



Cinvestav

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**Actividad y expresión de la bomba SERCA2a en
hipertrigliceridemia inducida por un alto consumo de sacarosa en un
modelo de desnutrición pre y postnatal**

T E S I S

Que presenta el

LN. Carlos Cruz Cortés

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

En la especialidad de **BIOQUÍMICA**

Directora de tesis: Dra. Angélica Rueda y Sánchez de la Vega

Ciudad de México

Agosto, 2016

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Bioquímica Cardiovascular del Departamento de Bioquímica del CINVESTAV IPN, bajo la dirección de la Dra. Angélica Rueda y Sánchez de la Vega y con el apoyo técnico de la QBP Martha Mercado Morales en los Western Blots y de Juan Carlos García. Durante el desarrollo del mismo, el autor fue becario de CONACYT (No. 336948). Gracias por el generoso apoyo obtenido.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Angélica Rueda por recibirme en su laboratorio desde el servicio social y por su constante orientación y motivación hasta la culminación de este proyecto.

A mi familia: A mi Madre Enriqueta Cortés por su amor y sus oraciones y a mi Padre Carlos Cruz por darme toda la educación y apoyo para lograr mis metas.

A mis hermanas Alma Lilia y Nareli por su amor y su confianza. A mis sobrinos Fer, Mirko, Iremita, Andrés y Narelita por darme tanta alegría. A Francisco Rodríguez por su apoyo y sus consejos. Gracias familia!

Un agradecimiento especial para mi profesora María Eugenia por sus enseñanzas.

Le agradezco a Martha Mercado y a Juan Carlos García su apoyo y su amistad.

A mis asesores el Dr. Ismael Jiménez y Dr. Víctor Calderón por sus consejos y aportaciones en este trabajo.

A Huguet Landa por toda su ayuda, por todas sus palabras de aliento y tanto cariño, muchas gracias.

A mis amigos Sabino y Miguel.

Y a mis compañeros de laboratorio y del departamento de Bioquímica.

ÍNDICE	
ABREVIATURAS	7
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUCCIÓN	10
<i>1.1 La desnutrición gestacional</i>	10
1.1.1. La desnutrición prenatal y su relación con el desarrollo de alteraciones metabólicas en la etapa adulta	10
<i>1.2. Las alteraciones metabólicas y el riesgo cardiovascular</i>	15
1.2.1 La hipertrigliceridemia y su relación con las enfermedades cardiovasculares	15
1.2.2. El Síndrome Metabólico y las enfermedades cardiovasculares	16
1.2.3. Estadísticas de mortalidad por enfermedades cardiovasculares	17
<i>1.3 Conceptos de fisiología cardíaca</i>	17
1.3.1 El acoplamiento excitación-contracción cardíaco	17
1.3.2 La Bomba SERCA del corazón	19
1.3.3 La regulación de la bomba SERCA cardíaca	24
<i>1.4 Patologías relacionadas con la presencia de una bomba SERCA2a disfuncional.</i>	26
2. ANTECEDENTES	28
<i>2.1 Disminución de la actividad de la bomba SERCA en desnutrición gestacional</i>	28
<i>2.2 Actividad de la bomba SERCA2a en dieta alta en sacarosa.</i>	29

3. JUSTIFICACIÓN	32
4. HIPÓTESIS	32
5. OBJETIVO GENERAL	32
6. MATERIALES Y MÉTODOS	33
<i>6.1 Estrategia para generar los grupos experimentales</i>	33
<i>6.2 Estrategia experimental</i>	34
<i>6.3 Determinación de parámetros corporales y séricos de las ratas.</i>	35
<i>6.4 Homogenados de ventrículo izquierdo de corazón</i>	35
6.4.1 Obtención de las muestras de tejido cardiaco	35
6.4.2 Preparación de homogenados de ventrículo izquierdo	35
6.4.3 Cuantificación de proteína	36
<i>6.5 Determinación de la actividad ATPasa de la bomba SERCA2a</i>	37
6.5.1 Curva patrón de fosfatos	39
6.5.2 Determinación de la actividad ATPasa de la bomba SERCA2a a distintas concentraciones de Ca ²⁺	40
<i>6.6 Electroforesis y Western Blot</i>	42
<i>6.7 Análisis de los datos</i>	43
7. RESULTADOS	45
<i>7.1 Modificación en los parámetros corporales como resultado de las diferentes dietas.</i>	45
<i>7.2 Desarrollo de hipertrigliceridemia en los grupos experimentales que recibieron sacarosa en el agua de bebida.</i>	45
<i>7.3 Estandarización de la actividad ATPasa de SERCA2a</i>	46
<i>7.4 Actividad ATPasa a diferentes concentraciones de Ca²⁺ libre</i>	53

7.5 Disminución de la expresión de SERCA2a por efecto de la desnutrición y la dieta alta en sacarosa. 55

8. DISCUSIÓN	58
9. CONCLUSIONES	64
10. PERSPECTIVAS	66
11. REFERENCIAS	67

ABREVIATURAS

ATP	Trifosfato de adenosina
Ca ²⁺	Ión calcio
ECV	Enfermedades Cardiovasculares
DM	Diabetes Mellitus
HbA1c	Hemoglobina glicosilada
HDL	Partículas de lipoproteína de alta densidad
HPA	Hipófisis Pituitaria Adrenal
LDL	Partículas de lipoproteína de baja densidad
P _i	Fosfato inorgánico
PKA	Cinasa de proteínas dependiente de AMPc
PLB	Fosfolamban
RS	Retículo Sarcoplásmico
RyR	Receptor de rianodina
SERCA	Bomba ATPasa de Calcio del Retículo Sarco/Endoplásmico
SM	Síndrome metabólico
TG	Triglicéridos
VI	Ventrículo izquierdo
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

RESUMEN

La vida intrauterina es un periodo crucial para el desarrollo y se ha demostrado que la desnutrición prenatal genera un inadecuado crecimiento fetal que se ha asociado a la presencia de alteraciones metabólicas como hipertrigliceridemia, obesidad, resistencia a la insulina, síndrome metabólico (SM) y Diabetes Mellitus tipo II (DM II); lo que aumenta el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares (ECV) en la etapa adulta.

La bomba ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarco/endoplásmico (bomba SERCA2a), tiene dos funciones principales: la primera es la de disminuir la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) a su nivel basal promoviendo la relajación; la segunda restituir los niveles de Ca^{2+} dentro del depósito intracelular en el retículo sarcoplásmico permitiendo que los cardiomiocitos se encuentren listos para el siguiente ciclo cardiaco por lo que juega un papel preponderante en la contracción y relajación cardiaca. Existen evidencias que indican que la actividad de SERCA2a disminuye en modelos animales de resistencia a la insulina y SM, pero no hay trabajos que hayan evaluado si la condición previa de desnutrición gestacional exacerba las alteraciones observadas en su actividad. En el presente trabajo hemos medido la actividad ATPasa de la bomba SERCA2a mediante una reacción colorimétrica en un modelo de desnutrición pre y postnatal en ratas Wistar machos a las que se les inducen alteraciones metabólicas mediante administración de agua con sacarosa.

Las ratas con desnutrición pre y postnatal (R) y que adicionalmente recibieron agua con sacarosa (R+S) desarrollaron hipertrigliceridemia, alteración reportada como de temprana aparición en el SM inducido por consumo de azúcares, además de indicios de resistencia a la insulina evidenciados por un aumento del 42.9% en los niveles de hemoglobina glicosilada. En cuanto a la actividad ATPasa de SERCA2a esta se encontró disminuida en un 53% en los corazones de ratas R en comparación con ratas control (C); además, se observó una recuperación de la actividad ATPasa de SERCA2a en el grupo R+S con respecto al grupo R. Por otro lado, la expresión proteica de SERCA se encontró disminuida en un 45% en los grupos C+S, R y R+S, por lo que evaluamos los niveles de fosforilación de fosfolamban (PLN-P), encontrando que los niveles de PLN-P se mantuvieron igual en el grupo de C+S respecto al C, sin embargo, encontramos un aumento de 1.7 veces en el grupo de R+S respecto al grupo R. Esto sugiere que la recuperación en la actividad de ATPasa de SERCA en el grupo R+S se debe a una disminución del efecto inhibitor de PLN.

También se evaluó la actividad de la bomba SERCA2a a diferentes concentraciones de Ca^{2+} encontrando su actividad óptima en el rango de concentración de 1 – 10 μM en todos los grupos experimentales.

En conclusión, los cambios en la dieta disminuyen la expresión de la bomba SERCA, y de manera interesante, esto no necesariamente se refleja en una disminución de su actividad enzimática, ya que se encontró una recuperación en la velocidad de reacción inicial en los grupos que recibieron una dieta alta en sacarosa; esto puede explicarse por mecanismos compensatorios como el incremento en la fosforilación de PLN, el principal modulador de la actividad de la bomba SERCA.

ABSTRACT

The intrauterine period is crucial for development. It has been shown that gestational undernourishment produces inadequately fetal growth, and it has been linked to metabolic alterations such as hypertriglyceridemia, obesity, insulin resistance (IR), metabolic syndrome (MS) and type II diabetes mellitus (DM II). These metabolic alterations increase the risk of developing cardiovascular diseases (CVD) in adulthood.

The cardiac Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA2a pump) accomplishes two main functions: firstly, it diminishes the intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) back to its resting levels promoting cardiac relaxation. Secondly, the SERCA pump recovers the Sarcoplasmic Reticulum (SR) Ca^{2+} levels, allowing cardiomyocytes to be ready for the next cardiac cycle. In this regard, SERCA pump has a key role in cardiac contractility and relaxation. Previous data have shown that SERCA2a activity diminishes in experimental models of IR and MS; however, there are no studies that evaluate whether the gestational undernourishment exacerbates the SERCA dysfunction associated with IR and MS even more. In this work we have measured the ATPase activity of the SERCA2a pump via a colorimetric reaction in cardiac homogenates of male *Wistar* rats with pre- and post-natal undernourishment (R) in which metabolic alterations has been also induced by the administration of sucrose in their drinking water (R+S).

Animals with solid food restriction (R) but that have received sucrose in water (R+S) developed hypertriglyceridemia, an early alteration reported in experimental models of sucrose-induced MS. Also R+S animals displayed IR evidenced by an increase of 42.9% in glycated hemoglobin (HbA1c). Regarding to the ATPase activity, it was diminished by 53% in the homogenates of R animals respect to those from animals which received solid food *ad libitum* (C). In addition, the ATPase activity was fully recovered in the R+S group respect to the R group.

On the other hand, SERCA protein expression showed a reduction of 45% in C+S, R and R+S groups thus, we evaluated the phosphorylated levels of the SERCA pump regulator, phospholamban (PLN). PLN-P levels were similar in C+S and C groups: however, PLN-P levels showed an increase of 1.7 fold in the R+S group respect to R group. This suggest that the recovery in SERCA pump activity in the R+S group is due to the decrease of the inhibitory effect of PLN.

We also evaluated the Ca^{2+} dependence of SERCA2a pump hydrolytic activity, finding that its optimal enzymatic activity is in the range of 1-10 μM free Ca^{2+} in all experimental conditions.

In conclusion, dietary changes decreased the expression of the SERCA pump; interestingly, this reduction was not necessarily reflected in a decrease of its enzymatic activity, since a recovery of the initial enzymatic velocities was found in the C+S and R+S groups; this could be explained by a compensatory mechanism such as the increase in PLN-P levels, the main modulator of the SERCA pump activity.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La desnutrición gestacional

La alta prevalencia de desnutrición en los países en vías de desarrollo constituye un importante problema de salud pública, siendo la desnutrición durante el periodo prenatal o gestacional un problema crítico, ya que tiene repercusiones de salud en la edad adulta (Sedaghat *et al.*, 2015).

En la encuesta nacional de nutrición ENSANUT 2012, se evaluaron los niveles de hemoglobina para evidenciar anemia por desnutrición en mujeres en edad reproductiva, y se reportó que el 17.9% de las mujeres embarazadas y el 11.6% de las no embarazadas presentaban anemia. La anemia representa una importante causa de mortalidad materna y perinatal (Ezzati *et al.*, 2002), además de aumentar el riesgo de partos prematuros y bajo peso al nacer (Allen *et al.*, 2001). En la ENSANUT se estimó que en México, el 2.8% de niños menores de 5 años presentaban bajo peso, 13.6% baja talla y 1.6% emaciación. El acceso limitado a alimentos de calidad es una de las razones principales de la desnutrición materno-infantil, no obstante, los hábitos de alimentación inadecuados y el limitado acceso a la información, también pueden contribuir a esta condición.

1.1.1. La desnutrición prenatal y su relación con el desarrollo de alteraciones metabólicas en la etapa adulta

Se ha descrito que la etapa de vida intrauterina y la infancia temprana son periodos críticos en el crecimiento y desarrollo de un individuo, particularmente entre el nacimiento y los 2 años de edad, cuando los requerimientos nutricionales son elevados debido a que el organismo se encuentra en un proceso de rápido crecimiento que involucra la especialización de tejidos para realizar diferentes funciones (Fernandez-Twinn *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2011).

El adecuado desarrollo del organismo depende del aporte energético constante y suficiente que permita cubrir las necesidades nutricias a medida que se lleva el crecimiento y especialización de los tejidos; dicho crecimiento posee un ritmo

controlado característico, el cual puede verse interrumpido si la ingesta de nutrientes es inadecuada. El crecimiento normal y el desarrollo, por lo tanto, se caracterizan por un incremento regulado en el tamaño, la masa y la complejidad de funciones de los tejidos y órganos (Williams *et al.*, 2011).

Por lo anterior, anomalías en el desarrollo durante la vida intrauterina y la niñez temprana, pueden llevar a cambios en el organismo que afecten su función metabólica y fisiológica, incrementando el riesgo de padecer enfermedades crónicas en la edad adulta (Phillips *et al.*, 2006; McMillen y Robinson 2005).

Actualmente existe creciente evidencia epidemiológica que sugiere que la malnutrición durante la vida intrauterina puede predisponer a desarrollar algunos desórdenes metabólicos que se presentan en la vida adulta, como lo son la resistencia a la insulina, el síndrome metabólico (SM) y la Diabetes Mellitus tipo II (DM II), (Valsamakis *et al.*, 2006; Sedaghat *et al.*, 2015); y se han propuesto diversas hipótesis para explicar los cambios fisiológicos involucrados en estos eventos, aunque ninguna se ha corroborado y aceptado plenamente.

En 1962, Neel, propuso la hipótesis del “genotipo ahorrador” (en inglés como “Thrifty Genotype”) para explicar la alta prevalencia de DM II en la población occidental. Neel hipotetizó que algunos genes eran activados para resistir periodos de escasez de alimento, y estos podrían volverse perjudiciales al encontrarse posteriormente en un periodo de abundancia de alimento, lo cual podría explicar la asociación entre desnutrición y el posterior desarrollo de complicaciones metabólicas.

En 1992, Hales y Barker utilizaron el término “fenotipo ahorrador” (Figura 1), el cual deriva de la previa hipótesis del “genotipo ahorrador”, y sugiere que el feto expuesto a una restricción alimentaria adopta dos estrategias para asegurar la supervivencia; la primera es el desvío de nutrientes hacia órganos importantes como el cerebro, preservando así su crecimiento, esto a expensas del poco desarrollo de otros órganos como el páncreas, hígado y músculo; la segunda estrategia, es una reprogramación metabólica que incrementa la eficacia del almacenamiento de nutrientes, de tal manera que el organismo pueda sobrevivir a condiciones post natales de pobre nutrición. En dado caso que el organismo nazca en condiciones donde existe

una nutrición adecuada o sobre nutrición, esta reprogramación resulta conflictiva al generar un organismo más eficaz para reservar energía en forma de grasa, lo cual podría conducir a alteraciones como obesidad, resistencia a la insulina, SM y DM II.

El estudio que realizaron Hales y cols., para introducir esta nueva hipótesis se realizó en Hertfordshire, Inglaterra, y evaluaron de manera prospectiva el peso y la estatura de niños varones, desde el nacimiento hasta cumplido un año de edad; se seleccionaron los individuos que presentaron los pesos y estaturas más bajos, y posteriormente, al cumplir una edad promedio de 64 años se les realizaron estudios de tolerancia a la glucosa y mediciones de parámetros antropométricos. En este estudio se encontró que el 18% de los individuos analizados presentaron alteraciones en las pruebas de tolerancia a la glucosa y el 7% fue diagnosticado con DM II. Los autores propusieron que, considerando que en el ser humano el desarrollo de los islotes de Langerhans ocurre en la vida intrauterina y que la masa de células beta pancreáticas aumenta alrededor de 130 veces entre la semana 12 de gestación y el quinto mes después del nacimiento, la desnutrición durante el periodo gestacional afectaría el desarrollo de las células beta pancreáticas, ocasionando el estado resistencia a la insulina encontrado.

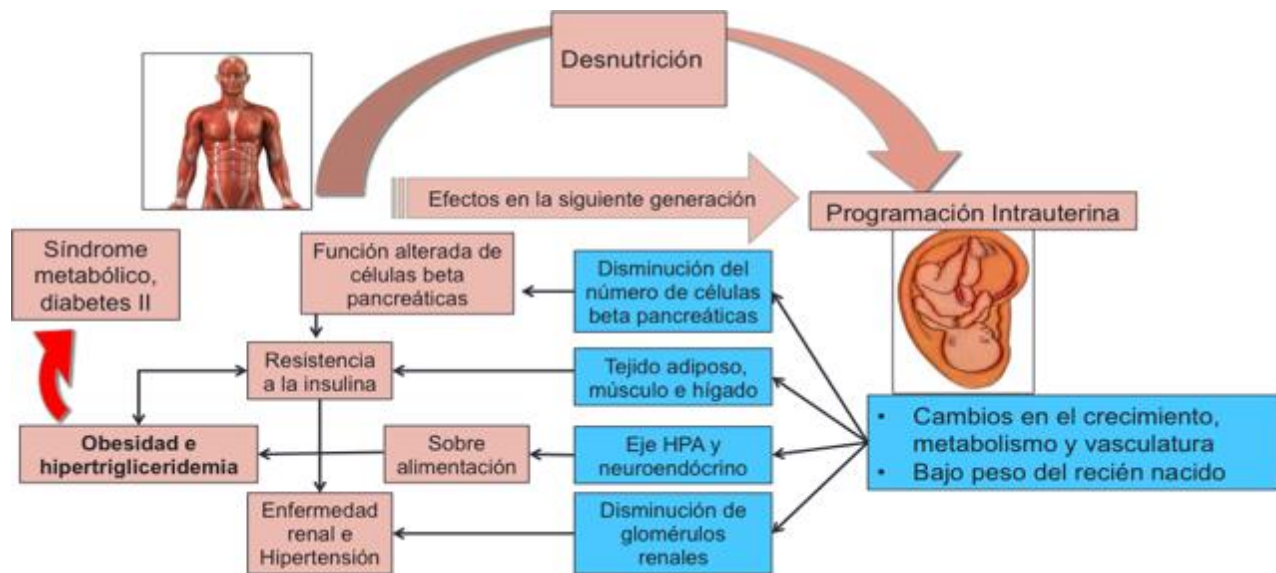


Fig. 1. Hipótesis del Fenotipo ahorrador.

Los efectos de malnutrición durante el periodo gestacional ocasionan una nueva programación intrauterina que provoca cambios irreversibles en el crecimiento y metabolismo del feto que conllevan a desarrollar alteraciones que desencadenan enfermedades en la edad adulta. Adaptado de: Fernandez-Twinn y Ozanne 2006.

Ravelli y colaboradores (1999) estudiaron el impacto de la desnutrición prenatal (en el periodo de la hambruna holandesa) en el desarrollo de obesidad en hombres y mujeres a la edad de 50 años. Para ello, midieron los parámetros antropométricos de 741 personas nacidas en este periodo (noviembre de 1943 a febrero de 1947), quienes estuvieron expuestas a la hambruna durante diferentes etapas de la gestación, y compararon tales resultados con los de personas no expuestas, encontrando que la malnutrición materna durante el periodo de gestación temprana se encuentra asociada con un mayor peso, índice de masa corporal (IMC) y mayor circunferencia de cintura en mujeres a la edad de 50 años. Finalmente, los autores propusieron que el incremento en la frecuencia de obesidad en las personas que padecieron desnutrición durante la gestación temprana se debe a una alteración funcional de los mecanismos regulatorios del sistema central endocrino (Ravelli *et al.*, 1999). El eje Hipófisis pituitario adrenal (HPA) del feto humano se encuentra funcional y bien desarrollado hacia el final de la gestación y es capaz de responder a factores externos, especialmente hipoxia y restricción de nutrientes. Por lo tanto, la presencia de estos factores durante el periodo intrauterino puede iniciar una respuesta al estrés que ocasione una programación

neuroendócrina con efectos a largo plazo en el feto (Phillips *et al.* 2006). Lamentablemente, este tipo de estudios tan detallados no se han realizado en la población mexicana.

Los efectos de la desnutrición gestacional en el desarrollo de enfermedades metabólicas en la etapa adulta también se han observado en modelos animales. Fernandez-Twinn y cols. (2003) emplearon un modelo de ratas sometidas a restricción proteica durante la gestación y lactancia, lo cual ocasionó cambios en los niveles de glucosa, insulina, prolactina, progesterona, estradiol y leptina; las crías de dichas ratas nacieron con un peso y tamaño menores a los controles, y desarrollaron diabetes, hiperinsulinemia y resistencia a la insulina en la etapa adulta (Fernandez-Twinn *et al.*, 2003).

En resumen, la desnutrición en el periodo temprano de gestación seguida de una nutrición adecuada después del nacimiento, se ha vinculado con el desarrollo de obesidad, problema de alta prevalencia en nuestro país (Figura 2. Gutiérrez *et al.*, 2012) y alteraciones metabólicas en la edad adulta. La obesidad, principalmente la acumulación de tejido adiposo en la región abdominal (o grasa central), se encuentra asociada al denominado SM (Björntorp 1993), el cual se ha definido como un conjunto de alteraciones metabólicas que incluyen el estado de resistencia a la insulina, dislipidemia e hipertensión, que incrementan el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares (ECV).

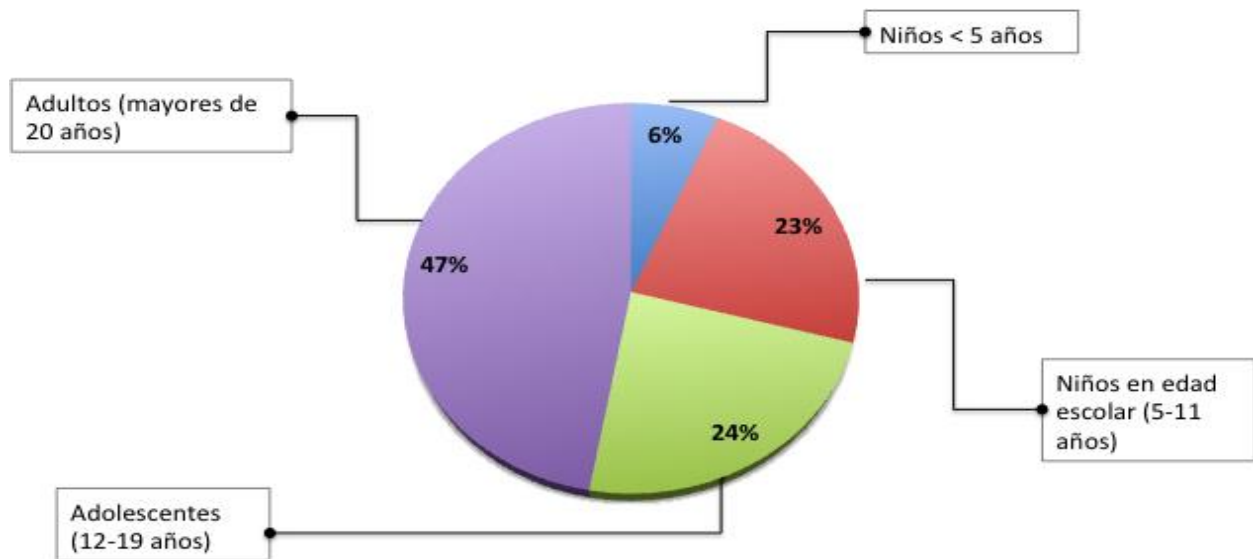


Fig. 2. Porcentajes de prevalencia de obesidad en México.

Grupos etarios afectados por obesidad en México según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012, se considera a la obesidad un problema de salud público. Datos tomados de: Gutiérrez *et al.*, 2012.

1.2. Las alteraciones metabólicas y el riesgo cardiovascular

1.2.1 La hipertrigliceridemia y su relación con las enfermedades cardiovasculares

La hipertrigliceridemia es el desorden lipídico más común en sujetos con SM y se considera un factor de riesgo de pronta aparición en el proceso de desarrollo de dicho síndrome; la hipertrigliceridemia se caracteriza por una elevada concentración en los niveles de triglicéridos (TG) en plasma, asociada a la producción incrementada y/o baja remoción de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), las cuales son ricas en TG. (Liu Y., *et al.*, 2016; Arsenault 2011). Numerosos estudios clínicos y pre clínicos han caracterizado la hipertrigliceridemia como uno de los factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (ECV); de hecho, al conjunto de hipertrigliceridemia, niveles elevados de partículas de colesterol-VLDL y niveles bajos de partículas HDL, se le ha denominado como “triada lipídica aterogénica” (Grundy 1998).

Las guías de la Sociedad Europea de Cardiología ESC (por sus siglas en inglés: European Society of Cardiology) sugieren que niveles de TG >1.7 mmol/L (o >150 mg/dL) incrementan el riesgo de desarrollar otras alteraciones metabólicas. (Reiner *et al.*, 2011). La hipertrigliceridemia comúnmente se presenta acompañada por otros factores de riesgo para desarrollar ECVs, como son: niveles reducidos de partículas de colesterol-HDL, elevados niveles de partículas de colesterol-LDL, obesidad abdominal, glucemia elevada en ayunas y presión sanguínea elevada, factores que conforman el denominado SM. (Grundy *et al.*, 2004; Graham *et al.*, 2012).

1.2.2. El Síndrome Metabólico y las enfermedades cardiovasculares

El SM es un conjunto de desórdenes metabólicos los cuales forman parte de una condición progresiva asociada al desarrollo de DM II y ECVs. Se ha estimado que el SM afecta aproximadamente a un cuarto de la población en países en desarrollo (Alexander *et al.*, 2003). El National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III (NCEP: ATP III) y el grupo Europeo para el estudio de la resistencia a la insulina, han señalado a algunos de estos componentes como: obesidad, (principalmente la que se encuentra en la región central-abdominal), dislipidemia aterogénica (hipertrigliceridemia y niveles reducidos de partículas HDL), y presión sanguínea elevada (Figura 3). Además se ha reportado que cada componente por separado puede ser considerado como un factor de riesgo independiente para el desarrollo de ECV (Grundy 2005).

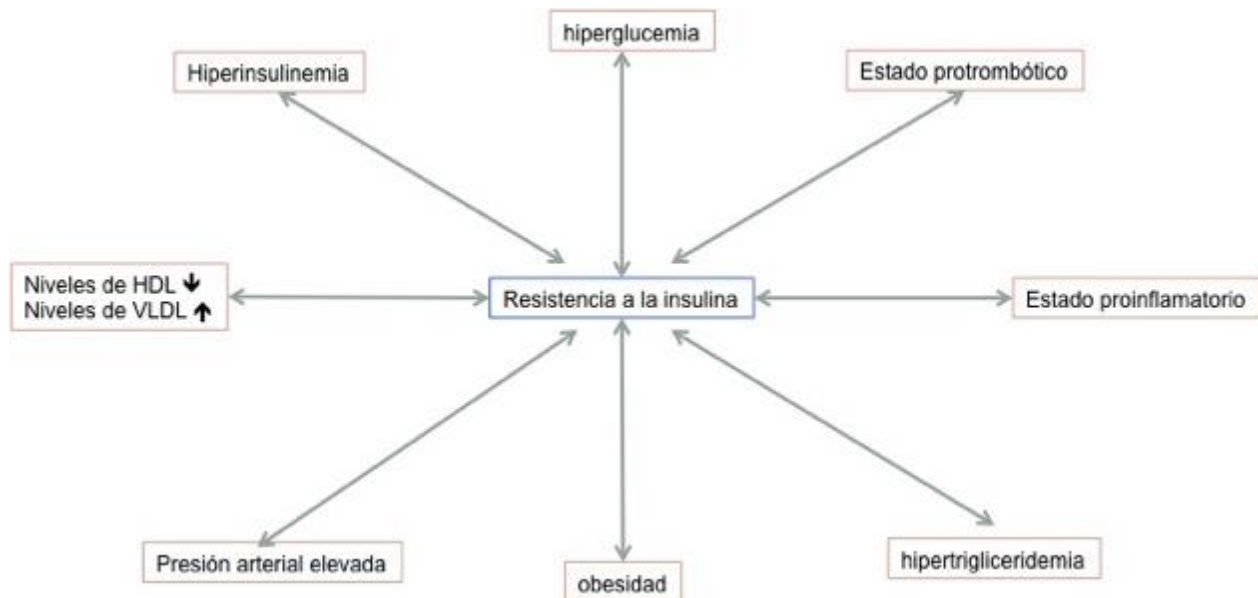


Fig. 3. Conjunto de alteraciones que conforman el SM.

Se considera al estado de resistencia a la insulina como un factor central en el desarrollo del SM. Adaptado de: Reaven G. 1993; Grundy S. *et al.*, 2002.

1.2.3. Estadísticas de mortalidad por enfermedades cardiovasculares

Anualmente mueren más personas por ECV que por ninguna otra causa. Alrededor de 17.5 millones de personas murieron por ECV en el 2012, representando esto un 31% de las muertes en el mundo. (*World Health Organization, 2016*). En México, según datos estadísticos del INEGI en 2013, las dos principales causas de muerte por enfermedad, tanto en hombres como en mujeres, corresponden a enfermedades del corazón y DM representando alrededor de 20% y 15%, respectivamente.

1.3 Conceptos de fisiología cardiaca

1.3.1 El acoplamiento excitación-contracción cardiaco

La contracción muscular es un proceso altamente regulado que depende de la concentración de Ca^{2+} libre en el citoplasma ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) de los cardiomiocitos (Bers 2006). Las fluctuaciones periódicas en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de los cardiomiocitos determinan en gran medida la magnitud y la duración de la fuerza contráctil. La serie de eventos exquisitamente coordinados mediante los cuales el potencial de acción cardiaco genera un aumento global y transitorio en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que alcanza niveles de entre 0.6 a 3 μM en

la sístole y que permite la contracción subsecuente de los miocitos cardiacos se engloban en lo que conocemos como acoplamiento excitación-contracción cardiaco (ECC; Rueda, de Alba y Valdivia 2014. Figura 4).

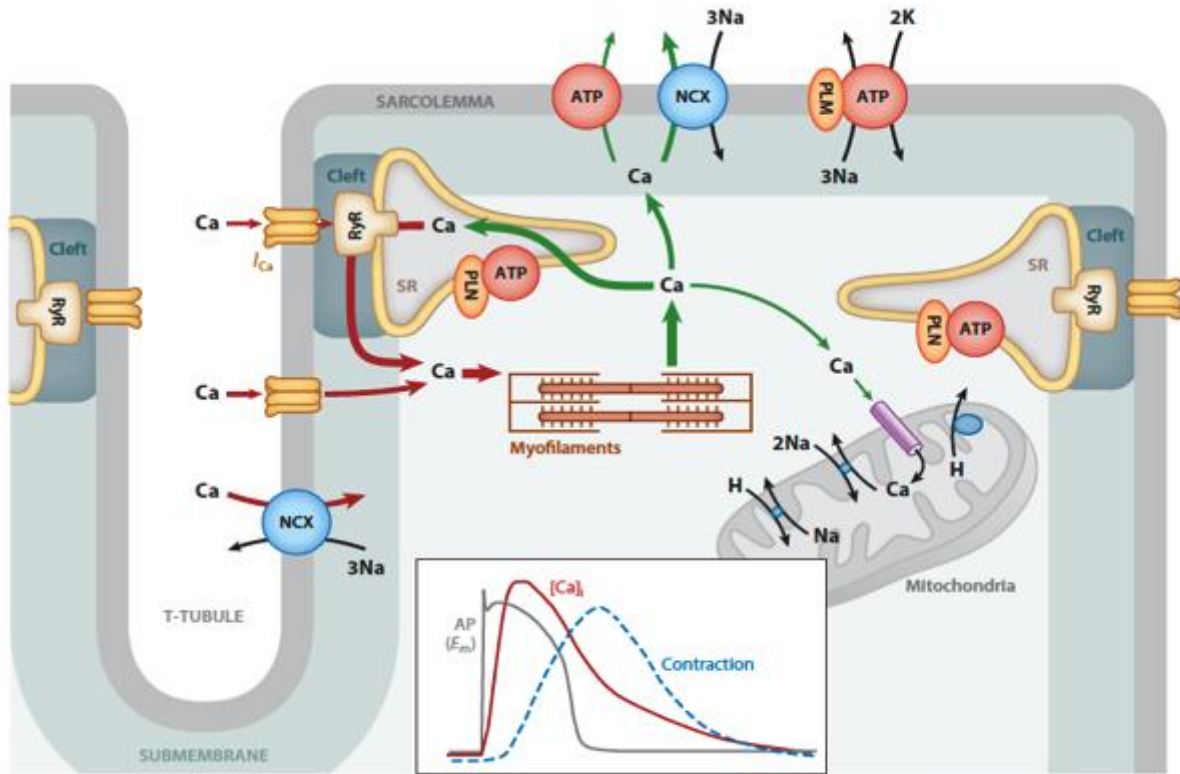


Fig. 4. Esquema del acoplamiento excitación-contracción cardiaco.

La despolarización de la membrana promueve la entrada de Ca^{2+} mediante los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, lo cual es sentido por los Receptores de Rianodina y liberan una mayor cantidad de Ca^{2+} del deposito intracelular RS, este mecanismo se conoce como CICR, la concentración incrementada de Ca^{2+} en el citoplasma promueve la contracción del miocito. Para que la relajación se lleve a cabo, es necesaria la remoción del ión, para esto existen proteínas especializadas, denominadas vías lentas (PMCA, Uniportador mitocondrial), y vías rápidas (bomba SERCA y NCX). RyR: Receptor de rianodina; NCX: Intercambiador Na^+/Ca^{2+} ; PLN: fosfolamban; PLM: fosfoleman (Bers 2014).

El ECC inicia en el miocito cardiaco cuando un potencial de acción activa a los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L en el sarcolema, también denominados receptores a dihidropiridinas (DHPR, por sus siglas en inglés), lo cual permite el influjo de Ca^{2+} a la célula, y el incremento de su concentración en una región muy cercana al retículo sarcoplásmico de unión (RS). Este incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ ocasiona la apertura de los canales de Ca^{2+} del RS denominados receptores de rianodina (RyR) en un

proceso denominado CICR (por sus siglas en inglés Calcium-Induced Calcium Release); estos canales de Ca^{2+} , permiten la salida de una mayor cantidad de Ca^{2+} del interior del RS hacia el citoplasma (alrededor del 20% del total) (Bers 2000), lo cual eleva las concentraciones del ión del rango nanomolar al micromolar; con esto, el Ca^{2+} difunde hacia los miofilamentos y permite la activación de la maquinaria contráctil (Figura 4). La subsecuente relajación se inicia al disociarse el Ca^{2+} de la proteína troponina C; para ello, existen vías lentas y rápidas de remoción del Ca^{2+} citosólico en las cuales participan diversas proteínas que se detallan en la Tabla 1 (Bers 2000).

Tabla 1. Contribución cuantitativa de remoción de Ca^{2+} de los diferentes transportadores intracelulares.

Proteína	Rata	Humano y conejo
Bomba SERCA	≈ 93%	≈ 74%
NCX	≈ 6%	≈ 24%
PMCA	≈ 0.5%	≈ 1%
Uniportador mitocondrial	≈ 0.5%	≈ 1%

NCX: Intercambiador $Na^+ Ca^{2+}$; PMCA: ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática. Adaptado de: Bers (2000)

Cuantitativamente la bomba SERCA es la más importante en la remoción de Ca^{2+} , y se ha descrito que en diversas patologías cardíacas, como la insuficiencia cardíaca, existen alteraciones en el funcionamiento de esta proteína. Actualmente se evalúan diversas estrategias terapéuticas para restaurar la actividad de la bomba SERCA que se expresa en el corazón de los pacientes con insuficiencia cardíaca (Abrar Shareff, Anwel y Poizat 2014; Stammers 2015).

1.3.2 La Bomba SERCA del corazón

La ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarco-endoplásmico (SERCA), es una bomba que lleva a cabo el transporte de Ca^{2+} desde el citoplasma hacia el lumen del RS en contra de su gradiente de concentración (≈1000 veces), mediante gasto energético, con una estequiometría de 2 iones Ca^{2+} transportados por cada molécula de ATP hidrolizada (Frank *et al.*, 2003). La bomba SERCA pertenece a la familia de ATPasas tipo P (que se fosforilan reversiblemente como parte de su ciclo de transporte); entre

éstas se encuentran la ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA), la bomba Na^+/K^+ y la bomba de H^+/K^+ (Brini y Carafoli 2009).

En vertebrados existen 3 genes distintos que codifican para la bomba SERCA: *ATP2A1*, *ATP2A2* y *ATP2A3*. Por splicing alternativo se generan alrededor de 10 isoformas, las cuales son tejido-específicas (Periasamy *et al.* 2007).

Se han descrito dos isoformas de la bomba SERCA1: SERCA1a, la cual se expresa en músculo esquelético rápido en el adulto (994 aa), y SERCA1b, la cual se encuentra en músculo esquelético rápido durante la vida fetal y neonatal (1011 aa) (Brandl *et al.*, 1987).

De entre los tres miembros de la familia de ATPasas de Ca^{2+} del RS que se expresan en mamíferos, SERCA2 es la que se encuentra más ampliamente distribuida en diferentes tejidos y tiene 3 isoformas: 2a, 2b y 2c (Vangheluwe *et al.*, 2005). La bomba SERCA2a (997 aa), se expresa principalmente en tejido cardíaco y músculo esquelético lento, mientras que la bomba SERCA2b (1042 aa) se encuentra en gran variedad de tejidos, por lo que se considera la isoforma ubicua (Lytton *et al.*, 1992); la bomba SERCA2c (999 aa), fue originalmente detectada en líneas celulares epiteliales y endoteliales, pero también se ha reportado en miocitos cardíacos (Gelebart *et al.*, 2003). Las isoformas de SERCA3 se expresan principalmente en células hematopoyéticas y en diversos tejidos no musculares (Periasamy y Kalyanasundaram 2007).

La expresión de las diferentes isoformas de la bomba SERCA, además de ser tejido-específica, varía dependiendo de la etapa del desarrollo en la que se encuentre el organismo, lo que implica que en determinados momentos se expresan en mayor medida unas isoformas que otras, lo cual permite un cambio en el fenotipo y maduración muscular (Periasamy y Kalyanasundaram 2007).

La estructura primaria de las diferentes isoformas de la bomba SERCA se encuentra altamente conservada, debido a esto, todas ellas tienen topologías transmembranales y estructuras terciarias muy similares, difiriendo entre ellas en su extremo carboxilo terminal. La bomba SERCA2a presenta una región carboxilo terminal

(C-terminal) de 4 aa., mientras que la SERCA2b contiene una región C-terminal que está compuesta de 49 aa., de tal modo que el C-terminal de SERCA2a está localizado en el citoplasma y el C-terminal de la SERCA2b se encuentra expuesto hacia el lumen del RS (Campbell, Kessler y Frambrough 1992; Lytton y MacLennan 1988; Vangheluwe *et al.* 2006; Brini y Carafoli 2009). La secuencia en el grupo amino terminal (N-terminal) de todas las bombas SERCA es similar: Met-Glu-X(Ala, Asn, Glu, Asp)-X(Ala, Gly, Ile). (Martonosi y Pikula 2003; Chemaly *et al.* 2013).

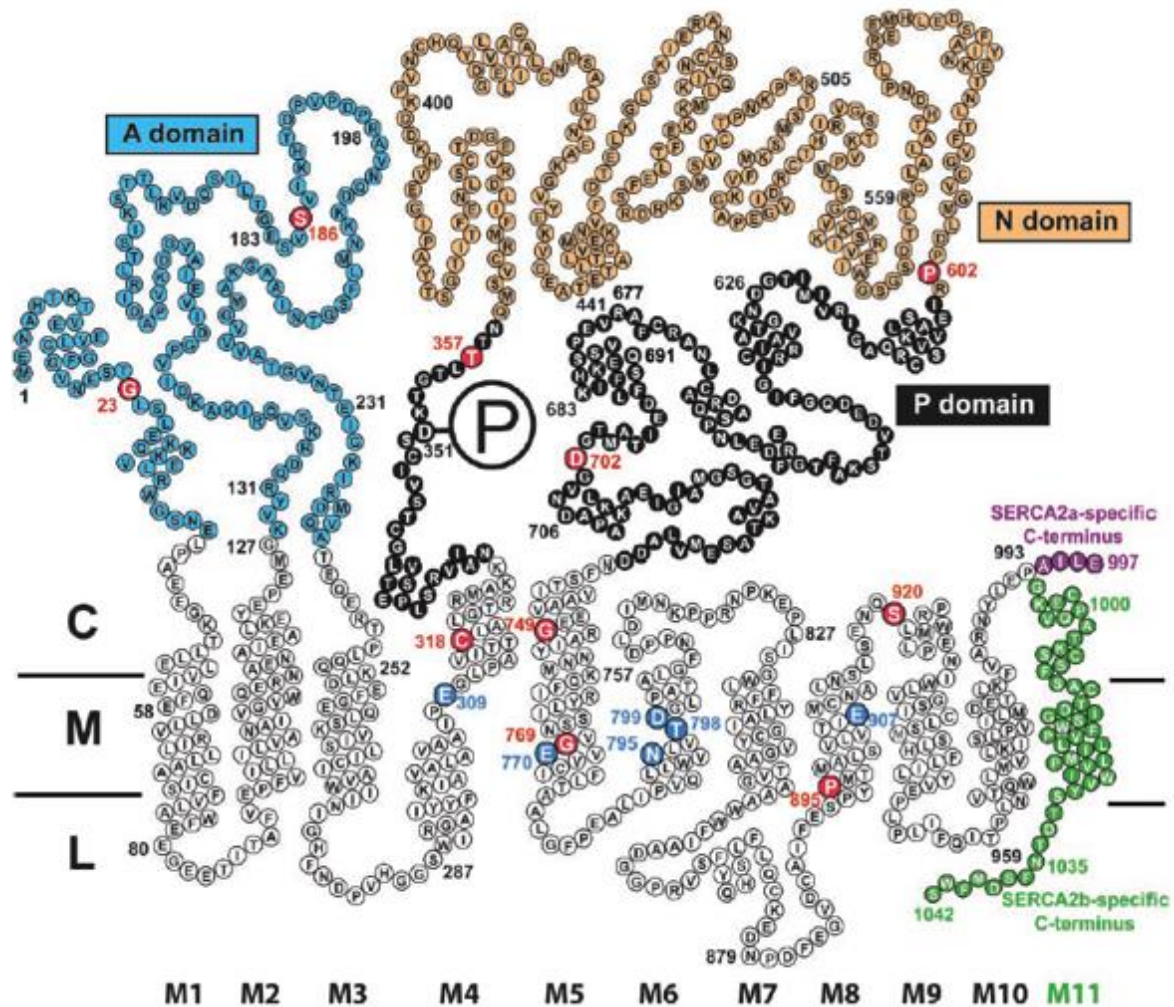


Fig. 5. Representación esquemática de la estructura primaria y de la posible estructura secundaria de la bomba SERCA.

El modelo se basa en la estructura cristalizada de la bomba SERCA1a en la conformación E1-Ca²⁺. Cada círculo representa un aminoácido en código de una letra. M1-M11 representan pasos transmembranales; se resaltan en morado y verde las secuencias del extremo C-terminal en las cuales difieren las isoformas SERCA2a y 2b. Dominio A de acción, dominio P de fosforilación (se indica el residuo fosforilable D³⁵¹), dominio N de unión a nucleótido. C: citosol; M: membrana; L: lumen (Dode 2003).

La SERCA2a es la principal isoforma de la ATPasa de Ca^{2+} de músculo esquelético lento en adulto y de músculo cardiaco, tanto en adulto como en neonatos (Brandl *et al.*, 1987). Es un único polipéptido con una masa molecular de alrededor de 110 kD y se localiza principalmente en la región longitudinal del RS, siendo la proteína más abundante (MacLennan y Holland 1975). El RS es una red de túbulos y cisternas que rodean las miofibrillas del músculo estriado y la membrana de éste puede ser aislada en forma de vesículas a partir de homogenados por centrifugación diferencial; en estas vesículas, la bomba SERCA representa del 60 al 80% del total de proteínas (De Meis y Vianna 1979).

La estructura de la bomba SERCA2a se divide en 3 dominios principales (Figura 5), la cabeza citoplasmática, la región del tallo y el dominio transmembranal; más de la mitad del total de la ATPasa se encuentra expuesta hacia la cara citoplasmática de la membrana del RS, formando así la cabeza citoplasmática. La cabeza contiene 6 subdominios: la región del N-terminal (residuos del 1-40), la región de hebra (131-238), el dominio de fosforilación que contiene el residuo fosforilable aspártico³⁵¹ (328-505), el dominio de unión a nucleótido (505-680), el dominio bisagra (671-738) y la región del C-terminal (902-final). El dominio de fosforilación y el de unión a nucleótido forman el sitio activo donde se realiza la hidrólisis de ATP y se encuentran estrechamente relacionados, estructural y funcionalmente. (Martonosi y Pikula 2003; Toyoshima *et al.*, 2000).

En su ciclo de actividad la bomba SERCA presenta al menos dos estados catalíticos, E1 y E2: en el estado E1 presenta sitios transmembranales de unión a Ca^{2+} de alta afinidad (del rango de ≈ 300 nM a $2 \mu\text{M}$), en cambio en el estado E2, la afinidad por Ca^{2+} se reduce en gran medida (del rango de $\approx 600 \mu\text{M}$ a 1mM), lo que permite la asociación y disociación de Ca^{2+} a través de cambios conformacionales en la estructura de la proteína (De Meis y Vianna 1979; Kobayashi *et al.*, 2015).

Todas las isoformas de SERCA son inhibidas por la tapsigargina, en el rango de concentraciones nanomolares. La Tapsigargina (TG) es un sesquiterpeno lactona que se obtiene de la planta *Thapsia garganica*, la cual se une de manera irreversible a la enzima en el residuo Fenilalanina²⁵⁶ y la estabiliza en una conformación E2 de baja afinidad por Ca^{2+} , disminuyendo así su actividad. (Figura 6) (Rasmussen *et al.* 1978; Thastrup *et al.* 1990; Treiman, Caspersen y Christensen 1998).

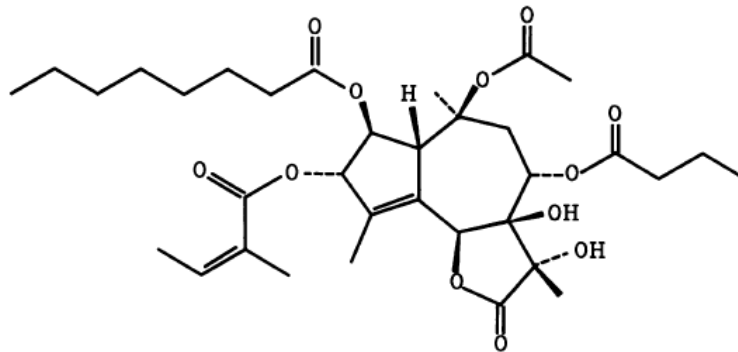


Fig. 6. Estructura de la tapsigargina, un inhibidor de la bomba SERCA.

Thastrup *et al.*, 1990

La tapsigargina inhibe a las isoformas de la bomba SERCA de forma diferencial, siendo 60 veces más potente para SERCA1 que para SERCA3, con las siguientes K_i : 0.2, 1 y 12 nM para SERCA 1, SERCA 2 y SERCA 3, respectivamente. Además es altamente selectivo ya que no inhibe a otras ATPasas como la PMCA ó la SPCA (Secretory Pathway Calcium Atpase) a estas concentraciones tan pequeñas (Michelangeli y East 2011; Brini y Carafoli 2009).

Existen otros compuestos que actúan como inhibidores de la bomba SERCA; algunos de éstos se presentan en la Tabla 2.

Tabla. 2 Lista de compuestos que actúan como inhibidores de la bomba SERCA

Inhibidor	K _i e IC ₅₀	Conformación de SERCA a la que se une
Tapsigargina	0.21 – 12 nM (K _i)	E2
Ácido ciclopiazónico	90 – 2500 nM (K _i)	E2
BHQ, 2,5-di-t-butil-1,4-benzohidroquinona	2 – 7 μM (K _i)	E2
Ortovanadato	10 – 100 μM (K _{0.5})	E2
Mastoparan	1 μM (K _i)	E1
Curcumina	7 – 15 μM (IC ₅₀)	E1
2APB, 2-aminoetoxidifenil borato	70 – 700 μM (IC ₅₀)	E1
Rapamicina	77 μM (IC ₅₀)	E1

Michelangeli y East 2011

1.3.3 La regulación de la bomba SERCA cardiaca

La actividad de la bomba SERCA2a es regulada por otras proteínas; entre éstas, fosfolamban (PLN) se considera el principal modulador. PLN es una proteína de bajo peso molecular (6080 Da) constituida por 52 aa. PLN ejerce un efecto inhibitorio sobre la bomba SERCA2a y su fosforilación por ciertas cinasas, resulta en la remoción de PLN de la bomba SERCA reduciendo su efecto inhibitorio, y por lo tanto promueve la actividad de la bomba. Cuando la [Ca²⁺]_i es baja, PLN interactúa con la bomba SERCA2a y disminuye su afinidad por Ca²⁺ (Periasamy, Bhupathy y Babu 2008). Por otro lado, cuando la [Ca²⁺]_i es elevada, la afinidad de la bomba SERCA por el ión aumenta debido a la activación de la proteína cinasa dependiente de Ca²⁺ y calmodulina (CaMKII) que fosforila a PLN en residuos de serina/treonina. CaMKII fosforila a PLN en el residuo de treonina¹⁷ (Bhupathy, Babu y Periasamy 2007). Otro mecanismo de regulación de PLN ocurre en respuesta a la estimulación β-adrenérgica y la activación de la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) (Tsien 1977; Levitski 1988), la cual fosforila a PLN en el residuo de serina¹⁶, lo cual retira el efecto inhibitorio sobre la bomba SERCA2a y aumenta la actividad de contracción y relajación del músculo cardiaco (Koss *et al.*, 1995; MacLennan y Kranias 2003). La fosforilación de PLN en serina¹⁶ por PKA ó en treonina¹⁷ por CaMKII incrementa la actividad de

SERCA2a de 2 a 3 veces, incrementando la velocidad de relajación (Koss *et al.*, 1995; MacLennan y Kranias 2003).

PLN se expresa de manera tejido dependiente y su expresión puede variar en estados de enfermedad crónica. En murinos, PLN se expresa alrededor de 3 veces más en ventrículo que en aurícula (MacLennan, Asahi y Tupling 2003), lo que sugiere que existe una regulación de Ca^{2+} específica en cada compartimento del corazón (Koss *et al.* 1995); lo anterior también se ha descrito en tejido de corazón humano, en donde la expresión de PLN está reducida en un 44% en las aurículas comparada con los ventrículos (Bokník *et al.* 1999). PLN se encuentra en equilibrio dinámico entre el estado de monómero y oligómero; en forma de monómero interactúa con SERCA2a e inhibe su actividad, mientras que la forma fosforilada de PLN tiende a formar pentámeros debido al cambio en el punto isoeléctrico de la proteína de 10 a 6.7; se ha sugerido que, estos oligómeros, son la forma inactiva de PLN (Figura 7)(Kranias *et al.*, 2012).

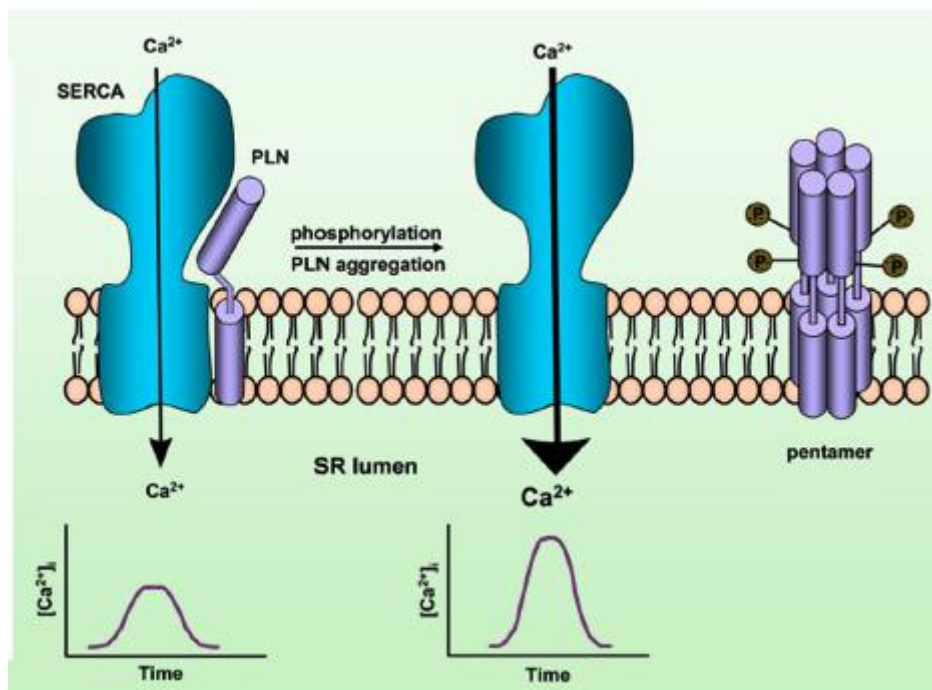


Fig. 7 Interacción de Fosfolamban y SERCA

PLN en su estado no fosforilado se encuentra en forma de monómero e interactúa con la bomba SERCA, disminuyendo su actividad; al ser fosforilado PLN, se estabiliza en una conformación de oligómero, lo que retira el efecto inhibitorio sobre la bomba SERCA, aumentando su velocidad de recaptura de Ca^{2+} . Tomado de: Kranias y Hajjar 2012

Otra proteína que participa en la regulación de SERCA2a es Sarcolipina (SLN), está constituida de 31 aa. Del mismo modo que PLN, al ser fosforilada, se retira la inhibición sobre la bomba SERCA2a, esto mediante la proteína cinasa 16 (STK16) que fosforila a SLN en el residuo treonina⁵ (Bhupathy *et al.*, 2009); sin embargo, contrario a PLN, SLN se expresa mayoritariamente, tanto en murinos como en humanos, en las aurículas y el músculo esquelético rápido y en menor cantidad en ventrículos (Babu *et al.*, 2005; Minamisawa *et al.*, 2003).

1.4 Patologías relacionadas con la presencia de una bomba SERCA2a disfuncional.

La insuficiencia cardiaca es la primera causa de muerte en pacientes diabéticos. Las cardiomiopatías son un factor importante que contribuyen al desarrollo de insuficiencia cardiaca y son un factor de riesgo independiente de otros factores asociados como la aterosclerosis, la hipertensión y otras complicaciones (Zhong *et al.*, 2001).

Las proteínas encargadas del manejo de Ca²⁺ intracelular tienen un rol muy importante en la patofisiología de cardiomiopatías. Se han realizado diversos estudios en modelos animales de diabetes para tratar de dilucidar las causas que conllevan al desarrollo de cardiomiopatías diabéticas. Los resultados de estos estudios sugieren disfunciones en el RS, lo que conduce a alteraciones en el manejo de Ca²⁺ intracelular en los miocitos cardiacos; Un ejemplo es la prolongada relajación que se observa en la cardiomiopatía diabética debido a la recaptura disminuida de Ca²⁺ hacia el RS provoca que el contenido de Ca²⁺ del RS se reduzca, y que se lleve a cabo una menor liberación sistólica de Ca²⁺ y por lo tanto una contracción cardiaca más débil. Ligeti *et al.*, (2006) encontraron que existía hipocontractilidad cardiaca y una disminución en la actividad de la bomba SERCA durante las etapas finales de la cardiomiopatía producida por diabetes sin embargo, durante las etapas tempranas de DM II Fredersdorf *et al.* (2012) reportaron un incremento en la actividad de recaptura de Ca²⁺ hacia el RS y mayor

contractilidad, estas diferencias podrían deberse a un periodo compensatorio previo a la caída de la actividad.

La expresión de la bomba SERCA2a inducida por insulina podría tratarse de un mecanismo de adaptación para tratar de manejar la sobrecarga de volumen sanguíneo ocasionada por los elevados niveles de glucosa que se presentan durante las fases iniciales de DM II, cuando los niveles de insulina también se encuentran elevados. A medida que la enfermedad progresa, los niveles de insulina disminuyen y la expresión de SERCA2a se afecta en el corazón (Fredersdorf *et al.*, 2012).

El óxido nítrico (NO) induce la S-glutathionilación de la bomba SERCA incrementando su actividad; sin embargo, este mecanismo se encuentra bloqueado por oxidaciones irreversibles de los enlaces tiol de la Cys⁶⁷⁴ que ocurren durante el desarrollo de enfermedades como la aterosclerosis, la DM y el SM (Adachi *et al.*, 2004). Las dislipidemias también pueden participar en la oxidación de la bomba SERCA, ya que la acumulación intracardiaca de ácidos grasos incrementa la demanda de oxígeno y la generación de especies reactivas de oxígeno (Dincer 2012).

La desregulación del Ca²⁺ en el RS desencadena el estrés del retículo lo que lleva al desarrollo de resistencia a la insulina en obesidad y diabetes, se ha propuesto que el mal funcionamiento de la bomba SERCA es uno de los principales factores que contribuyen al desarrollo de estrés del retículo (Kang *et al.*, 2016).

Dentro del RS ocurren procesos postraduccionales que incluyen el plegamiento, glicosilación, ensamble de subunidades y su posterior traslado hacia el aparato de Golgi, lo cual se lleva a cabo por proteínas chaperonas del interior del RS; la reducción en los niveles de Ca²⁺ luminal, la inhibición de la glicosilación o el bloqueo de la vía secretoria (evitando el traslado hacia el aparato de Golgi), produce la acumulación de proteínas mal plegadas e incrementa la demanda de chaperonas, a esta condición se le denomina estrés del retículo (Hojmann *et al.*, 2001).

2. ANTECEDENTES

2.1 Disminución de la actividad de la bomba SERCA en desnutrición gestacional

Existen muy pocos estudios que analicen los cambios en la actividad, regulación y/o expresión de la bomba SERCA en diferentes estados nutricios, a pesar de ser una proteína fundamental en la función cardiaca y vascular. A este respecto, Ramírez-Oseguera y colaboradores (2013) evaluaron la actividad ATPasa de la bomba SERCA de músculo esquelético en un modelo de ratas Wistar con desnutrición prenatal, y reportaron que ésta era significativamente menor que en las ratas control (Figura 8); no se evaluó si existían diferencias en la expresión proteica de la bomba SERCA o cambios en su regulación por proteínas accesorias entre las ratas con desnutrición gestacional y las ratas control (Ramírez-Oseguera *et al.*, 2013).

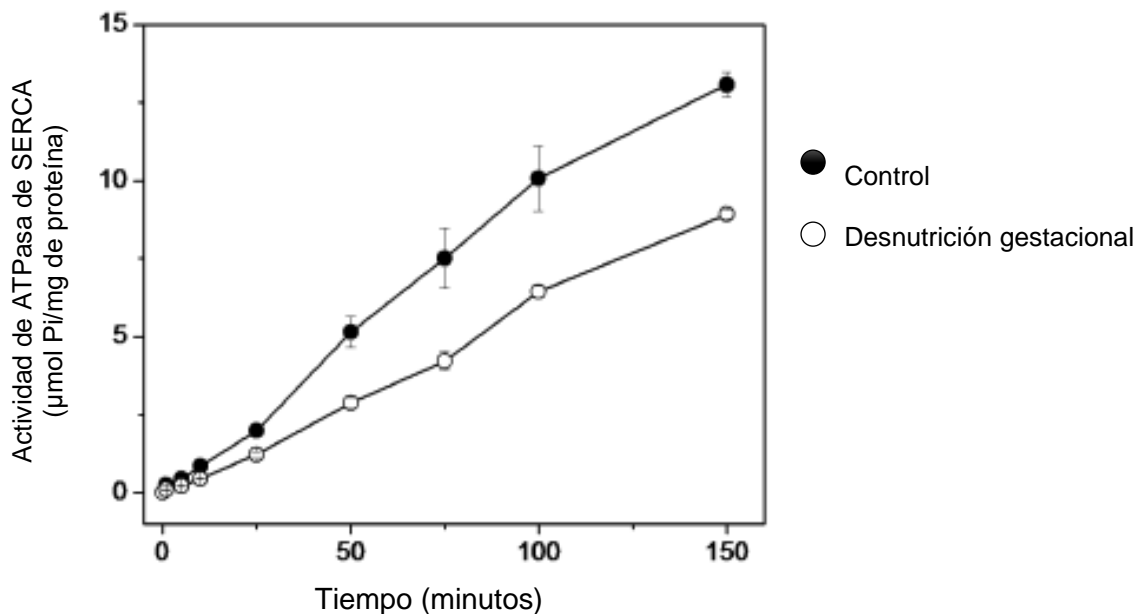


Figura 8. Disminución en la actividad ATPasa de la bomba SERCA en músculo esquelético de ratas con desnutrición gestacional.

Se evaluó la actividad de la bomba SERCA utilizando un método colorimétrico que permite cuantificar los fosfatos liberados por la hidrólisis de ATP y se encontró que la actividad es menor en el músculo esquelético de ratas con desnutrición gestacional que en ratas control. Tomado de: Ramírez-Oseguera *et al.*, 2013.

En el trabajo de Harvey *et al.*, (2015) se reportó que la expresión proteica de la bomba SERCA2a en cardiomiocitos de ratas Long Evans con desnutrición gestacional no se modifica con respecto a ratas control (Figura 9). En ese trabajo no se evaluó la actividad de SERCA2a; sin embargo, los autores sugieren que ésta se encuentra disminuida ya que encontraron una menor expresión de RyR pero el mismo contenido de Ca²⁺ en el RS (Harvey *et al.*, 2015).

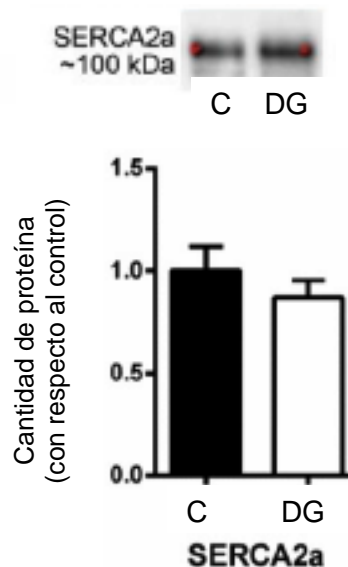


Figura 9. Expresión de la bomba SERCA2a en cardiomiocitos de ratas control y ratas con desnutrición gestacional.

Se evaluó la expresión de la bomba SERCA2a por western blot en cardiomiocitos y no se encontró diferencia significativa entre las ratas control (C) y las ratas con desnutrición gestacional (DG). Tomado de: Harvey *et al.*, 2015.

2.2 Actividad de la bomba SERCA2a en dieta alta en sacarosa.

Wold y colaboradores (2005) reportaron una actividad menor de la bomba SERCA2a evidenciada por una disminución en la velocidad de recaptura de Ca²⁺ en transitorios de Ca²⁺ inducidos por cafeína, en cardiomiocitos de ratas Wistar con resistencia a la insulina. La resistencia a la insulina fue inducida por una dieta alta en sacarosa durante 4 meses (Figura 10); no se encontraron cambios en la expresión de SERCA2a, ni de su regulador PLN (Figura 11) (Wold *et al.*, 2005).

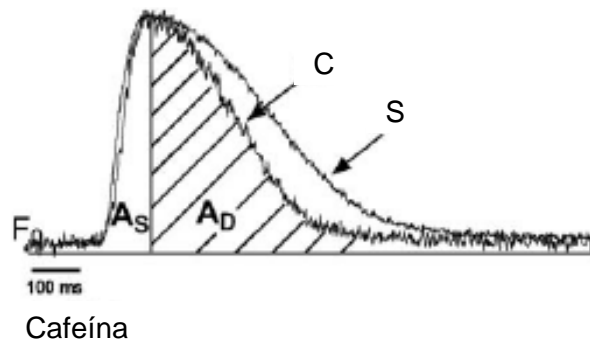


Figura 10. Reducción en la velocidad de recaptura de Ca^{2+} en cardiomiocitos de ratas con dieta alta en sacarosa y sus controles.

Los cardiomiocitos aislados se colocaron en solución extracelular libre de Na^+ y Ca^{2+} ($0\text{Na}^+/0\text{Ca}^{2+}$), posteriormente fueron estimulados con un breve pulso de cafeína (100 ms, 10 mM) en solución $0\text{Na}^+/0\text{Ca}^{2+}$. Bajo estas condiciones, el NCX se encuentra inhibido, la cafeína libera el Ca^{2+} del RS, y la remoción del Ca^{2+} citosólico registrada mediante un indicador de Ca^{2+} , Fluo-3/AM, se debe primariamente a la actividad de la bomba SERCA2a. En la figura se muestran los registros representativos de los transitorios de Ca^{2+} en células de ratas con dieta control (C) y con dieta alta en sacarosa (S), observándose una menor velocidad de recaptura en las últimas. As= integral de la fase sistólica; AD= integral de la fase diastólica. Tomado de: Wold *et al.*, 2005.

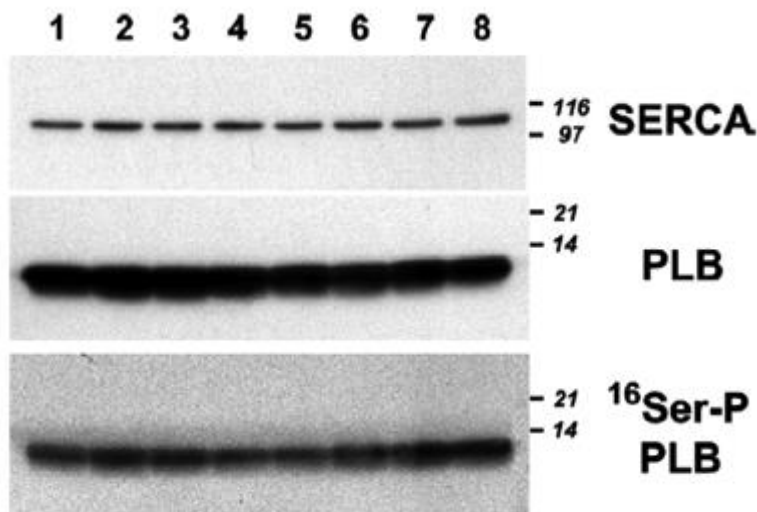


Figura 11. Expresión de la bomba SERCA y PLN en homogenados de cardiomiocitos aislados de ratas alimentadas con dieta alta en sacarosa y sus controles.

Los carriles 1, 3, 5 y 7 corresponden a muestras de ratas control; los carriles 2, 4, 6 y 8 corresponden a muestras de ratas con dieta alta en sacarosa. No se encontraron cambios en la expresión de la bomba SERCA ni de PLB, así como en la fosforilación de ésta última. Tomado de: Wold *et al.*, 2005.

En trabajos previos de nuestro laboratorio (Fernández-Miranda 2013), se evaluó la actividad de la bomba SERCA2a midiendo la recaptura de Ca^{2+} (utilizando el indicador Fura 4F) en microsomas de corazón de ratas control y ratas con SM inducido por una dieta alta en sacarosa durante 6 meses; se encontró que la actividad de la bomba SERCA2a, así como su expresión proteica, disminuyeron en los animales con SM (Figura 12).

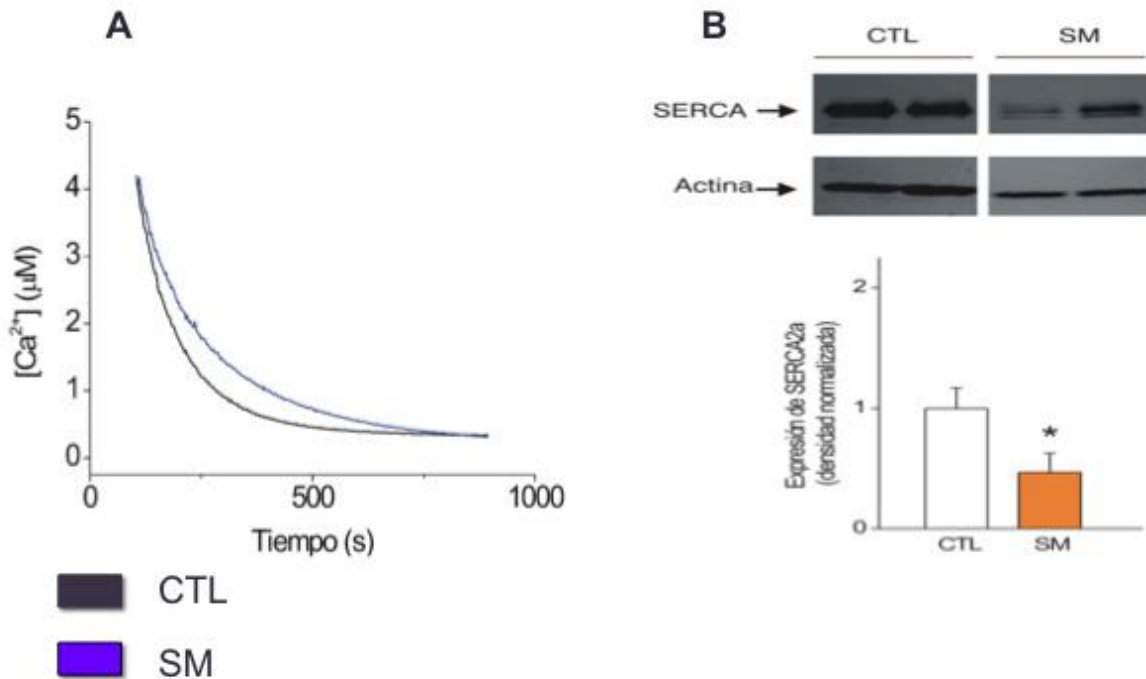


Figura 12. Disminución en la actividad y expresión de la bomba SERCA2a en un modelo de SM inducido mediante dieta alta en sacarosa.

En el panel A se muestra un gráfico representativo de la recaptura de Ca^{2+} en microsomas de corazón de ratas control y ratas con SM, observándose una menor velocidad en las muestras provenientes de tejido cardíaco de ratas con SM. En el panel B se muestra la expresión de la bomba SERCA evaluada por Western Blot en microsomas de VI de ratas control y ratas con SM, encontrándose una disminución en las muestras provenientes de ratas con SM. Tomado de: Fernández-Miranda 2013.

3. JUSTIFICACIÓN

La desnutrición durante el periodo prenatal incrementa el riesgo de padecer alteraciones metabólicas en la edad adulta como hipertrigliceridemia, obesidad, SM, y DM II, condiciones asociadas a un incremento en el riesgo cardiovascular. Se ha reportado la disminución de la actividad de la bomba SERCA2a en modelos experimentales tanto de dieta alta en sacarosa como de desnutrición prenatal, sin embargo, no se ha evaluado la actividad de esta proteína tan importante en la regulación de la $[Ca^{2+}]_i$ cardiaco en un modelo donde se presenten ambas condiciones. Por lo anterior el objetivo del presente trabajo es estudiar la actividad enzimática y la expresión proteica de la bomba SERCA2a, además de la expresión y nivel de fosforilación de su regulador fosfolamban en un modelo de desnutrición pre y postnatal y dieta alta en sacarosa.

4. HIPÓTESIS

La expresión y la actividad ATPasa de la bomba SERCA2a disminuyen como consecuencia de la desnutrición pre y post-natal, y esta alteración se exagera tras el consumo de una dieta alta en sacarosa en el periodo post-natal.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad ATPasa de SERCA2a, su expresión proteica, y su regulación por fosfolamban, en ventrículo izquierdo de corazones de ratas sometidas a desnutrición pre y postnatal y una dieta alta en sacarosa.

5.1 Objetivos específicos:

En homogenados de VI de corazón de animales sometidos a desnutrición pre y postnatal con una dieta alta en sacarosa y sus respectivos controles:

- a) Determinar la actividad ATPasa de la bomba SERCA2a (velocidades iniciales), y su dependencia por Ca^{2+} .
- b) Cuantificar los niveles de expresión de la bomba SERCA2a.
- c) Evaluar los niveles de expresión de fosfolamban (total y fosforilado)

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Estrategia para generar los grupos experimentales

El tratamiento para generar animales desnutridos y con SM ha sido aprobado por el comité interno para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (CICUAL) que se desempeña conforme a los lineamientos establecidos en la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999.

Los grupos experimentales se desarrollaron en el laboratorio del Dr. Ismael Jiménez, en el Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Cinvestav-IPN

A partir de animales de la cepa *Wistar* producidos en el bioterio de Cinvestav se obtuvieron hembras de alrededor de 250-300 g de peso, las cuales se dividieron en 2 grupos, y éstas fueron tratadas 3 semanas antes del apareamiento, durante las 3 semanas de la gestación y 3 semanas de lactancia de la siguiente manera: el primer grupo (control, C), recibió alimento *ad libitum* para roedor PicoLab Rodent Diet 20, (aproximadamente 20 g por animal; composición nutricional: proteína cruda 20%; grasa cruda 6.5%; fibra cruda 6.0%; minerales añadidos 2.5%; cenizas 7.0%). El segundo grupo (restringidos, R) recibió una cantidad disminuida de alimento aproximadamente en un 50% respecto a los animales control (10 g por animal).

Una vez destetadas, las crías de las hembras de cada grupo (C y R), se separaron por género, y los machos a su vez se dividieron en dos grupos, a uno de ellos (tanto C como R) se le administró sacarosa al 30% como agua de bebida durante 24 semanas y se les mantuvo el acceso al alimento sólido *ad libitum* (C+S) o restringido (R+S). Mientras que los otros dos grupos restantes recibieron únicamente agua con acceso al alimento sólido *ad libitum* (C) o reducido al 50% (R). Obteniéndose 4 grupos (Figura 13). Posterior a los tratamientos los animales se sacrificaron y se obtuvo el ventrículo izquierdo (VI) que se procesó para la obtención de homogenados que se utilizaron en los métodos descritos más adelante, y de acuerdo a la estrategia experimental (Figura 14).

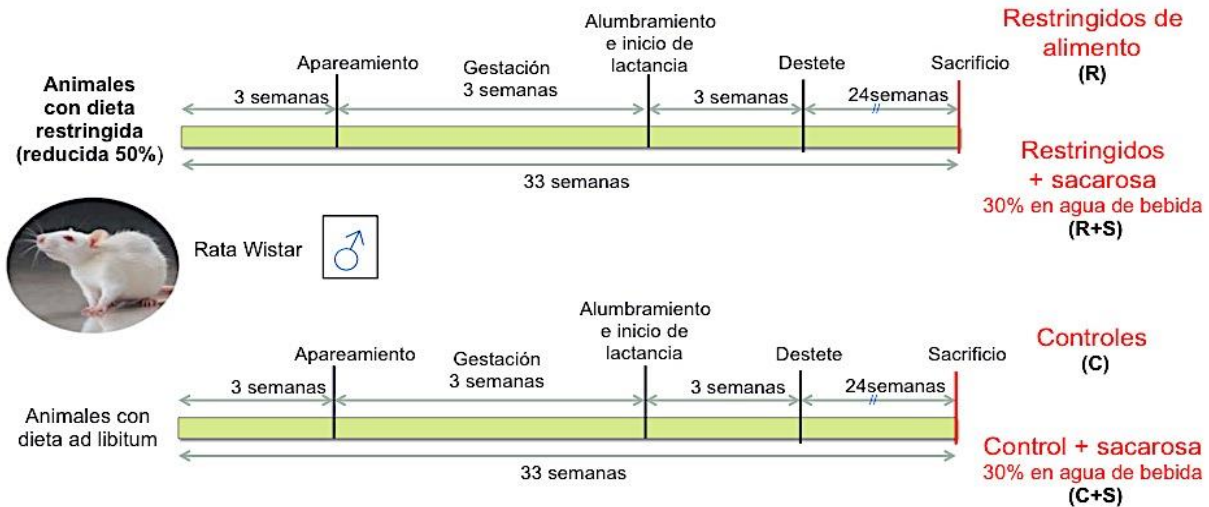


Figura 13. Estrategia para generar los grupos de animales.

La generación de los grupos experimentales se inició con ratas Wistar hembras. Tres semanas antes del apareamiento fueron separadas en 2 grupos, uno con restricción de alimento al 50% y otro grupo control con alimento *ad libitum*; Este tratamiento continuó durante la gestación y lactancia; después del destete, las crías machos fueron separadas en 2 grupos más, como se indica en la figura, a un grupo se le administró agua con sacarosa al 30% como agua de bebida y a otro agua solamente y fueron mantenidas en esas condiciones durante 24 semanas, hasta su sacrificio.

6.2 Estrategia experimental

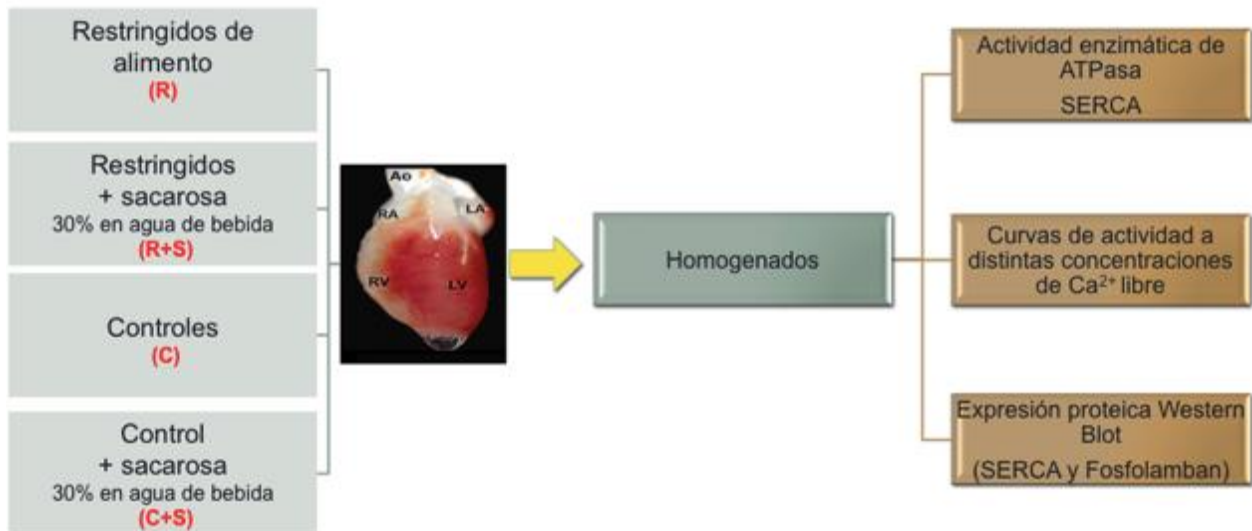


Figura 14. Estrategia experimental.

Se obtuvo el VI de los animales correspondientes a cada uno de los grupos y posteriormente se realizaron los homogenados de los tejidos obtenidos, y de estos homogenados se realizaron los experimentos indicados.

6.3 Determinación de parámetros corporales y séricos de las ratas.

Se registraron los siguientes parámetros corporales de los animales: peso corporal, peso del corazón, peso del VI y la circunferencia abdominal, con estos datos se obtuvieron las relaciones de peso corazón/peso corporal así como de peso del VI/peso corazón. Previo al sacrificio, las ratas se mantuvieron 8 h en un periodo de ayuno. Todos los pesos registrados se hicieron en una balanza granataria marca Ohaus, modelo Adventurer ARC120. Las mediciones de la circunferencia abdominal se realizaron con un flexómetro estándar.

Una vez retirado el corazón, se registró el peso de éste órgano completo y del VI y se tomó sangre de la cavidad torácica para realizar mediciones de los parámetros séricos; los parámetros registrados fueron: colesterol total, colesterol HDL y TG, mediante equipo comercial Cardiochek versión de software 2.56 y tiras comerciales para determinación de lípidos PTS panels. Para la medición del parámetro de HbA1c se enviaron las muestras a laboratorio.

6.4 Homogenados de ventrículo izquierdo de corazón

6.4.1 Obtención de las muestras de tejido cardiaco

Después de los 6 meses del tratamiento los animales fueron anestesiados mediante la administración de pentobarbital sódico (100 mL/kg de peso) y sacrificados de acuerdo con los protocolos aprobados por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los animales de Laboratorio (CICUAL) en concordancia con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Posteriormente les fue extraído el corazón, el cual se pesó y se separó el VI que fue congelado en N₂ líquido y guardado a -80° C hasta su procesamiento. Todo el proceso se realizó en una solución que contenía 0.9% de NaCl tratada con DEPC (dietil pirocarbonato) al 1%.

6.4.2 Preparación de homogenados de ventrículo izquierdo

Para la preparación de homogenados de VI se siguió el protocolo reportado previamente (Fernandez-Velasco *et al.*, 2011) con algunas modificaciones que se describen a continuación. El VI se trituró en N₂ líquido en un mortero hasta obtener un

polvo fino, que después se colocó en un homogenizador Potter-Elvehjem adaptado a un homogeneizador eléctrico, con una solución amortiguadora (composición: Hepes 20 mM, sacarosa 300 mM, pH a 7.2 con KOH) en una proporción de 4 mL de amortiguador de homogenización por g de tejido más una mezcla de inhibidores de proteasas (en μM : leupeptina 12, PMSF 100, benzamidina 500 y aprotinina 0.153). El tejido se homogenizó 3 veces a 400 rpm durante 45 s y con pausas de 30 s entre cada homogenización, este proceso se realiza a una temperatura de 0 a 4 °C. El homogenado se centrifuga a 4,000 rpm durante 10 min en un rotor JA20 a 4 °C, el sobrenadante se recupera y la pastilla se mezcla con una proporción de amortiguador idéntica a la primera, se repite el proceso de homogenización de la pastilla y se vuelve a centrifugar a 4000 rpm 10 min a 4 °C, se repite el proceso una última vez y se centrifuga durante 30 min en las mismas condiciones de temperatura. Los sobrenadantes de las 3 veces de homogenización se mezclan y se preparan alícuotas las cuales son almacenadas a -80°C.

Por otro lado, utilizando el mismo protocolo modificado de Fernandez-Velasco y colaboradores (2011) se realizaron homogenados de músculo esquelético de conejo. Para lo cual se utilizó el músculo *EDL (Extensor Digitorum Longus)* y éste fue procesado y reservado bajo los mismos criterios antes mencionados.

6.4.3 Cuantificación de proteína

La cuantificación de proteína se realizó mediante el método de Lowry con desoxicolato (Lowry, *et al.* 1951) la cantidad de proteínas en la muestra se estimó determinando la absorbancia (Abs) a 750 nm y los valores se interpolaron en una curva de calibración que se construyó determinando la Abs, de cantidades conocidas de albúmina sérica bovina (BSA).

Para esto se prepararon las siguientes soluciones:

Solución A: 10 g de Na_2CO_3 , 2 g de NaOH, 0.134 g de $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, disolver y aforar a 500 ml con agua desionizada

Solución B: 0.125 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ disolver y aforar a 25 mL con agua desionizada.

Desoxicolato de Na^+ al 1%: pesar 0.25 g de desoxicolato de Sodio $\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{NaO}_4$ disolver y aforar a 25 mL con agua desionizada.

Reactivo de Folin en una dilución 1:1 con agua desionizada.

Stock de BSA (1mg/mL): pesar 10 mg BSA y aforar a 10 mL con agua desionizada.

Solución C: se prepara al momento de usar, 100 mL de solución A con 1 mL de Sol. B

Se colocó la muestra en un tubo Eppendorf y se aforó a 800 μL , se adicionaron 100 μL de desoxicolato, después de adicionaron 2 mL de sol. C, se adicionaron 100 μL de reactivo de Folin diluido, se incubó 15 min a temperatura ambiente y se midió la Abs a 750 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-600.

Todas las preparaciones se hacen por duplicado, para las concentraciones de BSA se preparan a 0,10,25,50 y 100 μL aforadas en 800 μL , para las proteínas de interés se utilizan 5 μL de proteína aforados en 795 μL de agua desionizada y la preparación arriba mencionada.

6.5 Determinación de la actividad ATPasa de la bomba SERCA2a

La actividad enzimática (ATPasa) de la bomba SERCA se determinó mediante un ensayo de colorimetría el cual ha sido reportado previamente (Bartolommei G. *et al.* 2013) y se basa en la capacidad del ácido molíbdico de formar complejos con los fosfatos liberados por la hidrólisis de ATP en el ciclo de actividad de la bomba SERCA, estos complejos al ser reducidos en un ambiente ácido emiten una coloración azul intensa que puede ser cuantificada mediante espectrofotometría, el ensayo se describe a continuación.

Se preparó una solución de colorido la cual contenía en M: 2.5 de H_2SO_4 , 0.3 de Ácido ascórbico, 0.004 de tartrato de potasio y antimonio (III), 0.024 de heptamolibdato de amonio.

El buffer de ensayo contenía en mM: 80 KCl, 25 MOPS, pH a 7.0 ajustado con TRIS, 3 MgCl₂, 5 azida de sodio (NaN₃), 0.2 EGTA, 0.2 CaCl₂ (8.3 μM de calcio libre, calculado mediante el programa Maxchelator) (Patton C. et al., 2010) y 2 μM del ionóforo de Ca²⁺ A23187.

Se utilizó una concentración total de proteína de 50 μg, se añadió a la solución amortiguadora de ensayo y se incubó esta mezcla durante 5 min a 37°C en un thermoblock marca Daigger, posteriormente se inició la reacción al adicionar ATP (sal de Na⁺) a una concentración final de 1 mM. Se tomaron volúmenes (por duplicado) de 100 μL a diferentes tiempos (0,5,10,15,30 min) y se añadieron a 900 μL de solución de colorido la cual debido a la acidez, detiene la hidrólisis de ATP al desnaturalizar a la enzima. De manera paralela se hizo un ensayo bajo las mismas condiciones, pero se añadió tapsigargina a una concentración final de 100 nM para inhibir a la bomba SERCA (Figura 15).

Terminado el último tiempo las muestras se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente y se midió la Abs. a una longitud de onda de 850 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-600.

Se promedian las absorbancias y se obtiene la actividad ATPasa específica de SERCA al restar las actividades de ATPasas totales (reacciones sin tapsigargina) menos las actividades de las ATPasas insensibles a tapsigargina (reacciones con tapsigargina), estos datos se interpolan en una curva patrón de PO₄³⁻ para determinar los nmoles de Pi liberado (Figura 16).

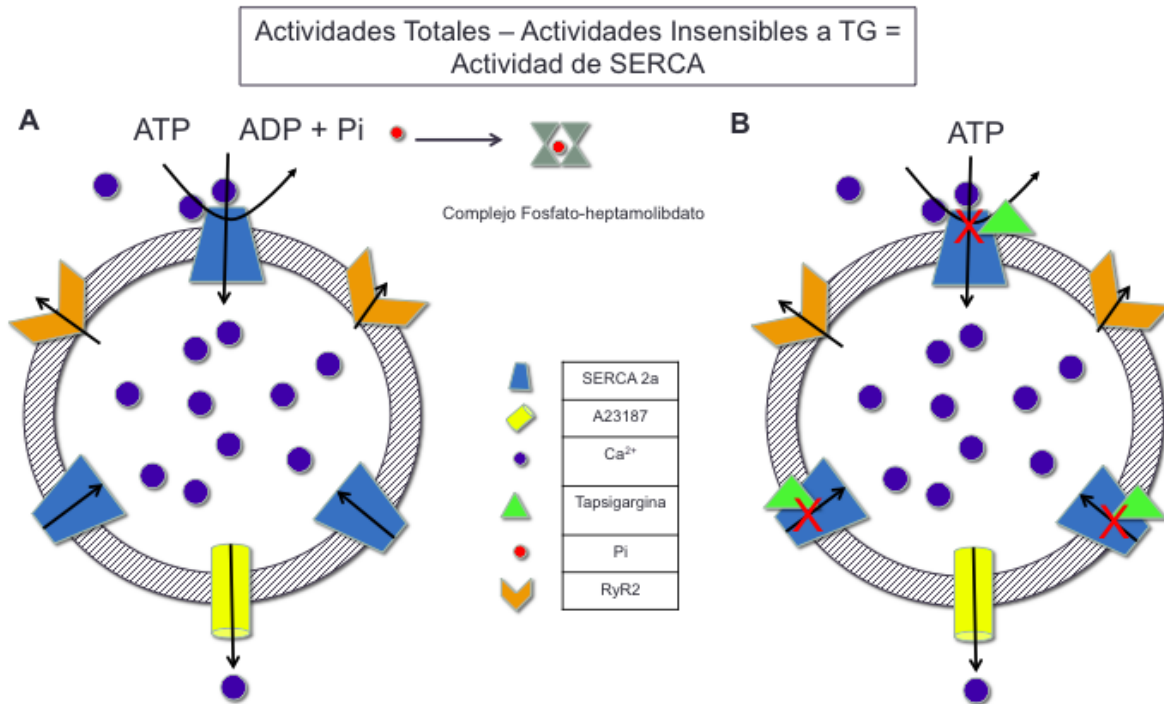


Figura 15. Representación del ensayo para determinar la actividad hidrolítica de la bomba SERCA2a.

En el panel A se representa una vesícula de RS con la bomba SERCA2a en la membrana, se inicia la actividad enzimática con la adición de ATP. La bomba SERCA recaptura Ca²⁺ al interior de la vesícula hidrolizando ATP a ADP y liberando fosfato inorgánico (P_i), este P_i forma un complejo con el heptamolibdato presente en la reacción. De manera paralela se muestra en el panel B, la misma reacción pero con el inhibidor de la bomba SERCA2a, tapsigargina. Adaptado de: Bartolommei *et al.*, 2013

6.5.1 Curva patrón de fosfatos

Para el ensayo se preparó una solución de KH₂PO₄ en diluciones seriadas (por duplicado) a concentraciones mM de 200, 100, 50, 25, 12.5 y 6.25, de cada concentración se toman 100 μL los cuales se añaden a 900 μL de la solución de colorido previamente descrita, para completar un volumen final de 1 mL, se incuban las muestras 10 min a temperatura ambiente y se mide la absorbancia a 850 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-600. La curva obtenida se muestra en la Figura 16.

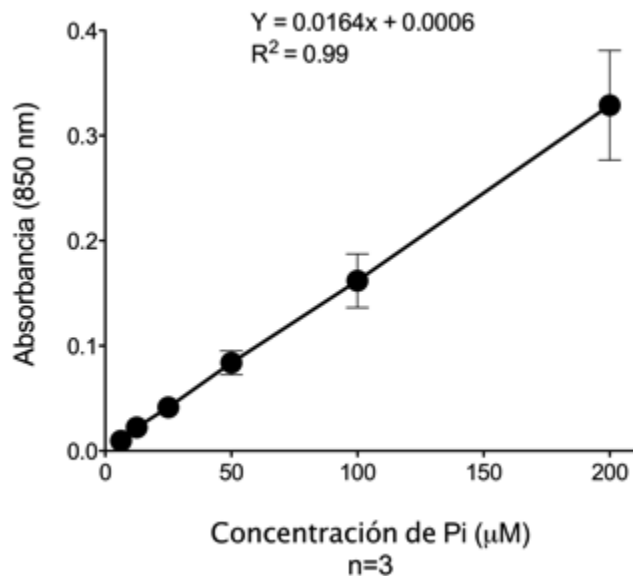


Figura 16. Curva patrón de fosfatos

Curva obtenida a concentraciones crecientes de fosfato de 6.25 – 200 µM, se obtiene la ecuación de la recta y R²

6.5.2 Determinación de la actividad ATPasa de la bomba SERCA2a a distintas concentraciones de Ca²⁺

La curva de dependencia de Ca²⁺ de la actividad ATPasa de la bomba SERCA se realizó utilizando los mismos criterios del protocolo de Bartolommei antes mencionado con algunas modificaciones.

Para los cálculos de las concentraciones de Ca²⁺ libre, se utilizó el programa Maxchelator Ca/Mg/ATP/EGTA Calculator v1 constants from Theo Schoenmakers' chelator (Patton *et al.*, 2010), en el cual se aplicaron las condiciones que se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones iónicas para calcular las concentraciones de Ca²⁺ libre mediante el programa Maxchelator

Fuerza iónica del amortiguador de ensayo	$I = \frac{1}{2} \sum_i C_i Z_i^2$ I= 0.094
Temperatura	37°C
pH	7.0
Mg	0.003 M
ATP	0.001 M
EGTA	0.0002 M

Se evaluó la actividad ATPasa de la bomba SERCA2a a 6 concentraciones distintas de Ca²⁺ libre, a un mismo tiempo de reacción de 30 min. Se detallan las concentraciones en la Tabla 4.

Tabla 4. Concentraciones de Ca²⁺ libre utilizadas para los ensayos ATPasa de la bomba SERCA2a

A	[]Deseada de Ca ²⁺ libre (μM)	0.01	0.1	1	10	100	1000
B	EGTA mM	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
C	Ca ²⁺ Total μM	3.55	30.7	130	202	322	1400
D	μl de un stock 10 mM	0.4	3.4	14.7	22.2	35.34	151.41

A: Concentraciones de Ca²⁺ evaluadas; B: Concentración de Quelante EGTA utilizada en el ensayo; C: Concentración de Ca²⁺ requerida (μM); D: μl de una solución 10 mM para obtener la concentración requerida

Utilizando las concentraciones de Ca²⁺ libre indicadas en la tabla 4, se procedió con el mismo protocolo para determinar la actividad ATPasa y se determinó la absorbancia en un espectrofotómetro Beckman DU-600 a 850 nm.

6.6 Electroforesis y Western Blot

La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) se llevó a cabo como una modificación al protocolo de Laemmli (Laemmli *et al.* 1970). Para la evaluar la expresión de SERCA se prepararon geles de acrilamida al 8% y para la evaluar la expresión de PLN (total y fosforilado) se prepararon geles de acrilamida al 16%, tanto para SERCA como para PLN ambos fueron de formato mini protean (BIORAD) de 1 mm de espesor.

Se añadió a la muestra buffer desnaturalizante Laemmli (SDS-protein gel loading solution Quality Biological, β -mercaptoetanol y agua) en una proporción 1:1; posteriormente la muestra se calentó a 37°C durante 20 min en un Thermoblock Daigger y se centrifugó brevemente (Microcentrífuga marca Eppendorf mod. 5415C), se cargó el volumen requerido para obtener 10 μ g de proteína y se corrió a 100 V durante 2.5 hrs. a temperatura ambiente en un buffer de corrida (25 mM de Trisma-base, 19.2 mM de glicina y 10% de SDS p/v). Las proteínas se transfirieron a una membrana PVDF a 100 V durante 2 h en una cámara de transferencia húmeda a 4° C con un buffer de transferencia (25 mM de Tris-base, 19.2 mM de glicina y 20% de metanol v/v). Una vez terminada la transferencia, las membranas se bloquearon con una solución al 5% de leche descremada en polvo en PBS-T (KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaCl y Tween 20 al 0.1%) durante 1 h a temperatura ambiente en agitación suave. Posteriormente la membrana se cortó y se incubó con los anticuerpos primarios diluidos en leche en agitación suave durante 2 h.

- SERCA

Se utilizó un anticuerpo policlonal que reconoce los residuos AILE del extremo carboxilo terminal de SERCA2a, en una dilución 1:5000 de la marca Badrilla (No.de catálogo: A010-20) donado por el Dr. Héctor Valdivia.

- Fosfolamban

Para determinar la fosforilación de fosfolamban (PLN-P) se utilizó un anticuerpo policlonal de conejo que reconoce la fosforilación en el residuo de serina 16 por PKA, en una dilución 1:10000 de la marca Badrilla (No. de catálogo: A010-14)

donado por el Dr. Héctor Valdivia (University of Michigan-Ann Arbor, MI, USA). Para determinar fosfolamban total (PLN) se utilizó el anticuerpo monoclonal de ratón en una dilución 1:5000 de la marca Abcam (No. de catálogo: ab2865)

- GAPDH

Como control de carga se usó la proteína gliceraldehido 3- fosfato deshidrogenasa reconocida por un anticuerpo monoclonal de ratón en una dilución de 1:100,000 de la marca Ambion (No. de catálogo: AM4300)

Se lavó el anticuerpo primario 3 veces, cada lavado de 10 min con PBS-Tween (Tris Base 2 mM, NaCl 13.7 mM y Tween 20 al 0.1%, pH 7.5).

Se realizó la incubación con anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa de rábano (HRP), por 1 h a temperatura ambiente (para PLB-P y SERCA2a cabra anti conejo marca Santa Cruz No. Cat. sc-2004; para GAPDH cabra anti ratón marca Santa Cruz No. Cat. sc-2005. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS-Tween.

Finalmente, se realizó la detección de la señal utilizando el kit de quimioluminiscencia (Thermo Scientific) y se expuso a una placa autorradiográfica (KODAK Biomax XAR).

6.7 Análisis de los datos

Los datos se presentan como el promedio \pm error estándar. Para el análisis estadístico se usó la prueba T-students no pareada ó ANOVA de una sola vía seguida de un análisis *post-hoc* de Bonferroni o Tukey. Las diferencias entre las medias fueron consideradas significativas si $P < 0.05$. Los análisis estadísticos se realizaron en Graph Pad Software, GraphPrism ver 5.0 y/o OriginPro 8.

El ajuste para las curvas de actividad de ATPasa a distintas concentraciones de Ca^{2+} se realizó en OriginPro 8 mediante la ecuación de Hill reportada por Meissner G., *et al.*, (1997) con algunas modificaciones:

$$V = V_{\max} \left(\frac{[\text{Ca}^{2+}]^{n_a}}{[\text{Ca}^{2+}]^{n_a} + K_a^{n_a}} \right) \left(1 - \frac{[\text{Ca}^{2+}]^{n_i}}{[\text{Ca}^{2+}]^{n_i} + K_i^{n_i}} \right)$$

Donde:

V_{\max} = a la actividad ATPasa máxima de la bomba SERCA en nmol de Pi/mg de proteína.

$[\text{Ca}^{2+}]$ = a la concentración de Ca^{2+} libre en μM .

K_a y K_i = a las constantes de Hill de activación e inactivación dependiente de Ca^{2+} , respectivamente, en μM .

n_a y n_i = a los coeficientes de Hill de activación e inactivación, respectivamente.

7. RESULTADOS

7.1 Modificación en los parámetros corporales como resultado de las diferentes dietas.

La Tabla 5 muestra los resultados de los parámetros corporales de los animales de los diferentes grupos experimentales. En cuanto al peso corporal, se observó una reducción significativa del 54.5% en el grupo de ratas restringidas (R) con respecto al grupo control (C). No se encontró diferencia significativa en el peso corporal de las ratas alimentadas con sacarosa (C+S) con respecto a las control (C). Por otra parte, las ratas con dieta sólida restringida y que recibieron sacarosa en el agua de bebida (R+S) recuperaron su peso corporal aunque no llegaron a alcanzar el valor promedio de los animales control (C). El incremento en el peso corporal de los animales del grupo R+S fue significativamente mayor (72%) con respecto a los animales del grupo R. En cuanto a la relación peso corazón/peso corporal, se encontró una disminución significativa del 27% en el grupo R+S con respecto al grupo C, no habiendo diferencias en la relación peso VI/peso corazón de ninguno de los grupos.

Tabla 5. Parámetros corporales de los animales de los animales de los diferentes grupos experimentales

Grupo Experimental	Peso corporal (g)	Circunferencia abdominal (cm)	Peso corazón / peso corporal	Peso VI / peso corazón
C	562 ± 28 (N=13)	23 ± 1 (N=3)	0.3585 ± 0.02 (N=13)	0.6076 ± 0.03 (N=13)
C+S	641 ± 31 # (N=15)	25 ± 1 # (N=5)	0.3332 ± 0.02 (N=15)	0.5566 ± 0.02 (N=15)
R	256 ± 29 * (N=6)	14 ± 1 * (N=5)	0.3213 ± 0.04 (N=6)	0.5108 ± 0.03 (N=6)
R+S	441 ± 17 # (N=6)	21 ± 0.5 # (N=6)	0.2615 ± 0.01 * (N=6)	0.5703 ± 0.01 (N=6)

Se indica el promedio ± el error estándar y el número de animales (N) para cada medición.

* $P < 0.05$ respecto al control. # $P < 0.05$ respecto a restringidos.

7.2 Desarrollo de hipertrigliceridemia en los grupos experimentales que recibieron sacarosa en el agua de bebida.

Una vez retirado el corazón de los animales se obtuvo una muestra de sangre de la cavidad torácica para realizar las medidas de los parámetros séricos. Los grupos que recibieron sacarosa, es decir, C+S y R+S, presentaron incrementos en los niveles séricos de triglicéridos correspondientes a 1.93 y 3.9 veces los valores control y desnutridos, respectivamente, por lo cual se consideró que desarrollaron hipertrigliceridemia (Tabla 6). El grupo R+S presentó un incremento del 42.9% en la HbA1c en comparación con el grupo R, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. No se observaron diferencias significativas en la concentración de colesterol HDL.

Tabla 6. Parámetros séricos de los animales

Grupo experimental	Triglicéridos (mg/dL)	HbA1c (%)	HDL (mg/dL)
C	77.8 ± 12 (N=9)	4.9 ± 0.15 (N=3)	33 ± 2 (N=9)
C+S	150 ± 18 * # (N=11)	5.5 ± 0.15 (N=5)	29 ± 2 (N=11)
R	51 ± 0.8 (N=6)	4.2 ± 0.03 (N=3)	29 ± 2 (N=6)
R+S	200 ± 32 * # (N=6)	6.0 ± 0.5 # (N=6)	33 ± 2 (N=6)

Se indica la media ± el error estándar y la N para cada medición. * $P < 0.05$ respecto al control.

$P < 0.05$ respecto a restringidos.

7.3 Estandarización de la actividad ATPasa de SERCA2a

Una vez realizados los homogenados de los diferentes grupos, se procedió a realizar los ensayos enzimáticos para determinar la actividad ATPasa de la bomba SERCA2a; Como controles para estandarizar la reacción, se hicieron ensayos sin homogenado, en donde al no estar la proteína SERCA2a el desarrollo de color azul se abatió; y otro ensayo sin el ionóforo de Ca^{2+} , donde de igual forma la actividad enzimática se redujo en gran medida al acumularse el Ca^{2+} dentro de las vesículas e inhibir a la bomba SERCA por saturación del catión en la vesícula; En la Figura 17 se muestran los datos obtenidos de tres experimentos diferentes y se corrobora que no se presenta desarrollo de coloración en ausencia de proteína, por lo que la generación se debe exclusivamente a los fosfatos producidos por la hidrólisis de ATP durante la

progresión de la reacción enzimática y no por algún artefacto producido por los componentes de la mezcla de reacción.

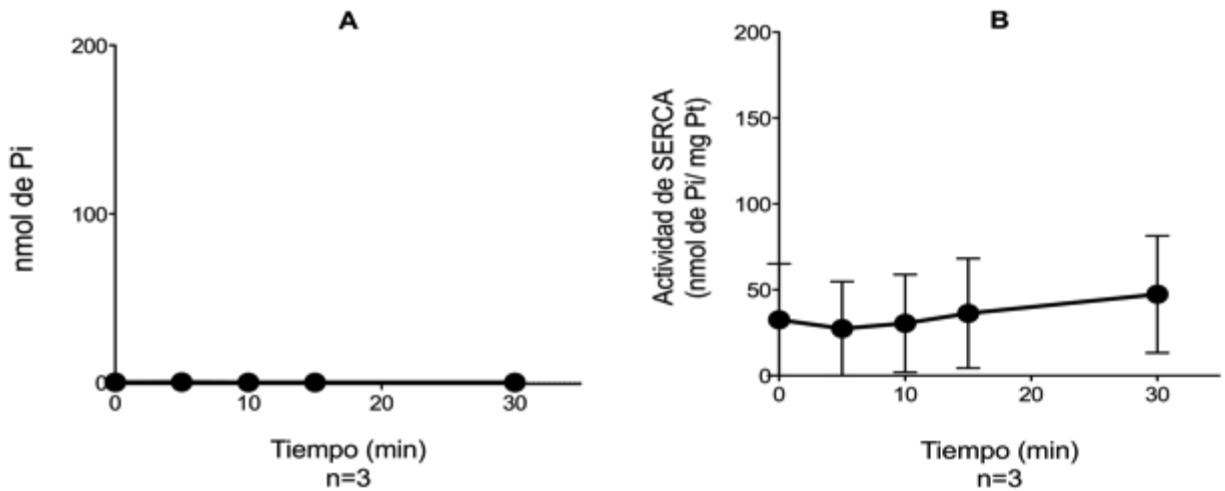


Figura 17. Controles de la reacción de actividad de ATPasa

Actividad de la bomba SERCA2a representada en nmolas de Pi. A: Ensayo realizado sin homogenado; B: Ensayo realizado sin ionóforo de Ca^{2+} A23187; datos que corresponde a una N=3 para ambas condiciones experimentales.

La Figura 18 muestra los controles realizados utilizando homogenados de músculo esquelético de conejo. Esto nos permite evaluar la actividad de la bomba SERCA1a principalmente, la cual tiene una mayor afinidad por Ca^{2+} y por lo tanto una mayor velocidad de recaptura de Ca^{2+} que SERCA2a. Se comprobó que bajo nuestras condiciones experimentales, el ensayo proporciona datos que concuerdan con lo reportado, es decir que la actividad de SERCA1a corresponde del 90% al 99% de las actividades totales de ATPasas (Wu K. et al., 1995; Brini y Carafoli 2009) (Figura 18A). Y por otro lado se probaron dos concentraciones de Ca^{2+} libre (10 y 50 μM) para determinar a qué concentración se obtenía la máxima actividad de SERCA1a (Bartolommei *et al.*, 2013; Shwinger *et al.*, 1995). Nuestros resultados muestran que se obtiene una actividad 25% mayor con la concentración de 10 μM de Ca^{2+} libre que con la concentración de 50 μM .

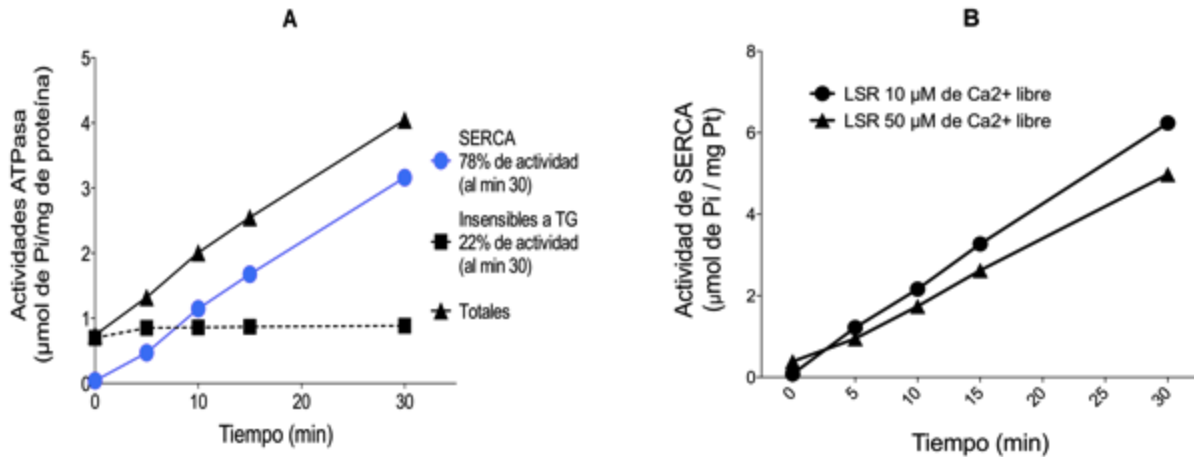


Figura 18. Actividad ATPasa de la bomba SERCA1a en homogenados de músculo esquelético de conejo.

A: Actividad de la bomba SERCA1a en homogenados de músculo esquelético de conejo, el 78% de la actividad total corresponde a la actividad de SERCA1a (N=1); B: Actividad de la bomba SERCA1a a dos concentraciones diferentes de Ca²⁺ libre, calculadas mediante Maxchelator. A la concentración de 10 μM de Ca²⁺ libre se presenta un 30% más de actividad que a 50 μM (N=1)

Una vez estandarizada la reacción y después de haber comprobado la eficacia de la tapsigargina para inhibir a la bomba SERCA1a en su totalidad, se realizaron los ensayos de actividad de la bomba SERCA2a en homogenados de VI provenientes de los animales de los cuatro grupos generados para el proyecto.

En la Figura 19 se muestra la actividad ATPasa de la bomba SERCA2a de los homogenados de VI provenientes de los grupos C y C+S, en presencia de una concentración de 10 μM de Ca²⁺ libre. Bajo las condiciones de reacción utilizadas (descritas previamente en la sección de materiales y métodos) no se observaron diferencias significativas en la actividad enzimática a los tiempos determinados de reacción en ambos grupos.

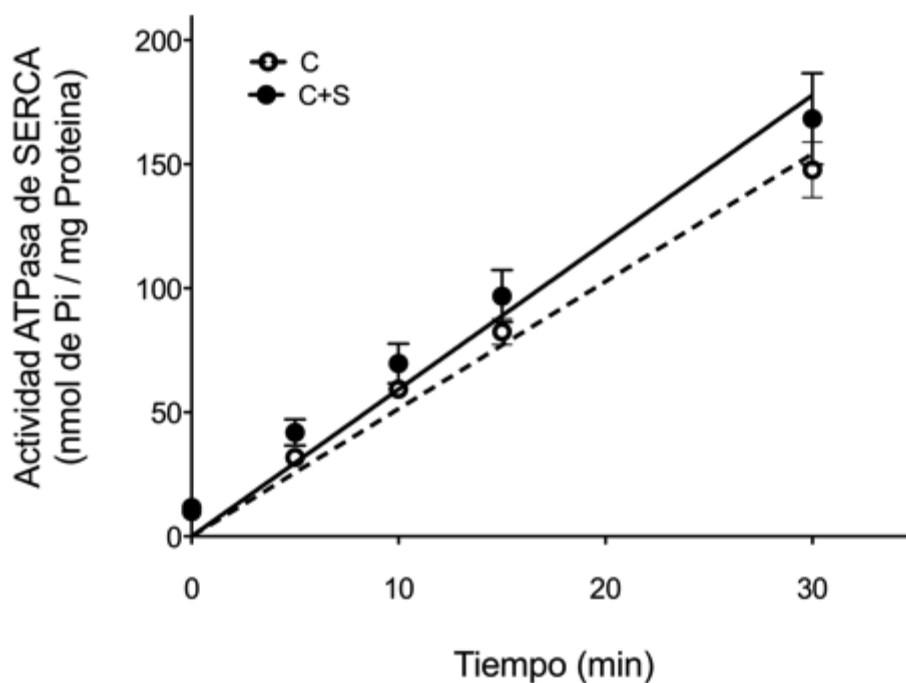


Figura 19. Actividad ATPasa de la bomba SERCA2a en homogenados de VI de corazón de rata.

Actividad enzimática de la bomba SERCA2a en presencia de $10 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} libre. La línea negra representa la regresión lineal ($m= 5.1$) de las medias \pm ee del grupo control; $N=7$, la línea roja representa la regresión lineal ($m= 6$) de las medias \pm ee del grupo control más sacarosa; $N=9$

Posteriormente se evaluó la actividad ATPasa de la bomba SERCA2a en condiciones de desnutrición; y se encontró que la actividad en el grupo R disminuyó un 53% con respecto a los animales del grupo C. Por el contrario, en el grupo de los animales R+S, tal actividad se recupera en 1.6 veces, alcanzando los niveles control, siendo esta diferencia estadísticamente significativa (Figura 20)

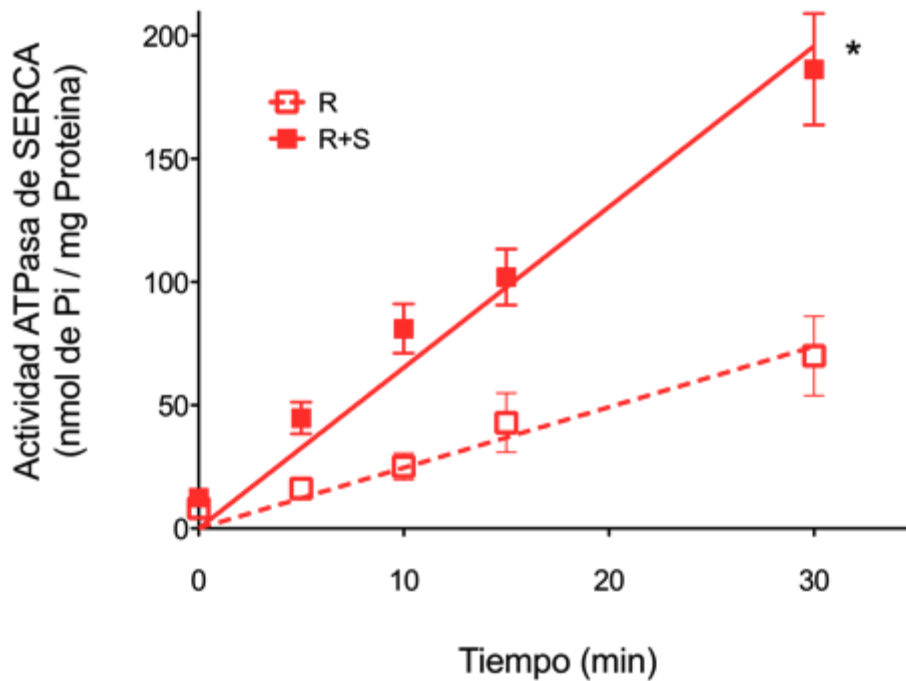


Figura 20. Actividad ATPasa de la bomba SERCA2a en homogenados de VI de corazón de rata.

Actividad enzimática de la bomba SERCA2a en presencia de $10 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} libre. La línea negra punteada representa la regresión lineal ($m= 2.5$) de los promedios \pm ee de la actividad enzimática a los tiempos indicados, del grupo de restringidos (R) $N=6$; la línea roja punteada representa la regresión lineal ($m= 6.5$) de los valores promedio \pm ee de la actividad enzimática a los tiempos indicados, del grupo restringidos más sacarosa (R+S) $N=6$; * $P < 0.05$ T-Student.

En la figura 21 se muestra una tabla con las velocidades de hidrólisis de ATP de la bomba SERCA2a, expresadas en nmol de Pi/mg de proteína/min, así como el porcentaje de contribución de la bomba SERCA2a en la actividad total de ATPasas.

Grupo	Velocidad nmol de Pi/mg de proteína/min	Velocidad inicial normalizada respecto al control	% de Act. de SERCA (30 m)
C	5.1 ± 0.18	1	57.5 ± 1.2
R	2.5 ± 0.25 *	0.47	42.7 ± 5.7
C+S	6.0 ± 0.30	1.15	60.7 ± 2.2
R+S	6.5 ± 0.36	1.27	61.1 ± 3.0

Figura 21. Velocidad de hidrólisis de ATP y porcentaje de actividad de la bomba SERCA2a en homogenados de VI de corazón de rata.

En la Figura se muestra el promedio de la velocidad de hidrólisis de ATP en nmol de Pi/mg de proteína/min ± error estándar, la velocidad inicial normalizada respecto al control y el porcentaje de actividad de la bomba SERCA2a con respecto al resto de ATPasas presentes. * $P < 0.05$ con respecto a C, C+S y R+S comparado mediante análisis ANOVA de una vía.

La actividad específica de la bomba SERCA2a se obtiene mediante la sustracción de las actividades totales presentes menos las actividades que son insensibles a tapsigargina. En la figura 22 se muestra en el gráfico que las condiciones C, C+S y R+S no presentan cambios en las actividades totales, pero se observa una disminución del 60% en las actividades totales del grupo R.

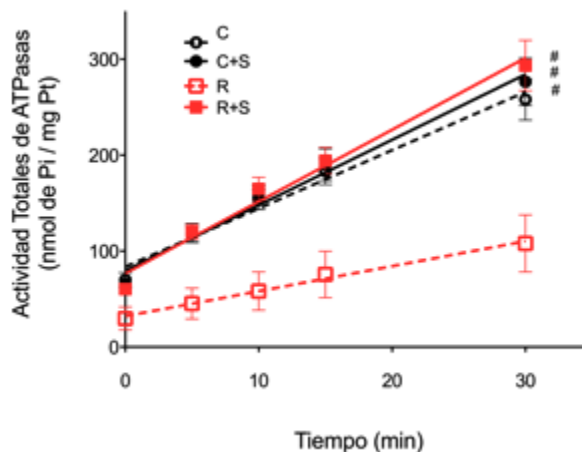


Figura 22. Actividades ATPasa totales en homogenados de VI de corazón de rata

La gráfica muestra las actividades ATPasa totales en nmol de Pi/mg de proteína, obtenidas en tiempos de 5, 10, 15 y 30 min. # $P < 0.05$ respecto a R, mediante pruebas de T-Student (C N=7; C+S N=9; R N=6; R+S N=6)

La Figura 23 muestra las actividades insensibles a tapsigargina en los homogenados de VI de corazón de ratas. Como se puede observar en la gráfica no existen diferencias significativas entre las actividades de los grupos C, C+S y R+S, pero se presenta una disminución significativa (alrededor del 30%) en las actividades ATPasa insensibles a tapsigargina del grupo R con respecto al control.

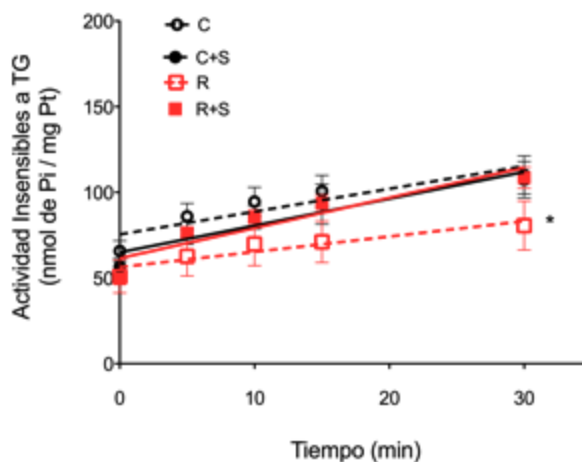


Figura 23. Actividades Insensibles a tapsigargina en homogenados de VI de corazón de rata.

La gráfica muestra las actividades ATPasa insensibles a tapsigargina en nmol de Pi/mg de proteína, obtenidas en tiempos de 5, 10, 15 y 30 min. se usó una concentración de 100 nM de tapsigargina. * $P < 0.05$ respecto a C, C+S y R+S mediante pruebas de T-Student (C N=7; C+S N=9; R N=6; R+S N=6)

7.4 Actividad ATPasa a diferentes concentraciones de Ca^{2+} libre

La actividad de ATPasa de la bomba SERCA ha sido evaluada mediante diversas técnicas, reportándose que se obtiene la mayor actividad a una concentración de 10 μM de Ca^{2+} libre; Realizamos curvas de dependencia de Ca^{2+} a seis concentraciones distintas, los datos obtenidos del grupo C y C+S se presentan en el gráfico de la Figura 24 y los parámetros cinéticos en la Tabla 7. Como se observa en la Figura 24, la máxima actividad de la bomba SERCA2a se establece entre 1 - 10 μM de Ca^{2+} libre. No se encontraron diferencias significativas en los parámetros cinéticos de las curvas comparadas.

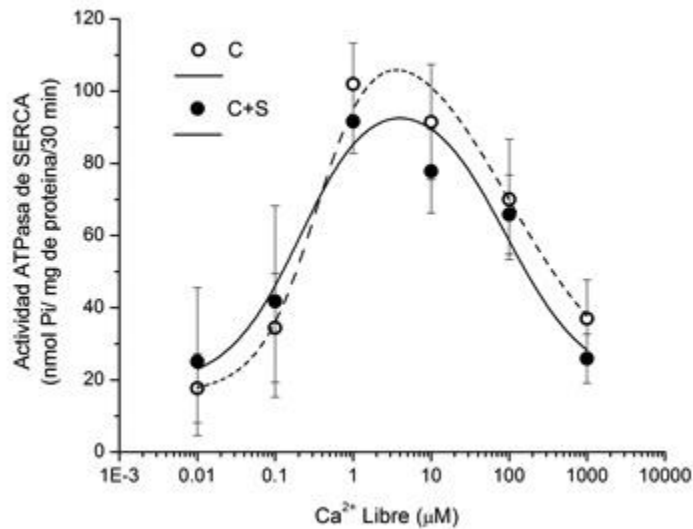


Figura 24. Curva de la actividad de la bomba SERCA2a a diferentes concentraciones de Ca^{2+} libre.

La Figura muestra la actividad ATPasa de la bomba SERCA2a en homogenados de VI de corazón a diferentes concentraciones de Ca^{2+} libre y a un tiempo de 30 min. La gráfica muestra el promedio \pm ee de N = 3.

Tabla 7. Parámetros cinéticos de las curva de actividad de ATPasa dependiente de Ca²⁺ de los grupos C y C+S.

Vmax: actividad enzimática máxima; Ka: constante de activación; Ki: constante de inactivación; na y ni coeficientes de Hill de activación e inactivación.

Grupo experimental	Vmax (nmol de Pi/mg de proteína/30 min)	Ka (μM)	na	Ki (μM)	ni	R ²
C	109.5	0.36	1.16	93	0.6	0.98
C+S	85.4	0.22	0.92	88	0.8	0.94

En la Figura 25 se ilustra el gráfico de los datos obtenidos de la actividad ATPasa, evaluada a diferentes concentraciones de Ca²⁺ libre y en la Tabla 8 se muestran los parámetros cinéticos de las curvas obtenidas. Al comparar las curvas obtenidas para los grupos R y RS, la máxima actividad ATPasa de ambos grupos estuvo en el rango de 1 - 10 μM.

Tabla 8. Parámetros cinéticos de las curva de actividad de ATPasa dependiente de Ca²⁺ de los grupos curva R y R+S.

Vmax: actividad enzimática máxima; Ka: constante de activación; Ki: constante de inactivación; na y ni coeficientes de Hill de activación e inactivación.

Grupos	Vmax (nmol de Pi/mg de proteína/30 min)	Ka (μM)	na	Ki (μM)	ni	R ²
R	47.64	0.38	2.6	104	0.96	0.95
RS	121.41	0.48	1.2	63	0.85	0.99

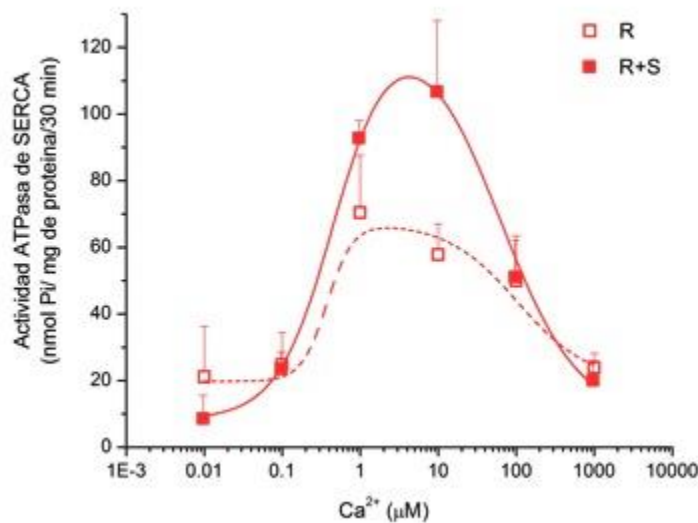


Figura 25. Curva de la actividad de la bomba SERCA2a a diferentes concentraciones de Ca²⁺ libre.

La Figura muestra la actividad ATPasa de la bomba SERCA2a en homogenados de VI de corazón a diferentes concentraciones de Ca²⁺ libre y a un tiempo de 30 min. la gráfica muestra el promedio de 3 experimentos diferentes \pm error estándar

7.5 Disminución de la expresión de SERCA2a por efecto de la desnutrición y la dieta alta en sacarosa.

Se cuantificó la expresión de la bomba SERCA2a mediante la técnica de Western Blot en homogenados de VI de corazón y se encontró disminuida entre un 40 al 45% en las condiciones C+S, R y R+S con respecto a los controles. Para todas las condiciones del WB se utilizaron 10 µg de homogenado, que fueron posteriormente transferidos a una membrana de PVDF y se incubaron con los anticuerpos primarios y secundarios como se indica en los materiales y métodos. Como control de carga se utilizó la proteína GAPDH.

La Figura 26 muestra una imagen representativa del WB que indica la expresión normalizada de SERCA2a con respecto al control.

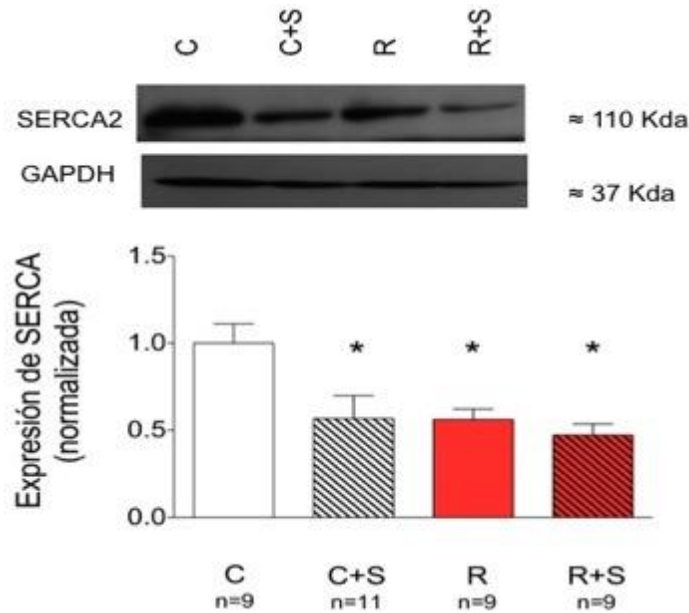


Figura 26. Expresión normalizada de la bomba SERCA2a en homogenados de VI
 Western Blot representativo de la expresión de SERCA2a normalizada con respecto al control; utilizando 10 µg de proteína. Se utilizó la proteína GAPDH como control de carga.

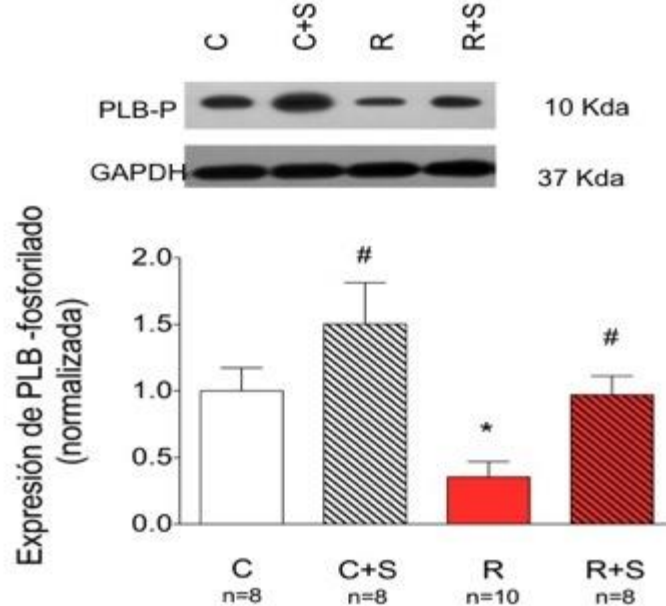


Figura 27. Expresión normalizada de fosfolamban fosforilado en homogenados de VI
 Western blot representativo de la expresión de PLN-P normalizada con respecto al control; se utilizaron 10 µg de proteína. El anticuerpo reconoce la fosforilación de PLN en el residuo de Serina¹⁶. Se utilizó la proteína GAPDH como control de carga.

La Figura 27 muestra una imagen representativa del WB de la expresión normalizada de PLN-P con respecto al control. Para el WB fueron utilizados 10 μg de homogenados, posteriormente fueron transferidos a una membrana de PVDF y se incubaron los anticuerpos primarios y secundarios indicados en los materiales y métodos. El anticuerpo utilizado para PLN reconoce la fosforilación en el residuo de serina¹⁶. El análisis densitométrico muestra un ligero aumento pero no significativo en el grupo C+S respecto a C y por otro lado indica un aumento significativo de 1.7 veces en el grupo R+S con respecto a R.

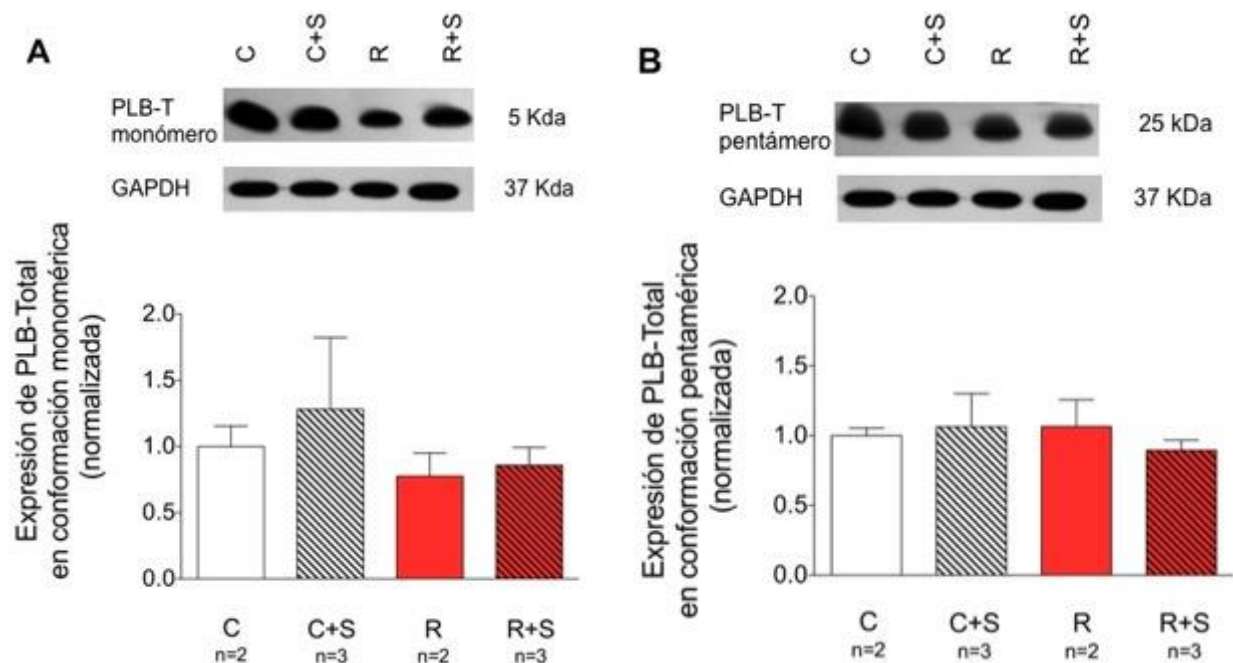


Figura 28. Expresión normalizada de fosfolamban total en homogenados de VI

Western blot representativo de la expresión de PLN-T normalizada con respecto al control; se utilizaron 10 μg de proteína. A: expresión de PLN-T en conformación de monómero; B: expresión de PLN-T en conformación de pentámero. Se utilizó GAPDH como control de carga.

La Figura 28 muestra un gráfico representativo del WB de la expresión normalizada de PLN-T con respecto al control, tanto en su conformación monomérica no fosforilada la cual ha sido propuesta como su forma activa la cual inhibe a la bomba SERCA, así como su conformación pentamérica que representa la forma fosforilada la cual retira la inhibición sobre la bomba SERCA. En ambos casos evaluados no se encontraron diferencias significativas.

8. DISCUSIÓN

El suministro de una dieta alta en sacarosa ha sido utilizado para desarrollar modelos experimentales que presentan alteraciones metabólicas que forman parte del SM en humanos. A estos modelos experimentales se les ha dado diferentes nombres dependiendo de las alteraciones metabólicas que se presentan: modelo de hipertrigliceridemia, hipertensión, estado prediabético, resistencia a la insulina, y de SM (Reaven *et al.*, 1979; Cárdenas *et al.*, 2006; Olguin *et al.*, 2015; Packard *et al.*, 2014; Chicco *et al.*, 2003; Pagliassotti *et al.*, 1996; Balderas-Villalobos *et al.*, 2013). En el presente trabajo los animales que recibieron sacarosa desarrollaron un incremento significativo en el contenido de grasa en la zona visceral de 0.78 y 0.5 veces (C+S y R+S) con respecto a los grupos C y R, e hipertrigliceridemia de 0.92 y 1.57 veces (C+S y R+S) con respecto al grupo C en un periodo de 6 meses lo cual está estrechamente asociado al desarrollo del SM (Björntorp 1993; Grundy 2005).

Así mismo, la HbA1c presentó incremento significativo (aproximadamente del 42.9%) en el grupo R+S, con respecto al grupo R ($6.0\% \pm 0.5$ en R+S, vs $4.2\% \pm 0.03$ en R; ver Tabla 6). Este parámetro refleja el promedio de glucosa en plasma en las últimas 8 a 12 semanas, donde se utilizan los siguientes criterios de diagnóstico en humanos: normal $< 5.7\%$ prediabetes $5.7 - 6.4\%$, diabetes $>6.5\%$ (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. NIH. 2014). Aunque no existe un consenso para determinar qué porcentaje de hemoglobina glicosilada correspondería a un valor normal, prediabético y diabético en roedores consideramos que estos incrementos en el porcentaje de hemoglobina glicosilada en el grupo R+S sugiere que los animales presentan un estado prediabético con resistencia a la insulina.

En cuanto a la actividad ATPasa de SERCA2a, se encontró que esta disminuyó de manera significativa en el grupo R (53% con respecto al control). Resultados similares se han observado en otros modelos, como lo reportado por Ramirez Oseguera *et al.*, 2013, quienes evaluaron la actividad de la bomba SERCA1a en un modelo de desnutrición gestacional. Cabe señalar que la restricción alimentaria empleada en este trabajo fue durante el periodo gestacional y continuó durante 6 meses después del nacimiento, y en el trabajo de Ramírez Oseguera la restricción alimentaria solo se llevó

a cabo durante el periodo gestacional y las ratas fueron sacrificadas inmediatamente después del nacimiento.

Por otro lado, observamos en el presente trabajo una disminución en la expresión proteica de la bomba SERCA en el modelo de desnutrición, contrario a lo reportado en el trabajo de Harvey *et al.*, 2015, en el cual encontraron que la expresión no se modifica en comparación con ratas control. Sin embargo, resulta necesario considerar que el modelo de desnutrición es distinto, ya que para este trabajo las ratas continuaron con restricción dietética durante 6 meses después de haber estado sometidas a desnutrición gestacional, y en el trabajo de Harvey *et al.*, sólo tuvieron restricción dietética durante la gestación, ya que posterior al nacimiento tuvieron acceso a una dieta balanceada control durante 12 semanas. El proceso crónico de desnutrición inducido en nuestro modelo podría explicar la menor expresión de la bomba SERCA.

Un mecanismo que podría explicar la disminución en la actividad de la bomba SERCA es que la expresión de proteínas disminuya al estar comprometida la ingesta de nutrientes.

La actividad de la bomba SERCA2a en el grupo de ratas C+S no se modificó en comparación con las ratas del grupo C, lo cual difiere con lo reportado en otros trabajos, donde también se utilizaron ratas alimentadas con sacarosa (Wold *et al.*, 2005; Balderas-Villalobos *et al.*, 2013). Considerando que la expresión de SERCA2a se encontró disminuida en el grupo C+S, esto indicaría que una menor cantidad de bomba está llevando a cabo la misma actividad que la observada en el grupo C. Los resultados de la medición de la fosforilación de PLN podrían explicar dicho incremento en la actividad, ya que se encontró una tendencia hacia una mayor fosforilación de este regulador, lo que conlleva a que se retire la inhibición que ejerce sobre la bomba SERCA2a.

Se ha reportado que existen cambios en la regulación de Ca^{2+} en alteraciones metabólicas moderadas, es decir, en etapas previas al establecimiento de patologías como la DMII (Wold *et al.*, 2005); sin embargo, en estas etapas tempranas del desarrollo de alteraciones, se recurre a mecanismos fisiológicos compensatorios para

mantener la capacidad contráctil (Miklos *et al.*, 2012). Por lo anterior, en el grupo C+S, la actividad conservada de la bomba SERCA2a a pesar de la disminución en su expresión, podría deberse a un mecanismo compensatorio para mantener la función cardíaca, involucrando vías que regulan el estado de fosforilación de PLN, el cual afecta directamente la afinidad de la bomba SERCA2a por Ca^{2+} .

En la cardiomiopatía diabética se ha observado que existe una prolongada relajación cardíaca, lo que se explica por una menor capacidad de recaptura de Ca^{2+} hacia el RS y se ha evidenciado una menor actividad y expresión de la bomba SERCA (Belke *et al.*, 2004; Zarain *et al.*, 2014). En los trabajos de Wold *et al.* (2005), y de Miklos *et al.* (2012), se ha propuesto que las alteraciones en la bomba SERCA inician desde etapas previas de la enfermedad, ocurriendo primero una disminución de la actividad sin afección en la expresión, y posteriormente al instaurarse la enfermedad, se afecta la expresión. En nuestro trabajo encontramos una menor expresión de la bomba SERCA2a pero con compensación en la actividad, lo cual podría diferir en el orden de alteraciones propuesto por Wold y Miklos, pero finalmente también definir una etapa previa a la posible instauración de una patología con manifestaciones más severas.

De manera interesante, en el caso del grupo de ratas R+S, se observó un incremento en la actividad de la bomba SERCA2a que fue de 1.6 veces respecto al valor correspondiente del grupo R, alcanzando los niveles de actividad observados en el grupo C. La mayor actividad podría deberse a que la resistencia periférica a la circulación de la sangre resultaría mayor en estas ratas, donde se encontró una disminución en la relación peso corazón/peso corporal debido al incremento en el peso por la ingestión de sacarosa, lo cual implicaría que el corazón realice mayor trabajo para bombear la sangre a un volumen corporal mayor. El incremento en la fosforilación de PLN podría ser el mecanismo fisiológico adaptativo para permitir esta mayor actividad de la bomba SERCA2a.

En el presente trabajo se postuló que la actividad de la bomba SERCA2a se encontraría reducida en los grupos C+S y R+S debido a que el estrés oxidativo inducido por glucosa en el corazón incrementa la nitración de SERCA2a en la cisteína⁶⁷⁴ y reduce su actividad (Zarain *et al.*, 2014), sin embargo, nuestros resultados muestran

que se presenta un incremento en la actividad de SERCA posiblemente como una compensación de la disminución en la expresión.

De manera general en nuestro estudio se observa una disminución en la expresión de SERCA2a, tanto inducida por desnutrición (R) como por dieta alta en sacarosa (C+S) o la combinación de ambos factores (R+S). En cuanto a los mecanismos moleculares que puedan explicar tal disminución en la expresión se encuentra el estrés del RS, el cual se puede inducir por la puesta en marcha de diversos factores, tales como la depleción de Ca^{2+} , la inhibición de la glicosilación, un mal plegamiento de proteínas por carencia de aminoácidos precursores, deprivación de energía o alguna interferencia con el entorno oxidativo del RS. En el grupo R existe una carencia de nutrientes importante; además en los grupos C+S y R+S se observó el desarrollo de hipertrigliceridemia, siendo los lípidos un conocido factor inductor de estrés del retículo (Hojmann *et al.*, 2001; Adachi *et al.*, 2004).

Se ha reportado que en la condición de estrés del retículo se incrementa la ubiquitinación y posterior degradación de la bomba SERCA en modelos de DMII (Takada *et al.* 2012).

Otro posible mecanismo implicado en la disminución de los niveles de proteína de SERCA es la N-glicosilación de la misma, modificación postraduccional que se ha reportado que induce una reducción en su expresión (Clark *et al.*, 2003; Bidasee *et al.*, 2004).

La desnutrición y la dieta alta en sacarosa ocasionaron una disminución de 0.5 veces en la expresión de SERCA2a, sin embargo, podrían modificar la proporción de las isoformas presentes en el corazón, lo cual modificaría la dependencia de Ca^{2+} en los ensayos de actividad, considerando que las diferentes isoformas de SERCA2 poseen distintas afinidades por este catión (Dally *et al.*, 2006).

Los ensayos de actividad de ATPasa se realizaron con una sola concentración de Ca^{2+} (10 μM), por lo que resultó necesario realizar otros ensayos en los cuales se probaron distintas concentraciones del catión (desde 0.01 μM hasta 1 mM) para evaluar

la dependencia de Ca^{2+} en la actividad de la SERCA2a, así como para conocer la concentración del catión en la cual se obtenía la mayor actividad de la bomba.

En todos los grupos de animales (C, C+S, R y R+S) se observó la mayor actividad de la bomba SERCA2a a la concentración de Ca^{2+} de 10 μM , y no se encontraron diferencias en la dependencia a la concentración del catión, pero si se evidenció una disminución en la V_{max} del grupo R+S de 2.5 veces con respecto a la V_{max} del grupo R.

Con la evidencia experimental obtenida en este trabajo y los posibles mecanismos involucrados se generó un esquema de la discusión que se presenta en la Figura 29.

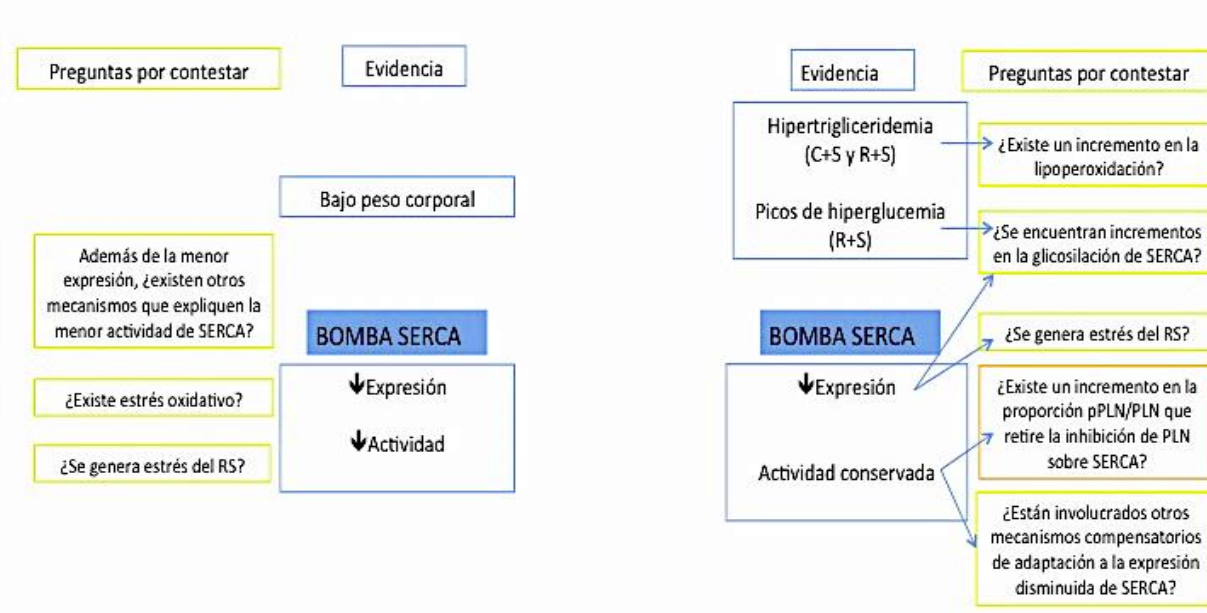
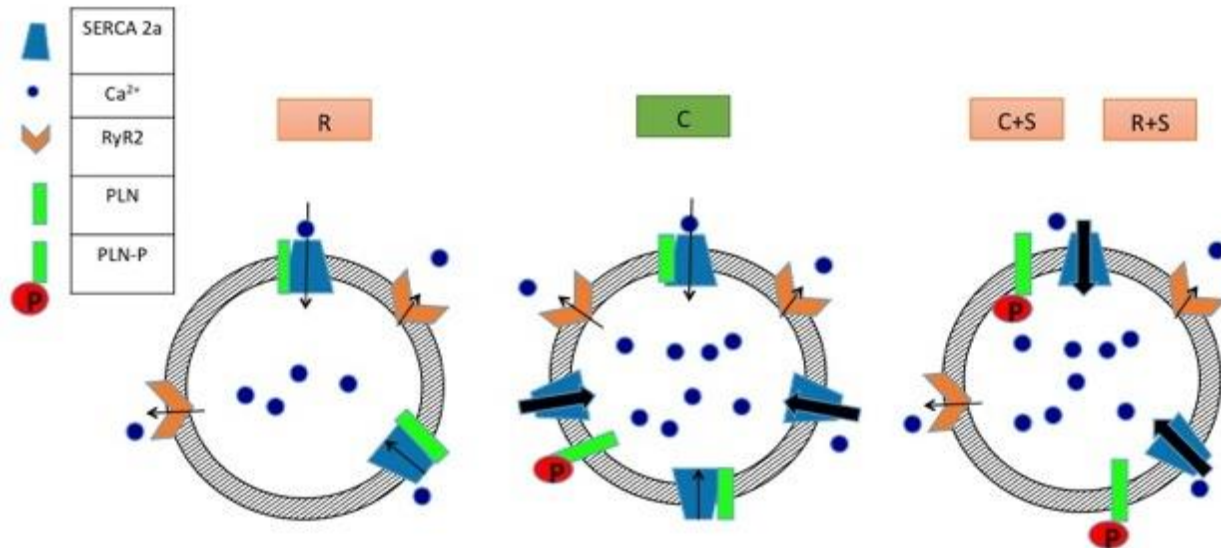


Figura 29. Esquema general de la discusión de resultados.

En la parte superior del esquema se representan vesículas obtenidas a partir de homogenados de VI de corazón, en donde en el grupo R encontramos una menor expresión de la bomba SERCA2a y una menor actividad; De manera interesante en los grupos que se les administró sacarosa C+S y R+S a pesar de que encontramos una menor expresión de la bomba SERCA2a, la actividad ATPasa de la bomba se recupera en un porcentaje similar al grupo C esto podría explicarse por mecanismos compensatorios como el incremento en la fosforilación de PLN, el principal modulador de la actividad de la bomba SERCA, sin embargo, podrían investigarse otros mecanismos los cuales se proponen en el esquema de la parte inferior para completar los hallazgos en este trabajo.

9. CONCLUSIONES

- Los animales que fueron sometidos a desnutrición prenatal R presentaron una reducción en el peso en un 50% con respecto a los controles, estos recuperaron peso durante el consumo de sacarosa R+S al nivel del grupo de animales C, al examinar el peso del corazón se encontró que en el grupo R+S la relación de peso corporal/peso corazón se encontraba disminuida, además desarrollaron mayor contenido de grasa abdominal, hipertrigliceridemia e indicios de resistencia a la insulina evidenciado por el aumento en la HbA1c, todos estos factores de riesgo reportados como componentes del SM
- La actividad y expresión de la bomba SERCA2a disminuye en ratas con desnutrición pre y postnatal (grupo R).
- Las ratas del grupo R+S recuperan los niveles de actividad enzimática de la bomba SERCA observados en animales del grupo C, aun cuando la expresión de la bomba SERCA permanece disminuida.
- No se encontraron cambios en la actividad enzimática entre el grupo C y el grupo al que se le administró sacarosa durante 6 meses (C+S) aun cuando la expresión de la bomba SERCA si se encontró reducida en un 45%
- La expresión proteica de la bomba SERCA2a disminuyó en los grupos C+S, R y R+S en el rango de 40 al 45% con respecto al grupo C.
- Los niveles de PLN-P mostraron un incremento significativo en el grupo R+S con respecto al grupo R, pero solo una tendencia a incrementar el grupo C+S con respecto al grupo C.

- La actividad enzimática óptima de la bomba SERCA2a se encontró en el rango de 1 a 10 μM de Ca^{2+} libre, y la dependencia a Ca^{2+} de la activación y la inactivación fue similar en todos los grupos experimentales.

Los cambios en la dieta disminuyen la expresión de la bomba SERCA, y de manera interesante, esto no necesariamente se refleja en una disminución de su actividad enzimática, ya que se encontró una recuperación en la velocidad inicial de reacción en los grupos que recibieron una dieta alta en sacarosa; esto puede explicarse por mecanismos compensatorios como el incremento en la fosforilación de PLN, el principal modulador de la actividad de la bomba SERCA.

10. PERSPECTIVAS

- Aumentar la N en los experimentos para evaluar la expresión proteica de PLN total
- Evaluar los niveles de RNAm de SERCA2a y PLN
- Examinar si existe un incremento de la lipoperoxidación en las ratas alimentadas con sacarosa
- Evaluar marcadores de estrés del retículo como IRE1 y PERK en condiciones de desnutrición y/o de dieta alta en sacarosa
- Realizar ensayos de tolerancia a la glucosa para evaluar el estado de resistencia a la insulina

11. REFERENCIAS

- Allen L. *Biological mechanisms that might underlie ironis effects on fetal growth and preterm birth. J Nutr* 2001; 131:2S-II
- Abrar Shareef M., Anwer L., Poizat C. *Cardiac SERCA2A/B: Therapeutic targets for heart failure. European Journal of Pharmacology* 724, 2014; 1–8
- Adachi T., Weisbrod R., Pimentel D., Ying J., Sharov V., Schöneich C., Cohen R. *S-Glutathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide. Nat Med.* 2004; 10(11):1200-7
- Alexander CM., Landsman PB., Teutsch SM., Haffner SM; *Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III); National Cholesterol Education Program (NCEP). NCEP-defined metabolic syndrome, diabetes, and prevalence of coronary heart disease among NHANES III participants age 50 years and older. Diabetes.* 2003; 52(5): 1210-4
- Arsenault BJ., Boekholdt SM., Kastelein JJ. *Lipid parameters for measuring risk of cardiovascular disease. Nat Rev Cardiol.* 2011; 8(4): 197-206
- Babu G.J., Zheng Z., Natarajan P., Wheeler D., Janssen P., Periasamy M. *Overexpression of sarcolipin decreases myocyte contractility and calcium transient. Cardiovasc. Res.* 2005; 65(1): 177–186
- Balderas-Villalobos J., Molina-Muñoz T., Mailloux-Salinas P., Bravo G., Carvajal K., Gómez-Viquez N. *Oxidative stress in cardiomyocytes contributes to decreased SERCA2a activity in rats with metabolic syndrome. Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013; 305 H1344–H1353
- Bartolommei G, Moncelli MR, Tadini-Buoninsegni F. *A Method to Measure Hydrolytic Activity of Adenosinetriphosphatases (ATPases). PloS ONE* 2013; 8(3): e58615
- Belke D., Dillmann W. *Altered cardiac calcium handling in diabetes. Current Science Inc.* 2004; 6: 424

- Bers D. Calcium Fluxes Involved in Control of Cardiac Myocyte Contraction *Circ Res.* 2000; 87:275-281

- Bers D. Altered Cardiac Myocyte Ca Regulation In Heart Failure. *Physiology (Bethesda)*. 2006; 21:380-7

- Bers D. Cardiac Sarcoplasmic Reticulum Calcium Leak: Basis and Roles in Cardiac Dysfunction. *Annu. Rev. Physiol.* 2014; 76:107-127

- Bhupathy, P., Babu, G.J., and Periasamy, M. Sarcolipin and phospholamban as regulators of cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2007; 42(5): 903–911

- Bhupathy P., Babu G.J., Ito M., Periasamy M. Threonine-5 at the N-terminus can modulate sarcolipin function in cardiac myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2009; 47(5): 723–729

- Bidasee K., Zhang Y., Shao C., Wang M., Patel K., Dincer U., Besch H. Jr. Diabetes Increases Formation of Advanced Glycation End Products on Sarco(endo)plasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase. *Diabetes.* 2004; 53(2):463-73

- Björntorp P. Visceral obesity: a "civilization syndrome" *Obes Res.* 1993; 1(3):206-22

- Boknik P., Unkel C., Kirchhefer U., Kleideiter U., Klein-Wiele O., Knapp J., et al. Regional expression of phospholamban in the human heart. *Cardiovasc. Res.* 1999; 43(1): 67–76

- Brandl CJ., de Leon S., Martin DR., MacLennan DH. Adult forms of the Ca²⁺ ATPase of sarcoplasmic reticulum. Expression in developing skeletal muscle. *J Biol Chem* 1987; 262: 3768–3774

- Brini M., Carafoli E. Calcium Pumps in Health and Disease. *Physiol Rev* 89 2009; 1341–1378

- Campbell A.M., Kessler P.D., Fambrough D.M. The alternative carboxyl termini of avian cardiac and brain sarcoplasmic reticulum/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases are on opposite sides of the membrane. *J.Biol.Chem.* 1992; 267, 9321–9325.

- Campbell A.M., Kessler P.D., Sagara Y., Inesi G., Fambrough D.M. Nucleotide sequences of avian cardiac and brain SR/ER Ca^{2+} -ATPases and functional comparisons with fast twitch Ca^{2+} -ATPase. Calcium affinities and inhibitor effects. *J.Biol.Chem.* 1991; 266,16050–16055

- Cárdenas G., Torres J.C., Zamora J., Pérez I., Baños G. Isolated Heart Function after Ischemia and Reperfusion in Sucrose-Fed Rats: Influence of Gender and Treatment. *Clinical and Experimental Hypertension* 2006; 28:85–107

- Chemaly E.R., Bobe R., Adnot S., Hajjar R., Lipskaia L., Sarco (Endo) Plasmic Reticulum Calcium Atpases (SERCA) Isoforms in the Normal and Diseased Cardiac, Vascular and Skeletal Muscle. *J Cardiovasc Dis Diagn.* 2013; 1:113

- Chicco A., D'Alessandro M., Karabatas L., Pastorale C., Basabe J., Lombardo Y. Muscle Lipid Metabolism and Insulin Secretion Are Altered in Insulin-Resistant Rats Fed a High Sucrose Diet. *J. Nutr.* 2003; vol. 133 no. 1 127-133

- Clark R., McDonough P., Swanson E., Trost S., Suzuki M., Fukuda M., Dillmann W. Diabetes and the Accompanying Hyperglycemia Impairs Cardiomyocyte Calcium Cycling through Increased Nuclear O-GlcNAcylation. *J Biol Chem.* 2003; 278 (45): 44230-7

- Dally S., Bredoux R., Corvazier E., Andersen J., Clausen J., Dode L., FanchaouY M., Gelebart P., Monceau V., Del Monte F., Gwathmey J., Hajjar R., Chaabane C., Bobe R., Raies A., Enouf J. Ca^{2+} -ATPases in non-failing and failing heart: evidence for a novel cardiac sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 2 isoform (SERCA2c). *Biochem. J.* 2006; 395, 249–258

- De Meis L., Vianna A. Energy interconversion by the Ca^{2+} dependent ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Ann. Rev. Biochem.* 1979. 48:275-92

- Dincer U. Cardiac ryanodine receptor in metabolic syndrome: is JTV519 (K201) future therapy? *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* 2012; 5:89-99

- Dode L., Andersen J.P., Leslie N., Dhitavat J., Vilsen B., Hovnanian A. Dissection of the Functional Differences between Sarco(endo)plasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) 1 and 2 Isoforms and Characterization of Darier Disease (SERCA2) Mutants by Steady-state and Transient Kinetic Analyses. *J Biol Chem.* 2003; 278(48): 47877-89

- Ezzati M, Lopez AD, Dogers A, Vander HS, Murray CJ. Selected major risk factors and global and regional burden of disease. *Lancet* 2002;360:1347-60

- Fernández-Miranda G. Efecto de la rosiglitazona en la expresión y regulación del receptor de rianodina cardíaco y la bomba SERCA en el síndrome metabólico. Proyecto de tesis doctoral Departamento de Bioquímica, Cinvestav-IPN, Ciudad de México, México. (2013)

- Fernandez-Twinn D.S., Ozanne S.E., Ekizoglou S., Doherty C., James L., Gusterson B., Hales C.N. The maternal endocrine environment in the low-protein model of intra-uterine growth restriction. *Br J Nutr.* 2003; 90(4): 815-22.

- Fernandez-Twinn D.S., Ozanne S.E. Mechanisms by which poor early growth programs type-2 diabetes, obesity and the metabolic syndrome. *Physiology & Behavior* 88 (2006) 234–243

- Fernández-Velasco M., Ruiz-Hurtado G., Rueda A., Neco P., Mercado-Morales M., Delgado C., Napolitano C., Priori S.G., Richard S., Gómez A.M., Benitah JP. RyRCa²⁺ leak limits cardiac Ca²⁺ window current overcoming the tonic effect of calmodulin in mice. *PLoS One.* 2011; 6(6): e20863

- Frank K., Bolck B., Erdmann E., Schwinger R. Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase modulates cardiac contraction and relaxation. *Cardiovascular Research* 57 2003; 20–27

- Fredersdorf S., Thumann C., Zimmermann W., Vetter R., Graf T., Luchner A., Riegger G., Schunkert H., Eschenhagen T., Weil J. Increased myocardial SERCA expression in early type 2 diabetes mellitus is insulin dependent: In vivo and in vitro data. *Cardiovascular Diabetology* 2012; 11:57

- Gelebart P., Martin V., Enouf J., Papp B. Identification of a new SERCA2 splice variant regulated during monocytic differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 303:676–684

- Graham I., Cooney M.T., Bradley D., Dudina A., Reiner Z. Dyslipidemias in the Prevention of Cardiovascular Disease: Risks and Causality. *Curr Cardiol Rep* 2012; 14:709–720

- Grundy S. Hypertriglyceridemia, Atherogenic Dyslipidemia, and the Metabolic Syndrome. *Am J Cardiol* 1998; 81(4A):18B–25B

- Grundy S., Becker D., Clark L., Cooper R., Denke M. et al., members of ATP III (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*. 2002; 106(25):3143-421

- Grundy S., Brewer b., Cleeman J., Smith S., Lenfant C. Definition of Metabolic Syndrome. *Circulation*. 2004; 109:433-438

- Grundy S., Cleeman J., Daniels S., Donato K., Eckel R., Franklin B., Gordon D., Krauss R., Savage P., Smith S., Spertus J., Costa F. Diagnosis and Management of the Metabolic Syndrome. *Circulation*. 2005; 112:2735-2752

- Gutiérrez JP., Rivera J., Shamah T., Villalpando S., Franco A., Cuevas L., Romero M., Hernández M. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. 2012; Instituto Nacional de Salud Pública (MX)

- Hales CN., Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*. 1992; 35(7): 595-601

- Harvey T.J., Murphy R.M., Morrison J.L., Posterino G.L. Maternal Nutrient Restriction Alters Ca²⁺ Handling Properties and Contractile Function of Isolated Left Ventricle Bundles in Male But Not Female Juvenile Rats. *PLoS ONE*. 2015 10(9):1-18

- Hojmann A., Frandsen A., Treiman M. Upregulation of the SERCA-type Ca²⁺ pump activity in response to endoplasmic reticulum stress in PC12 cells. *BMC Biochemistry* (2001) 2:4

- INEGI, Registros administrativos de mortalidad y morbilidad 2013. Consultado el 20 de Mayo de 2016. Disponible en URL: <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/>

- Kang S., Dahl R., Hsieh W., Shin A., Zsebo K., Buettner C., Hajjar R., Lebeche D. Small Molecular Allosteric Activator of the Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) Attenuates Diabetes and Metabolic Disorders. *J Biol Chem*. 2016; 291(10): 5185-98

- Kobayashi C., Koike R., Ota M., Sugita Y. Hierarchical domain-motion analysis of conformational changes in sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *Proteins* 2015; 83:746–756

- Koss K.L., Ponniah S., Jones W.K., Grupp I.L., and Kranias E.G. Differential phospholamban gene expression in murine cardiac compartments. *Molecular and physiological analyses. Circ. Res.* 1995; 77(2): 342–353

- Kranias E., Hajjar R. Modulation of Cardiac Contractility by the Phospholamban/SERCA2a Regulatome. *Circ Res.* 2012; 110:1646-1660

- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227, 680-685

- Levitzki A. From epinephrine to cyclic AMP. *Science*, 1988; 241(4867): 800–806

- Ligeti L., Szenczi O., Prestia C., Szab C., Horvath K., Marcsek Z., Van Stiphout R., Van Riel N., Buijs J., Van der Vusse G., Ivanics T. Altered calcium handling is an

early sign of streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy. *International Journal of Molecular Medicine* 2006; 17: 1035-1043

- Little R., Sacks D., Path F., Pogach L., Aron D., Stokes L. *The A1C Test and Diabetes*. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. NIH Publication 2014; No. 14–7816

- Liu Y., Cheng X., Zhang T., Lee S., Yamauchi J., Xiao X., Gittes G., Qu S., Jiang C., Dong H. *Effect of Hypertriglyceridemia on Beta-Cell Mass and Function in ApoC3 Transgenic Mice*. *J Biol Chem* 2016; 291(28):14695-705

- Lowry O., Rosebrough N., Farr L., Randall R. *Protein measurement with the folin phenol reagent*. *J. Biol. Chem.* 1951; 193:265-275

- Lytton J. and MacLennan D. *Molecular cloning of cDNAs from human kidney coding for two alternatively Spliced Products of the Cardiac Ca²⁺-ATPase Gene*. *J Biol Chem*. 1988 Oct 15; 263(29): 15024-31

- Lytton J., Westlin M., Burk S., Shull G., MacLennan D. *Functional Comparisons between Isoforms of the Sarcoplasmic or Endoplasmic Reticulum Family of Calcium Pump*. *J Biol Chem*. 1992; 267(20): 14483-9

- MacLennan D.H., Holland P. *Calcium transport in Sarcoplasmic Reticulum*. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 1975; 4:377-404

- MacLennan D.H., Asahi M., Tupling R. *The regulation of SERCA –type pumps by Phospholamban and Sarcolipin*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2003; 472-480

- MacLennan D.H., and Kranias E.G. *Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility*. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003 4(7): 566–577

- Martonosi A., Pikula S. *The structure of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum*. *Acta Biochim Pol.* 2003; 50(2): 337-65

- Meissner G., Rios E., Tripathy A., Pasek D. Regulation of Skeletal Muscle Ca²⁺ Release Channel (Ryanodine Receptor) by Ca²⁺ and Monovalent Cations and Anions. *J Biol Chem.* 1997; 272(3): 1628-38

- Mcmillen I.C., Robinson J.S. Developmental Origins of the Metabolic Syndrome: Prediction, Plasticity, and Programming. *Physiol Rev* 2005; 85: 571–633

- Michelangeli F. and East J.M. A diversity of SERCA Ca²⁺ pump inhibitors. *Biochem Soc Trans.* 2011; 39(3): 789-97

- Miklós Z., Kemecei P., Biró T., Marincsak R., Tóth B.I., Op denBuijs J., Benis E., Drozgyik A., Ivanics T. Early cardiac dysfunction is rescued by upregulation of SERCA2a pump activity in a rat model of metabolic syndrome. *Acta Physiol* 2012; 205, 381–393

- Minamisawa S., Wang Y., Chen J., Ishikawa Y., Chien K.R., Matsuoka, R. Atrial chamber-specific expression of sarcolipin is regulated during development and hypertrophic remodeling. *J. Biol. Chem.* 2003 278(11): 9570-9575

- Neel V. J. Diabetes Mellitus: A “Thrifty” Genotype Rendered Detrimental by “Progress”? *Am J Hum Genet.* 1962 Dec; 14(4): 353–362

- Olguin M.C., Posadas M.D., Revelant G., Labourdette V., Marinozzi D., Venezia M., Zingale M. Efectos del consumo elevado de fructosa y sacarosa sobre parámetros metabólicos en ratas obesas y diabéticas. *Rev Chil Nutr* 2015; Vol. 42, N°2 pp. 151-156

- Packard A., Ghosal S., Herman J., Woods S., Ulrich-Lai Y. Chronic variable stress improves glucose tolerance in rats with sucrose-induced prediabetes. *J. Psyneuen.* 2014; 47, 178-188

- Pagliassotti M., Prach P., Koppenhafer T., Pan D. Changes in insulin action, triglycerides, and lipid composition during sucrose feeding in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1996; 271:R1319-R1326

- Patton C., Bers D., Nuccitelli R. A Practical Guide to the Preparation of Ca²⁺ Buffers, *Methods in Cell Biology* 2010, Volume 99, p1-26; Maxchelator

Ca/Mg/ATP/EGTA Calculator v1 constants from Theo Schoenmakers' Chelator disponible en URL: maxchelator.stanford.edu

- Periasamy M., Kalyanasundaram A. *SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. Muscle Nerve* 35 2007: 430–442

- Periasamy, M., Bhupathy, P., and Babu, G.J. *Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase pump expression and its relevance to cardiac muscle physiology and pathology. Cardiovasc. Res.* 2008; 77(2): 265–273

- Phillips D., Jones A., Goulden P. *Birth Weight, Stress, and the Metabolic Syndrome in Adult Life. Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2006; 1083: 28–36

- Ramírez-Oseguera R. T., Jiménez-Garduño A. M., Álvarez R., Heine K., Pinzón-Estrada E., Torres-Saldaña I., Ortega A. *Gestational undernourishment modifies the composition of skeletal muscle transverse tubule membranes and the mechanical properties of muscles in newborn rats. Cell Physiol Biochem.* 2013; 32:1024-1039

- Rasmussen U., Broogger Christensen S., Sandberg F. *Thapsigargin and thapsigargin, two new histamine liberators from Thapsia garganica L. Acta Pharm. Suec.* 1978; 15,133–140

- Ravelli A., Van der Meulen J., Osmond C., Barker D, Bleker O. *Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. Am J Clin Nutr* 1999; 70:811–16

- Reiner Z., Catapano AL., De Backer G., Graham I., Taskinen MR., Wiklund O., et al. *ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias: the Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). Eur Heart J.* 2011; 32:1769–818

- Reaven G., Risser T., Ida Chen Y-D. Reaven E. *Characterization of a model of dietary-induced hypertriglyceridemia in young, nonobese rats. J. Lipid Res.* 1979; 20: 371-378.

- Reaven G. *Role of insulin resistance in human disease (Syndrome X): an expanded definition. Annu. Rev. Med.* 1993; 44:121-31

- Reyes, J.L., Zarain, A. *Función del retículo sarcoplásmico y su papel en las enfermedades cardíacas. Arch Cardiol Mex* 2006; 76: S4, 18-32

- Rueda A., de Alba-Aguayo D., Valdivia H. *Receptor de rianodina, fuga de calcio y arritmias. Arch. Cardiol. Méx.* 2014; vol.84 no.3

-Schwinger R., Böhm M., Schmidt U., Karczewski P., Bavendiek U., Flesch M., Krause E., Erdmann E. *Unchanged Protein Levels of SERCA II and Phospholamban but Reduced Ca Uptake and Ca ATPase Activity of Cardiac Sarcoplasmic Reticulum From Dilated Cardiomyopathy Patients Compared With Patients With Nonfailing Hearts. Circ.ahajournals.* 1995; 92: 3220-3228

- Sedaghat K, Zahediasl S, Ghasemi A. *Intrauterine programming. Iran J Basic Med Sci* 2015; 18: 212-220

- Stammers A.N., Hamm N.C., Hlynsky M.W., Kimber D.E., Kehler D.S. *The regulation of sarco(endo)plasmic reticulum calcium-ATPases (SERCA). Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2015; 93: 843–854

- Takada A., Miki T., Kuno A., Kouzu H., Sunaga D., Itoh T., Tanno M., Yano T., Sato T., Ishikawa S., Miura T. *Role of ER Stress in Ventricular Contractile Dysfunction in Type 2 Diabetes. PLoS ONE* 2012; 7(6): e39893

- Thastrup O., Cullen P., Drobak B., Hanley M., Dawson A. *Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; Vol. 87, pp. 2466-2470

- Toyoshima C., Nakasako M., Nomura H., Ogawa H. *Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. Nature.* 2000; 405(6787):647-55

- Treiman M., Caspersen C., Christensen S. A tool coming of age: thapsigargin as an inhibitor of sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases. *Trends Pharmacol Sci.* 1998; 19(4): 131-5

- Tsien R.W. Cyclic AMP and contractile activity in heart. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 1977; 8: 363–420

- Vangheluwe P., Raeymaekers L., Dode L., Wuytack F. Modulating Sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} ATPase 2 (SERCA2) activity: Cell biological implications. *Cell Calcium.* 2005; 38(3-4): 291-302

- Vangheluwe P., Sipido K.R., Raeymaekers L., Wuytack F. New perspectives on the role of SERCA2's Ca^{2+} affinity in cardiac function. *Biochimica et Biophysica Acta* 1763 2006; 1216–1228

- Valsamakis G., Kanaka-Gantenbein C., Malamitsi-Puchner A., Mastorakos G. Causes of Intrauterine Growth Restriction and the Postnatal Development of the Metabolic Syndrome. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2006; 1092: 138–147

- Williams A., Aggett P., Anderson A., Fraser R., Jackson A., Key T., Ong K., Prentice A., Robinson S., Walsh. Members of Scientific Advisory Committee on Nutrition. *The influence of maternal, fetal and child nutrition on the development of chronic disease in later life.* 2011; ISBN: 9780108510649. Public Health England. Consultado: 10 Julio 2016. Disponible en URL: [https://www.gov.uk/government/uploads/.../SACN Early Life Nutrition Report.pdf](https://www.gov.uk/government/uploads/.../SACN_Early_Life_Nutrition_Report.pdf)

- Wold L., Dutta K., Mason M., Ren J., Cala S., Schwanke M., Davidoff A. Impaired SERCA function contributes to cardiomyocyte dysfunction in insulin resistant rats. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2005; 39 297–307

- World Health Organization, Fact sheet. Consultado en mayo de 2016. Disponible en URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>

- Wu K., Lee W., Wey J., Bungard D., Lytton J. Localization and quantification of endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase isoforms transcripts. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 1995; 269 (38): C775-C784

- Zarain H., García G., Estrada R. Regulation of SERCA pumps expression in diabetes. *Cell calcium* 56. 2014; 302-310

- Zhong Y., Ahmed S., Grupp I., Matlib M. Altered SR protein expression associated with contractile dysfunction in diabetic rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281: H1137–H1147