



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

**“EXPRESIÓN MEMBRANAL DEL GLUT-4 EN TÚBULOS TRANSVERSOS DE RATAS
RECIÉN NACIDAS CON DESNUTRICIÓN GESTACIONAL”.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias Biomédicas

P R E S E N T A

Med. Cir. Ricardo Tonathiu Ramírez Oseguera

Director de tesis:

Dra. Alicia Ortega Aguilar
Facultad de Medicina, UNAM

Comité Tutor:

Dra. Margarita Martínez Gómez
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dr. Ismael Jiménez Estrada
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

México, D.F. Abril de 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

Durante mi vida entera he contado con personas que han sido participes de mi camino e incluso impulsores de mis logros y derrotas, aunque las decisiones siempre fueron mías en última instancia.

Esta tesis no habría sido posible sin la intervención de todos ellos, sin su consejo, apoyo y hasta reto ante mis momentos de duda. Por esto y más, les dedico este trabajo de vida.

Gracias antes que nadie, a mi madre y padre - Ana María Oseguera Schmüeckle y Ricardo Alfonso Ramírez Ortega - por ser las personas que moldearon mi carácter y forjaron inicialmente mi personalidad con amor, paciencia y disciplina, no sería ni habría logrado nada sin Uds. Saben cuánto los amo.

A mi hermana – Ana Mayela Ramírez Oseguera – por forzarme a ser paciente, entregado y comprometido. Te quiero mucho.

Gracias a mis profesores de formación temprana - José Luis Reyes, Adrián Martínez, Fernando Ruíz Penilla, Carlos Pedraza, Miguel Ángel Lobato - por mostrarme que hay horizontes más allá de lo que podemos percibir a simple vista, que son fascinantes y valiosos como para esforzarse para alcanzarlos.

Gracias a mi profesora de bioquímica y tutora en esta última etapa - Alicia Ortega Aguilar – por tu paciencia, confianza, amistad y sobre todo, por tu fe en mí, aun cuando yo hubiese dudado. Una nueva y mejor forma de pensamiento crítico se formó en mí y me será útil el resto de mi vida.

A Rocío Álvarez, por ser maestra, instructora, compañera e inmejorable amiga. Parte de esta tesis te pertenece.

A mi profesora de Farmacología y amiga – María Dolores Ramírez – por ser el oído que tuvo la paciencia de escuchar mis quejas más justas y sobre todo las más injustas, muchas gracias.

A mis amigos de toda la vida. Miguel Ángel Zenteno, por recordarme que el esfuerzo se vería recompensado. Fernando y Gaby Williams, por ser quienes se preocuparon siempre por mantener mis pies pegados al suelo. Rogelio Roque, por ser y dejarme ser auténtico, sin importar los retos que eso pudo haber representado. Luis Enrique Ángeles, por enseñarme a creer en mí, sin importar la opinión de otros. Oscar Chertudi, por enseñarme que la nobleza obliga más que mil palabras. Lizeth Rondero, por ser un ejemplo de superación y empeño. Ana María Borbolla, por ser una inspiración y magnífica compañera, gracias bonita. Diana Arias, Fernando Astiazarán, Jorge Manjarréz, Hugo Parra, Diego Elías, Aura Jiménez; por ser cómplices y compañeros de la aventura que significo mi formación profesional y de posgrado. Lo hemos logrado, aunque te vamos a extrañar siempre Wookie.

Gracias, siempre gracias.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, a sus profesores y personal académico, es especial al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.

Al Posgrado del Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, a sus tutores y personal académico.

A CONACYT. Por el financiamiento a través de las Becas de Posgrado durante el programa de doctorado (255816) que me permitió realizar mis estudios.

A La Dirección General del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA IN219812, IN218215) por el apoyo al proyecto.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	5
PREFACIO	6
RESUMEN GRÁFICO	7
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
LISTA DE ABREVIATURAS	10
LISTA DE FIGURAS	11

CAPÍTULOS

1. INTRODUCCIÓN	12
2. OBJETIVOS	21
3. HIPÓTESIS	22
4. MATERIALES Y MÉTODOS	23
4.1 ANIMALES	23
4.1.1 APAREAMIENTO.....	23
4.2 PROTOCOLO DE DESNUTRICIÓN GESTACIONAL (DG).....	24
4.3 OBTENCIÓN DE PRODUCTOS GESTACIONALMENTE DESNUTRIDOS	
.....	24
4.4 DISECCIÓN QUIRÚRGICA Y OBTENCIÓN DE MEMBRANAS EN	
TT Y RS.....	25
4.5 CUANTIFICACIÓN DE GLUCOSA SÉRICA.....	26
4.6 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS SÉRICAS TOTALES.....	26
4.7 AISLAMIENTO DE LAS MEMBRANAS DE TT	27
4.8 AISLAMIENTO DE MEMBRANAS DE RETÍCULO SARCOPLÁSMICO	
.....	28
4.9 PREPARACIÓN DEL MÚSCULO PARA PRUEBAS MECÁNICAS	
.....	28
4.10 CONTENIDO DE LÍPIDOS TOTALES Y DETERMINACIÓN DE	
COLESTEROL.....	29
4.11 ACTIVIDAD HIDROLÍTICA DE LA ATPasa.....	29
4.12 CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARIDO (CDB).....	29
4.13 ELECTROFORÉISIS DE PROTEÍNAS E INMUNOBLOT.....	30
5. REUSLTADOS	32
5.1 EFECTO DE LA DG EN LAS PROPIEDADES MECÁNICAS DEL MÚSCULO	
EDL.....	34
5.2 ACTIVIDAD DE LA ATPasa DE Ca ²⁺ (SERCA).....	37
5.3 MEMBRANAS DE TT.....	38
5.4 CDB DE LAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA DE LOS TT.....	40
5.5 PROTEÍNA Y CONTENIDO DE LÍPIDOS DE LAS MEMBRANAS DE	
TT.....	42

5.6	EXPRESIÓN DEL GLUT-4 Y Cav3 EN LOS TT DE RATAS NEONATAS	44
6.	DISCUSION	46
6.1	PROPIEDADES MECÁNICAS DE LOS MÚSCULOS EDL	47
6.2	EFFECTO DE LA DG EN LA ACTIVIDAD DE SERCA-1 Y PMCA	48
6.3	EFFECTO DE LA DG EN LAS MEMBRABNAS DE TT	48
7.	CONCLUSIONES	49
8.	REFERENCIAS	51

PREFACIO

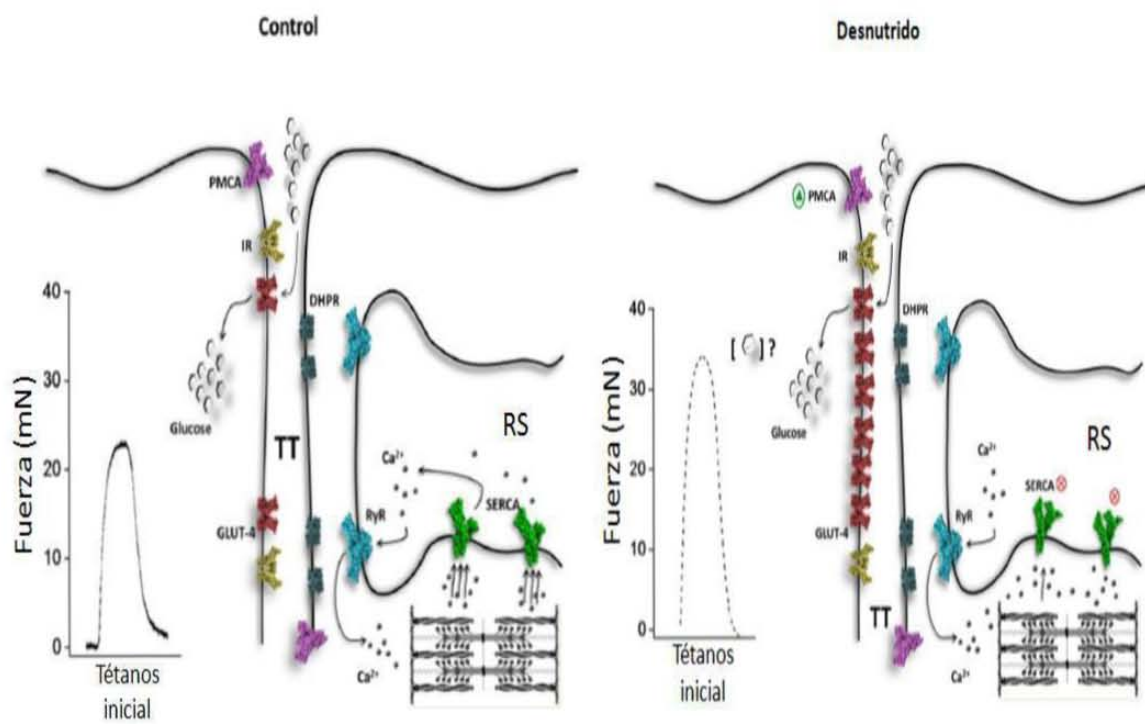
Las alteraciones nutricionales son un problema relevante del área de la salud. Actualmente, estas alteraciones oscilan entre la sub ingesta, la ingesta no balanceada y la sobre ingesta de nutrientes. Es un problema que afecta a todos los grupos etarios. Sin embargo, su presencia durante el periodo gestacional condiciona graves alteraciones en las etapas posteriores de la vida.

En el caso de la desnutrición gestacional, las consecuencias implican incrementos en la predisposición para presentar alteraciones del desarrollo neurológico y somatométrico, en la respuesta inmune, en la función respiratoria y hasta en la función cardiaca en el caso del infante. Sin embargo, estas alteraciones tienen alcances en etapas más avanzadas de la vida, aumentando el factor de riesgo de padecer enfermedades metabólicas (Obesidad, Diabetes, Dislipidemias), cardiovasculares (Hipertensión, Accidentes cardiovasculares y cerebrovasculares), infecciosas, oncológicas y psiquiátricas.

Desde finales de los años 70s, múltiples grupos han reportado la relación existente entre las alteraciones nutricionales en la gestación, e incluso antes de ésta, con la presentación de otras patologías en etapas maduras en organismos murinos, caprinos, vacunos y en los seres humanos.

Mucho se ha adelantado gracias a los avances en la ciencia y la tecnología en cuanto a la comprensión de la fisiopatología de los padecimientos antes señalados. Sin embargo, es necesario esclarecer los mecanismos que generan la predisposición o el aumento del factor de riesgo para presentar dichas entidades, relación ampliamente descrita en la literatura actual y desde hace 3 décadas. El entendimiento de los orígenes gestacionales de las enfermedades de la vida extrauterina mejorará nuestra aproximación a las mismas, favoreciendo conductas más efectivas en su tratamiento e incluso en su prevención.

RESUMEN GRÁFICO



RESUMEN

El músculo esquelético (ME) constituye más del 40% del peso corporal en la edad adulta. Transporta la glucosa de la dieta, principalmente a través del transportador de glucosa dependiente de insulina (GLUT-4) situado en el sistema de membranal de los túbulos transversos (TT). TT es una red intrincada de membranas de superficie que se propaga a través del área de la fibra muscular durante la diferenciación y el desarrollo que termina poco después del nacimiento. La membrana TT aloja las proteínas implicadas en el acoplamiento excitación-contracción y en la captación de glucosa. La regulación de la glucemia a través del movimiento es una función clave de los músculos esqueléticos completamente desarrollados. En este estudio, se caracteriza el efecto de la desnutrición gestacional (DG) en ratas sobre la expresión del GLUT-4 y en el contenido y relación proteína/lípido en las membranas de los TT. También se examinó el efecto de la DG sobre las propiedades mecánicas del extensor largo de los dedos (EDL) en músculos aislados como una indicación de la condición metabólica del ME en el nacimiento. Se demostró que la DG en el recién nacido, disminuye además del peso corporal, la masa del ME y la formación de las membranas TT, en donde las proteínas expresadas están en una conformación que les confiere mayor estabilidad térmica. La expresión membranal del GLUT-4 en los TT en la DG fue dos veces mayor que en la de los controles. Los músculos EDL aislados de animales con DG fueron 20% más fuertes y más resistente a la fatiga con respecto a los controles. Estos resultados proporcionan la primera evidencia de los cambios adaptativos del ME en los recién nacidos expuestos a la severa restricción alimentaria de la madre durante la gestación. Los efectos de la DG sobre en el músculo al nacimiento son el primer paso para la disfunción metabólica del ME, lo que contribuye inevitablemente a la fisiopatología de las enfermedades metabólicas en la edad adulta.

ABSTRACT

Skeletal muscle (SM) constitutes more than 40% of the body weight in adulthood. Transports dietary glucose mainly through the insulin-dependent glucose transporter (Glut-4) located in the Transverse tubule membrane system (TT). TT is a convoluted net of surface membranes that spread across the area of the muscle fibre during differentiation and development, which ends shortly after birth. The TT membrane hosts the proteins involved in excitation-contraction coupling and glucose uptake. Glycaemic regulation through movement is a key function of fully developed skeletal muscle. In this study, we aimed to characterize the effect of gestational undernourishment (GUN) in rats GLUT-4 expression and on the protein/lipid content of the TT membranes. We also examined the effect of GUN on the mechanical properties of isolated Extensor Digitorum Longus (EDL) muscles as an indication of the metabolic condition of the SM at birth. We demonstrate that GUN in the new-born, decreases body weight, SM mass and formation of TT membranes, where proteins expressed in a conformation with higher thermal stability. The TT membrane expression of GLUT-4 in GUN offspring was twice that of controls. The isolated EDL of GUN offspring was 20% stronger as measured by contractile force and more resistant to fatigue relative to controls. These results provide the first evidence of adaptive changes of the SM in new-borns exposed to severe gestational food restriction. The effects of GUN on muscle at birth are the first step toward detrimental SM metabolic function, contributing to the pathophysiology of metabolic diseases in adulthood.

LISTA DE ABREVIATURAS

Músculo esquelético	ME
Transportador de glucosa tipo 4	GLUT-4
Túbulos transversos	TT
Desnutrición gestacional	DG
Extensor largo de los dedos	EDL
Recién nacidos	RN
Cadena pesada de miosina	MHC
Transportadores de glucosa	GLUTs
Receptor de dihidropiridina	DHPr
Caveolina 3	Cav3
ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática	PMCA
ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico	SERCA
Retículo Sarcoplásmico	RS
Albúmina de suero de bovino	BSA
Calorimetría diferencial de barrido	CDB
Temperatura de transición	Tm
Exceso de calor	Cp
Unidades de densidad normalizadas	UDN
Unidades de densidad normalizadas respecto a actina	UAN

LISTA DE FIGURAS

Introducción

Figura 1. Proceso de diferenciación de la fibra muscular. Página 12.

Figura 2. Maduración postnatal de la fibra muscular, tipos de fibras. Página 13.

Figura 3. Efectos de la concentración de glucosa en la fusión de mioblastos.

Página 14. Figura 4. Desarrollo de los Túbulos transversos. Página 16.

Figura 5. Traslocación membranal del GLUT-4 en respuesta a insulina y ejercicio. Página 17.

Figura 6. Reconstrucción con cortes transversales de la red de túbulos transversos y la sarcolema. Página

18. Figura 7. Actividad de las ATPasas del músculo esquelético (PMCA y SERCA). Página 19.

Materiales y métodos

Figura 8. Tamaño de ratas recién nacidas control y desnutrido. Página 25.

Figura 9. Diseño experimental 1. Página 26.

Figura 10. Diseño experimental 2. Página 27.

Figura 11. Patrón calorimétrico de los túbulos transversos de músculo esquelético rápido de conejo. Página 30.

Resultados

Figura 12. Efecto de la desnutrición gestacional en el peso corporal, peso de músculo seco, proteínas séricas y glucosa sérica en ratas recién nacidas. Página 33.

Figura 13. Propiedades mecánicas de músculos EDL de ratas recién nacidas control y desnutridas, protocolo de fatiga. Página 35.

Figura 14. Efecto de la desnutrición gestacional en la fuerza de contracción del músculo EDL de ratas recién nacidas. Página 36.

Figura 15. Actividad ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico de ratas recién nacidas con desnutrición gestacional. Página 37.

Figura 16. Actividad de las ATPasas del túbulo transverso de ratas recién nacidas controles y con desnutrición gestacional. Página 39.

Figura 17. Perfiles calorimétricos de las proteínas de membrana de los túbulos transversos de ratas recién nacidas control y con desnutrición gestacional. Página 41.

Figura 18. Patrón electroforético de las proteínas de membrana de los túbulos transversos de ratas recién nacidas con desnutrición gestacional. Página 43.

Figura 19. Composición de los túbulos transversos de músculo esquelético de ratas recién nacidas control y con desnutrición gestacional. Página 44.

Figura 20. Expresión del GLUT-4 en membranas de TT de ratas recién nacidas control y con desnutrición gestacional. Página 45.

1. INTRODUCCIÓN

El músculo esquelético (ME) es el tejido más abundante en los organismos vertebrados¹ y representa entre el 35 y el 45 % del peso corporal total en los mamíferos en edad adulta, y entre el 22 al 25 % en individuos recién nacidos (RN)². En humanos, la diferenciación celular hacia la formación del tejido muscular inicia pocas semanas después del momento de la fecundación y concepción y este proceso de diferenciación celular continúa pocas semanas después del nacimiento³ (Figura 1).

Diferenciación de la célula muscular.

Miogénesis. Proceso altamente especializado.

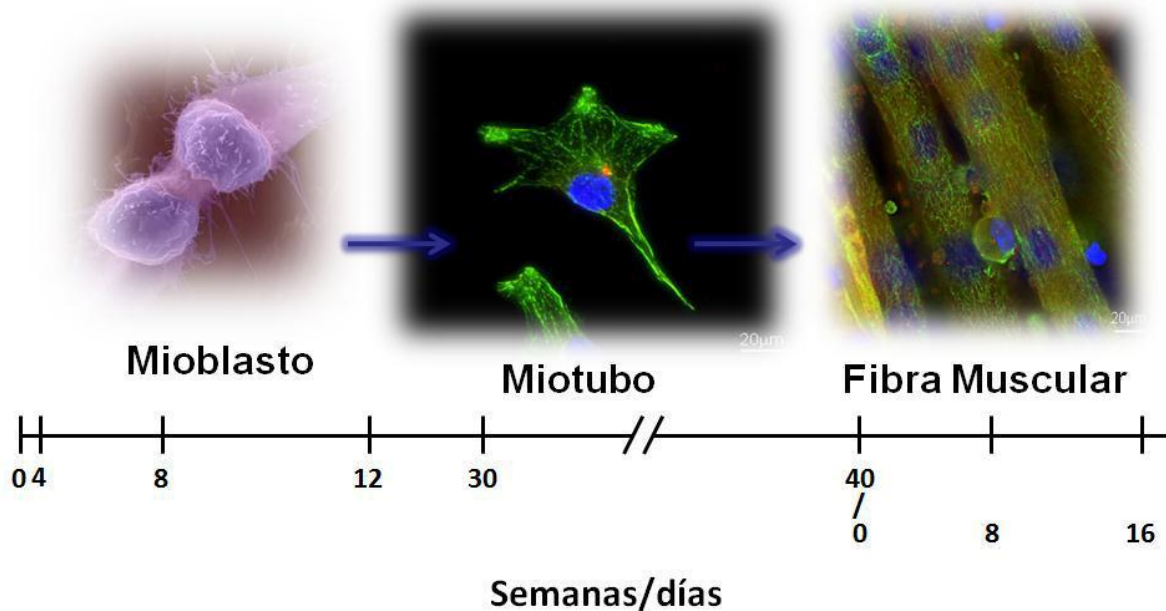


Figura 1. Proceso de diferenciación de la fibra muscular desde el mioblasto primario hasta la fibra muscular adulta.

El ME se divide desde el punto de vista mecánico en dos tipos principales; músculo lento y rápido, que se originan de diferentes poblaciones de células mesenquimales en el embrión temprano, las cuales aparecen completamente diferenciadas entre los días 30 para el músculo lento y 90 para el músculo rápido en humanos, después del nacimiento⁴. Sin embargo, el ME fetal y del recién nacido está compuesto principalmente de fibras musculares intermedias y lentas, con un metabolismo predominantemente oxidativo y gran resistencia a la fatiga muscular⁵ (Figura 2).

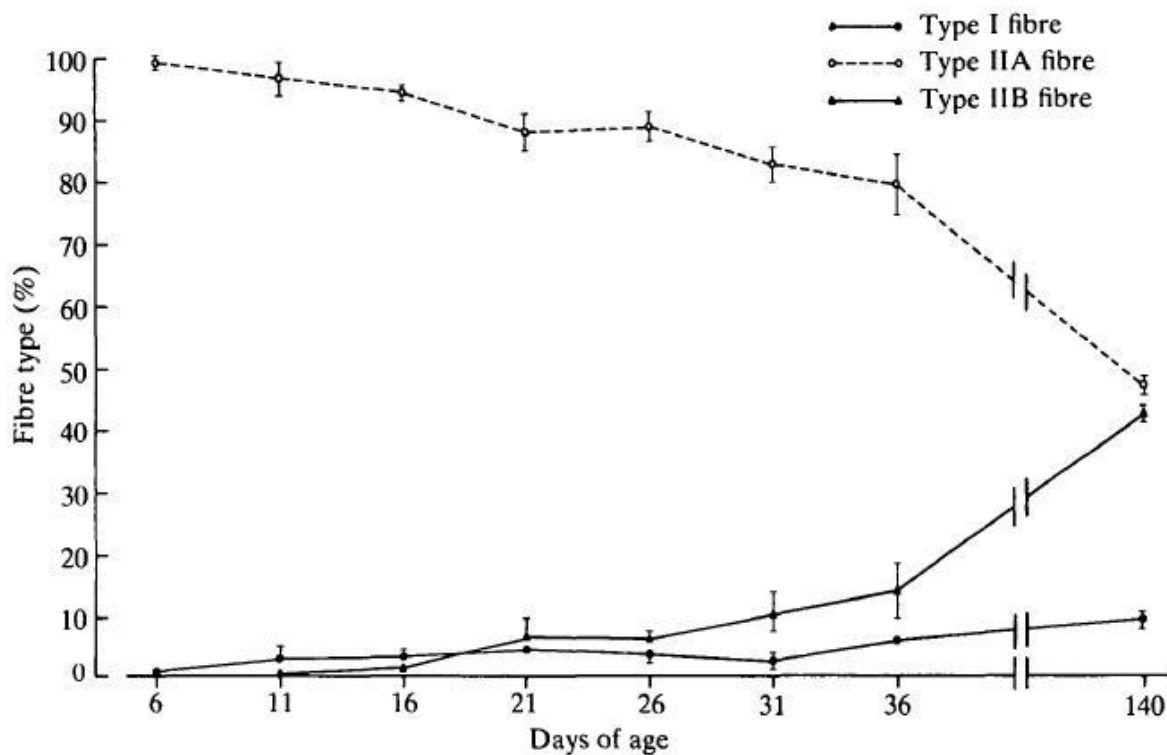


Figura 2. Seguimiento de los cambios de tipos de fibras de ME de ratas albinas desde los 6 días de vida hasta los 140 días⁵.

La compleja estructura del ME como un reservorio proteico, con la función principal de convertir la energía química en energía mecánica y controlado centralmente por el sistema nervioso, hacen del ME un gran sistema mecánico-metabólico único en los mamíferos en

condiciones nutrimentales óptimas. Está caracterizado por una rápida acumulación de proteínas, lo cual es posible gracias a una alta tasa de síntesis proteica^{6,7}. A medida que avanza la maduración hacia la fibra muscular plenamente desarrollada, la tasa de síntesis y acumulación de proteínas decaen de manera conjunta o en paralelo⁸. El ME requiere de glucosa como su principal fuente química de energía para desempeñar sus funciones mecánicas (contracción-relajación). El metabolismo de la glucosa es también la principal fuente de energía usada para la síntesis del proteoma muscular, el cual contiene las proteínas más grandes conocidas que están codificadas en el genoma humano⁹. Experimentos con bajas concentraciones de glucosa en el medio de cultivo de líneas celulares en mioblastos de ratón (células C2C12) han demostrado que se inhibe la fusión de mioblastos, un proceso crucial en la formación de los miotubos que culmina con la incompleta diferenciación de las fibras musculares¹⁰ (Figura 3).

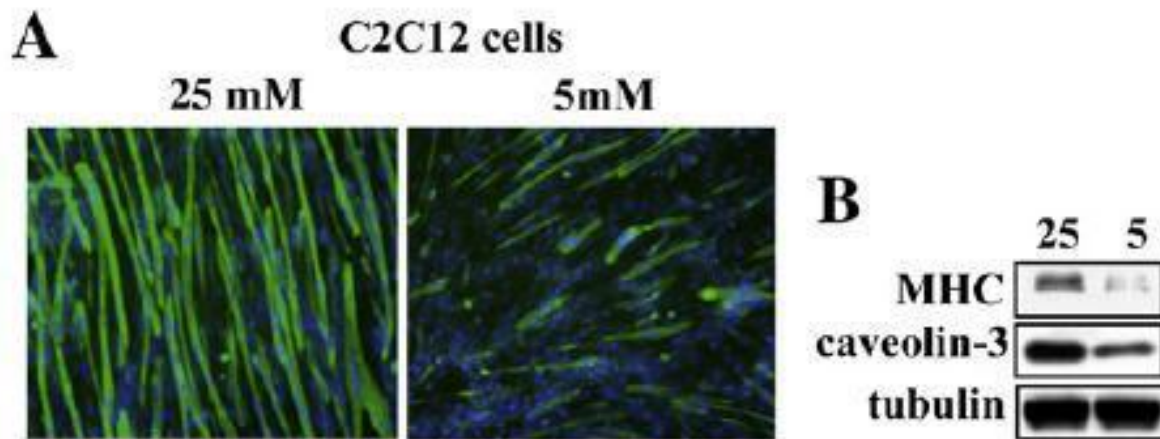


Figura 3. A) Formación de miotubos en altas concentraciones de glucosa (25mM) y falta de fusión de mioblastos en concentraciones bajas de glucosa (5mM) en el medio de cultivo. B) Inmunoblot de tres proteínas marcadores de fusión mioblástica Cadena Pesada de la Miosina (MHC), Caveolina-3 y Tubulina, que se encuentran disminuidos en células C2C12 cuando son cultivadas a bajas concentraciones de Glucosa¹⁰

La expresión de las diferentes isoformas de transportadores de glucosa (GLUTs) varían en el ME y depende de los mecanismos de diferenciación muscular. El GLUT-1, una isoforma de transportador no dependiente de la acción de la insulina (In), es expresado principalmente por el mioblasto en etapas tempranas de la miogénesis y está presente sólo en la sarcolema del ME adulto, lo que sugiere que los receptores de insulina presentes en la sarcolema no están relacionados con la captura de glucosa sino más bien están relacionados con el proceso de la miogénesis^{11,12,13}. Durante la diferenciación, la membrana plasmática del miotubo se invagina dando lugar a la formación de caveolas que por confluencia de varias de ellas formarán una red transversal al eje longitudinal de la fibra, de membranas celulares externas que se proyectan de una forma muy intrincada al interior del miotubo y finalmente de la fibra. Esta red de membranas se conoce como sistema de túbulos transversos (TT)^{14 15} (Figura 4), que se extiende al interior de la fibra muscular en crecimiento para incrementar el área de superficie en contacto con el ambiente extracelular.

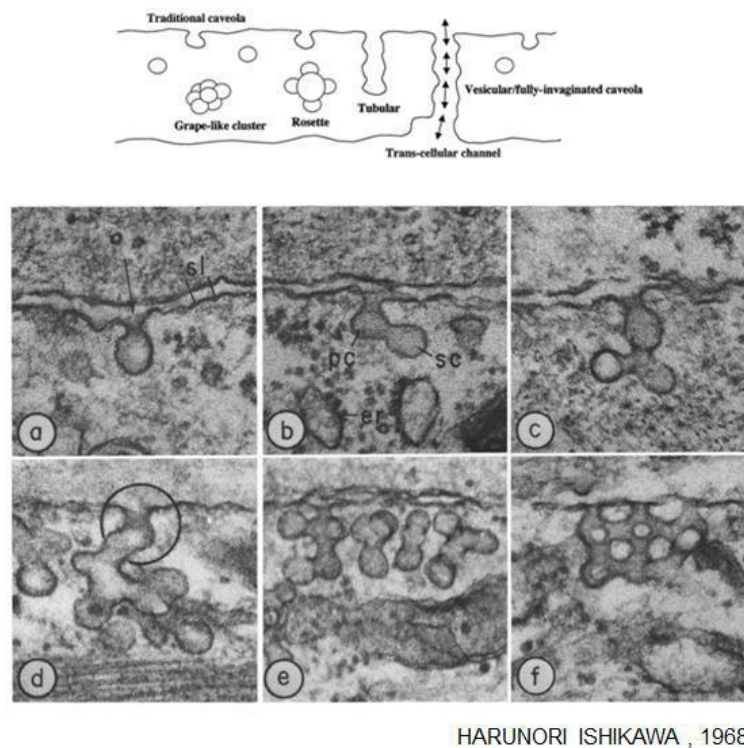


Figura 4. Desarrollo de los Túbulos transversos a partir de la invaginación de la Sarcolema. De **a a d**, representan varios grados de fusión de membranas internas con la invaginación inicial de la Sarcolema¹⁵

Dos eventos están vinculado con el desarrollo de los TTs: la transmisión del potencial de acción para iniciar el acople excitación-contracción¹⁶ y la redistribución de los GLUTs dependientes de insulina en la superficie de los TTs¹⁷. La expresión de proteínas cruciales como el receptor de dihidropiridina (DHPR), un canal de calcio dependiente de voltaje¹⁸, y del transportador de glucosa tipo 4 (GLUT-4), una isoforma de GLUT dependiente de Insulina que se expresa en el ME y en el tejido adiposo, hacen de estas proteínas marcadores específicos de los TTs en el ME adulto. El GLUT-4 es el principal mecanismo del ME para la captura de glucosa en respuesta a la estimulación por Insulina y por estimulación mecánica en la vida posnatal. Se ha demostrado que estos transportadores son 3 veces más abundantes en los TTs que en la sarcolema en el ME adulto. En contraste, los receptores de Insulina están distribuidos en iguales proporciones

entre las membranas del sarcolema y las de los TTs¹⁹ (Figura 5).

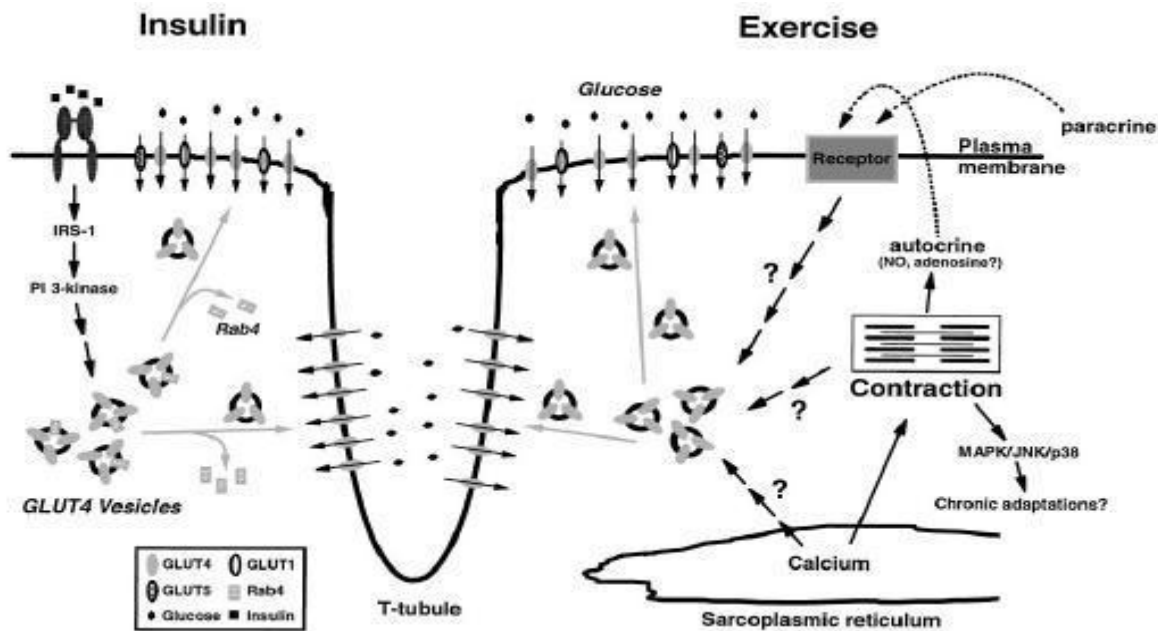


Figura 5. Esquema de la traslocación del GLUT4 en membrana plasmática y túbulos transversos de células musculares esqueléticas en respuesta a estímulos de ejercicio y de insulina²⁰.

El desarrollo de la miofibra en modelos murinos comienza el día 14 de la gestación, y el desarrollo de las membranas de los TTs se ha demostrado que inicia el día 15, terminando poco tiempo después del nacimiento²¹. Aunque la distribución de los TTs está casi completa poco después del nacimiento, la red completa de los TTs no está enteramente conectada²². En el ME adulto, el área de superficie calculada para los TTs es 7 veces mayor que el área de la sarcolema²³ (Figura 6). Además, la formación de los TTs es dependiente de la expresión de la proteína Caveolina de tipo 3 (Cav3), isoforma específica del ME^{24,25}. La deficiencia o ausencia de Cav3 en líneas C2C12 genera la falta de formación de membranas de TTs y por consiguiente, alteraciones en el desarrollo de la fibra muscular²⁶.

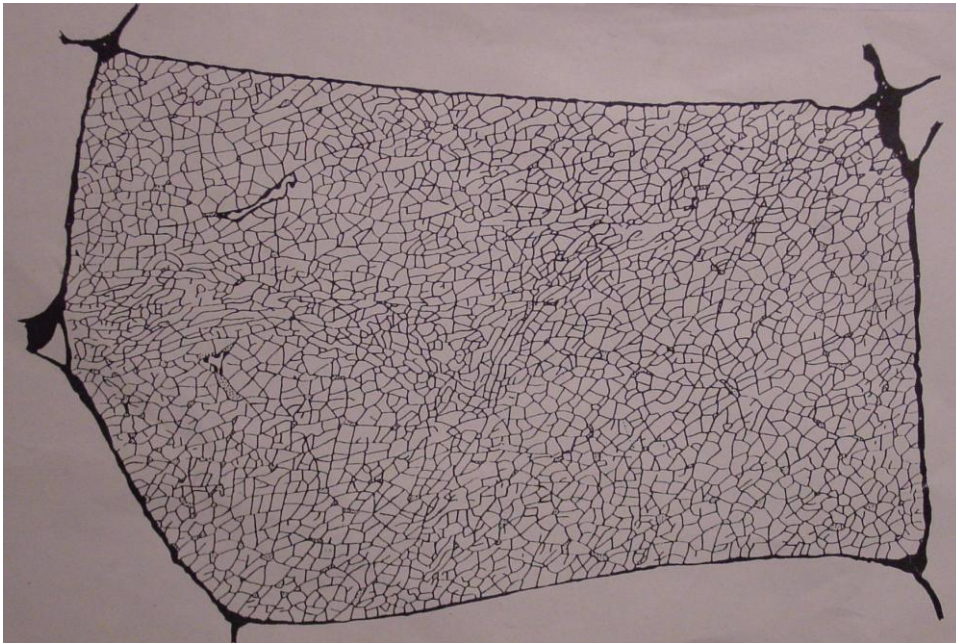


Figura 6. Representación de la proporción de membranas de superficie correspondientes a la Sarcolema y a los Túbulos transversos a partir de una reconstrucción, marcando a las membranas de superficie con ferritina²³.

Aunque se tiene ampliamente caracterizados a muchos de los marcadores de los TTs aislados de organismos adultos, es poco lo que se ha descrito de estas membranas y sus componentes en el ME del recién nacido. En el ME adulto, la ATPasa de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ representa alrededor del 26% de las proteínas de los TTs y esta proteína tiene la mayor actividad de ATPasa en esas membranas. Aunque la función de esta ATPasa no ha sido bien dilucidada, se le ha relacionado con una actividad tipo ecto-ATPasa²⁷.

La ATPasa de Ca^{2+} de las membranas de superficie (PMCA), representa aproximadamente el 10% de la actividad ATPasa total de los TTs en adultos²⁸. Esta proteína se encuentra sobre expresada después de la implementación de protocolos de ejercicios de resistencia en el ME de

adultos²⁹ (Figura 7). No obstante, en el ME de recién nacidos se desconoce si la PMCA está presente.

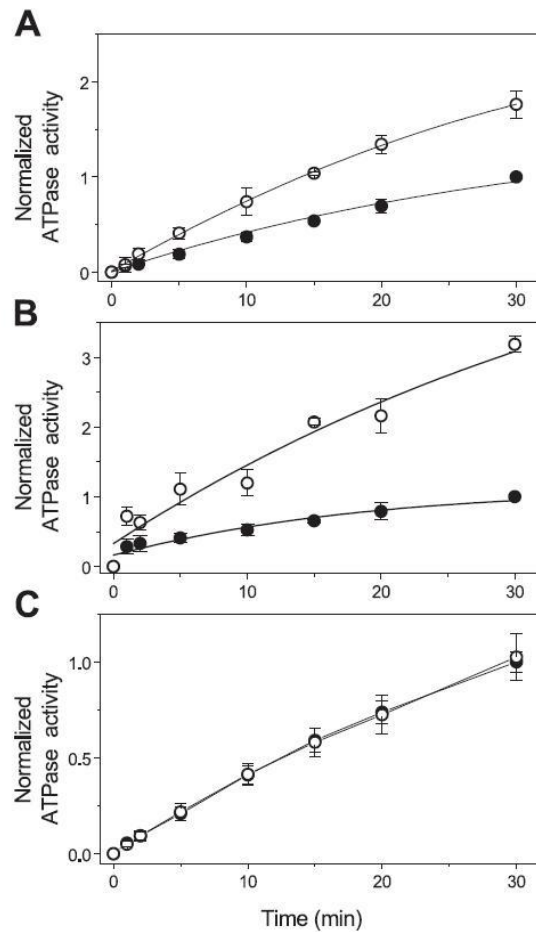


Figura 7. Actividad de la ATPasa de calcio (PMCA) A) Túbulo transversos de músculo esquelético rápido sin entrenamiento al ejercicio (símbolos abiertos). B) Túbulo transversos de músculo esquelético rápido con entrenamiento al ejercicio (símbolos abiertos). C) Retículo Sarcoplasmico (SERCA) de músculos sin y con (símbolos abiertos) entrenamiento al ejercicio (símbolos cerrados y abiertos respectivamente)²⁷.

En términos de composición lipídica, las membranas de TTs del ME de adultos normales están enriquecidas en colesterol y esfingolípidos, con una proporción fosfolípidos/colesterol entre 0.5 y 0.9 dependiendo de la especie^{24,30,31}. Sin embargo, no se tiene información de estas proporciones en los TTs del ME de recién nacidos.

Debido al porcentaje del ME en la masa total de los mamíferos y a su función, este tejido es altamente sensible a la restricción nutricional, sobre todo durante las etapas de desarrollo y diferenciación³². Cantidades reducidas de glucosa y aminoácidos generan músculos hipotróficos resistentes a la insulina^{33,34}.

En humanos, factores como la desnutrición materna pre-gestacional y gestacional además de la corta edad materna tienen un impacto significativo en el desarrollo de bajo peso al nacimiento, que a su vez está asociado con incremento del tejido adiposo y obesidad en la vida adulta^{35,36}. El tratamiento en humanos recién nacidos con muy bajo peso al nacimiento (<1,500 g) con la solución de nutrición parenteral isotónica tradicional (Glucosa 300mOsm/L) o con la misma solución adicionada con aminoácidos, ha demostrado una ganancia de peso dependiente de la masa grasa, sin aumentar o mejorar la masa muscular o magra³⁷. Debido a que en la vida posnatal, la hipertrofia es el mecanismo que permite al ME seguir creciendo, estimulando además el crecimiento óseo y el desarrollo y maduración del sistema nervioso motriz, la desnutrición gestacional debería ser considerada una causa potencial de las enfermedades metabólicas de la edad adulta, principalmente cuando los individuos adultos son expuestos a dietas ricas en carbohidratos^{38,39}.

2. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general:

Determinar el efecto de la desnutrición gestacional sobre las propiedades mecánicas del músculo esquelético de ratas recién nacidas con desnutrición gestacional, la relación lípido/proteína en las membranas de Túbulo transverso y la expresión del GLUT4 en TT de músculo esquelético al momento del nacimiento.

3. HIPÓTESIS

La desnutrición durante la gestación altera el desarrollo y composición de la red de membranas de los túbulos transversos disminuyéndolos cuantitativamente, y la expresión del GLUT4 en estas membranas se verá también disminuida junto con la fuerza y las propiedades mecánicas del ME.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los procedimientos fueron realizados en apego a las guías de “Cuidado y uso de animales de laboratorio” (Care and Use of Laboratory Animals) del Instituto de Recursos de Animales de Laboratorio de los Estados Unidos, las guías de la Asociación de Medicina Veterinaria de América (AVMA 2013), a la Norma Oficial Mexicana de “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio” (NOM-062-ZOO1999) y con aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

4.1 Animales.

Se usaron ratas Wistar machos de 300 g y hembras de 250 a 300 g, ambos en edad fértil, proporcionadas por el Bioterio Central de la Facultad de Medicina, UNAM, las cuales fueron colocadas en cajas con 5 hembras en un ambiente controlado con ciclos de luz/oscuridad de 12 h a una temperatura de 25°C para lograr la sincronización de los ciclos ováricos. Las fases del ciclo ovárico de las ratas hembras se determinaron por citología vaginal registrando los cambios morfológicos epiteliales.

4.1.1 Apareamiento.

En jaulas tipo jumbo fueron puestas 3 hembras y 1 macho durante tres días para que se aparearan. El apareamiento fue confirmado por la presencia de espermatozoides en el frotis vaginal además de la determinación de datos clínicos de embarazo (aumento del volumen de las glándulas mamarias, peso y circunferencia abdominal), estos eventos fueron considerados indicadores del

primer día de la gestación (día 0). Posteriormente, las ratas hembras preñadas fueron alojadas en jaulas individuales en condiciones controladas para iniciar el protocolo de desnutrición.

4.2 Protocolo de desnutrición gestacional.

A partir del día 0 de gestación, la dieta de las ratas gestantes se estableció en 8 g de alimento genérico al día (23% de proteína, 4.5% de grasas, 6% de carbohidratos y 2% de una mezcla de minerales, Rodent Laboratory Chow, Agribbrands Purina, México), con aporte de agua *ad libitum* durante los 21 días de la gestación⁴⁰. El día del nacimiento es considerado como el primero de vida de las crías.

4.3 Obtención de los productos gestacionalmente desnutridos.

El día del nacimiento fueron seleccionadas y separadas las crías que nacieron muertas. Las crías vivas fueron mezcladas y posteriormente divididas aleatoriamente en grupos de 6 animales para igualar el número de crías por camada y por grupo (control y NDG). Posteriormente fueron pesadas individualmente, se tomaron muestras de sangre y fueron sacrificadas por decapitación. La Figura 8 muestra las dimensiones de ratas neonatas promedio control y DNG.



Figura 8. Ratas recién nacidas; control y con desnutrición gestacional

4.4 Disección quirúrgica y obtención membranas enriquecidas en Túbulos transversos (TTs) y Retículo Sarcoplásmico (RS).

En el día 1 de vida, se obtuvo el músculo EDL de las extremidades posteriores, escogiendo animales aleatoriamente y mediante disección bajo microscopio de luz en una cámara de acrílico, en solución de Krebs-glucosa (135mM de NaCl, 5mM de KCl, 1mM de MgCl₂, 2.5mM de CaCl₂, 11mM glucosa, 1mM Na₂HPO₄, 15mM de NaHCO₃) burbujeada con O₂ al 95% y CO₂ al 5% para mantener un pH de 7, para la evaluación mecánica el mismo día del nacimiento. También fueron disecados los músculos dorsales y del resto de las extremidades, congelados con nitrógeno líquido y almacenados a -70°C para el aislamiento de las vesículas enriquecidas en membranas celulares (Figura 9).

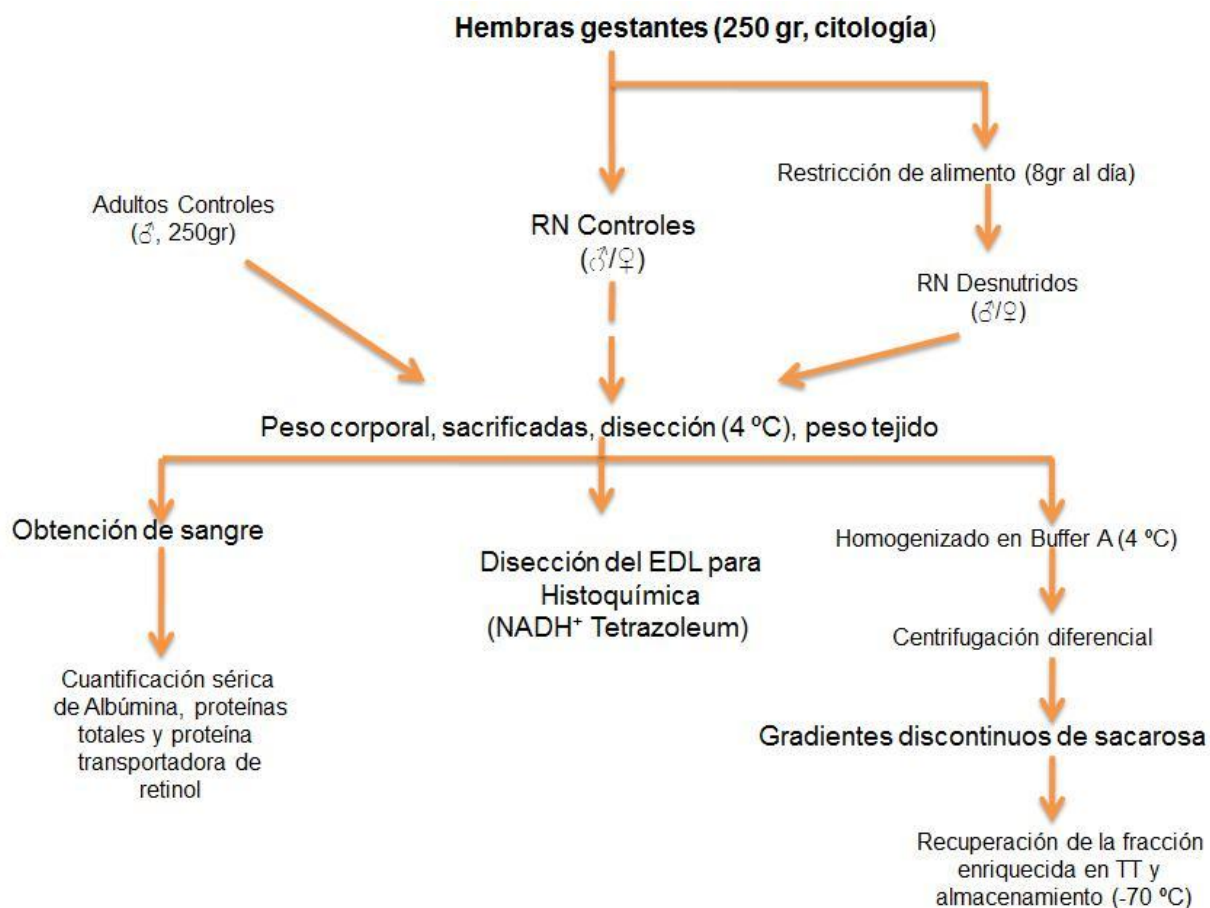


Figura 9. Esquema del diseño experimental.

4.5 Cuantificación de glucosa sérica.

Se tomó aleatoriamente una gota de sangre para cuantificar los niveles séricos de glucosa, usando un glucómetro Accu Check Active™ (Roche, Lote de tiras reactivas número 380).

4.6 Cuantificación de proteínas séricas totales.

El suero sanguíneo se obtuvo por centrifugación a 10,000 rpm por 10 min a 4°C y recuperación del suero sobrenadante. Las proteínas séricas totales se cuantificaron por Colorimetría usando el método de Comassie plus de Pierce.

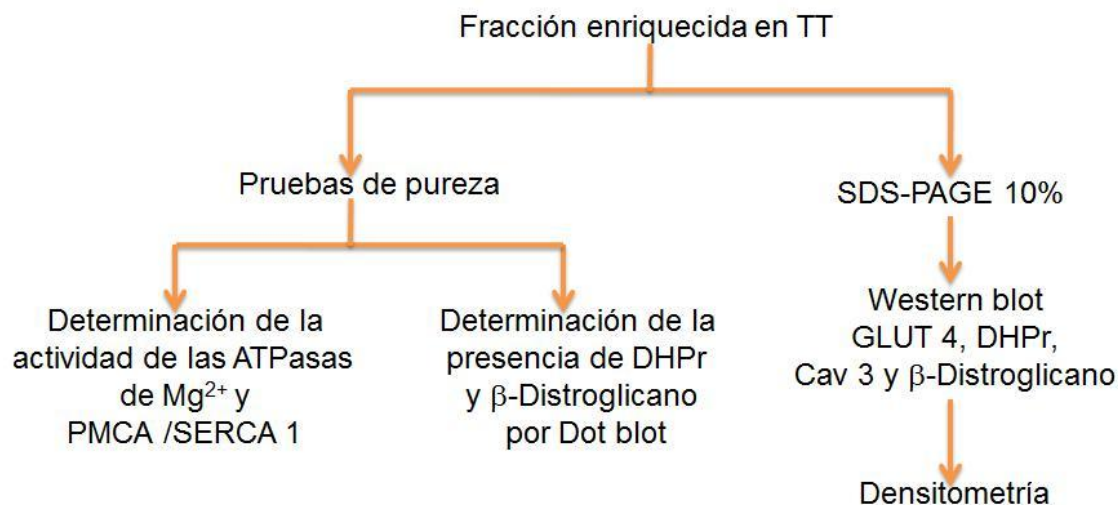


Figura 10. Esquema del diseño experimental a partir del aislamiento de membranas de Túbulo transversos.

4.7 Aislamiento de las membranas de túbulo transversos.

El músculo se obtuvo de grupos de 5 crías (20 g) de ratas recién nacidas controles y con desnutrición gestacional. El músculo obtenido fue mezclado por grupo de crías y homogenizado con Polytron a 4,500 rpm en 2 pulsos de 30 segundos con un descanso intermedio de 10 segundos, en una solución buffer A que contiene Tris-Malato 20 mM, 100 mM KCl, pH de 7.0 en una proporción 4:1. El homogenizado es centrifugado a 7,500 rpm en una centrifuga Sorval, en el rotor SS34 durante 30 min a 4°C. Se recupera el sobrenadante y se filtra en 8 capas de gasa. El sobrenadante es sometido a un choque osmótico con 0.5M de KCl y después sometido a dos lavados con buffer A en una ultracentrífuga Beckman con un rotor 45Ti a 43,00 rpm durante 45 min a 4°C, a continuación el pellet se resuspende en un buffer B (Tris-Malato 20 mM, 0.3 M de Sacarosa) y se determina la concentración de la proteína en la fracción microsomal para inferir los rendimientos. La muestra se pone en un gradiente discontinuo de sacarosa (43%, 35%, 27.5% y

28%) y se centrifuga durante 16 h a 4°C en una ultracentrífuga Bëckman con un rotor SW28 a 23,000 rpm. Se recuperan las interfases entre las fracciones 25-27.5%, 27.5-35% y 35-43% y se lavan de la Sacarosa y se resuspenden por separado con buffer base (Tris-Malato 20 mM) para ser guardadas a -20°C.

4.8 Aislamiento de membranas de Retículo Sarcoplásmico (RS)

Las membranas de RS se obtuvieron de músculos de las extremidades y de la región dorsal de ratas recién nacidas. El aislamiento se realizó mediante centrifugación diferencial y un gradiente discontinuo de sacarosa en la ausencia de cualquier agente reductor en el medio tampón. Gradientes de sacarosa inicial de 25%, 27,5% y 35% w / v se utilizan para separar las membranas de la superficie. La interfaz 35% se colocó en un segundo gradiente discontinuo que consiste en 27,5%, 30%, 32%, 35% y 45% de sacarosa. La banda obtenida en los 32% y el 35% se identificó como interfaces de RS ligero (RSL), detectada por la máxima actividad ATPasa estimulada por Ca^{2+} . Las concentraciones de proteína se determinaron utilizando el método de cuantificación de proteína Coomassie Plus (Pierce, Rockford, IL, EE.UU.) con albumina de suero bovino (BSA) como estándar (Figura 10).

4.9 Preparación del músculo para las pruebas mecánicas.

Los músculos EDL aislados fueron pesados (peso húmedo) y puestos en una cámara de acrílico equipada con electrodos de platino que corren a lo largo de las paredes internas de la cámara. Se usó solución de Krebs (mM: Na 135, KCl 5, MgCl₂ 1, CaCl₂ 2.5, glucosa 11, Na₂HPO₄ 1, NaHCO₃ 15) burbujeada con una mezcla de O₂ al 95% y CO₂ al 5% para alcanzar y mantener un pH de 7. El tendón distal del EDL es sujetado a un gancho fijo a un extremo de la cámara y el

tendón proximal al transductor de fuerza. Los electrodos de platino son conectados a 2 electroestimuladores (GrassSD9).

4.10 Contenido de lípidos totales y la determinación del colesterol

Los lípidos totales en membranas aisladas de TT (100 mg) se determinaron utilizando el método de cloroformo/metanol descrito previamente⁴¹. Para medir las concentraciones de colesterol se usó un Kit de cuantificación de colesterol/éster de colesterilo (Biovisión, CA, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La proteína se precipitó después de la determinación del peso.

4.11 Actividad hidrolítica de la ATPasa

La actividad ATPasa total se midió por determinación colorimétrica de Pi usando verde malaquita como se ha descrito previamente⁴². Alícuotas de 5 g / ml de proteína fueron incubadas en una solución que contiene (en mM): 100 de KCl, 5 MgCl₂, 5 de NaN₃, 1 ouabaina y 20 Tris-malato, pH 7. La reacción se detuvo con una solución que contiene lo siguiente: 0.045% de hidrocloreuro de verde malaquita, molibdato de amonio 4.2% en HCl 4 N, 0.8 ml de Triton-X100 por cada 100 ml de solución, y 0,25 ml de citrato de Na (34%). La absorbancia se leyó a 660 nm.

4.12 Calorimetría diferencial de barrido (CDB)

La CDB se utilizó para medir la temperatura de transición (T_m) de las proteínas de la membrana de TT. La T_m se define como la temperatura a la que el exceso de capacidad de calor es máxima. Las membranas de TT se disolvieron en una solución tampón que contiene 100 mM de KCl y 20 mM de Tris-malato (pH 7.0). El exceso de calor (C_p) frente a las exploraciones de temperatura se obtiene a partir de aproximadamente 0.5 mg de proteína/ml usando un calorímetro diferencial de barrido de alta sensibilidad VP-CDB (MicroCal Inc., MA EE.UU.). Las muestras y

las soluciones de referencia fueron cuidadosamente degasificadas bajo vacío durante 5 min antes de cargar completamente los contenedores del CDB con una capacidad de 0.56 ml. Cuando se alcanzó un equilibrio a 10°C, la temperatura se aumentó a 100 °C. Cada análisis se realizó a una velocidad de 1°C/min. Para evaluar la reversibilidad de desplegamiento de la proteína, la temperatura se enfrió a 10 ° C y vuelve a explorar hasta 100 ° C. La línea de base se corrigió restando la nueva exploración de la exploración inicial. En todos los casos, no hubo evidencia de reversibilidad. Los perfiles de CDB se analizaron y se usó el mejor ajuste teórico calculado, asumiendo la desnaturalización irreversible de las proteínas, como ha sido descrito para el retículo sarcoplásmico^{26, 43} (Figura 11)

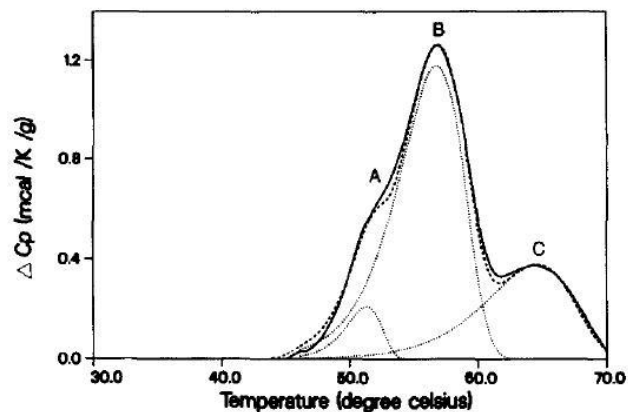


Figura 11. CDB de Túbulos transversos aislados de músculo rápido de conejo Nueva Zelanda (²⁶)

4.13 Electroforesis de proteínas e inmunoblot

Una muestra con 25 mg/ml de proteína se desnaturalizó a 95°C durante 5 min con el reactivo de Laemmli y se coloca en geles SDS-PAGE al 10% (120 V, 1h, temperatura ambiente). Después, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Bio Rad) durante 1h (100 V, 4°C). La membrana se incubó durante 1h a temperatura ambiente en TBS-Tween 20 con los

siguientes anticuerpos: GLUT-4 monoclonal anti-rata (ABCAM, 1:10.000), caveolina-3 monoclonal anti-rata (Santa Cruz Biotechnology, 1:600) y β -Distroglicano monoclonal anti-rata (Santa Cruz Biotechnology, 1:500). Se usó un anticuerpo anti-conejo de cabra acoplado con peroxidasa de rábano (Jackson ImmunoResearch Laboratories, 1:6.000) se incubó durante 1h a temperatura ambiente. Se utilizaron reactivos de detección de transferencia Western y películas (GE Healthcare). La determinación semicuantitativa del GLUT-4, CAV-3 y β -Distroglicano se hizo por densitometría, y los resultados se expresaron en unidades de α -actina usada como control de carga y normalizados a unidades de densidad (UDN).

La desviación estándar de la media (SD) se determinó para todos los resultados y la diferencia entre dos valores medios se determinó utilizando la prueba t de Student.

5. Resultados

Ratas Wistar normales del bioterio central de la Facultad de Medicina de la UNAM con alimento y agua *ad libitum* tienen un consumo promedio de aproximadamente 12 g de alimento comercial, lo que aumenta en promedio hasta 17g durante el embarazo. Las ratas con alimentación restringida fueron alimentadas con sólo 8g de la misma comida durante el embarazo. La Figura 12 A muestra el peso corporal medio de los RN control y desnutridos. El peso corporal de las crías control en el día cero fue de 5.8 ± 0.031 g frente a 4.5 ± 0.03 g para cachorros desnutridos, lo que representa una disminución del 23,04%. La Figura 12 B muestra el peso medio de músculo esquelético obtenido por disección quirúrgica por animal, el peso húmedo promedio fue de 0.423 ± 0.004 g para cachorros control y 0.268 ± 0.001 g de cachorros desnutridos, que corresponde a una disminución del 37% en los cachorros desnutridos. La Figura 12 C muestra las concentraciones promedio de proteína de suero, que fueron 12.86 ± 0.17 mg/ml para los cachorros control y 9.53 ± 0.093 mg/ml para los cachorros desnutridos, presentando los desnutridos una disminución del 25,78%. Figura 12 D muestra las concentraciones medias de glucosa en sangre para crías controles y desnutridas en el día cero, las cuales fueron $96,73 \pm 3,25$ mg/dl para los cachorros controles y $83,75 \pm 2,56$ mg/dl para los desnutridos, que corresponde a un nivel de glucosa 13,41% menor en los desnutridos.

Para evaluar la funcionalidad de los músculos esqueléticos en las crías desnutridas, estudiamos las propiedades mecánicas de músculos EDL aislados, utilizando la estimulación eléctrica.

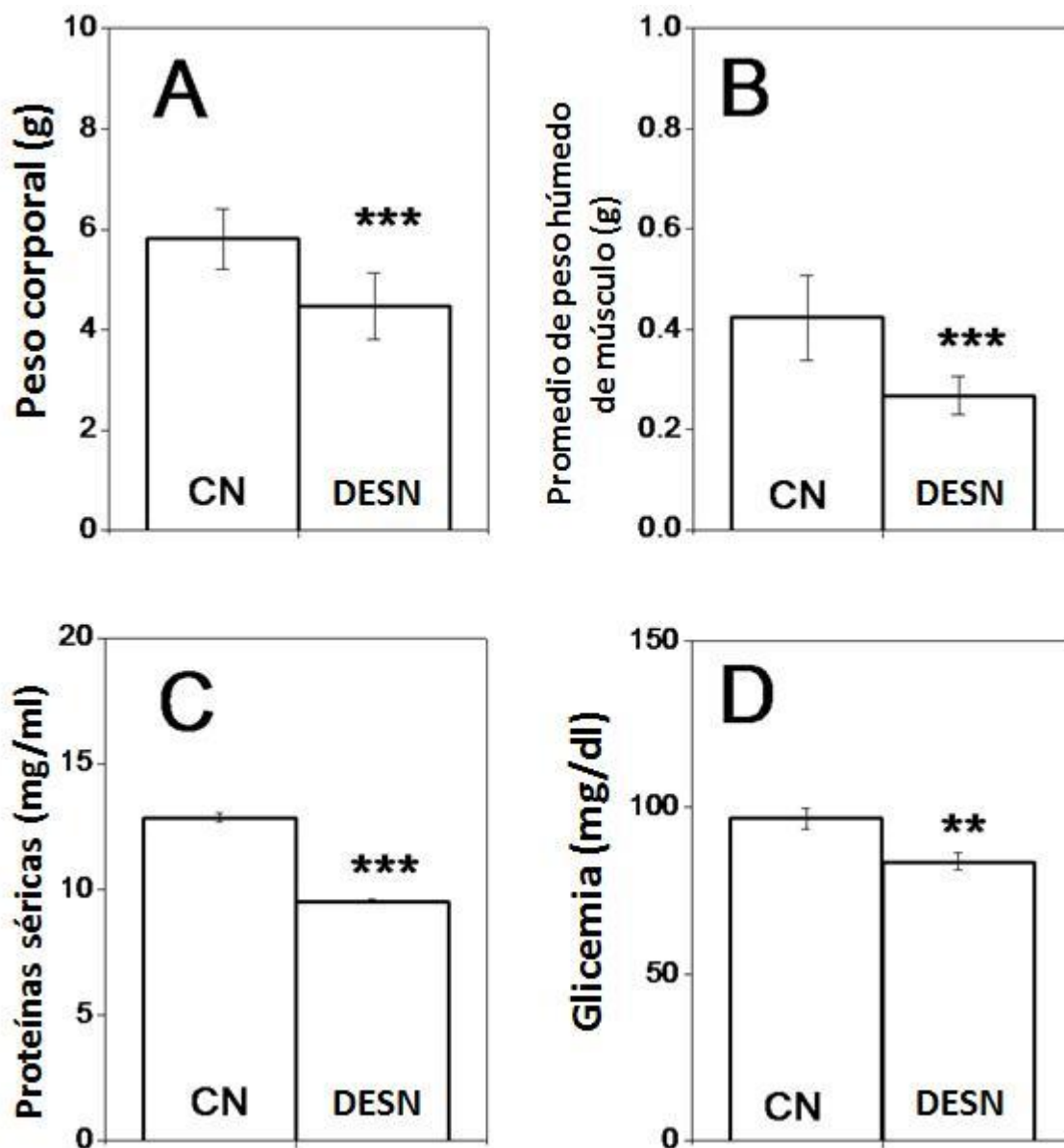


Figura 12. Efecto de la desnutrición gestacional en la rata recién nacida. Ratas recién nacidas control (Ctrl) y con desnutrición gestacional (DG). A) Peso corporal promedio (g); B) Promedio de peso seco (g) de los músculos aislados; C) Promedio de proteínas séricas (mg/ml); D) Promedio de glucosa sérica (mg/dl).

5.1 Efecto de la DG en las propiedades mecánicas del músculo EDL

La Figura 13 muestra la fuerza desarrollada por las crías controles y desnutridas durante un tren de la estimulación tetánica. La figura 13 A corresponde a un experimento representativo de un músculo EDL de crías control y muestra que, después de cada relajación, la línea de base se mantiene a un nivel más alto. Figura 13 B corresponde a un experimento representativo de un músculo EDL de crías desnutridas y muestra que la fuerza aumenta de 18 a 24 % en el músculo EDL desnutrido, cuando se comparan el primer y último estímulo tetánico (separados por 200s) durante el tren de estimulación. La figura 13 C muestra la fuerza media (en mN) seleccionado de diferentes estímulos tetánicos a lo largo del curso del tren de estimulación. El músculo EDL control tuvo una fuerza inicial de $24,9 \pm 1,9$ mN ($n = 5$), y la fuerza inicial de EDL de las crías desnutridas fue $30,3 \pm 2,9$ mN ($n = 4$) ($p > 0,05$). La fuerza media, 200 ms después del inicio del tren de estimulación fue de $16,3 \pm 1,8$ mN para las crías control y $21,2 \pm 2,4$ mN para las crías desnutridas ($p > 0,05$). El índice de fatiga fue similar entre los dos grupos, sin embargo, el tiempo para alcanzar el 30% de la fuerza fue $3,84 \pm 0,16$ min para las crías control y $4,12 \pm 0,067$ min para los desnutridos ($p < 0,05$). Las crías desnutridas requieren 6,86% más de tiempo para alcanzar el 30% de fatiga. La figura 14 A presenta tres estímulos tetánicos representativos del tren de estimulación - el tétanos inicial, el tétanos a los 90s y el tétanos de 180s - con índices similares de contracción y relajación, pero la fuerza desarrollada promedio del 60 % más alto en los EDLs de las crías desnutridas (línea discontinua). La Figura 14 B muestra la integral de la fuerza promedio con respecto a la función de tiempo, la cual fue superior en el músculo EDL de los desnutridos (línea discontinua) con respecto al control en un 64%, 70% y 80% respectivamente.

Los músculos EDL de las crías desnutridas desarrollo más fuerza y fue más resistente a la fatiga que los de las crías control. Debido a que la fuerza de la contracción y la fatiga están relacionadas con la regulación del calcio intracelular, se estudió la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (SERCA) y las propiedades de las membranas TT aislados de controles y desnutridos.

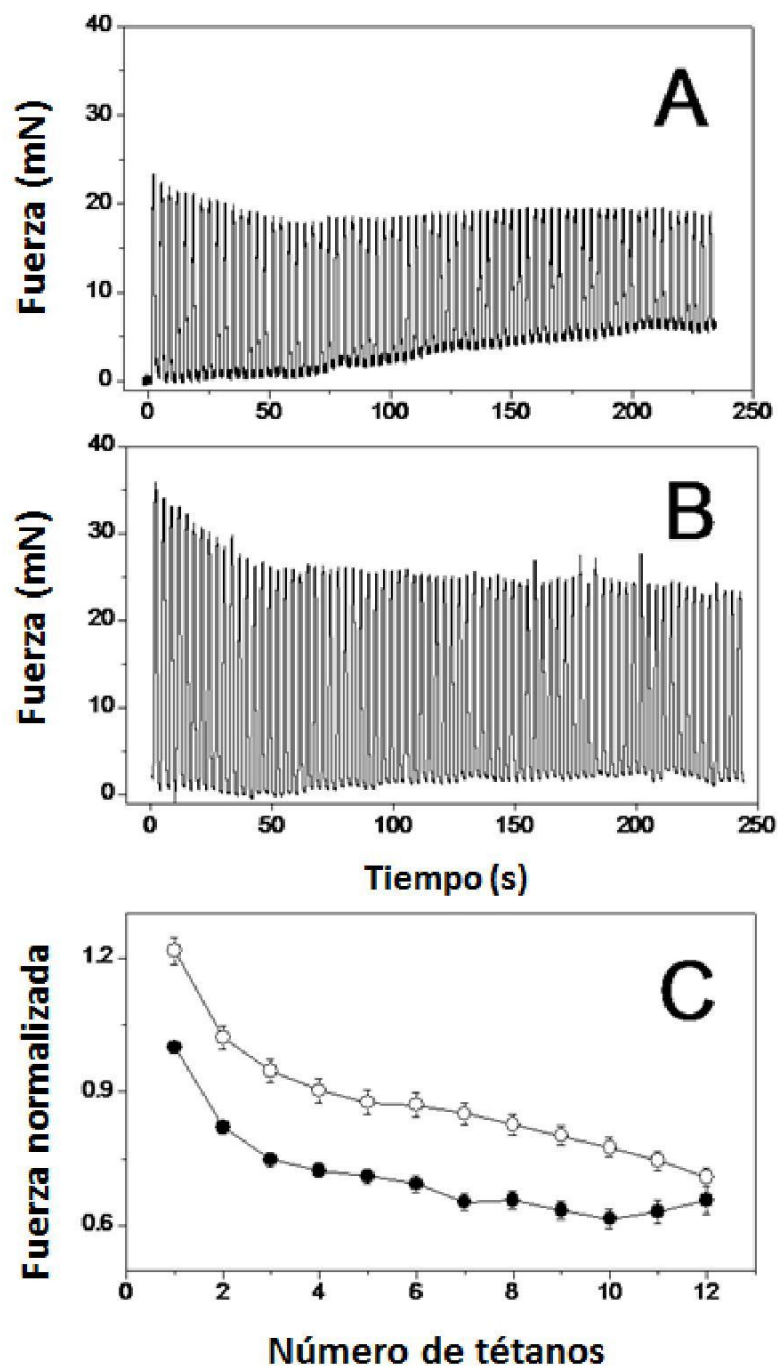


Figura 13. Propiedades mecánicas del músculo EDL aislado de ratas recién nacidas controles (●) y desnutridos en la gestación (○) Protocolo de estimulación para fatiga: 75Hz, 1s, 100V cada 0,3s. A) Experimento representativo del músculo control; B) Experimento representativo del músculo desnutrido; C) Promedio de fuerza de tétanos seleccionados de un tren de estimulación (mN \pm DE, n=5)

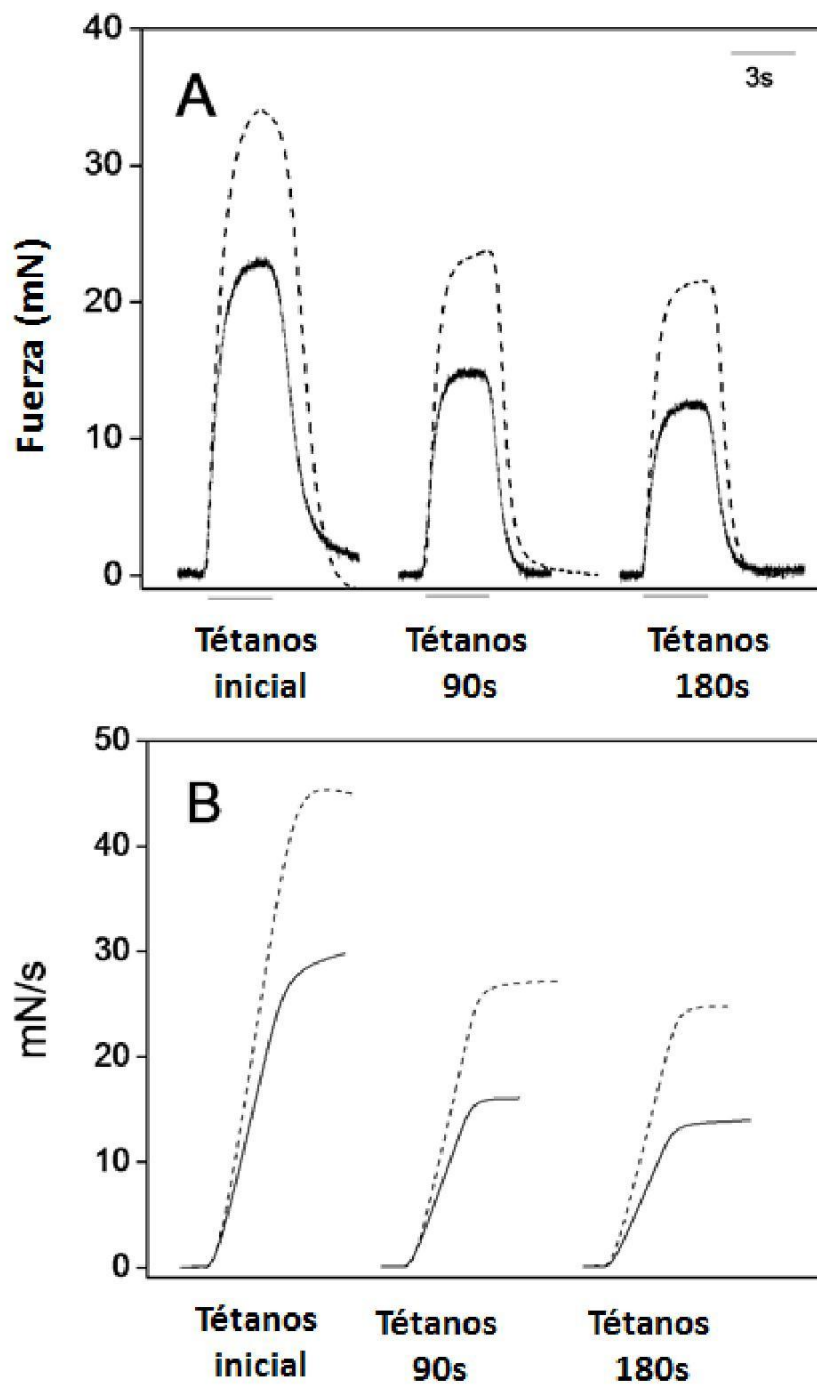


Figura 14. Efecto de la desnutrición gestacional en la fuerza de contracción del músculo EDL. Ratas recién nacidas controles (—) y desnutridas (---). A) Tres tétanos del protocolo de estimulación (75Hz, 1s, 100V cada 0,3s): tétanos inicial, tétanos 90s, tétanos 180s. El promedio de fuerza es 60% mayor en los EDL de desnutridos en el tétanos inicial, 55% a los 90s y 50% a los 180s. B) El promedio de la velocidad de fuerza máxima (N/s) en los EDL de desnutridos fue 64% mayor en los tétanos iniciales, 70% a los 90s y 80% a los 180s.

El aumento de la fuerza y la amplitud del tétanos que se muestran en la Figura 14 indican una mayor disponibilidad de calcio durante la contracción en el músculo desnutrido. La Figura 15 muestra la actividad hidrolítica específica de SERCA respecto a una función de tiempo, determinada en retículo sarcoplásmico aislado del músculo esquelético de crías controles y desnutridas. La actividad de SERCA en el músculo de los desnutridos es más baja durante el tiempo del ensayo, en concreto un 30% más bajo después de 2,5 h de reacción.

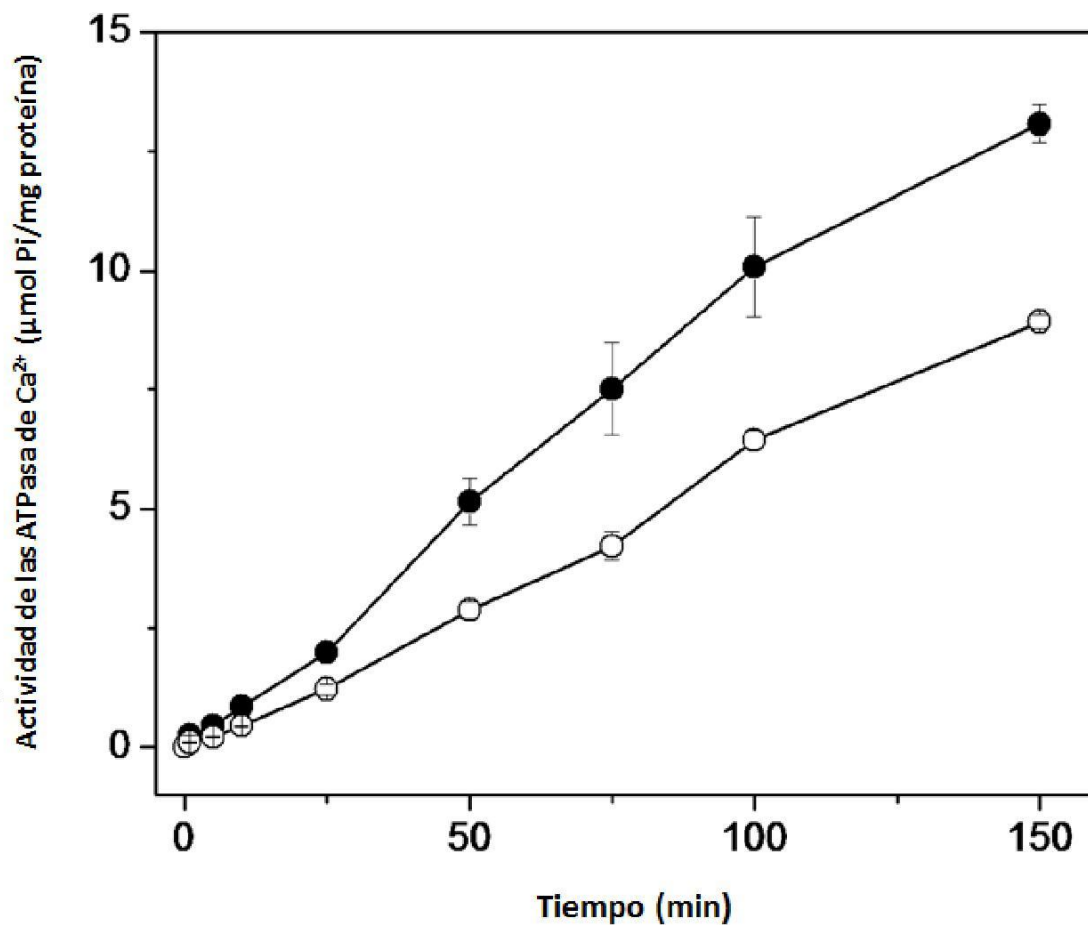


Figura 15. Actividad ATPasa de Ca²⁺ (SERCA) del retículo sarcoplásmico. La actividad de SERCA se determinó hasta por 2,5h de reacción. Ratas recién nacidas control (●) y desnutridas (○) (μmol Pi/mg proteína, ± DE, n=5).

5.3 Membranas de túbulos transversos.

La fracción de membrana obtenida en la interfaz 25/27.5% del gradiente de sacarosa tuvo la mayor actividad de la ATPasa de Mg^{2+}/Ca^{2+} , como también ha sido descrito en las membranas de TT adultos²⁷. La Figura 16 A muestra la actividad hidrolítica de la ATPasa de Mg^{2+}/Ca^{2+} en las membranas de TT de crías control, que corresponde a $2,67 \pm 0,14$ μmol de Pi/mg de proteína en 20 min; la actividad catalítica de la de la ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA) fue $0,07 \pm 0,03$ μmol de Pi/mg de proteína (n=3) ($p>0,05$), sin embargo, sólo el 2,7% de la actividad total de la actividad ATPasa de las membranas enriquecidas en TT corresponde a la PMCA. La Figura 16 B muestra la actividad de la ATPasa de Mg^{2+}/Ca^{2+} en las membranas de los TT de los desnutridos que fue de $2,51 \pm 0,12$ μmol de Pi/mg de proteína en 20 min; la actividad catalítica de la PMCA fue $0,06 \pm 0,11$ $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína (n=3) ($p>0,05$). La Figura 16 C muestra la comparación de la PMCA de las membranas de TT de controles y desnutridos y aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, la actividad PMCA muestra una tendencia de mayor actividad en los TT de las crías desnutridas.

Debido a que la composición protéica de las membranas del TT en los recién nacidos pueden ser distinta de las de los adultos, se estudió el perfil de desarrollo de proteínas de las membranas del TT de la crías controles y desnutridas y los comparamos con las membranas TT aisladas de músculos rápidos de adultos.

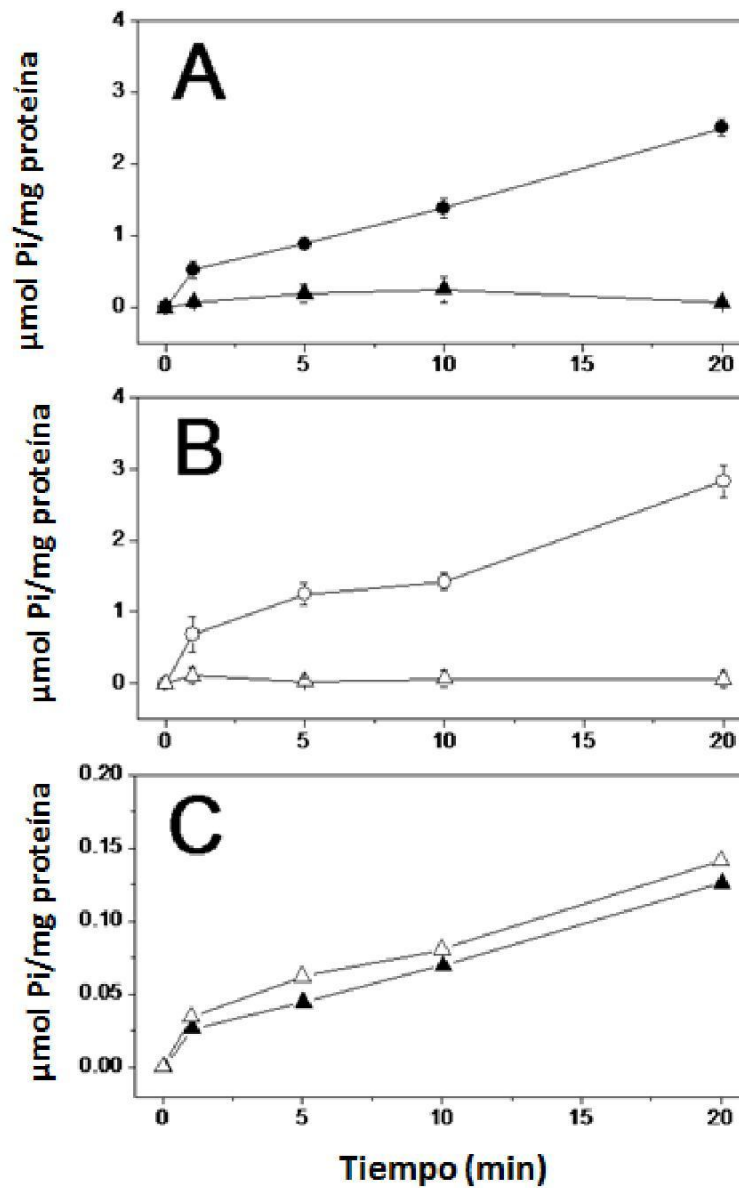


Figura 16. Actividad ATPasa de las membranas de los túbulos transversos (TT). Membranas de TT de aisladas de músculos de ratas recién nacidas controles y desnutridas fueron usadas para determinar: A) La actividad de la ATPasa de Mg²⁺/Ca²⁺ (●) contra la actividad de la ATPasa de Ca²⁺ (▲ en músculos controles; B) La actividad de la ATPasa de Mg²⁺/Ca²⁺ (○) contra la actividad de la ATPasa de Ca²⁺ (△) en músculos desnutridos; C) La actividad de la ATPasa de Mg²⁺/Ca²⁺ de músculos controles (▲) contra la de los desnutridos (△) (μmol Pi/mg proteína, ± DE, n=5).

5.4 CDB de las proteínas de membrana de los TT

El perfil de desnaturalización térmica de las proteínas de membrana de los TT se obtuvo por CDB a una velocidad de calentamiento de $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y se muestra en la Figura 17. La desnaturalización térmica de la proteína es un proceso endotérmico que genera el exceso de calor específico (C_p). La temperatura de transición (T_m) de cada componente se determina por la deconvolución del perfil. La desnaturalización era completamente irreversible después de la exploración a 80°C . Se usó como referencia el perfil de desnaturalización térmico de membranas de TT aislados a partir de músculo esquelético rápido de adultos²⁷. La figura 17 A muestra el perfil de la desnaturalización de las membranas de TT obtenidas de ratas recién nacidas control (línea continua). Hemos observado tres principales transiciones, a la $T_m(1) = 45^{\circ}\text{C}$, $T_m(2) = 52^{\circ}\text{C}$ y $T_m(3) = 58^{\circ}\text{C}$. La figura 17 B muestra el perfil de desnaturalización de las membranas de TT aisladas de ratas recién nacidas desnutridas. Aunque las tres transiciones observadas para las membranas de TT control también estuvieron presentes en los recién nacidos desnutridos, dos de las tres transiciones aparecieron a temperaturas más altas - $T_m(1) = 51^{\circ}\text{C}$ y $T_m(2) = 54^{\circ}\text{C}$ - que se diferenciaban por 6°C y 2°C , respectivamente, respecto de los recién nacidos controles. La transición a la $T_m(3) = 58^{\circ}\text{C}$ tenía la misma temperatura, pero la transición era más rápida que las tres transiciones controles.

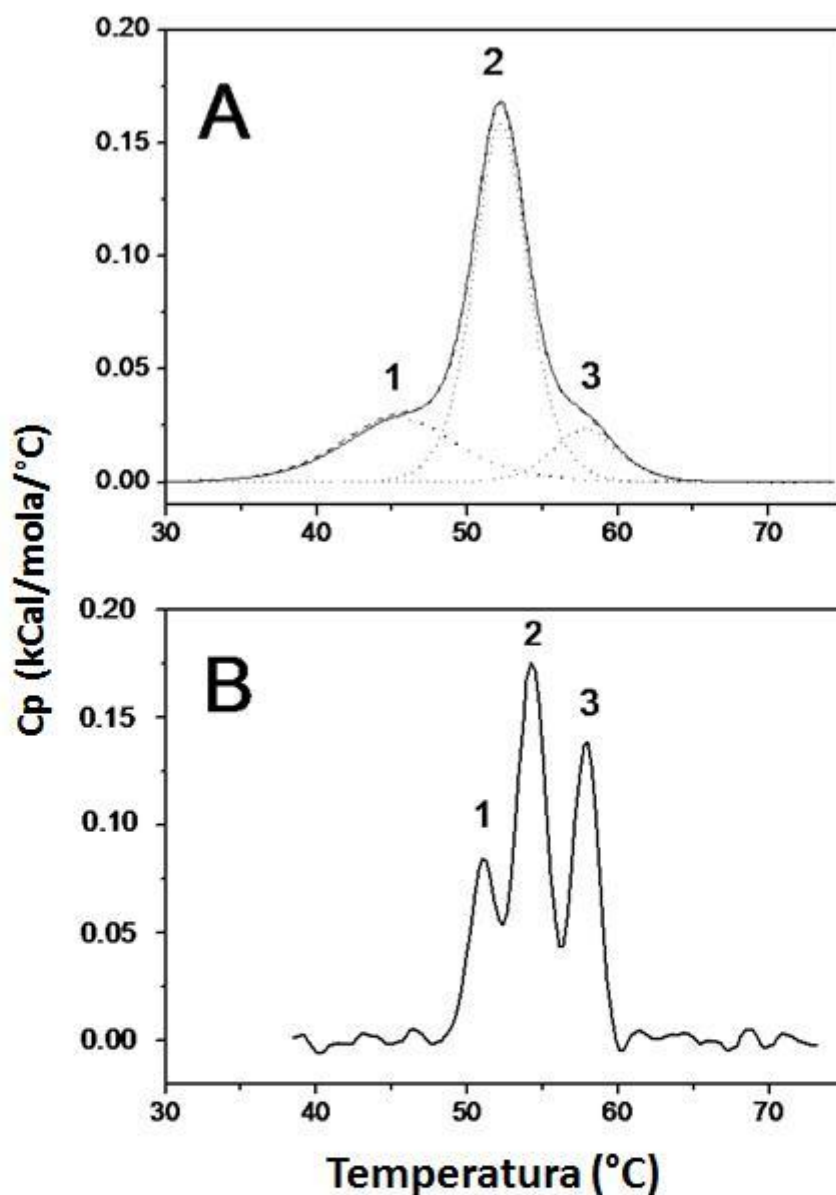


Figura 17. Perfiles calorimétricos de las proteínas de membrana de los TT. Experimentos representativos del escaneo con aumento de temperatura a $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ de las membrana de TT aisladas de músculo esquelético de ratas recién nacidas en una solución que contiene 10% sacarosa, 100mM de KCl, 20mM de Tris-malato y 1mM de CaCl_2 , pH 6,8. A) Las proteínas de los TT de controles muestran 3 transiciones principales: T_m (1) = 45°C , T_m (2) = 52°C y T_m (3) = 58°C y B) Las de los TT de desnutridos muestran 3 importantes transiciones a T_m (1) = 51°C , T_m (2) = 58°C y T_m (3) = 58°C . Los picos de transición 1 y 2 muestran aumento en la T_m en los desnutridos mientras que el pico de transición 3 se mantiene sin cambios. Sin embargo, los tres picos de transición en los TT de desnutridos pasan por un cambio rápido en la entalpía.

5.5 Proteína y el contenido de lípidos de las membranas de TT

El análisis de proteínas por electroforesis de SDS -PAGE mostró diferentes patrones de peso molecular entre las membranas de TT de los recién nacidos control y desnutridos. La figura 18 corresponde al patrón electroforético de SDS -PAGE de las membranas de TT aislados de músculo esquelético de adultos, recién nacidos control y recién nacidos desnutridos. El principal componente protéico de las membranas de TT adulto es la ATPasa de Mg^{2+}/Ca^{2+} (100-110 kDa), que representa el 26 % del total de las proteínas de los TT²⁶, mientras que la ATPasa de Ca^{2+} (130-140 kDa) representa aproximadamente el 10 %²⁷. En los recién nacidos, la ATPasa de Mg^{2+}/Ca^{2+} parece estar presente en niveles muy bajos o estar inactiva. En los recién nacidos control, el $44 \pm 2,7$ % (n=3) de la proteína total detectada por densitometría corresponde a una proteína, o grupo de proteínas, en un rango de peso molecular entre 40-60 kDa (Figura 18 A); en comparación, 55 ± 2.3 % de la proteína total cae en el mismo rango de peso molecular en el patrón protéico de los recién nacidos desnutridos (n=3) (Figura 18 B). El contenido total de proteínas y lípidos totales de las membranas de TT por gramo de tejido para los recién nacidos controles y desnutridos están enlistados en la Tabla I. En los recién nacidos desnutridos, la concentración de proteína fue 19 % menor por gramo de tejido en comparación con los recién nacidos controles, y la concentración total de lípidos fue 24 % menor por gramo de tejido en comparación con los recién nacidos controles. Debido a que el colesterol es uno de los principales componentes de las membranas TT, también se evaluó específicamente la concentración de este. En los recién nacidos desnutridos, la concentración de colesterol fue 18 % menor por gramo de tejido en comparación con los recién nacidos controles. Las proporciones de proteína/lípido calculados fueron 0.18 y 0.19 para los recién nacidos control y recién nacidos desnutridos nacidos, respectivamente. Las proporciones de lípidos/colesterol fueron 0.05 y 0.06 para los recién nacidos control y recién nacidos desnutridos, respectivamente. Aunque hubo una menor cantidad de cada componente

determinado en las membranas TT aisladas de músculo esquelético de los recién nacidos desnutridos, las proporciones se conservan entre los grupos. Marcadores protéicos de membranas de TT que se sabe que son esenciales para el desarrollo muscular, como caveolina3 y el transportador de glucosa dependiente de insulina GLUT-4, también fueron determinados. Se sabe que estas proteínas se encuentran casi exclusivamente en las membranas de TT. En contraste, el β -Distroglicano es un marcador protéico del sarcolema, distribuido en un arreglo costamérico cercano a las bocas de los TT³⁰.

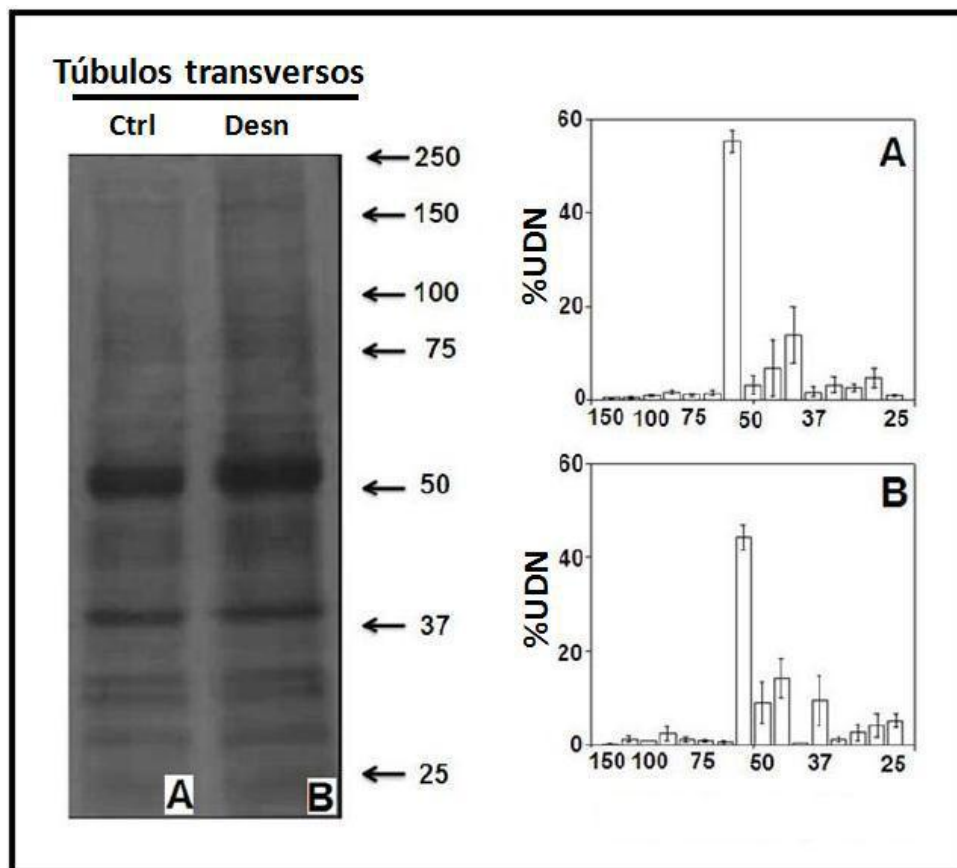


Figura 18. Patrón electroforético de las proteínas de los TT de músculo esquelético de ratas recién nacidas. Electroforesis SDS-PAGE y A) análisis por densitometría del peso de las proteínas de los TT de ratas recién nacidas controles y B) desnutridos. En los recién nacidos control el 44% \pm 2.7 de la proteína total detectada por densitometría se encuentra dentro del rango de peso moleculares entre 40-60 kDa, en comparación con los desnutridos, en los cuales el 55% \pm 2.3 del total de proteínas se encuentra en el mismo rango de peso molecular. Unidades de densidad normalizadas (UDN), (\pm DE, n=3)

Tabla 1. Componentes de los Túbulos transversos de ratas recién nacidas ($\mu\text{g/g}$ de tejido)

Membranas de TT	Controles	Desnutridos
Proteínas totales	125.55 \pm 11.2	102.21 \pm 11.8
Lípidos totales	686.59 \pm 66.6	519.31 \pm 32.3
Colesterol total	38.94 \pm 6.42	31.51 \pm 3.9
Lípidos + proteínas	812.14	621.52
\pm Desviación estándar, n=3		

5.6 Expresión del GLUT-4 y Cav-3 en los TT de ratas neonatas.

La Figura 19 es una imagen de una inmuno-transferencia y del análisis por densitometría para el anti-GLUT-4 (Figura 19 A), anti-caveolina-3 (Figura 19 B), anti- β -Distroglicano (Figura 19 C) y anti- α -actina (Figura 19 D), este último sirve de control para la carga de proteína. Las unidades de densitometría normalizadas (UDN) con respecto al control de carga de α -actina demostraron un aumento significativo de 2.16 veces en las membranas de TT de los recién nacidos desnutridos (1.64 ± 0.31 UDN) en comparación a las membranas de TT de los recién nacidos control (0.76 ± 0.2 NDU). No hubo diferencias en la expresión membranaral de Cav-3 entre los recién nacidos control y desnutridos. También, se determinó la presencia de β -Distroglicano porque a pesar de que se sabe que se expresa en el sarcolema, su localización coincide con las aberturas donde inician las invaginaciones de membrana de los TT, lo que dificulta eliminar al β -Distroglicano durante la purificación de membranas de TT. Sin embargo, la expresión en la membrana de la β -Distroglicano no presentó diferencias entre los grupos.

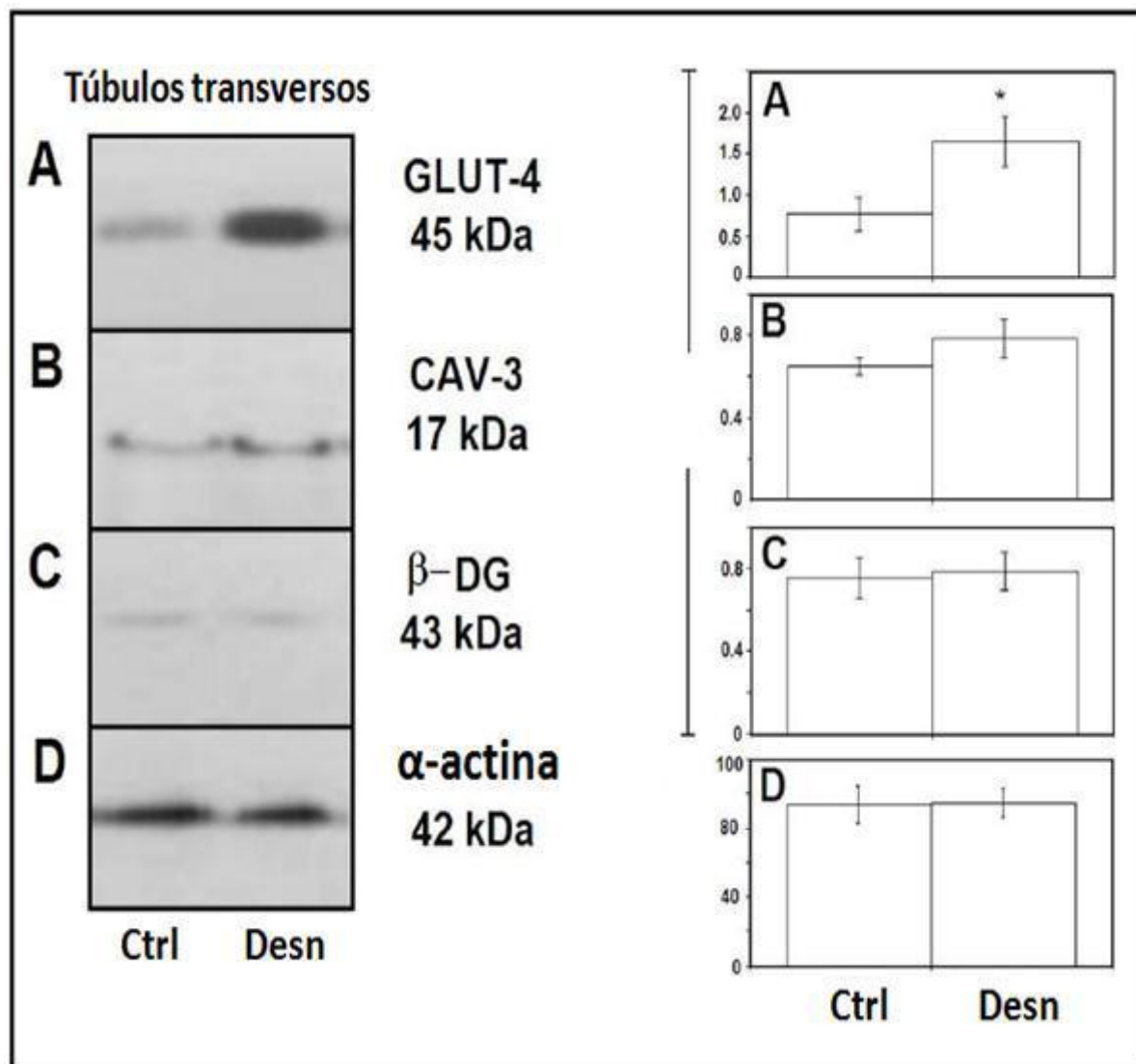


Figura 19. Expresión del GLUT-4 en membranas de TT de ratas recién nacidas control (Ctrl) y con desnutrición gestacional (Desn). Inmunotransferencia y análisis densitométrico para: A) anti-GLUT-4, B) anti-Caveolina 3, C) anti-β-Distroglicano y D) anti-α-Actina (control de carga).

Unidades de densidad normalizadas (UDN) y unidades de densidad normalizadas respecto a α-Actina (UAN)

6. Discusión

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la desnutrición gestacional, por la restricción de alimentos durante el embarazo, sobre el desarrollo del músculo esquelético de las crías de ratas Wistar. Nuestros resultados muestran un peso corporal 23% menor con las dimensiones del cuerpo simétrico en la descendencia gestacionalmente desnutrida. La restricción simétrica del desarrollo se explica por el hecho de que la desnutrición que afecta a todas las etapas de gestación afecta la diferenciación celular y el desarrollo^{3, 31, 37}. En el día cero, los recién nacidos desnutridos presentan una concentración reducida de proteínas y glucosa séricas. Las dietas de restricción proteico-calórica producen una respuesta metabólica que reduce la concentración de proteínas séricas, aumentando el transporte de glucosa sérica al músculo para favorecer la síntesis de proteínas. Las crías desnutridas con proteínas séricas reducidas responden a la restricción de nutrientes mejorando la captación de glucosa basal⁴⁴. Estas condiciones confirman la restricción calórico-proteica adecuada en nuestro modelo experimental. Varias observaciones en seres humanos y evidencias experimentales de modelos animales demuestran que la desnutrición desde la etapa fetal hasta la edad adulta produce alteraciones en la tolerancia a la glucosa e hipoinsulinemia, debido al efecto deletéreo de la desnutrición sobre la función de las células- β pancreáticas⁴⁵. La discrepancia en nuestros resultados puede estar relacionada con la edad de los animales estudiados, ya que realizamos nuestras determinaciones exclusivamente en el día cero de vida, mientras que la mayoría de los estudios han mostrado datos en animales varios días después de su nacimiento y hasta la edad adulta, lo que introduce muchas variables que no pueden ser disecadas fácilmente. Los efectos de la desnutrición gestacional en el aumento limitado del peso de los músculos esqueléticos, han sido definidos ampliamente en el pasado, mientras que la evaluación de las alteraciones de las propiedades mecánicas se ha enfocado siempre hacia la determinación del rendimiento muscular en la edad adulta.

La importancia de las evaluaciones mecánicas de este estudio radica en que es el primero en medir las propiedades mecánicas del músculo, incluyendo la fuerza de contracción y resistencia a la fatiga, en EDLs aislados de ratas recién nacidas controles y con desnutrición gestacional en el día cero de vida.

6.1 Propiedades mecánicas de los músculos EDL

Con estas evaluaciones se muestra que la fuerza muscular en los desnutridos recién nacidos es 17,5% superior a la de los controles y que el tiempo para alcanzar el 70% de fatiga es un 7% mayor en los músculos EDL de crías desnutridas. Después de un protocolo de fatiga, la recuperación de la fuerza fue de 70 % más rápido los recién nacidos desnutridos. Sin embargo, la reducción en la fuerza de contracción máxima y la fuerza tetánica ha sido demostrada en los músculos EDL de ratas con desnutrición gestacional hipoprotéica entre los 25 y 90 días de edad⁴⁶. El mismo modelo también ha sido utilizado para demostrar que la tensión pasiva se incrementa en los músculos EDL y sóleo, lo que indica que la desnutrición prenatal también afecta a los componentes elásticos pasivos⁴⁷. Consideramos medir el efecto directo de la desnutrición gestacional al nacer sobre la función músculo esquelético, porque este es un momento de la vida en el que no se han integrado aún las variables de alimentación o de adaptación al ambiente. El aumento de la fuerza de la contracción y la duración de la contracción tetánica en las crías recién nacidas desnutridas podría explicarse en parte por un aumento en la disponibilidad de calcio en el espacio de los miofilamentos que podría resultar de la reducción de la actividad de la SERCA.

6.2 Efecto de la DG en la actividad de SERCA-1 y PMCA

La actividad hidrolítica de ATP de SERCA en ratas recién nacidas a los 30 min de reacción fue la mitad de la actividad de SERCA reportada en músculo esquelético rápido de animales adultos⁴⁸. A pesar de que las membranas de retículo sarcoplásmico se obtuvieron de músculos que más tarde serán músculos esqueléticos rápidos, en las ratas recién nacidas, estos músculos son principalmente fibras de tipo lento/intermedio^{5,49} lo que podría explicar la actividad menor y más lenta comparada con sus homólogos adultos. La menor actividad de la ATPasa SERCA en los músculos de crías desnutridas podría estar relacionada con diferentes conformaciones de la misma, en lugar de tratarse de un mecanismo de inhibición. La actividad de la ATPasa PMCA de los TT de músculo de crías recién nacidas control es cuatro veces menor en comparación con los niveles de actividad reportados en los TT del músculo esquelético rápido de adultos²⁷. La contribución de la actividad de la ATPasa PMCA en las membranas de los TT para la regulación del calcio intracelular al nacimiento no parece jugar un papel importante durante la actividad muscular.

La reducción en el área de superficie de membrana de los TT por la desnutrición gestacional y su relación con la expresión de proteínas membranales en los TT y la función de contracción del músculo esquelético son aspectos que quedan por investigar.

6.3 Efecto de la DG en las membranas de TT.

En este estudio, mostramos la reducción en la cantidad de proteína y el contenido de lípidos por gramo de tejido en las membranas TT de los animales recién nacidos con desnutrición gestacional en contraste con una sobreexpresión de GLUT4.

Los niveles más bajos de componentes de la membrana TT en el músculo esquelético de crías con desnutrición gestacional se podrían explicar por la disminución de la fusión de mioblastos

debido a una deficiencia de la glucosa, como ha sido demostrado previamente en cultivos de mioblastos *in vitro*¹⁰, o por hiperinsulinemia similar a lo demostrado en fetos de ovejas embarazadas desnutridas^{50, 51}. Aunque la actividad específica de la proteína marcadora de las membranas de TTs (ATPasa de Mg^{2+}) tendió a ser mayor en los recién nacidos desnutridos, no se documentó ninguna diferencia significativa. Sin embargo, la concentración plasmática de glucosa disminuida, junto con el aumento de dos veces en la expresión del GLUT4 en las membranas de los TTs, encontradas en este estudio, apoya resultados similares que plantean la hipótesis de un mecanismo de compensación en los animales con estrés nutricional durante el desarrollo^{36, 39} y⁵². Sin embargo, es necesario investigar más a fondo la funcionalidad estructural de GLUT4, sobre-expresado en las membranas TTs del músculo esquelético de animales recién nacidos desnutridos. El aumento de la captación de glucosa ha sido señalado como responsable de producir un aumento de tejido adiposo en sujetos adultos que estaban gestacionalmente desnutridos⁵⁰. El subdesarrollo del músculo esquelético presentado en este trabajo, que resultó de la desnutrición gestacional, pone de manifiesto la importancia de tejido adiposo en el aumento de la captación de glucosa por las vías de la lipogénesis en los individuos adultos. El cambio en el perfil de desnaturalización de proteínas de la membrana TT, principalmente la reducción en la transición en el rango de temperatura, demuestra que las proteínas de la membrana de los TTs de los animales recién nacidos desnutridos tienen menor estabilidad térmica y por lo tanto son más vulnerables a daños estructurales.

7. CONCLUSIONES

En conclusión, los experimentos descritos en esta tesis presentan la primera evidencia obtenida en membranas de TTs de músculo esquelético, aisladas de ratas recién nacidas en el día cero que apoyan la idea de que los cambios más importantes que resultan de la desnutrición gestacional en las crías de ratas son la sobreexpresión de GLUT4, con un efecto en la estabilidad conformacional de las proteínas integrales de la membrana. La naturaleza precisa de los cambios conformacionales que se describen en estos resultados sigue siendo desconocida, por lo que actualmente estamos investigando la naturaleza de estos cambios conformacionales. También describimos por primera vez en este documento el efecto de la desnutrición gestacional en el incremento de la fuerza y resistencia a la fatiga en el músculo esquelético EDL aislado de recién nacidos en el día cero, lo que se asocia con una disminución en la actividad de la SERCA y alteraciones de la regulación del calcio intracelular por el retículo sarcoplásmico. Por ello proponemos, basados en nuestros resultados, que una estructura SERCA alterada junto con la sobre-expresión del GLUT-4 en los TT de músculo esquelético de recién nacidos con desnutrición gestacional están directamente involucrados en la adaptación mecánica de estos animales comparados con sus controles (Figura 13). Se necesitan estudios enfocados en los mecanismos y tiempos específicos que permitan identificar los mecanismos por los cuales la desnutrición afecta a la composición de los lípidos de las membranas de los TTs y la estructura de sus proteínas, para dilucidar los efectos metabólicos perjudiciales de la desnutrición gestacional en el desarrollo y función del músculo esquelético en el individuo adulto.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-
- ¹ Ziegler EE, O'Donnell AM, Nelson SE, Fomon SJ: Body composition of the reference fetus. *Growth* 1976; 40(4):329-41.
 - ² White DR, Widdowson EM, Woodard HQ, Dickerson JW: The composition of body tissues (II). Fetus to young adult. *Br J Radiol* 1991; 64 (758):149-59.
 - ³ Bryson-Richardson RJ, Currie PD: The genetics of vertebrate myogenesis. *Nature Reviews Genetics* 2008; 9: 632-646.
 - ⁴ Stockdale FE: Myogenic cell lineages. *Developmental Biol* 1992; 154(2): 284-98.
 - ⁵ Ho KW, Heusner WW, Van Huss J, Van Huss WD: Postnatal muscle fibre histochemistry in the rat. *J Embryol Exp Morph* 1983; 76: 37-44.
 - ⁶ Davis TA, Suryawan A, Orellana RA, Nguyen HV, Fiorotto LM: Postnatal ontogeny of skeletal muscle protein synthesis in pigs. *J Anim Sci* 2008; 86(14): E13-E18.
 - ⁷ Denne SC. and Kalhan SC: Leucine metabolism in human newborns. *Am J Physiol Endocrinol* 1987; 253(6): E608-E615.
 - ⁸ Mittendorfer B, Andersen JL, Plomgaard P, Saltin B, Babraj JA, Smith K, Rennie MJ; Protein synthesis rates in human muscles: neither anatomical location nor fibre-type composition are major determinants *J Physiol* 2005; 563(1):203-11.
 - ⁹ Tannu NS, Rao VK, Chaudhary RM, Giorgianni F, Saeed AE, Gao Y, Raghov R: Comparative Proteomes of the Proliferating C2C12 Myoblasts and Fully Differentiated Myotubes Reveal the Complexity of the Skeletal Muscle Differentiation Program. *Mol Cell Proteomics* 2004; 3:1065-1082.
 - ¹⁰ Fulco M, Cen Y, Zhao P, Hoffman EP, McBurney MW, Sauve AA, Sartorelli V: Glucose restriction inhibits Skeletal Myoblast Differentiation by Activating SIRT1 through AMPK Mediated Regulation of Nampt. *Developmental Cell* 2008; 14:661–673.
 - ¹¹ Mitsumoto Y, Klip A: Development regulation of the subcellular distribution and glycosylation of GLUT1 and GLUT4 glucose transporters during myogenesis of L6 muscle cells. *J Biol Chem* 1992; 267(7):4957-4962.
 - ¹² Zorzano A, Palacín M, Gumà A: Mechanisms regulating GLUT4 glucose transporter expression and glucose transport in skeletal muscle. *Acta Physiol Scandinav* 2005; 183(1):43-58.
 - ¹³ Mitsumoto Y, Burdett E, Grant A, Klip A: Differential expression of the GLUT1 and GLUT4 glucose transporters during differentiation of L6 muscle cells. *Biochem and Biophys Res Comm* 1991; 175(2):652–659.

-
- ¹⁴ Rash JE, Fambrough D: Ultrastructural and electrophysiological correlates of cell coupling and cytoplasmic fusion during myogenesis in vitro. *Developmental Biology* 1973; 30(1): 166-186.
- ¹⁵ Harunori Ishikawa: Formation of elaborate networks of T-system tubules in cultured skeletal muscle with special reference to the T-system formation. *J Cell Biol* 1968; 38(1); 51-66.
- ¹⁶ Almers W, Fink R, Palade PT: Calcium depletion in frog muscle tubules: the decline of calcium current under maintained depolarization. *J Physiol* 1981; 312:177-207.
- ¹⁷ Muñoz P, Roseblatt M, Testar X, Palacín M, Thoidis G, Pilch PF, Zorzano A: The T-tubule is a cell-surface target for insulin-regulated recycling of membrane proteins in skeletal muscle. *Biochem J* 1995; 312:393-400.
- ¹⁸ Fosset M, Jaimovich E, Delpont E and Lazdunski M: [3H]Nifedipine Receptors in Skeletal Muscle. Properties and preferential localization in transverse tubules. *J of Biol Chem* 1983; 258(10):6086-6092.
- ¹⁹ Burdett E, Beeler T, Klipp A: Distribution of glucose transporters and insulin receptors in the plasma membrane and the transverse tubules of skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys* 1987; 253(1):279-286.
- ²⁰ Tatsuya Hayashi, Jorgen F. P., Wojtaszewski y Laurie J. Goodyear. Exercise regulation of glucose transport in skeletal muscle. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 1997, Vol. 273, E1039-E1051.
- ²¹ Takekura H, Flucher BE, Franzini-Armstrong C: Sequential Docking, Molecular Differentiation and Positioning of T-Tubule/SR Junctions in Developing Mouse Skeletal Muscle. *Developmental Biol* 2001; 239:204-214.
- ²² Franzini-Armstrong C: Simultaneous maturation of transverse tubules and sarcoplasmic reticulum during muscle differentiation in the mouse. *Developmental Biol* 1991;146(2):353-63.
- ²³ Peachey LD: The sarcoplasmic reticulum and the transverse tubules of the frog's Sartorius. *J Cell Biol* 1995; 25(3);209-231.
- ²⁴ Parton RG, Way M, Zorzi N, Stang E: Caveolin-3 associates with developing T-tubules during muscle differentiation. *J Cell Biol* 1997; 136(1):137-154.
- ²⁵ Murph RM, Janelle PM, Graham DL: Plasma membrane removal in rat skeletal muscle fibers reveals caveolin-3 hot spots at the necks of transverse tubules. *Exp Cell Res* 2009; 315:1015-1028.
- ²⁶ Galbiati F, Engelman AJ, Volonte D, Zhang LX, Minetti C, Li M, Hou H, Kneitz B, Edelmann W, Lisati MP: Caveolin-3 null mice show a loss of caveolae, changes in the microdomain

distribution of the dystrophin-glycoprotein complex and t-tubule abnormalities. *J Biol Chem* 2001; 276:21425-21433.

²⁷ Sabbadini RA, Dahms AS: Biochemical properties of isolated transverse tubular membranes. *J Bioenerg Biomembr* 1989; 21(2):163-213.

²⁸ Ortega A, Lepock JR: Use of thermal analysis to distinguish magnesium and calcium stimulated ATPase activity in isolated transverse tubules from skeletal muscle. *Biochem Biophys A* 1995; 1233:7-13.

²⁹ Becker V, González-Serratos H, Álvarez R, Bäermann M, Irlles C, Ortega A: Effect of endurance exercise on the Ca²⁺ pumps from transverse tubule and sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2004; 97(2): 467-474.

³⁰ Roseblatt M, Hidalgo C, Vergara C, Ikemoto N: Immunological and biochemistry properties of transverse tubules membranes isolated from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem* 1981; 256:8140-8148.

³¹ Vega-Moreno J, Tirado-Cortes A, Álvarez R, Irlles C, Mas-Oliva J, Ortega A: Cholesterol Depletion Uncouples β -dystroglycans from Discrete Sarcolemmal Domains, Reducing the Mechanical Activity of Skeletal Muscle Cell *Physiol Biochem* 2012; 29:905-918.

³² Bedi KS, Birzgalis AR, Mahon M, Smart JL, Wareham AC: Early life undernutrition in rats. Quantitative histology of skeletal muscles from underfed young and refed adult animals. *Br J Nutr* 1982; (3):417-431.

³³ Hales CN, Barker DJP: Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 1992; 35(7):595-601.

³⁴ Holness MJ, Langdown ML, Sugden MC: Early-life programming of susceptibility to dysregulation of glucose metabolism and the development of type 2 diabetes mellitus. *Biochem* 2000; 349:657-665.

³⁵ Stocker CJ, Arch JR, Cawthorne MA: Fetal origins of insulin resistance and obesity. *Proc Nutr Soc* 2005; 64(2):143-51.

³⁶ Barker DJP, Hales CN, Fall CHD, Osmond C, Phipps KC: Type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia* 1993; 36 62-67.

³⁷ Guzmán J, Guzmán-Vázquez J, Ortega A, Irlles C, Arias J, Casanueva y López E, Vadillo-Ortega F: Evaluación del crecimiento posnatal en neonatos de muy bajo peso al nacer con alimentación parenteral hiperproteica temprana. *Nutrición Clínica* 2006; 9(3):1-6.

³⁸ Ozanne SE, Hales CN: The long term consequences of intrauterine protein malnutrition for glucose metabolism. *Proc Nutr Soc* 1999; 58(3):615-619.

-
- ³⁹ Summermatter S, Mainieri D, Russell AP, Seydoux J, Montani JP, Buchala A, Solinas G, Dulloo AG: Thrifty metabolism that favors fat storage after caloric restriction: a role for skeletal muscle phosphatidylinositol-3-kinase activity and AMP-activated protein kinase. *FASEB J* 2008; 22:774–785.
- ⁴⁰ Franco M. C., Arruda R. M., Villela-Dantas R. P., Kawamoto E. M., Fortes Z. B., Scavone C., Carvalho M. H., Tostes R. and Nigro D. (2002). Intrauterine undernutrition: expression and activity of the endothelial nitric oxide synthase in male and female adults offspring. *Cardiovascular research*, 56; 145-153.
- ⁴¹ Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 1956; 226(1):497-509.
- ⁴² Lanzetta PA, Alvarez LJ, Reinach PS, Candia OA: An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Analytical Biochem* 1979; 100:95-97.
- ⁴³ Lepock JR, Rodahl AM, Zhang C, Heynen M, Waters B, Cheng KH: Thermal denaturation of the Ca-ATPase of sarcoplasmic reticulum reveals two thermodynamically independent domains. *Biochemistry* 1990; 29:681–689.
- ⁴⁴ Swenne I, Crace CJ y G Milner RD. Persistent Impairment of Insulin Secretory Response to Glucose in Adult Rats After Limited Period of Protein-Calorie Malnutrition Early in Life. *Diabetes* April 1987 vol. 36no. 4 454-458
- ⁴⁵ Garofano A, Czernichow P y Bréant B. In utero undernutrition impairs rat beta-cell development. *Diabetologia* (1997) 40: 1231–1234.
- ⁴⁶ Toscano AE, Manhães-de-Castro R, Canon F: Effect of a low-protein diet during pregnancy on skeletal muscle mechanical properties of offspring rats. *Nutrition* 2008;24:270-278.
- ⁴⁷ Toscano AE, Ferraz KM, Manhães-de-Castro R, Canon F: Passive stiffness of rat skeletal muscle undernourished during fetal development. *CLINICS* 2010;65:1363-1369.
- ⁴⁸ Álvarez R, Vázquez P, Pérez F, Jiménez AM, Tirado A, González-Serratos H, Irlés C, Ortega A: Regulation of Fast Skeletal Muscle activity by SERCA1 vicinal-cysteins. *J Muscle Res Cell Motil* 2004;30:5-16.
- ⁴⁹ Haltia M, Berlin O, Schucht H, Sourander P. Postnatal differentiation and growth of skeletal muscle fibres in normal and undernourished rats. A histochemical and morphometric study. *J Neurol Sci.* 1978 Mar;36(1):25-39.
- ⁵⁰ Ford SP, Hess BW, Schwoppe MM, Nijland MJ, Gilbert JS, Vonnahme KA, Means WJ, Han H and Nathanielsz PW. Maternal undernutrition during early to mid-gestation in the ewe results in altered growth, adiposity, and glucose tolerance in male offspring. *J ANIM SCI* 2007, 85:1285-1294.

⁵¹ George LA, Zhang L, Tuersunjiang N, Ma Y, Long NM, Uthlaut AB, Smith DT, Nathanielsz PW, and Ford SP. Early maternal undernutrition programs increased feed intake, altered glucose metabolism and insulin secretion, and liver function in aged female offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 302: R795–R804, 2012.

⁵² Ozanne SE, Hales CN: The long term consequences of intrauterine protein malnutrition for glucose metabolism. *Proc Nutr Soc* 1999;58:615-619.