



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

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**ADIPONECTINA Y SU RELACIÓN CON ALTERACIONES DE LA BOMBA SERCA Y  
DEL RECEPTOR DE RIANODINA EN CORAZÓN DE ANIMALES CON SÍNDROME  
METABÓLICO**

TESIS

Que presenta

**Lic. en Q. Tatiana Romero García**

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS**

En la especialidad de

**BIOQUÍMICA**

**Directora de la Tesis:** Dra. Angélica Rueda y Sánchez de la Vega

México, Distrito Federal.

Agosto de 2015

**El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Bioquímica del Cinvestav-IPN, Unidad Zacatenco, bajo la dirección de la Dra. Angélica Rueda y Sánchez de la Vega, y con la ayuda experimental de la QBP Martha Mercado Morales, quien optimizó la técnica de Western Blots para adiponectina, receptor de rianodina y bomba SERCA; así como con la asistencia técnica de Juan Carlos García Torres para el cuidado y manejo de los grupos experimentales. Durante el desarrollo del mismo la estudiante fue becaria del CONACYT con el número 295776.**

**Las muestras con [<sup>3</sup>H]rianodina fueron filtradas en el equipo Brandel del Dr. José Antonio Arias Montano (Depto. de Fisiología, Biofísica y Neurociencias) a quien le agradecemos su apoyo, así como su amable ayuda para el análisis estadísticos de los datos y la mejor representación gráfica de los mismos.**

**Por último, agradecemos la generosidad de la Dra. Beatriz Xoconostle (Depto. de Biotecnología) quien nos permitió usar el equipo Rotor Gene 6000 (Corbett) en innumerables ocasiones para las qPCRs.**

Quiero agradecer a mi mamá por ser el mejor ejemplo de fortaleza, constancia, perseverancia y tenacidad, por darme fuerza cuando sentía que no podía más; a mis hermanos por alegrarme con sus mensajes; a mi mamita y tíos por su preocupación, amor y apoyo incondicional a pesar de la distancia, los amo infinitamente, todos ustedes hacen que cada esfuerzo valga la pena.

A la doctora Rueda, por la paciencia, por sus enseñanzas y apoyo constante. La considero un gran ejemplo a seguir.

A MartiCa por darme mucho más que apoyo académico, por ser consejera, consentirme y regañarme, tienes un lugar inmenso en mi corazón. A Juan Carlos por su paciencia y por las risas. A mis Compañeros del Laboratorio por toda su ayuda.

A mis amigos, Lu por estar siempre, Gato por mostrarme el camino a este lugar y Mafe por entender lo difícil de todo esto. Los llevo siempre conmigo, sin importar donde se encuentren.

A Gus, por todo su apoyo en las buenas y en las malas, por las enseñanzas, por su amor y por la infinitísima paciencia.

A mis compañeros de generación, por toda su ayuda en las clases, por las risas y todos los buenos momentos, en especial a Adrian por ser incondicional.

**“In its encounter with nature, science invariably elicits a sense of reverence and awe. The very act of understanding is a celebration of joining, merging, even if on a very modest scale, with the magnificence of the Cosmos.”**

***Carl Sagan***

# ÍNDICE

	Pág.
ABREVIATURAS	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	
1.1 Función biológica y estructura de la adiponectina	1
1.1.2. Sistema local de adiponectina en corazón	6
1.2 Síndrome Metabólico	7
1.2.1 Patogénesis del Síndrome Metabólico	9
1.2.1.1 Obesidad	9
1.2.1.2 Resistencia a insulina	10
1.2.1.3 Dislipidemia aterogénica	10
1.2.1.4 Hipertensión	11
1.2.1.5 Riesgo cardiovascular y adiponectina	11
1.3 Músculo Cardíaco	13
1.4 Receptor de Rianodina	15
1.5 Bomba ATPasa de Ca <sup>2+</sup> del retículo sarcoplásmico	18
<b>2. ANTECEDENTES</b>	21
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	26
<b>4. HIPÓTESIS</b>	26
<b>5. OBJETIVO GENERAL</b>	27
5.1 Objetivos particulares	27
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	28
6.1 Animales y tratamiento	28
6.2 Determinación de adiponectina en suero	29
6.3 Extracción de RNA total	30
6.4 Transcripción inversa	31
6.5 PCR Cuantitativa en tiempo real	32
6.6 Homogenados de ventrículo izquierdo de corazón	32
6.7 Cuantificación de proteína	33
6.8 Electroforesis	33
6.9 Western Blot	34
6.10 Ensayo de Actividad ATPasa de SERCA	35
6.11 Ensayo de unión a [ <sup>3</sup> H] rianodina	36
6.12 Análisis Estadístico	37
<b>7. RESULTADOS</b>	38
7.1 Presencia de características del SM a partir de los 2 meses de tratamiento.	38
7.2 Los machos y hembras que presentan características asociadas al SM muestran diferencias en los parámetros corporales.	43
7.3 La expresión y actividad del RyR2 no se altera con el	

desarrollo del SM.	45
<b>7.4</b> La actividad de la bomba SERCA2 disminuye al progresar el SM.	47
<b>7.5</b> La adiponectina que se expresa en corazón puede presentar variaciones respecto a la proveniente de adipocitos.	50
<b>7.6</b> Hay un sistema local de adiponectina en corazón que se altera en el SM.	53
<b>8. DISCUSIÓN</b>	55
<b>9. CONCLUSIONES</b>	63
<b>10.PERSPECTIVAS</b>	64
<b>11.BIBLIOGRAFÍA</b>	65

## **ABREVIATURAS**

**AdipoQ** Adiponectina

**AEC** Acoplamiento excitación contracción

**AMP** Adenosina monofosfato

**AMPK** Cinasa de proteínas activada por AMP

**DEPC** Dietilpirocarbonato

**DHPR** Receptor a dihidropiridinas, canal de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de voltaje tipo L

**HDL** lipoproteínas de alta densidad

**HMW** Adiponectina de alto peso molecular

**HRP** Peroxidasa de rábano

**HTG** Hipertrigliceridemia

**LDL** lipoproteínas de baja densidad

**Mr** Peso molecular aparente

**NO** Óxido nítrico

**PKA** Proteína cinasa A

**PLB** Fosfolamban

**PMCA** Bomba ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática

**qPCR** PCR cuantitativa en tiempo real

**RI** Resistencia a insulina

**RS** Retículo sarcoplásmico

**RyR** Receptor de rianodina

**RyR2** Receptor de rianodina cardiaco

**SERCA** Bomba ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico

**SM** Síndrome metabólico

**TBE** Buffer Tris-Borato-EDTA

**TCEP** tris-(2-carboxietil) fosfina clorhidrato

**VI** Ventrículo izquierdo del corazón

**VLDL** lipoproteínas de muy baja densidad

## RESUMEN

El síndrome metabólico (SM) comprende una serie de alteraciones fisiológicas y bioquímicas que producen diversos problemas de salud de alta incidencia en México, como la diabetes y las enfermedades cardiovasculares. La obesidad es la manifestación principal del SM y se relaciona con el aumento en la liberación de diversas citocinas proinflamatorias. Paradójicamente, la adiponectina que es una citocina cardioprotectora y cuya producción en tejido adiposo varía dependiendo del género (es mayor en hembras), disminuye en los individuos obesos, lo que se ha asociado con la aparición de alteraciones cardiovasculares. Como parte de su acción cardioprotectora, se ha observado, en experimentos *in vitro*, que el tratamiento con adiponectina de cardiomiocitos de rata neonata favorece la recuperación de la actividad de la bomba SERCA cardiaca.

Por lo anterior, consideramos de gran interés determinar si las posibles variaciones en la expresión y función de la bomba SERCA y del receptor de rianodina cardiaco (RyR2) se relacionan con cambios en la expresión de adiponectina, durante el desarrollo del SM. Para ello, a ratas *Wistar* (machos y hembra) recién destetadas se les administró azúcar al 30% como agua de bebida, durante 2, 4 y 6 meses. Nuestros resultados muestran que las características del SM se evidenciaron en etapas más tempranas y con mayor contundencia en los machos que en las hembras. En el caso del RyR, observamos un incremento significativo en su actividad funcional únicamente en los machos después de 6 meses de tratamiento, sin que esto se reflejara en un aumento en los niveles de mRNA o proteína del RyR. En las hembras no se encontraron alteraciones funcionales o de expresión de este canal iónico. En el caso de la bomba SERCA, su actividad de ATPasa disminuyó en ambos géneros, desde los 2 y 4 meses de tratamiento en hembras y machos, respectivamente. De forma interesante, en las hembras se evidencia una recuperación funcional de la actividad de ATPasa de la SERCA a partir de los 4 meses de tratamiento, sin cambios significativos en los niveles de mRNA o proteína de la misma. Paradójicamente, únicamente se evidenció una disminución en la concentración de la adiponectina que se expresa en el tejido cardiaco pero no en la circulante, reforzando la idea de la existencia de un sistema local de adiponectina en corazón que es afectado en el SM y que por un mecanismo aún no determinado puede participar en la disminución de la actividad de ATPasa de la bomba SERCA, particularmente en machos. Mecanismo molecular que valdría la pena dilucidar en un futuro.

## ABSTRACT

Metabolic syndrome (MS) comprises a group of physiological and biochemical alterations that underlie several health problems with high incidence in México, such as diabetes and cardiovascular diseases. Obesity is the main manifestation of MS and is related to the release of different pro-inflammatory cytokines. Nonetheless, adiponectin, a cardioprotective adipokine whose production in adipocyte tissue shows gender-related variations (it is more abundant in females), decreases in obese individuals. The decline in plasma levels of adiponectin has been associated with the appearance of cardiovascular diseases. As a part of its cardioprotective action, it has been shown that the *in vitro* treatment of neonate rat cardiomyocytes with adiponectin induces the recovery of functional activity of SERCA pump.

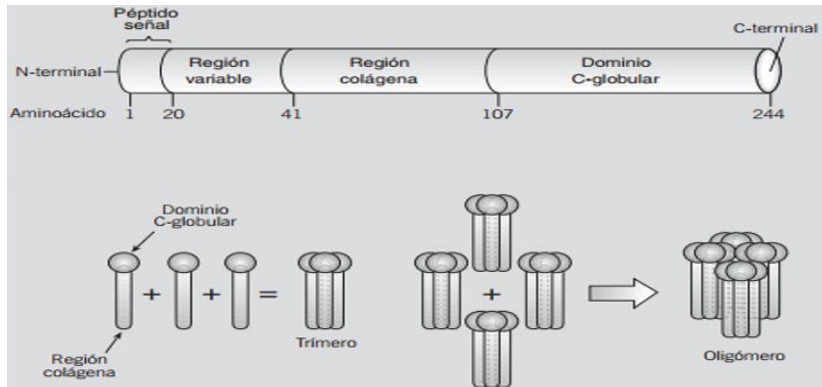
Thus, we aim to study whether the alleged variations in mRNA, protein expression levels and functional activity of SERCA pump and cardiac ryanodine receptor (RyR2) are related to changes in adiponectin expression, during the progression of MS. Then, wean Wistar rats (males and females) received a 30% sucrose solution as drinking water for 2, 4, and 6 months. Our results showed that the features of MS appear earlier and they are more pronounced in males than in females. About RyR2s, we observed a significant increase in its functional activity only in males after 6 month-treatment, without having this effect reflected in higher RyR2 mRNA levels or protein expression. In females, we couldn't detect any modification in the functional activity or protein expression levels of this ionic channel. In the case of the SERCA pump, the ATPase activity was found diminished in both genders, since 2- and 4-month treatments, in females and males, respectively. Very interesting, in the case of females we found a functional recovery of ATPase activity after 4-month treatment, with no modifications of SERCA mRNA or protein expression levels. Paradoxically, only protein expression levels of that adiponectin expressed in heart were found decreased, but not those of serum adiponectin, reinforcing the idea of the existence of a local adiponectin system in the heart, which is impaired in the MS condition. The reduced expression of adiponectin in heart might participate in the reduction of ATPase activity of SERCA, particularly in males, through an unknown mechanism that deserves to be studied in the future.



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 FUNCIÓN BIOLÓGICA Y ESTRUCTURA DE LA ADIPONECTINA

La adiponectina es una citocina de 244 aa (UniprotKB entry: Q15848 en *Homo sapiens* y Q8K3R4 en *Rattus norvegicus*) secretada principalmente por el tejido adiposo, que actúa como hormona en la regulación del metabolismo de lípidos y en el aumento de la sensibilidad a insulina. Esta proteína ha sido caracterizada por diferentes grupos de investigación por lo cual ha recibido diferentes nombres: apM1 (Adipose most abundant gene transcript 1), GPB28 (Gelatin Binding Protein 28), Acrp30 (adipocyte complement-related protein of 30 kDa) y AdipoQ (Palomer, *et al* 2005). El gen que codifica para la adiponectina, APM1, consta de 3 exones y 2 intrones que codifican para la proteína. En el extremo N-terminal tiene el péptido señal para su secreción, seguido por una región variable sin homologías conocidas, una región similar en su estructura a los colágenos VIII y X que consiste en 22 repetidos de Gly-X-Y con sitios susceptibles a modificaciones postraduccionales importantes para su función biológica, como hidroxilaciones y glicosilaciones; y un dominio globular que presenta alta homología estructural con el TNF-alfa, y puede separarse del resto de la proteína por lisis con una elastasa leucocitaria (Figura 1) (Chandran, *et al* 2003; Scherer, *et al*, 1995; Waki, *et al* 2005). La adiponectina es una proteína relativamente abundante en el plasma, en donde presenta concentraciones desde los 5 hasta los 30 µg/ml; sin embargo, estos valores varían de acuerdo a diferentes factores como el género y la edad (Figura 2) (Palomer, *et al* 2005). Curiosamente la adiponectina a diferencia de otras citocinas, disminuye en la obesidad y en otras patologías relacionadas, especialmente la forma oligomérica de esta proteína (Zhu *et al*, 2008). La adiponectina se ensambla en diversas formas oligoméricas (Figura 1) en donde los trímeros de los dominios globulares son la unidad básica; no obstante, esta proteína también se encuentra como trímero completo, hexámero u oligómero (HMW; high molecular weight). Los oligómeros se estabilizan por la formación de puentes disulfuro en la región similar al colágeno (Tsao, *et al* 2003).



**Figura 1. Estructura y modelo de ensamblaje de la adiponectina humana.** La unidad estructural básica de la adiponectina es un trímero, formado por la unión de los monómeros mediante el dominio globular. Los trímeros de adiponectina pueden asociarse, a su vez, en grupos de 2 a 6 unidades mediante el dominio colágeno, formando oligómeros (Palomer, *et al* 2005).



**Figura 2. Condiciones clínicas y bioquímicas asociadas al aumento o disminución de las concentraciones plasmáticas de adiponectina** (Domínguez, 2007).

Se han identificado 2 receptores a los cuales la adiponectina se une para ejercer sus acciones biológicas, denominados AdipoR1 (375 aa) y AdipoR2 (386 aa), que son proteínas de 7 pases transmembranales con el extremo C-terminal en el exterior y el N-terminal en el interior de la célula, que no presentan homología funcional o estructural con los receptores acoplados a proteínas G (o GPCR's). Así, a través del estímulo de AdipoR1 o AdipoR2 se ha encontrado que la adiponectina puede activar a la cinasa de proteínas activada por AMP (AMPK) y al receptor activado por proliferación peroxisomal gamma (PPAR $\alpha$ ), entre otras proteínas (Kadowaki, *et al* 2005). La expresión del receptor tipo 1 predomina en el musculo esquelético y presenta mayor afinidad por la forma globular de

adiponectina ( $K_d$  0.06  $\mu\text{g/ml}$ ), mientras que el tipo 2 se encuentra mayoritariamente en hígado y tiene mayor afinidad por el trímero completo de la proteína ( $K_d$  6.7  $\mu\text{g/ml}$ ) (Ramachandran, *et al* 2007; Yamauchi, *et al* 2003).

Adicionalmente, estos receptores han sido identificados en cardiomiocitos y su activación está relacionada con la activación de AMPK, Akt y de la ceramidasa (Ding, *et al* 2007; Fujioka, *et al* 2006). En estudios con cerdos se observaron los efectos protectores de esta citocina contra el daño al miocardio provocado por isquemia/reperfusión (Kondo, *et al* 2010). Asimismo, en ratones *knock-out* para la adiponectina son más susceptibles a infartos al miocardio por inducción de isquemia/reperfusión y a hipertrofia cardíaca en comparación a los wild-type (Shibata, *et al* 2005; Tao, *et al* 2007). Se han encontrado diferentes vías de señalización a través de las cuales la adiponectina ejerce dichos efectos (Figura 3), actuando específicamente sobre procesos como:

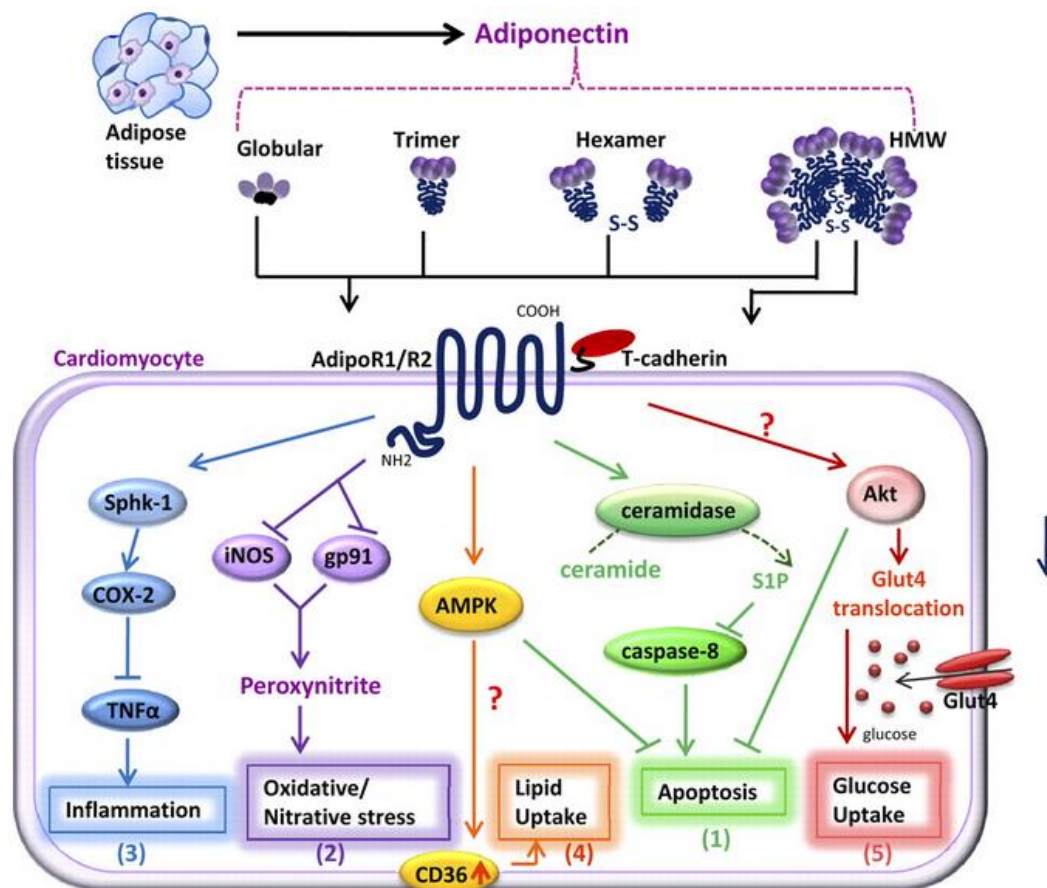
- Disminución del estrés oxidativo. En ratones que no expresan adiponectina, aumenta la producción de óxido nítrico (NO), superóxidos y peroxinitritos en tejido cardíaco pero el tratamiento con esta proteína revierte el daño (Tao, *et al* 2007). Por otro lado en corazones de rata se observó que la adiponectina mejora la función del ventrículo izquierdo (VI) y aumenta el flujo coronario durante la reperfusión, al contrario de la nitro-L-arginina, que actúa como inhibidor de la NO sintasa y revierte el efecto de la citocina (Gonon, *et al* 2008). Se conoce que este efecto es independiente de AMPK, pero que se relaciona con la regulación diferencial de las sintasas de NO endotelial e inducible (eNOS e iNOS, respectivamente), en donde la adiponectina bloquea la formación de peroxinitrito generada por la expresión de iNOS y de gp91phox (una subunidad de la enzima NADPH oxidasa) inducida por isquemia (Wang, *et al* 2009).
- Disminución de la apoptosis. Aparentemente, la adiponectina ejerce este efecto a través de la activación de diferentes vías de señalización en distintas condiciones patológicas, así se observó que al expresar el dominante negativo de la cinasa de AMP (AMPK) fueron bloqueados los

efectos supresores de la adiponectina en la apoptosis por inducción de isquemia/reperfusión en cardiomiocitos de ratón (Wang, *et al* 2009). Además se encontró que adiponectina también evita la apoptosis de cardiomiocitos inducida por palmitato, por la activación de la enzima ceramidasa lo que aumenta la producción de esfingosina-1-fosfato que es un metabolito que inhibe a la caspasa-8 (Holland, *et al* 2011).

- Reducción de la inflamación. La adiponectina posee efectos supresores de la inflamación inducida por isquemia/reperfusión, esto por la acción de la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2) que es limitante de la velocidad de síntesis de los prostanoides, como se comprobó al inhibir farmacológicamente a COX-2 en ratones, lo que revirtió los efectos de la adiponectina en la producción de TNF- $\alpha$  y el daño por isquemia/reperfusión (Shibata, *et al* 2005).
- Aumento del metabolismo de lípidos y de glucosa. La adiponectina estimula la actividad de la lipoproteína-lipasa vía la proteína cinasa asociada a RhoA/Rho (Ganguly, *et al* 2011) en cardiomiocitos de rata adulta. Asimismo, en cardiomiocitos adultos, la adiponectina aumenta el consumo de ácidos grasos mediado por CD36 (proteína translocasa de ácidos grasos) y mejora el transporte de glucosa estimulado por insulina al promover la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática vía Akt al interferir con la activación de la fosfatidilinositol cinasa 3 (Fang, *et al* 2010; Shulman, 2000). También en estudios *in vivo* se encontró que la adiponectina aumenta la oxidación de ácidos grasos a través de la activación de receptores PPAR $\alpha$ , disminuyendo el contenido de triglicéridos, mejorando igualmente la sensibilidad a insulina (Yamauchi, *et al* 2002).

Por otro lado se ha visto que la adiponectina puede interactuar con la proteína T-caderina que está anclada a la superficie celular por glicosilfosfatidilinositol (GPI) y que dicha interacción es indispensable para la función cardioprotectora de la adiponectina en corazón, como se observó en ratones que carecían de T-caderina, desapareciendo los efectos protectores de la

adiponectina contra la hipertrofia cardiaca inducida por aumento de la presión y los infartos al miocardio inducidos por isquemia/reperfusión. Esto indicaría que T-caderina puede actuar como co-receptor que presentaría a la adiponectina en el tejido de interés a su receptor (Adipo-R1 o Adipo-R2) con capacidad de iniciar una cascada de señalización intracelular (Denzel, *et al* 2010), además se puede predecir que T-caderina tiene la función de facilitar las interacciones entre la adiponectina y múltiples proteínas ya que se ha visto que adiponectina se ancla a la superficie del tejido cardiovascular (Peake, *et al* 2008).



**Figura 3. Vías de señalización de la adiponectina en cardiomiocitos.** (1) El efecto antiapoptótico está mediado por la activación de la ceramidasa, Akt y AMPK. (2) La actividad antioxidante está relacionada con la disminución de la expresión de la sintasa de NO inducible y de gp91. (3) La acción antiinflamatoria está mediada por la activación de la esfingosin-cinasa-1 y la ciclooxigenasa-2. (4) El estímulo del transporte lipídico vía la sobre regulación de CD36 mediada por AMPK. (5) El aumento en la translocación del transportador GLUT4 vía Akt favorece la captura de glucosa (Xu, *et al* 2012).

### 1.1.2. Sistema local de adiponectina en corazón.

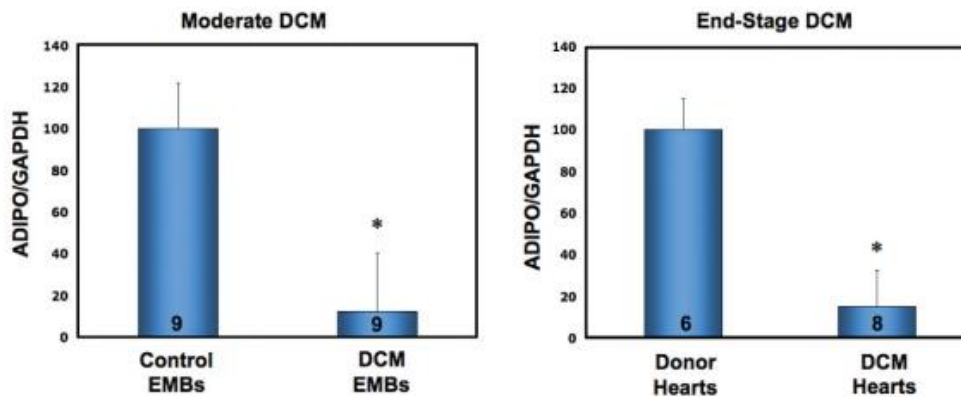
Anteriormente se consideraba que la adiponectina era una proteína expresada exclusivamente por el tejido adiposo; sin embargo, existen reportes de su producción en otros tejidos como riñón, hígado, músculo esquelético y hueso en formación (Piñeiro, *et al* 2005). Así mismo, en al menos 3 publicaciones, la adiponectina ha sido detectada en corazón, aunque existen discrepancias al respecto, ya que en una publicación no pudieron encontrar el mRNA de la misma (Tabla 1).

Tejido/ Línea celular	Expresión Proteína	mRNA	METODO	REFERENCIA
HL-1 y cardiomiocitos humanos	+	+	Inmunohistoquímica RT-PCR	Piñeiro, 2005
Cardiomiocitos adultos de rata	+	+	RT-PCR WB Inmunofluorescencia	Ding, 2007
Cardiomiocitos de ratón	ND	-	RT-PCR	Fujita, 2008
Cardiomiocitos SD T2DM	+	ND	ELISA	Li, 2014

**Tabla 1. Detección de adiponectina en tejido cardiaco.** Se muestra un resumen de diferentes estudios en los que se ha detectado mediante diferentes técnicas la presencia de adiponectina en corazón, a nivel de mRNA y/o de proteína.

Consecuentemente, algunos estudios han mostrado la existencia de un sistema local de la adiponectina en corazón, que parece independiente de la concentración de la citocina a nivel sistémico. Más específicamente, se ha encontrado que en pacientes con cardiomiopatía dilatada, disminuye la expresión de la adiponectina de corazón (Figura 4) sin que exista relación con las concentraciones de la adiponectina en el suero (Skurk, *et al* 2008). También Giannessi y colaboradores reportaron que los niveles de la adiponectina circulante están relacionados inversamente con la función cardiaca y con la adiponectina del miocardio, esto en un modelo de mini cerdos con marcapasos implantados que

estimulan al ventrículo izquierdo a una frecuencia cardiaca de 180 latidos/minuto (Caselli, *et al* 2012).



**Figura 4. Abundancia de mRNA de adiponectina en cardiomiopatía dilatada.** El RNA fue aislado de biopsias endomiocardiales obtenidas del ventrículo derecho de pacientes con cardiomiopatía dilatada moderada y con insuficiencia cardiaca severa. (Skurk. *et al* 2008)

De ahí la importancia de determinar si en el modelo de síndrome metabólico que hemos desarrollado en el laboratorio, parte de las alteraciones en el manejo de calcio intracelular y en la actividad de la bomba SERCA se relacionan con cambios en los niveles séricos de la adiponectina y/o con alteraciones en el sistema local de adiponectina cardiaco.

## 1.2 SÍNDROME METABÓLICO

El síndrome metabólico (SM) está definido como una asociación de trastornos fisiológicos y bioquímicos que generan diversos problemas de salud, constituyéndose como una epidemia global con alta incidencia en México y otros países de Latinoamérica donde su prevalencia es alta (ALAD, 2010). El SM ha tenido diversas definiciones a lo largo del tiempo desde su identificación en 1920 por Kylin como la agrupación de hipertensión, hiperglucemia e hiperuricemia (Kylin, *et al* 1923), posteriormente Vague identificó que la acumulación de tejido adiposo está relacionada con anormalidades metabólicas presentes en las enfermedades cardiovasculares y en la diabetes (Vague, *et al* 1947). Sin embargo, no fue hasta 1988 que Reaven asoció estas condiciones en lo que denominó

como *Síndrome X*, al notar que algunos factores de riesgo para las enfermedades cardiovasculares como la hiperglucemia, la dislipidemia y la hipertensión se presentaban juntos y subyacían en resistencia a la insulina (RI) (Isomaa, *et al* 2001), lo cual llevó a que más adelante otros autores lo denominaran como síndrome de RI y finalmente como SM al evidenciarse que esta agrupación de síntomas representaba riesgo metabólico en general, asociado al desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 y disfunción cardiovascular (Alberti, *et al* 2006).

Una de las definiciones más aceptadas por la comunidad científica fue la desarrollada por el National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III (ATPIII) en la que se identifican 5 componentes del SM relacionados con las enfermedades cardiovasculares (CVD por sus siglas en inglés) y su diagnóstico depende de la presencia de 3 o más de estos, de acuerdo a la definición de la American Heart Association (AHA) (Go, *et al* 2014):

- Obesidad central; circunferencia abdominal  $\geq$  a 102 cm en hombres y a 88 cm en mujeres.
- Hipertensión; presión arterial sistólica y diastólica  $\geq$  130/85 mm de Hg respectivamente o tratamientos farmacológicos específicos.
- Hipertrigliceridemia; niveles de triglicéridos  $\geq$  1.7 mmol/L (150 mg/dL) o tratamientos para disminuir los niveles altos de triglicéridos.
- Niveles bajos de colesterol HDL  $\leq$  1.03 mmol/L (40 mg/dL) en hombres y 1.3 mmol/L (50 mg/dL) en mujeres, o tratamientos específicos.
- Niveles de glucosa plasmática en ayunas  $\geq$  a 5.6 mmol/L (100 mg/dL) o el previo diagnóstico de diabetes tipo 2.

Otras definiciones fueron las realizadas en 1999 por la *World Health Organization* (WHO) que además incluye la microalbuminuria (concentraciones altas de albumina en la orina) y el *European Group for the Study of Insulin Resistance* que también considera la hiperinsulinemia (niveles elevados de insulina en la sangre) (Eckel, *et al* 2005).



### **1.2.1 Patogénesis del Síndrome Metabólico**

Las características del SM pueden clasificarse en 3 categorías etiológicas: la obesidad y desordenes del tejido adiposo, la RI y otros factores independientes (Scott, *et al* 2004).

#### **1.2.1.1 Obesidad**

Es la acumulación anormal o excesiva de tejido adiposo en el organismo y está definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como un índice de masa corporal (IMC), es decir el cociente entre el peso y la estatura de un individuo elevada al cuadrado, igual o superior a 30 kg/m<sup>2</sup>. Se considera una alteración metabólica nutricional muy frecuente y por tanto constituye un problema de salud pública de gran relevancia en México. La más reciente Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT 2012), mostró que 7 de cada 10 adultos padece de sobrepeso u obesidad.

La obesidad se manifiesta comúnmente como un aumento en la circunferencia de la cintura y el ATPIII lo considera la principal causa de la prevalencia del SM, ya que el exceso de tejido adiposo está involucrado con la liberación de diversos factores como: ácidos grasos no esterificados; citocinas; angiotensina II; interleucina 6; Proteína C reactiva (CRP) asociada con estados pro-inflamatorios; inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1), cuyo aumento en conjunto con el fibrinógeno propicia estados protrombóticos al inhibir la activador tisular del plasminógeno; el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) que impide la captación de glucosa y reduce la actividad de la lipoproteína-lipasa ocasionando un aumento en la lipogénesis hepática; leptina, cuyo aumento está relacionado con la RI por alteraciones en la fosforilación del receptor insulínico; resistina, que disminuye el transporte de glucosa en los adipocitos alterando la tolerancia a ésta; y adiponectina, cuyos niveles disminuyen generando un aumento en la RI, entre otros (Scott, *et al* 2004). Este efecto está relacionado con el incremento en la ingesta calórica y produce el almacenamiento de grasa visceral que cuenta con una alta tasa de lipólisis y además induce la liberación de factores que generan resistencia tisular a la acción de la insulina, produciendo una

hiperinsulinemia compensadora lo cual activa la lipogénesis en este tejido (Castillo, 2009).

#### **1.2.1.2 Resistencia a insulina**

Algunos autores consideran a la RI como una condición más determinante que la obesidad en el desarrollo del SM, argumentando que la hiperinsulinemia derivada de un defecto en la acción de la insulina (Eckel, *et al* 2005), es causa directa de otros factores de riesgo metabólicos como la intolerancia a glucosa (Ferrannini, *et al* 1991). Además, la RI en los tejidos periféricos genera la excesiva liberación de ácidos grasos libres desde los adipocitos por la reducción en la captación de glucosa, lo que estimula la síntesis de triglicéridos y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) en el hígado, produciendo dislipidemia (Hernández, *et al* 2006). Asimismo, se ha encontrado que pacientes con RI con obesidad y/o diabetes tipo 2 presentan defectos en la fosforilación oxidativa a nivel mitocondrial que se relacionan con la acumulación de triglicéridos y moléculas lipídicas en el músculo (Wang, *et al* 2010).

#### **1.2.1.3 Dislipidemia aterogénica**

La dislipidemia es una anomalía en el metabolismo que resulta en la variación de las concentraciones de lípidos y lipoproteínas en plasma. Los tres mayores componentes de la dislipidemia asociada al SM son el aumento de lipoproteínas ricas en triglicéridos (TRLs) y las consecuentes disminuciones en lipoproteínas de alta densidad (HDLs) y aumento de lipoproteínas de baja densidad (LDLs) en la sangre (Ruotolo, *et al* 2002), que en el SM están relacionadas con la RI y la hiperinsulinemia compensatoria. De esta forma, se favorece el incremento de la liberación hepática de colesterol VLDL, por deficiencia de la enzima lipoproteína-lipasa que es sensible a insulina, lo que genera la disminución en los niveles de colesterol HDL, hipertrigliceridemia y el incremento en los niveles séricos de colesterol VLDL y LDL que se oxidan potenciando la formación de ateroma y por ende el desarrollo de aterosclerosis y

de otras enfermedades cardiovasculares (Blaton, 2008; Castillo, 2009; Holvoet, *et al* 2000).

#### **1.2.1.4 Hipertensión**

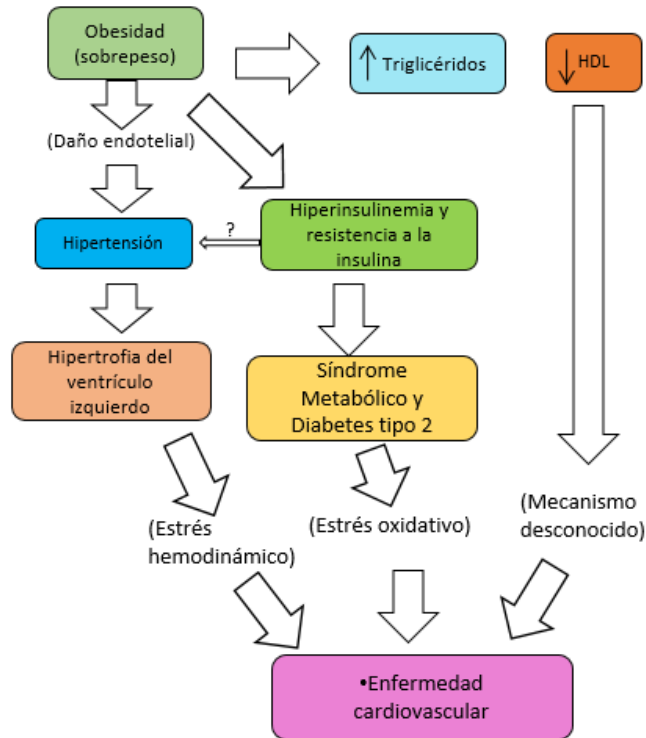
La hipertensión es un padecimiento multifactorial y asintomático que se caracteriza por valores de presión arterial elevados (sistólica, diastólica o ambos), favoreciendo la aparición de alteraciones cardiovasculares. Se sabe que la hiperinsulinemia produce hipervolemia al aumentar el volumen total de sangre circulante por incrementos en la reabsorción de agua y Na<sup>+</sup> en los túbulos contorneados proximal y distal del riñón, lo que ocasiona un aumento de la resistencia periférica que participa en la generación del fenotipo hipertenso, así como el aumento en la expresión de endotelina-1 que bloquea la producción de óxido nítrico aumentando las respuestas a mitógenos y vaso constrictores sobre el endotelio (Castillo, 2009). Por otro lado se ha encontrado que la obesidad y la acumulación de grasa visceral características del SM están relacionados con el aumento en la liberación de aldosterona de las glándulas suprarrenales (aldosteronismo primario) por estimulación de la vía renina-angiotensina, lo que constituye la principal causa de hipertensión endocrina (Krug, *et al* 2008).

Por ello la *European Society of Hypertension* y la *European Society of Cardiology*, advirtieron sobre la importancia de identificar a los pacientes con SM que presentan hipertensión como un grupo con alto riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares (Zanchetti, 2003).

#### **1.2.1.5 Riesgo cardiovascular y adiponectina**

Se ha demostrado que la principal causa de morbilidad y mortalidad en los individuos que padecen SM son las enfermedades cardiovasculares (Gimeno, *et al* 2004). Los factores de riesgo cardiovascular en pacientes que presentan RI no solo se relacionan con las alteraciones en el metabolismo lipídico, también con procesos inflamatorios, oxidativos y de hipercoagulabilidad que originan disfunción endotelial contribuyendo en la formación de ateromas (Rueda, *et al* 2012).

Una causa importante es el aumento de los niveles de proteína c-reactiva (CRP), que es un biomarcador de inflamación y un fuerte predictor de diabetes y enfermedades cardiovasculares. Se ha demostrado que altas concentraciones de esta proteína se relacionan con diferentes manifestaciones del SM como la microalbuminuria y la disminución de la fibrinólisis (Ridker, *et al* 2003).



**Figura 5. Vías involucradas en el desarrollo de la disfunción cardíaca en el Síndrome Metabólico.** Factores de riesgo implicados en el diagnóstico del SM y que participan en el desarrollo de la disfunción cardíaca. En paréntesis se encuentran los procesos posiblemente involucrados (Rueda, *et al* 2012).

De igual forma, la acumulación de adipocitos viscerales producto de la obesidad característica del SM, favorece la producción de angiotensina II que al actuar sobre sus receptores disminuye la expresión de proteínas transportadoras de glucosa (como GLUT-4) en las células adiposas y musculares, lo que resulta en RI y en la activación de la enzima NADPH oxidasa en adipocitos, macrófagos y células endoteliales, que en conjunto reducen la actividad de la enzima óxido

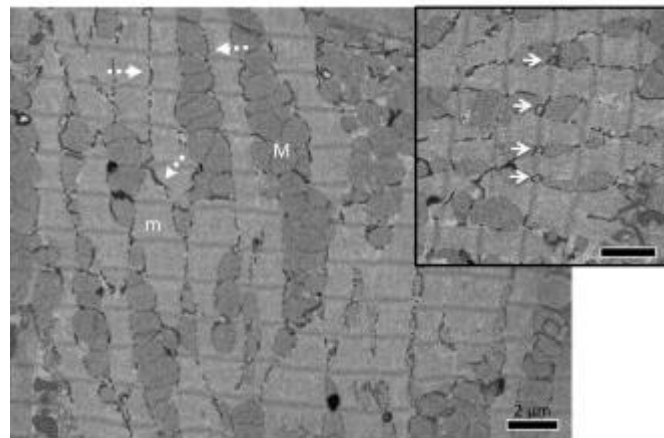
nítrico sintasa, induciendo estrés oxidativo y disfunción del endotelio por aumento en la producción del vasoconstrictor endotelina. (Hernández, *et al* 2006)

También se ha encontrado que la prevalencia del SM está influenciado por los antecedentes genéticos, la dieta, los niveles de actividad física, los niveles de sobre o desnutrición y en general el estilo de vida (Cameron, *et al* 2004).

Sin embargo, poco se sabe acerca de la posible relación existente entre la disminución en los niveles de adiponectina (bien documentada en la obesidad y la diabetes) y los cambios estructurales y moleculares que se presentan en el tejido cardiaco durante el desarrollo del SM.

### 1.3 MÚSCULO CARDIACO

El miocardio es el músculo estriado que forma las paredes de las aurículas y los ventrículos del corazón. Está formado por células musculares (cardiomiocitos) que están unidas en disposición lineal por discos intercalares, ubicados a nivel de las líneas Z.

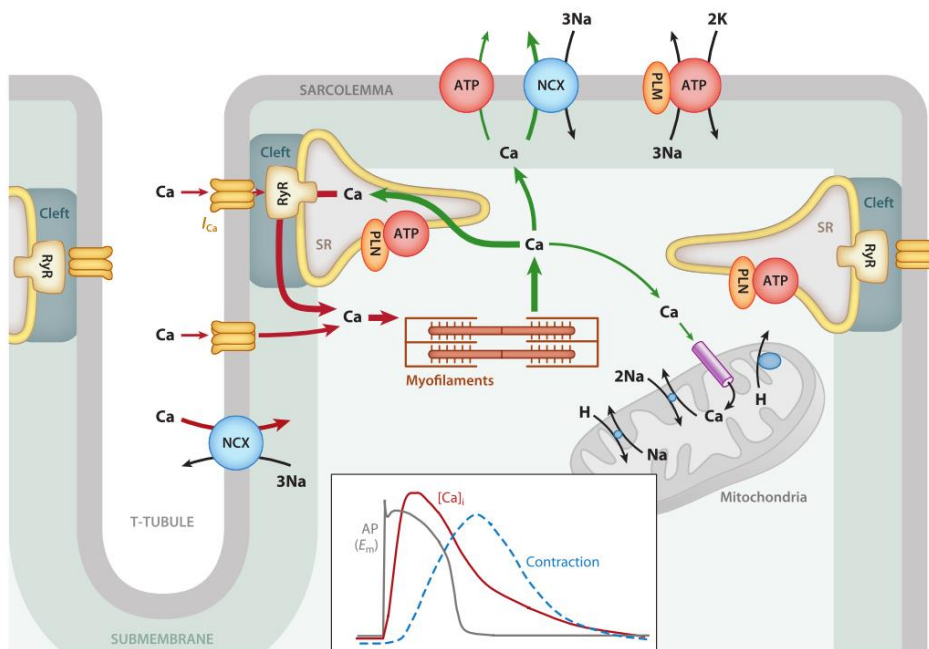


**Figura 6. Estructura del retículo sarcoplásmico en células de músculo cardiaco de rata.** La microscopía electrónica revela una elaborada red de retículo sarcoplásmico (RS) dentro de los cardiomiocitos de rata. En negro el RS, en gris claro las miofibrillas, y en gris oscuro las mitocondrias, las flechas blancas señalan los túbulos t en cada línea Z rodeado de RS (Pinali, *et al* 2013).

Los cardiomiocitos están rodeados por la lámina externa, miden alrededor de 15 µm de diámetro y 150 µm de largo; pueden presentar 1 o 2 núcleos, una gran

cantidad de mitocondrias bien distribuidas y exhiben una distribución regular del retículo sarcoplásmico (RS) entre las miofibrillas (Figura 6) que se asocia gracias a una expansión de las cisternas del RS a los túbulos T, en una organización estructural conocida como triada (Severs, 2000). Se ha identificado que en el SM, los cardiomiocitos sufren alteraciones estructurales como fibrosis de la matriz extracelular, mayor cantidad de mitocondrias y líneas Z más gruesas, que resultan en alteraciones funcionales (Hayden, *et al* 2006).

Los cardiomiocitos son células contráctiles por lo que participan activamente en el acoplamiento excitación-contracción (AEC), el cual comienza con la despolarización de la membrana plasmática de los túbulos T que activa la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los receptores a dihidropiridinas (DHPRs) o conocidos también como canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje tipo L, generando un aumento transitorio en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, que permite la activación de los receptores de rianodina (RyR) ubicados en la membrana del retículo sarcoplásmico (RS), liberando mayor cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el lumen al citoplasma en un proceso conocido como liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  (CICR) lo que a su vez activa la maquinaria contráctil.



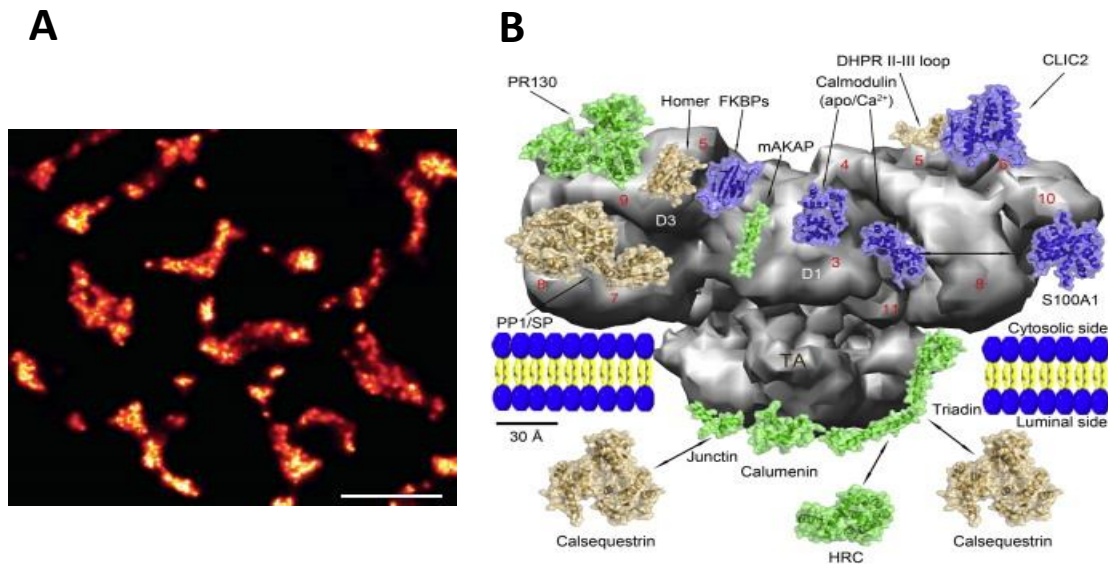
**Figura 7. Transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en cardiomiocitos.** (Bers, 2014)

La relajación ocurre cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  se disocia de la proteína troponina-c en los miofilamentos y es removido principalmente a través de la bomba ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS (SERCA) que rellena el depósito intracelular, y el uniportador de  $\text{Ca}^{2+}$  de la mitocondria, o bien al medio extracelular a través del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática, y la bomba ATPasa de la membrana plasmática (PMCA) (Figura 7), donde el porcentaje de participación en la remoción en ratas es de aproximadamente 93 %, 0.5%, 6% y 0.5%, respectivamente (Bers, 2014; Franzini-Armstrong, *et al* 1997; Rueda, *et al* 2014).

#### **4. RECEPTOR DE RIANODINA**

Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ /receptores de rianodina (RyR) son proteínas de membrana homotetraméricas que poseen 2 dominios funcionales, el C-terminal que contiene 10 segmentos transmembranales que forman el poro conductor de  $\text{Ca}^{2+}$  y el largo N-terminal en la parte citoplasmática del RS; esta región de gran tamaño (aprox. 30 x 30 nm, de ancho y largo, respectivamente) se puede visualizar en micrografías electrónicas y contiene una gran cantidad de sitios de unión a proteínas reguladoras como calbindina 1 y 2, calmodulina (CaM), sorcina, la proteína cinasa A (PKA), y la cinasa II de CaM (CaMKII) (Lanner, *et al* 2010). La secuencia de aminoácidos completa se obtuvo a partir de RyR de músculo esquelético de conejo, encontrando que se trata de una proteína con 4967 residuos y que aparece como una banda prominente, con un peso molecular aparente (Mr) en geles desnaturizantes (SDS-PAGE) de 340,000 y que en ocasiones está acompañada de una banda de menor tamaño (Mr de 300,000), aunque esto último varía dependiendo de las condiciones en que se preparan las vesículas enriquecidas de RS que contienen mayoritariamente al RyR, o bien de las condiciones del SDS-PAGE. Aunque es un solo gen el que codifica a la isoforma cardíaca del RyR (RYR2, localizado en el cromosoma 1 del humano, locus 1q43), este cuenta con 105 exones que por procesamiento alternativo del mRNA pueden generar por lo menos 2 variantes del RyR2 (Rueda, *et al* 2014).

Estos canales fueron identificados gracias al alcaloide rianodina que se encuentra naturalmente en las raíces y tallo de la planta *Ryania speciosa*, que fue aislado como insecticida (Jenden, *et al* 1969). Sin embargo, pronto fue evidente su acción como paralizante del músculo cardíaco y esquelético (Elison, *et al* 1967) y se observó que inhibía la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS al unirse con alta afinidad a una proteína presente en la membrana del RS (Canell, *et al* 1985; Campbell, *et al* 1987). Posteriormente, se pudo establecer que esta proteína es modulada por la rianodina al inducir el estado de subconductancia de lento cierre a concentraciones en el rango nanomolar. La proteína RyR fue purificada y estudiada por microscopía electrónica (Lai, *et al* 1988) y su función como canal iónico fue observada al incorporar el complejo a bicapas lipídicas planas artificiales (Fill, *et al* 2002).



**Figura 8. Receptor de Rianodina. A.** Distribución de RyR en miocitos ventriculares de rata. La imagen dSTORM transversa en pseudocolor capturó las líneas Z de un miocito donde se evidencia la densa organización en grupos de los receptores y su exclusión del área nuclear. (Hou Y, *et al* 2015) **B.** Mapa 3D del arreglo del Receptor de rianodina. La estructura gris muestra la vista lateral del homotetrámero, los números rojos muestran la ubicación de cada dominio, en violeta, verde y beige se muestran los sitios de interacción de RyR con diferentes proteínas modificadoras (Song, *et al* 2011).



El RyR tiene baja selectividad por  $\text{Ca}^{2+}$  (selectividad  $\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+ \sim 6$ ), con una conductancia muy alta ( $\sim 700$  pS cuando  $\text{K}^+$  es el portador de carga y  $\sim 100$  pS cuando  $\text{Ca}^{2+}$  es el portador) y es regulado por  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , ATP, y cafeína (Hymel, *et al* 1988; Smith, *et al* 1988; Tu, *et al* 1994)

El RyR cuenta con 3 isoformas en el genoma de mamíferos (RyR1, RyR2 y RyR3), las cuales están codificadas por 3 genes diferentes en cromosomas distintos, pero comparten un 70% de identidad (Takeshima, 1993). La isoforma predominante en musculo esquelético es RyR1 (Coronado, *et al* 1994), en musculo cardiaco es RyR2, mientras que la isoforma RyR3 se encuentra de forma ubicua (Froemming, *et al* 2000). Curiosamente las proteínas RyRs presentan una gran homología con los receptores  $\text{IP}_3\text{R}$ , pero una muy baja respecto a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje que se encuentran en la membrana plasmática (Mignery, *et al* 1989).

Los RyRs están asociados a diferentes proteínas que la modulan (Figura 8), entre ellas: la proteína calmodulina (CaM) que actúa inhibiendo o activando estos canales dependiendo de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  (Wagenknecht, *et al* 1997); la calsecuestrina, que es la principal proteína de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  dentro del RS (asocia entre 40 y 50 moléculas del catión debido a su alto contenido de aminoácidos ácidos (MacLennan, *et al* 1971)), modula al RyR bajo un mecanismo que está relacionado con cambios conformacionales en la calsecuestrina debidos a variaciones de pH y a la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  (Culligan, *et al* 2002); y DHPR cuya interacción con RyR claramente está relacionada con el acoplamiento excitación-contracción (AEC), de forma particular dependiendo del tejido donde ocurre, así en musculo esquelético hay unión entre las dos proteínas, mientras que en musculo cardiaco el canal DHPR genera un pequeño flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  que activa al canal RyR2 (Fill, *et al* 2002).

En ciertas patologías cardiacas, como en la cardiomiopatía diabética, la insuficiencia cardiaca y la taquicardia ventricular polimórfica inducida por catecolaminas, se han encontrado cambios en la expresión y/o actividad funcional del RyR. Por ejemplo se ha observado en un modelo murino, que en la

cardiomiopatía asociada a la diabetes disminuye la expresión de RyR2 y por ende la recaptura de  $\text{Ca}^{2+}$  decae, observando que los machos son más susceptibles a presentar estas alteraciones (Pereira, *et al* 2006).

### **1.5 BOMBA ATPasa DE $\text{Ca}^{2+}$ DEL RETÍCULO SARCOPLÁSMICO**

La bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarco/endoplásmico (SERCA, por sus siglas en inglés) pertenece a la familia de ATPasas tipo P, que incluye a PMCA y a la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , que se caracterizan por transferir el fosfato terminal de una molécula de ATP a un residuo de aspartato ubicado en el dominio catalítico, lo que provoca un cambio conformacional reversible.

La bomba SERCA hace uso de la energía liberada de la hidrólisis de una molécula de ATP para transportar 2 iones  $\text{Ca}^{2+}$  (con alta afinidad,  $K_d \sim 0.1 \mu\text{M}$ ) desde el citoplasma al RS, generando un gradiente electrogénico y manteniendo la concentración citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  en reposo entre 80 y 100 nM (Periasamy, *et al* 2007). De esta forma la bomba SERCA es responsable del proceso de relajación muscular (MacLennan, *et al* 1970; Martosoni, *et al* 2003).

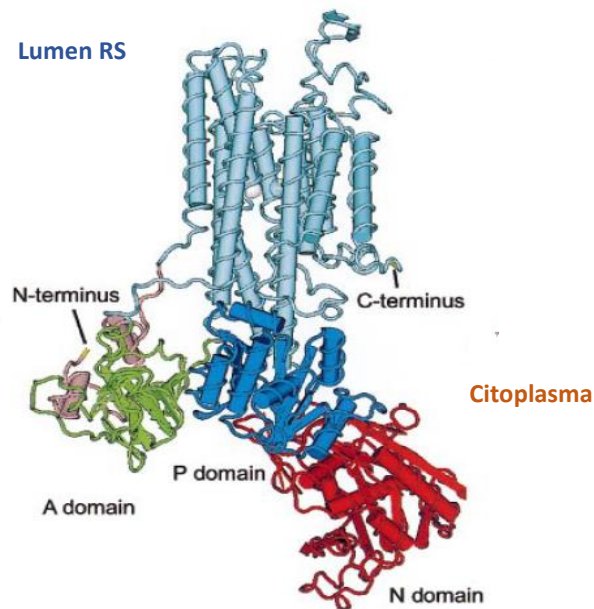
En vertebrados se han encontrado 3 diferentes genes que por splicing alternativo codifican cerca de 10 isoformas de esta proteína (Brandl, *et al* 1986). El gen SERCA 1 se expresa en músculo esquelético de contracción rápida codificando para SERCA1a de 994 aa que se encuentra en adultos y SERCA1b de 1011 aa en etapa fetal (Brandl, *et al* 1987). El gen SERCA2 codifica para SERCA2a de 997 aa que se expresa principalmente en músculo cardíaco y esquelético de contracción lenta (Heyen, *et al* 2001), SERCA2b de 1042 aa que se expresa en niveles bajos en células musculares y no musculares y SERCA2c de 999 aa que se ha reportado en músculo cardíaco (Dally, *et al* 2006). El gen SERCA3 codifica 6 isoformas (entre 999 y 1052 aa) en humanos, apareciendo en gran variedad de tejidos no musculares (células hematopoyéticas, plaquetas, células epiteliales, fibroblastos y células endoteliales), aunque a nivel proteico solo

se reconocen las formas a, b y c (Burk, *et al* 1989; Wuytack, *et al* 1995). Una característica importante de las isoformas de SERCA es que su estructura primaria presenta gran homología, por lo que se cree que su topología y estructura terciaria se conservan (Periasamy, *et al* 2007).

La estructura de la bomba SERCA consta de 10 hélices transmembranales (Figura 9), que forman un bolsillo en el cual se encuentra el sitio de unión a 2 iones  $\text{Ca}^{2+}$ , además de 3 dominios citoplasmáticos: el dominio A (sitio activo), el dominio P (sitio de fosforilación) y el dominio N (sitio de unión del ATP) (Toyoshima, *et al* 2004; Zhang, *et al* 1998). La bomba SERCA consta de un solo polipéptido de 110 kDa.

La actividad de la bomba SERCA puede ser regulada por fosfolamban (PLB) o sarcolipina (dependiendo del tejido), 2 proteínas de bajo peso molecular (52 y 31 aa, respectivamente). PLB es un homopentámero que bajo condiciones fisiológicas normales es fosforilado por la activación de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, que al estar acoplados a proteínas G activan a la adenilato ciclasa, lo que eleva los niveles de AMPc y activa a PKA que fosforila a PLB en Ser-16 lo cual reduce su interacción con SERCA, aumentando la velocidad máxima de la bomba para transportar  $\text{Ca}^{2+}$  (MacLennan, *et al* 2003; Periasamy, *et al* 2001). Otra característica importante de la bomba SERCA es que es inhibida por la estabiliza a la bomba en el estado E2 libre de  $\text{Ca}^{2+}$  (Xu, *et al* 2004).

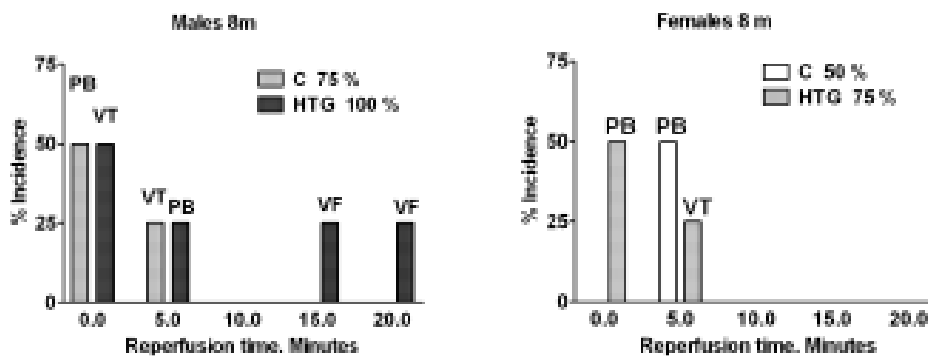
Las alteraciones en la expresión y actividad funcional de la bomba SERCA cardíaca, han sido mejor documentadas en patologías como diabetes mellitus tipo 2, insuficiencia cardíaca, cáncer y en el SM, en el que se ha reportado que las alteraciones metabólicas asociadas, representan un alto factor de riesgo para el desarrollo de insuficiencia cardíaca, que como se ha reportado ampliamente, se relaciona con disfunciones de la proteína SERCA (Miklos, *et al* 2012).



**Figura 9. Estructura tridimensional de SERCA1a.** Empezando por el N-terminal, el dominio A se encuentra entre 2 pequeñas hélices  $\alpha$  (rosa) y el primer segmento citoplasmático entre M1 y M2 (verde), conectándose con M1, M2 y M3 lo que le confiere cierta flexibilidad que parece ser importante para los cambios conformacionales. El dominio transmembranal (azul claro) contiene 10 hélices  $\alpha$ . El largo segmento intracelular entre M4 y M5 está plegado en 2 dominios diferentes, uno emergiendo del otro, y la parte en que más unidos se encuentran forma el dominio P (azul). El dominio N (rojo) funciona como una bisagra que se acerca al dominio P inclinándose  $20^\circ$ , juntando las dos partes del sitio activo (Sweadner, *et al* 2001).

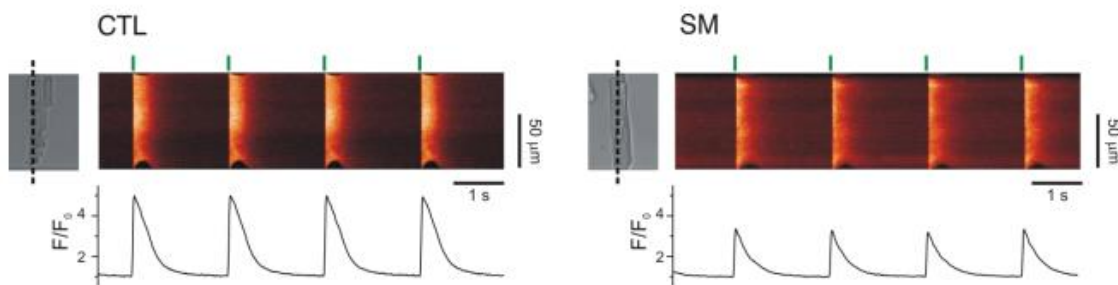
## 2. ANTECEDENTES

En un estudio reciente (Baños, *et al* 2006) se desarrolló un modelo de hipertensión e hipertrigliceridemia (HTG), a partir de la administración de sacarosa al 30% en el agua de bebida a ratas Wistar, como una variante del modelo descrito por Reaven (Reaven, *et al* 1991) y que puede considerarse que provoca SM teniendo en cuenta que también desarrolla hiperinsulinemia y obesidad central. En este estudio, los autores encontraron que se presentan variaciones en la función cardiaca relacionada con 2 factores: el género y la duración del tratamiento con sacarosa, encontrando que después de 3 meses se presenta hipertrigliceridemia, a los 5 meses se suma la hipertensión como signo y después de 8 meses se evidencian con mayor claridad otras características del síndrome, concluyendo que la función cardiaca se ve afectada en ratas con síndrome metabólico inducido, pero el nivel de daño varía según el género, siendo los machos los más afectados ya que presentaron más alteraciones en el electrocardiograma (latidos prematuros) y fibrilación ventricular letal (en los animales del grupo HTG), mientras que las hembras solo presentaron latidos prematuros y taquicardia ventricular (Figura 10).



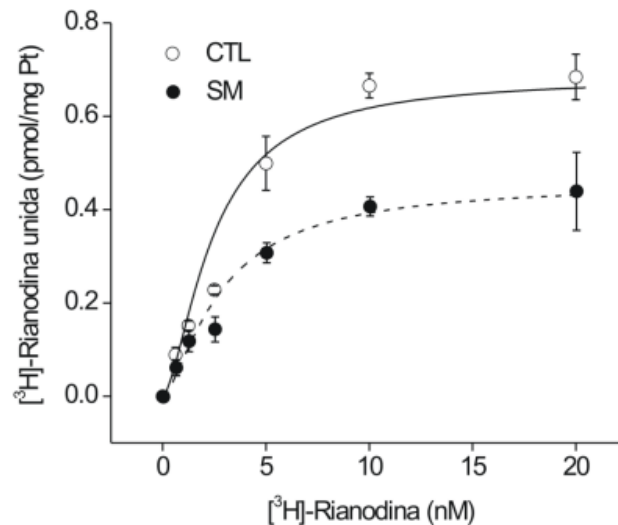
**Figura 10. Porcentaje de incidencia de diferentes arritmias post-reperfusion en las ratas hembras y macho de los grupos control (C) y de síndrome metabólico (HTG) a los 8 meses. VT: Taquicardia ventricular, PB: Latidos prematuros, VF: Fibrilación ventricular. (Cárdenas, *et al* 2006)**

En un trabajo previo desarrollado en el laboratorio (Barrera, 2011), se encontró que en los cardiomiocitos aislados de ventrículo izquierdo de animales con SM inducido con sacarosa al 30% en el agua de bebida, se presenta una disminución significativa en la amplitud del transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por estimulación eléctrica, en la frecuencia de las chispas de  $\text{Ca}^{2+}$  y en su capacidad contráctil (Figura 11), lo que sugiere una disminución en la expresión y/o la actividad de dos proteínas claves en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular: la bomba SERCA2a y el RyR2. Por tal razón se realizaron ensayos de unión a [ $^3\text{H}$ ]-rianodina encontrando que en preparaciones enriquecidas en RS de corazones de animales con SM hay una disminución del 32.4% en el número de RyR2 funcionales (Figura 12). Asimismo para el caso de la bomba SERCA se encontró que la expresión y consecuentemente la actividad ATPasa, disminuye en animales con SM inducido (Figura 13).

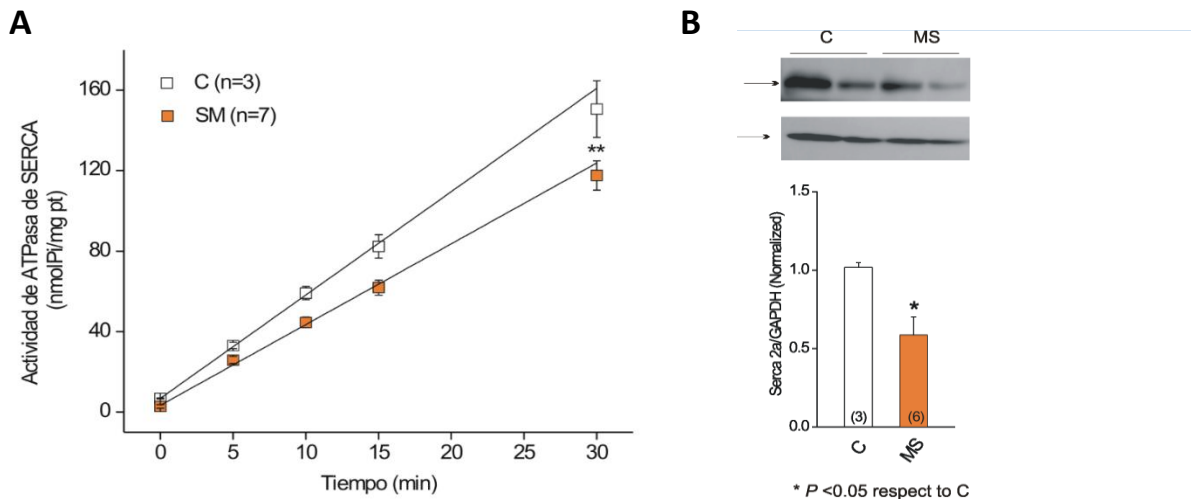


**Figura 11. Disminución de la amplitud de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en los cardiomiocitos de animales con síndrome metabólico.** Imágenes representativas de los cardiomiocitos y de los aumentos transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  producidos por estimulación eléctrica (0.5 Hz, líneas verticales verdes) en cardiomiocitos de animales control (CTL, imagen izquierda) y con síndrome metabólico (SM, imagen derecha). Las células cargadas con Fluo-3 se escanearon en el microscopio confocal en el modo de line scan (10 ms/línea, la línea negra punteada indica la posición del escaneo) generando imágenes bidimensionales donde el eje X representa el tiempo en ms y el eje Y representa la distancia en  $\mu\text{m}$ . La amplitud del transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ( $F/F_0$ ) producido por el estímulo eléctrico se muestra debajo de cada imagen (Barrera, 2011).

Es importante destacar que los resultados anteriores fueron obtenidos en ratas macho después de inducir el SM durante 6 meses, pero ya en otros estudios se ha encontrado una relación directa entre el desarrollo de ciertas alteraciones cardiacas y cambios en la expresión y/o función de estas proteínas involucradas en la regulación de  $Ca^{2+}$  intracelular de forma diferenciada según el género.



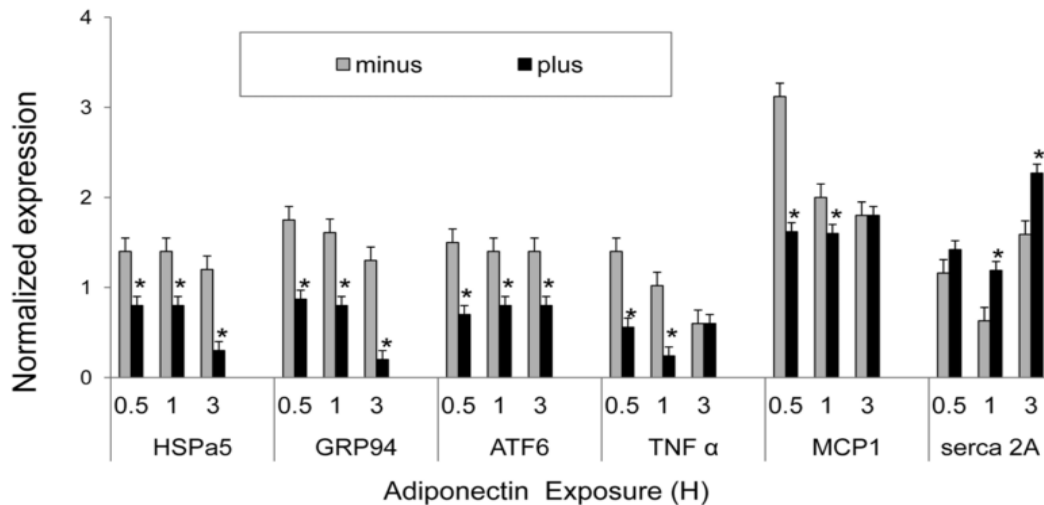
**Figura 12. Curva de saturación de la unión específica a [3H]-Rianodina.** Alícuotas de 50  $\mu$ g de proteína microsomal de corazones de animales con SM o controles se incubaron con diferentes concentraciones de [3H]-Rianodina (rango de 0.625 a 20 mmol/L) en medio de incubación, por 90 min a 37°C. La unión específica de [3H]-Rianodina para los microsomos de corazones de animales con SM (círculos negros, n = 7) y controles (círculos blancos, n = 7) se determinó restando a cada punto la unión no específica de la unión total. La unión no específica se determinó en presencia de 20  $\mu$ mol/L de rianodina. Los valores de unión específica se ajustaron a la ecuación  $y=B_{max}([Ca^{2+}]^n/([Ca^{2+}]^n+Kd))$  (Barrera, 2011).



**Figura 13. Actividad ATPasa (A) y expresión proteica de la bomba SERCA (B) en homogenados de tejido cardiaco de animales con SM y sus controles.** (Cruz, 2014 datos no publicados).

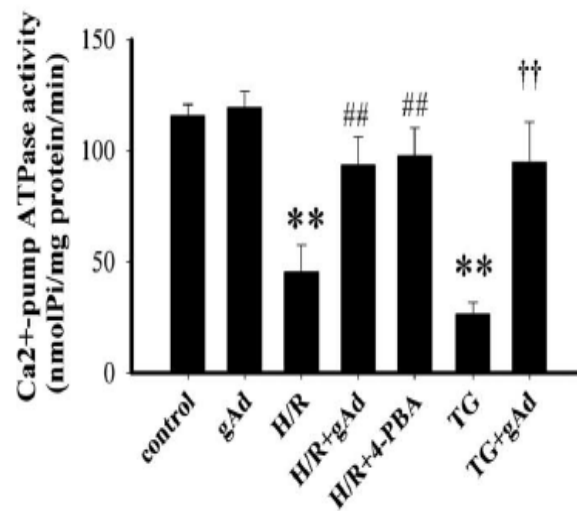
Un dato relevante para nuestro trabajo, es el que muestra que la administración de adiponectina recombinante protege de los efectos a nivel del corazón asociados a la presencia de obesidad (Shibata, *et al* 2005). Particularmente, en un estudio de Boddu y colaboradores (Figura 14) se examinó el efecto del tratamiento con adiponectina en la modulación de genes de respuesta al estrés del RS (HSPa5, GRP94, ATF6, además de los genes de inflamación TNF- $\alpha$  y MCP1) en cardiomioblastos H9C2, encontrando que la expresión génica de los 3 indicadores del estrés disminuyeron en el medio con adiponectina después de una hora y de forma paralela aumentaba la expresión génica de la bomba SERCA2a (Boddu, *et al* 2014).





**Figura 14. Cambios en los niveles de mRNA de proteínas relacionadas con el estrés del RS y la inflamación tras el tratamiento con adiponectina.** Cardiomioblastos de rata de la línea H9C2 que fueron tratados con adiponectina (100 ng/ml) El RNA se extrajo de las células después de 0.5, 1 y 3 h de tratamiento. Los transcritos HSPA5, GRP94, ATF6, TNF $\alpha$  y MCP1 fueron cuantificados por qPCR y normalizados con el mRNA ribosomal 18s. \*P < 0.05 vs. Control, (Boddu, *et al* 2014).

Respecto a la actividad ATPasa de SERCA (Figura 15) se encontró que en cardiomiocitos de ratas neonatas sometidos a hipoxia/reoxigenación, el tratamiento con adiponectina (2  $\mu$ g/ml) estimula la recuperación de la actividad de la bomba. La acción protectora de esta adipocitocina parece estar relacionada con la atenuación del estrés del RS (Guo, *et al* 2013)



**Figura 15. Efecto de adiponectina globular (gAd) en la actividad *in vitro* de SERCA en cardiomiocitos de ratas neonatas.** (Guo, *et al* 2013)

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Los antecedentes muestran que en otros modelos experimentales existe una relación entre los niveles de adiponectina y la modulación de la expresión y la actividad de proteínas claves en la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  en el corazón como la bomba SERCA.

Teniendo en cuenta que las alteraciones cardiovasculares aumentan en relación al desarrollo del síndrome metabólico, consideramos de gran interés determinar si las variaciones en la expresión y función de la bomba SERCA y el RyR durante la progresión del SM están relacionadas con los cambios en la expresión de adiponectina en corazón y si existe una diferencia en estas alteraciones con respecto al género.

### **4. HIPÓTESIS**

Las alteraciones en la expresión y función del receptor de rianodina y la bomba SERCA en corazón, se encuentran relacionadas con los niveles de adiponectina locales, los cuales se modifican negativamente, conforme se establece el síndrome metabólico en los machos, mientras que en las hembras dichas alteraciones se encuentran atenuadas.

## 5. OBJETIVO GENERAL

Determinar las variaciones en la expresión y función de las proteínas RyR2 y SERCA2a y su relación con los niveles de adiponectina en corazones de animales macho y hembra durante la progresión del síndrome metabólico.

### 5.1 Objetivos Particulares

1. Determinar los cambios en los parámetros corporales y séricos en ratas *Wistar* macho y hembra que reciben sacarosa en el agua de bebida a los 2, 4 y 6 meses de tratamiento.
2. Determinar los niveles de mRNA de RyR2, bomba SERCA y adiponectina en ventrículo izquierdo de corazón de animales en tratamiento con sacarosa y controles.
3. Cuantificar la expresión proteica de RyR2, bomba SERCA y adiponectina en homogenados de ventrículo izquierdo de corazón de animales en tratamiento con sacarosa y controles.
4. Evaluar la actividad funcional *in vitro* del RyR2 y bomba SERCA y determinar su relación con los niveles de adiponectina.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Animales y tratamiento

El protocolo de tratamiento (100-14) fue autorizado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) que se desempeña siguiendo la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

El modelo experimental se basó en ratas de la cepa *Wistar* machos y hembras recién destetadas (entre 18 y 23 días de nacidos) de aproximadamente 80 g, que permanecían en jaulas One Cage 2100™ en condiciones de esterilidad, con temperatura y ciclo luz-oscuridad (12h/12h) controlados. Siguiendo el método reportado por Barrera-Lechuga (2011) con algunas modificaciones, las ratas fueron distribuidas al azar en dos grupos, el primero (CTL) recibió agua común y alimento PicoLab Rodent Diet 20 de Lab Diet *ad libitum*, mientras que el segundo (SM) recibió agua con sacarosa al 30% como agua de bebida y el mismo alimento. De cada uno de estos grupos se tomaron animales para su sacrificio después de 2, 4 y 6 meses de iniciar la inducción del SM.

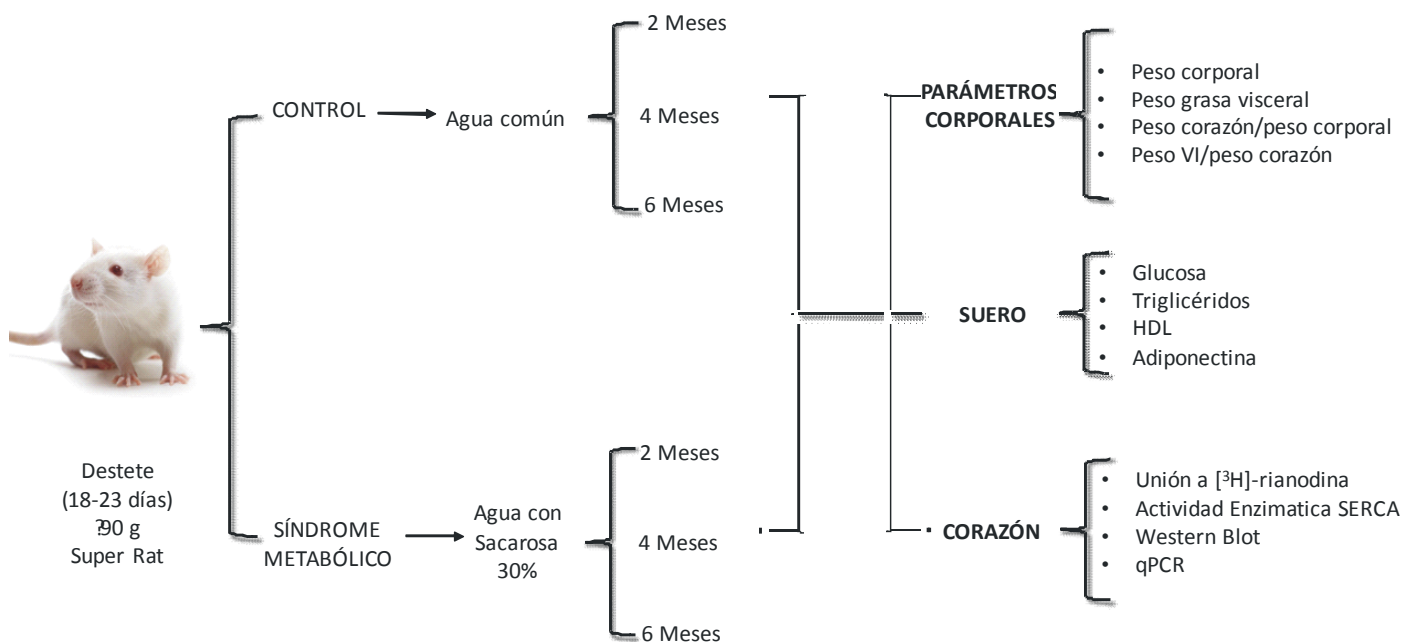


Figura 16. Estrategia experimental.

A los animales se les retiró el alimento y el agua con sacarosa (en el caso de los animales de SM) 8 h antes del sacrificio, manteniendo el suministro de agua común. Durante el momento del sacrificio, se registraron parámetros séricos como glucosa, HDL y triglicéridos, utilizando el panel de lípidos y la tira de determinación de glucosa de Cardiocheck; así como parámetros corporales como peso corporal, peso del corazón, peso del ventrículo izquierdo y peso de la grasa visceral. Adicionalmente, en corazón se determinaron parámetros relacionados con la expresión y la funcionalidad de proteínas reguladoras de  $Ca^{2+}$ , como se describe en los siguientes apartados (Figura 16).

## **6.2 Determinación de adiponectina en suero**

La determinación de la concentración sérica de adiponectina se realizó por medio de un ensayo de ELISA por competencia, utilizando un kit que detecta esta proteína en modelos murinos (Aviscera Bioscience #Cat. SK00010-06). Después del sacrificio, se recolectaron muestras de sangre de los animales, las cuales permanecieron en reposo a temperatura ambiente durante 90 min antes de ser centrifugadas a 5000 rpm durante 5 min en una centrífuga Eppendorf modelo 5415C para obtener el suero. Estas muestras fueron pre-tratadas con una solución que contenía TCEP 10 mM y SDS al 0.1% en una dilución 1:4, e incubadas a temperatura ambiente de 10 a 30 min para su uso inmediato. En los pozos correspondientes se adicionó buffer de dilución (blanco), diluciones estándar para la curva de adiponectina (en el rango de 0.16 a 100 ng/50 $\mu$ l), control positivo (adiponectina recombinante) o de muestras (cada una por duplicado). Posteriormente se adicionó el anticuerpo anti-conejo IgG a todos los pozos (exceptuando el blanco) y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente en movimiento constante. Después se adicionó biotina en cada pozo (exceptuando el blanco) y la placa fue sellada e incubada durante 2 h a temperatura ambiente en movimiento constante, tras lo cual se descartó todo el volumen en los pozos y se realizaron 4 lavados cada uno con 300  $\mu$ L de solución de lavado. A continuación se adicionó estreptavidina conjugada a HRP a todos los pozos y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente en movimiento constante, protegiendo la placa de la

luz. Nuevamente se descartó todo el volumen en los pozos y se realizaron 4 lavados como antes y se adicionó TMB (3,3', 5,5' tetrametilbencidina) en cada pozo y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente en movimiento constante, protegiendo la placa de la luz. Finalmente se adicionó una solución acida en cada pozo para detener la reacción y se determinó la densidad óptica a 450 nm de cada pozo usando un lector de Elisa (Synergy 2, Biotek).

### **6.3 Extracción de RNA total**

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital (100 mg/kg de peso), el corazón se extrajo de la cavidad torácica y se depositó en una solución de NaCl 0.9 % en H<sub>2</sub>O con dietilpirocarbonato (DEPC) para eliminar la sangre y disecar el ventrículo izquierdo. Éste se pulverizó en un mortero con N<sub>2</sub> líquido, y se homogenizó con 1 mL de TriReagent (Sigma Aldrich) por cada 100 mg de tejido a 400 rpm en un homogenizador Potter-Elvehjem hasta obtener una suspensión. El homogenado se incubó durante 5 min, a temperatura ambiente, se depositó en un tubo de 1.5 mL y se centrifugó a 12000 rpm por 10 min a 4°C (en una centrífuga Eppendorff modelo Hermle Z300K). Posteriormente, se recuperó el sobrenadante, al cual se le adicionaron 200 µL de cloroformo, se agitó vigorosamente en vórtex durante 15 s y se incubó 10 min a temperatura ambiente antes de centrifugarlo a 12000 rpm por 15 min a 4°C. A continuación se recuperó la fase acuosa y se adicionó isopropanol (aproximadamente la décima parte del volumen total), se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min, luego se centrifugó a 12000 rpm a 4°C durante 10 min, se recuperó la fase acuosa y se adicionaron 500 µL de isopropanol. Esto se mezcló por inversión, se incubó 10 min a temperatura ambiente y se repitió la centrifugación a 12000 rpm a 4°C durante 10 min. El sobrenadante se descartó por decantación y el pellet fue lavado con 1 mL de etanol al 70 % en H<sub>2</sub>O DEPC agitando en vórtex y centrifugando a 7500 rpm a 4°C durante 10 min, de nuevo se eliminó el sobrenadante por decantación y se dejó secar la pastilla por 5 min, finalmente la pastilla se resuspendió en H<sub>2</sub>O DEPC y se almacenó a -20°C.

Para comprobar la integridad del RNA extraído se realizó un gel de agarosa al 1% (p/v) usando amortiguador TBE 1X a 100 V durante 1 h; posteriormente el gel fue teñido con bromuro de etidio 0.03% y observado en un transiluminador de luz UV Benchtop.

#### **6.4 Transcripción inversa**

A partir del RNA extraído de VI se llevó a cabo la reacción de retrotranscripción para obtener cDNA. Se realizó una mezcla inicial que contenía 1  $\mu$ l de Poli T 500  $\mu$ g/ml (Promega), 1  $\mu$ l de dNTPs 10 mM, el volumen necesario de RNA para tener 5  $\mu$ g de este y H<sub>2</sub>O DEPC hasta completar un volumen final de 12  $\mu$ l. Esta mezcla se incubó a 65°C durante 5 min, en seguida se puso en hielo y se adicionó la segunda mezcla que contenía 4  $\mu$ l de amortiguador 5X first strand (Invitrogen), 2  $\mu$ l de DTT 0.1 M y 1  $\mu$ l de RNAsin (Promega). Después se incubó a 42°C por 2 min y se adicionó 0.5  $\mu$ l de la enzima Superscript II (100 U, Invitrogen) y la incubación continuó a 42°C por 50 min y a 70°C por 15 min, tras lo cual se agregó 1  $\mu$ l de RNAsa 10 mg/ $\mu$ l (Wothington). Posteriormente la temperatura disminuyó a 37°C y se mantuvo por 20 min.

Para comprobar la integridad del cDNA obtenido se realizó una PCR punto final a partir de una mezcla que contenía 0.5  $\mu$ l de dNTPs 10 pmol/ $\mu$ l, 0.2  $\mu$ l de enzima Taq polimerasa 50U/ $\mu$ l (Roche), 2.5  $\mu$ l de amortiguador 10X de MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM (Roche), 2  $\mu$ l de cDNA y 0.5  $\mu$ l de cada oligómero a amplificar y H<sub>2</sub>O DEPC hasta completar un volumen de 25  $\mu$ l, manejando las siguientes condiciones: 1 ciclo de 5 min a 94°C, 30 ciclos de 45 s a 94°C, 45 s a 58°C y 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C y finalmente 1 ciclo a 4°C por tiempo indefinido. El producto de PCR se corrió en un gel de agarosa al 2.5% (p/v) usando amortiguador TAE 1X a 100 V durante 1 h, el gel fue teñido con bromuro de etidio 0.03% y se observó en un transiluminador de luz UV Benchtop.

## 6.5 PCR Cuantitativa en Tiempo Real

A partir de cDNA cuantificado en un equipo NanoDrop (Thermo Scientific) se realizaron reacciones por triplicado cada una de un volumen final de 12.5  $\mu$ l en una mezcla que incluía el volumen necesario para tener 100  $\mu$ g de cDNA, SYBRGreen (Quiagen) como sonda fluorescente y los oligonucleótidos específicos para los genes de interés (RyR2, SERCA2a y AdipoQ) y de referencia (GAPDH) (Tabla 2).

Referencia GenBank	Proteína	Secuencia Oligo	# bases	Tamaño amplicon (pb)	Ubicación	Tm
NM_032078.1	RTRYR2F	CAAACAGGGCAGAAGACACC	20	103	Exón 75-76	62°C
	RTRYR2R	CTCTGAGGGTGCTCCACCT	19			
NM_001110139.2	ATPASA2AF	ACCTGGAAGATTCTGCGAAC	20	115	Exón 20-21	59°C
	ATPASA2AR	AATCCTGGGAGGGTCCAG	18			
NM_144744	AdipoqF	TGGTCACAATGGGATACCG	19	93	Exón 2-3	59°C
	AdipoqR	CCCTTAGGACCAAGAACACCT	21			
NM_017008.3	GAPDF	CTGCACCACCAACTGCTTAG	20	92	Exón 1	59°C
	GAPDR	TGATGGCATGGACTGTGG	18			

**Tabla 2. Secuencias de los oligos utilizados en qPCR.**

Las condiciones para la reacción fueron: 1 ciclo de 5 min a 95°C, 35 ciclos de 10 s a 95°C, 30 s a 60°C y 10 s a 72°C; y finalmente 1 ciclo de incremento de temperatura desde 60°C hasta 95°C. La qPCR se realizó en un equipo Rotor Gene 6000 (Corbett) del laboratorio de la Dra. Beatriz Xoconostle (Departamento de Biotecnología, CINVESTAV Zacatenco).

## 6.6 Homogenados de Ventrículo Izquierdo de Corazón

El ventrículo izquierdo aún congelado fue pulverizado en un mortero con N<sub>2</sub> líquido y se homogenizó con amortiguador pH 7.2 que contenía HEPES 20 mM y sacarosa 0.3 mM, el cual fue suplementado con inhibidores de proteasas (leupeptina 12  $\mu$ M, PMSF 100  $\mu$ M, benzamidina 500  $\mu$ M y aprotinina 12  $\mu$ g/ml). El tejido se homogenizó 2 veces por 45 s a 400 rpm con un intervalo de espera de 30



s, añadiendo más amortiguador de homogenización cada vez (en total 4 ml por cada gramo de tejido). El homogenado obtenido fue centrifugado a 4500 rpm durante 10 min a 4°C en una centrifuga Avanti J-26 XP de Beckman Coulter, utilizando el rotor JA-20. El sobrenadante resultante se reservó, mientras que el pellet fue homogenizado y centrifugado nuevamente a 4500 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante obtenido se unió al de la primera centrifugación y se centrifugó a 4500 rpm durante 30 min a 4°C, al recuperar el sobrenadante se obtuvo el homogenado final que se reservó a - 80°C.

## **6.7 Cuantificación de Proteína**

La concentración de proteína en cada homogenado fue medida por el método de Lowry (Lowry O, *et al*, 1951) con una curva de calibración de albumina sérica bovina (BSA). Se hicieron diluciones de los homogenados con 5 µl hasta un volumen final de 800 µl con H<sub>2</sub>O por duplicado y se adicionaron 100 µl de desoxicolato de sodio 0.03%, 2 ml de solución de Lowry que contenía Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2%, NaOH 2M, CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 1% y tartrato de sodio y potasio 2% y 100 µl de reactivo de Folin (Sigma-Aldrich) 1:1 en H<sub>2</sub>O. Esta mezcla se incubó durante 15 min a temperatura ambiente y se registraron las absorbancias a 750 nm con ayuda de un espectrofotómetro Beckman Coulter DU 800.

## **6.8 Electroforesis**

Con una modificación del protocolo de Laemmli (1970) se realizó la electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE. Los geles de 1 mm de espesor se prepararon en el formato mini protean (Biorad) en un gradiente del 4 al 16%, utilizando mezcla acrilamida-bisacrilamida 30%, Tris-HCl 1.5 M pH 8.8 (para el gel de corrida), Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 (para el gel concentrador), persulfato 10% y TEMED. Cada pozo se cargó con 8 µg de proteína en amortiguador de carga con 2-mercaptoetanol, después de ser incubadas a 37°C 20 min y se utilizaron los marcadores de peso molecular Dual Color Standards (Biorad). Las

condiciones de corrida fueron, 1 h a 90 V y 3 h a 100 V a 4 °C utilizando amortiguador de corrida pH 8.3 que contenía Tris-base 25 mM, glicina 19.2 mM y SDS 0.1%. Al finalizar, los geles podían ser teñidos con tinción de Azul de Coomassie durante 20 min o bien utilizados para Western Blot.

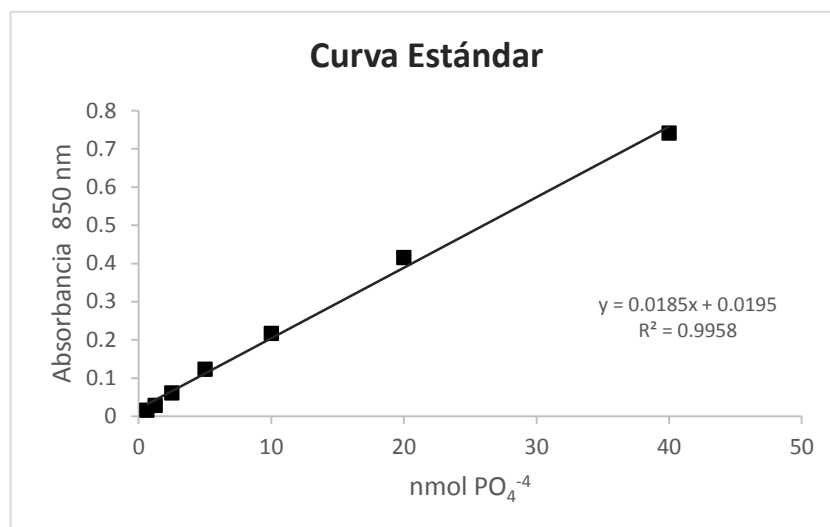
## **6.9 Western blot**

Para la electrotransferencia de proteínas desde los geles de poliacrilamida a membranas de PVDF se realizaron modificaciones al protocolo de Towbin (1979), utilizando una cámara de transferencia húmeda con amortiguador pH 8.3 que contenía Tris-base 25 mM, glicina 19.2 mM y metanol 20 % v/v, bajo las siguientes condiciones: 2 h a 100 V a 4°C. Terminada la transferencia, la membrana era bloqueada con leche 5% en amortiguador de fosfatos salino (o PBS, en mM: NaCl 137, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 10 y KCl 2.7, pH 7.4) con Tween 0.1% durante 1 h a temperatura ambiente. Finalizado el bloqueo la membrana era lavada 10 min con PBS Tween 0.1% en 3 ocasiones, posteriormente la membrana fue incubada con el anticuerpo primario correspondiente (anti-RyR2 1:5000 de Pierce, anti-SERCA2A 1:5000 de Badrilla, anti-GAPDH 1:160.000 de Ambion, anti-Adipo 1:5000 de Abcam), por 2 h, en seguida la membrana fue lavada 10 min con PBS Tween 0.1% en 3 ocasiones e inmediatamente se incubó la membrana con el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a peroxidasa durante 1 h (1:5000). Concluido esto, la membrana se incubó con el reactivo quimioluminiscente (Thermo Scientific) y era expuesta (de 10 a 60 s) a una placa fotográfica (KODAK BioMax XAR) hasta que se evidenciaba una señal clara, después la placa era revelada y fijada. La estimación de las concentraciones de proteína se realizó mediante densitometría en un equipo KODAK Image Station.

## 6.10 Ensayo de Actividad ATPasa de SERCA

Este ensayo se realizó de acuerdo al método reportado por Bartolommei (Bartolommei G, 2013), con algunas modificaciones las cuales se detallan a continuación. Se incubaron 100  $\mu\text{g}$  de proteína de homogenados a 37°C con amortiguador para ATPasa que contenía en mM: KCl 80, MOPS 25,  $\text{MgCl}_2$  3, Azida de sodio 5 y EGTA 0.2 (pH 7.0 con TRIS-HCl), más  $\text{CaCl}_2$  0.2 y el ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  A23187 2 $\mu\text{M}$ . Para iniciar la reacción enzimática se adicionó ATP 1 mM después de 5 min de incubación, esto para determinar la actividad total. Para determinar la actividad ATPasa independiente de SERCA se realizó una mezcla de reacción similar a la descrita a la cual se le adicionó 1  $\mu\text{M}$  del inhibidor de la bomba SERCA, tapsigargina (TGN).

La solución de coloración utilizada está compuesta (en mM) por ácido sulfúrico 125, ácido ascórbico 10, tartrato antimónico de potasio (III) 0.04 y heptamolibdato de amonio 0.5. Después de iniciar la reacción, se tomaron alícuotas de 100  $\mu\text{L}$  de las mezclas de reacción en tiempos subsecuentes (0, 5, 10, 15 y 30 min), las cuales se adicionaron inmediatamente a la solución de coloración. Cada reacción se realizó por duplicado. Las lecturas se realizaron después de 10 min de incubación en un espectrofotómetro Beckman Coulter DU 800 a una longitud de onda de 850 nm. Para determinar la actividad específica se restaron los valores de actividad insensible a TGN a la actividad total. Los valores de absorbancia se interpolaron en la curva estándar de fosfatos (Figura 17) y se reportan como nmol de  $\text{P}_i$ /mg de proteína.



**Figura 17. Curva estándar de fosfatos.** Se presentan los datos de Abs. a 850 nm vs. los nmoles de fosfato. Las mediciones se realizaron por duplicado, por lo tanto los valores de Abs. son el resultado del promedio. Se inserta el resultado de la regresión lineal y el valor del coeficiente de correlación ( $R^2$ ).

### 6.11 Ensayo de unión a [<sup>3</sup>H] rianodina

Este ensayo se realizó de acuerdo al método reportado por Fernández-Velasco y colaboradores (Fernández-Velasco M., et al., 2009), con algunas modificaciones las cuales se detallan a continuación. Se incubaron 100 µg de proteína en un volumen final de 100 µl con amortiguador de unión pH 7.2 que contenía KCl 2M, MOPS 60 mM y CaCl<sub>2</sub> 20 µM; y se adicionó [<sup>3</sup>H]-rianodina 20 nM, esto para determinar la unión total máxima, así mismo para determinar la actividad inespecífica se realizó una mezcla con rianodina 0.02 mM. Dichas mezclas fueron incubadas a 37°C durante 90 min en agitación constante, posteriormente las muestras se filtraron con ayuda de un colector automático (Brandel, Gaitersburg) en filtros Whatman GF-B preincubados en polietilenimina 0.3% v/v, en el laboratorio del Dr. Antonio Arias (Departamento de Fisiología, CINVESTAV Zacatenco). Los filtros se depositaron en viales con Aquasol (Perkin-Elmer) y la unión se midió en un contador de centelleo Beckman Coulter LS 6500. Cada mezcla se realizó por duplicado. Para determinar la unión específica (en desintegraciones por minuto) se restaron los valores de unión inespecífica a la

unión total y los valores se reportaron en pmol de [<sup>3</sup>H] rianodina unida/mg de proteína.

## 6.12 Análisis Estadístico

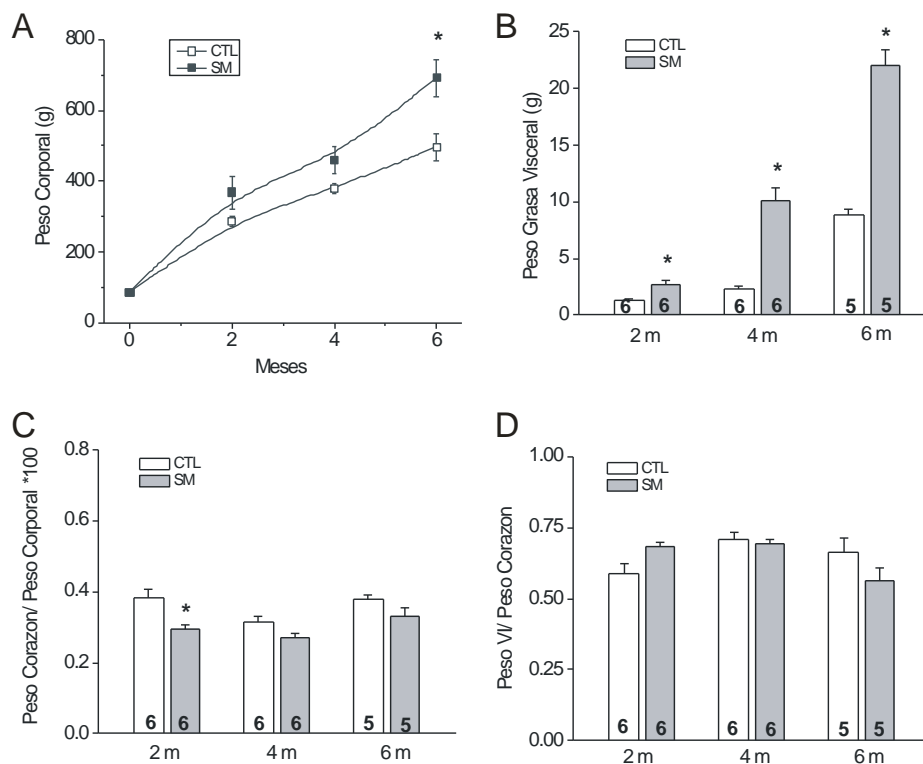
Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  el error estándar de la media ( $M \pm ESM$ ) de los datos. Se especifica el número de animales (N) y el número de experimentos (n) para cada condición. El análisis estadístico de los datos obtenidos en los diferentes ensayos de este proyecto se realizó con ayuda del software SigmaStat 3.0, aplicando una prueba de ANOVA seguido de un análisis *post-hoc* de Student-Newman-Keuls, aquellos datos que no pasaron la prueba de normalidad o de igual varianza se analizaron con la prueba de *Dunn's* para dos grupos para comparar entre pares de grupos y determinar la diferencia significativa con  $P < 0.05$  \*Grupo de SM respecto a su control, # respecto al CTL del otro género en el mismo periodo, respecto al SM del otro género en el mismo periodo.

**\*Nota:** Es importante aclarar que los datos correspondientes a los machos de 6 meses que se presentan, fueron tomados de trabajos previos realizados en nuestro laboratorio (Barrera-Lechuga, 2011; Fernandez, 2013; Cruz 2013), con el fin de comparar con los nuevos grupos.

## 7. RESULTADOS

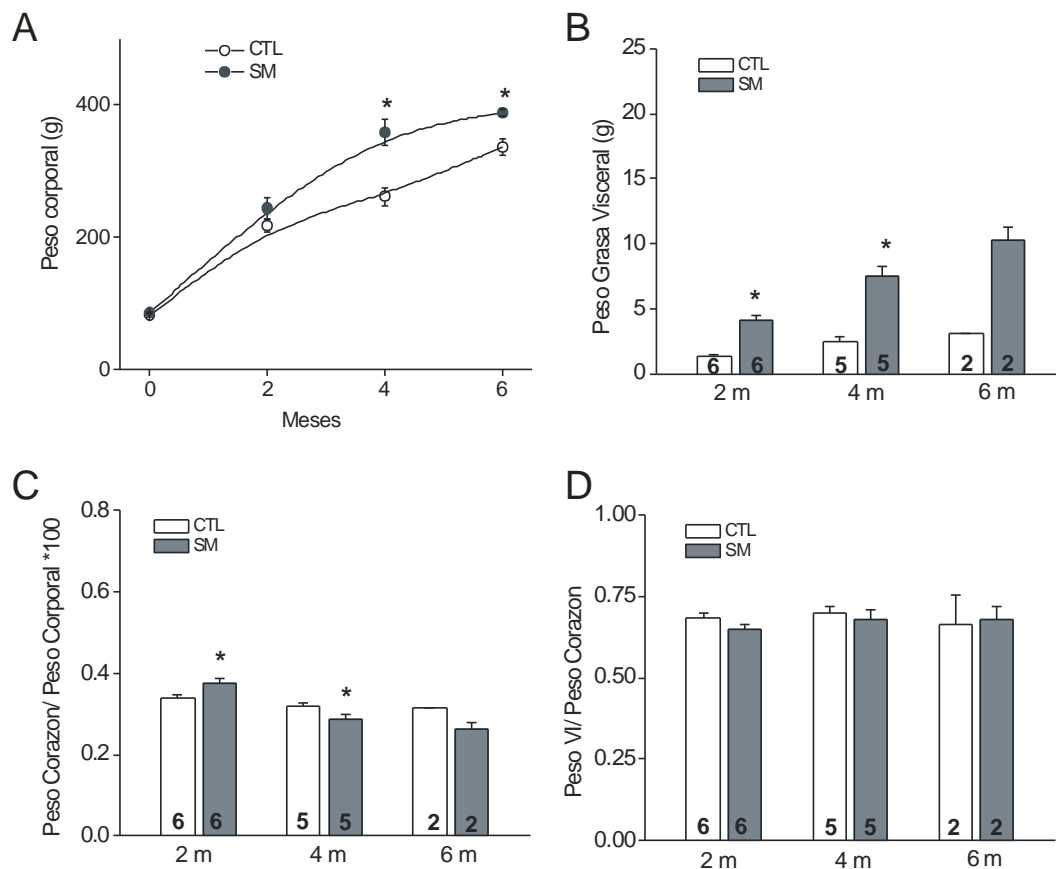
### 7.1 Presencia de características del SM a partir de los 2 meses de tratamiento.

Con el fin de establecer las diferencias en las características corporales de las ratas macho y hembra que recibieron tratamiento con sacarosa al 30% en el agua de bebida, se registraron el peso corporal, el peso del corazón y el peso de la grasa visceral de cada animal después del sacrificio en los tiempos estipulados, encontrando que tanto machos como hembras presentaron un aumento significativo de peso y mayor acumulación de grasa visceral respecto a sus controles, en los periodos evaluados; sin embargo, este aumento fue 2 veces mayor en los machos de 6 meses de tratamiento (figs. 18A, y 18B, vs. 19A y 19B).

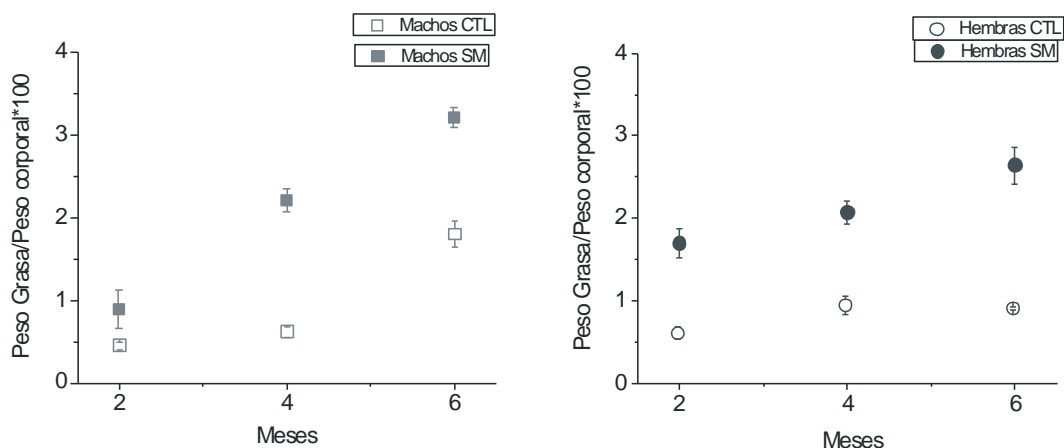


**Figura 18. Parámetros corporales de ratas macho que recibieron sacarosa al 30% en el agua de bebida durante 2, 4 y 6 meses. A.** Peso corporal. **B.** Peso grasa visceral. **C.** Relación peso corazón/peso corporal \* 100. **D.** Relación peso ventrículo izquierdo (VI)/peso corazón. Los datos se representan en gráficas de barras que corresponden al promedio  $\pm$  el error estándar. Los valores de N para cada medición (y que indican número de animales) están representados por los números dentro de cada barra. \*P<0.05 respecto a su control.

Respecto a la relación peso corazón/peso corporal \*100, se encontraron diferencias desde los 2 meses de tratamiento en ambos géneros; no obstante, estos cambios fueron más notorios en la relación peso ventrículo izquierdo/peso corazón (que sirve como indicador de hipertrofia cardiaca) en los machos (figs. 18C y 18D vs, 19C y 19D). En periodos posteriores a los 2 meses estos parámetros no mostraron variaciones significativas, descartando un crecimiento acelerado del VI que compensara las alteraciones producto del tratamiento.



**Figura 19. Parámetros corporales de ratas hembra que recibieron sacarosa al 30% en el agua de bebida durante 2, 4 y 6 meses. A.** Peso corporal. **B.** Peso grasa visceral. **C.** Relación peso corazón/peso corporal \* 100. **D.** Relación peso ventrículo izquierdo (VI)/peso corazón. Los datos se representan en gráficas de barras que corresponden al promedio  $\pm$  el error estándar. Los valores de N para cada medición (y que indican número de animales) están representados por los números dentro de cada barra. \*P<0.05 respecto a su control.

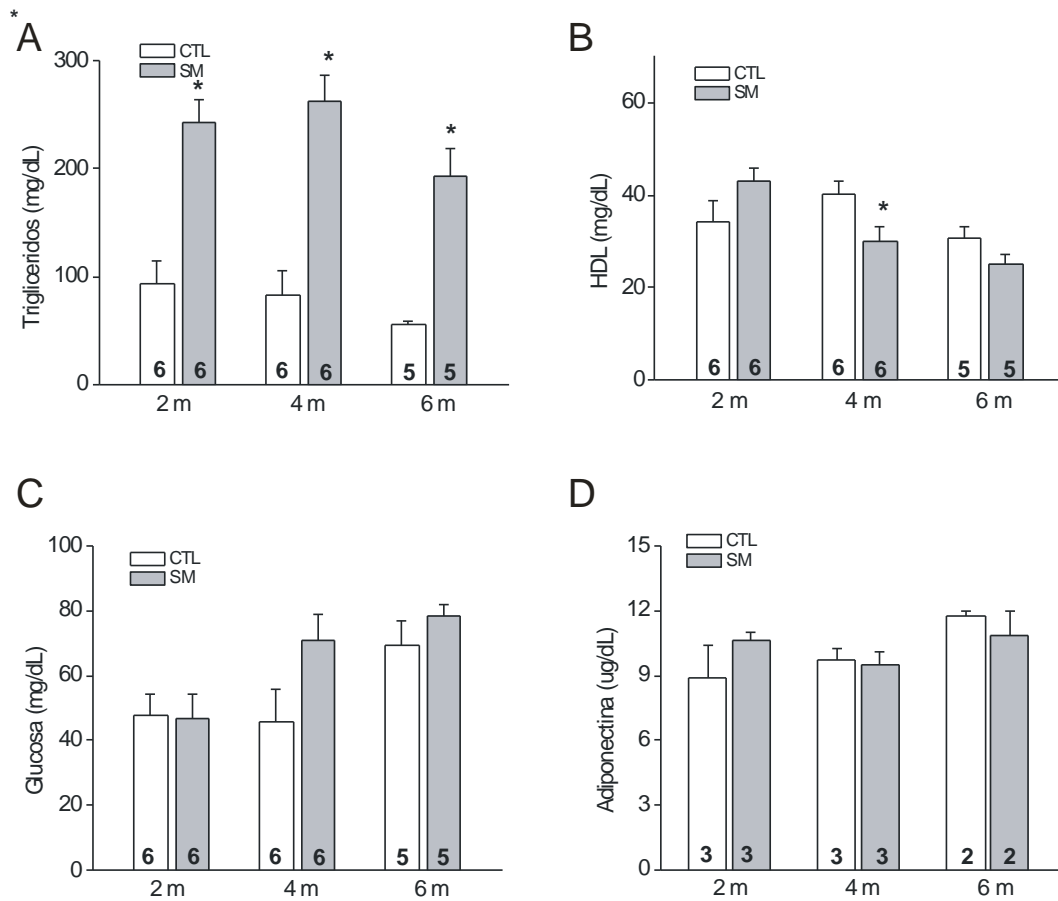


**Figura 20. Relación peso grasa visceral/ peso corporal \* 100 de ratas macho y hembra que recibieron sacarosa al 30% en el agua de bebida durante 2, 4 y 6 meses.** Los datos se representan en gráficas de barras que corresponden al promedio  $\pm$  el error estándar. Los valores de N para cada medición (y que indican número de animales) es igual a 6.

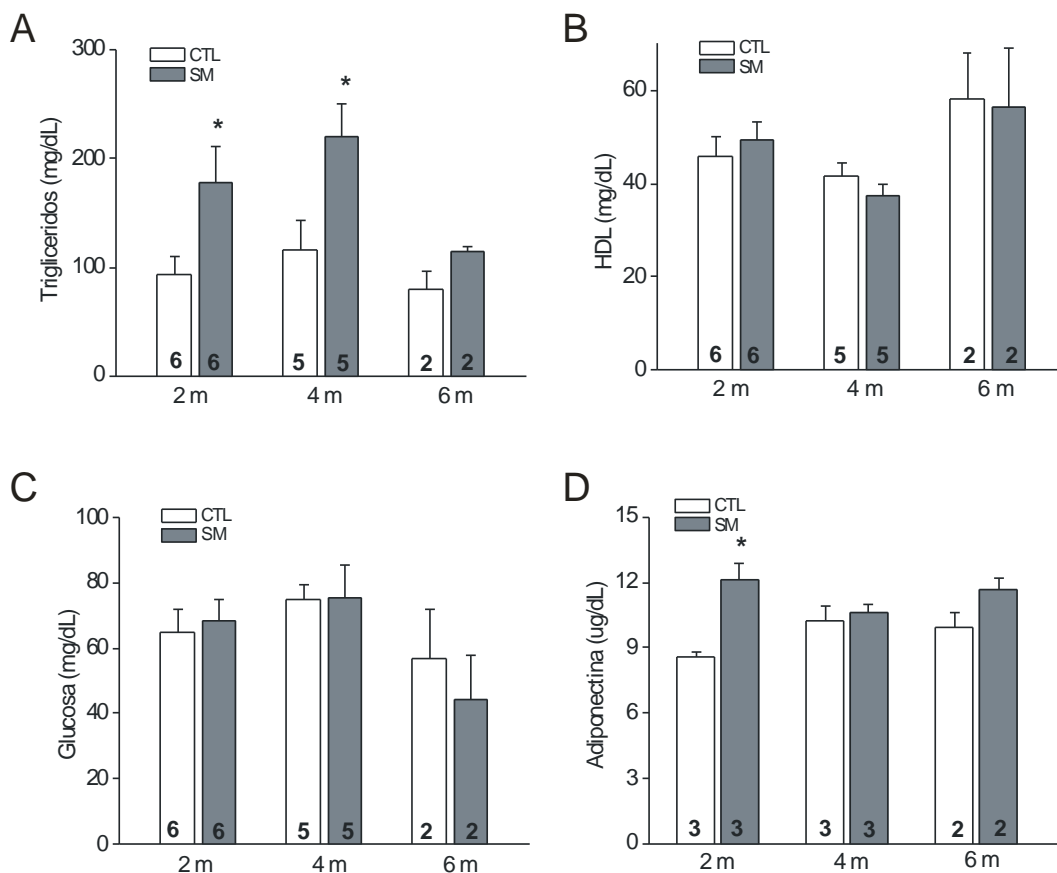
Consideramos relevante, evaluar las diferencias en la relación peso grasa visceral/ peso corporal \*100 entre machos y hembras, teniendo en cuenta que estos parámetros están relacionados con una de las principales características del SM como es la obesidad. Encontramos que la acumulación de tejido adiposo es más evidente y se manifiesta en etapas más tempranas en las hembras que en los machos que presentan aumentos graduales conforme continúa el tratamiento (fig. 20).

Así mismo se midieron parámetros séricos para evaluar el estado metabólico de los animales tratados, encontrando que en ambos géneros se presentó la hipertrigliceridemia asociada al aumento de grasa visceral, desde los 2 meses de tratamiento (figs. 21A y 22A), como ya se había reportado (El Hafidi, *et al* 1997); no obstante, este aumento en las concentraciones circulantes de triglicéridos no conllevó a la disminución de las lipoproteínas de alta densidad HDL, que solo fue significativa en los machos después de 4 meses de tratamiento con un descenso del 25% (fig. 21B).





**Figura 21. Parámetros séricos de ratas macho que recibieron sacarosa al 30% en el agua de bebida durante 2, 4 y 6 meses. A. Triglicéridos. B. HDL. C. Glucosa. D. Adiponectina.** Los datos se representan en gráficas de barras que corresponden al promedio  $\pm$  el error estándar. Los valores de N para cada medición (y que indican número de animales) están representados por los números dentro de cada barra. \* $P < 0.05$  respecto a su control.



**Figura 22. Parámetros séricos de ratas hembra que recibieron sacarosa al 30% en el agua de bebida durante 2, 4 y 6 meses. A.** Triglicéridos. **B.** HDL. **C.** Glucosa. **D.** Adiponectina. Los datos se representan en gráficas de barras que corresponden al promedio  $\pm$  el error estándar. Los valores de N para cada medición (y que indican número de animales) están representados por los números dentro de cada barra. \* $P < 0.05$  respecto a su control.

Por otro lado las concentraciones de glucosa circulantes no presentaron cambios significativos en ninguno de los grupos evaluados (figs. 21C y 22C), lo cual puede relacionarse con la hiperinsulinemia que se genera como respuesta al alto consumo de azúcar y que desencadena resistencia a insulina al establecerse el SM (Cárdenas, *et al* 2006). De igual forma las concentraciones de adiponectina secretada de los adipocitos hacia al torrente sanguíneo no mostraron cambios significativos, más que en el caso de las hembras después de 2 meses de tratamiento donde hay un aumento del 40% (figs. 21D y 22D), cabe destacar que esto concuerda con lo que se ha reportado, respecto a que

las hembras tienden a presentar valores más altos que los machos (Yasui, *et al* 2007).

## **7.2 Los machos y hembras que presentan características asociadas al SM muestran diferencias en los parámetros corporales.**

Al comparar los valores obtenidos para los parámetros corporales y séricos entre machos y hembras, en los diferentes periodos evaluados, se evidenció que aunque en ambos géneros se presentaron aumentos considerables en el peso corporal, estos fueron significativamente mayores en el caso de los machos desde los 4 meses. De igual manera, los machos presentaron mayor porcentaje de acumulación de grasa visceral y ésta fue significativamente superior a la de las hembras a los 6 meses. Otra diferencia importante entre géneros se evidenció a los 6 meses de tratamiento en la relación peso VI/peso corazón donde las hembras conservaron la relación, mientras que en los machos esta relación disminuyó, sugiriendo una pérdida en la función ventricular, que se podría relacionar con la reducción de la capacidad contráctil de los cardiomiocitos, reportada anteriormente (Tabla 3) (Barrera, 2011).

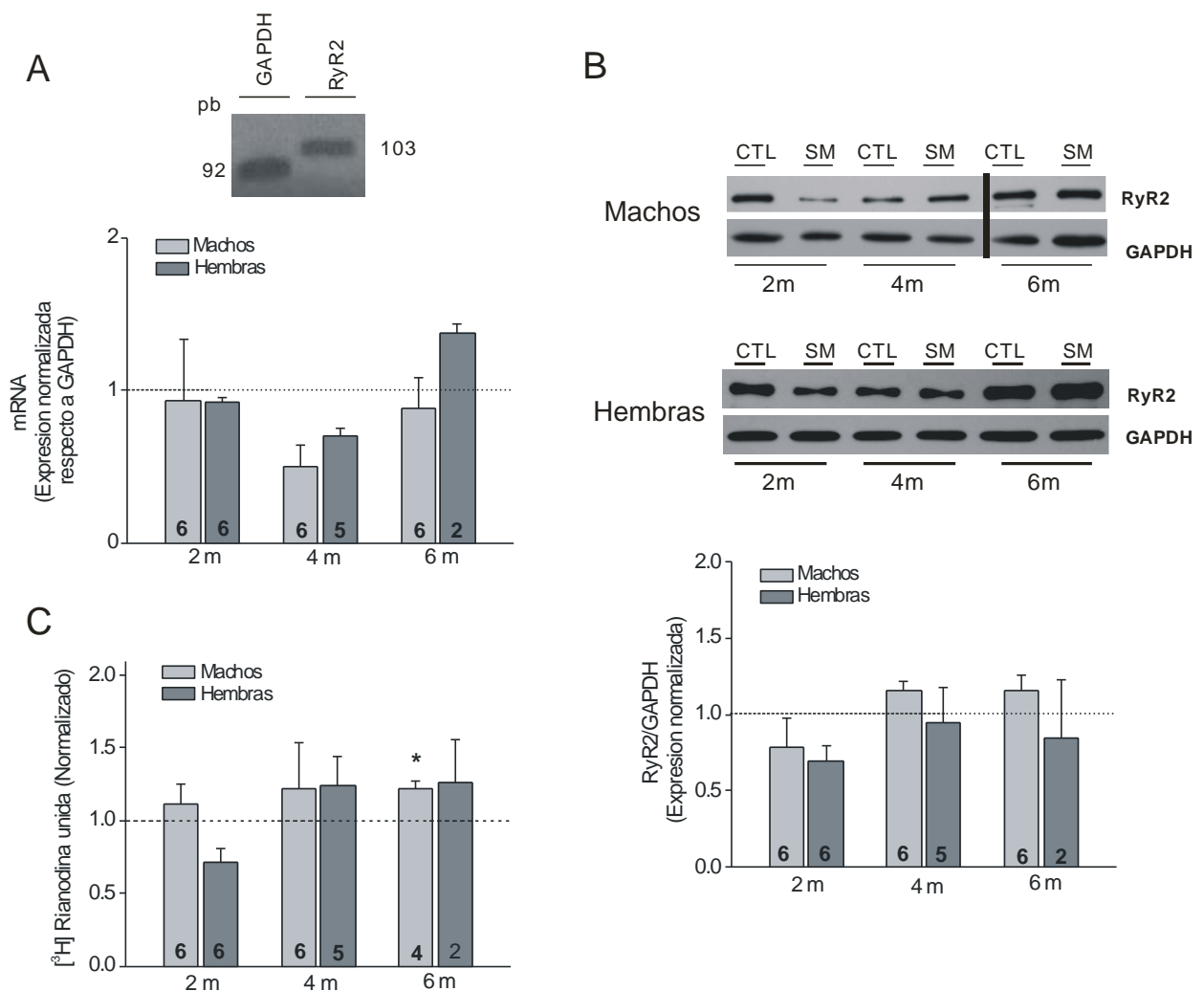
En relación a los parámetros séricos, no se reflejaron cambios significativos entre machos y hembras en los diferentes periodos evaluados, lo cual concuerda con lo observado anteriormente por Cárdenas y colaboradores (2006) quienes no encontraron variaciones en estos parámetros después de utilizar el mismo tratamiento. Sin embargo, si es importante destacar que la hipertrigliceridemia y la reducción en la concentración de HDL fue preponderante en machos más que en hembras.

		Peso Corporal (g)	Peso Grasa Visceral (g)	Peso Grasa V./Peso Corporal* 100	Peso corazón / peso corporal * 100	Peso VI/peso corazón	Glucosa (mg/dL)	Triglicéridos (mg/dL)	HDL (mg/dL)	Adiponectina (ug/dL)
<b>2 MESES</b>										
<i>Machos</i>	CTL	287.5 ± 14.7	1.31 ± 0.1	0.45	0.38 ± 0.02	0.58 ± 0.03 <sup>#</sup>	47.6 ± 6.8	93.6 ± 21.5	34.3 ± 4.4	8.9 ± 1.4
	SM	369 ± 45.9	2.66 ± 0.3	0.72	0.3 ± 0.01 <sup>*%</sup>	0.68 ± 0.01 <sup>*</sup>	46.6 ± 7.6	242.8 ± 21 <sup>*</sup>	43 ± 2.9	10.6 ± 0.3
<i>Hembras</i>	CTL	217.8 ± 9.2	1.32 ± 0.1	0.6	0.34 ± 0.007	0.68 ± 0.02 <sup>#</sup>	65 ± 6.7	93.5 ± 16.9	45.8 ± 4.2	8.6 ± 0.2
	SM	243.8 ± 15.6	4.15 ± 0.3 <sup>*</sup>	1.7	0.37 ± 0.01 <sup>%</sup>	0.65 ± 0.01	68.1 ± 6.8	177.8 ± 33.1 <sup>*</sup>	49.5 ± 3.5	12.1 ± 0.7
<b>4 MESES</b>										
<i>Machos</i>	CTL	379.3 ± 14 <sup>#</sup>	2.34 ± 0.2	0.61	0.31 ± 0.01	0.70 ± 0.02	46 ± 9.7	83.1 ± 21.6	40.1 ± 2.9	9.7 ± 0.5
	SM	459.8 ± 38.8 <sup>*%</sup>	10.08 ± 1.1 <sup>*</sup>	2.17	0.27 ± 0.01	0.69 ± 0.01	70.8 ± 8.2	262.3 ± 23.7 <sup>*</sup>	30.1 ± 2.9	9.5 ± 0.6
<i>Hembras</i>	CTL	261.8 ± 13.3 <sup>#</sup>	2.5 ± 0.4	0.95	0.32 ± 0.007	0.7 ± 0.02	75 ± 4.5	115.6 ± 26.7	41.8 ± 2.4	10.2 ± 0.7
	SM	358.2 ± 19.3 <sup>*%</sup>	7.5 ± 0.8	2.1	0.28 ± 0.01	0.68 ± 0.02	75.6 ± 10	219.6 ± 30.9	37.4 ± 2.3	10.6 ± 0.4
<b>6 MESES</b>										
<i>Machos</i>	CTL	496 ± 38	8.8 ± 0.5 <sup>#</sup>	1.77	0.38 ± 0.01	0.66 ± 0.05	69.4 ± 7.2	56.2 ± 3	30.6 ± 2.4	11.7 ± 0.2
	SM	692.2 ± 52.5 <sup>*%</sup>	21.9 ± 1 <sup>*%</sup>	3.16	0.33 ± 0.02	0.56 ± 0.04 <sup>%</sup>	78.4 ± 3	193.4 ± 25 <sup>*</sup>	25.2 ± 1.9	10.8 ± 1.1
<i>Hembras</i>	CTL	336 ± 13	3 ± 0.04 <sup>#</sup>	0.9	0.31 ± 0.001	0.66 ± 0.09	57 ± 15	79 ± 18	58 ± 10	9.9 ± 0.7
	SM	388.5 ± 4.5 <sup>%</sup>	10.2 ± 1 <sup>*%</sup>	2.62	0.26 ± 0.01	0.68 ± 0.03 <sup>%</sup>	44 ± 14	114.5 ± 4.5	56.5 ± 12.5	11.7 ± 0.5

**Tabla 3. Tabla comparativa de parámetros corporales y séricos de ratas macho y hembra que recibieron sacarosa al 30% en el agua de bebida durante 2, 4 y 6 meses.** Los datos se expresan como el promedio ± error estándar. \*P<0.05 respecto a su control, <sup>#</sup> P<0.05 respecto al CTL del otro género en el mismo periodo, % P<0.05 respecto al SM del otro género en el mismo periodo.

### 7.3 La expresión y actividad del RyR2 no se altera con el desarrollo del SM.

Con el objetivo de evaluar cómo el desarrollo del SM altera la función cardíaca, se estudió la expresión y la actividad de proteínas importantes en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular como el receptor de rianodina tipo 2, ya que como se ha reportado anteriormente (Dincer, *et al* 2006), cambios en su funcionalidad resultan en diversas alteraciones cardiovasculares.



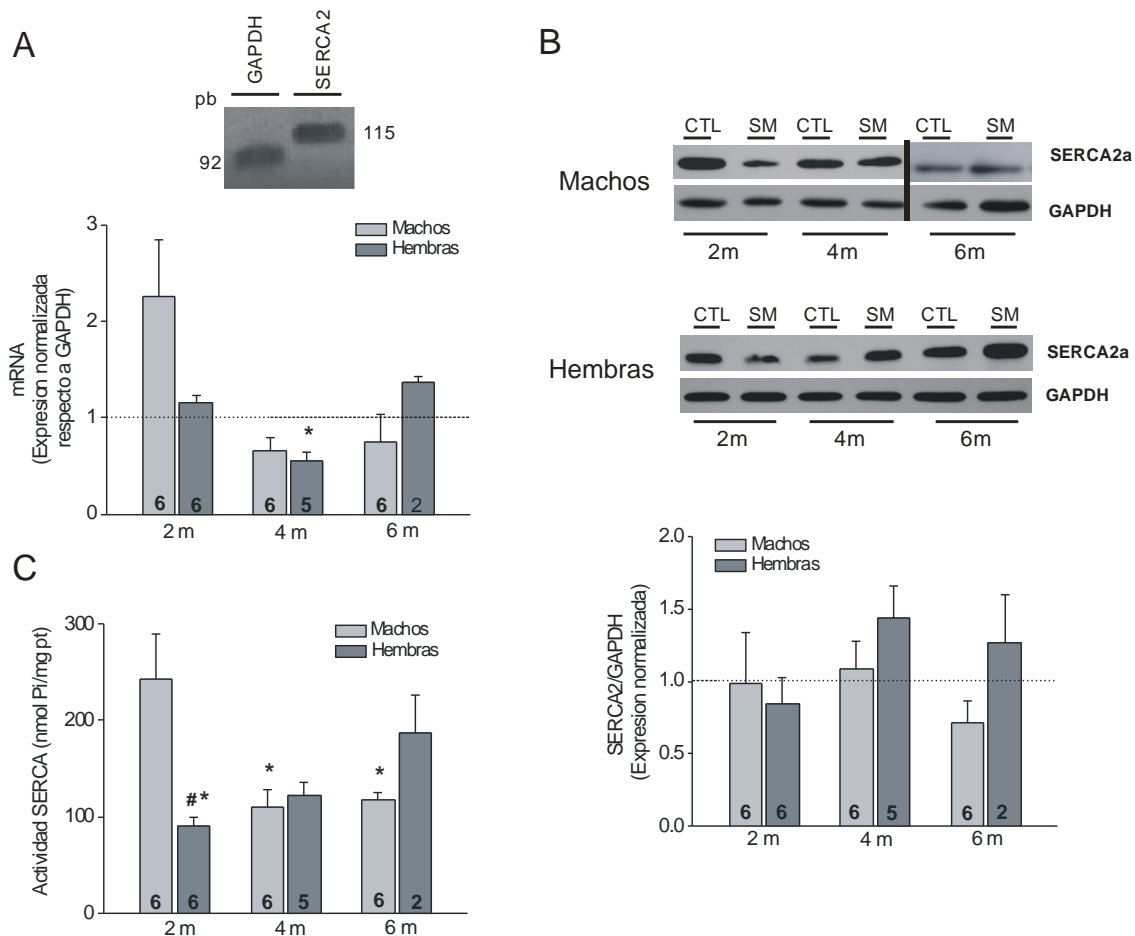
**Figura 23. Niveles de mRNA, expresión proteica y actividad del RyR2 en VI de ratas machos y hembras que recibieron sacarosa al 30% en el agua de bebida durante 2, 4 y 6 meses.** **A.** Expresión relativa del mRNA de RyR2 en VI evaluada por qPCR, de muestras provenientes de machos (*gris claro*) y hembras (*gris oscuro*) que recibieron tratamiento. La línea punteada indica el valor normalizado de sus respectivos controles. **B.** Imágenes representativas (*parte superior*) y gráfica de barras que indican la expresión relativa de RyR2 en homogenados de VI evaluada por Western Blot. **C.** Unión específica de [<sup>3</sup>H]-rianodina normalizada con respecto a los valores de sus respectivos controles. Los datos se representan en gráficas de barras que corresponden al promedio ± el error estándar. Los valores de N para cada medición (y que indican número de animales) están representados por los números dentro de cada barra. \*P<0.05 respecto a su control, # P<0.05 respecto al otro género en el mismo periodo.

Encontramos que los niveles de mRNA de RyR2 no presentaron cambios significativos en ninguno de los grupos evaluados (fig. 23A) y consecuentemente no se reflejaron variaciones en la cantidad de la proteína evaluada por Western Blots (fig. 23B). Pese a esto, la unión a [<sup>3</sup>H]-rianodina aumentó un 22% en homogenados de VI de muestras provenientes de machos tratados durante 6 meses (fig. 23C). En el caso de las hembras no se presentaron variaciones.

#### **7.4 La actividad de la bomba SERCA2 disminuye al progresar el SM.**

Otra de las proteínas clave en la regulación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que puede estar alterada como consecuencia del desarrollo de SM es la bomba ATPasa del retículo sarcoplásmico SERCA2, razón por la cual se estudió su expresión y actividad. Se observó que en general no hubo cambios significativos en los niveles del mRNA (fig. 24A) más que en las hembras tras 4 meses de tratamiento, comportamiento que se estabilizó al sexto mes. Así mismo la cantidad de esta proteína medida por la técnica de Western Blot no presentó cambios significativos, aunque se aprecia que las hembras tienden a presentar mayores cantidades de SERCA2 respecto a los machos (fig. 24B).

No obstante a la estabilidad en la expresión, se encontraron variaciones en la actividad de ATPasa al comparar los géneros, ya que inicialmente las muestras provenientes de los machos presentaron mayor actividad respecto a las hembras, pero a partir de los 4 meses los valores se estabilizan e incluso a los 6 meses las hembras tienden a aumentar su actividad ATPasa (fig. 24C).

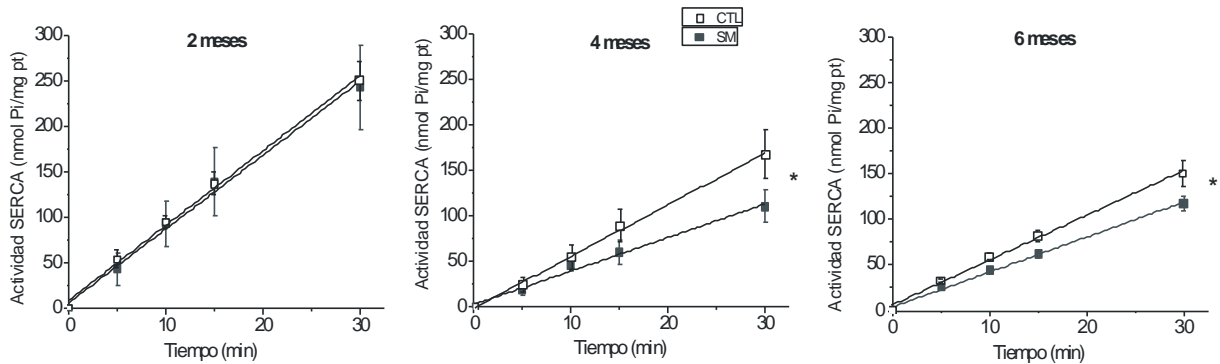


**Figura 24. Niveles de mRNA, expresión proteica y actividad de SERCA2 en VI de ratas machos y hembras que recibieron sacarosa al 30% en el agua de bebida durante 2, 4 y 6 meses.** **A.** Expresión relativa del mRNA de SERCA2 en VI evaluada por qPCR, de muestras provenientes de machos (*gris claro*) y hembras (*gris oscuro*) que recibieron tratamiento. La línea punteada indica el valor normalizado de sus respectivos controles. **B.** Imágenes representativas (*parte superior*) y gráfica de barras que indican la expresión relativa de SERCA2 en homogenados de VI evaluada por Western Blot. **C.** Actividad enzimática de la bomba ATPasa SERCA2 después de 30 minutos. Los datos se representan en gráficas de barras que corresponden al promedio  $\pm$  el error estándar. Los valores de N para cada medición (y que indican número de animales) están representados por los números dentro de cada barra. \* $P < 0.05$  respecto a su control, #  $P < 0.05$  respecto al otro género en el mismo periodo.

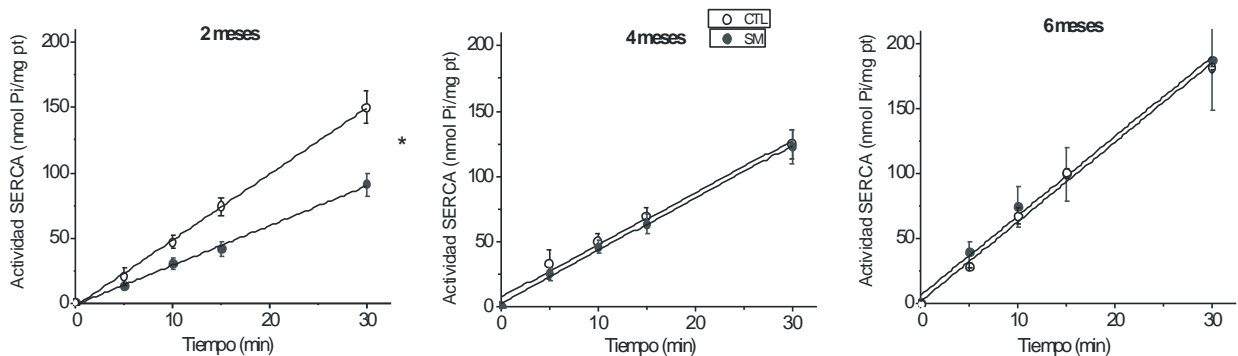


Particularmente en los machos la disminución en la actividad funcional es evidente desde los 4 meses y esta tendencia permanece a los 6 meses (fig. 25A). Por otro lado el comportamiento de las hembras no es el mismo, puesto que la actividad disminuyó desde los 2 meses de tratamiento; sin embargo, a partir de los 4 meses y hasta los 6 meses la actividad de ATPasa se recuperó alcanzando los niveles control (fig. 25B).

**A**



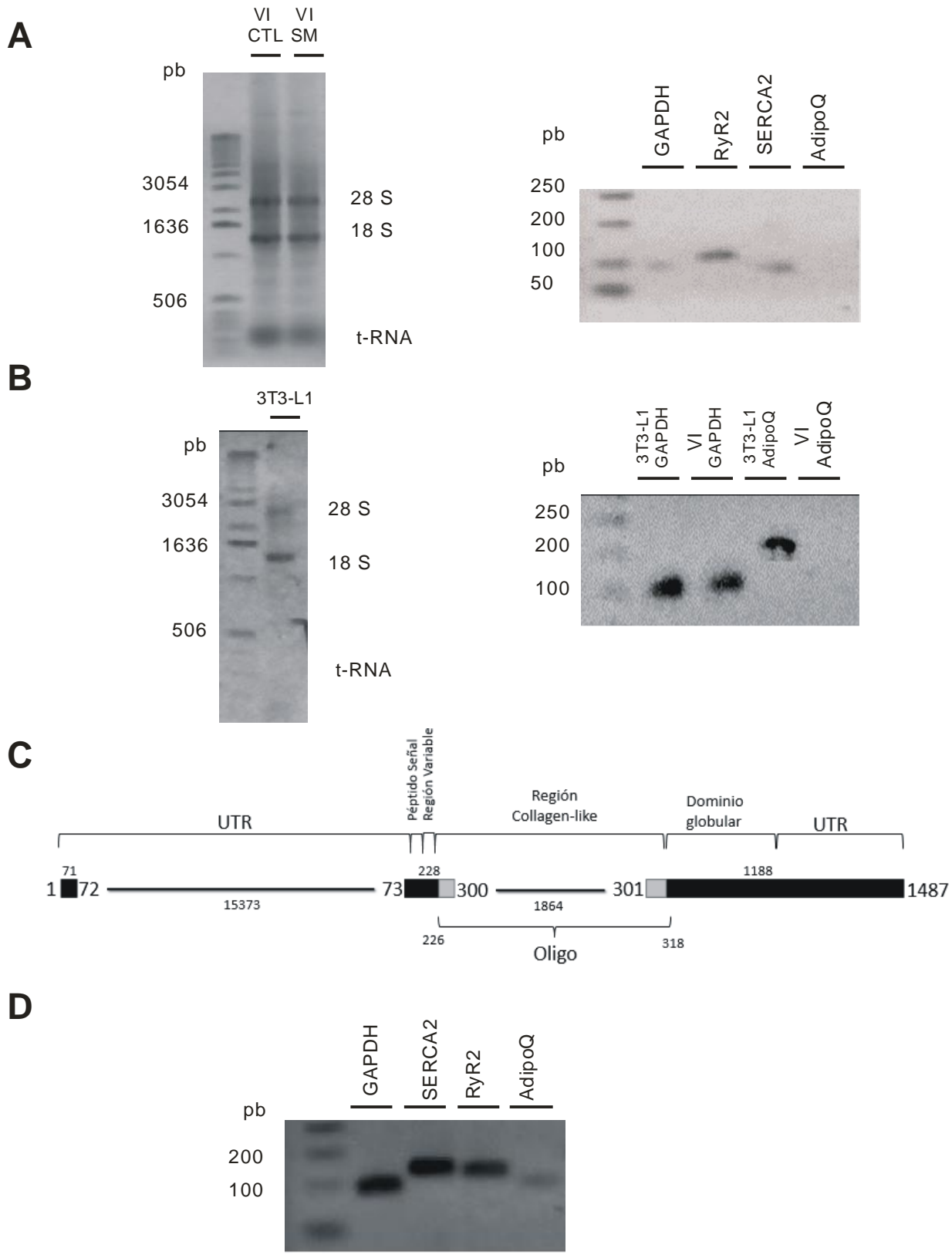
**B**



**Figura 25. Actividad de la proteína SERCA2 en VI de ratas. A.** Graficas de cinética enzimática de ratas macho tratadas durante 2, 4 y 6 meses con sacarosa al 30% en el agua de bebida. **B.** Graficas de cinética enzimática de ratas hembra tratadas durante 2, 4 y 6 meses con sacarosa al 30% en el agua de bebida. Los datos se expresan como el promedio  $\pm$  error estándar. \* $P < 0.05$  respecto al ajuste lineal de su control.

## **7.5 La adiponectina que se expresa en corazón puede presentar variaciones respecto a la proveniente de adipocitos.**

Para poder relacionar los cambios en la expresión y actividad de RyR2 y SERCA2a con los cambios debidos a la progresión del SM en las concentraciones de la adiponectina que se expresa en corazón, se extrajo el RNA de VI y se comprobó su integridad en geles de agarosa al 1% (fig. 26A). A continuación se realizó una PCR de punto final (PCRpf) para comprobar que los fragmentos de amplificación generados con los oligos inter-exónicos diseñados para detectar exclusivamente los mRNAs de RyR2, SERCA2 y AdipoQ fueran de los tamaños esperados (Tabla 2; fig. 26A). Corroborados los tamaños adecuados de los fragmentos de amplificación, se procedió con la qPCR. Sin embargo, después de varios intentos (n=4) se encontró que los oligos para AdipoQ no generaban ningún fragmento de amplificación (fig. 26A). Con el fin de corroborar experimentalmente el buen diseño y funcionamiento de estos oligos, se aisló RNA a partir de fibroblastos de la línea 3T3-L1 diferenciados a adipocitos (donados gentilmente por Citlali Gutierrez Rodelo, del laboratorio del Dr. Alberto Olivares, Departamento de Bioquímica); y efectivamente se verificó que los oligos amplificaban la región esperada del mRNA de adiponectina proveniente de adipocitos (fig. 26B). Al analizar la secuencia de la región amplificada, se encontró que abarcaba una parte que codifica para la región variable de la proteína. Por tal razón se diseñó un nuevo par de oligos que excluía esta región (fig. 26C), al realizar una nueva PCR punto final utilizando el nuevo par de oligos si se logró detectar el fragmento de amplificación esperado para AdipoQ (fig. 26D); lo que nos lleva a sugerir que la secuencia del mRNA que codifica para la proteína que se expresa en adipocitos difiere de aquella expresada de forma local en corazón; y que la diferencia se encuentra justamente en la región reportada como variable de la proteína.

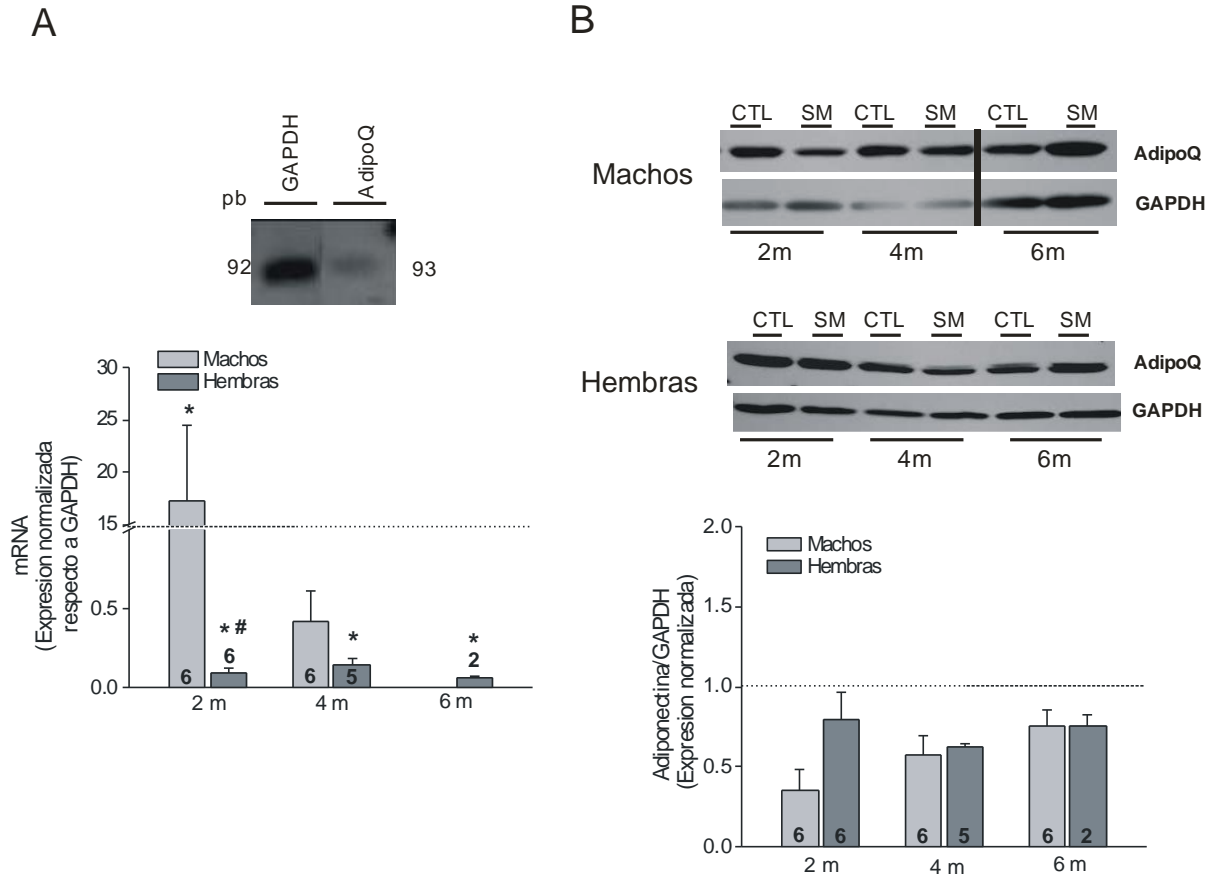


**Figura 26. Estandarización de oligos para qPCR** **A.** Imágenes representativas de geles de agarosa al 1% y al 2.5% respectivamente de la integridad del RNA total de VI de corazón y de PCRpf de muestras provenientes de animales tratados con sacarosa al 30% en el agua de bebida durante 4 meses. Se muestran los fragmentos de amplificación correspondientes a GAPDH= 92 pb, SERCA2= 115 pb, RyR2= 103 pb y AdipoQ= 215 pb. **B.** Imágenes representativas de geles de agarosa al 1% y al 2.5% respectivamente de la integridad del RNA total de fibroblastos 3T3-L1 diferenciados a adipocitos y de PCRpf. Se muestran los fragmentos correspondientes a la amplificación de GAPDH= 92 pb y AdipoQ= 215 pb. **C.** Representación del gen de AdipoQ de rata. Se especifica el transcrito generado en los corchetes y se muestran las diferentes regiones codificantes en barras negras y el diseño del oligo inter-exónico utilizado para PCRpf y RT-PCR en las barras grises **D.** Imagen representativa de PCRpf utilizando el nuevo diseño de oligos para el mRNA de AdipoQ proveniente de VI de animales tratados con sacarosa al 30% en el agua de bebida durante 4 meses. Se muestran los fragmentos correspondientes a la amplificación de GAPDH= 92 pb, SERCA2= 115 pb, RyR2= 103 pb y AdipoQ= 93 pb.

## **7.6 Presencia de un sistema local de adiponectina en corazón que se altera durante el SM**

Una vez que se determinó que efectivamente la adiponectina se expresa localmente en VI, procedimos a cuantificar los niveles de mRNA de esta citocina y la cantidad de dicha proteína en VI encontrando que en muestras provenientes de hembras se observó una disminución en los niveles de mRNA de 11 veces respecto a sus controles, desde los 2 meses de tratamiento, tendencia que se mantuvo hasta los 6 meses. En el caso de los machos, a los 2 meses se encontraron valores 17 veces más altos en los niveles de mRNA de AdipoQ en muestras provenientes de animales que recibieron sacarosa. Sin embargo, a los 4 meses los niveles de mRNA de Adipo Q disminuyeron abruptamente un 58% (fig. 27A). A nivel de expresión de proteína, evaluada por la técnica de *Western Blots*, en las muestras de las hembras se mantuvo la tendencia observada en los niveles de mRNA; sin embargo, en el caso de los machos los niveles de expresión proteica de AdipoQ fueron muy estables en los tiempos evaluados y no se reflejó el aumento observado en los niveles de mRNA a los 2 meses de tratamiento (fig. 27B).

Resultó evidente que la relación en cuanto a los niveles de mRNA y proteína de adiponectina de corazón difiere considerablemente de los niveles que se expresan en los adipocitos y que se reflejan en la AdipoQ que se encuentran circulando (figs. 21D y 22D). Dicha discrepancia nos permitió evidenciar la existencia de un sistema local de adiponectina en corazón que, al parecer es independiente de los niveles circulantes de esta citocina, tal como se ha reportado en otros modelos (Skurk, *et al* 2006). De acuerdo a los resultados obtenidos, tal sistema local de adiponectina en corazón es afectado mayormente en las hembras al desarrollarse el SM que en los machos.



**Figura 27. Niveles de mRNA y expresión de la proteína AdipoQ en VI de ratas machos y hembras que recibieron sacarosa al 30% en el agua de bebida durante 2, 4 y 6 meses.** **A.** Expresión relativa del mRNA de AdipoQ en VI de corazón evaluada por RT-PCR. **B.** Expresión relativa de la proteína AdipoQ en homogenados de VI de corazón evaluada por Western Blot. Los datos se expresan como el promedio  $\pm$  error estándar. Los valores de n para cada medición están representados por los números en cada barra. \* $P < 0.05$  respecto a su control, #  $P < 0.05$  respecto al otro género en el mismo periodo.

## 8. DISCUSIÓN

En el presente estudio se observó cómo emergen las diferentes características del SM en relación al tiempo de tratamiento y cómo se diferencia dicha progresión respecto al género. Inicialmente se observan cambios en el peso corporal, pero en su mayoría éstos no son significativos entre los grupos control y SM, a pesar de los aumentos en la acumulación de grasa visceral. Dicho comportamiento ya se había observado en este modelo (Cárdenas, *et al* 2006). En relación al género, el aumento en la acumulación de grasa visceral es evidente en ambos, pero se presenta con mayor contundencia en los machos quienes tienen mayor tendencia a acumular tejido adiposo en la zona intra-abdominal respecto a las hembras, cuyos depósitos de grasa se distribuyen principalmente en la parte baja de su cuerpo mientras que en la zona abdominal la acumulación se encuentra casi por completo en la región subcutánea (Pedersen, *et al* 2004). Los cambios de peso parecen no alterar el crecimiento normal del corazón, salvo en las etapas iniciales, donde los machos de 2 meses muestran indicios de hipertrofia al evidenciarse que el tamaño del corazón es menor y el del VI mayor respecto a los controles. Posteriormente el corazón y el VI van aumentando de tamaño paulatinamente, estos resultados contrastan con la hipertrofia que se esperaba como respuesta al incremento del gasto cardíaco y del volumen sanguíneo para cubrir las demandas metabólicas (Wong, *et al* 2004). Por otro lado, en las hembras es más difícil inducir hipertrofia e insuficiencia cardíaca (Douglas, *et al* 1998) esto se comprobó en nuestro modelo donde el tamaño del corazón y del VI no cambian de forma significativa en los periodos evaluados.

Consecuentemente a la mayor acumulación de grasa visceral, otra de las primeras características del SM en manifestarse tanto en machos como en hembras es la hipertrigliceridemia, que está relacionada al consumo calórico de cada grupo ya que al determinarse este parámetro no se encontraron diferencias significativas en las kilocalorías consumidas por día entre los grupos (datos no mostrados); no obstante, el aporte calórico de los grupos de SM se debía casi

exclusivamente al consumo de agua con sacarosa al 30% y el consumo de alimento sólido disminuyó de forma importante (datos no mostrados). Entonces, el exceso en la ingesta de carbohidratos lleva a la formación de ácido fosfatídico a partir de dihidroxiacetona fosfato proveniente de la glucólisis, lo que resulta en la síntesis exacerbada de triglicéridos que se almacenan en los adipocitos, contribuyendo en el incremento de la circunferencia abdominal y del peso. Se esperaban disminuciones en los niveles de HDL de forma paulatina, por el aumento de la síntesis hepática de lipoproteínas de baja densidad LDL, en respuesta a los aumentos de triglicéridos (Ros, *et al* 2006); sin embargo, en los periodos estudiados no se encontraron diferencias importantes.

Aunque no se evidenciaron valores de glucosa más altos en los grupos de SM como se podría esperar; en diferentes estudios en ratas (Cárdenas, *et al* 2006; Dutta, *et al* 2001) se ha mostrado que los valores de insulina si aumentan de forma importante, puesto que en las etapas tempranas del SM no se encuentran altas concentraciones de glucosa en sangre ya que inicialmente el organismo genera un aumento en la producción de insulina para responder al alto consumo de glucosa, entrando en un estado de hiperinsulinemia compensatoria que al establecerse el SM resulta en resistencia a insulina (Toida, *et al* 1996).

La insuficiencia cardiaca se considera una de las principales causas de morbilidad y mortalidad dentro de los que padecen el SM (Gimeno, *et al* 2004). Así mismo se ha encontrado que las alteraciones en la regulación de  $Ca^{2+}$  en miocitos están asociado al desarrollo de enfermedades cardiovasculares y que dichos cambios en la funcionalidad están asociados con alteraciones en la expresión y/o la actividad de las proteínas reguladoras de  $Ca^{2+}$  (Bers, 2014). Por tal razón evaluamos los cambios del RyR2 en el progreso del SM, sin encontrar cambios significativos en los niveles de mRNA expresión proteica y cantidad funcional de RyR2 a los 2 y 4 meses de tratamiento. Sin embargo, en muestras de VI de corazón de machos de 6 meses de tratamiento, encontramos un aumento significativo en la unión específica de [ $^3H$ ]rianodina, resultado que no es



consistente con lo encontrado por Dincer (2006) en un modelo de perros alimentados con una dieta alta en grasa, ni por lo reportado por Paulina Barrera (Barrera, 2011). Esto se podría explicar debido a que en ambos trabajos, se utilizaron preparaciones enriquecidas en RS para la determinación de los RyRs funcionales, mientras que en el presente estudio utilizamos homogenados totales de VI, que no fueron sometidos a una serie de centrifugaciones diferenciales, que podrían separar diferentes poblaciones de microsomas. No obstante, en diversos estudios ya se ha reportado como el aumento en el estrés oxidativo, que es uno de los efectos del SM, está asociado a la activación de RyR2 por un cambio conformacional generado por la nitrosilación de un residuo cisteína, seguido de la trans-nitrosilación de otros grupos tiol (Oda, *et al* 2015; Stoyanovsky, *et al* 1997), lo cual puede explicar el aumento en la actividad funcional del RyR2 observado en los machos después de 6 meses de tratamiento.

Por otra parte, estudios recientes han demostrado que el SM genera la activación crónica del sistema nervioso simpático lo que favorece un aumento en la fosforilación mediada por PKA en el residuo de Ser2809 del RyR, lo que conlleva al desarrollo de arritmias ventriculares letales, contracciones alteradas e insuficiencia cardíaca (Dincer, 2012); sin embargo, datos de nuestro laboratorio han mostrado que no hay cambios significativos en la fosforilación de la Ser2809 en microsomas de VI de ratas macho de 6 meses de tratamiento (Barrera, 2011). Es muy importante aclarar que existen muy pocas publicaciones que hayan estudiado el efecto del SM en la función y expresión del RyR2, de ahí que nuestros datos sean relevantes, debido a que es la primera vez que en este modelo experimental se estudia detalladamente la expresión y actividad funcional del RyR2. Respecto al género, en estudios previos se ha demostrado que hay expresión diferenciada de esta proteína dependiendo del género (Chu, *et al* 2005), así en un modelo de ratas Sprague-Dawley se encontró que las hembras presentan 35% más de proteína RyR que los machos en condiciones control, no obstante, esta ventaja parece no representar mayor fuerza muscular o diferencias a nivel funcional, puesto que no se han encontrado diferencias en la sensibilidad a

la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  del receptor ni en la carga del RS entre un género y el otro (Schwartz, *et al* 2004; Chen, *et al* 2003). En nuestros resultados no vemos diferencias en los RyR2 funcionales entre machos y hembras en condiciones de SM, y aunque no observamos diferencias significativas en la expresión del mRNA de RyR si se puede observar una tendencia en las hembras a presentar niveles de mRNA más altos que los de los machos.

Los estudios en relación con la proteína SERCA2 y sus alteraciones en el SM son más extensos, diversos estudios en animales bajo una dieta alta en sacarosa muestran que la disfunción diastólica está asociada con alteraciones en el acoplamiento excitación-contracción y específicamente con variaciones en SERCA2a relacionadas con su actividad más no con su expresión génica (Wold, *et al* 2005) ni cantidad relativa, lo cual se conserva en machos y hembras (Chu, *et al* 2005) como pudimos corroborar en nuestros resultados donde no evidenciamos cambios significativos en los niveles del mRNA relacionadas con el tratamiento ni con el género.

No obstante en otros modelos de disfunción cardíaca se ha visto que si hay variaciones en la regulación de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  por SERCA relativas al género. En ciertas patologías, los machos presentan disminución en la fosforilación en Ser16 de la proteína reguladora fosfolamban (PLB), lo que aumenta la inhibición de SERCA que se refleja en aumentos en la  $\text{EC}_{50}$  de la recaptura de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS (Dash, *et al* 2001). Esto puede explicar la caída en la actividad enzimática de SERCA2 que observamos en los machos del grupo de SM a partir de los 4 meses. De ahí la importancia de analizar en un futuro, el nivel de fosforilación de PLB en este modelo experimental.

Respecto a las hembras, en un modelo de SM inducido con fructosa se observó que en etapas tempranas, el SM altera la función de SERCA2 pero que posteriormente esto se previene por una regulación positiva de la bomba por cambios en la fosforilación de PLB (Miklós, *et al* 2012) incrementando la actividad

de SERCA, lo cual puede estar relacionado con nuestros resultados en hembras en los que se identificó que la actividad cae desde los 2 meses pero a partir de los 4 meses ésta se recupera. Además se ha encontrado que las hormonas sexuales femeninas juegan un papel importante en la regulación de la recaptura de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS ya que el suplemento a ratas ovariectomizadas con estrógeno y progesterona fue igual de efectivo en prevenir el daño cardiaco. Es importante aclarar que la regulación de estas hormonas no es directa sobre la proteína, puesto que no hay elementos de respuesta a estrógenos o progesterona encontrados en la región regulatoria o en el gen completo de SERCA de humanos (Zarain, *et al* 2002), así que la regulación podría estar relacionada con eventos de trans-activación sobre factores de transcripción o efectos sobre otra proteína que después repercuten en SERCA (Bupha-Intr, *et al.*, 2006).

En nuestros resultados observamos que las hembras a los 4 y 6 meses, tienden a mostrar niveles de expresión proteica de SERCA2a mayores respecto a los machos, aun cuando los niveles del mRNA no muestran diferencias significativas. Este contraste puede ser explicado por lo planteado por Moshal y colaboradores (2014) en su estudio realizado en cardiomiocitos de conejo, donde encontraron que la progesterona aumenta la cantidad de SERCA2a a través de la disminución de la ubiquitinización de esta proteína evitando su degradación, por ende consideramos que las hormonas femeninas de las hembras representan una ventaja sobre los machos, que les ayuda a acumular mayores cantidades de la bomba SERCA que permiten responder al daño generado por el consumo de azúcar para restablecer la actividad ATPasa.

Otro factor determinante que puede estar involucrado en los cambios en la actividad de la proteína SERCA, es la producción exacerbada de especies reactivas de oxígeno (ROS) que es un estado característico en el SM que se relaciona con prácticamente todas sus características como el aumento en los triglicéridos, que favorece la lipo-peroxidación y el estrés oxidativo (El-Hafidi, *et al* 1997). Por ejemplo, los cardiomiocitos de ratas con SM muestran mayor

producción de ROS además de remoción de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático reducido, que se asocia con una disminución en la recaptura de  $\text{Ca}^{2+}$  por un aumento en la oxidación de SERCA2a (Balderas, *et al* 2013), que puede sufrir cambios estructurales ocasionados por modificaciones post-traduccionales oxidativas (OPTMs) que inhiben su actividad (Lancel, *et al* 2010).

Teniendo en cuenta que la adiponectina se ha relacionado extensamente con la protección de la función cardiaca y una de las vías por las que ejerce este efecto involucra la disminución del estrés oxidativo, consideramos estudiar la relación entre la disminución en la actividad de la bomba SERCA y la adiponectina ya que en el trabajo de Boddu y colaboradores (2014) el tratamiento con esta proteína disminuye la expresión de genes asociados al estrés del RS al tiempo que aumenta la expresión de SERCA2a en cardiomioblastos H9C2 (Boddu, *et al* 2014). Se ha encontrado que el aumento en triglicéridos altera el manejo de  $\text{Ca}^{2+}$  y la contracción en cardiomiocitos de rata a través de un mecanismo dependiente de ROS que disminuye la actividad de SERCA2a y que al atenuar el estrés oxidativo por el tratamiento con adiponectina se normaliza su actividad (Guo, *et al* 2013). De hecho en el SM, el estrés oxidativo asociado inhibe la expresión de adiponectina (Furukawa, *et al* 2004), lo cual se comprobó indirectamente en nuestro trabajo, ya que tanto en machos como en hembras de los grupos de SM, se evidenciaron niveles de expresión de adiponectina en corazón por debajo de los controles. En los ensayos de Western Blot de adiponectina detectamos solo una banda alrededor de los 60 kDa; teniendo en cuenta que cada monómero de esta proteína pesa alrededor de 30 kDa, lo que detectamos corresponde al dímero que aunque no es una de las isoformas características de adiponectina, si es un producto de la desnaturalización por calor de la forma oligomérica HMW (Tsao, *et al* 2003), la cual es la más activa en el plasma y que se encuentra asociada por la relación HMW/ adiponectina total con el SM y otras patologías (Hara, *et al* 2006). Justamente se ha encontrado que dicha relación es un factor importante en las diferencias observadas entre machos y hembras, ya que se asocia a los niveles de

testosterona y de nivel de globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG) (Yasui, *et al* 2007).

Por otro lado, considerando que los niveles de adiponectina en sangre presentan una relación inversa con las concentraciones de triglicéridos, al facilitar la oxidación de ácidos grasos en hígado y músculo y además estimular la utilización de glucosa en músculo (Kozłowska, *et al* 2006), esperábamos bajas concentraciones de adiponectina en los grupos de SM como ya se han reportado en modelos de diabetes mellitus tipo 2 (Li, *et al* 2014); sin embargo, en nuestro modelo no encontramos disminuciones significativas entre los grupos control y SM en ninguno de los géneros en las concentraciones de adiponectina circulantes, pero en favor de nuestro trabajo, debemos mencionar que en otros reportes también se han encontrado altos niveles circulantes de esta proteína, como en un modelo de insuficiencia cardiaca, lo que se cree que está relacionado con un efecto compensatorio para reestablecer la homeostasis metabólica, el cual es generado por los péptidos natriuréticos que favorecen la producción de adiponectina en los adipocitos vía cGMP (Tsukamoto, *et al* 2009).

Lo anterior sugiere que los niveles de adiponectina circulante se recuperan para favorecer la actividad cardiaca, entonces ¿por qué se ve afectada la función cardiaca en el SM? La respuesta parece estar relacionada con la producción local de adiponectina y sus receptores en corazón, que ha sido recientemente estudiada (Piñeiro, *et al* 2005) y nuestros resultados lo confirman. En nuestro modelo experimental, los niveles de mRNA de adiponectina local disminuyen dramáticamente desde los 2 meses de tratamiento en el caso de las hembras y desde los 4 meses en los machos. La expresión local de esta citocina tiene relación con lo reportado en diferentes trabajos (Caselli, *et al* 2012; Skurk, *et al* 2008) que aseguran que existe un sistema de adiponectina cardiaco, regulado independientemente de los niveles séricos de adiponectina y de TNF $\alpha$ , el cual responde a un mecanismo auto/paracrino y que esta desregulado cuando se presenta insuficiencia cardiaca. Un hallazgo importante en nuestro trabajo al

probar dos oligos diferentes para amplificar a AdipoQ, fue encontrar diferencias precisamente entre la adiponectina secretada por adipocitos y la que se expresa de forma local en el corazón, lo cual nos permite plantear que hay diferencias estructurales que son importantes para el sistema local de adiponectina y su actividad cardioprotectora; no obstante resultaría de gran importancia complementar estos resultados en un futuro con otros ensayos para comprobar dicha hipótesis.

## 9. CONCLUSIONES

- Las características corporales y bioquímicas del SM se manifiestan primero y con más contundencia en los machos que en las hembras.
- Durante el desarrollo del SM se presentan cambios en actividad funcional de los RyR2 únicamente en los machos después de 6 meses de tratamiento; no obstante dicho comportamiento no se relaciona con la expresión ni con la cantidad de RyR2 activos tanto en machos como en hembras.
- La actividad ATPasa de la bomba SERCA2 disminuye en los machos a partir de los 4 meses de tratamiento, en un comportamiento que no está asociado a cambios en la expresión de la proteína.
- La actividad ATPasa de la bomba SERCA2 disminuye en las hembras desde los 2 meses de tratamiento y en un comportamiento no esperado, se recupera a partir de los 4 meses lo que se relaciona con mayores cantidades de esta proteína.
- Las disminuciones en la actividad de ATPasa de SERCA2 parecen estar relacionadas con alteraciones en el sistema local de adiponectina, lo que es de relevancia y podría deberse a un aumento en la oxidación de SERCA2.
- Nuestros datos sugieren que las hembras recuperan y conservan su función cardíaca por un mecanismo relacionado con las hormonas sexuales como la progesterona, que ofrece protección al disminuir la degradación de la bomba SERCA2.

## 10. PERSPECTIVAS

- Determinar la secuencia del mRNA de la adiponectina que se expresa en corazón, para alinearla con el mensajero de adiponectina de adipocitos e identificar las posibles diferencias.
- Evaluar los niveles de estrés oxidativo en cardiomiocitos de animales tratados con sacarosa al 30%.
- Evaluar la expresión y la localización de AdipoR1 y AdipoR2 en el músculo cardíaco.
- Evaluar la participación de fosfolamban como parte de la regulación ejercida por adiponectina a la bomba SERCA2.
- Trabajar con un modelo de ratas hembra ovariectomizadas para establecer la posible participación de las hormonas femeninas como progesterona en la protección de la actividad de SERCA cardíaca.



## 11. BIBLIOGRAFÍA

Alberti K., Zimmet P. and Shaw J. 2006. Metabolic syndrome – a new worldwide definition. A consensus statement from the International Diabetes Federation. *Diabetic Medicine*. 23:469-480

Balderas-Villalobos J., Molina-Muñoz T., Mailloux-Salinas P., Bravo G., Carvajal K. and Gómez-Viquez NL. 2013. Oxidative stress in cardiomyocytes contributes to decreased SERCA2a activity in rats with metabolic syndrome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 305(9):1344-1353.

Barrera-Lechuga P. 2011. Alteraciones en la función del receptor de rianodina cardiaco en un modelo de síndrome metabólico. Tesis Licenciatura

Bartolommei G., Moncelli M. and Tadini-Buoninsegni F. 2013. A method to measure hydrolytic activity of adenosinetriphosphatases (ATPases). *PLOS one*. 8: 1-9

Blaton V., Korita I. and Bulo A. 2008. How is metabolic syndrome related to dyslipidemia? *Biochemia Medica*. 18(2):14-24

Brandl CJ., Green NM., Korczak B. and MacLennan DH. 1986. Two Ca<sup>2+</sup> ATPase genes: homologies and mechanistic implications of deduced amino acid sequences. *Cell*. 44:597–607

Brandl CJ., DeLeon S., Martin DR. and MacLennan DH. 1987. Adult forms of the Ca<sup>2+</sup> ATPase of sarcoplasmic reticulum. Expression in developing skeletal muscle. *J Biol Chem*. 262: 3768–3774.

Bers D. Cardiac sarcoplasmic reticulum calcium leak: basis and roles in cardiac dysfunction. 2014. *Annu Rev Physiol*. 76:107–27

Boddu N., Theus S., Luo S., Wei J. and Ranganathan G. 2014. Is the lack of adiponectin associated with increased ER/SR stress and inflammation in the heart? *Adipocyte*. 3(1): 10–18

Bupha-Intr T. and Wattanapermpool J. 2006. Regulatory role of ovarian sex hormones in calcium uptake activity of cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 291(3):1101-1108.

Burk SE., Lytton J., MacLennan DH. and Shull GE. 1989. cDNA cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of a third organellar Ca<sup>2+</sup> pump. *J Biol Chem*. 264:18561–18568.

Cameron AJ., Shaw JE. and Zimmet PZ. 2004. The metabolic syndrome: prevalence in worldwide populations. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 33: 351–75

Campbell KP., Knudson CM., Imagawa T., Leung AT., Sutko JL., Kahl SD., Raab CR. and Madson L. 1987. Identification and characterization of the high affinity

[<sup>3</sup>H]ryanodine receptor of the junctional sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release channel. *J Biol Chem.* 262:6460–6463.

Cannell MB., Vaughan-Jones RD. and Lederer WJ. 1985. Ryanodine block of calcium oscillations in heart muscle and the sodium-tension relationship. *Federation Proc.* 44:2964–2969.

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

Caselli C., Lionetti V., Cabiati M., Prescimone T., D Aguardo G., Ottaviano V., Bernini F., Mattii L., Del Ry S. and Giannessi D. 2012. Regional evidence of modulation of cardiac adiponectin level in dilated cardiomyopathy: pilot study in a porcine animal model. *Cardiovascular diabetology.* 11: 143

Castillo J. 2009. El síndrome metabólico, una epidemia silenciosa. *Rev Cubana de Inv Biom.* 28(4)

Chandran M., Phillips SA., Ciaraldi T. and Henry RR. 2003. Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care.* 26:2442-2450

Chen J., Petranka J., Yamamura K., London R., Steenbergen C. and Murphy E. 2003. Gender differences in sarcoplasmic reticulum calcium loading after isoproterenol. *Am J of Physiol, Heart and Circul Physiol* 285: 2657–2662.

Chu S., Sutherland K., Beck J., Kowalski J., Goldspink P. and Schwertz D. 2005. Sex differences in expression of calcium-handling proteins and beta-adrenergic receptors in rat heart ventricle. *Life Sci.* 76(23):2735-2749.

Consenso Latinoamericano de la Asociación Latinoamericana de Diabetes (ALAD). 2010. Epidemiología, diagnóstico, control, prevención y tratamiento del síndrome metabólico en adultos. *Rev Asoc Latinoam Diab.*18(1):25-44.

Coronado R., Morrissette J., Sukhareva M. and Vaughan DM. 1994. Structure and function of ryanodine receptors. *Am J Physiol Cell Physiol.* 266:C1485–C1504

Culligan K., Banville N., Dowling P. and Ohlendieck K. 2002. Drastic reduction of calsequestrin-like proteins and impaired calcium binding in dystrophic mdx muscle. *J Appl Physiol.* 92:435–445.

Dally S., Bredoux R., Corvazier E., Andersen JP., Clausen JD., Dode L., et al. 2006. Ca<sup>2+</sup>-ATPases in non-failing and failing heart: evidence for a novel cardiac sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase 2 isoform (SERCA2c). *Biochem J.* 395: 249–258.

Dash R1, Frank KF, Carr AN, Moravec CS, Kranias EG. 2001. Gender influences on sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-handling in failing human myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 33(7):1345-1353.

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

Denzel MS., Scimia MC., Zumstein PM., Walsh K., Ruiz-Lozano P., and Ranscht B. 2010. T-cadherin is critical for adiponectin-mediated cardioprotection in mice. *J Clin Invest.* 120: 4342–4352

Dincer U., Araiza A., Knudson JD., Shao C., Bidasee KR. and Tune J. 2006. Dysfunction of cardiac ryanodine receptors in the metabolic syndrome. *J Mol Cell Cardiol.* 41(1):108-114

Dincer U. 2012. Cardiac ryanodine receptor in metabolic syndrome: is JTV519 (K201) future therapy? *Diabetes Metab Syndr Obes.* 5: 89–99.

Ding G., Qin Q., He N., Francis-David SC., Hou J., Liu J., Ricks E. and Yang Q. 2007. Adiponectin and its receptors are expressed in adult ventricular cardiomyocytes and upregulated by activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Mol Cell Cardiol.* 43: 73–84

Douglas P., Katz S., Weinberg E., Chen M., Bishop S. and Lorell B. 1998. Hypertrophic remodeling: gender differences in the early response to left ventricular pressure overload. *J of Amer Col of Card.* 32: 1118–1125.

Dutta K., Podolin D., Davidson M. and Davidoff A. 2001. Cardiomyocyte Dysfunction in Sucrose-Fed Rats Is Associated With Insulin Resistance. *Diabetes.* 50 (5): 1186-1192.

Eckel R., Grundy S., and Zimmet P. 2005. The metabolic syndrome. *Lancet.* 365: 1415–1428

Elison C. and Jenden DJ. 1967. The effects of ryanodine on model systems derived from muscle II myofibrils and natural actomyosin. *Biochem Pharmacol.* 16:1347–1354

El Hafidi M. and Baños G. 1997. In vivo plasma lipid oxidation in sugar-induced rat hypertriglyceridemia and hypertension. *Hypertension.* 30(2):624–628

Fang X., Palanivel R., Cresser J., Schram K., Ganguly R., Thong FS., Tuinei J., Xu A., Abel ED. and Sweeney G. 2010. An APPL1-AMPK signaling axis mediates beneficial metabolic effects of adiponectin in the heart. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 299: E721–E729

Fernandez-Velasco M., Rueda A., Rizzi N., Benitah JP., Colombi B., Napolitano C., Priori SG., Richard S., and Gómez AM. 2009. Increased Ca<sup>2+</sup> sensitivity of the ryanodine receptor mutant RyR2R4496C underlies catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circ Res.* 104(2):201-209

Ferrannini E., Haffner SM., Mitchell BD., et al. 1991. Hyperinsulinaemia: the key feature of a cardiovascular and metabolic syndrome. *Diabetologia.* 34:416–422

Fill M. and Copello J. 2002. Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiological Reviews.* 82 (4):893-922

Franzini-Armstrong C. and Protasi F. 1997. Ryanodine receptors of striated muscles: a complex channel capable of multiple interactions. *Physiol Rev.* 77(3): 699-729

Froemming GR., Murray BE., Harmon S., Pette D. and Ohlendieck K. 2000. Comparative analysis of the isoform expression pattern of Ca<sup>2+</sup>-regulatory membrane proteins in fast-twitch, slow-twitch, cardiac, neonatal and chronic low-frequency stimulated muscle fibers. *Biochim Biophys Acta.* 1466:151–168

Fujioka D., Kawabata K., Saito Y., Kobayashi T., Nakamura T., Kodama Y., Takano H., Obata JE., Kitta Y., Umetani K. and Kugiyama K. 2006. Role of adiponectin receptors in endothelin-induced cellular hypertrophy in cultured cardiomyocytes and their expression in infarcted heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 290: H2409–H2416

Furukawa S., Fujita T., Shimabukuro M., Iwaki M., Yamada Y., Nakajima Y., Nakayama O., Makishima M., Matsuda M. and Shimomura I. 2004. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 114(12): 1752–1761.

Ganguly R., Schram K., Fang X., Kim M., Rodrigues B., Thong FS. and Sweeney G. 2011. Adiponectin increases LPL activity via RhoA/ROCK mediated actin remodelling in adult rat cardiomyocytes. *Endocrinology.* 152: 247–254

Gimeno J., Lou L., Moliner E., Boned B. and Portilla D. 2004. Influencia del síndrome metabólico en el riesgo cardiovascular de pacientes con diabetes tipo 2. *Revista española de cardiología.* 57(6): 507-513

Go A., Mozaffarian D., et al. 2014. Heart Disease and Stroke Statistics-2014 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation.* E29-E292

Gonon AT., Widegren U., Bulhak A., Salehzadeh F., Persson J., Sjoquist PO. and Pernow J. 2008. Adiponectin protects against myocardial ischaemia-reperfusion injury via AMP-activated protein kinase, Akt, and nitric oxide. *Cardiovasc Res.* 78: 116–122

Grundy S., Brewer B., Cleeman J., Smith S., and Lenfant C. 2004. Definition of Metabolic Syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association Conference on Scientific Issues Related to Definition. *Circulation*. 109:433-438

Guo J., Blan Y., Bai R. Li H., Fu M. and Xiao C. 2013. Globular adiponectin attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury by upregulating endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase activity and inhibiting endoplasmic reticulum stress. *J Cardiovasc Pharmacol*. 62 (2): 143-153

Hara K., Horikoshi M., Yamauchi .T, .2006. Measurement of the high– molecular weight form of adiponectin in plasma is useful for the prediction of insulin resistance and metabolic syndrome. *Diab Care*. 29:1357-1362.

Hayden MR., Chowdhury N., Govindarajan G., 2006. Myocardial myocyte remodeling and fibrosis in the cardiometabolic syndrome. *J Cardiometab Syndr*. 1(5):326-333.

Hernandez T. et al. 2006. Consenso colombiano de síndrome metabólico 2006. Asociación colombiana de endocrinología. <http://academia.utp.edu.co/medicinadeportiva/files/2012/04/SINDROME-METABOLICO-ACEndocrinolog%C3%ADa.pdf>

Holland WL., Miller RA., Wang ZV., Sun K., Barth BM., Bui HH., Davis KE., Bikman BT., Halberg N., Rutkowski JM., Wade MR., Tenorio VM., Kuo MS., Brozinick JT., Zhang BB., Birnbaum MJ., Summers SA. and Scherer PE. 2011. Receptor-mediated activation of ceramidase activity initiates the pleiotropic actions of adiponectin. *Nat Med*. 17: 55–63

Holvoet P., Van CJ., Collen D. and Vanhaecke J. 200). Oxidized low density lipoprotein is a prognostic marker of transplant-associated coronary artery disease, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 20:698-702

Huo Y., Jayasinghe I., Crossman D., Baddeley D. and Soeller C. 2015. Nanoscale analysis of ryanodine receptor clusters in dyadic couplings of rat cardiac myocytes. *J Molec Cell Cardio*. 80: 45–55

Hymel L., Inui M., Fleischer S. and Schindler H. 1988. Purified ryanodine receptor of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum forms  $Ca^{2+}$ -activated oligomeric  $Ca^{2+}$  channels in planar bilayers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 85:441–445

Isomaa B., Almgren P., Tuomi T., Forsen B., Lahti K., Nissen M., Taskinen M., and Groop L. 2001. Cardiovascular Morbidity and Mortality Associated With the Metabolic Syndrome. *Diabetes Care*. 24:683–689

Jenden DJ. and Fairhurst AS. 1969. The pharmacology of ryanodine. *Pharmacol Rev*. 21:1–25.

Kadowaki T. and Yamauchi T. 2005. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev.* 26:439-451

Kylin E. 1923. Studien über das Hypertonie-Hyperglykämie-Hyperurikämie-Syndrom. *Zentralbl Inn Med.* 44:105–127

Kondo K., Shibata R., Unno K., Shimano M., Ishii M., Kito T., Shintani S., Walsh K., Ouchi N. and Murohara T. 2010. Impact of a single intracoronary administration of adiponectin on myocardial ischemia/reperfusion injury in a pig model. *Circ Cardiovasc Interv.* 3: 166–173

Kozłowska A. and Kowalska I. 2006. The adiponectin role in pathogenesis of metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Pol J Endocrinol.* 57 (6): 626-632.

Krug A., Ehrhart-Bornstein M. 2008. Is Increased Aldosterone in Metabolic Syndrome Patients an Additional Risk Factor? *Hypertension.* 51: 1252-1258

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

Lai FA., Erickson HP., Rousseau E., Liu QY. and Meissner G. 1988. Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. *Nature* 331:315–319

Lancel S., Qin E., Lennon S., Zhang S., Tong X., Mazzini M., Kang Y., Siwik D., Cohen R. and Colucci W. 2010. Oxidative Post-Translational Modifications Mediate Decreased SERCA Activity and Myocyte Dysfunction in  $G\alpha_q$ -Overexpressing Mice. *Circ Res.* 107(2): 228–232.

Lanner J., Georgiou D., Joshi A. and Hamilton S. 2010. Ryanodine Receptors: Structure, Expression, Molecular Details, and Function in Calcium Release. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2:a003996

Li J., Su S. and Zong X. 2014. Analysis of the association between adiponectin, adiponectin receptor 1 and diabetic cardiomyopathy. *Exp Ther Med.* (4):1023-1027.

Lowry OH., Rosebrough NJ., Farr AL. and Randall RJ. (November 1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 (1): 265–275.

MacLennan DH. 1970. Purification and properties of an adenosine triphosphatase from sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 245: 4508–4518

MacLennan DH. and Wong PT. 1971. Isolation of a calcium-sequestering protein from sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA.* 68:1231–1235

MacLennan DH. and Kranias EG. 2003. Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4:566–577

- Martonosi AN. and Pikula S. 2003. The network of calcium regulation in muscle. *Acta Biochim Pol.* 50: 1-30
- Mignery GA., Sudhof TC., Takei K. and Camilli P. 1989. Putative receptor for inositol 1,4,5-trisphosphate similar to ryanodine receptor. *Nature.* 342:192–195
- Mihailescu L. 2005. Capítulo 5. Propiedades fundamentales del miocardio. *Fisiología médica.* México: El manual moderno. 87–102.
- Miklos Z., Kemecei P., Biro T., Marincsak R., Toth B., Op den Buijs J., Drozgyik A., Benis E., and Ivanics T. 2012. Early cardiac dysfunction is rescued by upregulation of SERCA2a pump activity in a rat model of metabolic Syndrome. *Acta Physiol.* 205: 381–393
- Oda T., Yang Y., Uchinoumi H., Thomas DD., Chen-Izu Y., Kato T., Yamamoto T., Yano M., Cornea RL., and Bers DM. 2015. Oxidation of ryanodine receptor (RyR) and calmodulin enhance Ca release and pathologically alter, RyR structure and calmodulin affinity. *J Mol Cell Cardiol.* 85:240-248
- Palomer X., Pérez A. and Blanco-vaca F. 2005. Adiponectina: Un Nuevo nexo entre obesidad, Resistencia a la insulina y enfermedad cardiovascular. *Med Clin (Barc).* 124(10): 388-395
- Peake PW., Shen Y., Walther A. Charlesworth J. 2008. Adiponectin binds C1q and activates the classical pathway of complement. *Biochem Biophys Res Commun.* 367:560–565
- Pedersen S., Kristensen K., Hermann P., Katzenellenbogen J. And Richelsen B. 2004. Estrogen controls lipolysis by up-regulating 2 adrenergic receptors directly in human adipose tissue through the estrogen receptor. Implications for the female fat distribution. *J Clin Endoc and Met.* 89(4):1869-1878
- Pereira L., Hurtado G., Rueda A., Mercadiere J., Benitah J ando Gómez a. 2014 Calcium signaling in diabetic cardiomyocytes. *Cell Calcium*
- Periasamy M. and Huke S. 2001. SERCA Pump Level is a Critical Determinant of Ca<sup>2+</sup> Homeostasis and Cardiac Contractility. *J Mol Cell Cardiol.* 33: 1053–1063
- Periasamy M. and Kalyanasundaram A. 2007. SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. *Muscle Nerve.* 35: 430–442
- Pinali C., Bennett H., Bernard J., Trafford A. and Kitmitto A. 2013. Three-Dimensional Reconstruction of Cardiac Sarcoplasmic Reticulum Reveals a Continuous Network Linking Transverse-Tubules: This Organization Is Perturbed in Heart Failure. *Circ Res.* 113:1219-1230
- Piñeiro R., Iglesias MJ., Gallego R., Raghay K., Eiras S., Rubio J., Diéguez C., Gualillo O., González-Juanatey JR. and Lago F. 2005. Adiponectin is

synthesized and secreted by human and murine cardiomyocytes. *FEBS Lett.* 579(23):5163-5169.

Ramnachandran R., Ocon-Grove OM. And Metzger SL. 2007. Molecular cloning and tissue expression of chicken AdipoR1 and AdipoR2 complementary deoxyribonucleic acids. *Domest Anim Endocrinol.* 33: 19-31

Reaven G. and Ho H. 1991. Sugar-induced hypertension in Sprague-Dawley rats. *Am J Hypertens.* 4: 610-614

Ridker P., Buring J., Cook R. and Rifai N.2003. C-Reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14719 initially healthy american women. *Circulation.* 107:391-397

Ros E. and Laguna J. 2006. Tratamiento de la hipertrigliceridemia: fibratos frente a ácidos grasos omega-3. *Rev Esp Cardiol Supl.* 6(D):52-61

Rueda A., Fernández-Miranda G. and Barrera-Lechuga TP. 2012. En: *Biología Oral* 7:22-30. Gutierrez-Venegas G. Edit. México D.F. México.

Rueda A., Alba-Aguayo D. and Valdivia H. 2014. Receptor de rianodina, fuga de calcio y arritmias. *Arch Cardiol Mex.* 84 (3):191-201

Ruotolo G. and Howard BV. 2002. Dyslipidemia of the metabolic syndrome. *Curr Cardiol Rep.* 4(6):494-500

Scherer PE., Williams S., Fogliano M., Baldini G. and Lodish HF. 1995. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem.* 270: 26746–26749

Schwartz D., Beck J., Kowalski J. and Ross, J. 2004. Sex differences in the response of rat ventricle to calcium. *Biolog Res for Nurs.* 5: 286–298.

Severs N. 2000. The cardiac muscle cell. *BioEssays* 22:188–199

Shibata R., Sato K., Pimentel DR., Takemura Y., Kihara S., Ohashi K., Funahashi T., Ouchi N. and Walsh K. 2005. Adiponectin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through AMPK- and COX-2-dependent mechanisms. *Nat Med.* 11: 1096–1103

Shulman GI. 2000. Celular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest.* 106: 171-176

Smith JS., Imagawa T., Ma J., Fill M., Campbell KP. and Coronado R. 1988. Purified ryanodine receptor from rabbit skeletal muscle is the calcium-release channel of sarcoplasmic reticulum. *J Gen Physiol.* 92:1–26



Skurk C., Wittchen F., Suckau L., Witt H., Noutsias M., Fechner H., Schultheiss H. and Poller W. 2008. Description of a local cardiac adiponectin system and its deregulation in dilated cardiomyopathy. *European Heart Journal*. 29: 1168 – 1180

Song D., Lee J., Youn H., Eom S. and Kim D, 2011. Ryanodine receptor assembly: A novel systems biology approach to 3D mapping. *Progress in Biophy and Mol Biol*. 105(3):145-161

Stoyanovsky D., Murphy T., Anno P., Kim Y. and Salama G. 1997. Nitric oxide activates skeletal and cardiac ryanodine receptors. *Cell Calcium*. 21(1): 19-29

Swadner K. and Donnet C. 2001. Structural similarities of Na,K-ATPase and SERCA, the Ca<sup>2+</sup> ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Biochem J*. 356: 685-704

Takehima H. 1993. Primary structure and expression from cDNAs of the ryanodine receptor. *Ann NY Acad Sci*. 707:165–177

Tao L., Gao E., Jiao X., Yuan Y., Li S., Christopher TA., Lopez BL., Koch W., Chan L., Goldstein BJ. and Ma XL. 2007. Adiponectin cardioprotection after myocardial ischemia/reperfusion involves the reduction of oxidative/nitrative stress. *Circulation*. 115: 1408–1416

Toida S., Takahashi M., Shimizu H., Sato N., Shimomura Y. and Kobayashi I. 1996. Effect of high sucrose feeding on fat accumulation in the male Wistar rat. *Obes Res* 4(6):561-568.

Towbin H., Staehelin T. and Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 76(9):4350-4354

Toyoshima C. and Inesi G. 2004. Structural basis of ion pumping by Ca<sup>2+</sup>-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem*. 73:269–292

Tsao TS., Tomas E., Javorschi S., et al. 2003. Role of disulfide bonds in Acrp30/adiponectin structure and signaling specificity. Different oligomers activate different signal transduction pathways. *J Biol Chem*. 278: 50810-50817

Tsukamoto O., Fujita M., Kato M., Yamazaki S., Asano Y., Ogai A., Okazaki H., Asai M., Nagamachi Y., Maeda N., Shintani Y., Minamino T., Asakura M., Kishimoto I., Funahashi T., Tomoike H. and Kitakaze M. 2009. Natriuretic peptides enhance the production of adiponectin in human adipocytes and in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 53:2070–2077.

Tu Q., Velez P., Brodwick M. and Fill M. 1994. Streaming potentials reveal a short ryanodine-sensitive selectivity filter in cardiac Ca<sup>2+</sup> release channel. *Biophys J*. 67:2280–2285

Vague J. 1947. La differenciation sexuelle, facteur determinant des formes de l'obesity. *Presse Medicale*. 30 :339–340

Ver Heyen M., Heymans S., Antoons G., Reed T., Periasamy M. and Awede B, et al. 2001. Replacement of the muscle-specific sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase isoform SERCA2a by the nonmuscle SERCA2b homologue causes mild concentric hypertrophy and impairs contraction-relaxation of the heart. *Circ Res*. 89:838–846

Wagenknecht T., Radermacher M., Grassucci R., Berkowitz J., Xin HB. and Fleischer S. 1997. Locations of calmodulin and FK506-binding protein on the three-dimensional architecture of the skeletal muscle ryanodine receptor. *J Biol Chem*. 272:32463–32471

Waki H, Yamauchi T., Kamon J., Kita S., Ito Y., Hada Y., Uchida S., Tsuchida A., Takekawa S. and Kadowaki T. 2005. Generation of globular fragment of adiponectin by leukocyte elastase secreted by monocytic cell line THP-1. *Endocrinology*. 146(2):790-796

Wang M., Wang XC., Zhang ZY., Mou B. and Hu RM. 2010. Impaired mitochondrial oxidative phosphorylation in multiple insulin-sensitive tissues of humans with type 2 diabetes mellitus. *J Int Med Res*. 38(3):769-81

Wang Y. Gao E., Tao L., Lau WB., Yuan Y., Goldstein BJ., Lopez BL., Christopher TA., Tian R., Koch W. and Ma XL. 2009. AMP-activated protein kinase deficiency enhances myocardial ischemia/reperfusion injury but has minimal effect on the antioxidant/antinitrative protection of adiponectin. *Circulation*. 119: 835–844

Wold L., Dutta K., Mason M., Ren J., Cala S., Schwanke M. and Davidoff AJ. 2005. Impaired SERCA function contributes to cardiomyocyte dysfunction in insulin resistant rats. *J Mol Cell Cardiol* 39: 297–307.

Wong CY, O'Moore-Sullivan T, Leano R., Byrne N. and Bellere E. 2004. Alterations of left ventricular myocardial characteristics associated with obesity. *Circulation*. 110:3081-3087.

Wuytack F., Dode L., Baba-Aissa F. and Raeymaekers L. 1995. The SERCA3-type of organellar  $\text{Ca}^{2+}$  pumps. *Biosci Rep*.15:299–306

Xu A. and Vanhoutte P. 2012. Adiponectin and adipocyte fatty acid binding protein in the pathogenesis of cardiovascular disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 302: H1231–H1240

Xu C., Ma H., Inesi G., Al-Shawi MK. and Toyoshima C. 2004. Specific structural requirements for the inhibitory effect of thapsigargin on the  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase SERCA. *J Biol Chem*. 279: 17973-17979

Yamauchi T., Kamon J., Ito Y, et al. 2003. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*. 423: 762-769

Yamuchi T., Kamon J., Minokoshi Y. et al. 2002. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med.* 8: 1288-1295

Yasui T., Tomita J., Miyatani Y., Yamada M., Uemura H., Irahara M., Arai M., Kojimahara N., Okabe R., Ishii Y., Tashiro S. and Sato H. 2007. Associations of adiponectin with sex hormone-binding globulin levels in aging male and female populations. *Clinica Chimica Acta.* 386: 69–75

Zanchetti A. 2003. Guidelines Committee. 2003 European Society of Hypertension-European Society of Cardiology guidelines for the management of arterial hypertension. *J Hypertens* 21:1011-1053

Zarain-Herzberg A. and Alvarez-Fernandez G. 2002. Sarco(endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase-2 gene: structure and transcriptional regulation of the human gene. *Scientific World J.* 2: 1469–1483.

Zhang P., Toyoshima C., Yonekura K., Green NM. and Stokes DL. 1998. Structure of the calcium pump from sarcoplasmic reticulum at 8-Å resolution. *Nature.* 392: 835–839

Zhu W., Cheng KK., Vanhoutte PM., Lam KS. and Xu A. 2008. Vascular effects of adiponectin: molecular mechanisms and potential therapeutic intervention. *Clin Sci (Lond).* 114: 361–374