones 20X y 40X, en ese orden.

Se realizó una imagen de baja resolución de 500 nm de lado, y la aplicación "Point &Shoot" del software para elegir una serie de 20 puntos distribuidos de manera uniforme sobre la imagen. En cada uno de éstos puntos se obtuvieron aproximadamente 12 curvas de fuerza, con una velocidad de indentación y retracción de 6 µm/s, totalizando aproximadamente 240 curvas de fuerza por célula.

Para cada curva de fuerza se realizó un ajuste cuadrático, del que se obtuvo un valor para el Módulo Elástico Aparente (E*). En total se analizaron entre 14-20 células de cada condición, de por lo menos 3 animales diferentes. Se construyó un histograma normalizado del E* para cada condición.

Tinción con faloidina de células aisladas

Las células aisladas se fijaron a un vidrio tratado con polilisina 1X, se incubaron 10 minutos con PFA 1% en PBS y posteriormente se lavaron con 0.1% Tritón X-100-PBS. Para estudiar la Actina-F, se realizó una incubación con faloidina fluorescente 633 (50 µg/ml-Sigma Aldrich), 40 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron tres veces con PBS para eliminar exceso de faloidina. Se montaron los cubreobjetos y se obtuvo imágenes con el microscopio láser confocal. Se realizó un ploteo de superficie de células seleccionadas utilizando el programa Image J (NIH, USA), como insumo para poder determinar la distribución espacial de los filamentos de actina.

Análisis Estadístico

La normalidad de los datos, se determinó por el test de Shapiro-Wilks y la homocedasticidad (homogeneidad de varianzas entre grupos) fue evaluada por el test de Cochran y Levene (Alvarez Cáceres, 2007). La comparación de la glicemia entre grupos fue analizada por ANOVA para mediciones repetidas donde se incluyó el efecto de grupo, el efecto tiempo y la interacción entre ambos. Las otras variables (evaluadas en una sola ocasión) fueron comparadas entre grupos por ANOVA. Las comparaciones múltiples a posterior del ANOVA fueron realizadas por la mínima diferencia significativa (LSD) de Fisher. Los resultados fueron expresados como la media \pm el desvío estándar (SD). Se consideró diferencias significativas con un $\alpha \leq 0.05$ y tendencia con un α entre 0.05 y 0.1.

RESULTADOS

Caracterización de los ratones utilizados

En todos los animales, previo a la inyección de la STZ (semana 0), los niveles de glicemia fueron en promedio de 160 mg/dl. Hubo efecto de grupo ($p < 0,0001$), tiempo ($p = < 0,0001$), e interacción entre grupo y tiempo ($p < 0,0001$) en los niveles de glicemia. En los ratones inyectados con STZ, luego de 3 semanas de la inyección, el nivel de glicemia de los mismos fue significativamente mayor que en los controles ($p < 0,0001$) y con valores similares sostenidos de alta glicemia hasta las 12 semanas (3 meses) (Figura 5). La inyección de RSV no modificó significativamente la glicemia de los animales DRSV con respecto a los D ($p = 0,08$) y CRSV con respecto a los C ($p = 0,98$) (Figura 5).

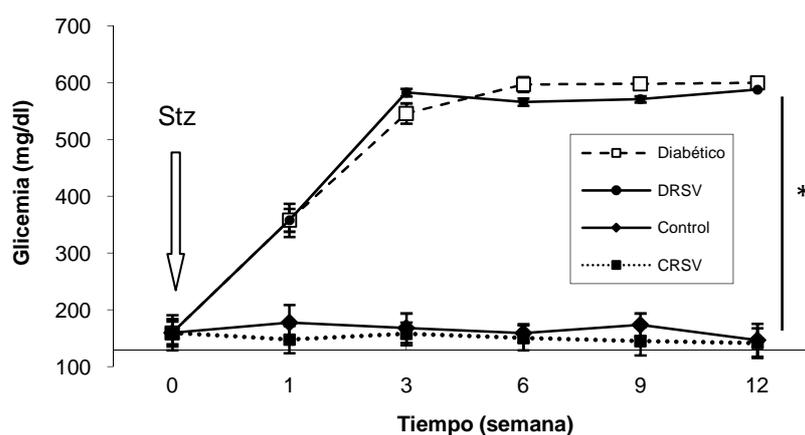


Figura 5. Niveles de glicemia de los grupos de ratones. Se tomaron medidas de glicemia en ratones hasta el término de 12 semanas. C: control (n=12), D: diabético (n=12), DRSV: diabético con RSV (n=12) y CRSV: control con RSV (n=5). El valor de la semana 0 es el de todos los animales previo a la inyección de STZ. Los valores son promedio \pm SD. * $p \leq 0,05$.

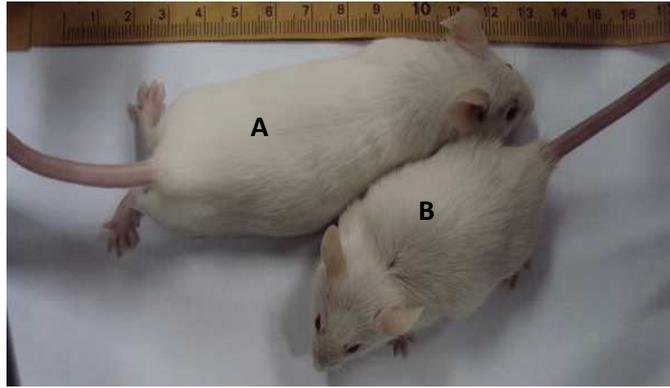


Figura 6. Foto representativa de ratones controles y diabéticos de 4 meses y medio de vida. A-Ratón control; B-Ratón diabético.

Expresión de la bomba de Ca^{2+} SERCA2a y de NCX1

La expresión de la bomba de Ca^{2+} SERCA2a, en homogenizados de VI de corazón no mostró un efecto de grupo ($p=0,16$) (Figura 7D). Sin embargo, en las comparaciones múltiples entre grupos de animales, detectamos una disminución significativa ($p=0,05$) al comparar animales D con animales control de la misma edad. Por otro lado, los ratones DRSV, mostraron una tendencia a una expresión mayor SERCA2a que los ratones D ($p=0,08$), al compararse dentro del ANOVA. El tratamiento de los animales CRSV no tuvo efecto significativo en la expresión de SERCA2a comparado con los animales C ($p=0.90$).

Con respecto a la expresión de NCX1 en homogenizados de VI de corazón obtenidos de animales diabéticos se observó un efecto de grupo ($p=0.0002$). A su vez, detectamos un aumento ($p=0.0049$) en la expresión en el grupo D, comparado con animales control de la misma edad (Figura 8D).

Por otra parte, los animales DRSV presentaron una disminución ($p=0.0023$) en la expresión de NCX1, comparado con los animales diabéticos (Figura 8D).

Finalmente, la expresión de NCX1 en los animales CRSV no mostró diferencias en el nivel de expresión ($p=0.7789$) comparado con los grupos control (Figura 8D).

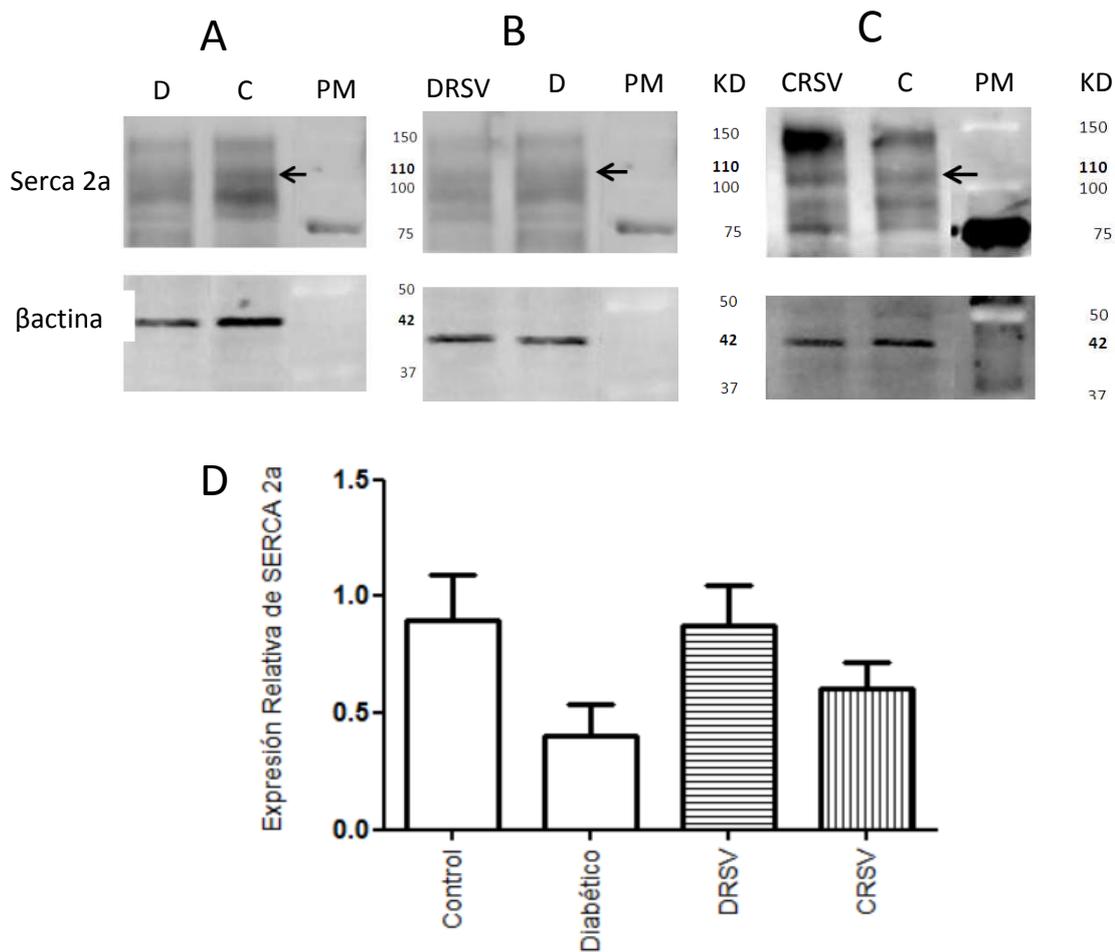


Figura 7. Expresión de SERCA2a en corazones de ratones. A, B y C: Imágenes representativas obtenidas por análisis de Western Blot de los diferentes grupos de animales (C= Control; D=Diabético; Diabético con RSV y CRSV= Control con RSV). Las flechas indican las bandas correspondientes a SERCA2a (110KDa). Proteína de referencia: β actina (42 KDa). **D:** expresiones relativas (SERCA2a/ β actina) con sus respectivas desviaciones estándar. (PM) Marcador de peso molecular. Ratones controles (n=4) y diabéticos (n=3), DRSV (n=3) y CRSV (n=4). Los valores son promedio \pm SD.

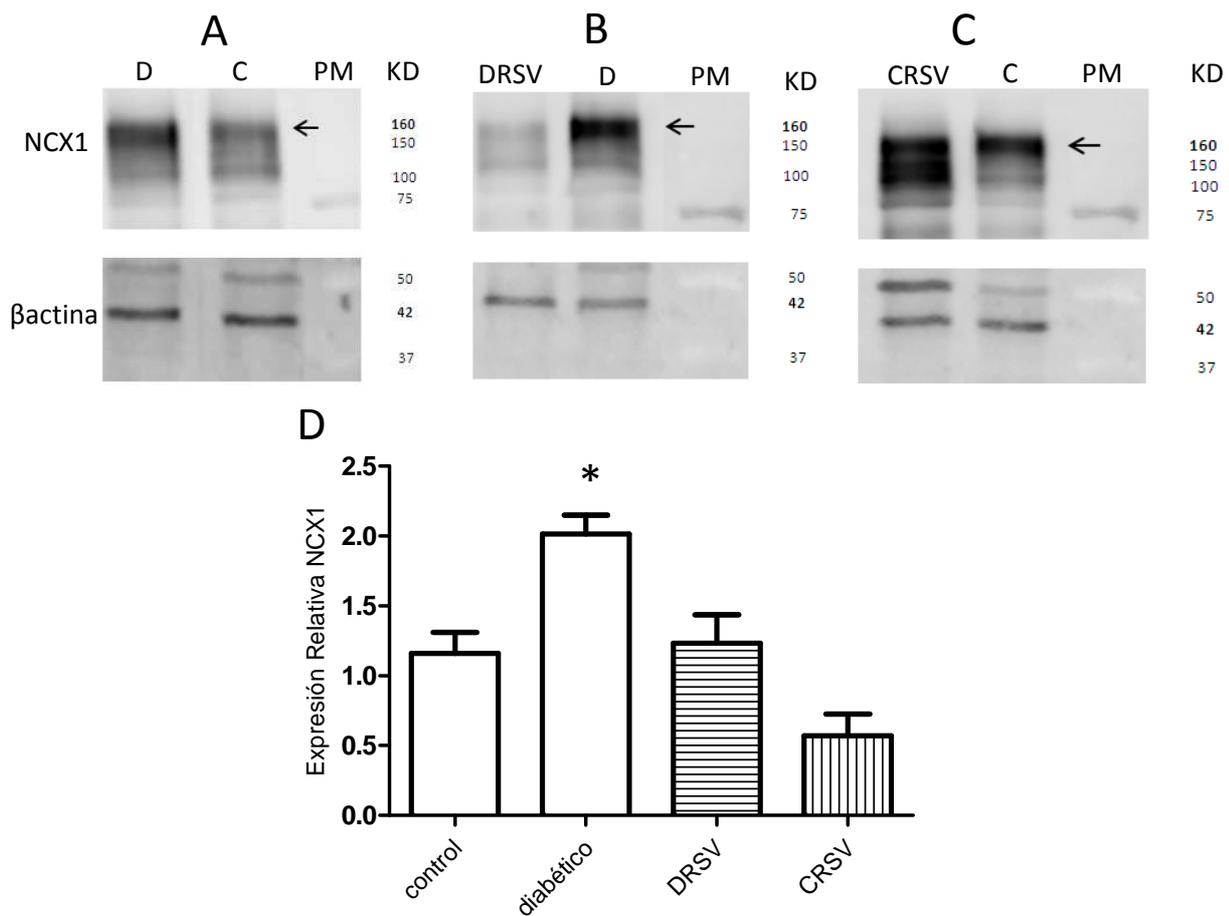


Figura 8. Expresión de NCX1 en corazones de ratones. A, B y C: Imágenes representativas obtenidas por análisis de Western Blot de los diferentes grupos de animales (C= Control; D=Diabético; DRSV= Diabético con RSV y CRSV= Control con RSV). Las flechas indican las bandas correspondientes a NCX1 (160KDa). Proteína de referencia: β actina (42 KDa). **D:** expresiones relativas (NCX1/ β actina) con sus respectivas desviaciones estándar. (PM) Marcador de peso molecular. Ratones controles (n=5) y diabéticos (n=6), DRSV (n=6) y CRSV (n=4). Los valores son promedio \pm SD. * $p \leq 0.05$.

Efecto del resveratrol en la acumulación de colágeno en el corazón

En los cortes de animales diabéticos, se constató una disposición desordenada de las células del miocardio, núcleos de tamaño irregular y fibras fragmentadas y desordenadas, a la vez que una acumulación de colágeno intersticial (Figura 9B). Este último ya ha sido ampliamente reportado y se identifica en esta tinción por un rojo carmesí característico, (Sulaiman et al., 2010). Esto no se observó ni en los preparados histológicos de los grupos control (Figura 9A) ni de CRSV (Figura 9C), los cuales presentaron fibras ordenadas y continuas, y no se observó acumulación de colágeno. Se observó que en las muestras de ratones DRSV las fibras tenían disposición similar a las de los animales control, y sólo en un animal de los cuatro analizados se constató una escasa acumulación de colágeno (Figura 9D).

En la Tabla 2, se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación de la acumulación de colágeno total, de los cortes de VI obtenidos de los diferentes grupos de ratones. Se observó que en el caso de los ratones diabéticos, las acumulaciones de colágeno total representaron un 6,23 % \pm 1,70, mientras que para el grupo C se detectó un 0.18% \pm 0,10 del total del área analizada. Hubo efecto de grupo sobre el contenido de colágeno ($p= 0,0001$), siendo el grupo D el único grupo diferente de las demás condiciones. No hubo diferencias significativas entre el grupo C y CRSV ($p=0,5277$).

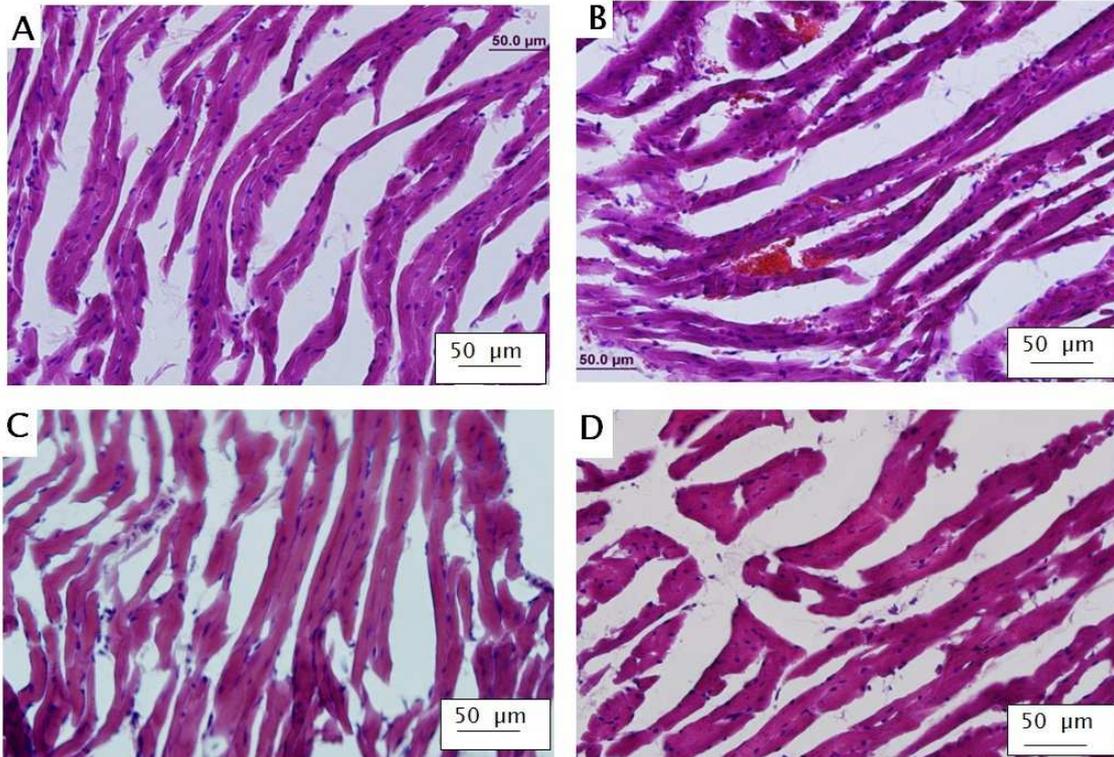


Figura 9. Cortes de corazón de ratón teñidos con Hematoxilina y Eosina
 Imagen representativa de cortes de VI de corazón de ratón de cuatro meses y medio por microscopía de luz transmitida. **A:** Ratón control. **B:** Ratón diabético. **C:** CRSV. **D:** DRSV. Magnificación: 40x.

Tabla 2. Contenido de colágeno en cortes histológicos.

Grupo	Porcentaje del área (%) de colágeno con respecto al área total de fibra analizada
C	0,18 ± 0,10
D	6,23 ± 1,70*
DRSV	0,10 ± 0,05
CRSV	0,17 ± 0,10

Los valores son promedio ± SD. n= 3 animales por grupo de acuerdo a como explicado en materiales y métodos. * p ≤ 0.05 en comparación con los diabéticos. C: control; D: diabético; DRSV: diabético con RSV y CRSV: control con RSV.

Estudio de F-Actina en cortes de corazón

A partir del análisis morfológico de las imágenes de cortes de VI de los cuatro grupos de ratones, se observó un patrón distintivo (ver Materiales y Métodos) en las muestras provenientes de corazones de ratones diabéticos que mostraron filamentos de actina irregulares y rotos (Figura 10C y D). En contraposición, los filamentos de actina de control, DRSV y CRSV fueron regulares y presentaron pocas regiones rotas (Figura 10 A y B, E y F, G y H, respectivamente).

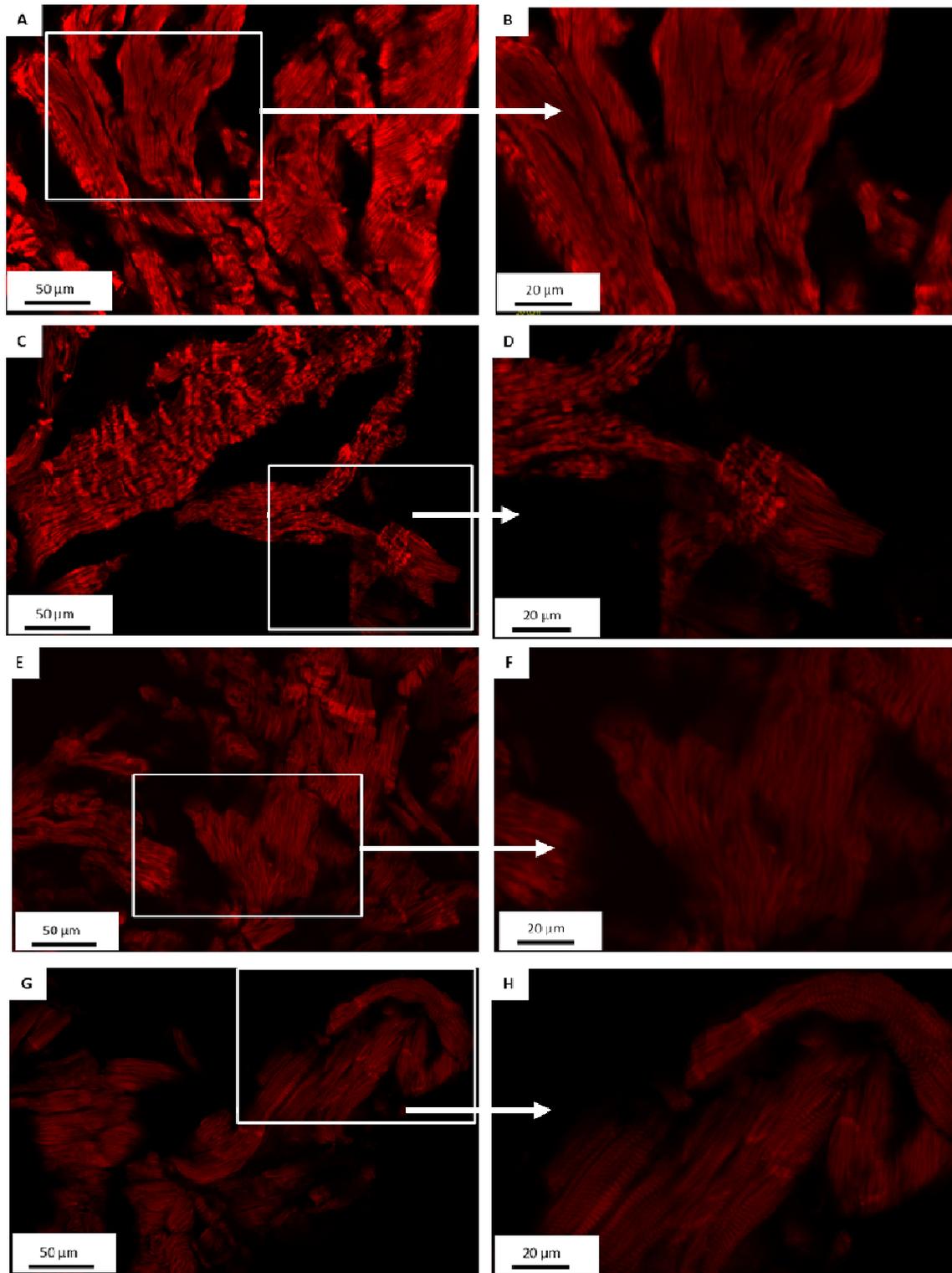


Figura 10. Estudio de F-Actina. Para estudiar la Actina-F, se realizaron cortes de 10 μm del ventrículo izquierdo de los diferentes grupos de ratones y se depositaron en vidrios tratados con gelatina. Se realizó una incubación de 40 min a TA con faloidina fluorescente 633 y se obtuvieron imágenes representativas de Microscopía Laser Confocal. A: control; C: diabético; E: CRSV; G: DRSV. Magnificación: 40x. B: control; D: diabético; F: CRSV; H: DRSV. Magnificación: 80x.

Efecto del Resveratrol en el Modulo Elástico Aparente de Cardiomiocitos Aislados

Las curvas de fuerza obtenidas en los cardiomiocitos vivos, mostraron una menor indentación en los cardiomiocitos D que en los cardiomiocitos C ante la misma fuerza aplicada. La figura 11 muestra el histograma de los E^* de cardiomiocitos C y D. Hubo un efecto de grupo para el E^* ($p=0.0001$). El E^* de los cardiomiocitos diabéticos ($E_d 91 \pm 14$ kPa) fue significativamente mayor al de los cardiomiocitos control ($E_c 43 \pm 7$ kPa) (Figura 11 y Figura 12).

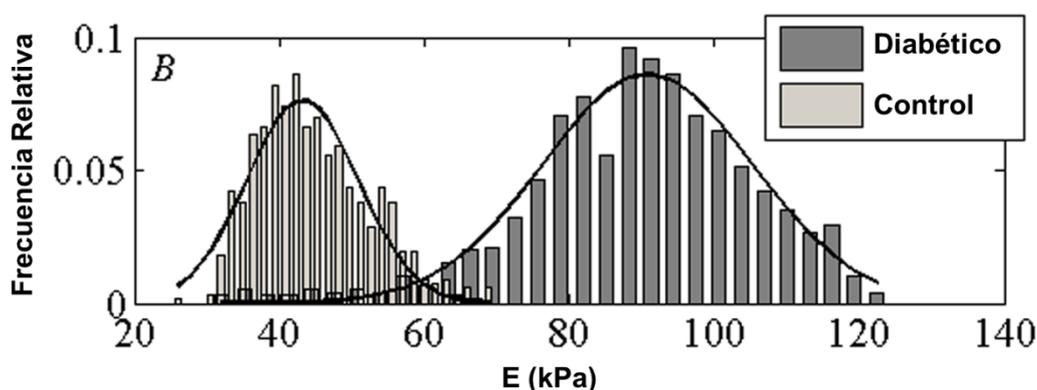


Figura 11. Módulo Elástico Aparente (E^*) de cardiomiocitos aislados Controles y Diabéticos.

Se obtuvo grupos de datos de tres animales diabéticos (14 células, 1,800 curvas de fuerza) y cuatro control (14 células, 2,780 curvas de fuerza). Se realizó un ajuste gaussiano a partir de los datos para cada histograma para calcular el promedio y la desviación estándar del Módulo Elástico (E).

Por otro lado, al realizar las comparaciones múltiples entre grupos, el E^* de los cardiomiocitos provenientes de los ratones DRSV fue significativamente menor ($p=0,00016$) al de los cardiomiocitos provenientes de ratones diabéticos sin tratamiento (Figura 12). Se constató una diferencia significativa ($p=0,03$) en el E^* de cardiomiocitos provenientes de los ratones CRSV, en comparación con los cardiomiocitos obtenidos de ratones control, siendo el E^* del grupo CRVS mayor que el del grupo C.

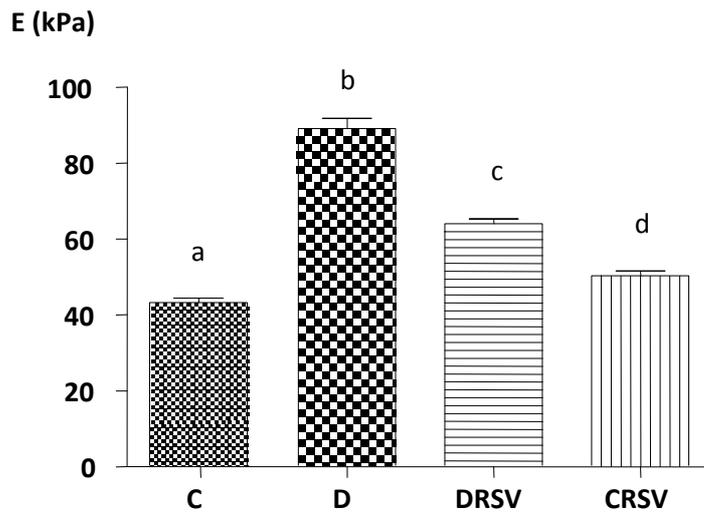


Figura 12. Módulos elásticos aparentes de cardiomiocitos aislados de los diferentes grupos de ratones. Los valores corresponden a la media \pm SD de 3360-4800 curvas de fuerza obtenidas de 14-2 células de por lo menos 3 animales de cada grupo. Los cardiomiocitos aislados de los diferentes grupos de ratones fueron colocados en una cámara de vidrio tratada con polilisina 1X. Los cardiomiocitos adheridos, fueron incubados en buffer Tyrode y se procedió como descrito en Materiales y Métodos. Se obtuvo el histograma normalizado del Módulo de Young para cada condición experimental. A cada histograma se le realizó un ajuste Gaussiano para obtener el promedio y el desvío estándar del Módulo Elástico E en cada condición experimental. Se realizó one-way ANOVA para el análisis estadístico. Diferentes letras entre grupos difieren: b vs. a, c y d, a vs. c y d, c vs. dp \leq 0.05

Efecto de la diabetes en la F-Actina de cardiomiocitos diabéticos

Observamos que los cardiomiocitos de ratones D mostraron filamentos irregulares y difusos (Figura 13D, E y F), en comparación a los cardiomiocitos de ratones C, los cuales mostraron una organización regular de la F-actina (Figura 13A, B y C) (Benech et al., 2014).

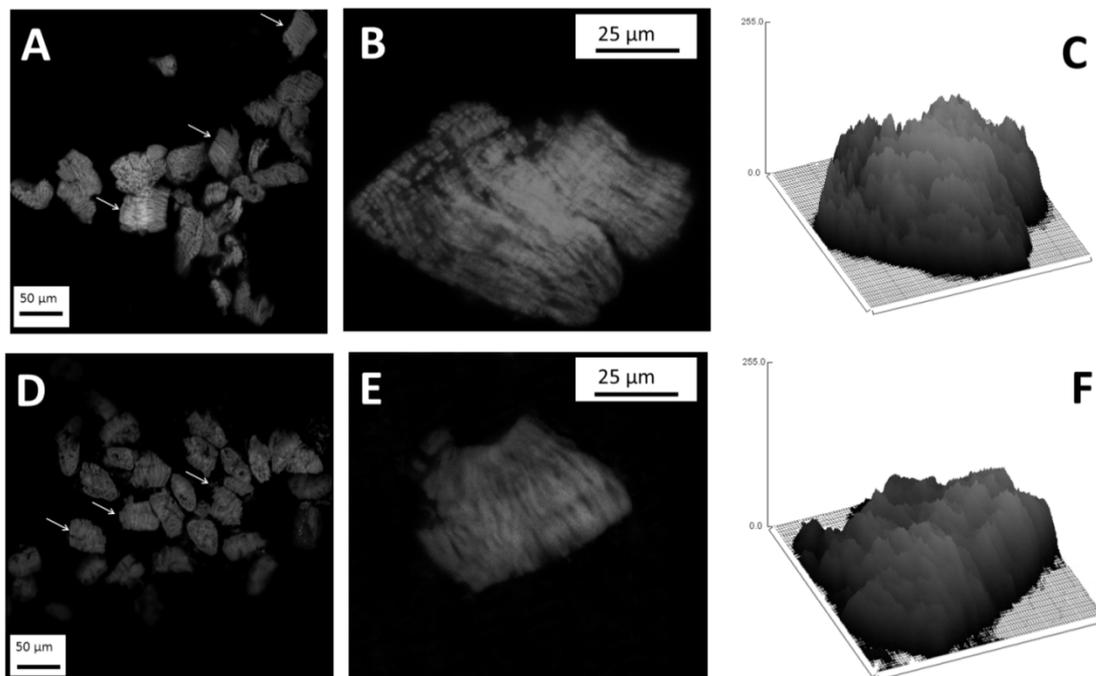


Figura 13. F-actina en cardiomiocitos aislados de VI de corazón de ratón teñidos con faloidina. Imágenes representativas de cardiomiocitos aislados de VI de corazón de ratón control y diabéticos teñidos con faloidina. Los cardiomiocitos fueron aislados, incubados 40 min con faloidina fluorescente 633 y fotografiados por microscopía láser confocal. Se realizó un ploteo de superficie de células seleccionadas utilizando el programa Image J para poder determinar la distribución espacial de los filamentos de actina. **A y B:** cardiomiocitos de ratón control. 40x y 100x respectivamente. **D y E:** cardiomiocitos de ratón diabético. 40x y 100x respectivamente. Con una flecha blanca se indican cardiomiocitos característicos de cada grupo. **C y F:** ploteo de superficie por ImageJ de cardiomiocito control y diabético respectivamente.

Efecto del Resveratrol en la Sobrevida de los ratones

El 75% de los ratones diabéticos murieron antes de que se completara el estudio. El tratamiento de los ratones diabéticos con RSV mostró mejorar la sobrevida de los ratones a lo largo de los 3 meses de estudio. A los 2 meses de inducida la diabetes murió el 60% de los ratones diabéticos. Sin embargo, en este mismo tiempo, el tratamiento con RSV redujo la muerte a un 25%, mientras que los ratones CRSV tuvieron una sobrevida similar a la de los animales control (Figura 14).

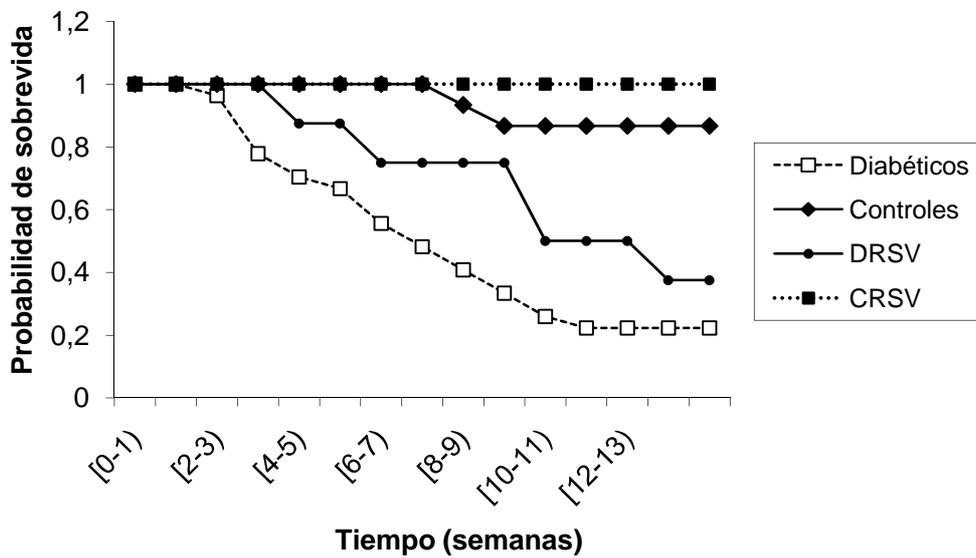


Figura 14. Probabilidad de sobrevida en función del tiempo de ratones control, diabéticos y tratados con Resveratrol. Tiempo: semanas.

DISCUSIÓN

Este trabajo muestra evidencias experimentales de que el tratamiento con RSV de ratones con DM1, puede ayudar a prevenir o mejorar varios de los mecanismos patogénicos vinculados con la enfermedad. El presente estudio, fue realizado utilizando el modelo de inducción de DM1 por administración de STZ. La administración de esta droga, produce necrosis selectiva de las células β del páncreas, resultando en animales con deficiencia de insulina. Este modelo animal de DM1 está muy bien caracterizado (Atkinson, Eisenbarth, & Michels, 2014; Coppieters et al., 2012; Diana et al., 2013) y ha sido utilizado previamente para estudios del efecto de la diabetes en el corazón (Sulaiman et al., 2010).

Todos los animales utilizados en el presente estudio mostraron altos niveles de glucosa en sangre (superior a 250mg/dl, (Figura 5) y signos de diabetes como poliuria y polidipsia. El tratamiento con RSV de los ratones diabéticos no disminuyó la alta glicemia (Figura 5). Este resultado es similar a resultados obtenidos por Sulaiman et al. (2010).

Utilizando este modelo de inducción de DM1, logamos observar el efecto del tratamiento con RSV en la expresión de dos proteínas relacionadas con la homeostasis del Ca^{2+} , la deposición de colágeno total, la nanomecánica de los cardiomiocitos y la sobrevivencia de los ratones diabéticos.

Efecto del resveratrol en la expresión de SERCA2a y NCX1

A pesar de no haber observado un efecto de grupo, detectamos una disminución significativa en la expresión de la bomba de Ca^{2+} SERCA2a, cuando comparamos animales diabéticos con animales control de la misma edad (Figura 7). Estos resultados están en concordancia con reportes previos (Benech et al., 2014; LaRocca et al., 2012; Sulaiman et al., 2010; Trost et al., 2002). Una disminución en la expresión de SERCA2a se ha observado también en estudios con pacientes diabéticos (Zarain-Herzberg et al., 2014).

Por otro lado, las muestras provenientes del grupo DRSV (Figura 7) mostraron una tendencia a una expresión mayor de SERCA2a que los diabéticos. Sin embargo, los animales CRSV

tuvieron un perfil de expresión relativa de SERCA2a similar al del grupo control (Figura 7). Estos resultados sugieren que el tratamiento con RSV afecta la expresión de SERCA2a, mitigando la inhibición de su expresión promovida por la diabetes. Los resultados están de acuerdo con el estudio realizado por Sulaiman et al., 2010, quienes, utilizando el modelo murino de DM1 inducida por inyección de STZ, reportaron que el tratamiento de estos ratones diabéticos con RSV fue responsable de que el nivel de expresión de SERCA2a llegara al 80% de la expresión en el control. La diferencia en el nivel de significancia, podría ser explicado por la vía y periodicidad de administración del RSV. En el trabajo citado anteriormente (Sulaiman et al., 2010), el RSV fue administrado diariamente en la ración, mientras que nuestro método fue administrado por vía intraperitoneal desde la confirmación de la diabetes, cada dos días, durante tres meses.

En homogenizado de animales diabéticos, detectamos un aumento significativo en la expresión de NCX1, comparado con animales control de la misma edad (Figura 8). Este resultado ha sido descrito en estudios previos (Hattori et al., 2000; Kashihara et al., 2000; LaRocca et al., 2012). LaRocca (2012) han propuesto que el aumento en la expresión de NCX1 en diabetes resulta por un mecanismo compensatorio por el descenso en la expresión de SERCA2a y en respuesta a una alteración de la homeostasis de Ca^{2+} en el corazón. Durante la diástole, el 95% del Ca^{2+} citosólico de miocitos murinos es re-secuestrado por SERCA2a del RE, disminuyendo por lo tanto el Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), lo cual permite la relajación del miocito. Para mantener el balance latido-a-latido del Ca^{2+} , este tiene que ser extruido por NCX1, con contribución de la Ca^{2+} -ATPasa del plasmolema (LaRocca et al., 2012). A su vez, algunos autores sugieren que el aumento en la expresión de NCX1 y el adelanto de la corriente de NCX1 (IncX) contribuye en hasta un 50% del eflujo de calcio para mantener los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ diastólicos, como mecanismo compensatorios al descenso de la actividad de SERCA2a (Reuter et al., 2005; Szentesi, et al. 2004; Wang et al., 2009). Por lo tanto, el aumento en la expresión de NCX1 en el corazón diabético ha sido propuesto como una adaptación a la disminución en la expresión de SERCA2a (LaRocca et al., 2012).

Con respecto a la expresión de NCX1 en ratones DRSV, ésta fue significativamente menor en comparación con la expresión en ratones diabéticos (Figura 8), mientras que la de los ratones

CRSV fue similar a la expresión en ratones control (Figura 8). Debemos dejar claro, que en nuestro trabajo no medimos la concentración de calcio ni en el citosol ni en el retículo endoplásmico en los diferentes cardiomiocitos, Lo que si constatamos, es que en la DM1 disminuye la expresión de SERCA2a y aumenta la de NCX1, y que el tratamiento con RSV atenúa parcialmente este efecto, haciendo que la expresión de SERCA2a y NCX1 sean más parecidas al grupo control (Sulaiman et al., 2010).

Como fue mencionado anteriormente, se sabe que el RSV es un activador de SIRT1 y un muy buen antioxidante (Park & Pezzuto, 2015; Raj et al., 2014). Sulaiman et al., (2010) reportaron que la actividad reducida de SIRT1 durante la DM1, contribuye a la represión de la expresión de SERCA2a observada en esta patología. Los mismos autores demuestran que el RSV, al activar SIRT1, mejora los niveles de expresión de SERCA2a. Sin embargo, en un estudio realizado por nuestro grupo de investigación (Bervejillo, 2015), fue constatado que el tratamiento de los ratones diabéticos con RSV no modificó significativamente, ni la expresión ni la actividad de SIRT1. Ambas se encontraron disminuidas en las muestras de ventrículo izquierdo de ratones diabéticos. En base a estos resultados, se sugiere que muy posiblemente las propiedades antioxidantes del RSV sean importantes en el restablecimiento de los niveles de expresión de SERCA2a y NCX1 alterados por la diabetes (se discutirá más adelante).

El resveratrol disminuye depósitos de colágeno en corazones diabéticos

En este trabajo, constatamos una acumulación de colágeno total del $6,23 \% \pm 1,70$ en el VI de los corazones de ratones diabéticos, valor significativamente diferente al porcentaje de colágeno total en corazones de ratones control (Figura 9) (Tabla 2). El depósito de colágeno en muestras de ventrículo izquierdo de corazones diabéticos ha sido descrito en varios trabajos previos, tanto en muestras de animales (Cooper et al., 2004, Huang et al., 2013) como en biopsias humanas (Van Heerebeek et al., 2008). En uno de estos trabajos, el depósito de colágeno fue cuantificado y representó el 8% del área total analizada (Huang et al., 2013). Este resultado fue similar al porcentaje de acúmulo de colágeno constatado en nuestro estudio.

En el caso de los ratones C y CRSV, el análisis visual y el análisis digital mostraron niveles muy bajos de colágeno (Tabla 2). Estos resultados sugieren que la acumulación de colágeno se da como consecuencia de la patología. El tratamiento con RSV de los ratones diabéticos, disminuyó significativamente el acúmulo de colágeno en el corazón. Estudios previos han mostrado una inhibición de la proliferación y diferenciación de fibroblastos cardíacos por el RSV, así como una modificación de la deposición de colágeno *in vivo* en el miocardio diabético (Lin et al., 2008, Liu et al., 2015, Wu 2016). Nuestros resultados están de acuerdo con los estudios mencionados anteriormente.

El daño oxidativo está involucrado en la patogénesis de diversas enfermedades, como las enfermedades neurodegenerativas, el cáncer, la diabetes y las enfermedades cardiovasculares. También cumple un rol importante en el envejecimiento. Se ha sugerido que el aumento del estrés oxidativo y de la producción de ROS en el corazón diabético, es un factor que contribuye al desarrollo y progresión patologías cardíacas (Cai, 2006; Cai et al., 2006). Varios grupos de investigación han mostrado la existencia de una mayor producción de ROS en DM1 y 2 (Barouch et al., 2003; Cai et al., 2002; Wold & Ren, 2004; Zhou et al., 2000). En condiciones fisiológicas, la mayor parte del ROS generado en las células se origina en la mitocondria. En células endoteliales expuestas a hiperglicemia, la generación de ROS por la mitocondria se vio aumentada (Brownlee, 1995). La sobre-expresión de la superóxidodismutasa mitocondrial (Sod2) en el corazón de ratones con DM1, revirtió la morfología alterada de las mitocondrias y mantuvo la función de los cardiomiocitos (Shen et al., 2006).

Varias son las evidencias experimentales que muestran actividad antioxidante del RSV. Mitocondrias de cerebro de rata incubadas con RSV, mostraron una reducción en la respiración mitocondrial (Zini et al., 1999). Además, el RSV inhibe la actividad del complejo III al competir con la coenzima Q. Este hecho es interesante pues demuestra su actividad antioxidante en la mitocondria, no sólo por su actividad en la toma de electrones desapareados, sino también por la inhibición del complejo que genera radicales libres (Zini et al., 1999). Se ha mostrado *in vitro* que concentraciones de RSV similares a las provenientes de la alimentación, pueden disminuir

los niveles de H₂O₂ en células MCF-7 al inducir la expresión de genes antioxidantes como la catalasa (Ferrero et al., 1998) y la manganeso superóxidodismutasa (MnSOD), a través de un mecanismo que involucra al homólogo de la fosfatasa y tensina (PTEN) y la vía de señalización proteína quinasa (Inglés et al., 2014). En referencia al sistema cardiovascular, se ha reportado que a una concentración de 20 µM de este polifenol, puede reducir el contenido de malondialdehído en células mononucleares de la sangre de pacientes sanos (Losa, 2003). Por otro lado, la pre-incubación de células del músculo liso de aortas bovinas con RSV, pudo atenuar la lipoproteína de baja densidad oxidada (oxLDL-), la que induce aumentos en ROS y niveles de H₂O₂ (Liu & Liu, 2004). En otro estudio llevado a cabo en plaquetas humanas tratadas con peroxinitrito, el RSV inhibió la carbonilación, la nitración y la peroxidación lipídica (Olas et al., 2008).

Como fue dicho anteriormente, en un estudio realizado por integrantes de nuestro grupo de investigación (Bervejillo, 2015), fue constatado que el tratamiento de los ratones diabéticos con RSV no modificó significativamente ni la expresión ni la actividad de SIRT1. La larga lista de evidencias experimentales citadas anteriormente, que muestran un efecto antioxidante del RSV, nos lleva a postular que el efecto de disminución de colágeno en los corazones de ratones DRSV puede ser atribuido en parte a la disminución de cascadas oxidativas, gracias al efecto antioxidante del RSV. El aumento en la producción de ROS ha sido asociado con aumento de apoptosis y activación de la actividad de caspasa 3 en corazones de ratones ob/ob y db/db (Barouch et al., 2003). El mismo estudio mostró el aumento de ROS asociado a un aumento del daño del ADN y pérdida de actividad de las diferentes vías de reparación del ADN. Además de causar daño celular, el aumento en la producción de ROS podría llevar a la disfunción cardíaca por otros mecanismos. Por ejemplo, ha sido propuesto que el aumento de ROS amplificaría la activación de la proteína quinasa C por la hiperglicemia, lo que aumentaría la formación de productos finales de glicosilación avanzada (AGEs), y aumentaría el flujo de glucosa por la vía de la aldosa reductasa (Brownlee, 1995; Koya & King, 1998). En su trabajo de Tesis, Bervejillo, 2015, mostró por inmunohistoquímica el aumento de AGEs en cortes de VI de corazón de ratones diabéticos, entre los cuales se encuentra muy posiblemente el colágeno. El tratamiento con RSV de los ratones diabéticos, disminuyó significativamente la presencia de los AGEs. Por lo tanto, el tratamiento con RSV, podría estar disminuyendo los *crosslinks*

(producto de la glicación no enzimática del colágeno y elastina en el corazón diabético), promoviendo el restablecimiento de los mecanismos normales de degradación del colágeno en el corazón. Sería necesario seguir trabajando para proporcionar evidencias experimentales directas del efecto antioxidante del resveratrol en nuestro modelo experimental.

Efecto del Resveratrol en las propiedades nanomecánicas de los cardiomiocitos y su posible relación con la F-actina.

En el presente trabajo de Tesis, se constató (utilizando AFM) un efecto de grupo en el E^* de los cardiomiocitos. A su vez el E^* de DRSV, fue significativamente menor al de los cardiomiocitos diabético y significativamente mayor al de los cardiomiocitos control (Figura 12). Trabajos previos han utilizado AFM para estudiar las propiedades dinámicas y mecánicas de células vivas. Eventos como la locomoción, diferenciación y envejecimiento, así como diferentes eventos fisiológicos y patológicos pudieron ser analizados por AFM (J.-Y. Chen et al., 2013; Kuznetsova et al., 2007; Müller & Dufrêne, 2011; Qiu et al., 2010; Wu et al., 2010; Zhu et al., 2012). Por ejemplo, utilizando AFM, se ha estudiado el efecto del envejecimiento y la obesidad en la rigidez de Células de la Musculatura Lisa Vascular (CMLV) (J.-Y. Chen et al., 2013; Qiu et al., 2010), así como el efecto del envejecimiento en la rigidez de los cardiomiocitos (Lieber et al., 2004).

Qiu, H et al, 2010, reportaron que la rigidez (determinada como E^*) fue 200% mayor en CMLV vivas obtenidas de la aorta de monos viejos comparados con CMLV obtenidas de monos jóvenes. El MEA reportado para CMLV de monos jóvenes fue de 12.8 ± 0.3 kPa y para CMLV de monos viejos fue de 41.7 ± 0.5 kPa. Este aumento en el E^* desapareció luego de tratar las células con Citocalasina D, una droga que provoca el desensamblaje del citoesqueleto de actina (Qiu et al., 2010).

Previamente, hemos demostrado un aumento del E^* en cardiomiocitos provenientes de ratones diabéticos en comparación con los provenientes de ratones controles. Este aumento en el E^* de los cardiomiocitos diabéticos fue observado en buffers con diferentes composiciones iónicas (Benech et al., 2014), incluyendo la condición fisiológica con 1,8 mM CaCl_2 . Por lo tanto, los cardiomiocitos provenientes de ratones diabéticos resultaron ser más rígidos que los de

ratones control, en condiciones fisiológicas normales (Figura 11 y Figura 12). Como fue mencionado anteriormente, en el presente trabajo constatamos que el E^* de los cardiomiocitos DRSV fue significativamente menor al de los cardiomiocitos diabéticos y significativamente mayor al de los cardiomiocitos control (Figura 12). Estos resultados sugieren que el tratamiento con RSV disminuye la rigidez provocada por la patología en los cardiomiocitos. Si bien fue constatado un efecto del resveratrol en el E^* , del grupo control, el efecto fue mucho menor que el observado en ratones diabéticos. En el grupo control, el E^* pasó de 43 ± 7 kPa (sin resveratrol) a 51 ± 7 kPa (con resveratrol), con un nivel de significancia de $p = 0,03$. En los ratones diabéticos el E^* fue de 91 ± 14 kPa (sin RSV) y 64 ± 7 kPa (con RSV) con un nivel de significancia de $p = 0,00016$.

El AFM, ha mostrado su capacidad en detectar cambios a nivel del citoesqueleto celular (Vinckier & Semenza, 1998). Aplicada a cardiomiocitos aislados vivos, las medidas de indentación registran cambios en el sarcolema, el esqueleto sarcomérico y las proteínas del citoesqueleto, incluidas la tubulina, desmina y actina. Diversos trabajos han mostrado alteraciones funcionales y estructurales en corazones de animales con diabetes inducida por inyección de STZ (Cooper et al., 2004; Lieber et al., 2004; Nemoto et al., 2006). Existen evidencias experimentales de que la diabetes afecta el citoesqueleto de actina (Cooper et al., 2004). Estos investigadores, utilizando faloidina, fluorescente, mostraron un remodelamiento del citoesqueleto de actina en corazones de ratas diabéticas y Nemoto et al., 2006, observaron que la tinción de actina estaba reducida, sugiriendo que su expresión estaba disminuida en los corazones diabéticos. El análisis morfológico de los cortes de VI de los cuatro grupo de ratones constatando filamentos de actina irregulares y rotos en los ratones diabéticos (Figura 10C y D) coincide con las observaciones de Cooper et al, 2004. El efecto protector de los filamentos de actina en los ratones diabéticos por el tratamiento con RSV, está en línea con sus propiedades anti-oxidantes que ya fueron discutidas. En el caso de los cardiomiocitos aislados, observamos que los provenientes de ratones diabéticos mostraron filamentos irregulares y difusos de actina (Figura 13D, E y F), en comparación a los cardiomiocitos de ratones control, los cuales mostraron una organización regular de la F-actina (Figura 13A, B y C) (Benech et al., 2014). Wu et al, 2010, mostraron que el citoesqueleto de actina es un componente importante en las medidas del módulo elástico obtenido en cardiomiocitos, ya que disminuye mucho con el

tratamiento con citocalasina D. En ausencia de citocalasina D, el E^* fue de aproximadamente 30 kPa y de aproximadamente 5 kPa en presencia de la droga. Estos resultados sugieren que en los cardiomiocitos vivos, la actina sería responsable de más del 80% del valor total del E^* . Es decir, que pequeños cambios en la organización del citoesqueleto de actina, podrían afectar significativamente la rigidez de los cardiomiocitos. Nuestros resultados con los cortes histológicos, muestran que el tratamiento con RSV de los ratones diabéticos fue capaz de disminuir o minimizar los daños causados por la patología diabética en los cortes realizados en los animales DRSV. También constatamos una disminución del MEA en los cardiomiocitos de estos ratones. El tratamiento con RSV promovió una disminución del 30% en el E^* , en comparación con el de los cardiomiocitos diabéticos. Dada la gran contribución del citoesqueleto de actina en el valor del E^* , sería bastante razonable pensar que el RSV pudiera estar protegiendo el citoesqueleto de actina de las modificaciones que le provoca la diabetes y que fueran explicadas anteriormente. Si bien con los cardiomiocitos diabéticos tratados con RSV no hemos realizado el estudio de la disposición de los filamentos de actina utilizando faloidina, el resultado obtenido con los cortes de tejido, permite especular que los filamentos de actina en este caso deberían ser muy similares al de los cardiomiocitos de ratones controles (filamentos de actina más nítidos organizados en forma más regular).

Como hemos visto, el tratamiento de ratones diabéticos con RSV ha mejorado varios de los mecanismos patogénicos vinculados con la enfermedad. Disminuyó el efecto de la diabetes en la expresión de SERCA2a y NCX1 y disminuyó el colágeno acumulado en el VI del corazón. También protegió los filamentos de F-actina de la desorganización y la rotura, así como protegió a los cardiomiocitos de la rigidez promovidos por la patología.

Trabajos previos, han reportado efectos cardioprotectores del RSV, tales como propiedades antiinflamatorias y antioxidantes (Raj et al., 2014; Švajger & Jeras, 2012). Además, el RSV presentó varios efectos benéficos en el corazón diabético, descritos anteriormente. Tal vez todos estos aspectos sumados puedan explicar que el tratamiento con RSV mejoró la supervivencia de los ratones diabéticos (Figura 14).

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos, concluimos que el tratamiento de ratones diabéticos con RSV produce efectos positivos a pesar de que el mismo no disminuyó el alto nivel de hiperglicemia que mantuvieron los ratones durante las 12 semanas del experimento. Sin embargo, pudimos constatar que el tratamiento con resveratrol: 1) promovió una tendencia en la recuperación del nivel de expresión de SERCA2a (expresión disminuida en la diabetes) y una disminución significativa en la expresión de NCX1 (expresión aumentada en la diabetes), tornando la expresión de ambas proteínas más similares a las observadas en el grupo control; 2) promovió una menor acumulación de colágeno en cortes de VI de los ratones diabéticos; 3) protegió los filamentos de F-actina de la desorganización y la rotura, así como protegió a los cardiomiocitos de la rigidez promovida por la patología; 4) constatamos una mayor sobrevida, de los ratones diabéticos tratados con el flavonoide. Por lo tanto, el RSV disminuyó el daño cardíaco causado por la diabetes en ratones no tratados con insulina.

El tratamiento con resveratrol podría ser una alternativa para prevenir efectos cardíacos en pacientes con DM.

PERSPECTIVAS

1. Realizar el análisis de nuevas muestras de los diferentes grupos y repetir análisis por Western Blot para corroborar el aumento de SERCA2a en DRSV (aumentar n).
2. Utilizar técnicas más específicas para la cuantificación de colágeno.
3. Realizar tinciones con faloidina en cardiomiocitos aislados de CRSV y DRSV para estudiar la estructura de la F-actina en estos grupos y poder comparar con los resultados obtenidos de animales C y D.
4. Realizar todos los procedimientos descritos en esta Tesis, en ratones diabéticos tratados con insulina y sus respectivos grupos control.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer de corazón a aquellos que gracias a su continua compañía, este trabajo fue posible.

Agradezco al Dr. Juan Benech por darme la oportunidad de realizar el trabajo de posgrado y orientarme durante la Maestría. Sus enseñanzas sobre la investigación y la vida académica dejan su huella en mi desarrollo profesional y personal.

Agradezco a mis compañeros y amigos del Laboratorio de Señalización Celular y Nanobiología, Natalia, Verónica, Mariel y Andrés, con quienes compartimos largas jornadas de experimentos, discusiones y presentaciones en congresos. También muchas gracias a Inés por el constante apoyo para el análisis por AFM y a Juan Pablo que me orientó e instruyó en los análisis estadísticos durante el transcurso del trabajo. Infinitas gracias a Gastón, por programar el MATLAB, para la cuantificación del colágeno.

A mis amigos, y a mis compañeros Scouts, hermanos de la vida, por comprender mis incontables ausencias a actividades sociales con justificativos científicos, y por escuchar mis historias del laboratorio, sobre las misteriosas células inmortales y los beneficios de las uvas para la salud.

Y finalmente, pero sumamente importante, a mi familia, por ser incondicionales fans de mi carrera, por seguir mis proyectos de investigación muy de cerca, dejándome transmitirles mi amor por la ciencia en cada paso. Por apoyarme pase lo que pase, bien cerca o desde la distancia. Un gracias enorme para todos, y también para los que ya no están.

REFERENCIAS

- Aksoy, P., Escande, C., White, T. a., Thompson, M., Soares, S., Benech, J. C., & Chini, E. N. (2006). Regulation of SIRT 1 mediated NAD dependent deacetylation: A novel role for the multifunctional enzyme CD38. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 349, 353–359.
- Alvarez Cáceres, R. (2007). *Estadística aplicada a las ciencias de la salud*. Madrid: Ediciones Díaz de Santos.
- Anton, S. D., Embry, C., Marsiske, M., Lu, X., Doss, H., Leeuwenburgh, C., & Manini, T. M. (2014). Safety and metabolic outcomes of resveratrol supplementation in older adults: Results of a twelve-week, placebo-controlled pilot study. *Experimental Gerontology*, 57, 181–187.
- Arieta, D. R. A. K. (2011). Miocardiopatía Diabética.
- Association, A. D., Eschwege, E., Guillausseau, P. J., Plouin, P. F., Daninos, J. M., Balarac, N., & Sauvanet, J. P. (2013). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 36 Suppl 1, S67–74.
- Atkinson, M. A., Eisenbarth, G. S., & Michels, A. W. (2014). Type 1 diabetes. *Lancet*, 383(9911), 69–82.
- Barouch, L. A., Berkowitz, D. E., Harrison, R. W., O'Donnell, C. P., & Hare, J. M. (2003). Disruption of leptin signaling contributes to cardiac hypertrophy independently of body weight in mice. *Circulation*, 108(6), 754–9.
- Battiprolu, P. K., Gillette, T. G., Wang, Z. V, Lavandero, S., & Hill, J. A. (2010). Diabetic Cardiomyopathy: Mechanisms and Therapeutic Targets. *Drug Discovery Today. Disease Mechanisms*, 7(2), e135–e143.
- 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.
- Baur, J. A., & Sinclair, D. A. (2006). Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 5(6), 493–506.
- Belke, D. D., Swanson, E. A., & Dillmann, W. H. (2004). Decreased sarcoplasmic reticulum activity and contractility in diabetic db/db mouse heart. *Diabetes*, 53(12), 3201–3208.
- Benech, J. C., Benech, N., Zambrana, A. I., Rauschert, I., Bervejillo, V., Oddone, N., ... Damián. (2014). Diabetes increases stiffness of live cardiomyocytes measured by atomic force microscopy nanoindentation. *AJP: Cell Physiology*, 307(10), C910–C919.
- Bervejillo, V. (2015). Glicosilación De Proteínas Y Productos Finales De Glicosilación Avanzada En El Corazón Diabético. Efectos Del Resveratrol. Tesis de Maestría en Biología, PEDECIBA Biología, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.
- Bluestone, J. A., & Tang, Q. (2005). How do CD4+CD25+ regulatory T cells control autoimmunity? *Current Opinion in Immunology*, 17(6), 638–42.
- Boudina, S., & Abel, E. D. (2007). Diabetic cardiomyopathy revisited. *Circulation*.
- Boudina, S., & Abel, E. D. (2010a). Diabetic cardiomyopathy, causes and effects. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 11(1), 31–39.

Boudina, S., & Abel, E. D. (2010b). Diabetic cardiomyopathy, causes and effects. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, 11(1), 31–39.

BRADFORD, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*.

Bresciani, L., Calani, L., Bocchi, L., Delucchi, F., Savi, M., Ray, S., ... Del Rio, D. (2014). Bioaccumulation of resveratrol metabolites in myocardial tissue is dose-time dependent and related to cardiac hemodynamics in diabetic rats. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 24(4), 408–415.

Brownlee, M. (1995). Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annual Review of Medicine*, 46, 223–34.

Brum, G., Flockerzi, V., Hofmann, F., Osterrieder, W., & Trautwein, W. (1983). Injection of catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase into isolated cardiac myocytes. *Pflugers Arch*, 398(2), 147–154.

Buys, A. V, Van Rooy, M.-J., Soma, P., Van Papendorp, D., Lipinski, B., & Pretorius, E. (2013). Changes in red blood cell membrane structure in type 2 diabetes: a scanning electron and atomic force microscopy study. *Cardiovascular Diabetology*, 12, 25.

Cai, L. (2006). Suppression of nitrate damage by metallothionein in diabetic heart contributes to the prevention of cardiomyopathy. *Free Radical Biology & Medicine*, 41(6), 851–61.

Cai, L., Li, W., Wang, G., Guo, L., Jiang, Y., & Kang, Y. J. (2002). Hyperglycemia-induced apoptosis in mouse myocardium: mitochondrial cytochrome C-mediated caspase-3 activation pathway. *Diabetes*, 51(6), 1938–48.

Cai, L., Wang, Y., Zhou, G., Chen, T., Song, Y., Li, X., & Kang, Y. J. (2006). Attenuation by metallothionein of early cardiac cell death via suppression of mitochondrial oxidative stress results in a prevention of diabetic cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*, 48(8), 1688–97.

Calliari, a, Sotelo-Silveira, J., Costa, M. C., Nogueira, J., Cameron, L. C., Kun, a, ... Sotelo, J. R. (2002). Myosin Va is locally synthesized following nerve injury. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 51(4), 169–76.

Candido, R., Srivastava, P., Cooper, M. E., & Burrell, L. M. (2003). Diabetes mellitus: a cardiovascular disease. *Current Opinion in Investigational Drugs (London, England: 2000)*, 4(9), 1088–94.

Carolo Dos Santos, K., Pereira Braga, C., Octavio Barbanera, P., Rodrigues Ferreira Seiva, F., Fernandes, A., & Henrique Fernandes, A. A. (2014). Cardiac energy metabolism and oxidative stress biomarkers in diabetic rat treated with resveratrol. *PLoS ONE*, 9(7).

Chen, J.-Y., Tsai, P.-J., Tai, H.-C., Tsai, R.-L., Chang, Y.-T., Wang, M.-C., ... Tsai, Y.-S. (2013). Increased aortic stiffness and attenuated lysyl oxidase activity in obesity. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(4), 839–46.

Chen, X., Feng, L., Jin, H., Feng, S., & Yu, Y. (2009). Quantification of the erythrocyte deformability using atomic force microscopy: correlation study of the erythrocyte deformability with atomic force microscopy and hemorheology. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 43(3), 243–51.

Cooper, G. J. S., Phillips, A. R. J., Choong, S. Y., Leonard, B. L., Crossman, D. J., Brunton, D. H., ... Baker, J. R. (2004). Regeneration of the heart in diabetes by selective copper chelation. *Diabetes*, 53(9), 2501–8.

- Coppieters, K. T., Dotta, F., Amirian, N., Campbell, P. D., Kay, T. W. H., Atkinson, M. A., ... von Herrath, M. G. (2012). Demonstration of islet-autoreactive CD8 T cells in insulinitic lesions from recent onset and long-term type 1 diabetes patients. *The Journal of Experimental Medicine*, 209(1), 51–60.
- Das, A. K., Das, J. P., & Chandrasekar, S. (1987). Specific heart muscle disease in diabetes mellitus--a functional structural correlation. *International Journal of Cardiology*, 17(3), 299–302.
- Despa, S., & Bers, D. M. (2013). Na⁺ transport in the normal and failing heart - remember the balance. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 61, 2–10.
- Diana, J., Simoni, Y., Furio, L., Beaudoin, L., Agerberth, B., Barrat, F., & Lehuen, A. (2013). Crosstalk between neutrophils, B-1a cells and plasmacytoid dendritic cells initiates autoimmune diabetes. *Nature Medicine*, 19(1), 65–73.
- Ehrenstein, M. R., Evans, J. G., Singh, A., Moore, S., Warnes, G., Isenberg, D. A., & Mauri, C. (2004). Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *The Journal of Experimental Medicine*, 200(3), 277–85.
- Ferrero, M. E., Bertelli, A. A. E., Fulgenzi, A., Pellegatta, F., Corsi, M. M., Bonfrate, M., ... Bertelli, A. (1998). Activity in vitro of resveratrol on granulocyte and monocyte adhesion to endothelium. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68(6), 1208–1214.
- Galderisi, M., Anderson, K. M., Wilson, P. W., & Levy, D. (1991). Echocardiographic evidence for the existence of a distinct diabetic cardiomyopathy (the Framingham Heart Study). *The American Journal of Cardiology*, 68(1), 85–9.
- Garcia, M. J., McNamara, P. M., Gordon, T., & Kannell, W. B. (1974). Morbidity and mortality in diabetics in the Framingham population. Sixteen year follow up study. *Diabetes*, 23(2), 105–111.
- Gil-Ortega, I., & Carlos Kaski, J. (2006). Miocardiopatía diabética. *Medicina Clínica*, 127(15), 584–594.
- Graham, H. K., Hodson, N. W., Hoyland, J. A., Millward-Sadler, S. J., Garrod, D., Scothern, A., ... Sherratt, M. J. (2010). Tissue section AFM: In situ ultrastructural imaging of native biomolecules. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 29(4), 254–60.
- Gonzalez, R C, Woods, Richard E, Eddins, Steven L, (2004). Digital Image Processing Using Matlab. Education, 624 (2).
- Hao, E., Lang, F., Chen, Y., Zhang, H., Cong, X., Shen, X., & Su, G. (2013). Resveratrol alleviates endotoxin-induced myocardial toxicity via the Nrf2 transcription factor. *PLoS One*, 8(7), e69452.
- Hattori, Y., Matsuda, N., Kimura, J., Ishitani, T., Tamada, A., Gando, S., ... Kanno, M. (2000). Diminished function and expression of the cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchanger in diabetic rats: implication in Ca²⁺ overload. *The Journal of Physiology*, 527 Pt 1, 85–94.
- Huang, Z. G., Jin, Q., Fan, M., Cong, X. L., Han, S. F., Gao, H., & Shan, Y. (2013). Myocardial remodeling in diabetic cardiomyopathy associated with cardiac mast cell activation. *PLoS One*, 8(3), e60827.
- Hung, L. M., Chen, J. K., Huang, S. S., Lee, R. S., & Su, M. J. (2000). Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Cardiovasc. Res.*, 47, 549–555.

- 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), 774–81.
- Imai, S., Armstrong, C. M., Kaeberlein, M., & Guarente, L. (2000). Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature*, 403(6771), 795–800.
- Inglés, M., Gambini, J., Miguel, M. G., Bonet-Costa, V., Abdelaziz, K. M., El Alami, M., ... Borrás, C. (2014). PTEN mediates the antioxidant effect of resveratrol at nutritionally relevant concentrations. *BioMed Research International*, 2014, 580852.
- Jenkins, M. J., Pearson, J. T., Schwenke, D. O., Edgley, A. J., Sonobe, T., Fujii, Y., ... Shirai, M. (2013). Myosin heads are displaced from actin filaments in the in situ beating rat heart in early diabetes. *Biophysical Journal*, 104(5), 1065–72.
- Kashihara, H., Shi, Z. Q., Yu, J. Z., McNeill, J. H., & Tibbits, G. F. (2000). Effects of diabetes and hypertension on myocardial Na⁺-Ca²⁺ exchange. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 78(1), 12–9.
- Korn, E., Carlier, M., & Pantaloni, D. (1987). Actin polymerization and ATP hydrolysis. *Science*, 238(4827), 638–644.
- Koya, D., & King, G. L. (1998). Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes*, 47(6), 859–66.
- Kuznetsova, T. G., Starodubtseva, M. N., Yegorenkov, N. I., Chizhik, S. A., & Zhdanov, R. I. (2007). Atomic force microscopy probing of cell elasticity. *Micron*, 38(8), 824–833.
- Laakso, M., & Kuusisto, J. (2014). Insulin resistance and hyperglycaemia in cardiovascular disease development. *Nature Reviews. Endocrinology*, 10(5), 293–302.
- Lagouge, M., Argmann, C., Gerhart-Hines, Z., Meziane, H., Lerin, C., Daussin, F., ... Auwerx, J. (2006). Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell*, 127(6), 1109–22.
- LaRocca, T. J., Fabris, F., Chen, J., Benhayon, D., Zhang, S., McCollum, L., ... Lebeche, D. (2012). Na⁺/Ca²⁺ exchanger-1 protects against systolic failure in the Akitains2 model of diabetic cardiomyopathy via a CXCR4/NF-κB pathway. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 303(3), H353–67.
- Lieber, S. C., Aubry, N., Pain, J., Diaz, G., Kim, S.-J., & Vatner, S. F. (2004). Aging increases stiffness of cardiac myocytes measured by atomic force microscopy nanoindentation. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 287(2), H645–H651.
- Lin, J.-F., Lin, S.-M., Chih, C.-L., Nien, M.-W., Su, H.-H., Hu, B.-R., ... Tsai, S.-K. (2008). Resveratrol reduces infarct size and improves ventricular function after myocardial ischemia in rats. *Life Sciences*, 83(9-10), 313–7.
- Lindley, S., Dayan, C. M., Bishop, A., Roep, B. O., Peakman, M., & Tree, T. I. M. (2005). Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes*, 54(1), 92–9.
- Liu, Y., & Liu, G. (2004). Isorhapontigenin and resveratrol suppress oxLDL-induced proliferation and activation of ERK1/2 mitogen-activated protein kinases of bovine aortic smooth muscle cells. *Biochemical Pharmacology*, 67(4), 777–785.
- Lopaschuk, G. D., Tahiliani, A. G., Vadlamudi, R. V, Katz, S., & McNeill, J. H. (1983). Cardiac sarcoplasmic reticulum function in insulin- or carnitine-treated diabetic rats. *The American Journal of Physiology*, 245(6), H969–76.

- Losa, G. A. (2003). Resveratrol modulates apoptosis and oxidation in human blood mononuclear cells. *European Journal of Clinical Investigation*, 33(9), 818–23.
- Louis, X. L., Thandapilly, S. J., MohanKumar, S. K., Yu, L., Taylor, C. G., Zahradka, P., & Netticadan, T. (2012). Treatment with low-dose resveratrol reverses cardiac impairment in obese prone but not in obese resistant rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 23(9), 1163–9.
- Mizushige, K., Yao, L., Noma, T., Kiyomoto, H., Yu, Y., Hosomi, N., ... Matsuo, H. (2000). Alteration in left ventricular diastolic filling and accumulation of myocardial collagen at insulin-resistant prediabetic stage of a type II diabetic rat model. *Circulation*, 101(8), 899–907.
- Morrish, N. J., Wang, S. L., Stevens, L. K., Fuller, J. H., & Keen, H. (2001). Mortality and causes of death in the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes. *Diabetologia*, 44 Suppl 2, S14–21.
- 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.
- Müller, D. J., & Dufrêne, Y. F. (2011). Atomic force microscopy: A nanoscopic window on the cell surface. *Trends in Cell Biology*.
- Murarka, S., & Movahed, M. R. (2010). Diabetic cardiomyopathy. *Journal of Cardiac Failure*, 16(12), 971–979. <http://doi.org/10.1016/j.cardfail.2010.07.249>
- Nemoto, O., Kawaguchi, M., Yaoita, H., Miyake, K., Maehara, K., & Maruyama, Y. (2006). Left ventricular dysfunction and remodeling in streptozotocin-induced diabetic rats. *Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society*, 70(3), 327–334.
- Nunoda, S., Genda, A., Sugihara, N., Nakayama, A., Mizuno, S., & Takeda, R. (1985). Quantitative approach to the histopathology of the biopsied right ventricular myocardium in patients with diabetes mellitus. *Heart and Vessels*, 1(1), 43–7.
- Olas, B., Wachowicz, B., Nowak, P., Stochmal, A., Oleszek, W., Glowacki, R., & Bald, E. (2008). Comparative studies of the antioxidant effects of a naturally occurring resveratrol analogue -- trans-3,3',5,5'-tetrahydroxy-4'-methoxystilbene and resveratrol -- against oxidation and nitration of biomolecules in blood platelets. *Cell Biology and Toxicology*, 24(4), 331–40.
- Organización Mundial de la Salud (OMS) (2016). <http://www.who.int>
- Park, E.-J., & Pezzuto, J. M. (2015). The pharmacology of resveratrol in animals and humans. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1852(6), 1071–1113.
- Pierce, G. N., & Dhalla, N. S. (1981). Cardiac myofibrillar ATPase activity in diabetic rats. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 13(12), 1063–9.
- Pierce, G. N., & Russell, J. C. (1997). Regulation of intracellular Ca²⁺ in the heart during diabetes. *Cardiovascular Research*.
- Qiu, H., Zhu, Y., Sun, Z., Trzeciakowski, J. P., Gansner, M., Depre, C., ... Vatner, S. F. (2010). Short communication: Vascular smooth muscle cell stiffness as a mechanism for increased aortic stiffness with aging. *Circulation Research*, 107(5), 615–619.
- Raj, P., Louis, X. L., Thandapilly, S. J., Movahed, A., Zieroth, S., & Netticadan, T. (2014). Potential of resveratrol in the treatment of heart failure. *Life Sciences*, 95(2), 63–71.

- Rao, A. A., Thota, H., Adapala, R., Changalasetty, S. B., Gumpeny, R. S., Akula, A., ... Das, U. N. (2008). Proteomic analysis in diabetic cardiomyopathy using bioinformatics approach. *Bioinformatics and Biology Insights*, 2, 1–4.
- Regan, T. J., Lyons, M. M., Ahmed, S. S., Levinson, G. E., Oldewurtel, H. A., Ahmad, M. R., & Haider, B. (1977). Evidence for cardiomyopathy in familial diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Investigation*, 60(4), 884–99.
- Reuter, H., Pott, C., Goldhaber, J. I., Henderson, S. A., Philipson, K. D., & Schwinger, R. H. G. (2005). Na(+)-Ca²⁺ exchange in the regulation of cardiac excitation-contraction coupling. *Cardiovascular Research*, 67(2), 198–207.
- Rogina, B., & Helfand, S. L. (2004). Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(45), 15998–6003.
- Shadfar, S., Couch, M. E., McKinney, K. A., Weinstein, L. J., Yin, X., Rodríguez, J. E., ... Willis, M. (2011). Oral resveratrol therapy inhibits cancer-induced skeletal muscle and cardiac atrophy in vivo. *Nutrition and Cancer*, 63(5), 749–62.
- Shen, X., Zheng, S., Metreveli, N. S., & Epstein, P. N. (2006). Protection of Cardiac Mitochondria by Overexpression of MnSOD Reduces Diabetic Cardiomyopathy. *Diabetes*, 55(3), 798–805.
- Shigematsu, S., Ishida, S., Hara, M., Takahashi, N., Yoshimatsu, H., Sakata, T., & Korthuis, R. J. (2003). Resveratrol, a red wine constituent polyphenol, prevents superoxide-dependent inflammatory responses induced by ischemia/reperfusion, platelet-activating factor, or oxidants. *Free Radical Biology & Medicine*, 34(7), 810–7.
- Sikkel, M. B., Hayward, C., MacLeod, K. T., Harding, S. E., & Lyon, A. R. (2014). SERCA2a gene therapy in heart failure: an anti-arrhythmic positive inotrope. *British Journal of Pharmacology*, 171(1), 38–54.
- Singh, K., Kadesjö, E., Lindroos, J., Hjort, M., Lundberg, M., Espes, D., ... Thorvaldson, L. (2015). Interleukin-35 administration counteracts established murine type 1 diabetes-possible involvement of regulatory T cells. *Scientific Reports*, 5, 12633.
- Su, H.-C., Hung, L.-M., & Chen, J.-K. (2006). Resveratrol, a red wine antioxidant, possesses an insulin-like effect in streptozotocin-induced diabetic rats. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 290(6), E1339–46.
- 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–H843.
- Švajger, U., & Jeras, M. (2012). Anti-inflammatory effects of resveratrol and its potential use in therapy of immune-mediated diseases. *International Reviews of Immunology*, 31(3), 202–22.
- Syrový, I., & Hodný, Z. (1992). Non-enzymatic glycosylation of myosin: effects of diabetes and ageing. *General Physiology and Biophysics*, 11(3), 301–7.
- Szentesi, P., Pignier, C., Egger, M., Kranias, E. G., & Niggli, E. (2004). Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ refilling controls recovery from Ca²⁺-induced Ca²⁺ release refractoriness in heart muscle. *Circulation Research*, 95(8), 807–13.
- Tan, T., Xiang, Y., Chang, C., & Zhou, Z. (2014). Alteration of regulatory T cells in type 1 diabetes mellitus: a comprehensive review. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 47(2), 234–43. <http://doi.org/10.1007/s12016-014-8440-0>.

- Tanno, M., Kuno, A., Yano, T., Miura, T., Hisahara, S., Ishikawa, S., ... Horio, Y. (2010). Induction of manganese superoxide dismutase by nuclear translocation and activation of SIRT1 promotes cell survival in chronic heart failure. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(11), 8375–82.
- Thirunavukkarasu, M., Penumathsa, S. V., Koneru, S., Juhasz, B., Zhan, L., Otani, H., ... Maulik, N. (2007). Resveratrol alleviates cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetes: Role of nitric oxide, thioredoxin, and heme oxygenase. *Free Radical Biology & Medicine*, 43(5), 720–9.
- Trost, S. U., Belke, D. D., Bluhm, W. F., Meyer, M., Swanson, E., & Dillmann, W. H. (2002). Overexpression of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase improves myocardial contractility in diabetic cardiomyopathy. *Diabetes*, 51(4), 1166–1171.
- Turner, R. S., Thomas, R. G., Craft, S., van Dyck, C. H., Mintzer, J., Reynolds, B. A., ... Aisen, P. S. (2015). A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of resveratrol for Alzheimer disease. *Neurology*, 85(16), 1383–91.
- Van Heerebeek, L., Hamdani, N., Handoko, M. L., Falcao-Pires, I., Musters, R. J., Kupreishvili, K., ... Paulus, W. J. (2008). Diastolic stiffness of the failing diabetic heart: Importance of fibrosis, advanced glycation end products, and myocyte resting tension. *Circulation*, 117(1), 43–51.
- Viglietta, V., Baecher-Allan, C., Weiner, H. L., & Hafler, D. A. (2004). Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *The Journal of Experimental Medicine*, 199(7), 971–9.
- Vinckier, A., & Semenza, G. (1998). Measuring elasticity of biological materials by atomic force microscopy. In *FEBS Letters* (Vol. 430, pp. 12–16).
- Waddingham, M. T., Edgley, A. J., Tsuchimochi, H., Kelly, D. J., Shirai, M., & Pearson, J. T. (2015). Contractile apparatus dysfunction early in the pathophysiology of diabetic cardiomyopathy. *World Journal of Diabetes*, 6(7), 943–60.
- Wang, J., Chan, T. O., Zhang, X.-Q., Gao, E., Song, J., Koch, W. J., ... Cheung, J. Y. (2009). Induced overexpression of Na^{+}/Ca^{2+} exchanger transgene: altered myocyte contractility, $[Ca^{2+}]_i$ transients, SR Ca^{2+} contents, and action potential duration. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 297(2), H590–601.
- Wang, J., Song, Y., Wang, Q., Kralik, P. M., & Epstein, P. N. (2006). Causes and characteristics of diabetic cardiomyopathy. *The Review of Diabetic Studies : RDS*, 3(3), 108–17.
- Whiting, D. R., Guariguata, L., Weil, C., & Shaw, J. (2011). IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 94(3), 311–21.
- Wold, L. E., & Ren, J. (2004). Streptozotocin directly impairs cardiac contractile function in isolated ventricular myocytes via a p38 map kinase-dependent oxidative stress mechanism. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 318(4), 1066–71.
- Wu, X., Sun, Z., Foskett, A., Trzeciakowski, J. P., Meininger, G. A., & Muthuchamy, M. (2010). Cardiomyocyte contractile status is associated with differences in fibronectin and integrin interactions. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 298(6), H2071–H2081.
- Xia, N., Daiber, A., Habermeier, A., Closs, E. I., Thum, T., Spanier, G., ... Li, H. (2010). Resveratrol reverses endothelial nitric-oxide synthase uncoupling in apolipoprotein E knockout mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 335(1), 149–54.

- Yu, S. P., & Choi, D. W. (1997). Na⁺ -Ca²⁺ Exchange Currents in Cortical Neurons: Concomitant Forward and Reverse Operation and Effect of Glutamate. *European Journal of Neuroscience*, 9(6), 1273–1281
- Zarain-Herzberg, A., García-Rivas, G., & Estrada-Avilés, R. (2014). Regulation of SERCA pumps expression in diabetes. *Cell Calcium*, 56(5), 302–310.
- Zarain-Herzberg, A., Yano, K., Elimban, V., & Dhalla, N. S. (1994). Cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase expression in streptozotocin-induced diabetic rat heart. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 203(1), 113–20.
- Zhao, S.-M., Wang, Y.-L., Guo, C.-Y., Chen, J.-L., & Wu, Y.-Q. (2014). Progressive decay of Ca²⁺ homeostasis in the development of diabetic cardiomyopathy. *Cardiovascular Diabetology*, 13, 75.
- Zhao, X.-Y., Hu, S.-J., Li, J., Mou, Y., Chen, B.-P., & Xia, Q. (2006). Decreased cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ -ATPase activity contributes to cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 62(1), 1–8.
- Zhou, Y. T., Grayburn, P., Karim, A., Shimabukuro, M., Higa, M., Baetens, D., ... Unger, R. H. (2000). Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(4), 1784–9.
- Zhu, Y., Qiu, H., Trzeciakowski, J. P., Sun, Z., Li, Z., Hong, Z., ... Meininger, G. A. (2012). Temporal analysis of vascular smooth muscle cell elasticity and adhesion reveals oscillation waveforms that differ with aging. *Aging Cell*, 11(5), 741–750.
- Zini, R., Morin, C., Bertelli, A., Bertelli, A. A., & Tillement, J. P. (1999). Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain. *Drugs under Experimental and Clinical Research*, 25, 87–97.

ANEXO A

Tratamiento de portaobjetos con Gelatina paracortes histológicos

1) Lavado de portaobjetos para microscopía en general.

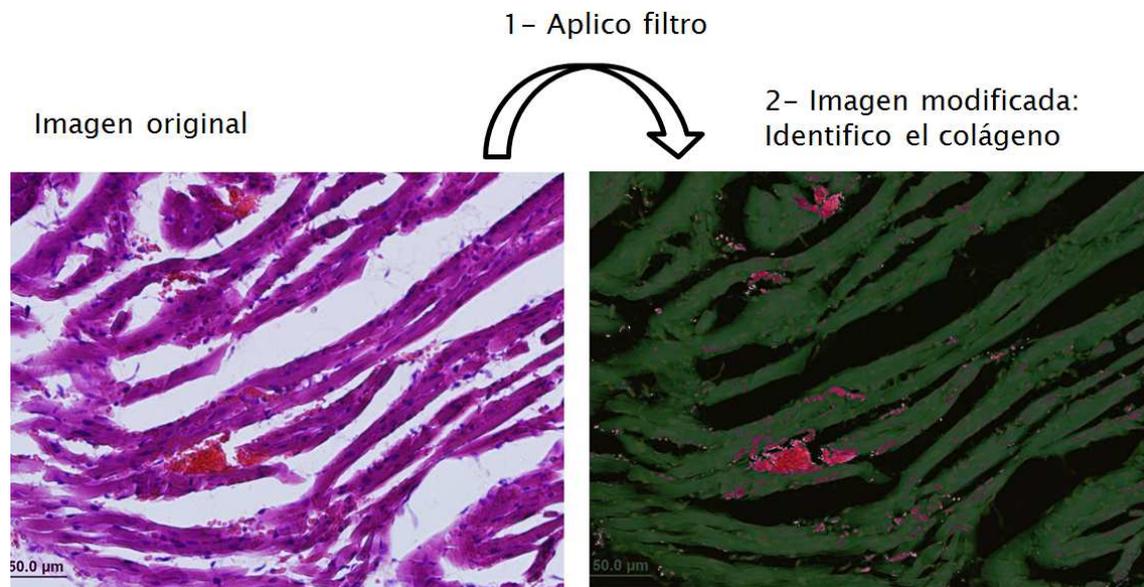
- Se prepara una solución de lavado con 200 ml de alcohol 70° y 2 ml de HCl.
- Los portaobjetos se colocan en esta solución y se deja *overnight*.
- Lavar con agua de la canilla y hacer tres cambios con H₂O de 10 minutos cada uno.
- Colocar los portaobjetos en rieles y dejar secar.

2) Preparación de portaobjetos para inmunohistoquímica y tinciones histológicas.

- Disolver 0,5 g de gelatina en 100 ml de H₂O. La temperatura no puede exceder los 60°C (se hace en plancha calefactora de modo de ajustar la temperatura).
- Agregar 0,05 g de cromoalumbre.
- Filtrar la gelatina disuelta por whattman y pasar la solución a un vaso de bohemia de 50 ml.
- Sumergir los portaobjetos en la solución de gelatina y sacarlos en seguida, escurrir y dejar secar al aire.
- Colocar los portaobjetos en caja semitapada y secar *overnight* en estufa a 37°C.
- Guardar en caja de portaobjetos a 4°C.

ANEXO B

Cuantificación de colágeno en cortes de corazón de ratón por análisis de MATLAB



3-Elijo niveles de filtro adecuados para cada muestra evitando saturación.

4-Extraigo datos del Matlab y realizo los cálculos estadísticos de las medidas obtenidas.

Figura B1. Esquema con imágenes representativas de corte de corazón de ratón, para análisis por MATLAB Se cuantificó el colágeno en 3 animales por condición a partir de entre dos y cuatro cortes por cada animal, de los cuales se analizó un promedio de 3 campos cada uno, a partir de imágenes 40X obtenidas del microscopio invertido por luz transmitida. La cuantificación de colágeno se realizó con el MATLAB (The MathWorks, Inc.), el cual fue programado para análisis de imágenes como descrito en software comerciales para este propósito (González and Woods, 2004). Se calculó el área total de cada corte y luego se obtuvo la diferencia de área entre el colágeno y el área total. Los niveles de sensibilidad de análisis se ajustaron caso a caso, estableciendo un criterio de observación para ajustar los niveles de los filtros y evitar saturación de la imagen