



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOQUÍMICAS

REGULACIÓN EPIGENÉTICA DE LA EXPRESIÓN
DEL GEN *ATP2A2* EN CARDIOMIOCITOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A

Q. JORGE ALBERTO FRAGOSO MEDINA

DIRECTOR DE TESIS: DR. ÁNGEL ZARAIN HERZBERG

México, D. F.

Diciembre, 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos y dedicatoria:

Esta parte es la que será omitida por todo el mundo que por accidente esté leyendo esta tesis y no los culpo, yo hago lo mismo. Pero también es cierto que para mí es importante mencionar a todas las personas importantes para alcanzar el grado. Así que recurriré a una frase muy trillada pero cierta: “Doy gracias a la vida que me ha dado tanto...”

Y en verdad debo agradecer la vida que me ha tocado vivir, a mis padres que durante toda ella han sido un pilar sobre el cual apoyarme en todo momento, a mi hermano Omar que siempre ha estado para recordarme los errores que debo corregir, a mis amigos de la UAEH (Mariana, Irene, Yosselin, Rosa, Isabel, Francisco, Javier y el resto que no cabrían aquí) que fueron, son y serán un referente de lo que consigo con esta tesis. También, aunque como el resto de los enumerados aquí, no lo lean, quiero agradecer a todos los catedráticos que en algún momento compartieron su experiencia y conocimiento conmigo, investigadores de la UAEH (especialmente a la Dra. Nury Pérez Hdz. que tanto me apoyó) y de la UNAM cuyos valiosos comentarios siempre serán importantes. Capítulo aparte son todos los amigos que en estos últimos 2 años y medio me han brindado su tiempo: Aydé, Lucía, Paula, Mauricio, Rafael, René y quienes esté olvidando. Gaby, la ruda del laboratorio (perdón por no apreciar mi vida) merece todo mi agradecimiento por su invaluable ayuda durante este tiempo.

Dr. Ángel Zarain, asesor de esta tesis, muchas gracias por lidiar con mis carencias académicas y sus acertadas sugerencias en cada paso del proyecto.

Espero no haberme extendido demasiado pero era justo y necesario: ¿común, trillado, soso, tonto, innecesario? Todo eso y mil cosas más pero este espacio es para eso ¿o no?

Como agradecimiento primordial y sobre todo dedicatoria: Este escrito a Érika, cuyo hombro fue decisivo en momentos de flaqueza.

ÍNDICE

Página

Índice de Figuras y Tablas.....	I
Abreviaturas.....	II
Resumen	III
Abstract.....	IV
1. Introducción	
1.1 Retículo sarcoplásmico.....	1
1.2 Acoplamiento excitación-contracción.....	5
1.3 La ATPasa de calcio del retículo sarco(endo)plásmico.....	7
1.4 Hipertrofia cardiaca.....	14
2. Antecedentes	
2.1 Regulación de la expresión de <i>ATP2A2</i>	16
2.2 La regulación epigenética.....	20
2.3 Las desacetilasas de histonas.....	21
2.4 Las regiones genómicas ricas en G+C y el estado de metilación del ADN.....	23
3. Planteamiento del Problema.....	24
4. Objetivos	
4.1 Objetivo general.....	26
4.2 Objetivos específicos.....	26
5. Hipótesis de Trabajo.....	26
6. Estrategia experimental	
6.1 Medios de cultivo, fármacos y soluciones.....	27

6.2 Cultivos primarios de cardiomiocitos de rata neonata.....	27
6.3 Purificación de ARN total y cuantificación de ARNm por RT-PCR en tiempo real.....	28
6.4 Ensayos de viabilidad celular.....	29
6.5 Ensayos funcionales del promotor del gen <i>ATP2A2</i>	30
6.6 Análisis estadístico.....	31
7. Resultados.	
7.1 Efecto de inhibidores de desacetilasas de histonas.....	32
7.2 Modelo de hipertrofia de cardiomiocitos en cultivo.....	38
7.3 Efecto del agente hipometilante 5-azacitidina.....	47
7.4 Efecto de la Mitramicina.....	51
8. Discusión.....	53
9. Conclusiones.....	63
10. Perspectivas.....	64
11. Referencias.....	65

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Página
Figura I. La estructura del músculo cardiaco.....	2
Figura II. Los componentes principales del cardiomiocito y su papel en el ciclo excitación-contracción.....	4
Figura III. Estructura de la bomba SERCA.....	9
Figura IV. Alineamiento de secuencia de las regiones reguladoras 5' del gen <i>ATP2A2</i>	11-13
Figura V. Algunos mecanismos que controlan la expresión del gen <i>ATP2A2</i> y el desarrollo de hipertrofia.....	18
Figura VI: Curvas dosis-respuesta con iHDACs para la abundancia relativa del ARNm de SERCA2a	33
Figura VII: Efecto de los iHDACs sobre la expresión de ANF.....	34
Figura VIII: Ensayos de viabilidad con iHDACs.....	35
Figura IX. Respuesta transcripcional a TSA y NaB de 2 construcciones de la región proximal del promotor de <i>ATP2A2</i>	37
Figura X. Respuesta transcripcional a TSA, Fen y NaB de las 2 construcciones de la región proximal del promotor de <i>ATP2A2</i> en medio sin suero.....	40
Figura XI. Influencia del SFBi sobre la respuesta transcripcional a TSA de las 2 construcciones de la región proximal del promotor de <i>ATP2A2</i>	41

Figura XII. Respuesta transcripcional a TSA, NaB y Fen de 2 construcciones de la región proximal del promotor de <i>ATP2A2</i> en medio OPTIMEM con SFB al 2%.....	42
Figura XIII. Abundancia relativa del ARNm de SERCA2a y ANF en medio OPTIMEM con SFB al 2%.....	43
Figura XIV. Abundancia relativa del ARNm de SERCA2a y ANF en medio DMEM con SFB al 10%.....	45
Figura XV. Respuesta transcripcional a TSA, NaB y Fen de 2 construcciones de la región proximal del promotor de <i>ATP2A2</i> en medio DMEM con SFB al 10 %).....	46
Figura XVI: A) Curva dosis-respuesta con 5-azacitidina para la abundancia relativa del ARNm de SERCA2a	49
Figura XVII: Respuesta transcripcional a 5-azacitidina de las 2 construcciones de la región proximal del promotor de <i>ATP2A2</i>.....	50
Figura XVIII: A) Curva dosis-respuesta con Mitramicina para la abundancia relativa del ARNm de SERCA2a.....	52
Figura XIX: Respuesta transcripcional a mitramicina de las 2 construcciones de la región proximal del promotor de <i>ATP2A2</i>.....	53

TABLAS

Tabla I. Genes e Isoformas de SERCA.....	9
Tabla II. Secuencias de los oligonucleótidos usados para qRT-PCR.....	31

Abreviaturas

5-Aza: 5-azacitidina

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ANF: Atrial natriuretic factor (Factor natriurético atrial)

AP2: Activator protein 2 (Proteína activadora 2)

ARN: Ácido ribonucleico

ATP: Trifosfato de adenosina

BNP: Brain natriuretic peptide (Péptido natriurético cerebral)

CaM: Calmodulina

CaMK: Calcium/calmodulin kinase (Cinasa dependiente de calcio/calmodulina)

CASQ2: Calsecuestrina

CBP: CREB binding protein (Proteína de unión a CREB)

CN: Calcineurina

CNP: C-type natriuretic peptide (Péptido natriurético tipo C)

CoA: Coenzima A

CsA: Ciclosporina

ChiP: Chromatin immunoprecipitation (Inmunoprecipitación de cromatina)

DHPR: Dihydropyridine receptor (Receptor de dihidropiridina)

DMEM: Dubelco's modified Eagle's medium (Medio de Eagle modificado por Dubelco)

ERSE: Endoplasmic reticulum stress response element (Elemento de respuesta al estrés del retículo endoplásmico)

FOG-2: Friend of GATA-2 (Factor de transcripción denominado "amigo de GATA 2")

GSK3 β : Glycogen syntase kinase 3 β (Cinasa de la glicógeno sintasa 3 β)

HAT: Histone acetyl transferase (Acetil-transferasa de histonas)

HDAC: Histone deacetylase (Desacetilasa de histonas)

iHDACs: Inhibidores de HDAC

KIF4: Krüpel-like factor 4 (Factor tipo Krüpel-4)

MAPKs: Mytogen activated protein kinases (Proteínas cinasas activadas por mitógeno)

MED1/TRAP220: Subunidad del complejo co-activador general de la transcripción "Mediator"

MEF: Myogenic enhancer factor (Factor potenciador de miocitos)

MHC: Myosin heavy chain (Cadena pesada de miosina)

Mit: Mitramicina

Na⁺/K⁺-ATPasa: ATPasa intercambiadora de sodio/potasio

NaB: Butirato de sodio

NCX: Na⁺/ Ca²⁺ exchanger (Intercambiador sodio/calcio)

N-FAT: Nuclear Factor of Activated T Cells (Factor nuclear de células T activadas)

NFY: Nuclear Factor Y (Factor nuclear Y)

NHE1: Na⁺/H⁺ exchanger (Intercambiador sodio/protón)

OPTIMEM: Medio de cultivo reducido en suero, modificación del medio "Eagle's Minimum Essential Media"

PE o Fen: Fenilefrina

PKA, PKC y PKD: Protein kinase (Proteína cinasa A, C o D repectivamente)

PLN: Fosfolamban

PMA: Phorbol 13-acetate 12-myristate (13-Acetato 12-miristato de forbol

PMCA: Plasmatic membrane calcium ATPase (ATPasa de calcio de la membrana plasmática)

PP1 y PP2: Phosphatase protein (Fosfatasa 1 y 2 respectivamente)

PrtK: Proteínasa K

qRT-PCR: Quantitative real-time polymerase Chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real)

RS: Retículo sarcoplásmico

RXR: Retinoic acid receptor (Receptor de ácido retinoico)

RyR2: Ryanodine receptor (Receptor de rianodina)

SERCA: Sarco(endo)plasmic reticulum calcium ATPase (ATPasa de calcio del retículo sarco(endo)plásmico)

SFB: Suero fetal bovino

SN: Sobrenadante

SRE: Serum response element (Elemento de respuesta a suero)

T: Tripsina

T₃: 3,5,3'-triyodotironina

TFIID: Transcription factor IID (Factor general de transcripción IID)

TG: Tapsigargina

THR o TR: Thyroid hormone receptor (Receptor de hormona tiroidea)

TRE: Thyroid hormone response element (Elemento de respuesta a hormona tiroidea)

TriB: Tributirato de sodio

TSA: Tricostatina A

U: Uniportador de calcio de la mitocondria

RESUMEN

La bomba de calcio del retículo sarco(endo)plásmico (SERCA) es la ATPasa responsable de mantener las concentraciones de calcio del retículo sarcoplásmico y del citoplasma en la célula. Existen 3 genes que codifican para la proteína SERCA (*ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3*), los cuales tienen varias isoformas reguladas de manera tejido-específica y que dependen del estado del desarrollo. La isoforma SERCA2a codificada por el gen *ATP2A2* se expresa principalmente en el corazón y es la encargada de bombear calcio al interior del retículo sarcoplásmico y restaurar las concentraciones basales de calcio en el citoplasma durante la relajación muscular del cardiomiocito. Se ha demostrado que los niveles de ARNm, proteína y actividad de transporte de calcio de SERCA2a se encuentran disminuidos en el corazón de pacientes con hipertrofia cardiaca severa, insuficiencia cardiaca y en modelos de hipertrofia de cardiomiocitos en cultivo. Recientemente, se describió que los inhibidores de desacetilasas de histonas (iHDACs) inhiben en forma dosis-dependiente la activación de hipertrofia cardiaca en modelos animales, sin embargo, el efecto de dichos fármacos sobre la expresión del gen *ATP2A2* no había sido estudiado. En este trabajo se caracterizó el efecto de los inhibidores de HDACs (iHDACs) butirato de sodio (NaB), tributirato de glicerilo (TriB) y tricostatina A (TSA), del agente hipometilante de ADN 5-azacitidina (5-aza) y de la mitramicina (agente intercalante del ADN que se une a secuencias ricas en G+C) sobre la expresión de *ATP2A2* en cultivos de cardiomiocitos de rata neonata. Se encontró que tratamientos de 48 horas con los 3 iHDACs al igual que 72 horas de tratamiento con la 5-aza indujeron la expresión del ARNm de SERCA2a: NaB, 2.3 veces; TriB, 3.2 veces; TSA, 2.5 veces; 5-aza,

2.4 veces. Por otro lado, la mitramicina disminuyó aproximadamente un 50% la abundancia del ARNm de SERCA2a después de 12 horas de tratamiento. Igualmente se midió el efecto de los fármacos sobre la actividad transcripcional de 2 construcciones del promotor del gen *ATP2A2* que contienen -2579 y -259 pb (pGL3-hSERCA2p-2579 y pGL3-hSERCA2p-259 respectivamente). Después de 24 horas de tratamiento con TSA se observó un incremento en la transcripción de 8 veces con la construcción pGL3-hSERCA2p-2579 y 3.5 veces con la construcción pGL3-hSERCA2p-259. De forma similar el NaB aumentó la transcripción de ambas construcciones. No se encontraron cambios en la actividad transcripcional de ambas construcciones al tratar los cardiomiocitos con 5-aza, confirmando que las construcciones del promotor en el plásmido pGL3 no se encuentran metiladas. En cambio, la transcripción de ambas construcciones se vio disminuida en un 65% por el tratamiento con mitramicina, lo que sugiere que las secuencias G+C que unen Sp1 son indispensables para la actividad transcripcional del gen. Adicionalmente, se analizó si la baja expresión de *ATP2A2* producida por el estímulo hipertrófico del agente alfa-adrenérgico fenilefrina podía ser restaurada y/o prevenida por los iHDACs y se encontró que en medio suplementado con SFB al 2% la actividad transcripcional de las construcciones del promotor fueron rescatadas completamente pero sólo parcialmente en los niveles de ARNm. En contraste, cuando la hipertrofia fue inducida por fenilefrina en medio con suero al 10%, tanto la actividad transcripcional como los bajos niveles de ARNm fueron casi completamente rescatados y/o prevenidos por la TSA pero no por el NaB. Futuros estudios se deben llevar a cabo para determinar los

mecanismos moleculares involucrados en la inducción diferencial que ejercen el NaB y la TSA sobre la expresión del gen *ATP2A2* en cardiomiocitos.

ABSTRACT

The sarco(endo)plasmic reticulum calcium-ATPases (SERCAs) are calcium pumps responsible for maintaining the sarcoplasmic reticulum (SR) and cytoplasmic calcium concentrations in the cell. SERCA proteins comprise several isoforms encoded by 3 different genes (*ATP2A1*, *ATP2A2* and *ATP2A3*) regulated in tissue-specific manner and during development. The SERCA2a isoform encoded by the *ATP2A2* gene is expressed mainly in the heart and is responsible for pumping calcium ion inside the SR and restoring the basal cytoplasmic calcium concentration during muscle relaxation. It has been shown that mRNA, protein and calcium transport activity levels of SERCA2a are decreased in the hearts from patients with severe cardiac hypertrophy, heart failure and in cell culture cardiac hypertrophy models. Recently, it was reported that inhibitors of histone deacetylases (iHDACs) inhibit activation of cardiac hypertrophy in a dose-dependent fashion in animal models, however, the effect of these drugs on *ATP2A2* expression had not been studied. In this work we characterized the effect of the HDACs inhibitors (iHDACs) sodium butyrate (NaB), glyceryl tributyrate (TriB) and trichostatin A (TSA), the effect of the DNA hypomethylating agent 5-azacytidine (5-aza) and that of the DNA intercalating agent (binding to sequences rich in G + C) mythramycin, on *ATP2A2* expression in cultured neonatal rat cardiomyocytes. We found that 48 hour treatments with all the three iHDACs and 72 hours treatment with 5-aza induced mRNA expression of SERCA2a, as follows: NaB, 2.3 times; TriB, 3.2 times; TSA, 2.5 times, 5-aza, 2.4 times. Furthermore, mythramycin decreased by approximately 50% the abundance of SERCA2a mRNA after 12 hours treatment. After 24 hours treatment, TSA increased 8-fold the

transcription of the pGL3-hSERCA2p-2579 construct and 3.5-fold the transcription of the pGL3-hSERCA2p-259 construct. Similar changes were observed in transcriptional activity of both constructs with NaB. We did not see changes in the transcriptional activity of any of the constructs when cardiomyocytes were treated with 5-aza, confirming that the pGL3 constructs were unmethylated. Transcription of both gene constructs was decreased by 65% by mithramycin treatment, showing the functional importance of the G+C rich regions (that bind Sp1 factor) present in the *ATP2A2* promoter. Further, we examined whether *ATP2A2* gene repression produced by the hypertrophic stimulus of phenylephrine could be restored and/or prevented by iHDACs. We found that in medium supplemented with 2% FBS, the transcriptional activity of *ATP2A2* promoter constructions was completely restored and/or prevented but only partially in its mRNA levels. However, when hypertrophy was induced by phenylephrine in medium with 10% serum, both the low transcriptional activity and mRNA levels were almost completely restored and/or prevented only by TSA, but not by NaB treatment. Additional studies are needed to determine the molecular mechanisms involved in differential induction elicited by NaB and TSA on *ATP2A2* gene expression in cardiomyocytes.

1. INTRODUCCIÓN

En el corazón, los cardiomiocitos forman el tejido muscular estriado que lleva a cabo la contracción y relajación cardíaca. Este tejido es una red de células interconectadas entre sí que se sincronizan gracias a las “uniones comunicantes” (gap junctions en inglés) para responder a los estímulos eléctricos que desencadenan la contracción muscular. La red de tejido muscular cardíaco posee la capacidad de responder rápidamente y de manera sincronizada a una despolarización de la membrana plasmática gracias a los túbulos T. Dichos túbulos son invaginaciones de la membrana plasmática que están en íntimo contacto con el retículo sarcoplásmico (RS) de la célula. En los túbulos T se encuentran los canales receptores de dihidropiridinas (DHPR), los cuales son canales iónicos tipo L sensibles a voltaje que permiten la entrada de pequeñas corrientes del ion calcio (Ca^{2+}) en respuesta a la despolarización de la membrana plasmática.

1.1 Retículo sarcoplásmico

El RS es un organelo que consiste en un sistema de membranas que funciona como un reservorio de Ca^{2+} para la célula y está compuesto por 2 regiones principales: las cisternas terminales y el RS longitudinal. En las cisternas terminales se encuentran los canales de Ca^{2+} llamados receptores de rianodina (RyR2). Dichos canales son tetraméricos, y tienen un peso de aproximadamente 2000 kDa; son los encargados de permitir la salida masiva de Ca^{2+} al citoplasma para iniciar la contracción muscular y se encuentran en gran cercanía a los túbulos T (120 Å). La región amino-terminal constituye la mayor parte del canal y se

encuentra en el citosol, además de controlar las propiedades de apertura de la región carboxilo terminal que se encuentra en el lumen del RS, contiene varios sitios de unión a proteínas reguladoras como calstabilina 2, sorcina, proteína cinasa A (PKA), fosfatasa 1 y 2 (PP1 y PP2) y calmodulina (CaM). La regulación de RyR2 durante ejercicio o estrés está mediada por la activación de los receptores adrenérgicos β acoplados a proteínas G.

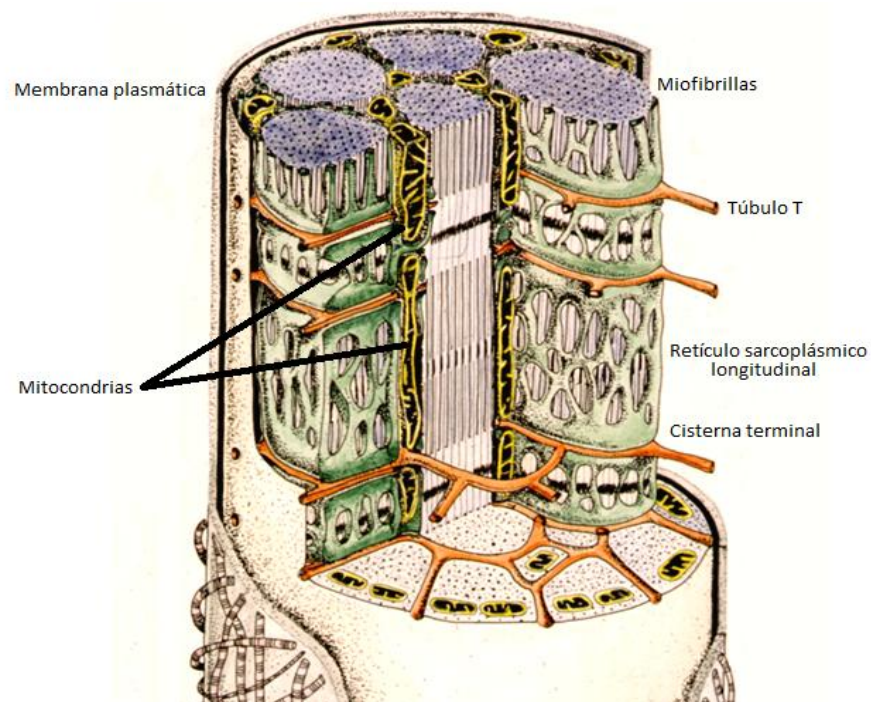


Figura I. La estructura del músculo cardíaco. En la imagen se muestra cómo se aumenta la superficie de la membrana plasmática en el cardiomiocito a través de las invaginaciones conocidas como túbulos T, la gran cercanía de éstos con respecto a la cisterna terminal del RS, la alta cantidad de mitocondrias del músculo cardíaco y la disposición de las miofibrillas que llevan a cabo la contracción.

En el RS, RyR2 está en estrecho contacto con 2 proteínas reguladoras llamadas triadina y juntina. La triadina es una glicoproteína integral de la membrana del RS, pesa 95 kDa y la mayor parte de su masa se encuentra en la

luz del RS. A pesar de que esta proteína es capaz de inhibir al RyR uniéndose al dominio citoplásmico de éste, no tiene efecto alguno al unirse al dominio luminal del canal. La juntina es una proteína de 26 kDa que interacciona con RyR2 en el lumen del RS y que por otro lado, al igual que la triadina, también es capaz de unirse a la calsecuestrina (CASQ2) para conformar el complejo CASQ2-RyR2-triadina-juntina que es el encargado de regular la liberación de Ca^{2+} del RS al citoplasma.

Dentro de la cisterna terminal del RS hay una concentración muy elevada de Ca^{2+} (aproximadamente 20 mM) pero la mayor parte no se encuentra libre (la concentración de Ca^{2+} libre es de 1-2 mM), por lo que se halla unido a polímeros de CASQ2, la cual posee una alta capacidad de unión a Ca^{2+} (40-50 moles de Ca^{2+} por mol de proteína) y una afinidad moderada (1 mM). En condiciones normales, la disociación de la CASQ2 del complejo RyR2-triadina-juntina es suficiente para activar la apertura del canal de RyR2 y se ha demostrado por ensayos *in vitro* (Beard et al, 2002) que la interacción directa CASQ2-RyR2 no permite tal apertura, por lo que se sugiere que la existencia del complejo cuaternario completo es indispensable para que se ejerzan las funciones regulatorias a cargo de la CASQ2.

Los sistemas de transporte que permiten mantener la homeostasis de Ca^{2+} en tejidos musculares, como lo es el músculo cardíaco, son vitales para el correcto funcionamiento y acoplamiento de los ciclos de contracción-relajación muscular. En específico, el acoplamiento excitación-contracción, descrito en la próxima sección, debe ser finamente regulado para mantener concentraciones adecuadas de Ca^{2+} tanto en el RS como en el citosol y dicha regulación depende de una gran

cantidad de proteínas que funcionan como receptores, transductores, canales iónicos, moduladores, enzimas sensibles a Ca^{2+} , intercambiadores de iones y ATPasas dependientes de Ca^{2+} .

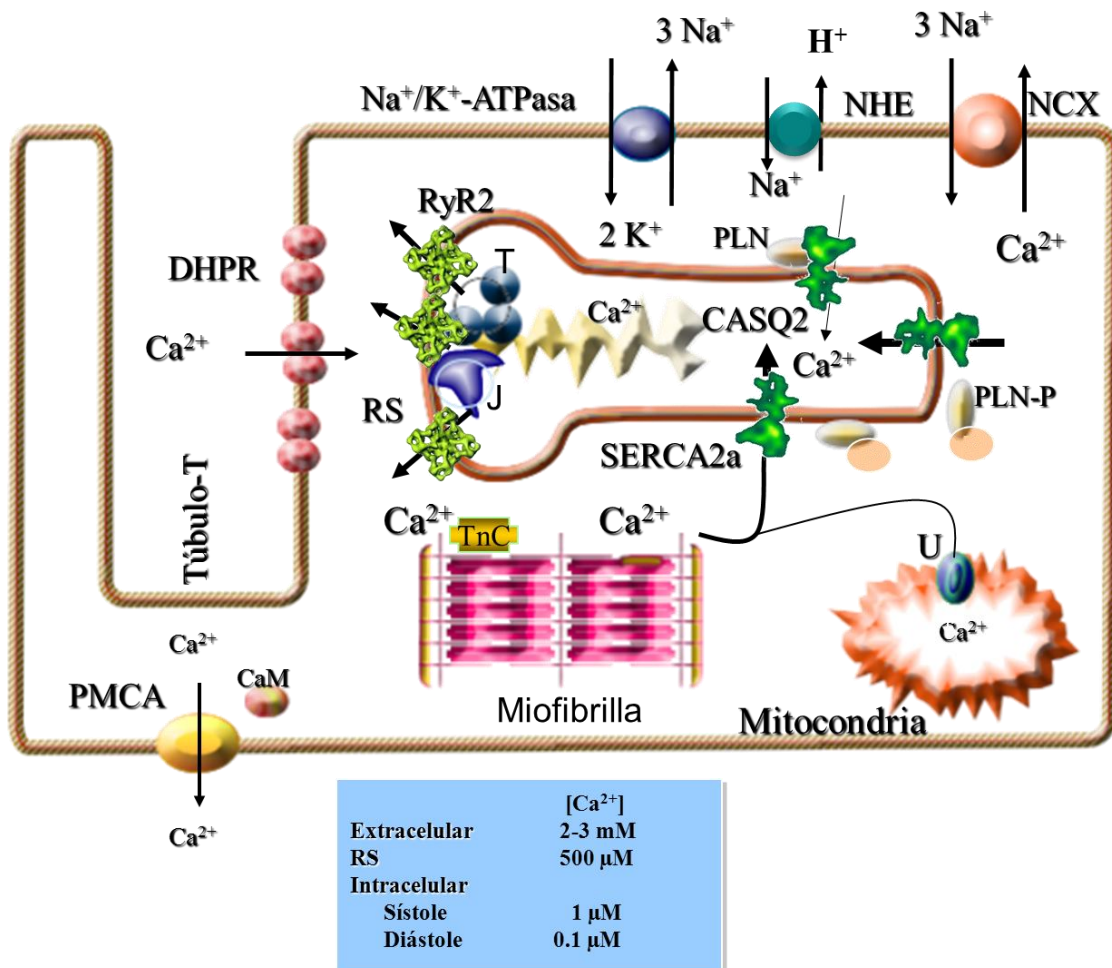


Figura II. Los componentes principales del cardiomiocito y su papel en el ciclo excitación-contracción. De manera esquemática se representa cómo las corrientes de calcio que entran a través de los DHPR alcanzan inmediatamente los canales RyR2 en el retículo sarcoplásmico para que se inicie la liberación masiva de calcio hacia el citosol. En el citosol, la unión del Ca^{2+} a la troponina C desencadena la contracción de las miofibrillas, cuando esto ha ocurrido, las altas concentraciones de Ca^{2+} son regresadas al estado basal principalmente por la acción de SERCA2a y en menor medida por las diversas ATPasas de la membrana plasmática. En el recuadro se observan las concentraciones de los distintos compartimentos involucrados en el proceso (modificado de Zarain-Herzberg. 2006).

Abreviaturas: NHE, Intercambiador Na^+/H^+ ; NCX, Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; PLN, Fosfolamban; TnC, Troponina C; U, Uniportador de Ca^{2+} de la mitocondria; PMCA, ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática.

1.2 Acoplamiento excitación-contracción

El acoplamiento excitación-contracción inicia con la despolarización de la membrana del cardiomiocito, dicha despolarización provoca que los canales DHPR en la membrana plasmática permitan la entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular, donde la concentración de este ion es de 2 a 3 mM, que a su vez alcanza los canales RyR2 en la cisterna terminal del RS.

El aumento en la concentración de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]$) provoca la apertura de los canales RyR2 y la salida masiva de Ca^{2+} del interior del RS a través de un mecanismo conocido como liberación de calcio inducida por calcio; una vez que el calcio citosólico alcanza concentraciones cercanas a 10 μM se puede unir a la troponina C liberando a los miofilamentos de actina de una inhibición que evita su contacto con la miosina. En ausencia del efecto inhibitorio de la troponina C, se puede llevar a cabo la contracción muscular que continúa hasta que la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólica disminuye principalmente por el transporte activo de Ca^{2+} al interior del RS llevado a cabo por la ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarco(endo)plásmico (SERCA2a) y por la salida de Ca^{2+} de la célula por el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) del sarcolema.

El intercambiador NCX permite la salida de 1 ion Ca^{2+} a la matriz extracelular que es intercambiado por 2 iones Na^+ que entran a la célula. Este mecanismo es el responsable de reducir en un 30-40 % la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólica durante la diástole, mientras que el resto y mayor parte del calcio en exceso en el citoplasma es regresado al RS por las bombas SERCA. Las SERCAs catalizan el

transporte activo de Ca^{2+} al interior del retículo endoplásmico y/o sarcoplásmico; 2 iones Ca^{2+} son transportados al interior del RS por molécula de ATP hidrolizado.

Aunque su contribución es mínima, existen otros 2 mecanismos por los que las altas concentraciones citosólicas de calcio durante la diástole son reducidas a las cantidades basales, dichos mecanismos los constituyen la entrada de calcio a la mitocondria a través del uniportador de calcio mitocondrial simbolizado como “U” en la Figura II y la ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA), que disminuyen la $[\text{Ca}^{2+}]$ citoplásmica en menos del 5 %.

Además de los canales mencionados, existen otros tantos que permiten directa o indirectamente la regulación de la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólica, tal es el caso de la bomba electrogénica de Na^+/K^+ que es una ATPasa encargada del bombeo de 3 iones sodio hacia el espacio extracelular que son intercambiados por dos iones potasio que entran al citoplasma. Este bombeo de iones sodio genera un gradiente de Na^+ que permite que funcione el intercambiador NCX. Otro actor importante en el funcionamiento del cardiomiocito es el intercambiador de Na^+/H^+ 1 (NHE1), cuya función es transportar un ión sodio desde la matriz extracelular al citoplasma e intercambiarlo por un protón, lo cual además de participar en la regulación del pH celular también es capaz de alterar la homeostasis de calcio indirectamente ya que únicamente a través de la sobre-expresión de esta proteína se ha detectado la generación de graves problemas cardiacos en animales transgénicos y el desarrollo de hipertrofia en cardiomiocitos neonatales (Nakamura et al. 2008).

Cuando inicia el acople, existe una alta cantidad de Ca^{2+} unido a la CASQ2 y una vez que se activan los canales de RyR2, la mayor parte del Ca^{2+} presente

en el RS es liberado al citoplasma. Después que se ha llevado a cabo la contracción, el Ca^{2+} es regresado al RS y vuelve a asociarse con los monómeros de CASQ2 existentes a concentraciones bajas de Ca^{2+} ($<1\text{mM}$), el rápido incremento del Ca^{2+} en el RS provoca que la CASQ2 vuelva a conformar los polímeros que mantendrán una concentración libre de Ca^{2+} de 1 mM .

Una vez que las concentraciones de calcio citoplásmico regresan a niveles basales y que el RS está nuevamente cargado con altas cantidades de este ion, se inicia una vez más el ciclo con la entrada de Ca^{2+} a través de los canales DHPR.

1.3 La ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarco(endo)plásmico

La proteína más importante para la regulación de las $[\text{Ca}^{2+}]$ citoplásmico e intra-reticular en el cardiomiocito es la bomba SERCA2a. Las SERCAs son ATPasas tipo P, llamadas así por la conservación temporal de la energía del ATP en forma de un intermediario fosforilado de la enzima, dicho intermediario está formado por el fosfato y del ATP hidrolizado unido a un residuo de ácido aspártico invariable en la secuencia altamente conservada $\text{SDKTGT}[\text{L/I/V/M}][\text{T/I/S}]$; estas proteínas pesan alrededor de 110 kDa y constituyen la mayor parte de proteína del RS longitudinal ($80\text{-}90\%$).

SERCA2a es la principal proteína de la membrana del RS longitudinal del cardiomiocito; se trata de una proteína de 10 hélices transmembranales (Figura III) que tiene una alta afinidad por Ca^{2+} ($K_m \sim 0.1\ \mu\text{M}$), por lo que se estima que sólo se necesitan máximo 2 ciclos de transporte para recuperar la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólica en la relajación muscular.

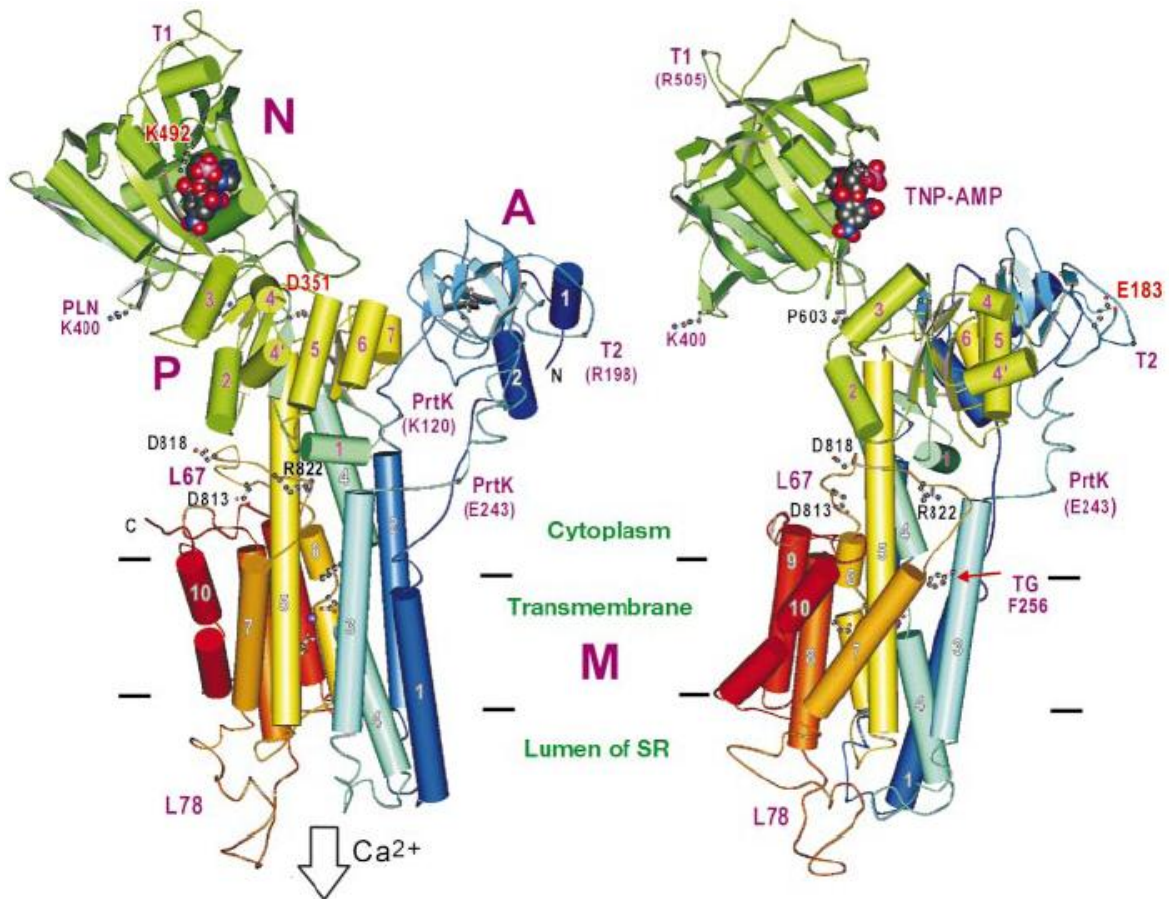


Figura III. Estructura de la bomba de calcio SERCA. En la imagen el color cambia gradualmente desde el azul para la porción amino terminal hasta el rojo para la porción carboxilo terminal. Se muestran los 3 dominios citoplásmicos, A (contiene el motivo TGES característico de las ATPasas tipo P), N (aquí se une el ATP) y P (dominio donde ocurre la fosforilación). Las hélices transmembranales están numeradas al igual que las que se encuentran en los dominios A y P. Las esferas moradas representan 2 iones Ca^{2+} . Se resaltan varios residuos y sitios importantes: TNP-AMP (unión de ATP), E183 (residuo clave para la actividad catalítica), PLN (unión de fosfolamban), D351 (sitio de fosforilación), TG (sitio de unión del inhibidor tapsigargina), PrtK y T (estos dos últimos, sitios susceptibles a digestión por proteinasa K y tripsina respectivamente). Tomado de Toyoshima, et al. 2000.

La actividad enzimática de SERCA2a es regulada por fosfolamban (PLB), una proteína pequeña (6.1 kDa) que puede ser fosforilada por PKA, PKC o por la CAMKII; sin embargo, en su forma desfosforilada es un inhibidor de SERCA que disminuye la afinidad aparente por Ca^{2+} de la bomba.

Las bombas SERCA poseen una gran diversidad que depende del estado del desarrollo y es tejido-específica (Berridge et al. 2003). En el humano existen 3 genes diferentes para las bombas SERCA llamados *ATP2A1*, 2 y 3, y cada gen produce varias isoformas a través del proceso de edición (splicing en inglés) alternativa del transcrito primario del ARNpre-mensajero (Martonosi y Pikula 2003) (ver Tabla I).

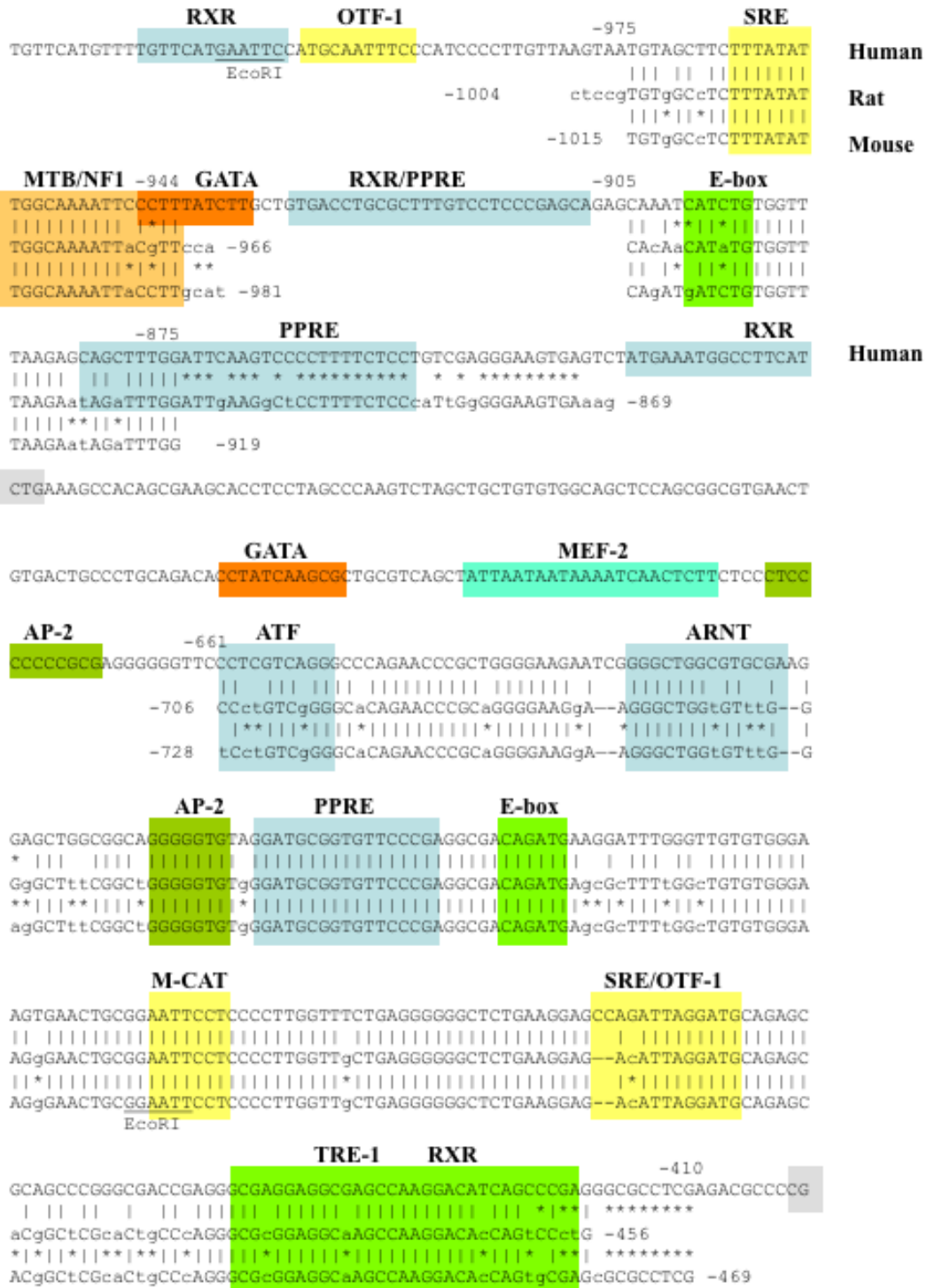
Tabla I. Genes e Isoformas de SERCA

Gen	Isoformas	Tejidos en que se expresa
<i>ATP2A1</i>	SERCA1a	Músculo esquelético de contracción rápida adulto
	SERCA1b	Músculo esquelético de contracción rápida neonatal
<i>ATP2A2</i>	SERCA2a	Músculos cardiaco y esquelético de contracción lenta
	SERCA2b	Células no musculares y músculo liso (expresión ubicua)
	SERCA2c	Diferenciación de monocitos, corazón
<i>ATP2A3</i>	SERCA3a-f	Sistema nervioso central, células epiteliales y hematopoyéticas

De las 3 isoformas provenientes del gen *ATP2A2*, sólo la isoforma SERCA2a se expresa en cardiomiocitos abundantemente y se ha demostrado que los niveles tanto de ARNm como de proteína para dicha isoforma están reducidos en modelos animales con isquemia del miocardio, hipertrofia cardiaca e insuficiencia cardiaca; ocurriendo lo mismo en pacientes con hipertrofia cardiaca severa e insuficiencia cardiaca (Zarain-Herzberg y Álvarez-Fernández. 2006). En modelos *in vitro* de hipertrofia inducida por el agonista alfa adrenérgico fenilefrina

también se han observado bajos niveles de ARNm y proteína para SERCA2 (Prasad et al. 2007).

La estructura y regulación transcripcional del gen humano que codifica para la proteína SERCA2 ya han sido descritas previamente (Zarain-Herzberg y Álvarez-Fernández. 2006) y el análisis realizado en dicho trabajo se muestra en la figura IV. Se debe mencionar la presencia de algunos elementos reguladores de ADN conservados entre ratón, rata, conejo y humano importantes para los objetivos del presente estudio. Como se muestra en la Figura IV, existen 3 regiones de homología en la región reguladora del gen *ATP2A2*, la primera región en los primeros 230 pb del promotor basal contiene una caja-TATA, un elemento de respuesta a estrés del retículo endoplásmico (ERSE: endoplasmic reticulum stress response element) formado por una caja-E y una caja-CCAT, 4 sitios Sp1 en los primeros 200 pb del promotor y un elemento de respuesta a hormona tiroidea (TRE: thyroid hormone response element). La segunda región de homología contiene un sitio TRE y un elemento de respuesta a suero (SRE: serum response element) entre otros. La tercera región de homología entre especies contiene un sitio TRE, un sitio de respuesta al receptor de ácido retinoico (RXR: retinoic acid receptor), un sitio de unión al factor potenciador de miocitos-2 (MEF: myogenic enhancer factor), un sitio de unión al factor nuclear de células T activadas (N-FAT: Nuclear Factor of Activated T Cells), un sitio Nkx-2.5 y un elemento GATA. Aunque fuera de las regiones de homología, el gen humano contiene varios sitios más de unión a RXR, GATA, Nkx-2.5 y MEF-2.



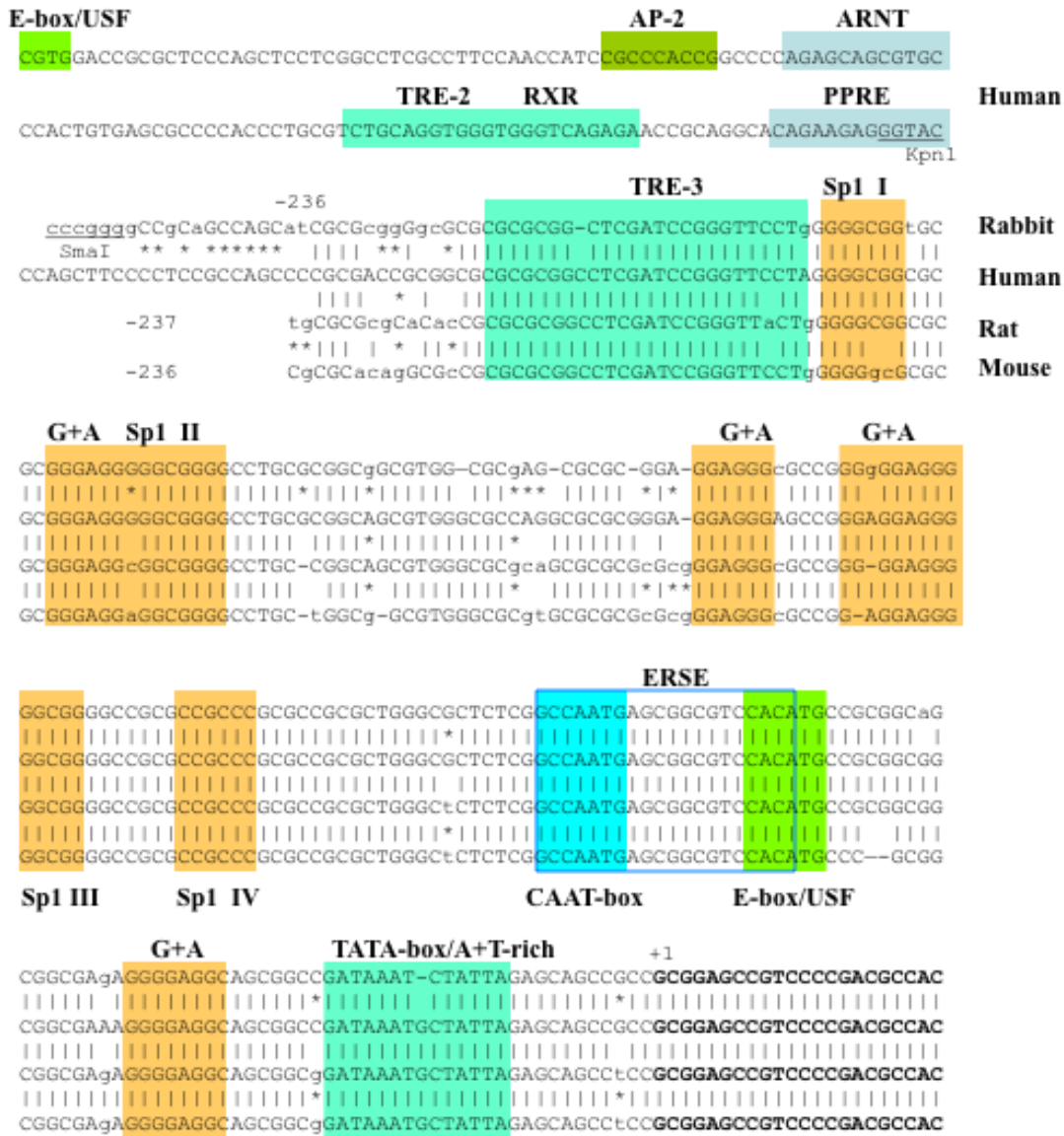


Figura IV. Alineamiento de secuencia de las regiones reguladoras 5' del gen *ATP2A2*. La homología entre 1.58 kb de la secuencia regulatoria del gen humano para *SERCA2* y las secuencias del mismo gen para ratón, rata y conejo se muestran con líneas verticales, un asterisco indica homología sólo entre 2 especies. Las secuencias consenso para varios elementos regulatorios se muestran en áreas coloreadas, el elemento ERSE está encuadrado y la secuencia 5' no traducida del primer exón está en negritas. (Tomado de Zarain-Herzberg y Álvarez-Fernández. 2006).

1.4 Hipertrofia cardiaca

La hipertrofia cardiaca se caracteriza por un aumento en tamaño de los miocitos cardiacos que se presenta como respuesta a un aumento adaptativo en la carga de trabajo del corazón. La hipertrofia cardiaca puede ser una respuesta fisiológica normal como en el caso de los atletas y tiene un efecto benéfico al mejorar la capacidad de trabajo sin provocar daño al miocardio; o puede ser una hipertrofia patológica, como ocurre si el crecimiento es provocado por hipertensión arterial crónica, polimorfismos genéticos, pérdida de cardiomiocitos después de daño isquémico como ocurre en un infarto o por un metabolismo cardiaco alterado. La hipertrofia patológica, en un principio es una respuesta compensatoria pero que al mantenerse lleva a un decaimiento en la función del miocardio y evoluciona hacia la insuficiencia cardiaca.

En cuanto a la forma del crecimiento se puede hablar de hipertrofia concéntrica cuando se presenta una sobrecarga de presión crónica que lleva a un volumen reducido del ventrículo izquierdo y aumento en el grosor de la pared del mismo provocado por la adición de sarcómeros en paralelo. Por otro lado la sobrecarga de volumen produce hipertrofia excéntrica al provocar dilatación y adelgazamiento de la pared cardiaca, lo que se debe a la adición de sarcómeros en serie.

Una diferencia primordial entre la hipertrofia fisiológica y la patológica es la activación del programa genético fetal, ya que sólo en el segundo caso se activa la expresión de genes propios del corazón en desarrollo y que están normalmente reprimidos en corazones adultos; dicho programa genético tiene por objeto lidiar con la elevada demanda hemodinámica, sin embargo, a pesar de que permite el

incremento ordenado del aparato contráctil, también implica la disminución en los niveles de expresión de las isoformas adultas de varios genes que de hecho son usados como biomarcadores de hipertrofia patológica (Barry, et al. 2008).

El programa genético fetal está constituido por una gran cantidad de genes que son expresados diferencialmente durante la hipertrofia patológica, sin embargo, existen algunos que representan ejemplos clásicos ya sea por su importancia en la capacidad contráctil del miocito o por la gran diferencia en sus niveles de expresión que se presenta durante la enfermedad como son las isoformas de la cadena pesada de miosina (MHC), el factor natriurético atrial (ANF), el péptido natriurético cerebral (BNP) y la expresión de actina α -esquelética. Uno de los principales marcadores de hipertrofia cardiaca son los niveles de MHC, dicha proteína presenta 2 isoformas en el corazón adulto, β MHC y α MHC. Cuando se presenta hipertrofia, se elevan los niveles de la isoforma β MHC y disminuyen los de α MHC, con lo que se disminuye la velocidad de la actividad enzimática de la ATPasa de la miosina. Aunque este cambio es bastante característico del crecimiento hipertrófico, se ha reportado que por sí solo pudiera no constituir evidencia de incremento en la hipertrofia (Pandya, Kim y Smithies. 2006).

Los péptidos natriuréticos son hormonas que regulan varios procesos fisiológicos del sistema cardiovascular y endocrino y que poseen potentes propiedades inhibitorias sobre la hipertrofia. Existen 3 miembros de estas hormonas, los cuales son ANF, BNP y CNP; ANF se expresa principalmente en los atrios, BNP se puede encontrar en atrios y ventrículos, mientras que la distribución de CNP no ha sido descrita en detalle. ANF y BNP se encuentran en

altas cantidades en el desarrollo embrionario pero se encuentran ausentes en el adulto sano. Como consecuencia de un estímulo hipertrófico, se elevan los niveles de ambos péptidos en los cardiomiocitos en un intento de inhibir la respuesta hipertrófica (Barry, et al. 2008). Por otra parte, el aumento en la expresión de actina esquelética y de algunas proteínas que tienen que ver con la respuesta a algunas citocinas también ha sido asociado con el desarrollo de hipertrofia (Rajan, et al. 2006).

2. ANTECEDENTES

2.1 Regulación de la expresión del gen *ATP2A2*

Los mecanismos moleculares por los que se mantiene el funcionamiento y expresión de las SERCAs, involucran a otras bombas que controlan la homeostasis de cationes en la célula además de un conjunto de proteínas reguladoras que son parte de varias rutas de señalización, por lo que múltiples estudios se han realizado para tratar de explicar los mecanismos que regulan la expresión del gen *ATP2A2* en cardiomiocitos (Berridge et al. 2003). Entre los distintos estímulos que influyen sobre la expresión del gen *ATP2A2*, se encuentra la hormona tiroidea (3,5,3'-triyodotironina en su forma activa, también nombrada simplemente como T₃), la cual es capaz de inducir la expresión de *ATP2A2* mediante su unión a los receptores nucleares THR (por sus siglas en inglés: thyroid hormone receptors). La hormona T₃ al unirse a sus receptores, los cuales son factores de transcripción cuya unión al promotor de *ATP2A2* ya ha sido demostrada (Zarain-Herzberg, et al. 1994), activa la transcripción del gen mediante el reclutamiento de complejos remodeladores de la cromatina. La activación de *ATP2A2* por T₃ es inhibida por estimulación de receptores adrenérgicos α_{1A} en cardiomiocitos de rata (Wu et al. 1997). En corazón humano se ha demostrado que la actividad de SERCA2a puede ser regulada en un proceso mediado por la proteína fosfatasa PP2-B dependiente de calcio, también llamada calcineurina (Münch et al. 2002). En cardiomiocitos de rata neonata se encontró que la activación de calcineurina por altas concentraciones de calcio intracelular lleva a elevados niveles de la forma activa (no fosforilada) del factor de transcripción NFAT, lo que desencadena niveles elevados del transcrito primario

de *ATP2A2* (Prasad et al. 2009), sin embargo, los mecanismos moleculares exactos que median esta activación no han sido descritos.

En la Figura V se muestra un resumen propuesto por Inesi y colaboradores (2009) de lo encontrado con respecto a la función de algunos mecanismos que median los niveles de transcripción del gen *ATP2A2*.

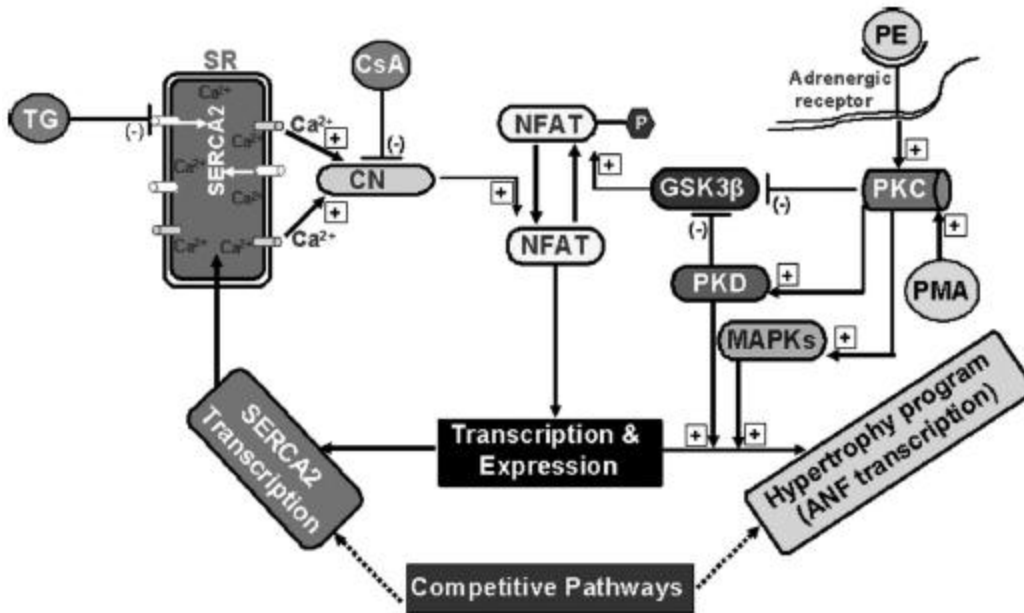


Figura V. Algunos abordajes farmacológicos y los mecanismos descritos a partir de ellos en el control de la expresión de SERCA2 y el desarrollo de hipertrofia. 1) La activación de PKC causada por PE (estimulación α -adrenérgica) o PMA media la activación del programa de hipertrofia y la expresión de ANF, los cuales requieren a NFAT activo (desfosforilado). 2) Niveles apropiados de NFAT activo se alcanzan mediante una mayor desfosforilación (CN activada) o una menor fosforilación (GSK3 β inactiva). 3) La activación de CN se obtiene mediante altas concentraciones de calcio intracelular, ya sean alcanzadas directamente a través de la inactivación catalítica de SERCA2 por TG o indirectamente a través de la inhibición de la expresión de SERCA2 (debido a la activación de PKC por PE). 4) En ausencia de estimulación adrenérgica de PKC, la activación directa de CN por altas concentraciones de calcio (a causa de la inhibición de SERCA2 por TG) incrementa la expresión de SERCA2. 5) El reclutamiento competitivo de NFAT y/u otros factores de transcripción por el programa de hipertrofia resulta en la inhibición de la expresión de SERCA2 y NCX1 bajo condiciones de activación α -adrenérgica. 6) El efecto inhibitorio de la CsA demostró que CN es necesaria para desfosforilar a NFAT y activar la expresión tanto de SERCA2 como del programa de hipertrofia. Tomado de Prasad et al. 2009.

Abreviaturas usadas:

TG, Tapsigargina; PE, fenilefrina; PMA, 13-acetato 12-miristato de forbol; CsA, ciclosporina; SR, retículo sarcoplásmico; CN, calcineurina; PKC, proteína cinasa C; PKD, proteína cinasa D; GSK3 β , cinasa de la glicógeno sintasa 3 β ; MAPKs, proteínas cinasas activadas por mitógeno.

También se ha demostrado que algunos factores de transcripción pertenecientes a la familia Sp1 regulan la expresión del gen *ATP2A2*, tanto *in vivo* como *in vitro* en distintos tipos celulares, incluidos los cardiomiocitos (Takizawa et al. 2003). Otros mecanismos que son capaces de regular la expresión del gen *ATP2A2* son la concentración citoplásmica de Ca^{2+} a través de la activación de calcineurina y la consecuente translocación de NFAT al núcleo, así como la actividad de distintas cinasas involucradas en distintas cascadas de transducción de señales como son PKC, PKD y GSK3 β . El estrés oxidativo también ha sido relacionado con la expresión del gen *ATP2A2* (Vangheluwe et al. 2005) y reportes recientes (Sulaiman et al. 2010) indican que el polifenol resveratrol es capaz de prevenir la baja expresión del gen *ATP2A2* que se observa en la cardiomiopatía diabética. Los efectos del resveratrol sobre múltiples genes son atribuidos a que activa a la sirtuína SIRT1, cuya actividad como desacetilasa es vinculada con sus efectos benéficos sobre varias funciones celulares relacionadas con el metabolismo energético. Específicamente se reportó que la región comprendida entre -260 y -70 en el promotor de *ATP2A2* podría tener un papel importante en la represión de la actividad transcripcional que se observó cuando cardiomiocitos fueron crecidos en alta glucosa. Aunque existen trabajos que cuestionan el hecho de que el resveratrol activa directamente la actividad catalítica de SIRT1 (Borra et al. 2005; Kaeberlein et al. 2005 y Beher et al. 2009), sus efectos benéficos sobre la expresión disminuida de *ATP2A2* presente en la cardiomiopatía diabética representan un antecedente importante respecto a las posibles rutas de regulación de la expresión el gen *ATP2A2*.

2.2 La regulación epigenética

La epigenética, se refiere a la regulación heredable de la expresión genética que no requiere cambios en la secuencia del ADN. Dicha regulación se lleva a cabo mediante la modificación covalente del ADN y las histonas. Las modificaciones mencionadas son susceptibles de alteración durante la vida de la célula por lo que representan un nivel de regulación de la expresión génica que puede ser explotado para el control de enfermedades que de hecho tienen su origen en un “epigenotipo” particular. Un aspecto importante del epigenoma es que puede ser afectado por múltiples factores entre los que se encuentran la alimentación o la edad de un individuo, teniendo como resultado un “código” de regulación casi tan flexible en algunos casos como la regulación transcripcional.

Como se sabe desde hace algunas décadas, el ADN no se encuentra desnudo en el núcleo de la célula, sino que se encuentra empaquetado en una estructura llamada cromatina, compuesta fundamentalmente por ADN enrollado en proteínas llamadas histonas, dichas histonas son susceptibles de modificaciones químicas en algunos residuos que les confieren distintas propiedades con respecto a la accesibilidad del ADN con el que interaccionan. Entre las modificaciones más comunes que pueden sufrir las histonas está la acetilación de algunos residuos de lisina y serina de H3 y H4 (Bártová et al. 2008); dichas acetilaciones están relacionadas con el grado de compactación de la cromatina, correspondiendo el estado acetilado a la cromatina relajada. La acetilación de las “colas de las histonas” (como comúnmente se llama a la región de las histonas que puede ser acetilada) es llevada a cabo por enzimas llamadas acetiltransferasas de histonas (HAT) y el proceso inverso, la desacetilación, está a

cargo de las desacetilasas de histonas (HDACs). El estado de acetilación de las histonas, por tanto, está sujeto a un equilibrio entre la actividad de HATs y HDACs. Existen 4 clases de HDACs en mamíferos: clase I (1, 2, 3, 8), clase II (4, 5, 7, 9 forman la clase IIA y 6, 10 pertenecen a la clase IIB), clase III también conocida como de las sirtuínas (Sirt 1-7) y clase IV con sólo un miembro, la HDAC11 (Nebbioso, et al. 2009).

Aunque la principal función de las HDACs es la remoción de grupos acetilo de las colas de histonas, también se han descrito y propuesto varias funciones adicionales para estas proteínas entre las que están la de anclaje de complejos transcripcionales y la fosforilación de factores de transcripción (Chandrasekaran, et al. 2009). En este contexto, dada su importante función dentro de la maquinaria transcripcional de la célula, es relevante el estudio de sus efectos sobre la expresión génica.

2.3 Las desacetilasas de histonas en el corazón

Recientemente, se ha explorado la relación entre la acetilación de histonas y el desarrollo de hipertrofia e insuficiencia cardiaca, encontrándose por escaneo diferencial de cromatina una amplia gama de regiones genómicas afectadas por el nivel de acetilación de histonas y que están relacionadas con la respuesta a estímulos hipertróficos (Kaneda, et al. 2005). De hecho, mediante el uso de inhibidores de desacetilasas de histonas (HDACs) ha logrado inhibir en forma dosis-dependiente la activación de hipertrofia cardiaca y de programas genéticos fetales sobre cardiomiocitos postnatales (Antos, et al. 2003); además, se ha

reportado que la isquemia del miocardio induce la actividad de HDACs en corazón de ratón *in vivo* e *in vitro* (Granger, et al. 2008).

En el corazón se expresan principalmente las HDAC clase II y se ha demostrado que son exportadas del núcleo al citoplasma en respuesta a señales de estrés y que este transporte depende de su fosforilación a cargo de la cinasa dependiente de calcio/calmodulina (CaMK). Por otro lado, ratones “knock-out” para HDAC 5 y HDAC9 son hipersensibles a señales de estrés y desarrollan corazones masivamente hipertróficos en respuesta a varios estímulos de estrés patológico (Chang, et al. 2004).

La inhibición de las HDACs tipo II por el compuesto MC1568 ha mostrado ser tejido específica al inhibir la actividad enzimática de HDAC4 y HDAC5 en corazón y músculo esquelético sin afectar la de HDAC3, permitiendo que el complejo HDAC-MEF2 permanezca en un estado reprimido y por tanto, evitando la transcripción de genes relacionados con el crecimiento hipertrófico (Nebbioso, et al. 2009).

Se ha demostrado que la exportación nuclear de HDAC5 mediada por CaMKII depende de la formación de oligómeros HDAC4-HDAC5, dada la presencia de un sitio único de unión a CaMKII en HDAC4, del cual carecen las demás HDACs tipo II (Backs, et al. 2008).

Otros estudios que reportan una conexión entre la homeostasis del calcio y la activación de HDACs, indican que HDAC5 se asocia directamente con la proteína de unión a Ca^{2+} calmodulina en una interacción dependiente de Ca^{2+} y que esta unión inhibe la asociación de HDAC5 con MEF2a, factor transcripcional que regula la expresión de *ATP2A2* (Berger, et al. 2003).

Además de que se ha estudiado el papel de las HDACs en el corazón, su contraparte, es decir, la función de las HAT también ha sido explorada y se reportó que los co-activadores transcripcionales CBP y p300 son necesarios para la inducción de hipertrofia mediada por fenilefrina en cardiomiocitos. Específicamente se demostró que la función pro-hipertrófica de los co-activadores depende de su actividad como acetil-transferasas de histonas puesto que basta la inducción de dicha actividad para generar hipertrofia (Gusterson, et al. 2003). Sin embargo, la participación del elemento CCAAT presente en el promotor basal del gen *ATP2A2* y su posible función de remodelación de la cromatina no ha sido estudiada.

2.4 Las regiones genómicas ricas en G+C y el estado de metilación del ADN

La metilación del ADN es un factor que influye en la expresión de genes debido al reconocimiento del estado de metilación de secuencias genómicas por diversos factores de transcripción. La región regulatoria proximal (250 pb) del gen *ATP2A2* presenta secuencias ricas en G+C (80 %) conservadas en humano, conejo, rata y ratón (Zarain-Herzberg y Álvarez-Fernández 2002). Específicamente, el sitio de inicio de la transcripción se encuentra inmerso en una isla CpG que abarca aproximadamente 2 kb. La influencia del estado de metilación de la isla CpG mencionada ha sido parcialmente explorada, ya que se reportó que la metilación del promotor disminuye la expresión de *ATP2A2* en la línea celular HL-1, proveniente de cardiomiocitos atriales de ratón (Kao, et al. 2009).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En todo el planeta y en particular en la población mexicana, la principal causa de muerte siguen siendo las enfermedades cardiovasculares, significando el 17.7 % de la mortandad femenina y el 15.4 % de los decesos entre los hombres (INEGI, Estadísticas demográficas, 2005), por lo que un mejor entendimiento de la forma en que nuevas terapias pudieran funcionar sobre la expresión de genes relacionados con el sistema de regulación del calcio es de gran importancia. Particularmente, el uso de fármacos epigenéticos ha demostrado un futuro promisorio en este contexto, sin embargo, ni los efectos ni los mecanismos de regulación sobre el gen *ATP2A2*, han sido descritos. Por tanto, la caracterización del efecto de los fármacos mencionados sobre la expresión de *ATP2A2* ayudará a entender mejor los posibles mecanismos de acción de terapias encaminadas a solucionar el problema que representan las enfermedades cardiovasculares.

Dado el gran auge que ha tenido el estudio de la regulación epigenética principalmente en el tratamiento del cáncer, en gran parte por el éxito de fármacos que interfieren con la acetilación de histonas y con la metilación del ADN; se ha expandido la investigación sobre el uso de inhibidores de desacetilasas de histonas y de fármacos que inhiben la metilación del ADN en el tratamiento de otras enfermedades como lo son las afecciones cardíacas. Sin embargo, en el caso del tratamiento de la hipertrofia cardíaca severa, por ejemplo, se han encontrado datos contradictorios respecto al uso de los fármacos mencionados. Por un lado se ha descrito que vastas regiones genómicas relacionadas con la respuesta a estímulos hipertróficos pueden ser afectadas por el nivel de acetilación de histonas (Kaneda et al. 2005) y que la inhibición de las HDACs

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Caracterizar el efecto regulador que ejercen los inhibidores de las Desacetilasas de Histonas tipo I y II (trichostatina A, butirato de sodio y tributirato de glicerilo), del agente hipometilante 5-azacitidina, y del fármaco mitramicina que se une a regiones ricas en G+C, sobre la expresión del gen *ATP2A2* en cardiomiocitos normales e hipertróficos, así como explorar los mecanismos involucrados en dicha regulación.

4.2 Objetivos particulares

- Identificar el efecto que ejercen los inhibidores de HDACs, la 5-azacitidina y la mitramicina sobre la expresión del gen *ATP2A2* a nivel transcripcional y de abundancia de ARNm.
- Estudiar el efecto de estos fármacos sobre la expresión del gen *ATP2A2* en cardiomiocitos hipertróficos.

5. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Las HDACs y la metilación del ADN regulan la expresión del gen *ATP2A2* en cardiomiocitos, disminuyéndola durante la hipertrofia, por tanto, el uso de inhibidores de las HDACs y de agentes hipometilantes del ADN previenen la baja en la expresión del gen existente en cardiomiocitos hipertróficos.

puede revertir la expresión de genes fetales en cardiomiocitos adultos. Sin embargo, la delección de las HDACs 5 o 9 en ratones ha demostrado provocar una hiper-sensibilidad a estímulos hipertróficos (Chang et al. 2004), por lo que se puede deducir que los niveles tanto de actividad como de expresión de dichas enzimas debe ser finamente regulado para actuar de manera normal sobre los distintos genes que están involucrados en el desarrollo y/o prevención de la hipertrofia. En este contexto, es necesario ahondar en los mecanismos que permiten a las HDACs mantener los niveles de expresión óptimos de los genes mencionados, ya que como las evidencias sugieren, tanto la sobre-expresión como la delección de estos remodeladores de la cromatina no resultan del todo adecuadas.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

6.1 Medios de cultivo y soluciones

El medio de cultivo DMEM sin glutamina se adicionó con glucosa (4.5 g/l), rojo de fenol (15.9 mg/l), NaHCO_3 (1.2 g/l), kanamicina (70 mg/l), piruvato de sodio (0.11 g/l), nistatina al 0.1 % y una mezcla de antibiótico/antimicótico (Invitrogen) al 1 %. El medio de cultivo OPTIMEM (Invitrogen) se adicionó con 2.4 g/l de NaHCO_3 y los mismos antibióticos usados para el medio DMEM. Ambos medios de cultivo fueron adicionados con 5-bromodesoxiuridina (5-BrdU) a una concentración final de 0.1 mM para evitar el crecimiento de fibroblastos en el cultivo. El amortiguador ADS contiene las siguientes concentraciones finales: NaCl 116 mM, Hepes 20 mM (pH 7.4), NaH_2PO_4 1 mM, Glucosa 5.5 mM, KCl 5.4 mM y MgSO_4 0.8 mM. Se usaron los inhibidores para las desacetilasas de histonas clases tipo I y II, tricostatina A (TSA), butirato de sodio (NaB) y tributirato de glicerilo (TriB). También se evaluó el efecto de la 5-azacitidina, inhibidor de la metilación del ADN, y de la mitramicina, cuyo efecto es evitar la unión de factores transcripcionales a regiones del ADN ricas en guanina (G) y citosina (C).

6.2 Cultivos primarios de cardiomicitos de rata neonata

Se usaron ratas neonatas de 1-2 días de edad de la cepa Wistar a las que se extrajeron los ventrículos del corazón. Los ventrículos extraídos se colocaron en amortiguador ADS a 37°C, se fragmentaron y lavaron 3 veces con ADS, se eliminó el sobrenadante (SN) y se incubaron con agitación constante por 15 minutos en ADS adicionado con pancreatina al 0.06% y colagenasa tipo II al 0.03%; después de la incubación se disoció mecánicamente el músculo, se recuperó el SN en

medio de cultivo a 4°C (DMEM con 20% de suero fetal bovino inactivado (SFBi) y la pastilla se sometió a 4 nuevas digestiones de 10 minutos con pancreatina y colagenasa, recuperando el SN como en la primera ocasión. Una vez que se recuperó el total de las células en medio DMEM con 20% de SFBi se pasó dicha suspensión por una malla de tela de aproximadamente 50 µm de diámetro y la suspensión celular recuperada fue centrifugada a 800 rpm por 3 minutos a 20°C. El SN fue eliminado y la pastilla se re-suspendió en DMEM con 10% de SFBi, lavando una vez más para centrifugar y eliminar nuevamente el SN; la pastilla obtenida se resuspendió en DMEM con 10 % de SFBi y 5-BrdU 0.1 mM; esta suspensión celular fue sembrada en placas de cultivo que se incubaron a 37°C con 5% de CO₂. Se agregaron los diferentes fármacos después de 48h de cultivo en todos los casos excepto cuando se adicionó 5-azacitidina, caso en el cual se agregó el fármaco a las 36 horas. Las células fueron mantenidas en medio DMEM con 10% de SFBi y 5-BrdU 0.1 mM en todos los casos, excepto aquellos en los que se indica lo contrario, usando en dichas excepciones medio OPTIMEM con 2% de SFBi y 5-BrdU 0.1 mM desde las 24 horas de cultivo.

6.3 Purificación de ARN total y cuantificación de ARNm por RT-PCR en tiempo real

Se utilizó la técnica de qRT-PCR para cuantificar los niveles de ARNm para SERCA2a y ANF, usando los valores de ARNm de GAPDH para normalizar los datos. A partir de 1 µg de ARN se sintetizó el ADNc usando la enzima reverso-transcriptasa M-MLV (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones: se usó una concentración final de oligonucleótidos al azar

de 150 ng/μl, de 7.5 ng/μl de oligonucleótido dT₂₀, de 10 mM de dNTPs, de 0.1 M de DTT y 100 unidades de la enzima M-MLV en un volumen final de 20 μl por reacción. La reacción de PCR en tiempo real fue llevada a cabo en un equipo ABI PRISM 7000 usando el kit SYBR GreenER qPCR SuperMix for ABI PRISM de Invitrogen y se usó una concentración de 200 nM de cada oligonucleótido en un volumen final de 20 μl por reacción. Los resultados numéricos fueron analizados con el método propuesto por Pfaffl (2001).

Los oligonucleótidos fueron diseñados usando MacVector y sintetizados en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM y la secuencia de los mismos se muestra en la Tabla II.

6.4 Ensayos de viabilidad celular

Se midió el efecto de los tratamientos farmacológicos sobre la viabilidad celular de los cultivos primarios usando el kit denominado “Cell Titer 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay” de Promega, el cual es un método colorimétrico en el cual se agrega directamente a una placa de 96 pozos con células en cultivo una sal de tetrazolio (reactivo de Owen) que es bio-reducida en las células metabólicamente activas. El producto (formazán) es soluble en el medio de cultivo, directamente proporcional al número de células viables y detectable directamente en la placa de cultivo (después de 1-4 horas de incubación) a través de la medición de la absorbancia a 490 nm. Se usaron pozos con 100 μl de medio de cultivo a los cuales se agregaron 20 μl del reactivo de Owen; las mediciones de absorbancia se llevaron a cabo en el luminómetro marca Wallac modelo Victor² (Perkin Elmer) después de 1 hora de incubación.

6.5 Ensayos funcionales del promotor del gen *ATP2A2*

Para estudiar el efecto de los diferentes tratamientos en el nivel de transcripción del gen *ATP2A2*, se realizaron transfecciones transitorias con dos construcciones que contienen al gen reportero luciferasa bajo el control de 2 longitudes del promotor de *ATP2A2* usando como vector al plásmido pGL3-basic: uno que tiene sólo 259 pb de región reguladora-5' (pGL3-hSERCA2p-259) y otro que tiene 2579 pb (pGL3-hSERCA2p-2579). Los cultivos primarios de cardiomiocitos sembrados en placas de cultivo de 12 pozos con 48 horas de incubación se lavaron 3 veces con medio de cultivo sin suero y sin antibióticos, se incubaron con 500 µl de este medio por 30 minutos y enseguida se agregaron 500 µl del mismo medio (incubado previamente por 20 minutos a temperatura ambiente) conteniendo 1µg del plásmido correspondiente y 2.5 µl de Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Después de agregar la mezcla plásmido-lipofectamina, se incubó por 3 horas a 37°C con CO₂ al 5%. Terminada esta incubación se cambió el medio de cultivo al suplementado con antibióticos, SFB (a menos que se indique lo contrario) y los fármacos probados en las distintas condiciones. Una vez que pasó el tiempo de incubación con los fármacos correspondientes se usó el amortiguador de lisis pasiva (PLB) de Promega para lisar las células en agitación constante (100 rpm) por media hora, tiempo después del cual se congelaron a -70 °C por media hora y se regresaron a temperatura ambiente para recuperar el lisado y centrifugarlo a 11,000 rpm por 2 minutos, se recuperó el sobrenadante y se midió la actividad de luciferasa usando el luminómetro marca Wallac modelo Victor². Para normalizar los datos de las

transfecciones se midió la concentración de proteína usando el reactivo de Bio-Rad basado en el método de Bradford.

6.6 Análisis estadístico

Los resultados son expresados como la media de al menos 3 experimentos independientes +/- error estándar, los valores fueron comparados con análisis de varianza (ANOVA) aplicando la prueba de Holm-Sidak para comparaciones múltiples (a menos que se indique lo contrario) mediante el software SPSS11. El valor de $p < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo. En las gráficas, el asterisco denota valores estadísticamente significativos comparados con los respectivos controles de cada experimento, en caso de haberse realizado comparaciones entre otros valores que no fuesen el control, se indican con líneas horizontales. Se indica en las gráficas correspondientes si ninguna de las comparaciones hechas fue estadísticamente significativa.

Tabla II. Secuencias de los oligonucleótidos usados para qRT-PCR

Oligonucleótido	Secuencia
SERCA2a F	5'-GGCTGATGGTGCTGAAAATCTC-3'
SERCA2a R	5'-CAATGTTTAGGAAGCGGTTACTCC-3'
ANF F	5'-TAGACCACCTGGAGGAGAAGATGC-3'
ANF R	5'-CAGTTTGCTTTTCAAGAGGGCAG-3'
GAPDH F	5'-GGAGAAACCTGCCAAGTATGATGA-3'
GAPDH R	5'-TGGGAGTTGCTGTTGAAGTCG-3'

7. RESULTADOS

7.1 Efecto de inhibidores de desacetilasas de histonas

La TSA y el NaB son ampliamente usados como inhibidores de HDACs tipo I y II, aunque adicionalmente se han reportado otros efectos del NaB sobre las funciones celulares como son la inhibición de la fosforilación de histonas H1 y H2A o la alteración del estado de metilación de residuos lisina y arginina en histonas (Boffa, et al, 1981). El TriB no ha sido propiamente reportado como inhibidor de HDACs, sin embargo, la estructura del mismo permite suponer su función como tal.

En este trabajo se demostró que los fármacos utilizados sobre los cultivos primarios de cardiomiocitos, tienen un efecto inductor dosis-dependiente sobre la expresión de *ATP2A2*, medido a través de la abundancia de ARNm para SERCA2a por qRT-PCR.

La tricostatina A (50 nM) indujo 2.5 veces la cantidad de ARNm para SERCA2a mientras que el NaB (2 mM) lo hizo 2.3 veces y el TriB (0.5 mM) 3.2 veces (Figura VI).

Es importante resaltar que el efecto producido por el TriB es aproximadamente 1.5 veces el del NaB pero logrado con una concentración 4 veces menor. Lo anterior puede ser debido a que dentro de la célula el TriB se metaboliza para liberar tres moléculas de butirato.

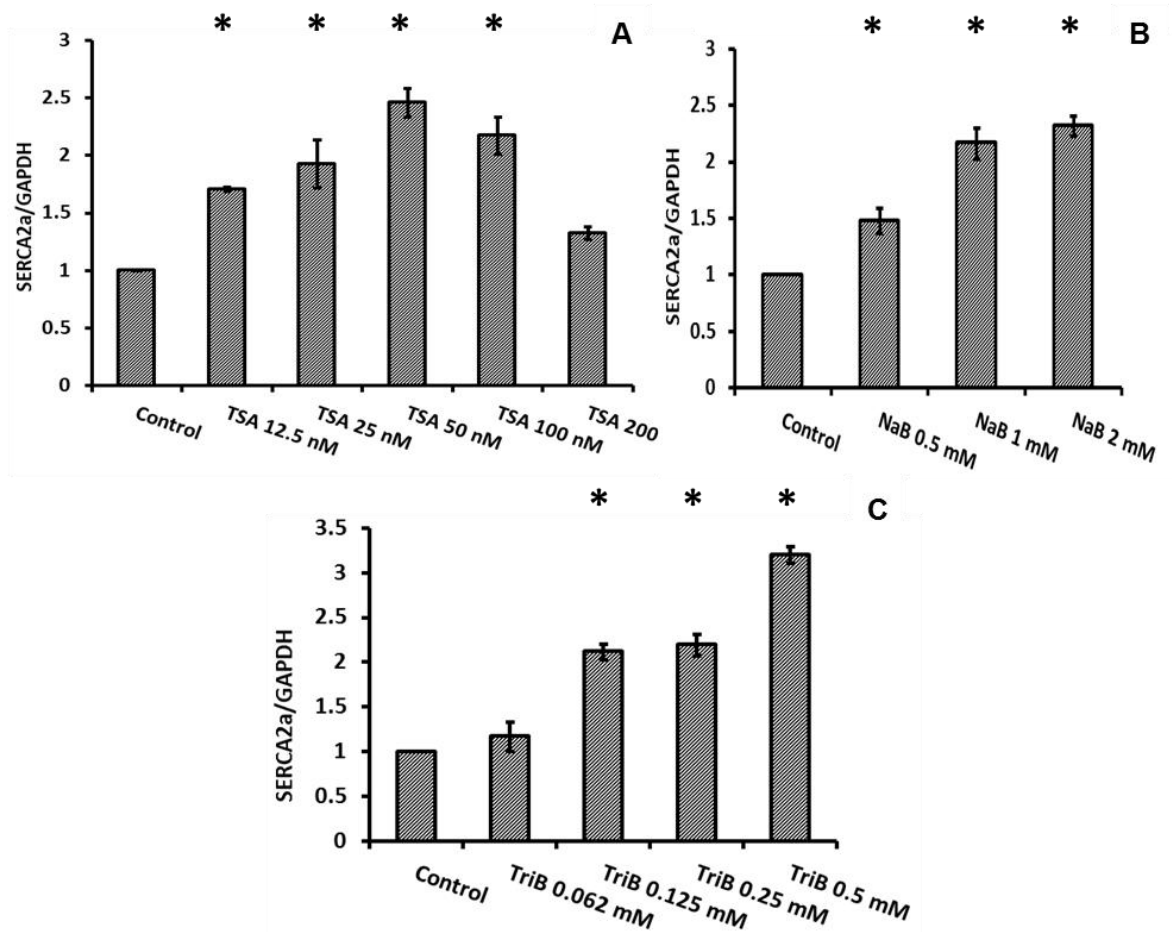


Figura VI: Curvas dosis-respuesta a iHDACs para la abundancia relativa del ARNm de SERCA2a. Los cardiomiocitos de rata neonata fueron mantenidos en medio DMEM suplementado con SFB al 10% y sometidos a tratamientos de 48 horas. Se midió por qRT-PCR la expresión de *ATP2A2* en respuesta a tricostatina A (A), butirato de sodio (B) o tributirato de glicerilo (C); usando el nivel del RNAm de GAPDH para normalizar los datos.

Una vez que se comprobó que los iHDACs probados eran capaces de inducir la expresión de *ATP2A2*, también se cuantificó su influencia sobre la expresión de ANF (Figura VII), un típico marcador de hipertrofia para determinar si podían relacionarse los resultados encontrados aquí con lo reportado en la literatura acerca de la capacidad de los iHDACs para revertir los altos niveles de ANF encontrados en la hipertrofia (Antos, et al. 2003). Contrastando con los

reportes de la literatura, el tratamiento farmacológico provocó una inducción dosis-dependiente de los niveles de ANF en las condiciones de este estudio, diferentes a las reportadas únicamente en el hecho de mantener a los cardiomiocitos en un medio de cultivo suplementado con SFB al 10%.

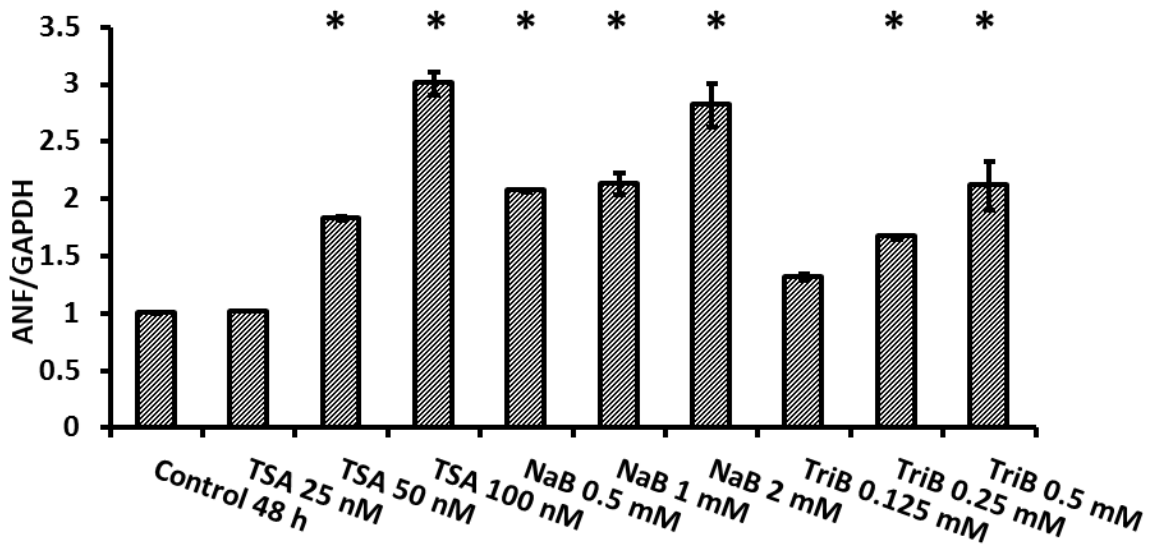


Figura VII: Efecto de los iHDACs sobre la expresión de ANF. Los cardiomiocitos de rata neonata fueron mantenidos en medio DMEM suplementado con SFB al 10% y sometidos a tratamientos de 48 horas. Se midió por qRT-PCR la expresión ANF usando los niveles del ARNm de GAPDH para normalizar los datos.

Para descartar un posible efecto nocivo de los fármacos y que los cambios observados se debieran a esto y no a sus propiedades inhibitorias sobre las HDACs, se midió la viabilidad celular de los cultivos (Figura VIII), ya que existe evidencia acerca de los efectos citotóxicos que puede provocar particularmente la TSA, como son su genotoxicidad sobre linfoblastos humanos *in vitro* (Olaharski et al. 2006) y el hecho de que provoque apoptosis y disminución de la supervivencia en líneas celulares de neuronas dopaminérgicas humanas, de rata y de ratón (Wang et al. 2009).

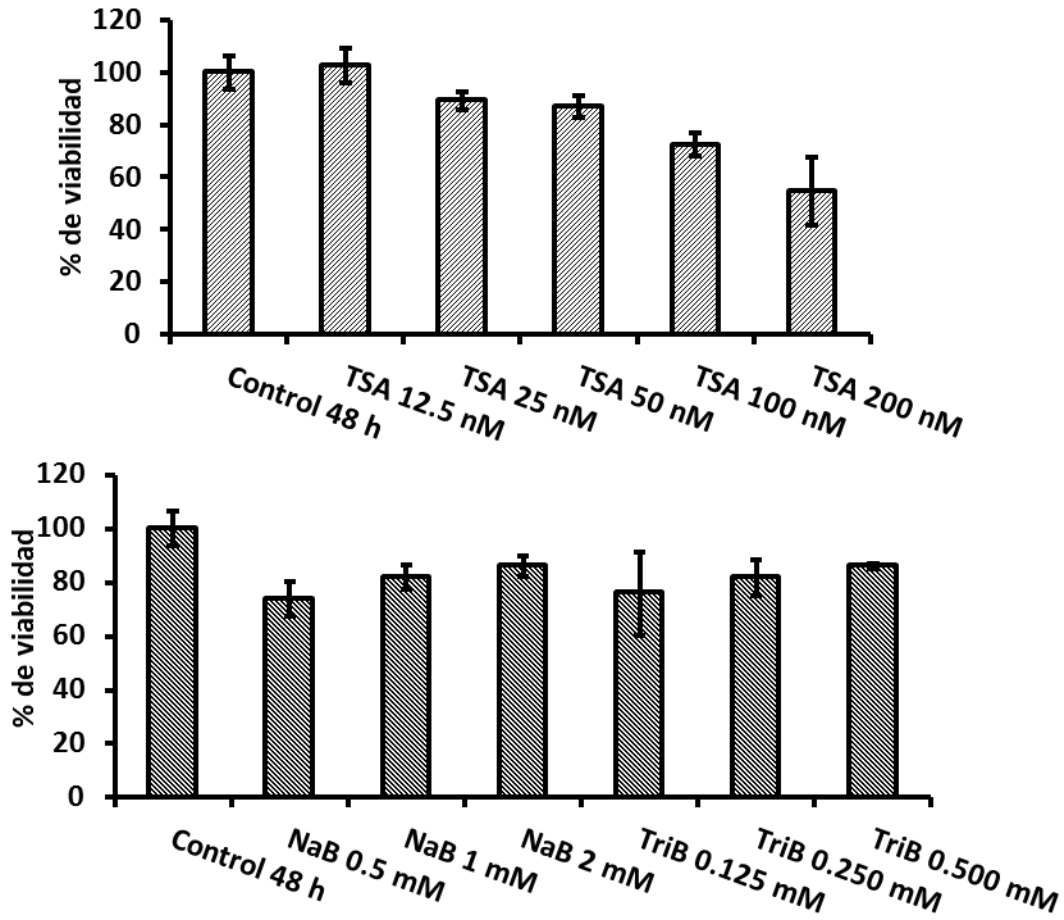


Figura VIII: Ensayos de viabilidad en respuesta a iHDACs. Los cardiomiocitos fueron sembrados en placas transparentes de 96 pozos, mantenidos en medio DMEM suplementado con SFB al 10% y sometidos a tratamientos farmacológicos de 48 horas. Después de la exposición a los iHDACs, se agregó el reactivo de Owen, se incubó por 1 hora y se midió absorbancia a 490 nm. Datos +/- error estándar, cambios no significativos.

Los resultados de los ensayos de viabilidad celular permitieron observar que ésta se veía comprometida con las dos concentraciones más altas de TSA y que por otro lado no se veían efectos nocivos del TriB o el NaB, por lo que se decidió utilizar la concentración más alta de este último en ensayos posteriores y una concentración de 50 nM para la TSA.

Con la evidencia de la capacidad de los iHDACs para inducir la expresión del ARNm de SERCA2a, se realizaron transfecciones transitorias con 2 construcciones de la región reguladora 5' del gen *ATP2A2* (hSERCA2-Luc) para medir la actividad transcripcional producida por los tratamientos con los fármacos. La primera construcción usada (denominada construcción corta) contiene 259 pb de la región 5' no traducida y representa el promotor basal del gen. Contiene entre otros elementos, 4 sitios de unión al factor de transcripción Sp1, una caja-TATA, una caja-E y una caja-CCAAT. La segunda construcción (larga) contiene 2579 pb y contiene múltiples elementos regulatorios que permiten modular la expresión de *ATP2A2* como respuesta a distintas señales y estímulos, así como conferirle especificidad de expresión en corazón. Por ejemplo, contiene elementos de respuesta a hormona tiroidea (TRE) y a ácido retinoico (RXR), varios sitios AP2 y E-box, además de sitios de unión para MEF-2, GATA y Nkx-2.5 (Zarain-Herzberg Angel and Alvarez-Fernández 2002).

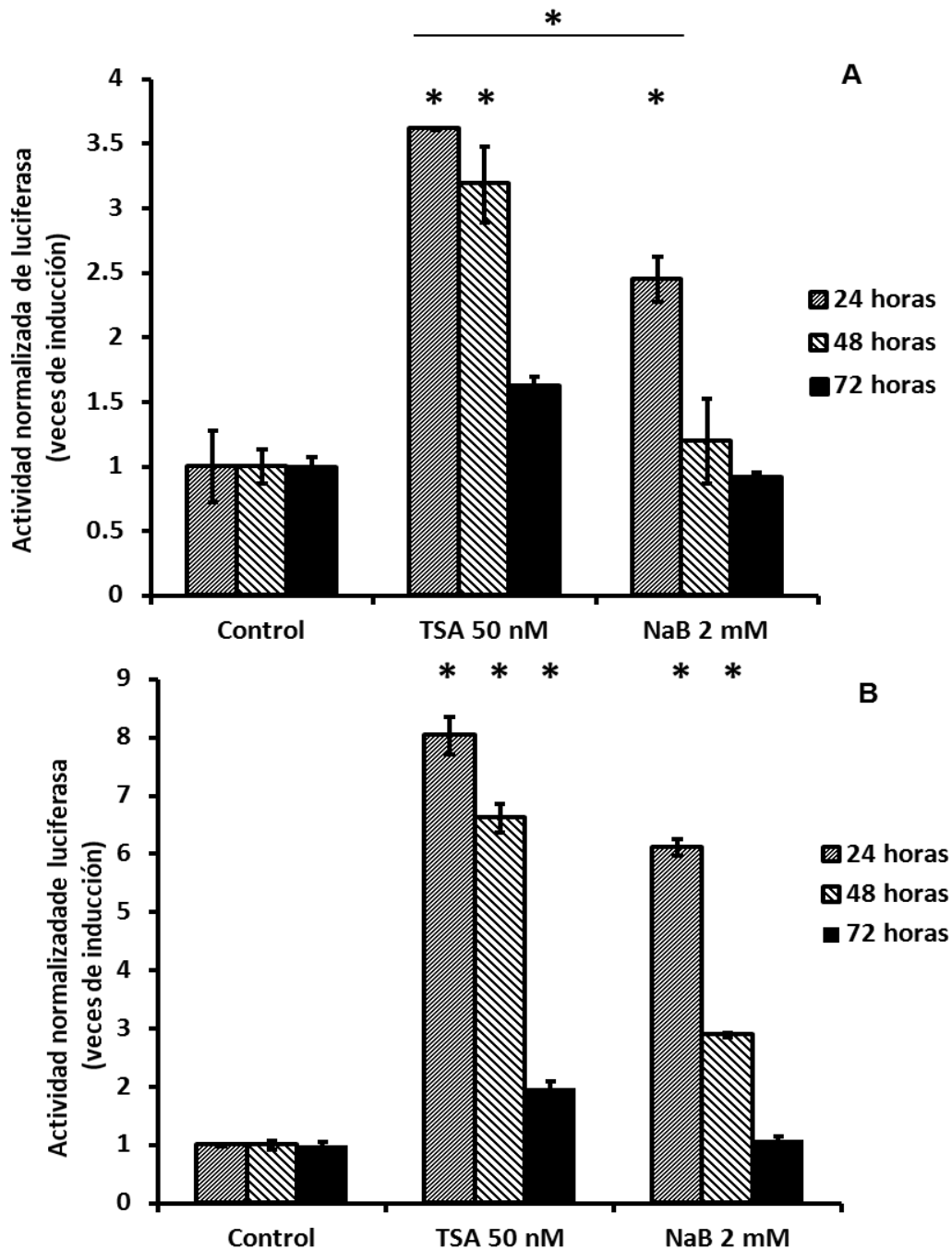


Figura IX. Respuesta transcripcional a TSA y NaB de 2 construcciones de la región proximal del promotor de *ATP2A2*. 48 horas después de sembrar los cardiomiocitos, fueron transfectados con 1 μ g del plásmido hSERCA2-luc conteniendo A) 254 pb o B) 2579 pb de la región promotora 5' no traducida del gen *ATP2A2*. La actividad de luciferasa fue medida después que se aplicaron los fármacos por los tiempos indicados y fue normalizada utilizando la concentración de proteína de los extractos. De aquí en adelante, una línea con asterisco denota dos valores comparados entre sí con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), independientemente de su comparación con los controles respectivos.

Al medir la actividad transcripcional de la construcción corta en respuesta al tratamiento con TSA, se encontró que se induce 3.5 veces la actividad con respecto al control mientras que el tratamiento con NaB produjo una inducción de 2.5 veces, ambos efectos medidos a las 24 horas de tratamiento (Figura IX). Por otro lado, la actividad de la construcción de 2579 pb, igualmente medida a las 24 horas de tratamiento con los fármacos, fue inducida 8 veces por la tricostatina A y 6 veces por NaB.

7.2 Modelo de hipertrofia de cardiomiocitos en cultivo

Para comprobar si los iHDACs podían rescatar y/o prevenir la expresión disminuida de *ATP2A2* que existe en modelos de hipertrofia cardiaca, se llevaron a cabo transfecciones transitorias en medio OPTIMEM (Invitrogen) sin suero, para evitar los efectos hipertróficos de este último, ya que en 1982 Simpson y colaboradores reportaron que el suero fetal bovino por sí solo es capaz de producir hipertrofia en cardiomiocitos de ratas neonatas y que la ausencia del mismo en cultivos tratados con catecolaminas hace más pronunciada la existencia de hipertrofia comparando con cultivos en presencia de suero. En estos ensayos donde medimos el efecto del tratamiento con iHDACs sobre cardiomiocitos sometidos a estimulación adrenérgica con fenilefrina, se encontró que ésta disminuye en aproximadamente un 30-40% la actividad transcripcional de la construcción corta pero no afecta la actividad de la construcción larga (Figura X); por otro lado, la TSA no tuvo el efecto inductor observado en medio DMEM suplementado con suero a 24 ó 48 horas de tratamiento. Al tratar el cultivo con

Fen 100 μ M inmediatamente después de transfectar y colocar TSA 50 nM 24 horas después (para lograr al final de 48 horas de tratamiento farmacológico, 24 horas de exposición a la TSA), tampoco se observó inducción transcripcional alguna. Sin embargo, la TSA sí indujo la actividad transcripcional de ambas construcciones (aproximadamente 1.8 veces para la corta y 3 veces para la larga) al co-tratar las células con Fen 100 μ M cuando ambos fármacos fueron aplicados por 48 horas. Por último, el NaB solo o en presencia de Fen logró inducir la actividad de la construcción corta 1.6 veces y 2 veces la de la construcción larga (en los ensayos en presencia de suero el NaB indujo 3 veces la actividad transcripcional de la construcción corta y 5 veces la de la larga).

Con base en estos resultados se decidió evaluar el comportamiento de la actividad transcripcional en respuesta a 2 concentraciones bajas de suero (1 y 2%) y 2 concentraciones de TSA (25 y 50 nM) para descartar un efecto tóxico en estas condiciones. Este ensayo mostró que en presencia de SFBi al 2% la TSA 50 nM induce la actividad transcripcional de ambas construcciones (Figura XI).

Habiendo establecido una concentración óptima de suero para evaluar el modelo de hipertrofia, se probaron en estas condiciones los tratamientos farmacológicos que inicialmente se llevaron a cabo en medio sin SFBi. En estos experimentos se observó que la fenilefrina disminuyó en un 30% la actividad transcripcional de la construcción corta y sólo un 15% la de la construcción larga (Figura XII). Por otro lado, la TSA aumentó en un 40% la actividad de la construcción corta y un 90% la de la construcción larga, mientras que al co-tratar los cardiomiocitos con fenilefrina la inducción alcanzada fue ligeramente mayor sin existir cambios estadísticamente significativos entre ambas condiciones.

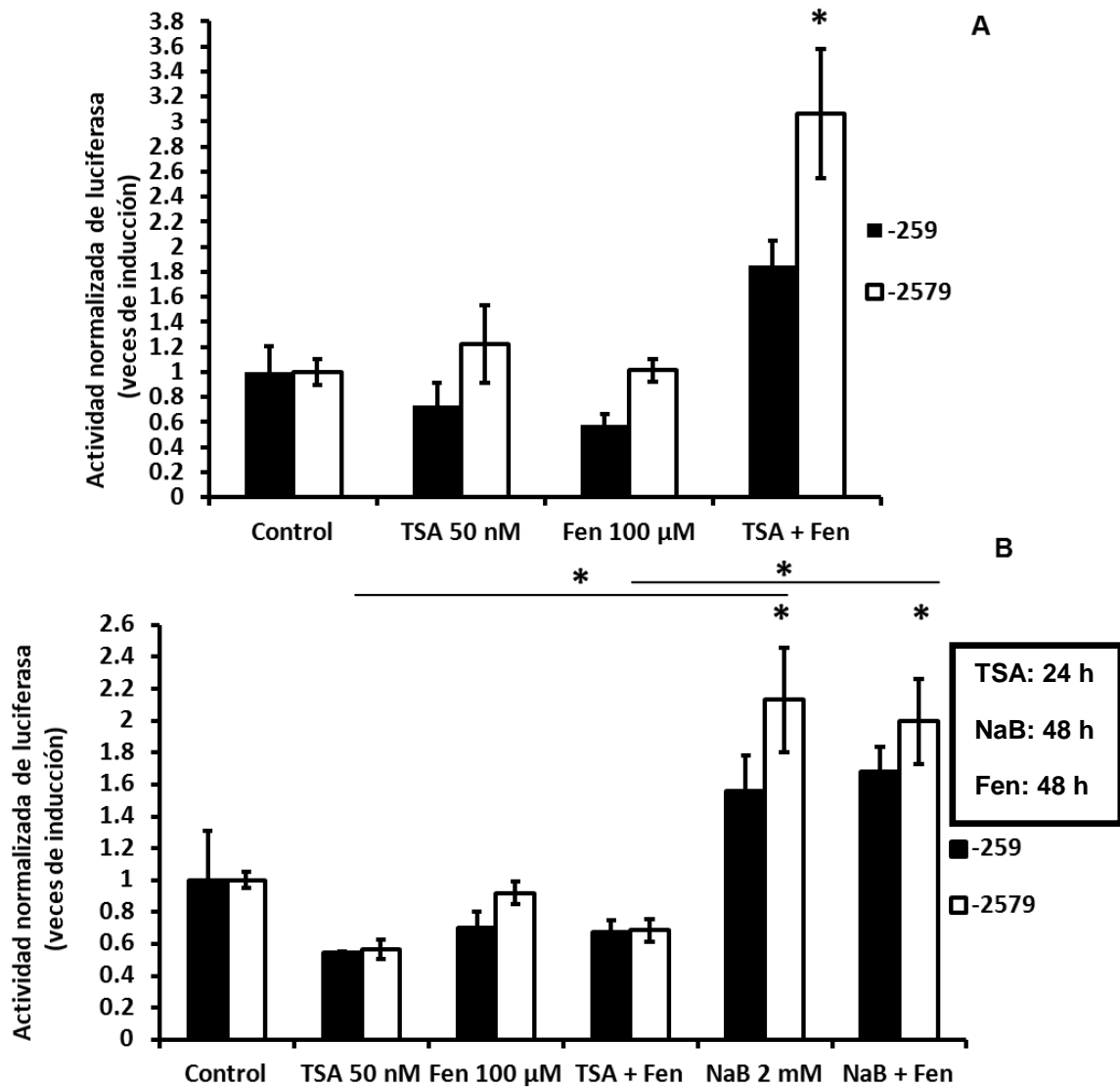


Figura X. Respuesta transcripcional a TSA, Fen y NaB de las 2 construcciones de la región proximal del promotor de *ATP2A2* en medio sin suero. El cultivo primario fue mantenido en medio OPTIMEM sin suplemento de suero desde las 24 horas de sembrado y fue transfectado con 1 μ g de la construcción indicada. A) Los fármacos fueron aplicados por 48 horas, B) Las células fueron expuestas a los fármacos por 48 horas, excepto a la TSA que fue aplicada 24 horas después de la transfección en ambos casos (sola o cuando fue administrada junto a Fen) para alcanzar 24 horas de exposición al finalizar el tratamiento.

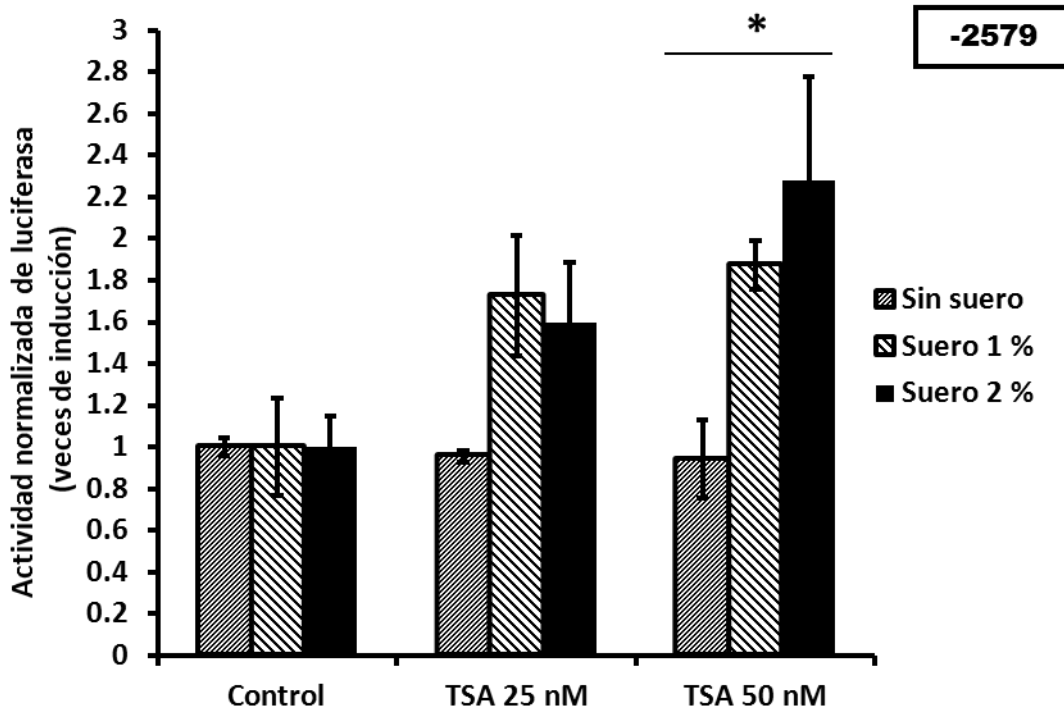
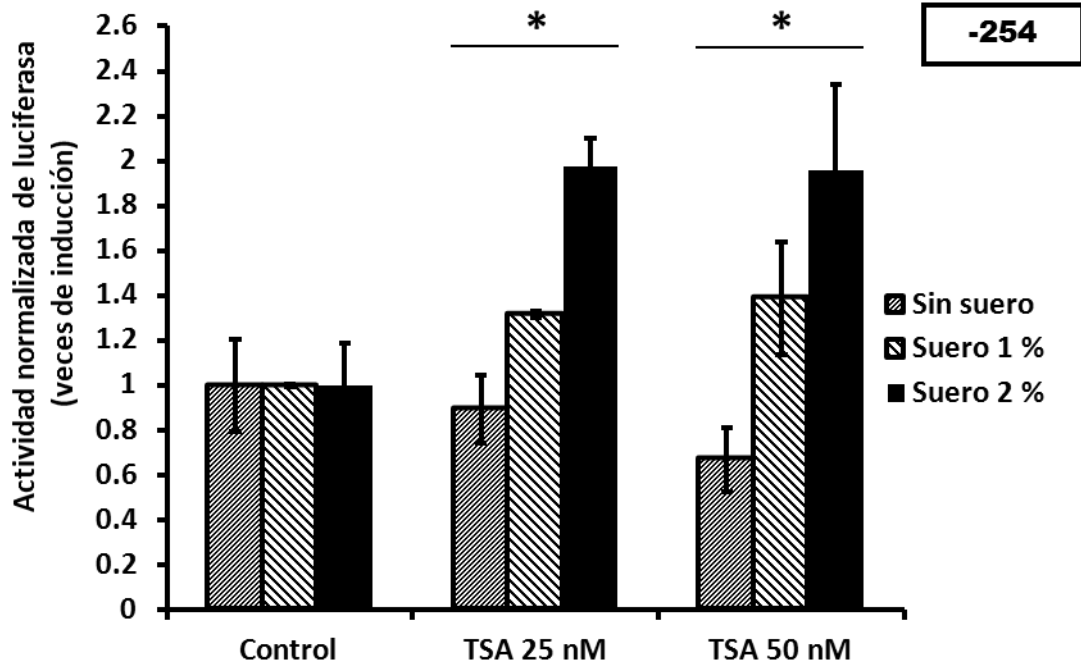


Figura XI. Influencia del SFBi sobre la respuesta transcripcional a TSA de las 2 construcciones de la región proximal del promotor de *ATP2A2*. Inmediatamente después de la transfección con la construcción correspondiente, las células fueron expuestas a la concentración indicada de TSA por 24 horas.

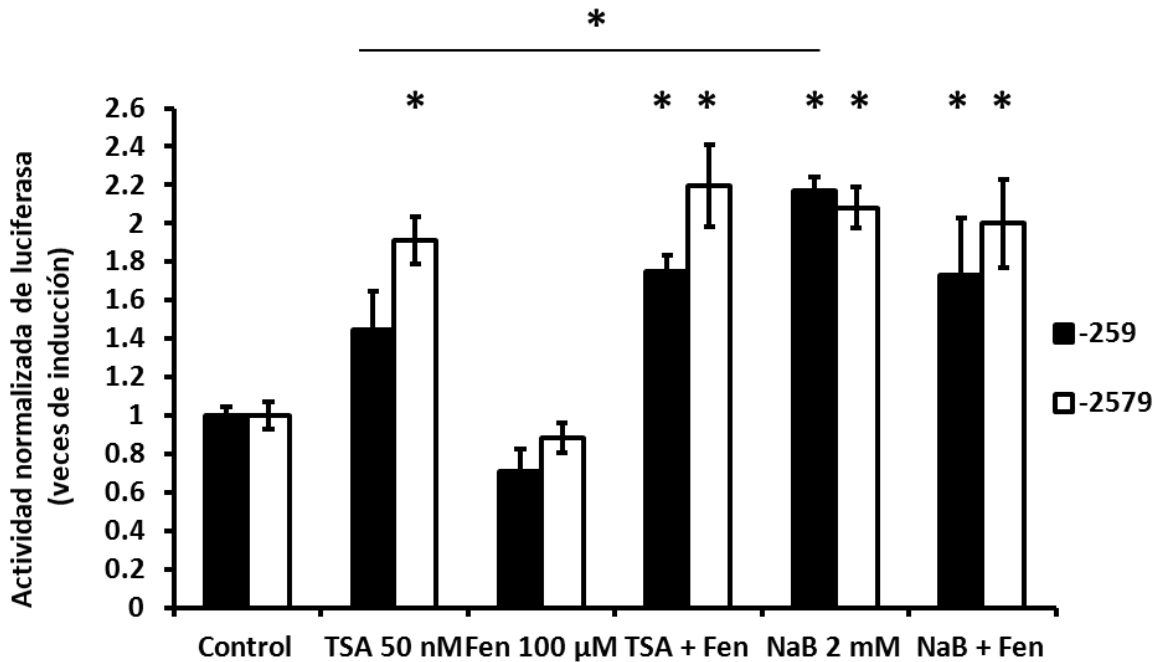


Figura XII. Respuesta transcripcional a TSA, NaB y Fen de 2 construcciones de la región proximal del promotor de *ATP2A2* en medio OPTIMEM con SFB al 2%. El cultivo primario fue mantenido en medio OPTIMEM suplementado con SFBi al 2% desde las 24 horas de sembrado y fue transfectado con 1 μg de la construcción correspondiente. Los fármacos fueron aplicados por 48 horas a las concentraciones indicadas.

El NaB indujo 2.2 veces la actividad transcripcional de la construcción corta y 2.1 veces la de la construcción larga, mientras que la presencia de fenilefrina no modificó significativamente dicha inducción al igual que ocurrió para la TSA.

Habiendo obtenido los resultados de la actividad transcripcional, se llevó a cabo la medición de la abundancia del ARN mensajero en las mismas condiciones (Figura XIII) y se observó que la expresión del gen endógeno no se veía afectada significativamente por los iHDACs en estas condiciones de bajo suero y que la baja expresión causada por la fenilefrina (40% del control) sólo pudo ser rescatada en un 10-15% por ambos iHDACs.

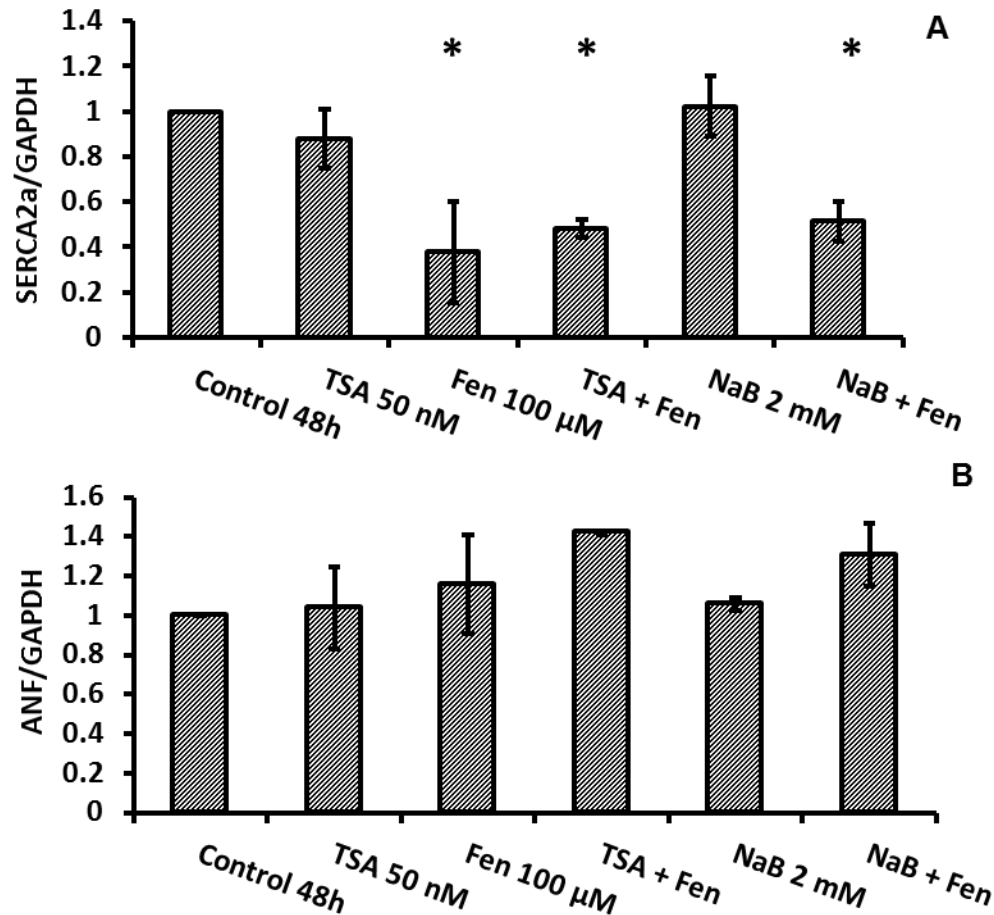


Figura XIII. Abundancia relativa del ARNm de SERCA2a y ANF en medio OPTIMEM con SFB al 2%. El cultivo primario fue mantenido en medio OPTIMEM suplementado con SFBi al 2% desde las 24 horas de sembrado y fue sometido a tratamientos farmacológicos de 48 horas a las concentraciones indicadas. Se midió por qRT-PCR la expresión de SERCA2a (A) y ANF (B). Datos +/- error estándar, $p < 0.05$, datos comparados por la prueba Fisher LSD para comparaciones múltiples.

De los resultados anteriores es destacable el efecto del SFBi en el medio de cultivo, ya que la ausencia del mismo parece impedir la respuesta transcripcional de las construcciones del promotor de *ATP2A2* a la TSA y disminuir la correspondiente al NaB; además, al utilizar una concentración baja de suero (2%), la inducción fue marcadamente disminuida. Por otro lado, en la respuesta del gen endógeno también influyeron drásticamente las condiciones del medio de cultivo,

ya que los niveles de ARN mensajero para SERCA2a no se vieron afectados por los iHDACs en medio bajo en suero, en contraste con lo que se observó en medio al 10% (Figura VI) donde se logró una inducción de la expresión de 2 veces. Por otro lado, también la inducción de ANF observada en medio con 10% de suero (Figura VII) fue marcadamente disminuida hasta casi desaparecer en el medio con bajo suero. Aunado al hecho anterior, la baja concentración de suero impidió que los bajos niveles de ARNm para SERCA2a provocados por fenilefrina fueran rescatados y/o prevenidos por los iHDACs.

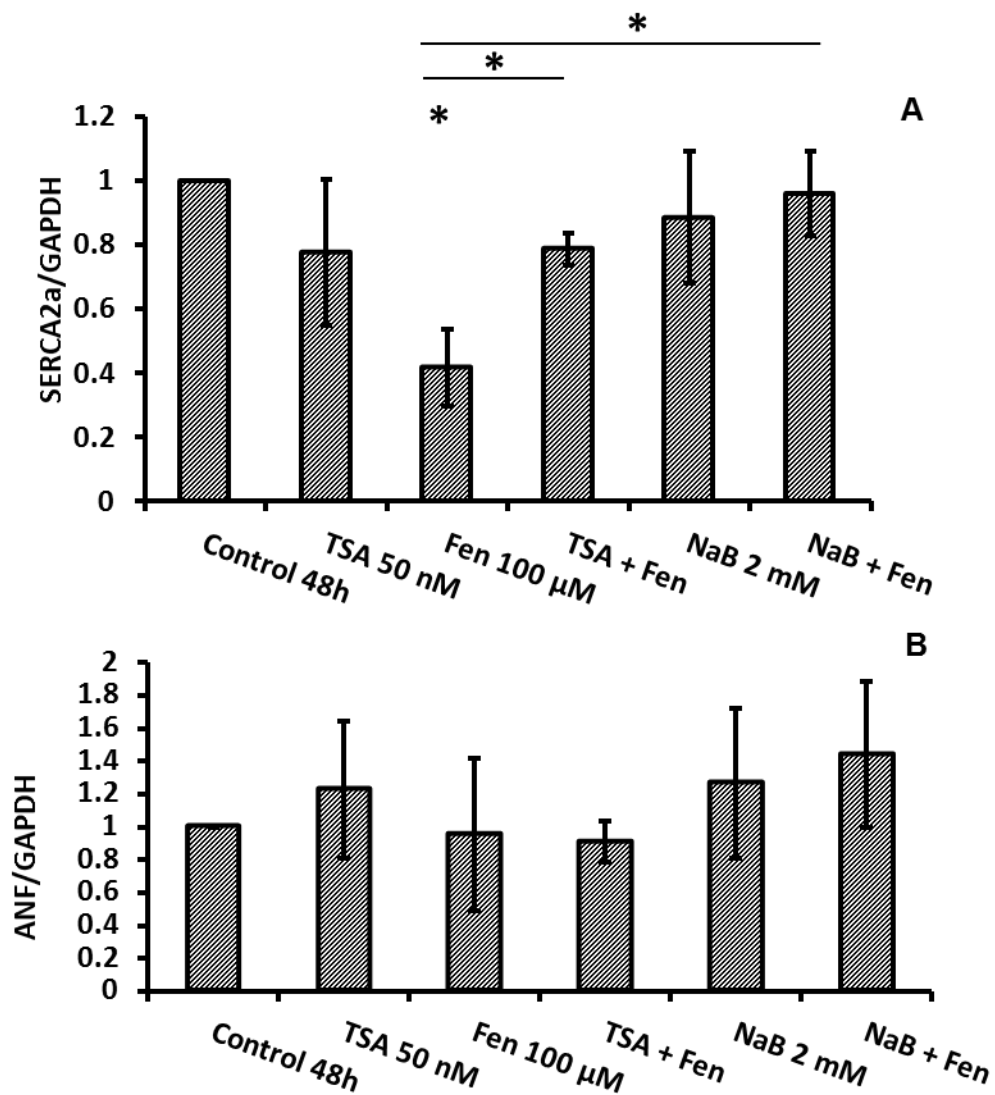


Figura XIV. Abundancia relativa del ARNm de SERCA2a y ANF en medio DMEM con SFB al 10%. El cultivo primario fue mantenido en medio DMEM suplementado con SFBi al 10% y sometido a tratamientos farmacológicos de 48 horas a las concentraciones indicadas. Se midió por qRT-PCR la expresión de SERCA2a (A) y ANF (B). Datos +/- error estándar, $p < 0.05$, datos comparados por la prueba Fisher LSD para comparaciones múltiples.

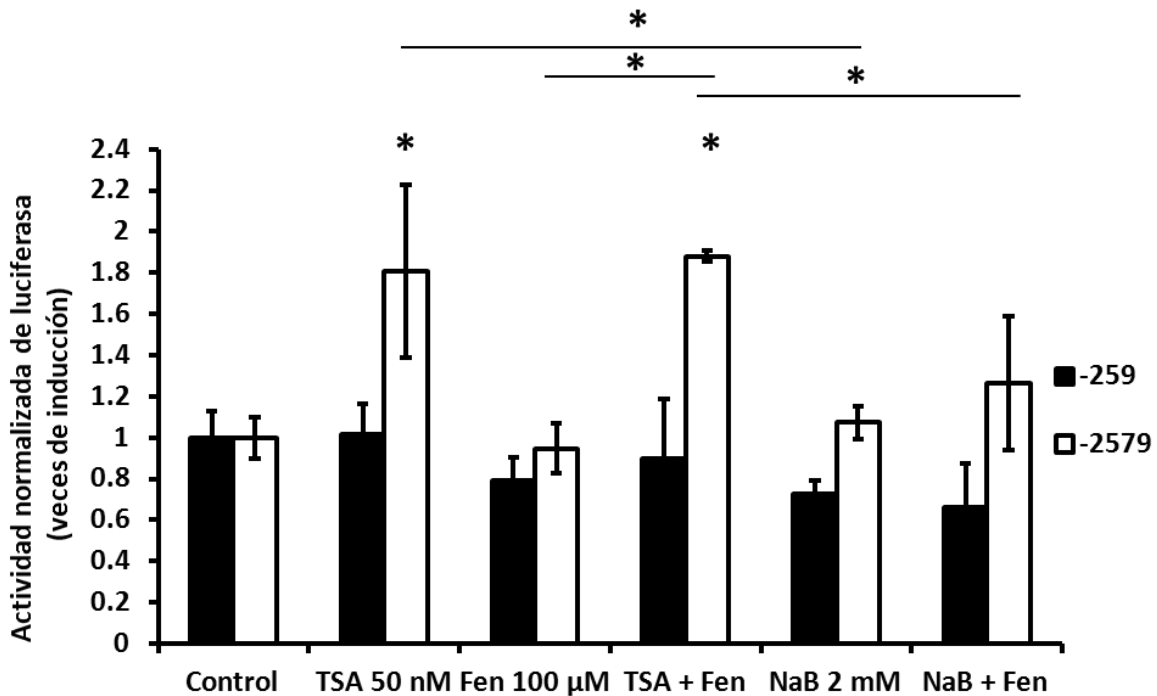


Figura XV. Respuesta transcripcional a TSA, NaB y Fen de 2 construcciones de la región proximal del promotor del gen *ATP2A2* en medio DMEM con SFB al 10%. El cultivo primario fue mantenido en medio DMEM suplementado con SFBi al 10% y fue transfectado con 1 µg de la construcción correspondiente. Los fármacos fueron aplicados por 48 horas a las concentraciones indicadas. Datos +/- error estándar, $p < 0.05$, datos comparados por la prueba Fisher LSD para comparaciones múltiples.

Aunque el modelo clásico de hipertrofia in vitro requiere bajos niveles de suero en el medio de cultivo, dados los resultados obtenidos hasta este punto, se decidió llevar a cabo la medición de los niveles del ARNm para SERCA2a (Figura XIV) y la actividad transcripcional de las construcciones del gen (Figura XV) en respuesta a fenilefrina y a los co-tratamientos fenilefrina/iHDACs en medio

suplementado con suero al 10%. En estos ensayos se observó que la fenilefrina provocó una disminución del 50% en los niveles del mensajero para SERCA2a mientras que los iHDACs rescataron y/o previnieron esta baja casi por completo en el caso del NaB y hasta llegar a un 80% del control para el caso de la TSA. Ninguno de los tratamientos afectó significativamente los niveles del mensajero para ANF en medio DMEM con suero al 10%. Además se encontró que la Fen y el NaB juntos o por separado disminuían en un 20-30% la actividad transcripcional de la construcción corta mientras que la TSA sola o en combinación con la Fen prácticamente no afectaba la actividad de esta construcción. En contraste con lo observado para la construcción de 259 pb, la actividad de la construcción larga no se vio afectada por Fen y el NaB sólo aumentó mínimamente la actividad transcripcional, en cambio, la TSA aumentó casi al doble la actividad de la construcción demostrando un efecto bastante distinto de ambos iHDACs sobre ambas construcciones.

7.3 Efecto del agente hipometilante 5-azacitidina

A nivel de ARNm, se observó que el tratamiento de los cardiomiocitos con el agente hipometilante del ADN 5-azacitidina (5 μ M) por 72 horas indujo 2.3 veces la expresión de SERCA2a (Figura XVI). La inducción de la abundancia del ARNm para SERCA2a puede deberse a la hipometilación del gen *ATP2A2* pero también a la hipometilación de otros genes, cuyos niveles y por tanto funciones (afectadas por el nivel global de metilación de ADN) podrían regular la expresión del gen. Por este motivo, para descartar efectos secundarios debidos a la modificación de la expresión de genes que pudieran regular los niveles de transcripción de *ATP2A2*,

cardiomiocitos transfectados con las construcciones de hSERCA2-luc (Figura XVII) fueron tratados con 5-azacitidina por 72 horas. En dichas transfecciones no se observaron cambios en la actividad transcripcional de ninguna de las 2 construcciones. Al medir la actividad transcripcional de un plásmido transfectado transitoriamente en células de mamíferos, el nivel de metilación del mismo no puede ser afectado por la 5-aza. Por lo anterior, los cambios que se observen sobre la actividad transcripcional bajo estas condiciones se deberán al efecto de genes que modifiquen la actividad transcripcional del plásmido. El no haber observado cambios en la actividad transcripcional de las construcciones hSERCA2-luc sugiere que este fármaco induce la expresión de *ATP2A2* a través de la hipometilación de su promotor. Este resultado también sugiere que lo observado a nivel de ARNm no es un efecto indirecto de la activación o represión de otro gen que pudiese estar controlando la transcripción de *ATP2A2*.

Al igual que para los iHDACs, se midió la viabilidad celular (Figura XVI) de los cultivos sometidos a distintas concentraciones de 5-azacitidina (5-Aza) para asegurar que las respuestas observadas no se debieran a un efecto tóxico sobre los cultivos.

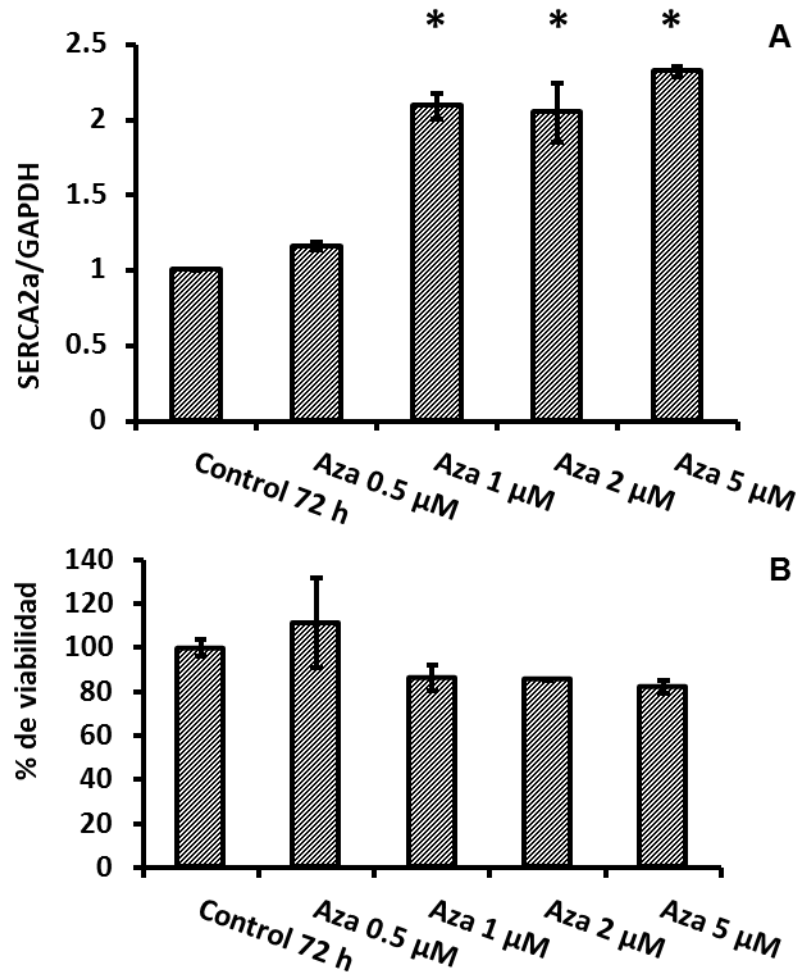


Figura XVI: A) Curva dosis-respuesta con 5-azacitidina para la abundancia relativa del ARNm de SERCA2a. Los cardiomiocitos neonatales de rata fueron expuestos por 72 horas a las concentraciones indicadas de 5-azacitidina. B) Medición de la viabilidad celular para las distintas concentraciones de 5-Aza.

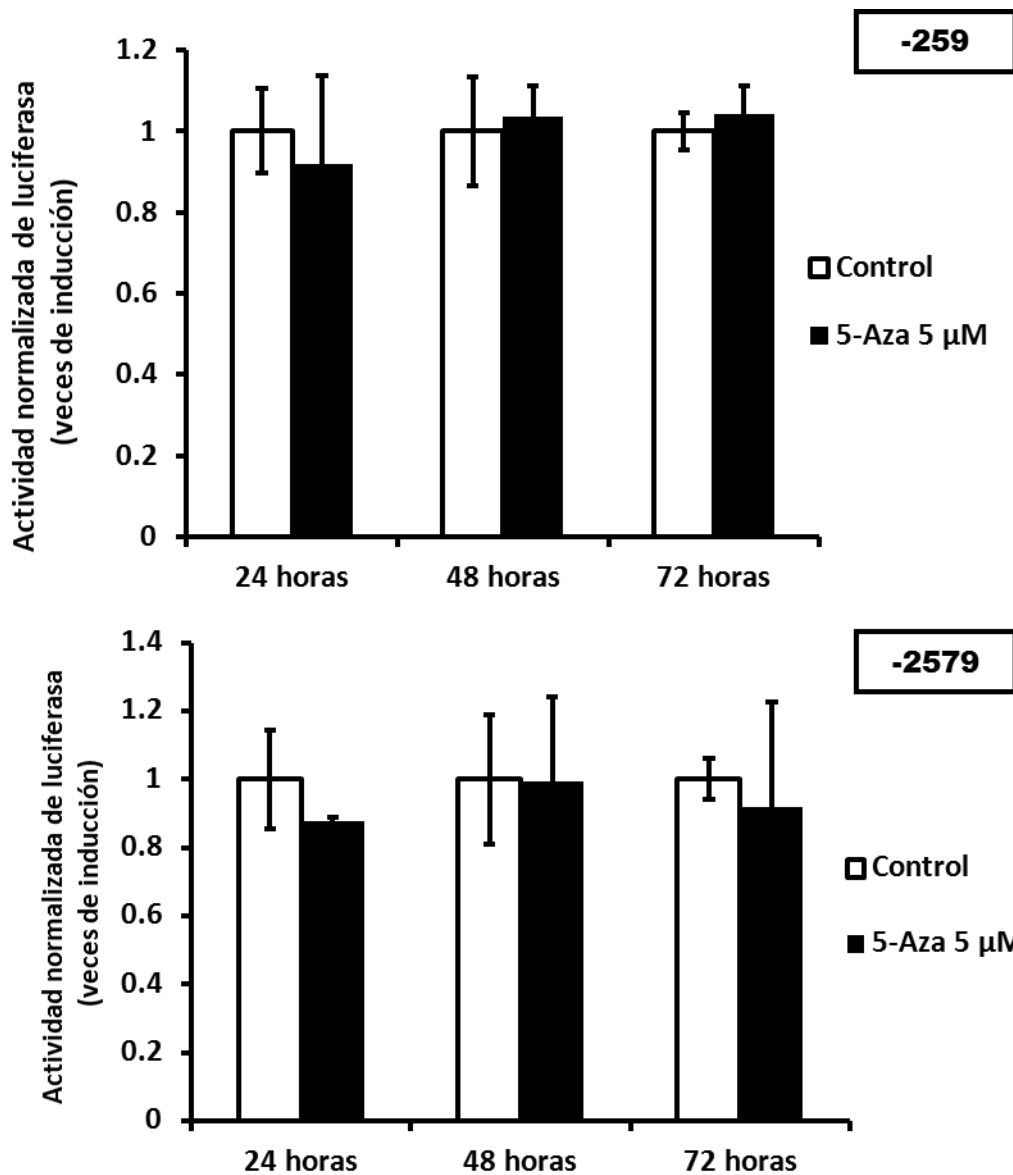


Figura XVII: Respuesta transcripcional a 5-azacitidina de las 2 construcciones de la región proximal del promotor de *ATP2A2*. 48 horas después de haber sido sembradas las células, fueron transfectadas con la construcción correspondiente e inmediatamente después tratadas con 5-azacitidina por los tiempos indicados. Datos +/- error estándar, cambios no significativos.

Los resultados encontrados en los ensayos de abundancia de mensajero y actividad transcripcional concuerdan con lo encontrado por Kao et al. (2009), ya que en dicho estudio se reportó que la hiper-metilación del promotor de *ATP2A2*

disminuye la expresión del gen en una línea celular de cardiomiocitos atriales de ratón mientras que en el presente estudio se encontró que la hipo-metilación provocada por el uso de la 5-azacitidina induce la expresión de *ATP2A2* en cardiomiocitos de rata neonata.

7.4 Efecto de la Mitramicina

Para investigar el papel de los elementos Sp1 en la regulación de la transcripción del gen *ATP2A2* se usó el fármaco mitramicina. La mitramicina se une a regiones de ADN ricas en secuencias G+C (Van Dyke y Devan. 1983) como son los elementos de unión a los factores de transcripción Sp1 y Egr-1 que se encuentran en el promotor proximal del gen. La medición de la abundancia relativa del ARNm para *SERCA2a* en cultivos tratados con mitramicina mostró que la expresión del gen se veía disminuida en aproximadamente 50% y que este efecto era prácticamente el mismo usando concentraciones de 10, 50, 100 ó 200 nM. Por esta razón y dado que la transcripción de una gran cantidad de genes puede verse afectada por la mitramicina, se midió la viabilidad celular en los cultivos sometidos al tratamiento farmacológico (Figura XVIII) para descartar que los niveles observados de actividad transcripcional fuesen debidos a efectos citotóxicos. Se encontró que la viabilidad celular no se veía comprometida a ninguna de las concentraciones ensayadas, por lo que se procedió a explorar la actividad transcripcional en respuesta a la concentración más alta de mitramicina. La actividad transcripcional de ambas construcciones del promotor de *ATP2A2* fue disminuida en un 65% cuando el cultivo fue expuesto a mitramicina 200 nM por 12 h (Figura XIX). Estos resultados reflejan la importancia de las zonas ricas en G y C

en el promotor de *ATP2A2*, ya que al parecer el tratamiento farmacológico evita que factores de transcripción que se unen a secuencias ricas en G y C lleven a cabo la activación del gen. Por ejemplo, Brady y colaboradores en el 2003 reportaron que 3 sitios Sp1 presentes en la región proximal del promotor de *ATP2A2* son necesarios para promover una correcta transcripción, ya que al mutarlos la actividad transcripcional del promotor proximal del gen se veía drásticamente disminuida.

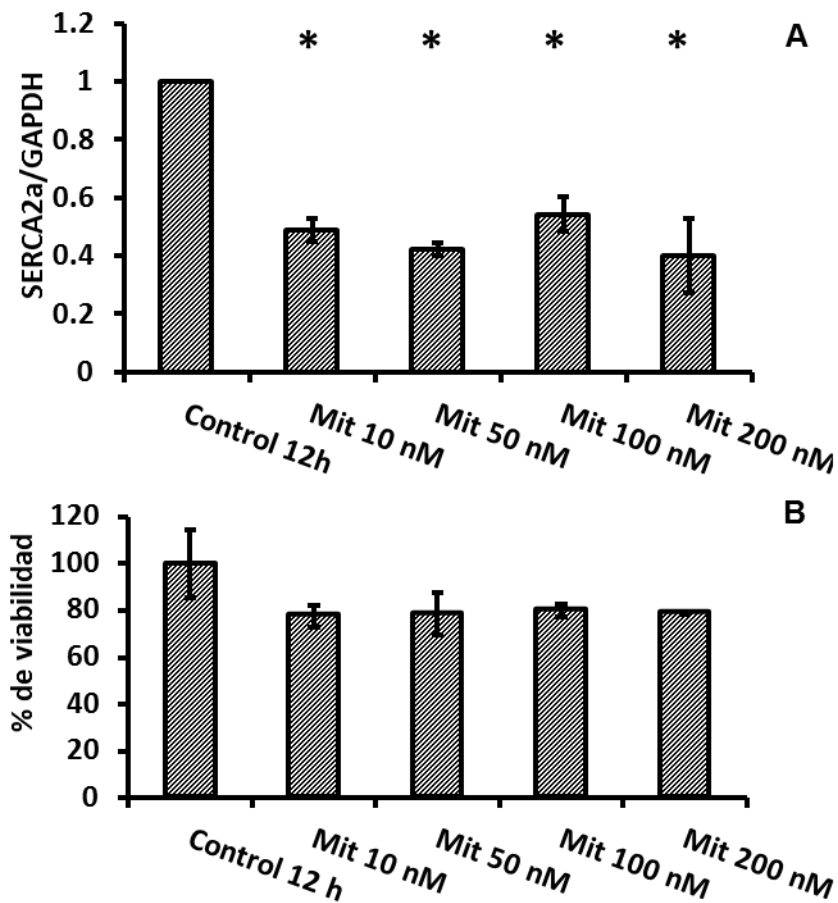


Figura XVIII: A) Curva dosis-respuesta con Mitramicina para la abundancia relativa del ARNm de SERCA2a. Los cardiomiocitos de rata neonata fueron expuestos por 12 horas a las concentraciones indicadas de mitramicina. B) Medición de la viabilidad celular.

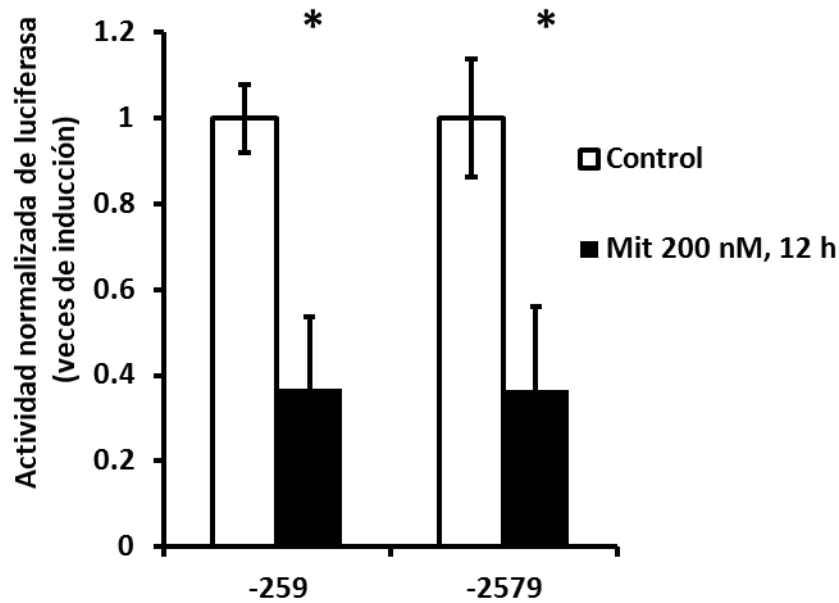


Figura XIX: Respuesta transcripcional a mitramicina de las 2 construcciones de la región proximal del promotor de *ATP2A2*.

8. DISCUSIÓN

Los resultados reportados en el presente trabajo, demuestran que la inhibición de las HDACs tipo I y II promueve la transcripción del gen *ATP2A2*, probablemente favoreciendo un estado relajado de la cromatina de la región del promotor del gen. Sin embargo, los mecanismos exactos no pueden ser contestados en este trabajo, ya que se desconoce si la activación observada con inhibidores de HDACs (iHDACs) es directa sobre el promotor de *ATP2A2* o si el efecto de la inhibición promueve la transcripción de genes que codifiquen para factores de transcripción que activen la transcripción de *ATP2A2*. Se ha demostrado que HDAC4 y HDAC5 interactúan con el factor transcripcional MEF2 para reprimir su transcripción (Berger et al. 2003), por lo que la inhibición de dichas enzimas podría activar la expresión del gen *ATP2A2* de forma indirecta

inhibiendo la represión de MEF2 o activando factores de transcripción cuya función es reprimir la expresión de genes musculares.

Por otro lado, recientemente se reportó que la respuesta a iHDACs en cardiomiocitos está mediada por el factor transcripcional Klf4. En este estudio (Kee and Kook 2009) se propuso que la hipertrofia cardiaca activa HDAC2, la cual es responsable de reprimir al gen de Klf4 que a su vez funciona como un represor de los genes fetales relacionados con el desarrollo de hipertrofia. Dada la gran similitud de Klf4 con los factores de transcripción Sp1, es posible especular que la respuesta que se observa en esta tesis se deba ya sea a la participación de Klf4 como tal o a una función análoga de algún factor Sp1 sobre el promotor del gen *ATP2A2*. Específicamente, la construcción corta del promotor del gen *ATP2A2* usada en los experimentos del presente estudio tiene 4 sitios Sp1 que (además de la posible función recién mencionada) se ha demostrado interaccionan con HDAC1 y HDAC2 (Doetzlhofer, et al. 1999). Dado que en presencia de iHDACs la represión transcripcional por parte de las HDACs se anula, es lógico que se encuentre una mayor actividad transcripcional de la construcción corta como resultado de inhibir la actividad catalítica de estas enzimas que; de otro modo, reprime la transcripción del gen.

La actividad de la construcción larga del promotor del gen (-2579 pb) se vio mayormente inducida por la inhibición de las HDACs, lo que probablemente esté relacionado con los distintos elementos *cis* presentes en dicha construcción y ausentes en la construcción corta que contiene al promotor basal (-259 bp). De hecho, la presencia de sitios de unión para MEF-2 pudiera explicar en parte el aumento en la actividad, puesto que, como ya se mencionó previamente, HDAC4

y HDAC5 interactúan con MEF-2 para reprimir su transcripción y por tanto reprimir su efecto inductor sobre la expresión de *ATP2A2*; es decir, que al inhibir la actividad de las HDACs 4 y 5 se podría estar aumentando la expresión de *ATP2A2* a través de la no-represión de MEF-2a. Por otro lado, la presencia de sitios GATA en la construcción larga indican la represión del gen en condiciones normales, ya que, la construcción corta muestra una actividad aproximadamente 4 veces mayor que la construcción larga en ausencia de tratamientos farmacológicos; sin embargo, como se deduce de los resultados expuestos, la contribución de esta represión a la actividad transcripcional global se ve superada por la inducción posiblemente mediada por los sitios RXR, TRE o Nkx-2.5. De hecho, se ha demostrado que, por ejemplo, el “knock-out” para Nkx-2.5 muestra niveles disminuidos de *SERCA2a* aunados a deficiencias marcadas en el manejo de la homeostasis del calcio, lo que podría estar relacionado con un efecto positivo sobre la regulación del gen *ATP2A2* (Briggs et al. 2008).

La actividad transcripcional observada en las construcciones del promotor para *ATP2A2* alcanza un máximo en tiempos cortos, ya que la inducción observada fue mayor a 24 horas de tratamiento comparada con los ensayos a 48 y 72 horas.

Con las evidencias mencionadas es posible que la respuesta observada en los cardiomiocitos, en respuesta a los inhibidores de HDACs, esté mediada por la acetilación de histonas en el promotor de *ATP2A2* así como por la expresión y/o función alterada de factores de transcripción que regulan la expresión del gen, sin embargo, hacen falta experimentos más detallados que confirmen el modo de acción de los fármacos probados.

Por otro lado, como ya se mencionó, el hecho de que el patrón de expresión en respuesta a los iHDACs se vea dramáticamente modificado como resultado de alterar la concentración del SFB en el medio de cultivo permite pensar en la posibilidad de que algunos factores presentes en el suero estuviesen determinando la respuesta transcripcional que tiene el gen *ATP2A2* en respuesta a la inhibición de las HDACs.

Se ha reportado previamente que la activación de la transcripción del gen *ATP2A2* mediada por hormona tiroidea, puede ser inhibida mediante estimulación α_1 -adrenérgica (Wu, et al. 1997); más aún, en el mismo trabajo se sugirió, mediante la co-transfección de los receptores a hormona tiroidea (THR α) y a ácido retinoico (RXR γ) en cardiomiocitos de rata neonata, que la inhibición (en respuesta a propranolol, un agente β -adrenérgico) de la activación de la expresión de *ATP2A2* inducida por T₃ ocurre incluso con la formación de heterodímeros RXR-THR. Tomando como base lo anterior, puede esperarse que, por ejemplo, la respuesta de la transcripción de *ATP2A2* de un cultivo de cardiomiocitos a un estímulo hipertrófico sea la misma con o sin suero (que contiene entre muchos otros factores, hormona tiroidea y ácido retinoico), como se observa en los resultados del presente trabajo donde los niveles del ARNm para SERCA2a en respuesta al tratamiento con fenilefrina, se vieron disminuidos tanto en cultivos mantenidos con SFB al 10% como en aquéllos con sólo 2%. Sin embargo, la ausencia de T₃ ha sido relacionada con la formación de complejos que reprimen la expresión de *ATP2A2* (Rouf, et. al. 2008). Particularmente se demostró que el co-represor FOG-2 interacciona con THR α para disminuir drásticamente la expresión

de *ATP2A2*, dicho efecto posiblemente mediado por la disminución de p300 que normalmente es reclutado por THR α .

También se han investigado los posibles mecanismos que están involucrados en la transcripción de algunos genes susceptibles a regulación por hormona tiroidea, en particular, Lizcano y colaboradores (2001) estudiaron si la represión ejercida por THR en condiciones hipotiroideas era mediada por la actividad de HDACs y si la inhibición de estas enzimas podía revertir la represión mediada por THR. Se encontró que dependiendo de la línea celular, la transcripción de genes sujetos a regulación por hormona tiroidea podía o no ser afectada por la inhibición de las HDACs, sugiriendo la existencia de mecanismos alternos por los que la ausencia de hormona tiroidea en los medios de cultivo pudiese estar reprimiendo la transcripción de genes.

En cuanto a los mecanismos de acción de la expresión de genes promovida por THR, se reportó que la participación del complejo "Mediator" MED1/TRAP220 es indispensable para que T₃ promueva la transcripción del gen *Crabp1* en fibroblastos embrionarios de ratón y en células P19. En dicho estudio se demostró que en el promotor del gen *Crabp1*, un sitio TRE ubicado 1 kb por arriba del sitio de inicio de la transcripción une a THR y que éste interactúa con un factor Sp1 unido en el promotor basal, siendo el complejo MED1/TRAP220 (subunidad del complejo co-activador general de la transcripción "Mediator") indispensable para dicha interacción (Park, et al. 2005).

Estos datos podrían explicar, al menos en parte, la ausencia de una respuesta transcripcional alta en cardiomiocitos cultivados en condiciones de bajo suero, ya que la ausencia de T₃ en el medio de cultivo podría evitar que aún sin la

actividad enzimática de las HDACs se promoviera normalmente la transcripción del gen. Particularmente el hecho de que se haya reportado la participación conjunta de THR y Sp1 en la inducción de la expresión de ciertos genes, podría tener un importante significado en la transcripción de *ATP2A2*, ya que como se mencionó previamente, los sitios Sp1 en el promotor basal son indispensables para la correcta transcripción del gen y la existencia de sitios TRE en el promotor podrían mediar este tipo de inducción para *ATP2A2*.

Dado que múltiples investigaciones (Sowa, et al. 1997; Doetzlhofer, et al. 1999 y Yang, et al. 2001) han demostrado que el mecanismo por el que los iHDACs usados en este trabajo actúan sobre los niveles de transcripción de varios genes depende en gran medida de la presencia de sitios Sp1 en los promotores de dichos genes, el hecho de que la respuesta transcripcional de *ATP2A2* se vea comprometida en condiciones en las que posiblemente esté involucrado el secuestro de estos factores de transcripción por una maquinaria de represión transcripcional, podría significar que en el modelo usado en el presente estudio la presencia de sitios Sp1 en el promotor basal no sea suficiente para permitir la inducción del gen *ATP2A2* y que también sea necesaria la ausencia de ciertos complejos represores aún no descritos. De hecho, se ha propuesto la hipótesis que el efecto del resveratrol sobre la actividad transcripcional de *ATP2A2* (dicho polifenol evita que la expresión de *ATP2A2* se vea disminuida en modelos animales de cardiomiopatía diabética) tiene que ver con la presencia de sitios para Sp1 y THR en la región del promotor involucrada en la represión que se observa en respuesta a alta glucosa. Incluso se ha insinuado que SIRT1 podría ser el responsable directo, bajo estas condiciones, de modificar factores de transcripción

que alteren los niveles de transcripción de *ATP2A2*. Dado que los niveles de glucosa, la composición del suero e incluso la concentración de ciertos factores de crecimiento y hormonas en el medio de cultivo de los cardiomiocitos pueden representar una alteración en los niveles de transcripción del gen *ATP2A2*, es posible que distintas vías de señalización converjan en la modificación de factores transcripcionales sumamente importantes para la transcripción del gen *ATP2A2*, particularmente que una respuesta a la inhibición de HDACs dependa en gran medida de la presencia de una interacción entre THR y Sp1 para evitar que complejos represores se recluten al promotor del gen, podría representar un mecanismo viable para explicar los resultados observados en el presente trabajo.

En el caso del gen *ATP2A2* es posible que la caja CCAAT presente en el promotor proximal, tenga un papel importante en la regulación por HDACs. Ya se ha demostrado que el factor transcripcional Y (Nuclear Factor Y o NFY), que se une a la caja CCAAT (Dorn, et. al. 1987) presente generalmente en los primeros 100 pb de los promotores de varios genes, es necesario para la transcripción basal de dichos genes. Ejemplos de lo anterior son los genes *MFP-1* y *ThB* del metabolismo de ácidos grasos (Desaints, et. al. 2004) o el gen *TLX3*, cuya expresión basal requiere de la unión de NFY al promotor proximal del gen en varias líneas celulares de leucemia linfocítica aguda de células T (Borghini, et. al. 2006). Se ha propuesto (Vernimmen, et. al. 2007) que la función como activador de la transcripción de NFY podría deberse a su intervención en un complejo que reclutaría la maquinaria necesaria para el inicio de la transcripción, dicha participación potenciada por su capacidad de reclutar acetil-transferasas de histonas como GCN5, P/CAF y p300 (Currie. 1998, Faniello, et. al. 1999). Puesto

que el factor NFY pudiera reclutar acetil transferasas de histonas al promotor de *ATP2A2*, la influencia de la inhibición de HDACs dependería ampliamente de si este factor transcripcional se uniera a la caja CCAAT en el promotor proximal del gen y por tanto de la relajación de cromatina que significaría el reclutamiento de acetil-transferasas de histonas a la región inmediata al sitio de inicio de la transcripción.

Por último, la diferencia observada en la inducción que promovieron el NaB y la TSA cuando el cultivo fue mantenido en medio con suero al 10% refuerza los datos que se tienen acerca de los diferentes mecanismos moleculares parcialmente descritos para ambos fármacos, ya que se mostró en células K562 que tanto el NaB como la TSA inducen la expresión del gen $G\alpha_{i2}$, sin embargo se encontró que la inducción ejercida por el NaB se veía reprimida si se bloqueaba la ruta MEK-ERK, lo cual no ocurría cuando la inducción del gen se llevaba a cabo con TSA (Yang, et. al. 2001). Desde 1998 Cuisset y colaboradores reportaron que posiblemente una fosfatasa de serina-treonina estaría implicada en la vía de señalización que permite al NaB ejercer su efecto sobre la acetilación de histonas, si se toman en cuenta ambos reportes, podría significar que la vía de señalización involucrada en la inducción por NaB no se estimule de igual manera en presencia o ausencia de suero y que ocurra lo contrario para TSA. Dado que el NaB puede promover la acumulación de butiril-CoA y consecuentemente de acetil-CoA, uno de los mecanismos por los que podría promover la transcripción génica es a través de la acetilación no sólo de histonas sino también de factores de transcripción y posiblemente a través del incremento de la afinidad por ADN del factor general de transcripción TFIID, ya que mediante un sistema de transcripción *in vitro* se

encontró que en ausencia de histonas el acetil-CoA disminuye la concentración necesaria de TFIID para observar transcripción (Galasinski, et al. 2000). Aunque se desconoce si esta promoción de la transcripción por parte del acetil-CoA ocurra de igual manera en el contexto normal de la cromatina, podría representar una vía por la cual el NaB una vez metabolizado en la célula podría inducir la transcripción de genes específicos.

En cuanto al efecto de la mitramicina sobre la expresión de *ATP2A2*, se encontró que tanto a nivel de ARNm como de actividad transcripcional disminuye en aproximadamente un 65% la expresión del gen, lo cual podría ayudar a evaluar, aunque de manera parcial, la participación de los sitios Sp1 en la inducción del gen *ATP2A2* provocada por los iHDACs, ya que se podría tratar el cultivo de cardiomiocitos con mitramicina al mismo tiempo que se induce la expresión del gen con los iHDACs para saber si la no-uni3n de Sp1 al promotor evita que los iHDACs ejerzan su efecto inductor.

La expresi3n de un gran n3mero de genes est3 regulada por el estado de metilaci3n del ADN, esta regulaci3n puede conferir niveles de expresi3n tejido-específicos (Douet, et al. 2006) o estar involucrada en el desarrollo de enfermedades como el c3ncer (Lyko y Brown. 2005). La forma en que la metilaci3n del DNA reprime la transcripci3n g3nica es a trav3s de prote3nas de uni3n a dinucle3tidos CpG metilados (prote3nas MDB por las siglas *Methyl CpG Binding Domain*). Dichas prote3nas se unen a islas CpG metiladas, una vez unidas, son capaces de reclutar a HDACs para silenciar las regiones gen3micas afectadas por el estado de metilaci3n del ADN (Wade. 2001). Aunque actualmente

no se entienden todos los mecanismos, por los cuales la metilación del DNA reprime la expresión génica, el descrito anteriormente es el mayormente aceptado.

La unión de factores transcripcionales a regiones ricas en C+G es afectada por la metilación del ADN. Existen varios reportes (Peteranne, et al. 1993; Douet, et al. 2006 y López-Serra, et al. 2006) en los que la unión del factor transcripcional Sp1 a sus secuencias blanco, es inhibida por la metilación de dinucleótidos CpG. Aunque se ha investigado la influencia de la metilación del ADN en varias enfermedades como SIDA y cáncer, poco se sabe respecto a su papel en las enfermedades cardiacas.

Los efectos de la 5-azacitidina sobre la expresión del gen *ATP2A2* en cardiomiocitos, sugieren fuertemente que el gen tiene un grado de metilación basal que regula su expresión en condiciones normales. En este caso, la activación del gen a través del factor transcripcional Sp1 sería regulada por la metilación del promotor de *ATP2A2*. Podría suceder que la represión generada por el nivel de metilación del gen fuese producto de una regulación epigenética relacionada con la posible respuesta a condiciones patológicas. En dichas condiciones, la desmetilación del gen permitiría una mayor expresión y por tanto contender con cambios en la homeostasis del calcio.

Por otro lado, dado que la hipermetilación del promotor de *ATP2A2* activaría la expresión del gen en forma distinta a como lo hacen los iHDACs, si la 5-azacitidina previniera la baja expresión de *ATP2A2* que provoca la fenilefrina, significaría que el estado de metilación del promotor del gen juega un papel mucho más importante del que hasta ahora se le ha atribuido.

9. CONCLUSIONES

- Los inhibidores de las desacetilasas de histonas aumentaron de manera dosis-dependiente la expresión del ARNm de SERCA2a en cardiomiocitos en cultivo: 2.3 veces para NaB (2 mM), 3.5 veces para TriB (0.5 mM) y 2.5 veces para TSA (50 nM). Los tratamientos no comprometieron la viabilidad celular de los cultivos primarios.
- La actividad transcripcional de la construcción pGL3-hSERCA2p-259 se incrementó hasta en 3.5 veces por la TSA (50 nM) mientras que la actividad de pGL3-hSERCA2p-2579 aumentó hasta 8 veces después de 24 h de tratamiento.
- La presencia de SFB en el medio de cultivo fue determinante tanto para la respuesta de la actividad transcripcional de las dos construcciones pGL3-hSERCA2-Luc, así como para la abundancia del ARNm de SERCA2a.
- La reducción en los niveles de ARNm de SERCA2a que provoca la fenilefrina fue casi totalmente prevenida por los iHDACs sólo en medio suplementado con SFB al 10 %.
- La respuesta que produce la tricostatina A en distintas concentraciones de suero en el medio de cultivo, es distinta a la que produce el butirato de sodio.
- La 5-azacitidina parece inhibir la represión del gen *ATP2A2* a través de la hipometilación de su promotor sin afectar la viabilidad celular.

- La mitramicina reprime la expresión de *ATP2A2* tanto a nivel de la abundancia del ARNm como de la actividad transcripcional de ambas construcciones pGL3-hSERCA2-Luc sin afectar la viabilidad celular.

10. PERSPECTIVAS

Para responder a la pregunta de si efectivamente existen complejos represores en el promotor de *ATP2A2* bajo las condiciones del presente trabajo, sería conveniente realizar inmunoprecipitaciones de Sp1 y en dichos inmunoprecipitados buscar la presencia de HDAC1, HDAC4, HDAC5, NFY, p300, THR e incluso de MED1/TRAP220 o FOG-2 para tratar de explicar el comportamiento de la actividad transcripcional del gen *ATP2A2* observada.

Para corroborar que los efectos observados sobre el gen *ATP2A2* se deban a la hiper-acetilación de histonas, sería conveniente llevar a cabo ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) para medir el estado de acetilación de histonas en la región del promotor de *ATP2A2* en cardiomiocitos normales e hipertróficos, comprobar la funcionalidad de los sitios de unión a varios factores de transcripción importantes, así como tratar de identificar con las distintas construcciones del promotor de *ATP2A2* disponibles, las regiones que están relacionadas directamente con la activación observada.

11. REFERENCIAS

1. Antos CL, McKinsey TA, Dreitz M, Hollingsworth LM, Zhang C-L, Schreiber K, Rindt H, Gorczynski RJ, Olson EN. 2003. Dose-dependent blockade to cardiomyocyte hypertrophy by histone deacetylase inhibitors. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 28930–28937.
2. Backs J, Backs T, Bezprozvannaya S, McKinsey TA, Olson EN. 2008. Histone deacetylase 5 acquires calcium/calmodulin-dependent kinase II responsiveness by oligomerization with histone deacetylase 4. *Molecular and cellular biology* 28: 3437-3445.
3. Bártoová Eva, Krejčí Jana, Harnicarová Andrea, Galiová Gabriela, Kozubek Stanislav. 2008. Histone modifications and nuclear architecture: a review. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 56: 711-721.
4. Beard Nicole A, Sakowska Magdalena M, Dulhunty Angela F, Laver Derek R. 2002. Calsequestrin Is an Inhibitor of Skeletal Muscle Ryanodine Receptor Calcium Release Channels. *Biophysical Journal* 82: 310-320.
5. Behr D., J. Wu, S. Cumine, K. W. Kim, S. Lu, L. Atangan, and M. Wang. 2009. Resveratrol is not a direct activator of SIRT1 enzyme activity. *Chemical biology & drug design* 74:619-624.
6. Berger I, Bieniossek C, Schaffitzel C, Hassler M, Santelli E, Richmond TJ. 2003. Direct interaction of Ca²⁺/calmodulin inhibits histone deacetylase 5 repressor core binding to myocyte enhancer factor 2. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 17625-17635.
7. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick L. 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Molecular cell biology* 4: 517-529.
8. Boffa L C, Gruss R J, Allfrey V G. 1981. Manifold effects of sodium butyrate on nuclear function. *The Journal of biological chemistry* 256: 9612-9621.
9. Borghini S., M. Vargiolu, M. Di Duca, R. Ravazzolo, and I. Ceccherini. 2006. Nuclear factor Y drives basal transcription of the human TLX3, a gene overexpressed in T-cell acute lymphocytic leukemia. *Molecular cancer research* 4:635-643.
10. Borra M. T., B. C. Smith, and J. M. Denu. 2005. Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol. *The Journal of biological chemistry* 280:17187-17195.
11. Brady, M., M. U. Koban, et al. (2003). "Sp1 and Sp3 transcription factors are required for trans-activation of the human SERCA2 promoter in cardiomyocytes." *Cardiovascular Research* 60: 347-354.
12. Briggs LE, et al. 2008. Perinatal Loss of Nkx2-5 Results in Rapid Conduction and Contraction Defects. *Circulation Research* 103: 580-590.
13. Chandrasekaran Sangeetha, Peterson Richard E, Mani Santhosh K, Addy Benjamin, Buchholz Avery L, Xu Lin, Thiyagarajan Thirumagal, Kasiganesan Harinath, Kern Christine B, Menick Donald R. 2009. Histone deacetylases facilitate sodium/calcium exchanger up-regulation in adult cardiomyocytes. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23: 3851-3864.
14. Chang S, McKinsey TA, Zhang CL, Richardson JA, Hill JA, Olson EN. 2004. Histone Deacetylases 5 and 9 Govern Responsiveness of the Heart to a Subset of Stress Signals and Play Redundant Roles in Heart Development. *Molecular and cellular biology* 24: 8467–8476.

15. Cuisset L., L. Tichonicky, and M. Delpech. 1998. A protein phosphatase is involved in the inhibition of histone deacetylation by sodium butyrate. *Biochemical and biophysical research communications* 246:760-764.
16. Desaint S., F. Hansmannel, M.-C. Clémencet, C. Le Jossic-Corcous, V. Nicolas-Frances, N. Latruffe, and M. Cherkaoui-Malki. 2004. NFY interacts with the promoter region of two genes involved in the rat peroxisomal fatty acid beta-oxidation: the multifunctional protein type 1 and the 3-ketoacyl-CoA B thiolase. *Lipids in health and disease* 3:4-12.
17. Doetzlhofer a., H. Rotheneder, G. Lagger, M. Koranda, V. Kurtev, G. Brosch, E. Wintersberger, and C. Seiser. 1999. Histone deacetylase 1 can repress transcription by binding to Sp1. *Molecular and cellular biology* 19:5504-5511.
18. Douet V., M. B. Heller, and O. Le Saux. 2007. DNA methylation and Sp1 binding determine the tissue-specific transcriptional activity of the mouse Abcc6 promoter. *Biochemical and biophysical research communications* 354:66-71.
19. Dorn A., Bollekens J., Staub A., Benoist C. y Mathis D. 1987. A multiplicity of CCAAT box-binding proteins. *Cell* 50: 863-872.
20. Faniello M. C., M. a Bevilacqua, G. Condorelli, B. de Crombrughe, S. N. Maity, V. E. Avvedimento, F. Cimino, and F. Costanzo. 1999. The B subunit of the CAAT-binding factor NFY binds the central segment of the Co-activator p300. *The Journal of biological chemistry* 274:7623-7626.
21. Galasinski S. K., T. N. Lively, a. Grebe De Barron, and J. a. Goodrich. 2000. Acetyl coenzyme A stimulates RNA polymerase II transcription and promoter binding by transcription factor IID in the absence of histones. *Molecular and cellular biology* 20:1923-1930.
22. Granger A, Abdullah I, Huebner F, Stout A, Wang T, Huebner T, Epstein JA, Gruber PJ. 2008. Histone deacetylase inhibition reduces myocardial ischemia-reperfusion injury in mice. *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22: 3549-3560.
23. Gusterson R. J., E. Jazrawi, I. M. Adcock, and D. S. Latchman. 2003. The transcriptional co-activators CREB-binding protein (CBP) and p300 play a critical role in cardiac hypertrophy that is dependent on their histone acetyltransferase activity. *The Journal of biological chemistry* 278:6838-6847.
24. Kaerberlein M., T. McDonagh, B. Heltweg, J. Hixon, E. a. Westman, S. D. Caldwell, A. Napper, R. Curtis, P. S. DiStefano, S. Fields, A. Bedalov, and B. K. Kennedy. 2005. Substrate-specific activation of sirtuins by resveratrol. *The Journal of biological chemistry* 280:17038-17045.
25. Kaneda R, Ueno S, Yamashita Y, Choi YL, Koinuma K, Takada S, Wada T, Shimada K, Mano H. 2005. Genome-Wide Screening for Target Regions of Histone Deacetylases in Cardiomyocytes. *Circulation Research* 97: 210-218.
26. Kao Y-H, Chen Y-C, Cheng C-C, Lee T-I, Chen Y-J, Chen S-A. 2009. Tumor necrosis factor- α decreases sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase expressions via the promoter methylation in cardiomyocytes. *Critical Care Medicine* 38: 1-6.
27. Kee HJ, Kook H. 2009. Krüppel-like factor 4 mediates histone deacetylase inhibitor-induced prevention of cardiac hypertrophy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 47: 770–780.
28. Lizcano F., N. Koibuchi, H. Fukuda, F. Dangond, and W. W. Chin. 2001. Cell type-specific roles of histone deacetylase in TR ligand-independent transcriptional repression. *Molecular and cellular endocrinology* 172:13-20.
29. López-Serra L., E. Ballestar, M. F. Fraga, M. Alaminos, F. Setien, and M. Esteller. 2006. A profile of methyl-CpG binding domain protein occupancy of

- hypermethylated promoter CpG islands of tumor suppressor genes in human cancer. *Cancer research* 66:8342-8346.
30. Martonosi AN, Pikula S. 2003. The structure of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Acta Biochimica Polonica* 50: 337-365
 31. Münch G, Bölck B, Karczewski P, Schwinger. RHG. 2002. Evidence for Calcineurin-mediated Regulation of SERCA 2a Activity in Human Myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 34: 321-334.
 32. Nakamura T. Y., Y. Iwata, Y. Arai, K. Komamura, and S. Wakabayashi. 2008. Activation of Na⁺/H⁺ exchanger 1 is sufficient to generate Ca²⁺ signals that induce cardiac hypertrophy and heart failure. *Circulation research* 103:891-899.
 33. Nebbioso A, et al. 2009. Selective class II HDACi impairs myogenesis by modulating stability and activity of HDAC-MEF2 complexes. *EMBO reports* 10: 776–782.
 34. Olaharski A. J., Z. Ji, J. Woo, S. Lim, A. E. Hubbard, L. Zhang, and M. T. Smith. 2006. The histone deacetylase inhibitor trichostatin A has genotoxic effects in human lymphoblasts in vitro. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology* 93:341-347.
 35. Pandya K., H. Kim, and O. Smithies. 2006. Fibrosis , not cell size , delineates β-myosin heavy chain reexpression during cardiac hypertrophy and normal aging in vivo. *PNAS* 103:16864–16869.
 36. Park S. W., G. Li, Y. Lin, M. J. Barrero, K. Ge, R. G. Roeder, and L. Wei. 2005. Thyroid hormone-induced juxtaposition of regulatory elements/factors and chromatin remodeling of Crabp1 dependent on MED1/TRAP220. *Molecular cell* 19:643-653.
 37. Peteranne Joel, Wei Shao and Karen Pratt. 1993. A nuclear protein with enhanced binding to methylated Sp1 sites in the AIDS virus promoter. *Nucleic Acids Research* 21 (24): 5786-5793.
 38. Pfaffl M. W. . 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 29:e45.
 39. Prasad AM, Ma H, Sumbilla C, Lee DI, Klein MG, Inesi G. 2007. Phenylephrine hypertrophy, Ca²⁺-ATPase (SERCA2), and Ca²⁺ signaling in neonatal rat cardiac myocytes. *AJP Cell Physiology* 292: C2269-C2275.
 40. Prasad A. M., and G. Inesi. 2009. Effects of thapsigargin and phenylephrine on calcineurin and protein kinase C signaling functions in cardiac myocytes. *AJP Cell Physiology* 296: 992-1002.
 41. Rajan S., S. S. Williams, G. Jagatheesan, R. P. Ahmed, G. Fuller-Bicer, A. Schwartz, B. J. Aronow, and D. F. Wieczorek. 2006. Microarray analysis of gene expression during early stages of mild and severe cardiac hypertrophy. *Physiological genomics* 27:309-317.
 42. Rouf R., S. Greytak, E. C. Wooten, J. Wu, J. Boltax, M. Picard, E. C. Svensson, W. H. Dillmann, R. D. Patten, and G. S. Huggins. 2008. Increased FOG-2 in failing myocardium disrupts thyroid hormone-dependent SERCA2 gene transcription. *Circulation research* 103:493-501.
 43. Simpson P, McGrath A, Savion S. 1982. Myocyte hypertrophy in neonatal rat heart cultures and its regulation by serum and by catecholamines. *Cardiovascular Research* 51: 787-801.
 44. Sowa Y., T. Orita, S. Minamikawa, K. Nakano, T. Mizuno, H. Nomura, and T. Sakai. 1997. Histone deacetylase inhibitor activates the WAF1/Cip1 gene promoter through the Sp1 sites. *Biochemical and biophysical research communications* 241:142-150.

45. Sulaiman M., M. J. Matta, N. R. Sunderesan, M. P. Gupta, M. Periasamy, and M. Gupta. 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:H833-H843.
46. Takizawa T, Arai M, Tomaru K, Koitabashi N, Baker DL, Periasamy M, Kurabayashi M. 2003. Transcription factor Sp1 regulates SERCA2 gene expression in pressure-overloaded hearts: a study using in vivo direct gene transfer into living myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 35: 777-783.
47. Toyoshima C., M. Nakasako, H. Nomura, and H. Ogawa. 2000. Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* 405:647-655.
48. Michael W. Van Dyke and Peter B. Dervan. 1983. Michael W. Van Dyke and Peter B. Dervan. 1983. Chromomycin, Mithramycin, and Olivomycin Binding Sites on Heterogeneous Deoxyribonucleic Acid. Footprinting with (Methidiumpropyl-EDTA)iron(II). *Biochemistry* 22:2373-2377.
49. Vangheluwe P, Raeymaekers L, Dode L, Wuytack F. 2005. Modulating sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase 2 (SERCA2) activity: Cell biological implications. *Cell calcium* 38: 291-302.
50. Vernimmen D., M. De Gobbi, J. a Sloane-Stanley, W. G. Wood, and D. R. Higgs. 2007. Long-range chromosomal interactions regulate the timing of the transition between poised and active gene expression. *The EMBO journal* 26:2041-2051.
51. Wade P. A. 2001. Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 23:1131-7.
52. Wang Y., X. Wang, L. Liu, and X. Wang. 2009. HDAC inhibitor trichostatin A-inhibited survival of dopaminergic neuronal cells. *Neuroscience letters* 467:212-216.
53. Wu PSC, Moriscot AS, Knowlton KU, Hilal-Dandan R, He H, Dillmann WH. 1997. α₁-Adrenergic stimulation inhibits 3,5,3'-triiodothyronine-induced expression of the rat heart sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ adenosine triphosphatase gene. *Endocrinology* 138: 114-120.
54. Yang J., Y. Kawai, R. W. Hanson, and I. J. Arinze. 2001. Sodium butyrate induces transcription from the Gai2 gene promoter through multiple Sp1 sites in the promoter and by activating the MEK-ERK signal transduction pathway. *The Journal of biological chemistry* 276:25742-25752.
55. Zarain-Herzberg Á. 2006. Regulation of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase expression in the hypertrophic and failing heart. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 84: 509-521
56. Zarain-Herzberg A, Alvarez-Fernández G. 2002. Sarco(endo)plasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase-2 Gene: Structure and Transcriptional Regulation of the Human Gene. *The Scientific World JOURNAL* 2: 1469-1483.
57. Zarain-Herzberg A., J. Marques, D. Sukovich, and M. Periasamy. 1994. Thyroid hormone receptor modulates the expression of the rabbit cardiac sarco (endo) plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase gene. *The Journal of biological chemistry* 269:1460-1467.