



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EFFECTO DE UNA DIETA HIPERLIPÍDICA E HIPERGLUCÉMICA EN LA
ACTIVIDAD DE LAS CALPAÍNAS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:
MARISOL MARTÍNEZ ZAMUDIO

TUTOR PRINCIPAL

DRA. PATRICIA OSTROSKY SHEJET
[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. IVETTE CALDELAS SÁNCHEZ
[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM](#)

DRA. MARCIA HIRIART URDAVINA
[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)

Ciudad de México, Diciembre 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

Este trabajo se realizó en el Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas, de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), gracias al financiamiento del Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT) a través del donativo de Fronteras de la Ciencia No. 398 y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT – UNAM) mediante los proyectos IN201914 y IN212516, y el Programa Institucional de Estrategias de Prevención en Obesidad y Dabetes del Instituto de Investigaciones Biomédicas – UNAM.

Agradezco al CONACYT por haberme otorgado una beca dentro del programa de Becas Nacionales para cursar mis estudios de Maestría.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A los miembros del jurado de examen:

Dr. Samuel Canizales Quinteros

Facultad de Química, UNAM

Dra. Andrea Sachi Días Villaseñor

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Dra. Citlalli Osorio Yáñez

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Dra. Elena Zambrano González

Facultad de Medicina, UNAM

Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Por el tiempo dedicado a la revisión de la presente tesis, por sus valiosas observaciones y retroalimentación, GRACIAS.

A los miembros del comité tutor:

Dra. Ivette Caldelas Sánchez

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Dra. Marcia Hiriart Urdavina

Instituto de Fisiología Celular

Dra. Patricia Ostrosky Shejet

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Por acompañarme en el desarrollo de este proyecto, por compartir sus conocimientos, por sus cuestionamientos y su apoyo, GRACIAS.

A la **Dra. Ana María Salazar Martínez** del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, por el apoyo técnico y metodológico proporcionado durante la elaboración de esta tesis.

A la **QFB Lourdes Monserrat Sordo Cedeño** del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, por el apoyo técnico brindado en la elaboración de esta tesis.

A la **M. en C. Erika Navarrete Monroy** del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, por su apoyo técnico en la obtención y clasificación de las muestras utilizadas en la elaboración de esta tesis.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	8
ABREVIATURAS.....	9
INTRODUCCIÓN	13
Síndrome Metabólico.....	13
Epidemiología.....	14
Fisiopatología	14
Etiología.....	17
Modelos de estudio del Síndrome Metabólico.....	17
Ambiente intrauterino como origen del desarrollo de la salud y la enfermedad.....	18
Dieta materna alta en nutrientes.....	20
Conejo como modelo de estudio	21
Calpaínas	22
Calpaínas convencionales	22
Calpaínas clásicas y no clásicas	23
Estructura y función de la calpastatina	23
Función de las calpaínas.....	24
Calpaínas involucradas en patologías	25
JUSTIFICACIÓN	29
HIPÓTESIS.....	29
OBJETIVO GENERAL.....	30
OBJETIVOS PARTICULARES.....	30
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
Mantenimiento de los conejos	31
Dieta	31
Procedimiento de toma de muestra	33
Actividad de calpaínas por citometría de flujo	34
Extracción y cuantificación de proteínas de muestras de hígado y músculo de crías posterior al reto metabólico.....	35
Determinación de la abundancia proteica por Western Blot	35
Análisis estadístico	36
RESULTADOS	37
Actividad de las calpaínas en linfocitos de conejas madres.....	37

Actividad de las calpaínas en linfocitos de conejos crías	37
Abundancia proteica de CAPN1, CAPN2, CAPN10 y CAST en muestras de hígado de las crías	38
Abundancia proteica de CAPN1, CAPN2, CAPN10 y CAST en muestras de músculo de las crías .	44
Correlación de la abundancia de las calpaínas en hígado con valores bioquímicos evaluados en sangre.....	49
Correlación de la abundancia de las calpaínas en músculo con valores bioquímicos evaluados en sangre.....	51
DISCUSIÓN.....	54
Actividad de las calpaínas en linfocitos de conejo expuestos a una dieta alta en lípidos y carbohidratos	54
Actividad de calpaínas en linfocitos de crías expuestas de manera intrauterina a una dieta alta en lípidos y carbohidratos.....	55
Expresión de las calpaínas en tejidos de las crías después de un reto metabólico	56
CONCLUSIONES	63
PERSPECTIVAS	64
REFERENCIAS.....	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo fisiopatológico del SM.....	15
Figura 2. Miembros de la familia de las calpaínas clasificadas por su expresión y estructura.....	24
Figura 3. Diseño experimental.....	33
Figura 4. Reto metabólico en crías.....	33
Figura 5. Fundamento de la hidrólisis del sustrato fluorogénico CMAC, t-BOC-Leu-Met para medir actividad de calpaínas	34
Figura 6. La actividad de las calpaínas en linfocitos de conejas disminuye al ser alimentadas con una dieta Sobrenutrida (SN)	37
Figura 7. La actividad de las calpaínas en linfocitos de crías es menor en aquellas procedentes de madres alimentadas con una dieta SN	38
Figura 8. La dieta SN aumenta la abundancia de CAPN1 hepática, este efecto se ve incrementado si la madre tuvo una dieta SN	40
Figura 9. La abundancia de CAPN 2 en hígado no es alterada por una dieta materna o dieta reto SN	41
Figura 10. La abundancia de CAPN 10 en hígado no es alterada por una dieta materna o dieta reto SN	42
Figura 11. La abundancia de CAST en hígado no es alterada por una dieta materna o dieta reto SN	43
Figura 12. La abundancia de CAPN 1 en músculo no es alterada por una dieta materna o dieta reto SN	45
Figura 13. La dieta SN aumenta la abundancia de CAPN2 muscular, este efecto se ve incrementado si la madre tuvo una dieta SN	46
Figura 14. La abundancia de CAPN 10 en músculo no es alterada por una dieta materna o dieta reto SN	48
Figura 15. La abundancia de CAST en músculo no es alterada por una dieta materna o dieta reto SN	48
Figura 16. Correlación entre la abundancia de proteína de CAPN1, CAPN2, CAPN10 y CAST en hígado y la concentración de diversos parámetros bioquímicos medidos en sangre	50
Figura 17. Autocorrelograma de abundancia de calpaínas medidas en hígados de las crías.....	51
Figura 18. Correlación entre la abundancia de proteína de CAPN2 y CAPN10 en músculo y la concentración de diversos parámetros bioquímicos medidos en sangre	52
Figura 19. Autocorrelograma de abundancia de calpaínas medidas en el músculo de las crías.....	53

ABREVIATURAS

ADIPOQ	Adiponectina
AGNE/AGL	Ácidos grasos no esterificados / Ácidos grasos libres
Akt	Proteína cinasa B
CAPN1, 2 y 10	Calpaína-1, calpaína-2 y calpaína-10
CAST	Calpastatina
CBSW	Dominio β -sándwich del tipo de calpaína
CMAC, t-BOC-Leu-Met	7-Amino-4-Clorometil-Cumarin tert-Butoxicarbonil-Leu-Met
CON	Control
CysPc	Dominio de proteasa similar a calpaína
DOHaD	Origen del desarrollo de la salud y la enfermedad
DT2	Diabetes tipo 2
ECV	Enfermedad cardiovascular
ENT	Enfermedad no transmisible
FTO	Gen asociado a masa grasa y obesidad
GLUT1 y 4	Transportador de glucosa 1 y 4
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HGNA	Hígado graso no alcohólico
ICA512	Autoantígeno 512 de las células de los islotes
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de masa corporal
KRH	Solución amortiguadora Krebs Ringer Hepes
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LEPR	Receptor de leptina
MC4R	Receptor de melacortina 4
MIF	Mediana de la intensidad de fluorescencia
OLETF	Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty
PC1, PC2	Protease core 1 y 2
PEF(S) y PEF(L)	Dominio penta-mano EF de la subunidad reguladora pequeña y grande
SM	Síndrome metabólico
SN	Sobrenturida
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
TCF7L2	Factor de transcripción 7 tipo 2
TG	Triglicéridos
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

RESUMEN

Las calpaínas son una familia de proteasas de cisteína dependientes de calcio con diversas funciones celulares. Se ha reportado que la calpaína-1 (CAPN1), calpaína-2 (CAPN2) y calpaína-10 (CAPN10) están implicadas en procesos asociados a la homeostasis de la glucosa. El objetivo de este trabajo fue determinar si la actividad y la expresión de estas calpaínas son alteradas por la exposición *in utero*, y en la etapa adulta, a una dieta alta en lípidos y carbohidratos en el modelo de conejo europeo.

Para responder a nuestra pregunta de investigación, se midió la actividad de las calpaínas en los linfocitos de conejas que fueron alimentadas con una dieta estándar (CON) o una dieta alta en grasas y carbohidratos (SN) antes y durante el embarazo. Al nacer, las crías fueron amamantadas por conejas nodrizas alimentadas con la dieta CON, y posterior al destete, fueron mantenidas con esta misma dieta. Se determinó la actividad de calpaínas en los linfocitos de las crías en las semanas 10, 13 y 57 de edad. En la semana 62 de edad, los conejos fueron sometidos a un reto metabólico con la dieta SN por un mes, de tal manera que se obtuvieron cuatro grupos de acuerdo a la dieta materna y al reto metabólico (CON-CON, CON-SN, SN-CON y SN-SN). Pasado este tiempo, los conejos fueron eutanasiados, y se tomaron muestras de tejido hepático y muscular para evaluar la abundancia de CAPN1, CAPN2 y CAPN10 por Western Blot.

Los resultados mostraron que las conejas madre alimentadas con la dieta SN por 8 semanas presentan una menor actividad de calpaínas que el grupo CON. Así también, la dieta materna afectó la actividad de las calpaínas en los linfocitos de las crías; ya que en la semana 10 de edad, las crías provenientes de las madres SN presentaron una tendencia a tener menor actividad de las calpaínas. Dicha actividad, en este mismo grupo, incrementó con el paso del tiempo en el que fueron alimentadas con la dieta CON. Al estudiar los tejidos de las crías alimentadas en el reto metabólico con la dieta SN, se encontró que la abundancia de CAPN1 y CAPN2 aumentó en hígado y músculo, respectivamente; siendo más elevada en las crías SN-SN, provenientes de madres sobrenutridas.

Para determinar si la abundancia en las calpaínas en el hígado y músculo posterior al reto metabólico, reflejan las alteraciones en los parámetros bioquímicos comúnmente encontradas en el síndrome metabólico (SM), se realizaron análisis de correlación entre las variables. Entre las observaciones significativas, se encontró que a mayor concentración de colesterol total y lipoproteínas de baja densidad (LDL) en plasma, mayor fue la abundancia de CAPN1 en hígado y CAPN2 en músculo. Además, se encontró que a mayor concentración de ácidos grasos libres (AGL) en sangre, factor que promueve la resistencia a la insulina, menor fue la expresión de CAPN10 en músculo. Por otra parte, se encontró una correlación negativa entre las isoformas de CAPN10 y CAPN1 en hígado, lo que indicaría que estas calpaínas tienen diferentes funciones en el tejido.

Estas evidencias sugieren que la dieta alta en grasas y carbohidratos genera una desregulación en las calpaínas, y que éstas pueden tener funciones tejido-específicas. Por una parte, CAPN1 y CAPN2 podrían estar involucradas en la progresión del daño causado por la dieta, como son dislipidemia, resistencia a la insulina y acumulación de lípidos en estos tejidos. Por otra parte, estas mismas alteraciones pueden ocasionar una desregulación de la CAPN10, que se refleja como una correlación negativa con la concentración de AGL en sangre, y con la disminución en la actividad de calpaínas en linfocitos (donde, de acuerdo a evidencias previas, la CAPN10 es la principal responsable), ambas relacionadas con la resistencia a la insulina. Por lo tanto, las

asociaciones encontradas demuestran que la abundancia de las calpaínas en los tejidos evaluados tiene una estrecha relación con los parámetros bioquímicos que están típicamente alterados en el SM.

Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que la exposición *in utero* a una dieta alta en lípidos y carbohidratos es capaz de inducir una desregulación de las calpaínas asociadas a alteraciones metabólicas, tanto en linfocitos, como en otros tejidos importantes para el metabolismo; que se detona por el consumo de la misma dieta en los individuos maduros.

INTRODUCCIÓN

Síndrome Metabólico

El Síndrome Metabólico (SM) es un grupo de condiciones metabólicas que en conjunto promueven el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (ECV) y diabetes tipo 2 (DT2) (Dunford & Sangster, 2017). En los últimos años se ha reportado un incremento en la prevalencia del SM en México y el mundo, lo que ha dado importancia al estudio del origen de estas alteraciones, así como la prevención y control de las mismas. De acuerdo al Programa Nacional de Educación del Colesterol – Tercer Panel de Tratamiento para el Adulto (NCEP-ATP-III) (Expert Panel on Detection Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults, 2001), una persona con SM es aquella que cumple con al menos 3 de los 5 factores enlistados:

- 1) Obesidad abdominal
- 2) Niveles elevados de triglicéridos
- 3) Bajos niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL)
- 4) Hipertensión
- 5) Incremento de la concentración de glucosa en sangre en ayuno.

(Samson & Garber, 2014)

El diagnóstico de SM predice un incremento de al menos cinco veces de desarrollar DT2 y de hasta dos veces de padecer ECV dentro de los próximos 5 a 10 años. Además de ECV y DT2, el SM también está asociado a otras enfermedades como hígado graso no alcohólico (HGNA), síndrome del ovario poliquístico y algunos tipos de cáncer (Samson & Garber, 2014). El HGNA está asociado significativamente con componentes del SM como son obesidad abdominal, triglicéridos, presión arterial y glucosa elevados, resistencia a la insulina y a niveles bajos de lipoproteínas de alta densidad (HDL); y a mayor número de estos componentes en un individuo, mayor es la prevalencia de HGNA (Samson & Garber, 2014). En un estudio en México, se encontró que el 87% de los hombres y 76% de las mujeres con SM, también presentan HGNA (Castro-Martínez y cols. s/f). El 40-85% de las mujeres con síndrome del ovario poliquístico presentan obesidad abdominal; y los otros componentes del SM (resistencia a la insulina, dislipidemia e hipertensión) están concentrados en esta misma población (Samson & Garber, 2014). Además, la obesidad incrementa el riesgo a desarrollar cáncer de colon, riñón, próstata, endometrio y mama (Samson & Garber, 2014); y alrededor del 20% de las muertes por cáncer están atribuidas a complicaciones desencadenadas por la obesidad.

Epidemiología

La prevalencia de SM depende de los parámetros utilizados en cada estudio, como son la definición usada, edad, sexo, estatus socioeconómico y antecedentes étnicos. Sin embargo, en los estudios publicados de la última década, se estima que de un cuarto a un tercio de la población adulta cumple con los criterios del SM. De acuerdo al ENSANUT 2016, el 36.8% de la población adulta padece SM, un incremento del 10.2% con respecto al 2012 (Wacher-Rodarte, 2009, ENSANUT, 2016), siendo así uno de los países con mayor incidencia de SM (Aguilar-Salinas y cols., 2004).

En cuanto a los factores individuales del SM, en la encuesta ENSANUT 2018 se reportó que el 37.3% de la población adulta (37.6% mujeres, 36.8 hombres) presenta hipercolesterolemia y la prevalencia actual de hipertensión arterial es de 18.4% (20.9% mujeres, 15.3% hombres). También se encontró un porcentaje de 10.3% (9.1% hombres, 11.4% mujeres) de personas adultas diagnosticadas con diabetes. La prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad en la población en edad escolar (5-11 años de edad) es de 35.6% (18.1% sobrepesos, 17.5% obesidad), mientras que en población adolescente (12-19 años) es de 38.4% (23.8% sobrepeso, 14.6% obesidad) y en adultos mayores de 20 años es de 75.2% (39.1% sobrepeso, 36.1% obesidad) (ENSANUT, 2018). De manera más específica, la prevalencia de obesidad abdominal en adultos mayores de 20 años es de 76.6% (65.4% de los hombres, 87.7% de las mujeres) (ENSANUT, 2016). Estos datos son importantes, ya que se sabe que la presencia de SM en niños y adolescentes está asociada al historial de obesidad de los padres (Monzani y cols., 2014). Si a nivel de salud pública y prevención, no se atienden de manera adecuada estos problemas, la incidencia de SM en toda la población seguirá incrementando en los próximos años.

Fisiopatología

Entre las diversas hipótesis que explican el mecanismo fisiopatológico del SM, la más aceptada es que tiene su origen en la resistencia a la insulina y el flujo de ácidos grasos libres (AGL) (McCracken, Monaghan, & Sreenivasan, 2018).

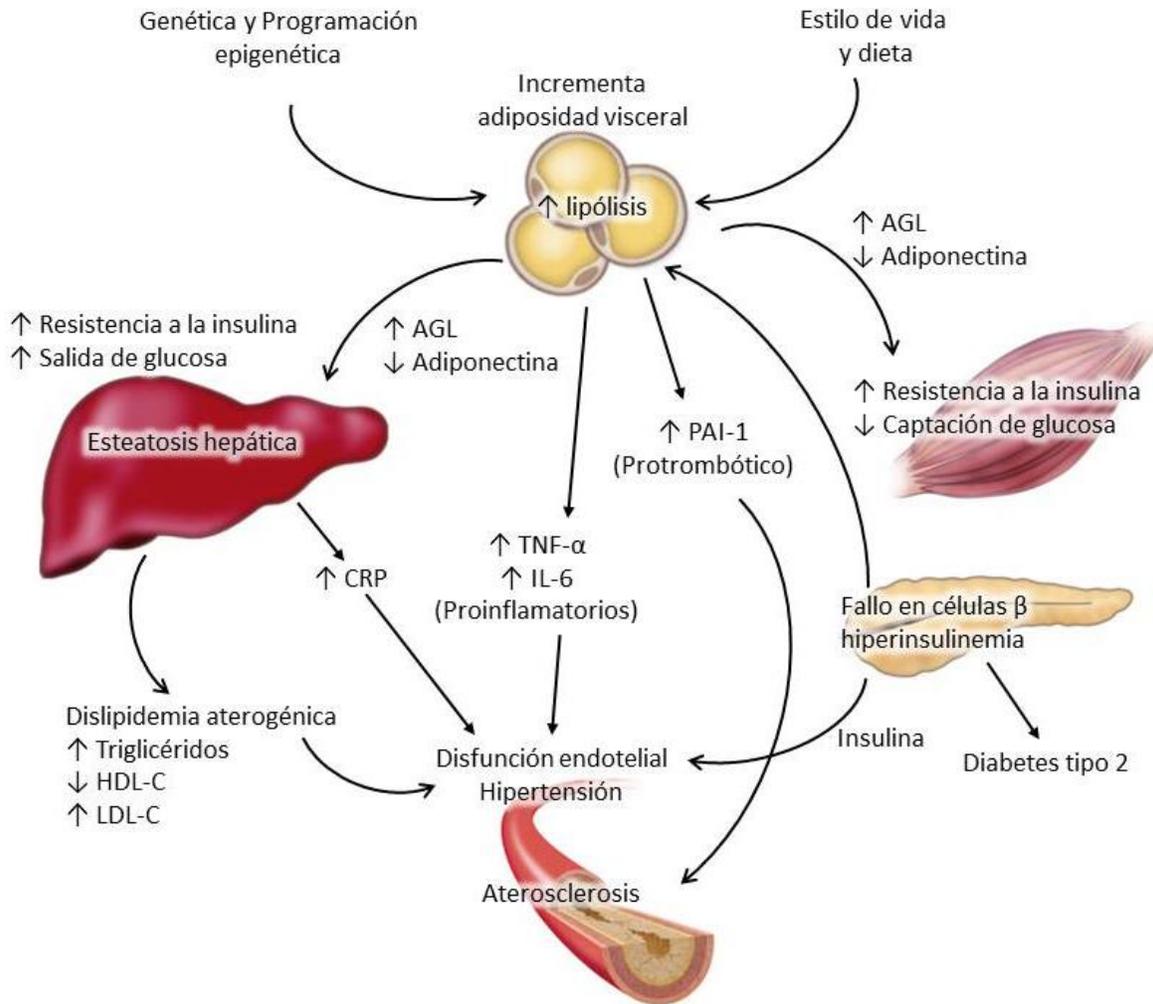


Figura 1. Mecanismo fisiopatológico del SM. (Martínez-Zamudio, 2020; modificado de SAMSON & GARBER, 2014).

A grandes rasgos, como se observa en la Figura 1, cuando hay un consumo excesivo de calorías y una vida sedentaria, el exceso de energía es almacenado en forma de grasa en el tejido adiposo y grasa visceral, lo cual se asocia a una mayor resistencia a la insulina, a una disminución en las partículas de HDL y un incremento en LDL y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). En individuos susceptibles, las células β -pancreáticas no tienen la capacidad de compensar esta resistencia a la insulina, dando como resultado una hipoinsulinemia relativa en diversos tejidos, la cual promueve el incremento de la actividad de la lipasa y una superabundancia de la lipólisis de triglicéridos (TG) en adipocitos, que resultan en un exceso en la liberación de AGL (Samson & Garber, 2014). Estos AGL son almacenados en el hígado, donde hay un aumento en la síntesis de TG y VLDL, lo que conduce a la salida de VLDL del hígado, una hipertrigliceridemia y al desarrollo de hígado graso (Nikolic y cols., 2013). Los TG de partículas de VLDL

son intercambiados por ésteres de colesterol de HDL-C, lo que resulta en el aclaramiento y rápida disminución de HDL-C. Por otra parte, el exceso de TG es transferido a LDL, los cuales son sustratos más atractivos para la lipasa hepática, resultando en partículas pequeñas de LDL. Las LDL son moléculas altamente aterogénicas, ya que tienen mayor capacidad de penetrar en la íntima de la pared arterial y son más susceptibles a la oxidación y a la unión selectiva a los receptores de los macrófagos. Clínicamente, la dislipidemia por obesidad se observa como una hipertrigliceridemia, con bajos niveles de HDL-C y un incremento en el radio LDL/LDL-C (Samson & Garber, 2014).

Por otra parte, el incremento del flujo de AGL a tejidos periféricos también inhibe la señalización de la insulina. Con resistencia a la insulina hepática y una abundancia de AGL, se incrementa la gluconeogénesis, lo que contribuye a la hiperglucemia, mientras que la resistencia a esta hormona en tejido muscular resulta en un incremento intramiocelular de lípidos y una disminución en la captación de glucosa. Con el tiempo, las células β -pancreáticas no secretan insulina en cantidad suficiente para compensar la resistencia, y como resultado se genera DT2 (Samson & Garber, 2014).

El tejido adiposo, además de almacén de ácidos grasos, funciona como un órgano endocrino. Entre las adipocinas que secreta, y que están asociadas al SM, encontramos a la leptina, resistina, proteína quimioatrayente de monocitos 1, proteína de unión a retinol 4, factor de activación de plasminógeno 1 y adiponectina. Además, se ha encontrado que en tejido adiposo visceral de individuos obesos, hay un reclutamiento de macrófagos y un incremento en citosinas como interleucina 6 (IL-6), factor de necrosis tumoral α (TNF- α), los cuales incrementan la inflamación y se ha visto que está asociado a un incremento en el riesgo a desarrollar hipertensión, aterosclerosis (Hardy, Czech, & Corvera, 2012) y ECV asociado a obesidad (McCracken y cols., 2018; Samson & Garber, 2014).

El desarrollo de hipertensión es multifactorial, aunque está mediado parcialmente por la disfunción endotelial causado por la generación de especies reactivas a oxígeno mediada por AGL. Por otra parte, la hiperinsulinemia induce el aumento de la reabsorción renal de sodio (Rochlani y cols., 2017), la activación del sistema nervioso simpático, la inhibición de la óxido nítrico sintasa y promueve los efectos de las citosinas derivadas del tejido adiposo. También se observa una hiperactividad en el sistema de la renina-angiotensina-aldosterona en la obesidad, lo cual altera la tensión arterial (Samson & Garber, 2014).

Etiología

Se sabe que el desarrollo del SM está influenciado por causas genéticas, ambientales y enfermedades preexistentes. Es posible que los genes que influyen en el desarrollo del prediabetes, sean los mismos que intervienen en el fenotipo de SM (Samson & Garber, 2014). Por ejemplo, se han descrito genes que incrementan el riesgo a desarrollar tanto SM como DT2, como son aquellos que alteran la función de las células- β pancreáticas (variantes de *CAPN10*, factor de transcripción 7-tipo 2 (*TCF7L2*)) (Kang y cols., 2006; Perez-Martinez y cols., 2012; Samson & Garber, 2014), genes asociados a un incremento en el IMC y mecanismos de señalización cerebral de saciedad (receptor de melancortina 4 (*MC4R*), gen asociado a masa grasa y obesidad (*FTO*), adiponectina (*ADIPOQ*) y el receptor de leptina (*LEPR*)) (Perez-Martinez y cols., 2012), y genes implicados en alteraciones de los niveles de triglicéridos (*MLX* interactin proteinlike, (*MLXIPL*)). Sin embargo, se cree que estos genes explican solo una pequeña parte de la susceptibilidad genética a desarrollar SM (Samson & Garber, 2014).

Estudios de la nutrición fetal en modelos animales, han encontrado factores epigenéticos en el desarrollo de SM, ya que el retraso en el crecimiento intrauterino puede dar como resultado una programación en la expresión de genes que se manifiestan en forma de SM (Lusis, Attie, & Reue, 2008); esto será explicado con mayor detalle más adelante.

Modelos de estudio del Síndrome Metabólico

Debido a la naturaleza multifactorial del SM, se necesita seleccionar un modelo experimental adecuado que mejor represente su fisiopatología en humanos. Los modelos animales más utilizados para su estudio son las ratas y ratones, a los cuales se les realiza ya sea una manipulación de la dieta, modificación genética o administración de fármacos (Wong y cols., 2016), siendo la dieta el principal inductor del SM utilizado.

La dieta tiene un papel importante en el crecimiento y desarrollo como fuente de nutrición, pero la composición de la dieta es la que determina el estatus nutricional. La alimentación moderna, especialmente en países occidentales, es rica en carbohidratos como fructosa y sacarosa, así como alta en grasas saturadas.

La fructosa, debido a sus propiedades lipogénicas, es un componente que permite fácilmente desarrollar SM en modelos animales. La sacarosa, o azúcar de mesa, es la fuente principal de fructosa en la dieta occidental, por lo tanto, se ha usado ampliamente para el estudio de las consecuencias de esta dieta. La alimentación con sacarosa ha mostrado resultados variables con respecto al desarrollo de obesidad (Wong y cols., 2016), pero en general, se ha encontrado que induce

lipogénesis en ratas, incrementa la concentración de insulina, glucosa, leptina, TG y AGL en plasma, así como alteraciones en la tolerancia a la glucosa. Se ha encontrado que ratas alimentadas con sacarosa presentan resistencia a la insulina, sin cambios en concentraciones de glucosa e insulina en plasma en ayuno, pero sí una mayor concentración de ambos de manera postprandial (Santuré y cols., 2002). También se ha observado que la alimentación con sacarosa incrementa la presión sistólica en ratas, además, genera un incremento en la masa ventricular sin fibrosis cardíaca y causa el desarrollo de esteatosis hepática (L. Brown & Panchal, 2011; W. Huang y cols., 2010; Wong y cols., 2016).

Una dieta alta en grasa, por otra parte, provoca intolerancia a la glucosa, dislipidemia y una hiperglucemia moderada en la mayoría de las cepas de ratas y ratones. En ratones, esta alimentación aumenta el peso corporal, incrementa la presión sistólica arterial e induce disfunción arterial. Se ha reportado ampliamente que una dieta alta en grasa en modelos animales permite el desarrollo de las complicaciones encontradas en el SM humano; como son fibrosis e hipertrofia cardíaca, necrosis del miocardio y esteatosis hepática (L. Brown & Panchal, 2011).

En diversos estudios se han usado combinaciones entre sacarosa y diferentes fuentes de grasa para inducir los signos y síntomas del SM (L. Brown & Panchal, 2011). En roedores alimentados con una dieta alta en sacarosa y lípidos se observa un incremento en el peso corporal y en los depósitos de grasa abdominal, hiperinsulinemia, hiperglucemia e hiperleptinemia. También se ha observado que causa esteatosis hepática e incrementa las enzimas lipogénicas hepáticas. Dadas estas evidencias, y a que es una dieta muy similar a la consumida por los humanos, se determina que una dieta alta en carbohidratos y lípidos es el mejor modelo para estudiar el SM (L. Brown & Panchal, 2011).

Ambiente intrauterino como origen del desarrollo de la salud y la enfermedad

Diversos estudios epidemiológicos y experimentales en animales, han encontrado que el ambiente en etapas tempranas del desarrollo influye en tanto en la salud, como en el riesgo de desarrollar procesos fisiopatológicos crónicos, como son las enfermedades no transmisibles (ENT), en las cuales hay una predisposición genética y fisiológica acoplada al ambiente intrauterino y al estilo de vida en la edad adulta. Dentro de las ENT se encuentran la diabetes, enfermedades cardiovasculares, enfermedades pulmonares crónicas y algunos tipos de cáncer (Hanson & Gluckman, 2014). A partir de estos estudios, Barker y colaboradores propusieron la hipótesis del Origen del desarrollo de la salud y la enfermedad (Developmental Origins of Health and Disease, DOHaD), en donde se postula que la exposición a ciertas influencias ambientales durante periodos críticos del

desarrollo y el crecimiento pueden tener consecuencias significativas en la salud del individuo a corto y largo plazo (Barker & Osmond, 1986).

Dentro de la hipótesis de DOHaD, existen tres principios que explican el mecanismo que conduce a enfermedades en los adultos.

1. Plasticidad, describe la maleabilidad natural de la fisiología y el cuerpo humano. Por ejemplo, cuando el feto está sometido a un flujo sanguíneo inadecuado a través de la placenta, las vías metabólicas del feto se ajustan para acoplarse a ese ambiente hostil.
2. Epigenética, modificaciones de los genes que no alteran la secuencia de DNA pero sí su expresión, y por lo tanto la transcripción de la proteína. Las modificaciones epigenéticas son el eje central del desarrollo de procesos a través de la gestación; son altamente modificables, ya que están influenciadas por factores ambientales internos y externos durante toda la vida.
3. Programación, relación entre las alteraciones en órganos, estructura de tejidos o vías funcionales en etapas tempranas del desarrollo, y los riesgos a padecer enfermedades en etapas adultas. Al parecer hay periodos específicos durante el desarrollo, en los cuales diferentes órganos y sistemas son más susceptibles a la programación de la enfermedad.

Un ejemplo en donde se observan los tres principios de DOHaD, es cuando un feto en la etapa de plasticidad del desarrollo es expuesto a un flujo sanguíneo placentario deficiente, esto lleva a cambios epigenéticos que alteran la producción de la insulina, y dichas modificaciones pueden ser permanentemente programadas e incrementar el riesgo individual de desarrollar diabetes en la etapa adulta (Thiele & Anderson, 2016). Otros ejemplos de factores que pueden alterar el desarrollo en etapas tempranas son la obesidad materna, diabetes gestacional, parto por cesárea, lactancia, sobrealimentación del infante, exposición a toxinas, contaminantes, humo de tabaco y estrés psicológico (Hanson & Gluckman, 2014; Marciniak y cols., 2017). Se debe tomar en cuenta que la mayoría de las ENT en los adultos tienen una naturaleza compleja y la programación confiere una predisposición para la enfermedad, pero sin ser una determinante absoluta.

Históricamente se ha estudiado el papel de la desnutrición sobre el desarrollo de enfermedades. En un estudio realizado por Barker en 1986, se encontró que personas nacidas en áreas de alta pobreza, con desnutrición, sobrepoblación e infecciones recurrentes, tenían un pobre desarrollo, y un mayor riesgo de muerte por enfermedades coronarias cardiacas en adultos (Barker & Osmond, 1986). Además se encontró que al tener un bajo peso al nacer, se incrementa la

prevalencia de hipertensión, enfermedad cardiaca coronaria, derrames y SM en el adulto.

De manera epidemiológica se han estudiado las consecuencias de eventos como guerras y hambrunas sobre el desarrollo. Por ejemplo, en estudios de la cohorte de hambruna del invierno de 1944-1945 en Alemania y Holanda, se encontró que los individuos que en este periodo estuvieron *in utero*, tuvieron bajo peso al nacer y una baja tolerancia a la glucosa en edad adulta (Ravelli y cols., 1998). En adultos nacidos durante o después de la guerra civil en Nigeria (1967-1970), se reportó un incremento en el riesgo a desarrollar hipertensión en aquellos afectados por hambruna materna o en etapas tempranas postnatales (Hult y cols., 2010). También se ha descrito que individuos que sufrieron *in utero* de la gran hambruna China de 1959-1961, tuvieron un mayor IMC en la edad adulta. Tanto en la cohorte holandesa como en la cohorte china, se han encontrado datos contradictorios respecto a la hipertensión en individuos expuestos a hambruna materna (Huang y cols., 2010; Yanping Li y cols., 2011), ya que hay inconsistencias sobre su efecto en diferentes etapas del embarazo y vida temprana. Además se debe considerar que los individuos no estuvieron únicamente sometidos a una desnutrición, sino también a posibles cambios importantes en su dieta y a una gran cantidad de estrés.

En diversos ensayos experimentales se ha demostrado que la nutrición desbalanceada *in utero* afecta a un amplio número de órganos y sistemas, como son la función y metabolismo del cerebro (Gallagher y cols., 2005), el apetito, el sistema nervioso simpático (Samuelsson y cols., 2010), el eje Hipotalámico-Hipofisario-Adrenal (Poore & Fowden, 2002), ritmos circadianos (Vickers y cols., 2003), riñón, páncreas, hígado, músculo esquelético, tejido adiposo pardo y tejido adiposo blanco, hueso, y alteraciones en cardiomiocitos (Hanson & Gluckman, 2014; Marciniak y cols., 2017; Houde y cols., 2013)

Dieta materna alta en nutrientes

Recientemente se ha encontrado que el concepto de DOHaD también funciona en un contexto donde hay un ambiente prenatal o neonatal excesivo en nutrientes. Se ha reportado extensamente que la obesidad materna y la diabetes gestacional están asociadas a macrosomía fetal, al incremento de adiposidad de las crías y al riesgo a desarrollar obesidad, hipertensión, diabetes y ECV en etapas adultas. Estos efectos en la descendencia están relacionados con la exposición a un ambiente hiperglicémico intrauterino (Hanson & Gluckman, 2014; Marciniak y cols., 2017). Este mecanismo se ha asemejado en estudios con roedores, donde en hembras alimentadas con una dieta rica en grasas durante el embarazo, se promueve la adiposidad, daños vasculares y metabólicos, así como signos de

hígado graso en las crías en etapa adulta (Keleher y cols., 2018; Gosh y cols. 2001; Slater-Jefferies y cols., 2010).

Una preocupación creciente es la transmisión del riesgo a desarrollar diabetes de generación en generación; ya que cada vez es mayor el número de mujeres que presentan DT2 durante sus años reproductivos, y se ha encontrado que los hijos de las madres con diabetes tienen una mayor tendencia a la obesidad y desarrollar esa misma enfermedad. Esta preocupación no sólo se limita a madres con DT2, ya que en estudios de metanálisis se demostró que los hijos de madres que padecieron diabetes gestacional tienen mayor riesgo de desarrollar obesidad, resistencia a la insulina y mayor presión arterial (Aceti y cols., 2012).

El transporte de nutrientes entre la madre y el feto ocurre exclusivamente mediante la placenta; y una restricción calórica, una dieta obesogénica o la exposición a ciertos fármacos, alteran la función placentaria mediante cambios en la expresión génica, cambios epigenéticos, endócrinos o metabólicos que modifican la función de transportadores de aminoácidos y glucosa, enzimas, hormonas y vascularización de la placenta (Marciniak y cols., 2017). Por ejemplo, se ha observado una alteración en la metilación del gen *ABCA1*, implicado en la homeostasis del colesterol, en placenta y sangre de cordón umbilical en mujeres con intolerancia a la glucosa durante el embarazo (Hanson & Gluckman, 2014).

Conejo como modelo de estudio

Diversos animales como roedores (Neitzke y cols., 2008), largomorfos (Menchetti, y cols., 2015), ovejas (Zhu y cols., 2010) o primates no humanos (Chavatte-Palmer y cols., 2016) han sido utilizados como modelo de estudio de los mecanismos que llevan a DOHaD. La elección del modelo animal es importante ya que dependerá de su similitud con la anatomía, fisiología y metabolismo del humano, así como el tiempo de gestación. El conejo ha sido utilizado anteriormente como modelo de aterosclerosis y desórdenes metabólicos, debido a que su metabolismo lipídico es similar al humano al presentar altos niveles de LDL plasmático, y ser altamente sensible a desarrollar tanto aterosclerosis como los componentes del SM mediante una dieta alta en sacarosa y lípidos (Arias-Mutis y cols., 2017; Fan & Watanabe, 2003; Lozano y cols., 2019; Waqar y cols., 2010). También ha servido para estudiar la programación metabólica fetal (Fischer y cols., 2012), además de desórdenes del metabolismo lipídico entre madre y feto, en donde se ha encontrado que al alimentar con una dieta obesogénica a las madres antes y durante la gestación induce a la obesidad en las crías (Napoli y cols., 2000; Palinski y cols., 2001; Picone y cols., 2011).

La placenta de conejos se desarrolla de manera discoidal hemocorial, al igual que la de humanos y roedores (Furukawa, Kuroda, & Sugiyama, 2014). Mientras que

los roedores tienen una placenta hemotricorial, los conejos tienen una estructura hemodiorial, es decir, con dos capas de células coriónicas entre la sangre materna y feto, por lo que es más similar a la estructura hemomonocorial, con una capa de células coriónicas, encontrada en los humanos en el último semestre de gestación. Por este motivo, el uso del conejo es preferente para el estudio de la transferencia de nutrientes entre la madre y el feto (Fischer y cols., 2012). Además, debido a su tiempo de vida largo a diferencia de los roedores, permite explorar las consecuencias de enfermedades crónicas (Lozano y cols., 2019).

Calpaínas

Las calpaínas (EC 3.4.22.17; Clan CA, family CO2) son grupo de proteasas de cisteínas no lisosomales intracelulares caracterizadas por poseer un dominio de proteasa de cisteína (CysPc) homólogo a μ -calpaína o m-calpaína humanas (Ono & Sorimachi, 2012), y se definen como proteasas citosólicas con actividad proteolítica dependiente de Ca^{2+} a un pH neutro. Los miembros de esta familia se encuentran en casi todas las células eucariotas y en algunas bacterias. En humanos hay 15 genes que codifican para las calpaínas, denominados *CAPNn* (n=1-3, y 5-16), cada uno de los cuales genera uno o más transcritos e isoformas a nivel de proteína (CAPNn), constituyendo así una superfamilia de más de 50 especies moleculares (Ono, Saido, & Sorimachi, 2016). Además, el sistema proteolítico de las calpaínas incluye dos genes para las subunidades reguladoras (CAPNS1 y CAPNS2), y un gen para la calpastatina (CAST), que es el inhibidor endógeno de las calpaínas convencionales (Ono & Sorimachi, 2012).

Las calpaínas se clasifican de acuerdo a la presencia o ausencia de ciertos dominios proteicos. Se clasifican en convencionales, clásicas, no clásicas, ubicuas y o tejido específico.

Calpaínas convencionales

Las calpaínas convencionales han sido las más estudiadas y con mayor expresión ubicua en mamíferos. En este subgrupo se encuentran la μ -calpaína y m-calpaína, las cuales son heterodímeros que consisten en una subunidad menor regulatoria (CAPNS1/30K, de 30 kDa) y una subunidad mayor (CAPN1 o CAPN2 de 80 kDa). Estas dos calpaínas comparten un 60% de identidad de aminoácidos, tienen sustratos y sitios inhibitorios en común, y ambas son expresadas ubicuamente. Sin embargo, difieren ampliamente en su requerimiento de Ca^{2+} *in vitro* para su actividad proteolítica (μM contra mM respectivamente) y en los mecanismos de activación inter-dominios, los cuales son altamente especializados para cada molécula (Maki y cols., 1987).

Las subunidades catalíticas de CAPN1 y CAPN2 están formadas por los siguientes dominios:

- El dominio N-terminal de α -hélice o dominio I. Este dominio es autolisado cuando es activado por Ca^{2+} , resultando en su habilidad para funcionar a menores concentraciones de Ca^{2+} , con diferente especificidad de sustrato; este es uno de los mecanismos regulatorios de la actividad de calpaínas.
- El dominio catalítico CysPc o dominio II. Está constituido por los dominios PC1 y PC2 (protease core 1 y 2). Estos dos dominios, al estar separados uno del otro, mantienen a los residuos de aminoácidos de la triada catalítica (Cys115 en PC1, y His272 y Asn296 en PC2 de CAPN1) en un estado no funcional hasta que la unión de Ca^{2+} a los motivos de unión de Ca^{2+} permiten la rotación del subdominio PC2, generando la formación de un dominio CysPc único y funcional (Ono & Sorimachi, 2012).
- La región β -sándwich del tipo de calpaína (calpain-type β -sandwich, CBSW) o dominio III. Compuesto por ocho láminas β antiparalelas.
- El dominio penta-mano EF o dominio IV (penta-EF-hand of the large catalytic subunit, PEF(L)).

La subunidad reguladora CAPNS1 está conformada por:

- Un dominio penta-mano EF o dominio IV (penta-EF-hand of the small regulatory subunit, PEF(S)).
- Un grupo rico en residuos de glicina o dominio V (Gly-rich, GR).

(Ono y cols., 2016; Ono & Sorimachi, 2012)

Calpaínas clásicas y no clásicas

Las calpaínas clásicas son aquellas que, además del dominio CysPc, presentan los dominios CBSW y PEF. Este grupo está integrado por las CAPN1/ μ CL, CAPN2/mCL, CAPN3/p94, CAPN8/nCL-2, CAPN9/nCL-4, y CAPN11–14. Por otra parte, las calpaínas no clásicas son aquellas que no tienen ni el dominio CBSW ni el dominio PEF, es decir las calpaínas CAPN5/hTRA3, CAPN6/CANPX, CAPN7/PaIBH, CAPN10, CAPN15/SOLH, CAPN16/demi-calpain.

Estructura y función de la calpastatina

La calpastatina (CAST) es el único inhibidor endógeno de las calpaínas convencionales, es altamente específica y no inhibe otras enzimas. Cada molécula de CAST tiene una unidad inhibitoria que se repite cuatro veces, y cada unidad inhibe una molécula de calpaína (Ono & Sorimachi, 2012). La secuencia primaria de CAST es menos conservada entre especies que las calpaínas. De acuerdo a ensayos *in silico* de alineación de las secuencias proteicas, la CAPN1 de rata y conejo tienen 89% y 88% de similitud con la humana, respectivamente; mientras que para CAST solo tienen 66% y 75% de similitud (Sorimachi & Ono, 2012).

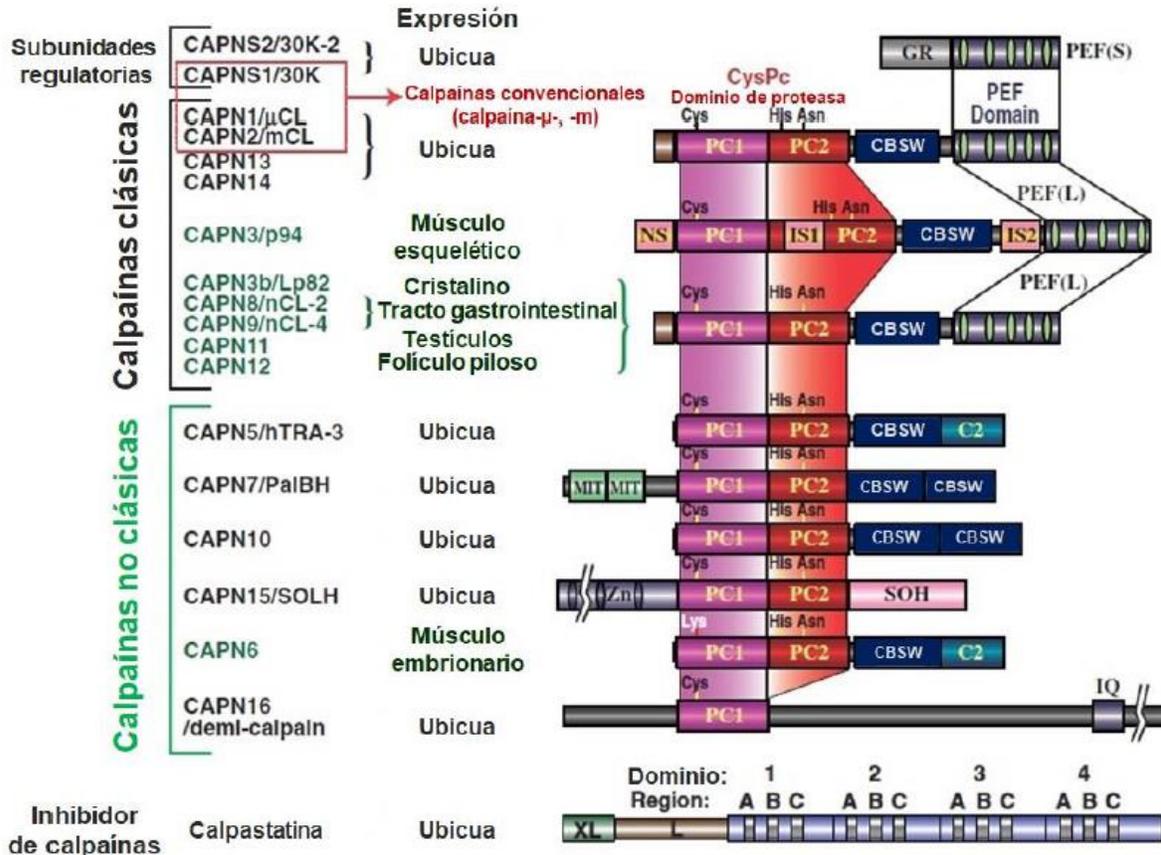


Figura 2. Miembros de la familia de las calpaínas clasificadas por su expresión y estructura. Modificada de (Ono & Sorimachi, 2012)

Función de las calpaínas

A la fecha, se desconoce la manera en que las calpaínas reconocen a sus sustratos (Shinkai-Ouchi y cols., 2016) ya que aunque cortan en los mismos sitios de una proteína, no seleccionan estos sitios de forma secuencia-dependiente de la proteína blanco (Ono & Sorimachi, 2012). Se ha demostrado, en estudios a gran escala, que esta especificidad por el sitio de corte está dada por la distancia del extremo N-terminal con el sitio de corte, así como la estructura secundaria y terciaria de sustrato (Shinkai-Ouchi y cols., 2016). Algunos de los sustratos conocidos de las calpaínas son: proteínas asociadas al citoesqueleto y la membrana (MAP1, MAP2, αII-espectrina, β-espectrina, talina y vimetina), enzimas (PKC, PARP y p35), transductores de señales (STAT5, STAT3) y factores de transcripción (C-Fos; C-un; NF-κB, e IκB) (Łopatniuk & Witkowski, 2011).

Las calpaínas proteolisan a sus sustratos en un número limitado de sitios, que permiten transformar o modular su estructura y actividad (Ono y cols., 2004, 2010). Por lo tanto se considera que las calpaínas tienen un papel en regulación más que en degradación. Además, a diferencia del sistema de ubiquitina y

autofagia, que requieren de diversos pasos mediados por muchas proteínas, la función de la calpaína reside únicamente en una o dos moléculas.

A través de la proteólisis parcial de sus sustratos, las calpaínas regulan diversos procesos fisiológicos como la remodelación del citoesqueleto, movilidad celular, desarrollo embrionario, transducción de señales, apoptosis, ciclo celular, potenciación a largo plazo de la transmisión sináptica y la expresión génica (Donkor, 2015). La importancia fisiológica de las calpaínas se refleja en la variedad de los defectos causados por la alteración en la función de las calpaínas en diversos tejidos y organismos.

Calpaínas involucradas en patologías

Existen enfermedades en las que la actividad de las calpaínas puede causar o exacerbar dichas patologías, tales son los desórdenes neurodegenerativos como enfermedad de Parkinson y Alzheimer, accidente cerebrovascular, hipertensión, aterosclerosis, desórdenes cardiovasculares, isquemia (por sobre activación de CAPN1 y CAPN2), cáncer, cataratas (por sobre activación de CAPN1, CAPN2 e isoformas de CAPN3), úlcera gástrica (por disminución en la actividad de CAPN8 y CAPN9), y DT2 (por desregulación de CAPN1, CAPN2 y CAPN10) (Ono y cols., 2016; Pánico y cols., 2019; Zatz & Starling, 2005).

Por otra parte, las calpainopatías son enfermedades causadas por un defecto en los genes de las calpaínas que originan la pérdida o ganancia de la función. Entre los ejemplos de calpainopatías se encuentran la distrofia muscular de la cintura y extremidades (mutaciones en CAPN3) y vitreoretinopatía inflamatoria autosómica dominante (mutaciones en CAPN5) (Ono y cols., 2016).

Alteraciones metabólicas asociadas a calpaínas

En el año 2000 se identificaron algunos polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) intrónicos en el gen *CAPN10* en población México-americana: SNP-43 (G>A), -63 (C>T) y la inserción/delección de 32 pb, (InDel-19) (; los cuales conforman un haplotipo de riesgo que aumenta hasta 2.9 veces la probabilidad de desarrollar DT2 (Flores-Martínez y cols., s/f; Horikawa y cols., 2000; Senemar, Edraki, & Toosi, 2016). Si bien, en estudios individuales se han mostrado ciertas controversias para replicar dicha asociación en otras poblaciones, se han realizado metanálisis que encuentran una fuerte asociación del SNP-43 y SPN-44 con un incremento en el riesgo de padecer DT2 de un 19% y 17% respectivamente (Pánico y cols., 2014). Hasta el día de hoy no hay una explicación molecular de por qué estos SNP causan dicha susceptibilidad, se ha reportado que en individuos homocigotos G/G en UCSPN-43 hay una menor expresión de *CAPN10* a nivel de mRNA en músculo esquelético (Pánico y cols., 2014).

Debido a que de estos polimorfismos en el gen *CAPN10* fueron las primeras variantes génicas, identificadas mediante estudios de asociación de genoma completo (GWAS) (Horikawa y cols., 2000), asociadas a un mayor riesgo de desarrollar DT2, se han realizado diversos estudios enfocados en determinar el papel que tiene el sistema de las calpaínas en la homeostasis de la glucosa (Horikawa y cols., 2000; Turner, Cassell, & Hitman, 2005). Sato y colaboradores encontraron que en ratas Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF), un modelo animal que desarrolla espontáneamente un fenotipo similar a la DT2 en la semana 18, la expresión de *CAPN10* en hígado, tejido adiposo y leucocitos está disminuida aún antes de que los animales desarrollen la enfermedad (SATO, 2003). Esto sugiere, que la desregulación de *CAPN10* podría reflejar alteraciones en los órganos involucrados en la homeostasis del cuerpo, y que podría funcionar como marcador del desarrollo de DT2 (Covington & Schnellmann, 2012; Sato y cols., 2003).

A nivel molecular y celular, se ha descrito que una estimulación aguda (60 minutos) o crónica (3.5 a 10.5 días) con elevadas concentraciones de glucosa (15 o 28 mM) induce un aumento en la abundancia a nivel de proteína de las isoformas de 54 y 64 kDa de *CAPN10* en la línea celular de insulinoma INS-1. Además, se ha descrito que la isoforma de 54 kDa de *CAPN10* interactúa con los gránulos secretores de insulina, donde escinde la proteína SNAP-25, favoreciendo la secreción de insulina inducida por un coctel de secretagogos (Marshall y cols., 2005; Turner y cols., 2007).

También se ha involucrado a *CAPN10* con el transporte de la glucosa en adipocitos y células de músculo esquelético. El knockdown de *CAPN10* en adipocitos 3T3-L1 disminuye la captación de glucosa estimulada por insulina, en parte por alteraciones en la reorganización de los filamentos de actina y una menor translocación del transportador de glucosa GLUT4, a la membrana plasmática (Paul y cols., 2003). Mientras que el knockdown de *CAPN10* en miotubos humanos, reduce la captación de glucosa estimulada por insulina sin alterar la fosforilación de la proteína cinasa B (Akt) ni los niveles de expresión de GLUT1 o GLUT4 (Brown, Yeaman, & Walker, 2007). Sin embargo, los mecanismos precisos que son regulados por esta proteasa, así como sus blancos moleculares no se han definido.

Se ha observado que la concentración de glucosa extracelular, y la DT2 tienen diversos efectos en la actividad de calpaínas. En estudios en linfocitos de donadores con DT2 y donadores sanos se encontró que las células de individuos con DT2 captan menos glucosa (Piątkiewicz, Czech, & Tatoń, 2007). Además, en nuestro grupo de trabajo, se ha determinado que las calpaínas de los linfocitos de donadores control incrementan su actividad en respuesta a altas concentraciones

de glucosa (15.6 mM), mientras que en los linfocitos de donadores con DT2, la actividad de estas proteasas no incrementa en respuesta a la glucosa extracelular (Díaz-Villaseñor y cols., 2008).

También se ha reportado que las calpaínas pueden tener un papel importante sobre la actividad de la insulina. CAPN1 está involucrada en la síntesis y secreción de insulina en células β -pancreáticas; ya que escinde a ICA512-TMF, un miembro de la familia de receptores de tirosina, generando un fragmento (ICA512-CCF) que promueve el recambio de los gránulos secretores de insulina, así como la transcripción de genes involucrados en la formación de éstos (Ort y cols., 2001; Trajkovski y cols., 2004, 2008). Por otra parte, en células HepG2 se encontró que altas concentraciones de glucosa incrementan la secreción de exosomas con CAPN2, la cual corta el dominio extracelular del receptor de insulina, afectando directamente al señalamiento intracelular de insulina (Yuasa et al y cols., 2016).

Al sobre-expresar CAST en el músculo esquelético de ratones transgénicos se observa una disminución en los niveles de Akt, importante en la translocación de las vesículas de GLUT4 a la membrana celular inducida por insulina (Spencer & Mellgren, 2002). Este mismo estudio reveló que la CAPN2 es capaz de cortar a GLUT4 en su región C-terminal *in vitro*, lo que sugiere que las calpaínas son capaces de modular la estabilidad de los transportadores de glucosa (Branca, 2004; Mackenzie & Elliott, 2014; Otani y cols., 2004). Por otra parte, en adipocitos se encontró que la sobre-expresión de CAST promueve la diferenciación de pre-adipocitos mesenquimatosos de ratón (ST-13), y disminuye la captación de glucosa estimulada por insulina (Yajima y cols., 2006). Esto demuestra que las calpaínas convencionales, CAPN1 y CAPN2, regulan la homeostasis de la glucosa en diversos tejidos.

Mushtaq y colaboradores (2015) encontraron un incremento en la abundancia proteica de CAPN1 y especies reactivas de oxígeno en suero de pacientes con DT2 que sufrieron infarto al miocardio. Asimismo, se ha encontrado un aumento en la actividad de las calpaínas en cardiomiocitos estimulados con altas concentraciones de glucosa y en corazones hiperglicémicos *in vivo*, siendo que la CAPN1 puede inducir la apoptosis a través de la regulación negativa de la actividad de Na⁺/K⁺/ATPasa (Y. Li, Li, Feng, Arnold, & Peng, 2009). En ratas con diabetes inducida por estreptozocina, donde hay una hipertrofia cardíaca, se presenta un incremento en la actividad de las calpaínas y en la expresión proteica de CAPN1, posiblemente inducida por estrés oxidativo e inflamación mediada por NF- κ B (Han y cols., 2019). Por lo tanto, se ha sugerido que la actividad de las calpaínas puede ser importante para el desarrollo de cardiomiopatías diabéticas.

El incremento de CAPN1 se ha visto relacionado con alteraciones vasculares asociadas a la acumulación de placa dentro de las arterias. En ratones diabéticos se encontró un incremento en la expresión de CAPN1 en arterias mesentéricas, que puede iniciar la disfunción endotelial al disminuir la conversión de PGH2 a PGI2 al inactivar a la PG2 sintasa (Randriamboavonjy y cols., 2017). PGI2 es miembro de las prostaglandinas que inhibe la activación plaquetaria y leucocitaria, además de ser un potente vasodilatador, por lo tanto, una disminución de su producción promueve el desarrollo de la enfermedad de la arteria coronaria, hipertensión, falla cardíaca y diabetes (Van Huyen y cols., 2010). También se ha encontrado un incremento en la actividad de las calpaínas y un aumento en la expresión de CAPN1 en aorta de ratas alimentadas con una dieta alta en colesterol. Además, en el mismo estudio se encontró que al inactivar a las calpaínas, se inhibe el desarrollo de aterosclerosis (L. Yu y cols., 2018) al evitar la degradación de ABCA1 por las calpaínas, dando como resultado un incremento en la biogénesis de HDL (Yokoyama y cols., 2012).

Se ha encontrado que el sistema de calpaínas podría estar involucrado en la función de la autofagia, que se trata de un proceso de degradación intracelular, el cual es considerado una respuesta adaptativa al estrés o al daño celular. En obesidad hay una disminución de la capacidad autofágica hepática, y esto resulta en resistencia a la insulina (Yang y cols., 2010). Además, se ha reportado que Atg7 y Atg3, proteínas involucradas en el mecanismo de autofagia, son blancos del sistema de calpaínas (Zhao y cols., 2016). En el hígado de ratones obesos se ha encontrado una disminución de Atg7, acompañado de un incremento de la expresión de CAPN2 y de hepatocitos con esteatosis (Yang y cols., 2010; Zhao y cols., 2016), fenómeno que se vio restaurado utilizando inhibidores de las calpaínas. Esto demuestra que las calpaínas podrían tener un papel importante en mecanismos asociados a resistencia a la insulina y obesidad.

JUSTIFICACIÓN

La prevalencia del síndrome metabólico en México y en el mundo ha incrementado considerablemente en los últimos años, y se sabe que la exposición a dietas desequilibradas es de las principales causas de estas alteraciones. Por otra parte, el ambiente intrauterino es de gran importancia para el desarrollo de la salud y de procesos patológicos a corto y largo plazo. La exposición a una dieta materna excesiva en nutrientes puede tener consecuencias significativas en la salud del individuo, como es el desarrollo de SM. Aunque se conocen ampliamente los efectos de una dieta hiperglucemiante e hiperlipídica en la incidencia del SM y DT2, y sus consecuencias en el embarazo y en la descendencia; poco se ha estudiado sobre los efectos de ésta en la funcionalidad de proteínas implicadas en el desarrollo de DT2, como son las calpaínas. Por lo tanto, este trabajo pretende establecer si las calpaínas de individuos adultos responden a estímulos ocasionados por una dieta alta en lípidos y carbohidratos *in útero*, usando un modelo de conejo.

HIPÓTESIS

La exposición *in utero* a una dieta alta en lípidos y carbohidratos induce una desregulación en la expresión y funcionalidad de las calpaínas que participan en la regulación de la glucosa (CAPN1, CAPN2 y CAPN10), efecto que se detona si hay una exposición en la etapa adulta a la misma dieta.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar si la actividad y expresión de las calpaínas involucradas en la regulación de la glucosa es alterada por la exposición, *in utero* y en la etapa adulta, a una dieta alta en lípidos y carbohidratos en un modelo de conejo.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar si la exposición a una dieta alta en carbohidratos y lípidos en la adolescencia y embarazo, o *in utero*, afecta la actividad de las calpaínas en presencia de 5.6, 11.1 y 15.6 mM de glucosa extracelular, en linfocitos de conejo.
2. Evaluar la abundancia de CAPN1, CAPN2, CAPN10 y CAST en tejido hepático y muscular de las crías provenientes de madres alimentadas con una dieta alta en carbohidratos y lípidos, después de un reto metabólico con la misma dieta.
3. Correlacionar la abundancia de las calpaínas en tejido hepático y muscular con los parámetros bioquímicos evaluados en la sangre de las crías.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos fueron realizados de acuerdo a la Guía de cuidado y uso de animales del laboratorio del National Institutes of Health (NIH Pub. No. 86-23, 1996) y la guía del tratamiento de animales en la investigación del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). El protocolo fue revisado y aprobado por el Comité de uso y cuidado animal del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, previo a la realización de este estudio (ID:198).

Mantenimiento de los conejos

En este estudio se utilizó la cepa Chinchilla del conejo doméstico (*Oryctolagus cuniculus*) criados y mantenidos en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Se resguardaron a 25 conejas hembras vírgenes en jaulas de acero inoxidable individuales (120x60x45 cm), y se mantuvieron en un ciclo de luz y oscuridad de 16/8 horas respectivamente (las luces fueron encendidas a las 09:00 hrs). La temperatura ambiente fue regulada a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ con una humedad relativa entre el 40 y 60%. Durante toda la experimentación, el alimento y agua se administraron *ad libitum*.

Dieta

Al cumplir 10 semanas de edad, las conejas fueron alimentadas con la dieta de conejo estándar (Conejo Ganador, Malta Cleyton, México; CON, n=8), o una dieta rica en grasa y carbohidratos (SN, n=12). Dicha dieta consistió en una suplementación del alimento estándar con 0.1% de colesterol (Sigma, USA), 4% de aceite de soya (Sigma, USA) y 15% de azúcar refinada (Great Value); de tal manera que la dieta SN se caracterizó por ser alta en grasas (4.5% kcal) e hidratos de carbono (2.59% kcal) y baja en proteínas (-7,1% kcal) respecto al porcentaje de kcal de dichos macronutrientes presentes en la dieta CON. La composición de cada una de las dietas se presenta en la **Tabla 1**.

Al lote de las conejas alimentadas con dieta SN, se les administró dicha dieta por 8 semanas consecutivas y posteriormente, para evitar abortos espontáneos, dos semanas previas a la cruce, recibieron 6 días de alimentación CON seguida por un día de dieta SN. En la semana 20 de edad, las conejas de ambos grupos fueron cruzadas con machos de 24 semanas de edad de la misma cepa, alimentados con la dieta CON. Debido a que el consumo crónico de la dieta SN afecta la fertilidad y el mantenimiento de la gestación en las hembras, se les administró 30 UI de gonadotropina coriónica humana (Chorulon, Intervet, México) vía intravenosa 3 minutos previo al apareo; mientras que al grupo con dieta CON se le administró agua destilada. Durante el periodo de gestación, se mantuvo con la dieta CON al grupo control, mientras que el grupo sobrenutrido tuvo acceso a la dieta SN cada tercer día; de tal manera que mantuvieran los valores hiperglucémicos e

hiperlipidémicos registrados previo a la cruce. A pesar de que el consumo de la dieta SN no modificó el peso corporal, la presión arterial ni la ingesta calórica semanal de las hembras sobrenutridas, sí generó dislipidemia en las hembras sobrenutridas, así como un incremento en el peso del hígado y el corazón y alteraciones en la concentración de glucosa en sangre (Viveros-Moreno,2015).

Tabla 1. Composición nutrimental de la dieta (Modificado de Viveros-Moreno, 2015).

COMPONENTE	DIETA CONTROL			DIETA SOBRENUTRIDA		
Materia seca	94.39%			87.20%		
Humedad	5.61%			12.80%		
	g (%)	Kcal	% Kcal	g (%)	Kcal	% Kcal
Proteína cruda	15.73	62.92	21.78	11.22	44.88	14.68
Lípidos	3.83	34.47	11.93	5.58	50.22	16.43
Minerales totales (Cenizas)	11.56			7.58		
Fibra cruda	15.39			10.21		
Hidratos de carbono digeribles (Extracto libre de nitrógeno)	47.87	191.48	66.28	52.61	210.44	68.87
Energía metabolizable	2542.57 Kcal/kg			2609.15 Kcal/kg		
Composición química de las dietas por 100 g de alimento, base húmeda. La energía obtenida de proteínas, lípidos e hidratos de carbono fueron calculados a partir de los derivados del análisis químico proximal.						

A partir de 15 camadas se obtuvieron 51 conejos crías, sin diferencias significativas en el número de crías por camada de acuerdo a la dieta de la madre. Fueron pesados, marcados y divididos en dos grupos de acuerdo a la dieta que llevaron las madres: aquellos nacidos de madres alimentadas con dieta CON, o de madres alimentadas con la dieta SN. Las crías fueron mantenidas en cajas aisladas con un ciclo de luz y oscuridad 12/12 (se encendió la luz a las 12 hrs), se mantuvieron a temperatura ambiente y humedad de 40 a 60%, y durante los primeros 31 días de vida fueron alimentadas por 10 minutos al día por conejas nodrizas que eran alimentadas con la dieta CON. Del día 32 al 36 después del nacimiento, o etapa de destete, las crías fueron alimentadas gradualmente con dieta CON. A partir del día 37 y hasta la semana 62 de edad, los conejos fueron alimentados únicamente con la dieta CON. En la semana 62 de edad, los conejos fueron sometidos a un reto metabólico con la dieta SN por un mes. De tal manera, que se obtuvieron cuatro grupos como se observa en la **Figura 4**. Pasado este tiempo, se eutanasiaron los conejos por decapitación, y se tomaron muestras de sangre, del lóbulo izquierdo del hígado y del músculo gastrocnemo.

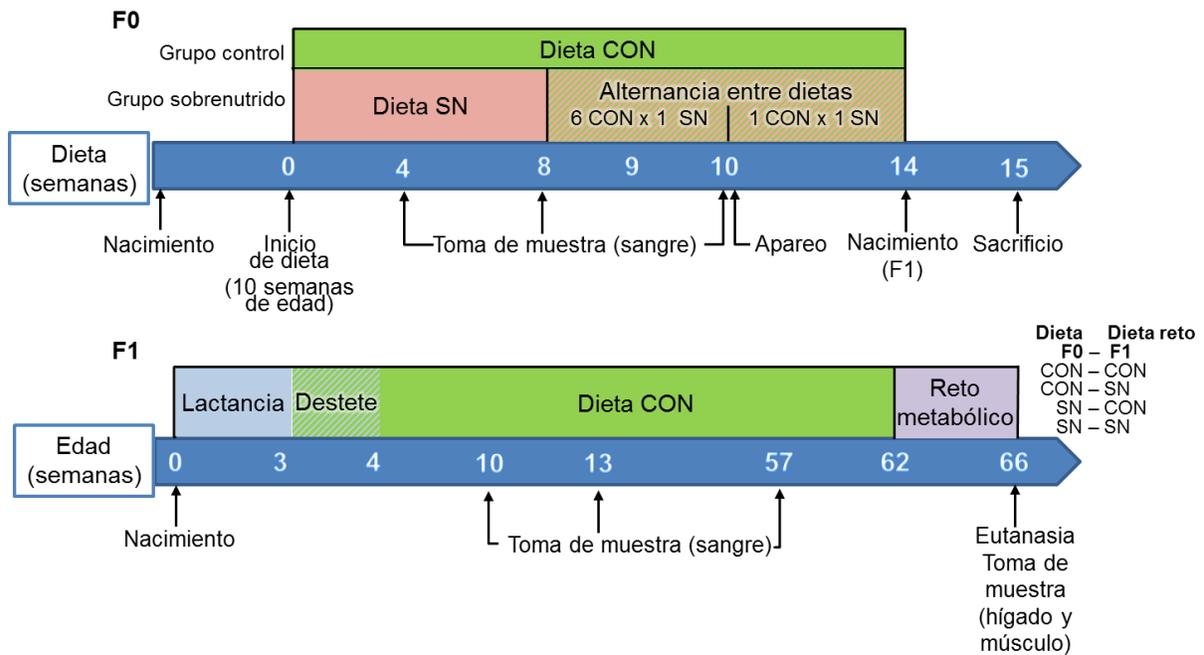


Figura 3. Diseño experimental. Líneas del tiempo que representan el tiempo en que los conejos madres (F0) o crías (F1) fueron alimentados a la dieta SN o CON. Las líneas negras inferiores representan los eventos importantes en el diseño experimental.

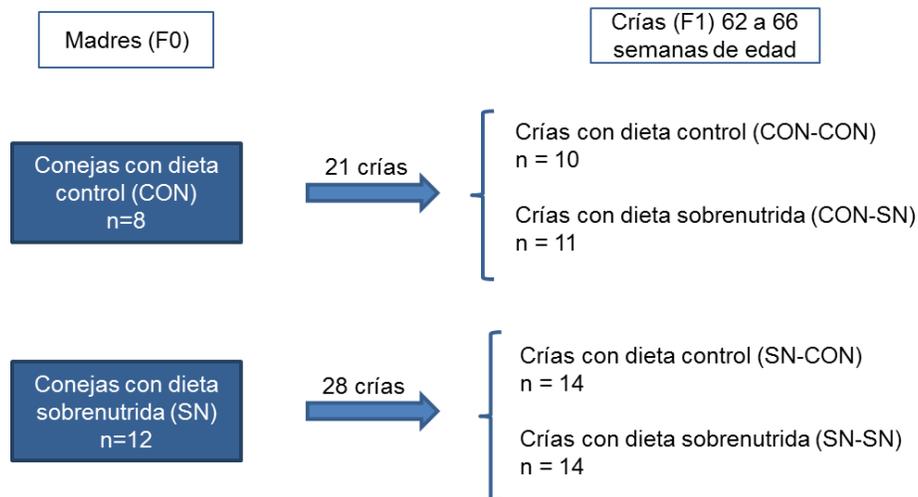


Figura 4. Reto metabólico en crías. De 8 conejas alimentadas con la dieta CON antes y durante el embarazo, se obtuvieron 21 crías, de las cuales, 11 fueron alimentadas con la dieta SN de la semana 62 a 66 de edad. De 12 conejas alimentadas con la dieta SN antes y durante el embarazo, se obtuvieron 28 crías, de las cuales, 14 fueron alimentadas con la dieta SN de la semana 62 a 66 de edad.

Procedimiento de toma de muestra

Se tomaron muestra de sangre de la oreja de las conejas hembras con ayuno de 12 horas, en las semanas 4, 8 y 10 del inicio de la dieta; y en los conejos crías en

las semanas 10, 13, 57 y 66 de edad. La sangre fue almacenada en tubos de 1.5 mL con 25 μ L de heparina para su inmediato uso para el ensayo de actividad de calpaínas.

Actividad de calpaínas por citometría de flujo

Para la realización de este ensayo, todos los reactivos se mantuvieron a 37°C y cubiertos de la luz. Para cada reacción, se tomaron 25 μ L de sangre y se adicionaron 75 μ L de amortiguador de Krebs Ringer Hepes (KRH) con sustrato fluorogénico CMAC, t-BOC-Leu-Met (10 μ M, Molecular Probes) al 0.5%, con diferentes concentraciones de glucosa (5.6, 11.1 y 15.6 mM). Como control negativo se utilizó una solución de KRH con 5.6 mM de glucosa sin sustrato fluorogénico. Se mezclaron los tubos delicadamente y se incubaron por 12 minutos a 37°C. Posteriormente se adicionaron 400 μ L de Phosflow 1x. Se incubaron por 30 minutos a 37°C en agitación mínima y se centrifugaron a 4000 rpm por 5 minutos a 4°C. Se recuperó el paquete celular, al cual se le adicionaron 300 μ L de paraformaldehído al 4% en solución amortiguadora de fosfato salino (PBS) y se evaluaron 10,000 linfocitos por muestra en el canal VL1 del Citómetro Attune Azul-Violeta (Applied Biosystems). Se realizaron duplicados técnicos.

Se utilizó el software FlowJo V10.5.0 (FlowJo) para seleccionar la población linfocitaria con ayuda de un gráfico de tamaño contra granularidad (FSC vs SSC), y se midió de la mediana de la intensidad de la fluorescencia (MIF), causada por la degradación del sustrato.

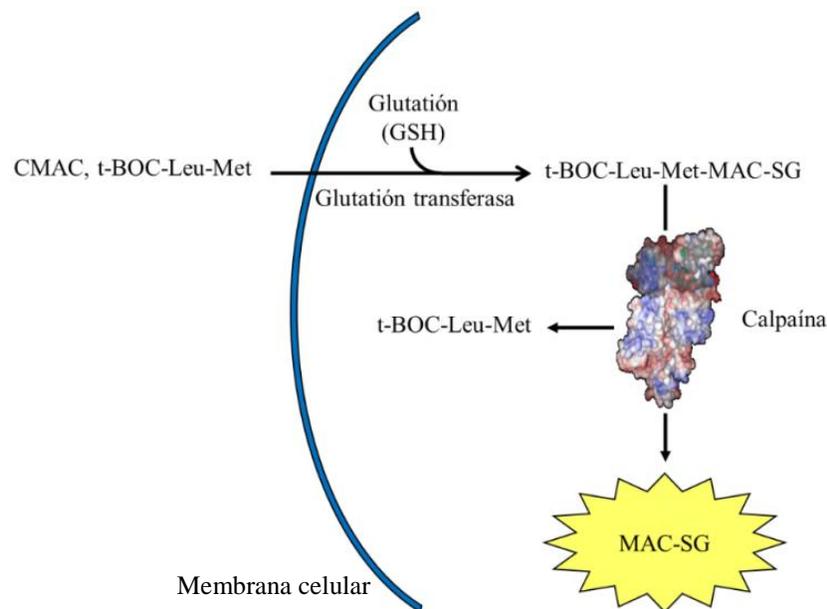


Figura 5. Fundamento de la hidrólisis del sustrato fluorogénico CMAC, t-BOC-Leu-Met para medir actividad de calpaínas. El sustrato fluorogénico CMAC, t-BOC-Leu-Met es permeable y en el interior de la célula se conjuga con glutatión (GSH) para formar un compuesto que se hidroliza

por acción de las calpaínas, generando el complejo CMAC-GS, capaz de emitir fluorescencia. Modificada de: (Rosser, Powers, & Gores, 1993).

Extracción y cuantificación de proteínas de muestras de hígado y músculo de crías posterior al reto metabólico

Las muestras fueron lisadas con amortiguador RIPA en presencia de inhibidores de proteasas y fosfatasa y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 5 mM (Thermo Fisher Scientific). Con ayuda de un sonicador el tejido fue disgregado a 4°C. El lisado fue centrifugado a 14 000 rpm por 18 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante, al cual se le determinó la proteína total por el método Lowry (DC Protein Assay, Bio-Rad) utilizando albúmina sérica bovina (Bio-Rad) como estándar de concentración.

Determinación de la abundancia proteica por Western Blot

La proteína extraída de la muestra de hígado o músculo correspondiente se aforó con el amortiguador de carga (Tris 0.5 M pH 6.8, glicerol 10.5%, dodecilsulfato sódico (SDS) 10%, azul de bromofenol 0.05%) y, para la inmunodetección de CAPN1, CAPN2, CAPN10, se adicionó β -mercaptoetanol al 5% y se desnaturalizaron a 85°C por 5 minutos.

Para detectar CAPN1 y CAPN10 se corrieron 20 μ g de proteína por carril en geles de SDS-poliacrilamida al 12%. Para CAPN2 se corrieron 40 μ g en geles al 12% y para calpastatina se corrieron 15 μ g de proteína en geles al 10%. Posteriormente las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa en una cámara semi-húmeda (BioRad) a 15 Volts durante 50 minutos. Posterior a la transferencia, los geles fueron teñidos con Azul de Coomassie al 0.1% (#1610436, BioRad). Las membranas se bloquearon con leche baja en grasa (Santa Cruz Biotechnology) al 4% en TBS + 0.1% de Tween-20 durante una hora en agitación constante. Posteriormente se incubaron a 4°C toda la noche con los anticuerpos primarios correspondientes: anti-calpaína 1 de ratón (ab3589, Abcam, FD 1:1000); anti-calpaína 2 de ratón (C268, Sigma-Aldrich, FD 1:500), anti-capaina 10 de conejo (ab28226, Abcam, FD 1:1000), anti-calpastatina de conejo (ab28252, Abcam, FD 1:10,000) en leche baja en grasa al 4% en TBS-Tween. Al día siguiente las membranas se lavaron tres veces con TBS-Tween y se incubaron por una hora a temperatura ambiente y en agitación constante con los anticuerpos secundarios conjugados con la peroxidasa de rábano picante: anti-ratón de cabra (sc-2005, Santa Cruz Biotechnology; FD 1: 4000) y anti-conejo de cabra (sc2004, Santa Cruz Biotechnology; FD 1:3000).

Para la detección de β -Actina se empleó el anticuerpo primario anti-actina de cabra (sc-1616, Santa Cruz Biotechnology; FD 1:1000) y el anticuerpo secundario anti-cabra de burro (sc-2020, Santa Cruz Biotechnology; FD 1:1000).

Ambos anticuerpos se incubaron en leche baja en grasa al 4% en TBS-Tween durante una hora a temperatura ambiente.

Las inmunotransferencias se revelaron y digitalizaron con el sistema de peroxidasa – Enhanced Chemiluminescence Prime (ECL Prime)™ Western Blotting Analysis System (GE Healthcare, Amersham) en un fotodocumentador para quimioluminiscencia D-DiGit (LI-COR Bioscience).

Para el análisis de los inmunoblots de Western Blot se midió la densidad óptica (OD) de las bandas con el software ImageStudio Lite V5.2 y los datos se ajustaron a los niveles de proteína total del gel teñido con Azul de Coomassie después de la transferencia. Posteriormente, los datos fueron normalizados con respecto al valor del control (CON-CON) de la membrana.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con los programas GraphPad Prism 6 (GraphPad Software) y RStudio V 1.1.463. Se determinó el tipo de distribución de las variables mediante una prueba de normalidad Shapiro-Wilk. Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con post hoc Sidak o Tuckey para comparaciones múltiples. Para el análisis de correlación se realizó una prueba de Spearman, los correlogramas se realizaron con ayuda de los paquetes ggplot2, corrplot y cowplot. En todos los ensayos se consideró como diferencia significativa aquella con un valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Actividad de las calpaínas en linfocitos de conejas madres

Para evaluar si la dieta SN altera la actividad de las calpaínas a diferentes estímulos de glucosa extracelular, se midió la hidrólisis del sustrato CMAC, t-BOC-Leu-Met en linfocitos de conejas mediante citometría de flujo. Dicha actividad se determinó en las semanas 4, 8 y 10 de consumo de la dieta, y a concentraciones de glucosa extracelular de 5.6, 11.1 y 15.6 mM (Figura 6A).

Se encontró que la actividad de calpaínas en linfocitos de conejo no es afectada por las diferentes concentraciones de glucosa extracelular evaluadas, tanto en conejas alimentadas con la dieta CON o SN. Sin embargo, se encontró que la actividad de las calpaínas está disminuida en linfocitos de conejas expuestas a la dieta SN, siendo significativo a las 8 semanas del consumo de la dieta (Figura 6B, $p < 0.05$).

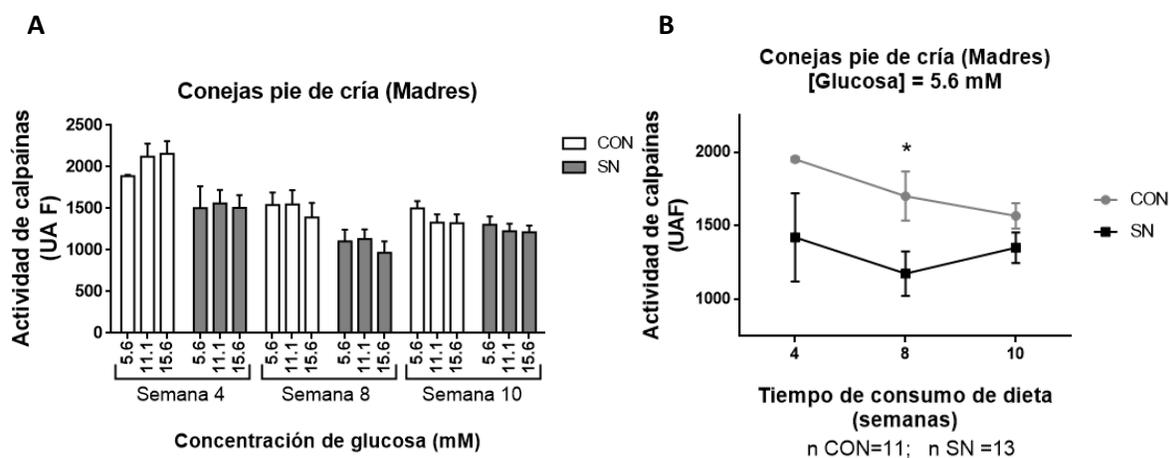


Figura 6 La actividad de las calpaínas en linfocitos de conejas madres disminuye al ser alimentadas con una dieta Sobrenutrida (SN). Esta actividad fue medida como la hidrólisis CMAC, t-BOC-Leu-Met en los linfocitos de conejas pie de cría estimulados a diferentes concentraciones de glucosa extracelular (5.6, 11.1 y 15.6 mM). A) Promedio \pm EEM de la actividad de las calpaínas a las diferentes concentraciones de glucosa extracelular en las semanas 4, 8 y 10 de consumo de la dieta control (CON) o sobrenutrida (SN). En la gráfica B) se observa únicamente el promedio \pm EEM de la actividad de las calpaínas en linfocitos estimulados con 5.6 mM de glucosa extracelular en las semanas 4, 8 y 10 del consumo de la dieta correspondiente. * representa la diferencia significativa (ANOVA de dos vías con prueba Sidak post hoc, $p < 0.05$) entre el grupo SN contra el CON en la semana 8. UAF: Unidades Arbitrarias de Fluorescencia).

Actividad de las calpaínas en linfocitos de conejos crías

Para determinar si la dieta materna afecta la actividad de las calpaínas en sus crías, se realizó el ensayo de actividad de calpaínas por citometría de flujo en linfocitos de las crías en las semanas 10, 13 y 57 de edad (Figura 7A). Cabe

recordar que desde el destete hasta la semana 62, dichas crías fueron alimentadas con la dieta CON. El ANOVA de dos vías reveló un efecto significativo de la dieta sobre la hidrólisis del sustrato específico de las calpaínas, siendo menor en las crías provenientes de madres alimentadas con la dieta SN ($p < 0.05$). Dicha actividad es restablecida con el tiempo que pasaron siendo alimentadas con una dieta CON, siendo significativamente menor en las semanas 10 y 13 con respecto a la semana 57 de edad ($p < 0.01$ y $p < 0.05$).

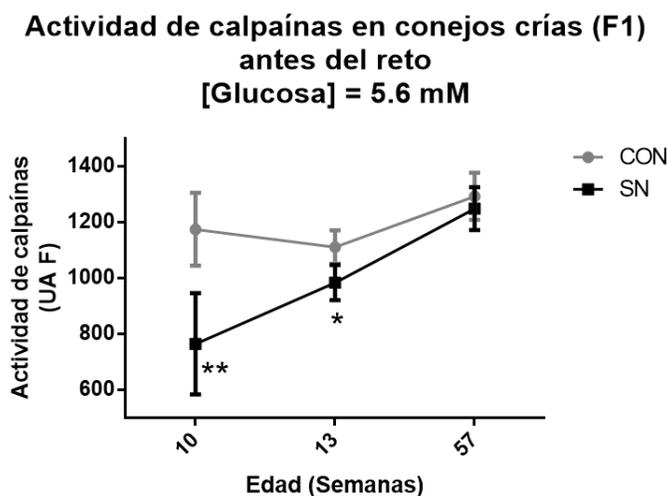


Figura 7. La actividad de las calpaínas en linfocitos de crías es menor en aquellas procedentes de madres alimentadas con una dieta SN. La actividad se restablece al ser alimentados con una dieta CON por 57 semanas. Promedio \pm EEM de la actividad de las calpaínas en linfocitos de crías de 10, 13 y 57 semanas de edad, provenientes de madres alimentadas con una dieta CON o SN. Los linfocitos fueron estimulados con 5.6 mM de glucosa extracelular. La actividad fue medida como la hidrólisis CMAC, t-BOC-Leu-Met. Los asteriscos representan diferencia significativa en la actividad de las calpaínas en el grupo SN en la semana 10 y 13 contra la semana 57 del mismo grupo. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ (ANOVA de dos vías con post hoc Sidak).

Posteriormente se realizó un reto metabólico en cual las crías fueron alimentadas con la dieta SN, o continuaron con la dieta CON por un mes. Pasado este tiempo se pretendió analizar la actividad de las calpaínas en los linfocitos de estos conejos; y se tomaron muestras de hígado y músculo para evaluar la abundancia de las calpaínas en dichos tejidos. Desafortunadamente, por cuestiones técnicas, no se logró obtener un resultado en los experimentos de la actividad de calpaínas en linfocitos posterior al reto metabólico.

Abundancia proteica de CAPN1, CAPN2, CAPN10 y CAST en muestras de hígado de las crías

El hígado es el órgano eje del metabolismo, ya que funciona como centro de procesamiento de glucosa, lípidos y proteínas, y los suministra al resto de los tejidos cuando así lo requieran. Por lo tanto, para evaluar si la dieta materna y la dieta en la adultez afectan la expresión de las calpaínas involucradas en el

metabolismo de la glucosa, se determinó la abundancia proteica de CAPN1, CAPN2, CAPN10 y CAST en muestras de hígado de las crías después del reto metabólico mediante Western Blot.

En el caso de CAPN1, se identificó una banda correspondiente a la proteína entera de CAPN1 de 75 kDa, y una banda de 65 kDa aproximadamente, la cual corresponde al producto de autólisis de CAPN1 (**Figura 8A**). Se encontró que la dieta reto SN incrementa significativamente la abundancia a nivel de proteína de CAPN1 en el hígado de las crías, y este efecto es más notorio en las crías provenientes de madres con dieta SN (**Figura 8B p<0.01**). En cuanto al fragmento de CAPN1, se encontró un comportamiento similar, siendo significativamente mayor únicamente en las crías provenientes de madres con dieta SN (**Figura 8C p<0.05**). Posteriormente se obtuvo el índice de autólisis de CAPN1, el cual se define como el cociente del valor obtenido de la banda del fragmento de CAPN1 sobre el valor correspondiente a la proteína entera. Este índice reporta, de manera indirecta, la actividad de dicha proteasa en el tejido, ya que se ha demostrado que el fragmento de 65 kDa es formado por la autólisis de CAPN1, y mientras más activa, mayor es la cantidad de su fragmento (**Figura 8D**). Debido a que no se encontraron diferencias significativas, se concluye que la dieta SN induce la expresión de CAPN1, pero no afecta su actividad.

En el inmunoblot para CAPN2 también se encontraron dos bandas, las cuales corresponden a la proteína CAPN2 entera y a su fragmento de autólisis, de 75 y 65 kDa respectivamente (**Figura 9A**). Al igual que en CAPN1, se realizó un análisis del índice de CAPN2, definido como el cociente del valor dado del fragmento de CAPN2 sobre el valor de CAPN2 entera. No se encontraron diferencias significativas en la abundancia de CAPN2 o su fragmento en ningún grupo, tampoco se obtuvo diferencia en el índice de CAPN2 (**Figura 9B, C y D**). Lo que indica que la dieta SN no afecta la actividad, ni la expresión a nivel de proteína de CAPN2 hepática.

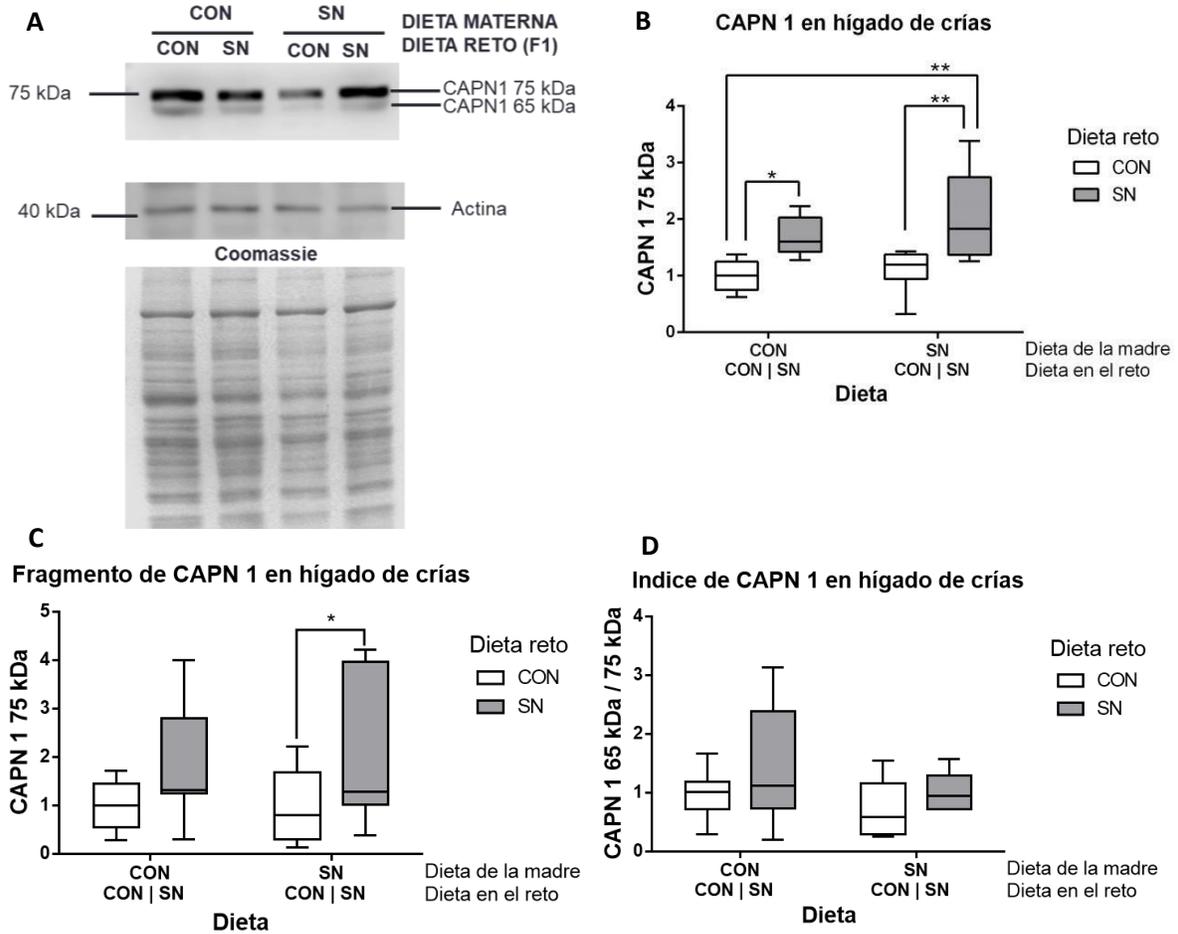


Figura 8. La dieta SN aumenta la abundancia de CAPN1 hepática, este efecto se ve incrementado si la madre tuvo una dieta SN. La abundancia de CAPN 1 se evaluó por Western Blot. En la figura A) se observa el blot representativo para CAPN1, como control de carga se usó la proteína total del gel SDS-PAGE teñido con Azul de Coomassie y los valores densitométricos se normalizaron con la señal correspondiente al valor obtenido en las muestras CON-CON. Las gráficas muestran la mediana \pm el rango intercuartílico y el valor máximo y mínimo de las señales densitométricas obtenidas de B) CAPN 1 entera (75 kDa), C) El fragmento de CAPN1, producto de autólisis (65 kDa), y D) El índice de CAPN 1 obtenido como el cociente de la banda correspondiente al producto de autólisis entre la banda de la proteína entera. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (ANOVA de dos vías con análisis post hoc de Tukey). CON-CON $n = 8$, CON-SN $n = 7$, SN-CON $n = 10$, SN-SN $n = 6$.

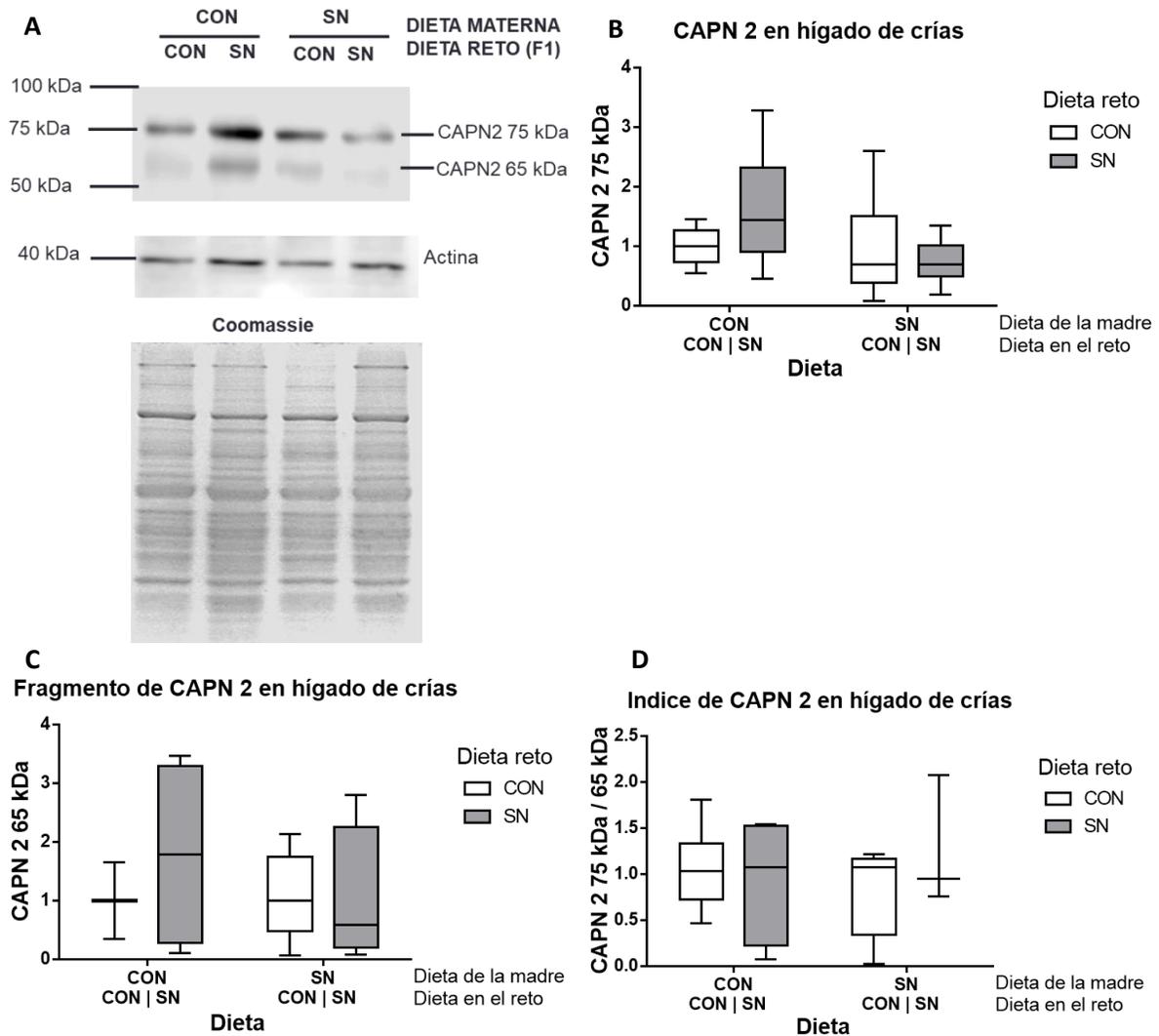


Figura 9. La abundancia de CAPN 2 en hígado no es alterada por una dieta materna o dieta reto SN. A) Blot representativo de los inmunoblots anti CAPN2, como control de carga se usó la proteína total del gel SDS-PAGE teñido con Azul de Coomassie. Los valores densitométricos se normalizaron con la señal correspondiente al valor obtenido en las muestras CON-CON. Las gráficas muestran la mediana \pm el rango intercuartílico y los valores máximos y mínimos de las señales densitométricas obtenidas de B) CAPN 2 entera (75 kDa), C) El fragmento de CAPN2, producto de autólisis (65 kDa), y D) El índice de CAPN 2 obtenido como el cociente de la banda correspondiente al producto de autólisis entre la banda de la proteína entera. (ANOVA de dos vías con análisis post hoc de Tukey). CON-CON n = 8, CON-SN n = 7, SN-CON n = 10, SN-SN n = 6.

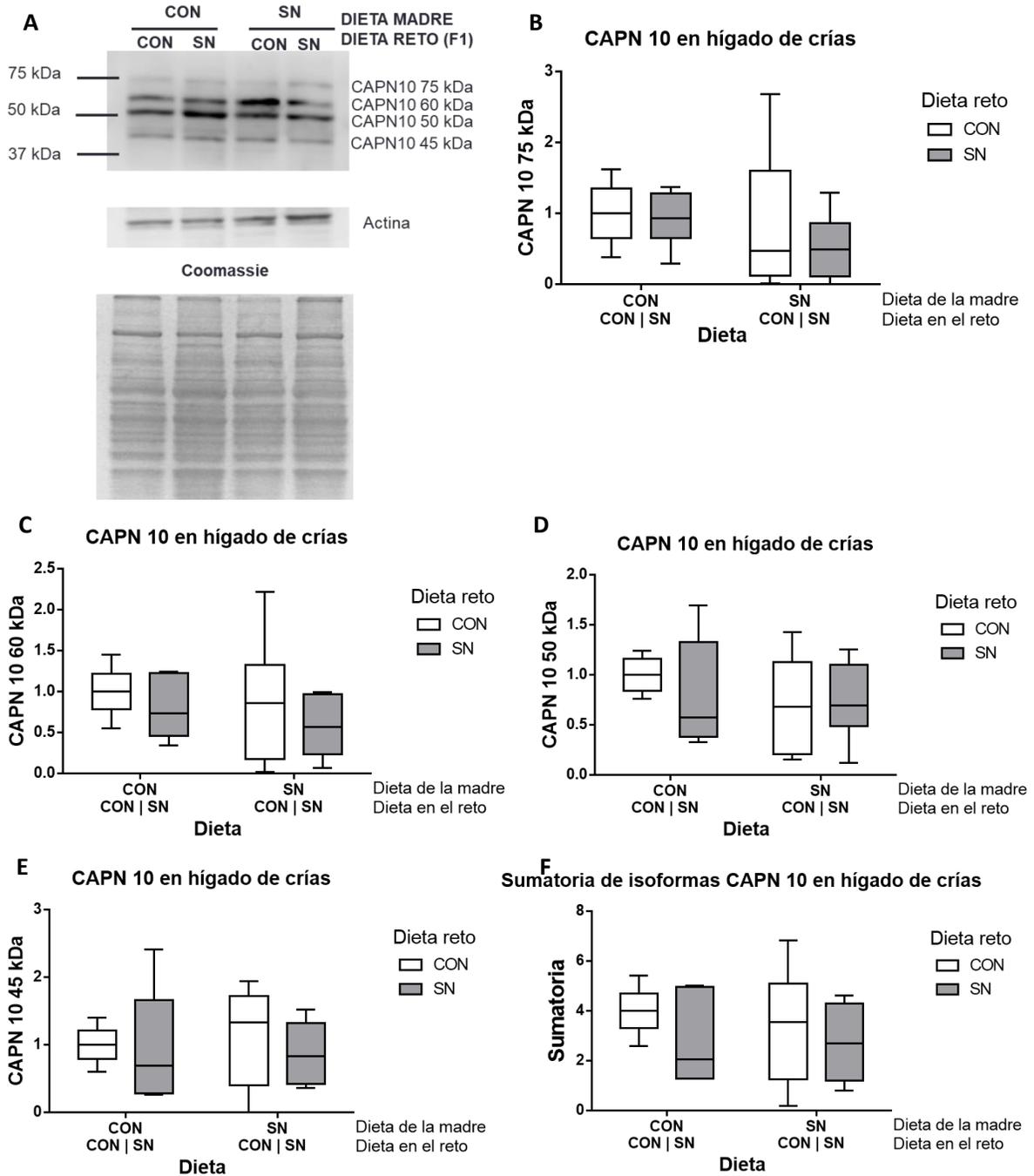


Figura 10. La abundancia de CAPN 10 en hígado no es alterada por una dieta materna o dieta reto SN. A) Blot representativo de los inmunoblots anti CAPN10, como control de carga se usó la proteína total del gel SDS-PAGE teñido con Azul de Coomassie. Los valores densitométricos se normalizaron con la señal correspondiente al valor obtenido en las muestras CON-CON. Las gráficas B, C, D, E y F muestran la mediana \pm el rango intercuartílico y el valor máximo y mínimo de las señales densitométricas obtenidas de las isoformas de CAPN 10 de 75, 60, 50, 45 kDa y la sumatoria de todas las isoformas, correspondientemente (ANOVA de dos vías con análisis post hoc de Tukey). CON-CON n = 8, CON-SN n = 7, SN-CON n = 10, SN-SN n = 8.

En la muestra de hígado se encontraron 4 isoformas de CAPN10 de aproximadamente 75, 60, 50 y 45 kDa respectivamente (**Figura 10A**). Interesantemente, la isoforma equivalente a la más reportada en humano, CAPN10a, con un peso aproximado de 75 kDa, no es la isoforma con mayor expresión en hígado de conejo. No se encontraron diferencias significativas de ninguna isoforma, o la sumatoria de ellas, en ningún grupo (**Figura 10B-F**).

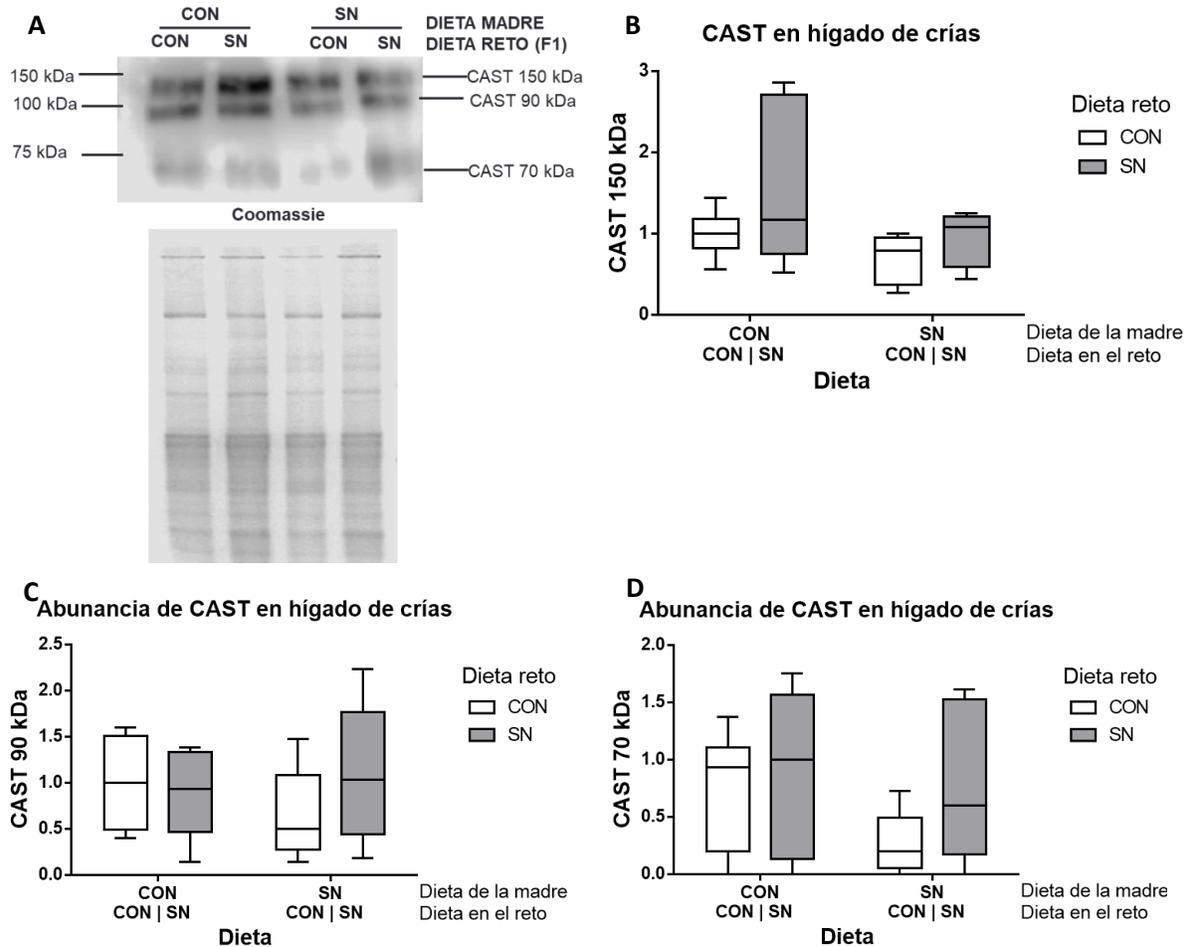


Figura 11. La abundancia de CAST en hígado no es alterada por una dieta materna o dieta reto SN. A) Blot representativo de los inmunoblots anti CAST, como control de carga se usó la proteína total del gel SDS-PAGE teñido con Azul de Coomassie. Los valores densitométricos se normalizaron con la señal correspondiente al valor obtenido en las muestras CON-CON. Las gráficas B, C, y D muestran la mediana \pm el rango intercuartílico y el valor máximo y mínimo de las señales densitométricas obtenidas de las isoformas de CAST de 150, 90 y 70 kDa respectivamente. (ANOVA de dos vías con análisis post hoc de Tukey). CON-CON n = 8, CON-SN n = 7, SN-CON n = 10, SN-SN n = 8.

CAST es el único inhibidor endógeno de las calpaínas clásicas, por lo tanto es importante determinar si la diferencia en la expresión de las calpaínas dada por la dieta es causada por una alteración en la expresión de CAST. Se encontraron 3

bandas inmunoreactivas al anticuerpo anti-CAST de 150, 90 y 70 kDa aproximadamente (

Figura 11A). Se realizó el análisis densitométrico de cada una de las bandas y no se encontraron diferencias significativas en ningún grupo (

Figura 11B, C y D). Lo que indica que el incremento de CAPN1 en el hígado de las crías con dieta SN no es causado por una desregulación de la expresión a nivel de proteína de CAST.

Abundancia proteica de CAPN1, CAPN2, CAPN10 y CAST en muestras de músculo de las crías

El músculo, debido a su demanda energética, es el principal tejido responsable de la captación de glucosa dependiente de insulina; por lo tanto tiene un papel importante en el desarrollo de la resistencia a la insulina y DT2. Por esta razón se decidió determinar si la dieta SN afecta la expresión a nivel de proteína de las calpaínas importantes en el metabolismo de la glucosa. Para esto, se realizaron ensayos de Western Blot en muestras de músculo gastrocnemio de conejos crías después el reto metabólico, para determinar si, tanto la dieta reto como la dieta materna, afectan la abundancia de CAPN1, CAPN2, CAPN 10 y CAST.

Al igual que en hígado, en el inmunoblot de músculo se identificaron dos bandas correspondientes a la proteína entera de CAPN1 de 75 kDa, y a su producto de autólisis de 65 kDa aproximadamente (**Figura 12A**). No se encontraron diferencias significativas en la abundancia de CAPN1, o de su fragmento, en ninguno de los grupos (**Figura 12B y C**). Tampoco se encontraron diferencias en el índice de CAPN1 (**Figura 12D**). Lo que indica que la dieta SN no afecta la actividad ni la expresión a nivel de proteína de CAPN1 en músculo.

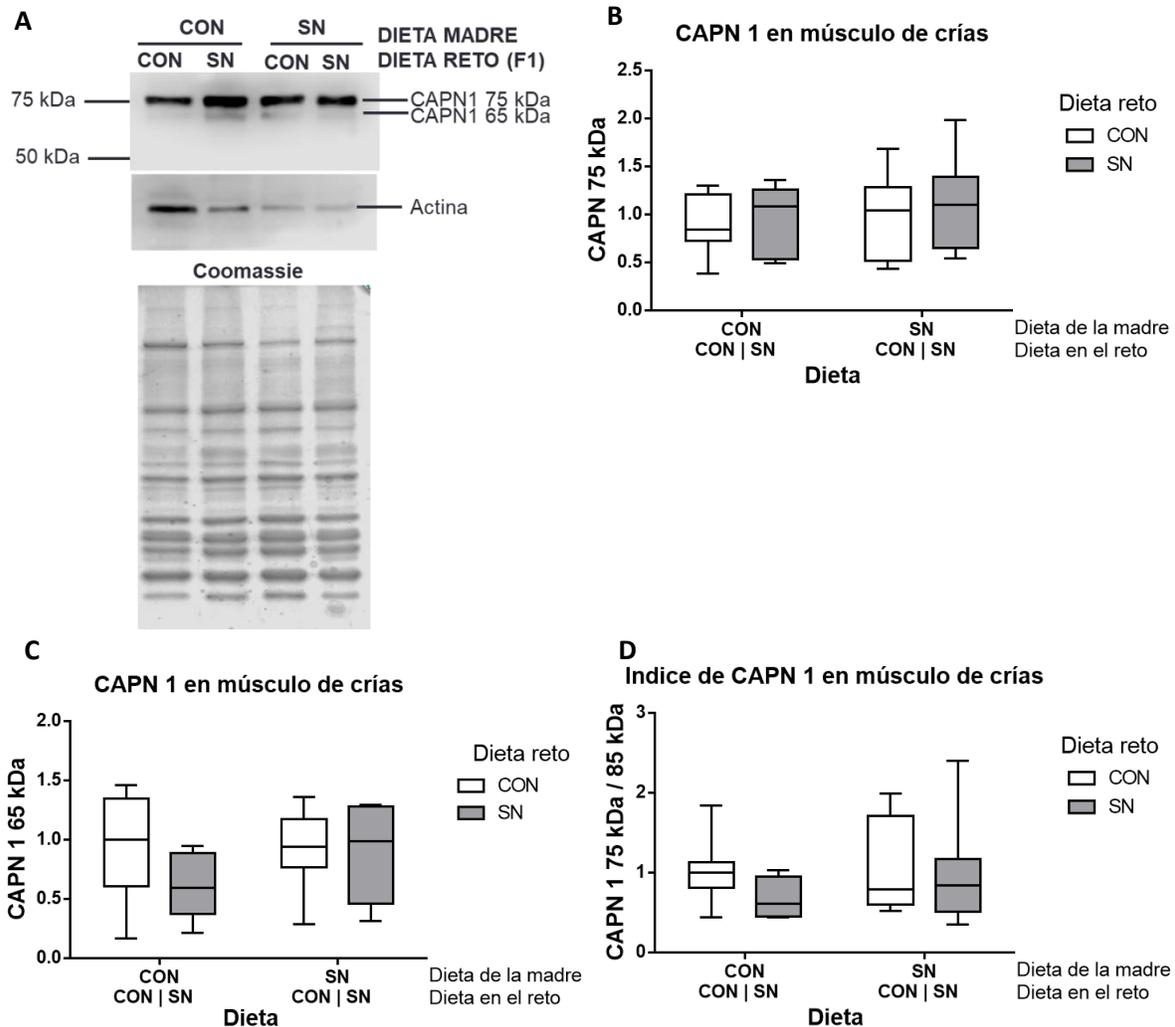


Figura 12. La abundancia de CAPN 1 en músculo no es alterada por una dieta materna o dieta reto SN. A) Blot representativo de los inmunoblots contra CAPN1, como control de carga se usó la proteína total del gel SDS-PAGE teñido con Azul de Coomassie. Los valores densitométricos se normalizaron con la señal correspondiente al valor obtenido en las muestras CON-CON. Las gráficas muestran la mediana \pm el rango intercuartílico y el valor máximo y mínimo de las señales densitométricas obtenidas de B) CAPN 1 entera (75 kDa), C) El fragmento de CAPN1, producto de autólisis (65 kDa), y D) El índice de CAPN 1 obtenido como el cociente de la banda correspondiente al producto de autólisis entre la banda de la proteína entera (ANOVA de dos vías con análisis post hoc de Tukey). CON-CON n = 10, CON-SN n = 7, SN-CON n = 12, SN-SN n = 11.

En el caso de CAPN2 muscular, se detectó una banda de 75 kDa que corresponde a CAPN2 entera, y una banda de 65kDa perteneciente al fragmento de autólisis de CAPN2 (**Figura 13A**). De manera interesante, se encontró que la dieta SN incrementa significativamente la abundancia de CAPN2 en músculo, siendo este efecto más notorio en aquellos conejos provenientes de madres SN (**Figura 13B**, $p < 0.01$). No se encontraron diferencias significativas en ningún grupo en la abundancia del fragmento y el índice de CAPN2 (**Figura 13C y D**). Con lo que se

concluye, que tanto la dieta materna SN, como la dieta reto SN incrementan la expresión a nivel de proteína de CAPN2 en músculo, más no su actividad.

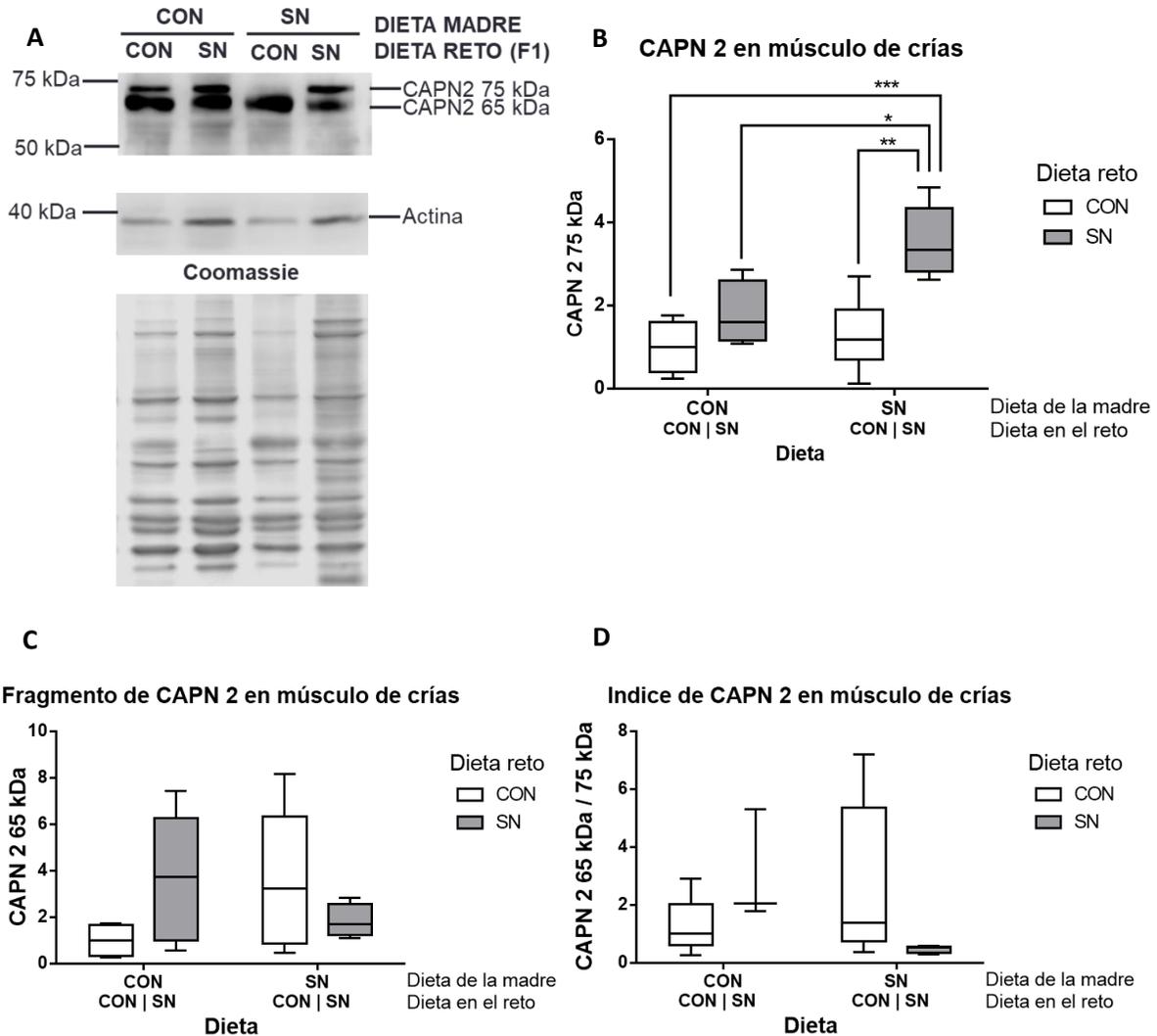
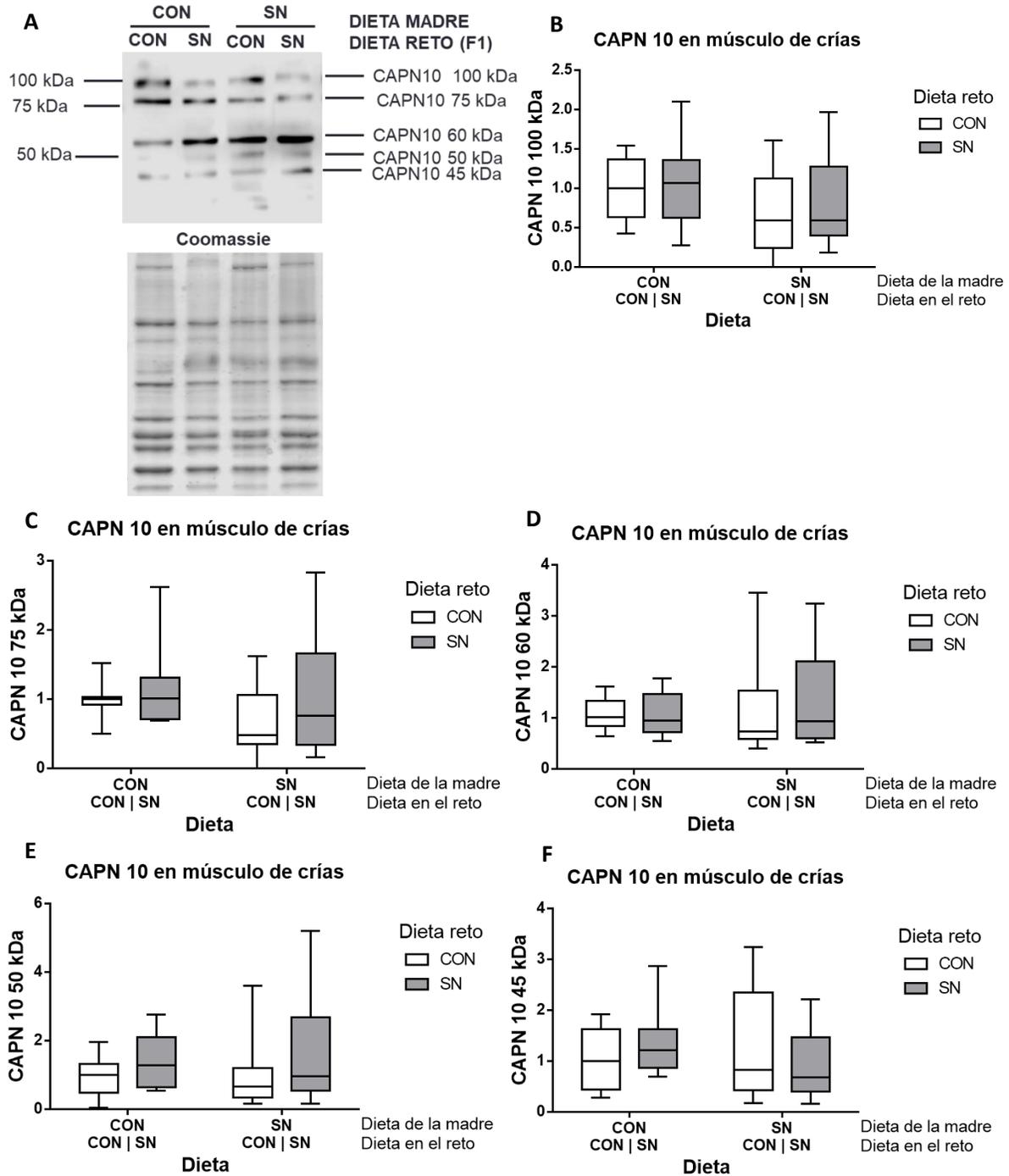


Figura 13. La dieta SN aumenta la abundancia de CAPN2 muscular, este efecto se ve incrementado si la madre tuvo una dieta SN. La abundancia de CAPN 2 se evaluó por Western Blot. A) Blot representativo de los inmunoblots, como control de carga se usó la proteína total del gel PAGE teñido con Azul de Coomassie. Los valores densitométricos se normalizaron con la señal correspondiente al valor obtenido en las muestras CON-CON. Las gráficas muestran la mediana \pm el rango intercuartílico y el valor máximo y mínimo de las señales densitométricas obtenidas de B) CAPN 2 entera (75 kDa), C) El fragmento de CAPN2, producto de autólisis (65 kDa), y D) El índice de CAPN 2, obtenido como el cociente de la banda correspondiente al producto de autólisis entre la banda de la proteína entera. El cual se puede representar como la tasa de autólisis. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$. (ANOVA de dos vías con análisis post hoc de Tukey). CON-CON $n = 10$, CON-SN $n = 7$, SN-CON $n = 12$, SN-SN $n = 11$.

A diferencia del hígado, en músculo de conejo se encontraron 5 isoformas de CAPN10, de 100, 75, 60, 50 y 45 kDa correspondientemente (Figura 14A). Se realizó el análisis densitométrico de cada una de las isoformas, así como un

análisis de la sumatoria de la señal de las cinco isoformas; sin embargo no se encontraron diferencias significativas en ningún grupo (**Figura 14B-G**). Estos resultados indican que la dieta SN no afecta la expresión a nivel de proteína de CAPN10 en músculo.



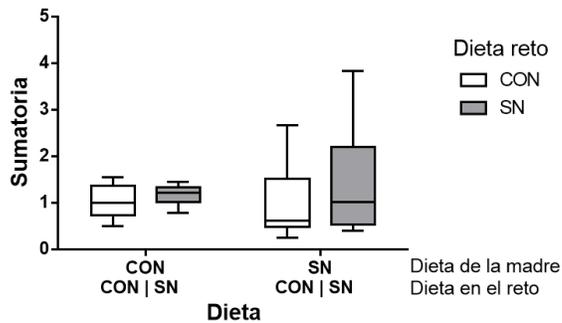
G**Sumatoria de isoformas CAPN 10 en músculo de crías**

Figura 14. La abundancia de CAPN 10 en músculo no es alterada por una dieta materna o dieta reto SN. La abundancia de CAPN 10 se evaluó por Western Blot. A) Blot representativo de los inmunoblots anti CAPN10, como control de carga se usó la proteína total del gel PAGE teñido con Azul de Coomassie. Los valores densitométricos se normalizaron con la señal correspondiente al valor obtenido en las muestras CON-CON. Las gráficas B, C, D, E, F y G muestran la mediana \pm el rango intercuartílico y el valor máximo y mínimo de las señales densitométricas obtenidas de las isoformas de CAPN 10 de 100, 75, 60, 50, 45 kDa y la sumatoria de todas las isoformas, correspondientemente (ANOVA de dos vías con análisis post hoc de Tukey). CON-CON n = 10, CON-SN n = 7, SN-CON n = 12, SN-SN n = 11.

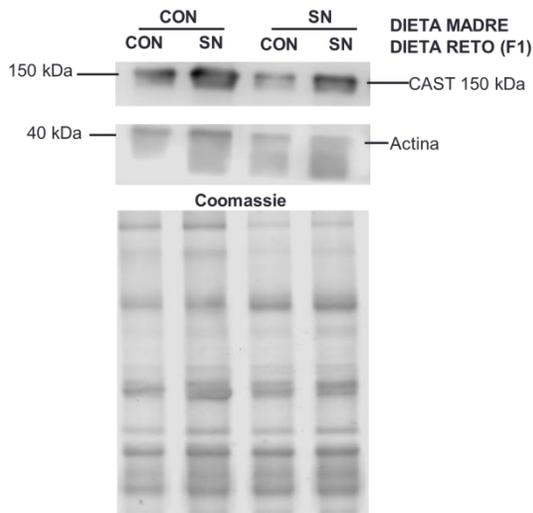
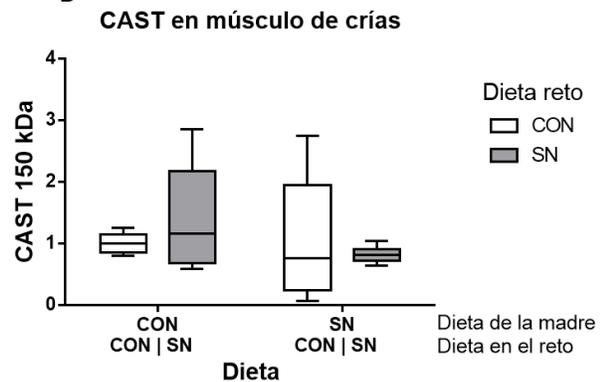
A**B**

Figura 15. La abundancia de CAST en músculo no es alterada por una dieta materna o dieta reto SN. La abundancia de CAST se evaluó por Western Blot. A) Blot representativo de los inmunoblots contra CAST, como control de carga se usó la proteína total del gel PAGE teñido con Azul de Coomassie. Los valores densitométricos se normalizaron con la señal correspondiente al valor obtenido en las muestras CON-CON. Las gráficas B) muestra la mediana \pm el rango intercuartílico y el valor máximo y mínimo de las señales densitométricas obtenidas de CAST de 150 kDa. (ANOVA de dos vías con análisis post hoc de Tuckey). CON-CON n = 10, CON-SN n = 7, SN-CON n = 12, SN-SN n = 11.

En el inmunoblot para CAST en tejido muscular se encontró una banda correspondiente a CAST de 150 kDa (**Figura 15A**). Se realizó el análisis densitométrico y no se encontraron diferencias significativas de la abundancia de

CAST en ningún grupo (**Figura 15B**). Se concluye que las diferencias en la abundancia de CAPN2 en músculo de conejos con dieta SN no están asociados a una desregulación de la abundancia proteica de CAST.

Correlación de la abundancia de las calpaínas en hígado con valores bioquímicos evaluados en sangre

Como parte de un proyecto que se desarrolló en paralelo con estos mismos grupos experimentales, se tomaron muestras de sangre de los conejos crías previo a la eutanasia, en la semana 66, a los cuales se les determinó colesterol (COL), triglicéridos (TG), glucosa (GLU), ácidos grasos libres (AGL), lipoproteínas de alta densidad (HDL) y lipoproteínas de baja densidad (LDL) en dos tiempos diferentes: ZT 00, el inicio del ciclo de luz; y ZT12, el inicio del ciclo de oscuridad. Con estos datos obtenidos por el grupo del laboratorio de la Dra. Caldelas, se evaluó si la abundancia de CAPN1, CAPN2, CAPN10 y CAST en el hígado de las crías están asociados a la concentración de estos metabolitos en sangre. Se realizó una prueba de Spearman y los valores significativos obtenidos ($p < 0.05$) fueron graficados mediante un correlograma, mismo en el que se indicó el grupo experimental al que pertenece cada valor de acuerdo a una escala de colores. Se encontraron asociaciones positivas entre CAPN1 con COL y LDL, y CAPN2 con LDL en donde los conejos alimentados con una dieta control (CON-CON y SN-CON) presentaron una menor concentración de estos metabolitos y una menor abundancia de dichas calpaínas; mientras que los conejos alimentados con una dieta sobrenutrida en el reto metabólico (CON-SN y SN-SN) tienden a tener una mayor abundancia de CAPN1 y CAPN2 en el hígado y una mayor concentración de estos lípidos en sangre. Demostrando así que la dieta es un componente importante para el comportamiento de estos factores. En el caso de la CAST, se encontró que la isoforma de 90 kDa correlaciona negativamente con la concentración sanguínea de AGL (ZT12) y TG; y positivamente para COL (ZT00) y LDL (ZT00). Para esta proteína no se observó gráficamente que la dieta influyera en la correlación. Las correlaciones individuales y los datos estadísticos se encuentran en la

Figura 16.

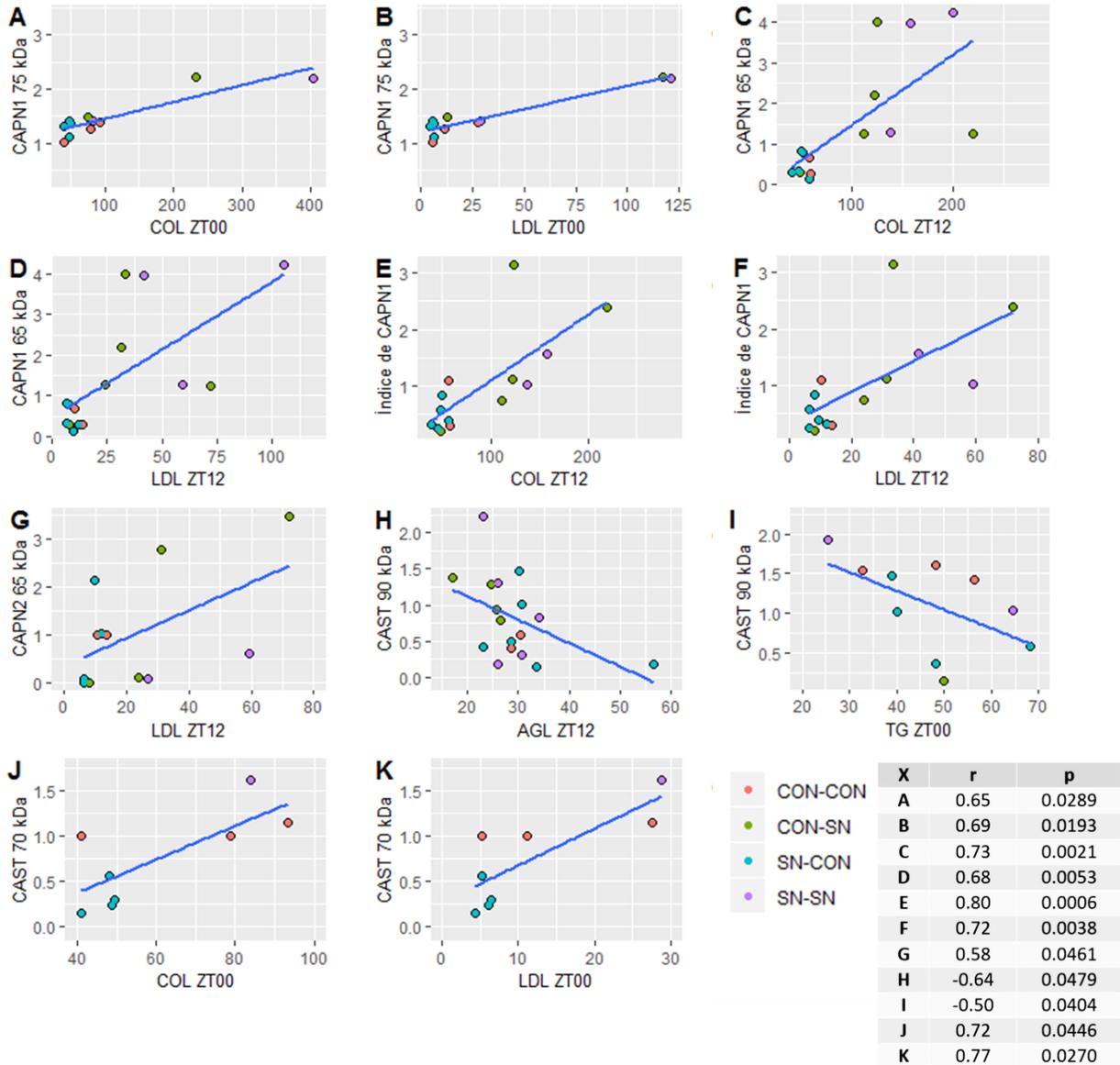


Figura 16. Correlación entre la abundancia de proteína de CAPN1, CAPN2, CAPN10 y CAST en hígado y la concentración de diversos parámetros bioquímicos medidos en sangre. El eje de las x representa la concentración del analito en sangre de acuerdo a la hora de la toma de muestra (ZT00: inicio del ciclo de luz, ZT12: inicio del ciclo de oscuridad), el eje de las y representa la abundancia de la calpaína correspondiente en hígado. En el recuadro inferior derecho se enlistan los parámetros estadísticos de cada uno de los gráficos, obtenidos por prueba de Spearman.

Por otra parte, se realizó un análisis de correlación de Spearman entre la abundancia de las calpaínas evaluadas en el hígado (**Figura 17**). Se encontró que la abundancia de CAPN10 (isoformas de 75, 60, 50 y 45 kDa) correlaciona negativamente con la abundancia de CAPN1 de 75 kDa, y las isoformas de CAPN10 de 50 y 45 kDa con la abundancia de CAST (150 y 90 kDa). También se encontró que la abundancia de CAPN1 correlaciona positivamente con la abundancia de CAST (150, 90 y 70 kDa).

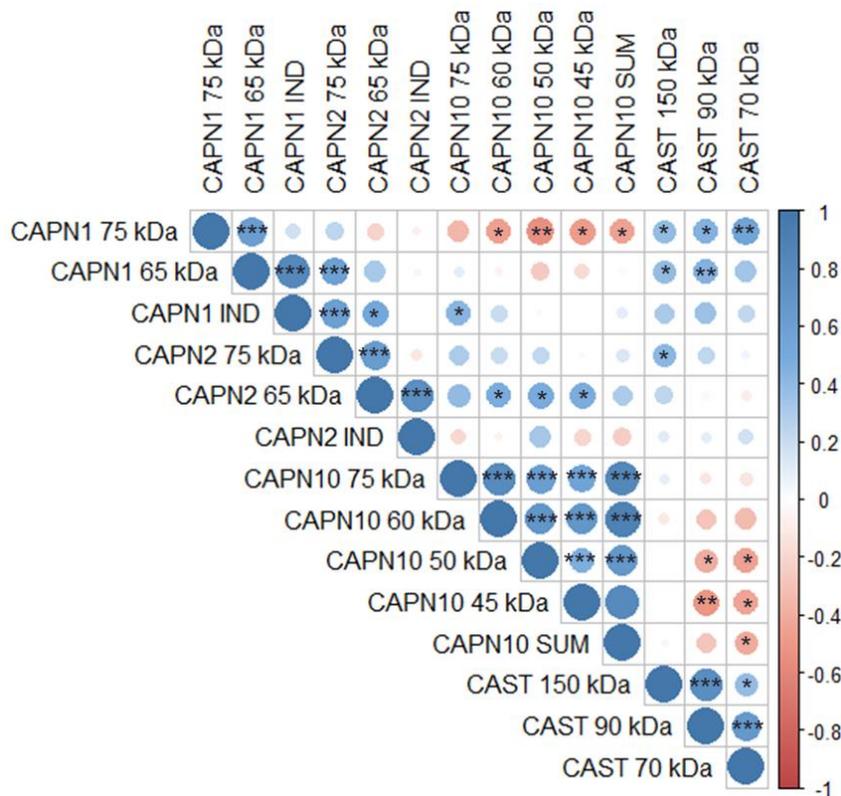


Figura 17. Autocorrelograma de abundancia de calpaínas medidas en hígados de las crías. Cada una de las calpaínas evaluadas fueron enlistadas en el eje de la x y el eje de la y. Cada celda dentro del triángulo invertido muestra la correlación entre dos variables, de acuerdo a una prueba de Spearman. El color y el tamaño del círculo dentro de cada recuadro representan el nivel de correlación entre las variables evaluadas, que va desde fuertemente negativas (rojo) hasta fuertemente positivas (azul), de tal manera que mientras mayor es la correlación, mayor es el tamaño y la intensidad del círculo. Los asteriscos dentro de los círculos representan el nivel de significancia, * $p \leq 0.5$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

Correlación de la abundancia de las calpaínas en músculo con valores bioquímicos evaluados en sangre

Se evaluó si la abundancia de CAPN1, CAPN2, CAPN10 y CAST en músculo están asociados a la concentración de los metabolitos previamente descritos en sangre. Se realizó una prueba de Spearman y los valores significativos obtenidos ($p < 0.05$) fueron graficados mediante un correlograma, indicando el grupo experimental correspondiente mediante una escala de colores. Se encontraron correlaciones positivas entre la abundancia del fragmento de CAPN2 y LDL (ZT00, ZT12). Además de una correlación negativa entre la abundancia de CAPN10 (isoformas de 60, 50 y 45 kDa) y la concentración de AGL en sangre. Se observa que la dieta podría ser un factor que influye en la correlación entre el fragmento de CAPN2 en hígado y la concentración de LDL en sangre al inicio del ciclo de oscuridad, únicamente. Las correlaciones individuales y los datos estadísticos se encuentran en la **Figura 18**.

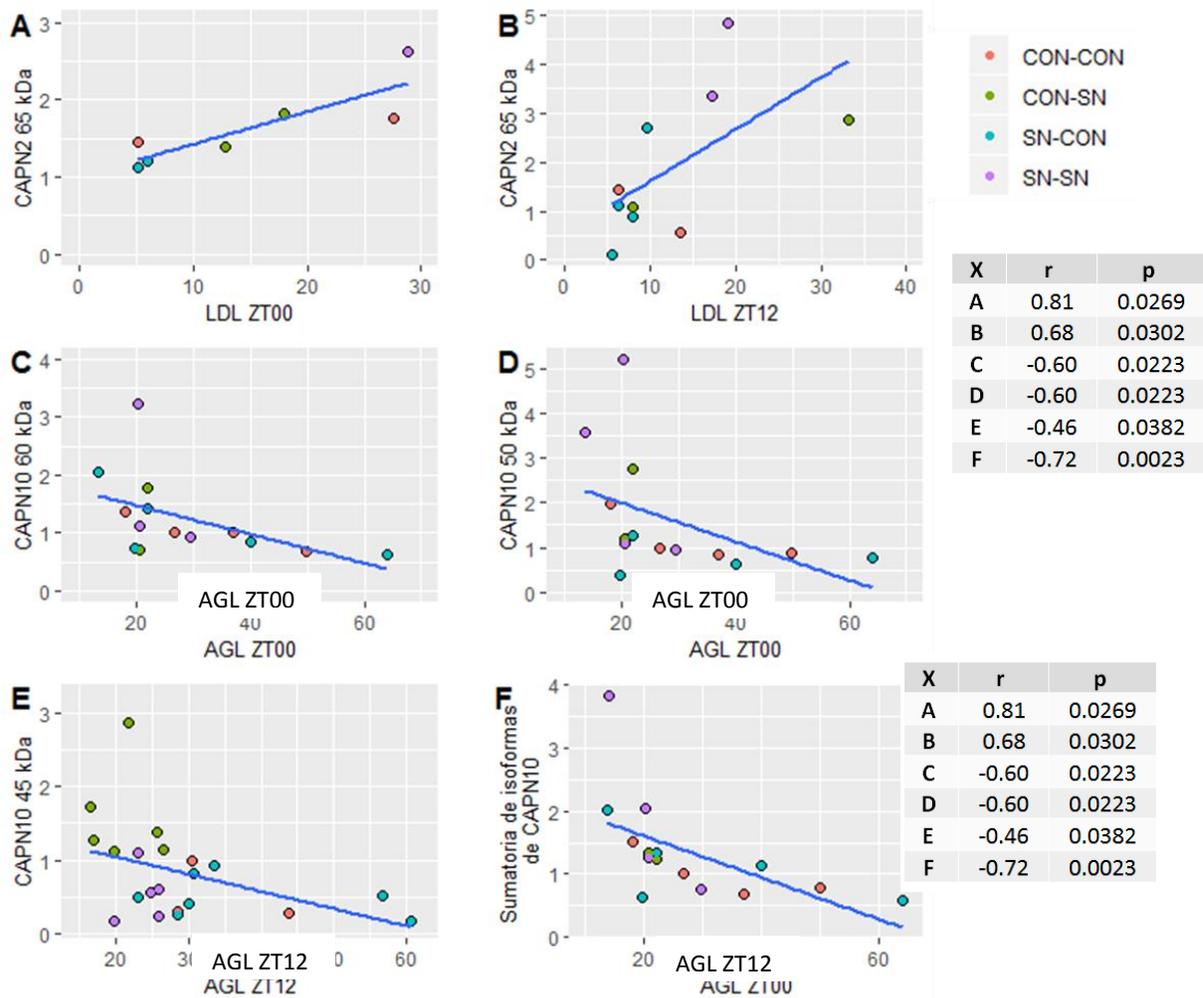


Figura 18. Correlación entre la abundancia de proteína de CAPN2 y CAPN10 en músculo y la concentración de diversos parámetros bioquímicos medidos en sangre. Correlación positiva entre la abundancia de proteína de CAPN 2 en músculo y la concentración de LDL en sangre; y correlación negativa entre la abundancia de CAPN 10 y la concentración de AGL en sangre. En el recuadro inferior derecho se enlistan los parámetros estadísticos de cada uno de los gráficos, obtenidos por prueba de Spearman.

De manera similar, se realizó en análisis de correlación de Spearman entre las abundancias de las calpaínas encontradas en el músculo. Sin embargo no se encontraron resultados significativos de interés (**Figura 19**).

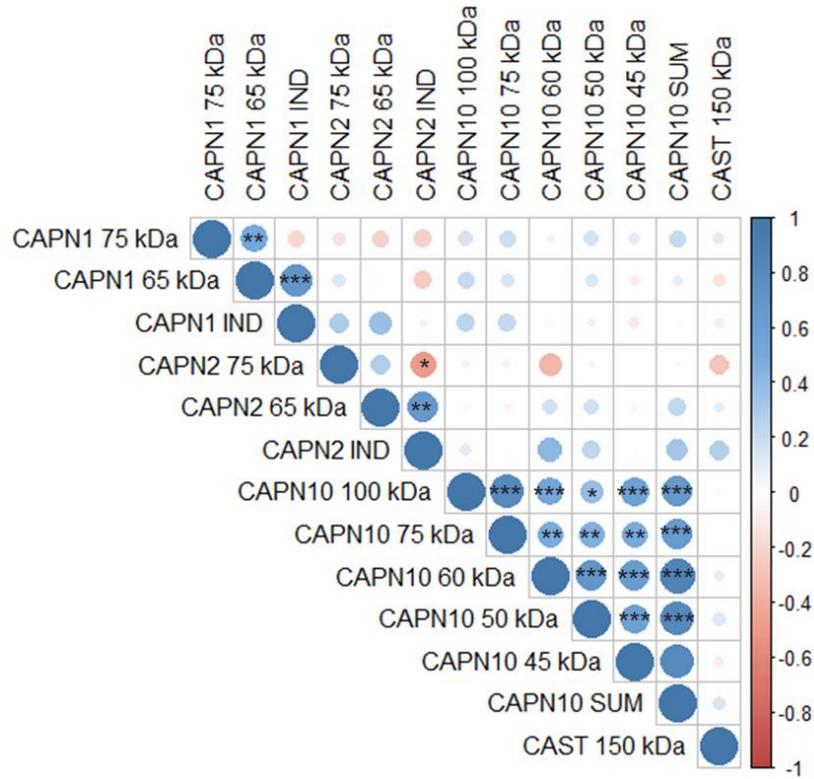


Figura 19. Autocorrelograma de abundancia de calpaínas medidas en el músculo de las crías. Cada una de las calpaínas evaluadas fueron enlistadas en el eje de la x y el eje de la y. Cada celda dentro del triángulo invertido muestra la correlación entre dos variables, de acuerdo a una prueba de Spearman. El color y el tamaño del círculo dentro de cada recuadro representan el nivel de correlación entre las variables evaluadas, que va desde fuertemente negativas (rojo) hasta fuertemente positivas (azul), de tal manera que mientras mayor es la correlación, mayor es el tamaño y la intensidad del círculo. Los asteriscos dentro de los círculos representan el nivel de significancia, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$. Spearman.

DISCUSIÓN

Las calpaínas son una familia de proteasas de cisteínas que están involucradas en diversos mecanismos fisiológicos como tráfico vesicular, apoptosis y migración celular. Dentro de esta familia, las CAPN1, CAPN2 y CAPN10 tienen diversos papeles en la homeostasis de la glucosa, el metabolismo de lípidos, el desarrollo de DT2 y sus complicaciones. Dado nuestro interés por conocer la participación de las calpaínas en la generación de esta enfermedad, este grupo de investigación ha estudiado su actividad en linfocitos de individuos sanos. Así, se ha encontrado que responden a diferentes concentraciones de glucosa extracelular; es decir, a mayor concentración de ésta, mayor es la actividad de las calpaínas (Díaz-Villaseñor y cols., 2008) y también se ha reportado que esta capacidad que tienen de responder a altas concentraciones de glucosa, está disminuida en pacientes con DT2 (Díaz-Villaseñor y cols., 2008; Salazar-Martínez y cols., 2019).

En el laboratorio de la Dra. Ivette Caldelas se inició un estudio para evaluar los efectos de una dieta alta en lípidos y carbohidratos en los ritmos circadianos del conejo (*Oryctolagus cuniculus*) y sus descendientes. Aunque el conejo se utiliza frecuentemente como modelo de estudio para este tipo de dietas, hay muy poca información sobre el efecto de un ambiente alto en lípidos y carbohidratos sobre la abundancia de las calpaínas en conejos. Por lo tanto, se propuso evaluar la actividad de las calpaínas, tanto en las conejas hembra que recibieron la dieta alta en nutrientes, como en la generación de conejos que estuvieron expuestos a esta dieta *in utero*.

Actividad de las calpaínas en linfocitos de conejo expuestos a una dieta alta en lípidos y carbohidratos

Para determinar si la dieta alta en lípidos y carbohidratos afectaba la actividad general de las calpaínas en los linfocitos de conejo, se evaluó la hidrólisis del sustrato fluorogénico CMAC-t-BOC-Leu-Met. Para esta determinación se utilizaron concentraciones de glucosa de 5.6, 11.1 y 15.6 mM, equivalente a 100, 200 y 280 mg/dL de glucosa, que corresponden al valor promedio encontrado en sangre en ayunas, al límite superior postprandial y a una concentración elevada de glucosa en humanos, respectivamente.

A diferencia de lo descrito en humanos, la actividad de las calpaínas en linfocitos de conejos no respondió a las diferentes concentraciones de glucosa utilizadas. En este trabajo se encontró que los conejos alimentados con una dieta estándar tienen una concentración promedio de glucosa en sangre en ayunas de 6.7 mmol/L (120 mg/dL), mientras que los conejos con la dieta alta en nutrientes tuvieron una concentración promedio de 8.3 mmol/L (150 mg/dL) (Caldelas y cols, 2020), que está dentro y sobre el límite superior de los valores de referencia en conejos sanos respectivamente (4.2 a 8.2 mmol/L) (Eatwell, 2008). Los conejos

tienen concentraciones de glucosa mayores a los encontrados en humanos sanos, que va de 3,9 a 5.6 mmol/L en ayunas; por lo tanto, podría ser que las concentraciones utilizadas en este ensayo no fueron lo suficientemente elevadas como para estimular la actividad de calpaínas. Por otra parte, se encontró que la actividad general de las calpaínas fue menor en las conejas alimentadas con una dieta sobrenutrida que con un régimen estándar después de 8 semanas de ser alimentadas bajo esta condición. Esto indica que una exposición crónica a una dieta alta en carbohidratos y lípidos puede disminuir la actividad de las calpaínas en los linfocitos.

Previamente, en experimentos pilotos realizados en el laboratorio de la Doctora Caldelas, se encontró que el consumo crónico de la dieta desbalanceada afecta la fertilidad, así como el mantenimiento de la gestación en las conejas. Con base en estos datos, quince días previo al apareo, la dieta de las conejas del grupo sobrenutrido (SN) fue alternada con la dieta control (CON). De tal manera que recibieron seis días de dieta control seguido de un día con la dieta sobrenutrida. Se verificó que con esta alternancia en la dieta, las conejas gestaran de manera exitosa, pero que mantuviera el perfil metabólico previamente desarrollado únicamente por la dieta SN, como son dislipidemia e hiperglucemia (Viveros Moreno, 2016). Por lo tanto, en la semana 10 del consumo de la dieta, las hembras SN ya estaban alternando entre las dietas, como preparación para el apareo.

De acuerdo a los datos reportados por el laboratorio de la doctora Caldelas, y que aún no han sido publicados, por lo que no serán explícitamente presentados en este trabajo, la alternancia entre las dietas en el grupo sobrenutrido (SN) de la semana 8 a la 10, mantuvo una concentración elevada de glucosa, colesterol total, LDL y HDL en sangre, en comparación con el grupo control (CON). Sin embargo, la concentración de ácidos grasos libres (AGL o AGNE) disminuyó de la semana 8 a la 10 en el grupo SN (Caldelas, manuscrito en revisión, 2020). Llama la atención que en la etapa de preparación para la cruce, en la cual las hembras del grupo SN alteraron entre dietas, la actividad de las calpaínas en linfocitos incrementó al mismo tiempo que la concentración de AGL en sangre disminuyó, ya que estos dos fenómenos están asociados a cambios en la resistencia a la insulina (Boden, 2003). Pareciera ser que ambos marcadores son más sensibles a detectar los cambios en la dieta, a diferencia de la glucosa, colesterol total, LDL y HDL en sangre.

Actividad de calpaínas en linfocitos de crías expuestas de manera intrauterina a una dieta alta en lípidos y carbohidratos

Para estudiar los efectos de la dieta materna a la exposición intrauterina, las crías fueron alimentadas por madres nodrizas por 10 minutos al día que durante toda su

vida recibieron una dieta CON, y posterior al destete, fueron mantenidas con el mismo régimen. De manera interesante, se encontró que la actividad de las calpaínas en linfocitos de crías de 10 semanas de edad expuestas *in utero* a la dieta SN, tiende a ser menor que el grupo control. Lo que sugiere que la funcionalidad de las calpaínas en los linfocitos en edad temprana podría estar afectada por la dieta materna. También se encontró que en el grupo proveniente de madres sobrenutridas, la actividad de las calpaínas se normalizó de la semana 13 a la 57 de edad, es importante recalcar que durante todo este tiempo los conejos continuaron con la dieta CON. Lo anterior apunta a que los factores ambientales, como los hábitos alimenticios, pueden influir en restablecer la actividad normal de las calpaínas. De tal manera que la dieta intrauterina por sí sola no afecta la programación del sistema de calpaínas en las crías de manera permanente, siempre y cuando se mantenga una alimentación balanceada.

Sería interesante investigar si la disminución en la actividad de las calpaínas a las 10 semanas de edad fue causada por un cambio en la expresión de los genes de esta superfamilia de proteasas. Se sabe que el ambiente intrauterino desfavorable puede cambiar el perfil epigenético del producto, haciéndolo susceptible a ciertas patologías. Por ejemplo, un estudio en roedores (Keleher y cols., 2018), comprobó que una dieta materna alta en grasa es capaz de alterar la metilación del DNA, modificando la expresión de cientos de genes involucrados en el procesamiento de RNA, la respuesta inmune, la función mitocondrial, procesos de catabolismo de proteínas y genes que previamente se han visto ligados a ECV y obesidad. También se comprobó que estos efectos epigenéticos pueden perdurar en la etapa adulta y estar acompañado de cambios fenotípicos relevantes en obesidad, hipertensión y diabetes en ratones (Keleher y cols., 2018). En otros estudios en ratón, se encontró que las alteraciones en la metilación de genes importantes para la homeostasis energética, como ADIPOQ y LEP, que codifican para adiponectina y leptina respectivamente, pueden persistir hasta por tres generaciones, a pesar de la dieta materna *in utero* subsecuente (Block & El-Osta, 2017; Masuyama y cols., 2015). Hasta ahora no se ha reportado que cambios en la dieta alteren la metilación de los genes de la familia de las calpaínas.

Expresión de las calpaínas en tejidos de las crías después de un reto metabólico

Para saber si la dieta materna y la dieta de las crías en la etapa adulta, son factores importantes para la expresión de las calpaínas involucradas en el metabolismo de la glucosa, se evaluó el perfil de las calpaínas CAPN1, CAPN2, CAPN10 y CAST en el tejido hepático y muscular de las crías después de ser alimentadas con la dieta CON o SN por un mes. Se determinó estudiar a las

calpaínas en estos tejidos, debido a su importancia en el metabolismo y la homeostasis de la glucosa.

Cuando se evaluaron CAPN1 y CAPN2 por Western Blot, se encontraron dos bandas inmunoreactivas, de aproximadamente 75 y 65 kDa, que corresponden a la proteína entera y al fragmento generado por autólisis. Para CAPN10 se encontraron isoformas diferentes de acuerdo al tejido evaluado. En el hígado se encontraron cuatro isoformas de CAPN10, de 75, 60, 50 y 45 kDa aproximadamente, siendo la de 75 kDa la de menor expresión. Mientras que en músculo se encontraron cinco isoformas, de 100, 75, 60, 50 y 45 kDa respectivamente. Esto indica que el perfil de isoformas de CAPN10 puede variar entre tejidos del mismo organismo. Experimentos en el laboratorio han replicado este fenómeno en tejidos de ratón (Pánico y cols., 2020). Se ha reportado que CAST tiene una migración irregular en electroforesis en gel de poli(acrilamida) que no corresponde con su peso molecular, y puede ubicarse entre los 170 y 110 kDa de acuerdo al tejido y organismo de origen. Además esta proteína puede tener isoformas generadas por empalme alternativo o por modificaciones postraduccionales (M. Maki & Hitomi, 2000). En el trabajo presente, se encontraron tres isoformas de CAST en el hígado de conejo, de 150, 90 y 70 kDa respectivamente; mientras que en músculo se encontró únicamente la isoforma de 150 kDa.

El hígado es el órgano esencial para el metabolismo al mantener la homeostasis del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. Sus funciones metabólicas están estrictamente controladas por múltiples señales nutricionales, hormonales y neuronales y, en situaciones de sobrecarga de energía crónica, el hígado puede funcionar como reserva de altas cantidades de lípidos, resultando en el desarrollo de esteatosis hepática y esteatohepatitis (Asrih & Jornayvaz, 2015). Por otra parte, la resistencia a la insulina, asociada a obesidad y DT2, es considerada como el factor clave que relaciona al hígado graso no alcohólico (HGNA) con el síndrome metabólico (SM), ya que conduce a una alteración en el metabolismo de lípidos, incrementando la oxidación y la captación hepática de lípidos, lo que exacerba la esteatosis hepática, que conlleva a fibrosis, falla hepática y finalmente a carcinoma hepatocelular (Asrih & Jornayvaz, 2015).

En nuestro modelo, el consumo de la dieta alta en lípidos y carbohidratos por un mes en la etapa adulta promovió un incremento de la acumulación de lípidos en los hepatocitos e inicios de fibrosis (comprobado mediante ensayos histológicos), sobretodo en las crías que también fueron expuestas a la dieta sobrenutrida *in utero* (Caldelas, manuscrito en proceso). Esto indica que la dieta materna es un factor que puede promover las alteraciones hepáticas causadas por una dieta alta en grasas y en carbohidratos. Por otra parte, se encontró que la abundancia de

CAPN1 incrementa significativamente en los conejos alimentados con la dieta sobrenutrida en el reto metabólico con respecto a la dieta control. Además, se encontró que el incremento de CAPN1 en hígado es aún mayor en las crías provenientes de madres sobrenutridas, esto sugiere que CAPN1 podría estar relacionada con el desarrollo de HGNA por una dieta alta en carbohidratos y lípidos. Por otra parte, no se encontraron cambios en la abundancia de CAPN2, CAPN10, ni del inhibidor endógeno, CAST en el hígado de las crías de ningún grupo. Ya que la expresión de CAST no fue afectada por la dieta, la abundancia y función de las calpaínas en este órgano podrían estar reguladas a otro nivel que no sea necesariamente por la actividad de su inhibidor; como son la regulación postranscripcional o modificaciones postraduccionales. Se debe considerar, en el futuro, evaluar el nivel de mRNA de CAPN1, CAPN2 y CAPN10, ya que esto nos daría un mejor panorama sobre la regulación de las calpaínas.

CAPN1 y CAPN2 son proteínas estructurales y funcionalmente muy similares (Ono & Sorimachi, 2012); sin embargo, podrían tener un papel de forma tejido-específico y especie-específico. Probablemente, por esta especificidad encontramos diferentes alteraciones de estas calpaínas de acuerdo al tejido estudiado en el conejo; aunque, esencialmente, pueden tener la misma función. También se debe tomar en cuenta que el sistema de calpaínas ha sido poco caracterizado en el conejo.

En investigaciones anteriores, *in vitro* (en células HepG2) (Yuasa y cols., 2016) e *in vivo*, (roedores y patos) (Awde y cols., 2013; Liu y cols., 2016; Zhao y cols., 2016) se ha encontrado que la exposición a altas concentraciones de glucosa, y la presencia de diabetes u obesidad, incrementa la expresión, actividad y liberación de calpaínas, entre las que destaca CAPN2, en hepatocitos con esteatosis. Esta liberación de calpaínas promueve la extensión del daño en las células periféricas, mediante la degradación de la membrana celular causada por su actividad de proteasa. Específicamente, se ha encontrado que un incremento en la CAPN2, causado por esteatosis hepática, disminuye la capacidad autofágica del tejido. La autofagia es un mecanismo importante para la degradación y el reuso de los organelos y restos celulares; para así, mantener las funciones del órgano (Awde y cols., 2013; Liu y cols., 2016; Sawant y cols., 2006; Yang y cols., 2010; Zhao y cols., 2016). Debido al alto grado de homología entre las calpaínas convencionales, CAPN1 puede tener funciones similares en el hígado del conejo, que las descritas anteriormente de CAPN2 en el hígado de otros modelos. Por lo tanto, el incremento en la expresión de CAPN1, causado por la exposición a la dieta SN *in útero* y en la edad adulta, podría promover la progresión del daño.

Hasta ahora, solo se han publicado dos investigaciones sobre el efecto de la dieta materna sobre la actividad y expresión de las calpaínas en las crías. Dichos

estudios tuvieron como objetivo determinar cuál es la mejor dieta materna para mantener la calidad de la carne de res, debido a que las calpaínas se consideran un factor importante para la calidad de la carne (Lian, Wang, & Liu, 2013). En uno de estos trabajos se describió que una dieta alta en carbohidratos, lípidos y proteínas, *in utero*, incrementa la expresión de CAPN1 en el músculo del feto (Jennings y cols., 2016) sin generar cambios en CAPN2 o CAST. Por consecuencia, en estos fetos, con mayor expresión de CAPN1, se esperaría encontrar alteraciones estructurales en el tejido muscular; ya sea un aumento en las vesículas lipídicas, o incluso un rompimiento de las fibras musculares.

Nuestros datos muestran que la dieta SN materna y la dieta reto, no alteraron la expresión de CAPN1, CAPN10 y CAST en el músculo de los conejos crías. Sin embargo, se encontró que la abundancia de CAPN2 en músculo de conejo incrementa en las crías alimentadas en el reto con la dieta SN, siendo significativamente mayor en el grupo proveniente de las madres SN. Es decir, la dieta materna es un factor que potencia las alteraciones causadas por la dieta del individuo. De manera similar al hígado en situaciones de sobrenutrición, el músculo puede sufrir de resistencia a la insulina, acumulación de lípidos y esteatosis; lo que podría afectar la integridad de las fibras musculares (Goodpaster & Wolf, 2004). Hasta el momento no se ha reportado si CAPN2 tiene un papel en la progresión del daño por esteatosis muscular; por lo que este trabajo sería el primero en reportar que CAPN2 podría estar involucrado en el daño muscular causado por una dieta alta en lípidos y carbohidratos en conejos. Sin embargo, se deben hacer más estudios para establecer el estado del tejido muscular en conejos con la dieta sobrenutrida.

Se ha descrito que CAPN2 es capaz de alterar la señalización de la insulina, ya que se ha reportado que es capaz de cortar la fracción extracelular del receptor de insulina (Yuasa et al., 2016). Un incremento en la expresión de CAPN2 en el músculo de los conejos alimentados con una dieta SN, sugeriría que los receptores de insulina de la membrana celular de los miocitos son más susceptibles a ser escindidos por CAPN2. La alteración en la señalización de la insulina provocaría una resistencia a la insulina en el músculo esquelético. Ya que el músculo es el órgano con mayor captación de glucosa en el organismo, se incrementaría la concentración de glucosa en sangre, lo que conduciría a una sobrecarga del páncreas para contrarrestar la resistencia a la insulina. La resistencia a la insulina en tejido muscular también causa un incremento intramiocelular de lípidos y una disminución en la captación de glucosa. Por otra parte, se han encontrado evidencias de que la resistencia a la insulina en tejido muscular, altera la sensibilidad a la insulina y la redistribución de sustratos en el hígado, lo que promueve alteraciones en el metabolismo de lípidos y esteatosis

hepática (Petersen et al., 2007). Con el tiempo, las células β -pancreáticas no secretan la insulina suficiente para compensar la resistencia a la insulina, y como resultado se genera DT2 (Samson & Garber, 2014).

Para determinar si hay alguna relación entre la abundancia de las calpaínas en los tejidos estudiados y la concentración de los parámetros bioquímicos que comúnmente están alterados en diabetes y SM, se realizó un análisis de correlación Spearman. Debido a que el ciclo circadiano es importante para la investigación que se está realizando en paralelo, se tomaron muestras de sangre al inicio del ciclo de luz (ZT00) y al inicio del ciclo de la oscuridad (ZT12). Se decidió analizar los datos de manera separada de acuerdo al tiempo de toma e muestra, ya que la variación entre los valores encontrados cambia conforme al momento del día.

Se descubrieron correlaciones positivas entre la abundancia de CAPN1, CAPN2 y algunas isoformas de CAST en hígado, con la concentración de colesterol total y LDL en sangre, y se encontró que la dieta reto es un factor importante para el comportamiento de estas asociaciones. Por otra parte, se encontraron correlaciones negativas entre la abundancia de CAST de 90 kDa en hígado con la concentración de AGL y TG en sangre. De este análisis, destacan los resultados de la correlación significativa entre el índice de CAPN1 con la concentración de colesterol y LDL en sangre a tiempo ZT12 (**$r=0.8$, $p=0.0006$ y $r=0.72$, $p=0.0038$** respectivamente). Con este análisis se concluye que a mayor concentración de colesterol total y LDL en sangre, mayor es la actividad de CAPN1 en el hígado, y que dichos factores se incrementan por una dieta alta en lípidos y carbohidratos.

La presencia de uno o más marcadores de dislipidemia (niveles elevados de colesterol total, TG y LDL, y valores disminuidos de HDL en suero), incrementa el riesgo de desarrollar HGNA (Peng, Mo, & Tian, 2017; Sun y cols., 2016), el cual se caracteriza por una acumulación de lípidos en el hígado que promueve el daño celular, inflamación y fibrosis hepática. Anteriormente se ha descrito que las calpaínas alteran el mecanismo de autofagia en esteatosis hepática (Zhao et al., 2016), y que son capaces de exacerbar el daño a las células periféricas al ser liberada por hepatocitos necróticos (Limaye y cols., 2003; Mehendale & Limaye, 2005). En estos trabajos se encontró que en individuos con niveles alterados de lípidos en sangre, y que presentan esteatosis hepática, tienen alteraciones en la función de las calpaínas en el hígado. En nuestro modelo se encontró que la dieta *in utero* y la dieta reto sobrenutridas generan una dislipidemia y promueven la acumulación de lípidos en los hepatocitos de conejo, lo cual podría estar relacionado con las alteraciones en la abundancia de CAPN1 en estos individuos. Sería interesante estudiar histológicamente la localización celular de CAPN1 en hepatocitos con esteatosis de los conejos alimentados con la dieta SN; ya que se

podría hacer una mejor asociación entre la concentración y la actividad de CAPN1, con la acumulación de lípidos en estas células.

En las asociaciones entre la abundancia de las calpaínas en músculo y los parámetros bioquímicos medidos en sangre, se encontraron correlaciones positivas entre la abundancia de CAPN2 entera, con la concentración de LDL en sangre en los tiempos ZT00 y ZT12, es decir, a mayor concentración de LDL en sangre, mayor es la abundancia de CAPN2 en músculo. Como se describió anteriormente, CAPN2 podría estar involucrado en la resistencia a la insulina en músculo. Esta resistencia promueve alteraciones en el metabolismo de los lípidos, que podría reflejarse como un incremento de LDL u otros metabolitos en sangre. Por otra parte, se encontraron correlaciones negativas de diversas isoformas de CAPN10 en músculo con la concentración de AGL en sangre. Las concentraciones plasmáticas de AGL están estrechamente relacionadas con resistencia a la insulina, además de que promueve la acumulación intramuscular de lípidos, por lo tanto, a mayor concentración de AGL, mayor es la resistencia a la insulina (Boden, 2003; Delarue & Magnan, 2007). En el laboratorio, se ha encontrado que los linfocitos de pacientes con DT2, enfermedad caracterizada por resistencia a la insulina, presentan una disminución en la actividad de las calpaínas, siendo la CAPN10 la principal proteasa responsable de la actividad (Salazar y cols., 2019). De manera paralela, nosotros encontramos que en el hígado de conejos que presentan niveles elevados de AGL en sangre, tienen una menor expresión de isoformas de CAPN10, lo que sugiere que en condiciones metabólicas que promueven la resistencia a la insulina, la expresión de CAPN10 puede estar desregulada en diversos tejidos. En conclusión, las asociaciones encontradas demuestran que la abundancia de las calpaínas en los tejidos evaluados tiene una estrecha relación con los parámetros bioquímicos que están típicamente alterados en el SM.

Para determinar si la expresión de las calpaínas está regulada de manera diferente, se realizó un análisis de correlación entre las calpaínas evaluadas en el hígado y músculo de los conejos. Se encontró una correlación altamente positiva entre las diferentes isoformas de CAPN10, tanto en el tejido muscular como en el hepático. Se esperaba este resultado debido a que estas isoformas, causadas por empalme alternativo, se expresan en conjunto.

Por otra parte, en tejido hepático se encontraron correlaciones negativas entre CAPN1 entera y las isoformas de CAPN10, es decir, en los conejos con mayor abundancia de CAPN1, tienen menor abundancia de CAPN10, y viceversa. El comportamiento opuesto en la expresión proteica de estas calpaínas sugiere que podrían tener funciones contrarias en el hígado, como se ha propuesto anteriormente en otros tipos celulares. En el laboratorio se encontró que, en

células Jurkat, CAPN1 inhibe la captación de glucosa, mientras que CAPN10 la promueve (Pánico y cols., 2019). Las evidencias sugieren que CAPN10 podría tener un papel en la regulación de la translocación y abundancia de los transportadores de glucosa en diferentes tejidos. En el hígado, la glucosa es transportada al interior y al exterior de las células mediante el transportador de membrana GLUT2, el cual es independiente de insulina, no es saturable y es de baja afinidad a la glucosa. Hasta ahora no se ha encontrado que las calpaínas tengan un papel en la función del transportador GLUT2. Debido a que la regulación y actividad de GLUT2 son muy diferentes al de los transportadores GLUT1 y GLUT4, los cuales sí interactúan con las calpaínas (Otani et al., 2004; Pánico et al., 2019; Paul et al., 2003), es posible que las calpaínas tengan una función en el hígado diferente a la regulación de los transportadores de glucosa, pero que, de igual manera, CAPN1 y CAPN10 tengan funciones contrarias.

Finalmente, los datos de este trabajo aportan evidencia de que la dieta materna y la dieta individual pueden causar y exacerbar cambios en la actividad y abundancia proteica de las calpaínas, las cuales podrían tener una función tejido-específica y que podrían estar involucrados en el daño causado por la acumulación de lípidos en los tejidos. Además, sugiere que el sistema de calpaínas podría ser de importancia para estudiar el pronóstico de enfermedades como DT2 o SM.

CONCLUSIONES

- La actividad general de las calpaínas en linfocitos de conejo no es dependiente de las concentraciones de glucosa extracelular evaluadas.
- La dieta sobrenutrida disminuye la actividad general de las calpaínas en linfocitos de conejo.
- La tendencia en la disminución en la actividad de las calpaínas en las crías jóvenes expuestas *in utero* a una dieta sobrenutrida, y su restablecimiento al ser alimentadas con la dieta control, muestra que la dieta materna puede afectar a la funcionalidad de las calpaínas en los linfocitos de las crías, reflejo de posibles alteraciones metabólicas, como resistencia a la insulina o predisposición a desarrollar DT2. Sin embargo, este efecto puede ser corregido por los hábitos alimenticios del individuo.
- Las crías expuestas a un reto alimenticio con la dieta sobrenutrida durante un mes, mostraron un incremento en la abundancia de CAPN1 en hígado, y de CAPN2 en músculo. Lo que indica que las consecuencias de una dieta desequilibrada pueden alterar la expresión de las calpaínas de manera tejido-específica. Este efecto es más significativo en los conejos provenientes de madres sobrenutridas, demostrando que la dieta materna, antes y durante el embarazo, puede inducir una desregulación de las calpaínas asociadas a alteraciones metabólicas en diversos tejidos importantes para el metabolismo; que pueden ser detonados por los hábitos alimenticios en la etapa adulta.
- Las correlaciones encontradas entre la concentración de diversos lípidos en sangre, con la abundancia de las calpaínas en los tejidos importantes para el metabolismo, sugieren que las calpaínas pueden estar involucradas en las consecuencias metabólicas causadas por una dieta desequilibrada, como son la acumulación lipídica intracelular y la resistencia a la insulina.

PERSPECTIVAS

La evaluación de las calpaínas en tejidos de animales sometidos a dietas altas en nutrientes ha sido un campo poco estudiado, ya que hasta hace pocos años se les había conferido una función principal en la calidad y suavidad de la carne en la industria alimentaria. Sin embargo, últimamente se ha encontrado que tienen un papel importante en condiciones como DT2 y SM. Este trabajo es el primero en presentar los efectos de una dieta materna alta en nutrientes sobre las calpaínas importantes para el metabolismo en tejido hepático y muscular de conejo. Por esta razón es de gran importancia hacer un seguimiento sobre los efectos de las calpaínas en dichos tejidos.

Sería interesante investigar cuál es el efecto de la dieta sobrenutrida, tanto materna como en la etapa adulta, en la integridad del tejido muscular mediante técnicas histológicas, de esta manera podría comparar posibles alteraciones como la acumulación de vesículas lipídicas o el rompimiento de las fibras musculares con las calpaínas.

En un futuro, se podría determinar la actividad de las calpaínas en estos tejidos mediante ensayos de zimogramas, lo cual nos podría dar un mayor panorama sobre el efecto de la dieta sobrenutrida en la función de las calpaínas.

Dado que se encontraron correlaciones interesantes entre la concentración de lípidos en sangre y la abundancia de las calpaínas, nos surge la pregunta de si una condición dislipidémica actúa directamente sobre las calpaínas. Para responder a esta pregunta, sería necesario hacer estudios *in vitro*, por ejemplo, se podrían tratar líneas celulares de hepatocitos o miocitos con ácidos grasos para determinar si la actividad o la expresión de las calpaínas cambian con el tratamiento, y posteriormente estudiar los posibles mecanismos por los cuales se llevaría a cabo.

REFERENCIAS

- Aceti, A., Santhakumaran, S., Logan, K., Philipps, L., Prior, E., & Gale, C. et al. (2012). The diabetic pregnancy and offspring blood pressure in childhood: a systematic review and meta-analysis. *Diabetologia*, 55(11), 3114-3127. doi: 10.1007/s00125-012-2689-8
- Aguilar-Salinas, C. A., Rojas, R., Gómez-Pérez, F. J., Valles, V., Ríos-Torres, J. M., Franco, A., ... Sepúlveda, J. (2004). High prevalence of metabolic syndrome in Mexico. *Archives of Medical Research*, 35(1), 76–81. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2003.06.006>
- Arias-Mutis, O. J. J., Marrachelli, V. G., Ruiz-Saurí, A., Alberola, A., Morales, J. M., Such-Miquel, L., ... Zarzoso, M. (2017). Development and characterization of an experimental model of diet-induced metabolic syndrome in rabbit. 12(5), e0178315. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178315>
- Asrih, M., & Jornayvaz, F. R. (2015, diciembre 15). Metabolic syndrome and nonalcoholic fatty liver disease: Is insulin resistance the link? *Molecular and Cellular Endocrinology*, Vol. 418, pp. 55–65. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.02.018>
- Awde, S., Marty-Gasset, N., Wilkesman, J., & Remignon, H. (2013). Proteolytic activity alterations resulting from force-feeding in Muscovy and Pekin ducks. *Poultry Science*, 92(11), 2997–3002. <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03195>
- Barker, D. J. P., & Osmond, C. (1986). INFANT MORTALITY, CHILDHOOD NUTRITION, AND ISCHAEMIC HEART DISEASE IN ENGLAND AND WALES. *The Lancet*, 327(8489), 1077–1081. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(86\)91340-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(86)91340-1)
- Block, T., & El-Osta, A. (2017, noviembre 1). Epigenetic programming, early life nutrition and the risk of metabolic disease. *Atherosclerosis*, Vol. 266, pp. 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.09.003>
- Boden, G. (2003, mayo 4). Effects of free fatty acids (FFA) on glucose metabolism: Significance for insulin resistance and type 2 diabetes. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*, Vol. 111, pp. 121–124. <https://doi.org/10.1055/s-2003-39781>
- Branca, D. (2004). Calpain-related diseases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 322(4), 1098–1104. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.07.126>
- Brown, A. E., Yeaman, S. J., & Walker, M. (2007). Targeted suppression of calpain-10 expression impairs insulin-stimulated glucose uptake in cultured primary human skeletal muscle cells. *Molecular genetics and metabolism*, 91(4), 318–324. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2007.05.001>
- Brown, L., & Panchal, S. K. (2011). Rodent models for metabolic syndrome research. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Vol. 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/351982>
- Castro-Martínez, M. G., Banderas-Lares, D. Z., Ramírez-Martínez, J. C., & Escobedo-de la Peña, J. (s/f). Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in subjects with metabolic syndrome. *Cirugía y cirujanos*, 80(2), 128–133.

- Chavatte-Palmer, P., Tarrade, A., & Rousseau-Ralliard, D. (2016). Diet before and during pregnancy and offspring health: The importance of animal models and what can be learned from them. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(6). <https://doi.org/10.3390/ijerph13060586>
- Covington, M. D., & Schnellmann, R. G. (2012). Chronic high glucose downregulates mitochondrial calpain 10 and contributes to renal cell death and diabetes-induced renal injury. *Kidney International*, 81(4), 391–400. <https://doi.org/10.1038/KI.2011.356>
- Delarue, J., & Magnan, C. (2007, marzo). Free fatty acids and insulin resistance. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, Vol. 10, pp. 142–148. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e328042ba90>
- Díaz-Villaseñor, A., Hiriart, M., Cebrián, M. E., Zacarías-Castillo, R., & Ostrosky-Wegman, P. (2008). The activity of calpains in lymphocytes is glucose-dependent and is decreased in diabetic patients. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 40(3), 414–419. <https://doi.org/10.1016/J.BCMD.2007.08.009>
- Donkor, I. O. (2015, enero 1). An updated patent review of calpain inhibitors (2012-2014). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, Vol. 25, pp. 17–31. <https://doi.org/10.1517/13543776.2014.982534>
- Dunford, A. R., & Sangster, J. M. (2017, diciembre 1). Maternal and paternal periconceptional nutrition as an indicator of offspring metabolic syndrome risk in later life through epigenetic imprinting: A systematic review. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*, Vol. 11, pp. S655–S662. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2017.04.021>
- Eatwell, K. (2008). BSAVA Manual of Rabbit Medicine and Surgery. *Journal of Small Animal Practice*, 49(8), 427–427. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2008.00571.x>
- Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2016 - Medio camino. (2020). Recuperado de <https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2016/informes.php>
- Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018. (2020). Informe de resultados. Recuperado de <https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/informes.php>
- Expert Panel on Detection Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. (2001). Executive Summary of the Third Report (NCEP) -Adult Treatment Panel III. *Journal of American Medical Association*, 285, 2486–2497. <https://doi.org/10.1001/jama.285.19.2486>
- Fan, J., & Watanabe, T. (2003). Transgenic rabbits as therapeutic protein bioreactors and human disease models. *Pharmacology & Therapeutics*, 99(3), 261–282. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(03\)00069-X](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(03)00069-X)
- Fischer, B., Chavatte-Palmer, P., Viebahn, C., Navarrete Santos, A., & Duranthon, V. (2012). Rabbit as a reproductive model for human health. *Reproduction*, 144(1), 1–10. <https://doi.org/10.1530/REP-12-0091>
- Flores-Martínez, S. E., Castro-Martínez, A. G., López-Quintero, A., García-Zapién, A. G., Torres-Rodríguez, R. N., & Sánchez-Corona, J. (s/f). [Association analysis of SNP-63 and indel-19 variant in the calpain-10 gene with polycystic ovary syndrome in women

of reproductive age]. *Cirugia y cirujanos*, 83(1), 35–42.
<https://doi.org/10.1016/j.circir.2015.04.021>

- Furukawa, S., Kuroda, Y., & Sugiyama, A. (2014). A comparison of the histological structure of the placenta in experimental animals. *Journal of toxicologic pathology*, 27(1), 11–18. <https://doi.org/10.1293/tox.2013-0060>
- Gallagher, E., Newman, J., Green, L., & Hanson, M. (2005). The effect of low protein diet in pregnancy on the development of brain metabolism in rat offspring. *The Journal Of Physiology*, 568(2), 553-558. doi: 10.1113/jphysiol.2005.092825
- Goodpaster, B. H., & Wolf, D. (2004). Skeletal muscle lipid accumulation in obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes. *Pediatric Diabetes*, 5(4), 219–226.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-543X.2004.00071.x>
- Ghosh P, Bitsanis D, Ghebremeskel K, Crawford MA, Poston L. (2011). Abnormal aortic fatty acid composition and small artery function in offspring of rats fed a high fat diet in pregnancy. *J Physiol* 533, 815–822
- Han, Q., Liu, Q., Zhang, H., Lu, M., Wang, H., Tang, F., & Zhang, Y. (2019). Simvastatin improves cardiac hypertrophy in diabetic rats by attenuation of oxidative stress and inflammation induced by calpain1-mediated activation of nuclear factor-kb (Nf-kb). *Medical Science Monitor*, 25, 1232–1241. <https://doi.org/10.12659/MSM.913244>
- Hanson, M. A., & Gluckman, P. D. (2014, octubre 1). Early developmental conditioning of later health and disease: physiology or pathophysiology? *Physiological reviews*, Vol. 94, pp. 1027–1076. <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2013>
- Hardy, O. T., Czech, M. P., & Corvera, S. (2012, abril). What causes the insulin resistance underlying obesity? *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, Vol. 19, pp. 81–87. <https://doi.org/10.1097/MED.0b013e3283514e13>
- Horikawa, Y., Oda, N., Cox, N. J., Li, X., Orho-Melander, M., Hara, M., ... Bell, G. I. (2000). Erratum: Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nature Genetics*, 26(2), 163–175.
<https://doi.org/10.1038/79876>
- Houde, A., Guay, S., Desgagné, V., Hivert, M., Baillargeon, J., & St-Pierre, J. et al. (2013). Adaptations of placental and cord blood ABCA1 DNA methylation profile to maternal metabolic status. *Epigenetics*, 8(12), 1289-1302. doi: 10.4161/epi.26554.
- Huang, C., Li, Z., Wang, M., & Martorell, R. (2010). Early Life Exposure to the 1959–1961 Chinese Famine Has Long-Term Health Consequences. *The Journal of Nutrition*, 140(10), 1874–1878. <https://doi.org/10.3945/jn.110.121293>
- Huang, W., Metlakunta, A., Dedousis, N., Zhang, P., Sipula, I., Dube, J. J., ... O'Doherty, R. M. (2010). Depletion of liver kupffer cells prevents the development of diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *Diabetes*, 59(2), 347–357.
<https://doi.org/10.2337/db09-0016>
- Hult, M., Tornhammar, P., Ueda, P., Chima, C., Bonamy, A. K. E., Ozumba, B., & Norman, M. (2010). Hypertension, diabetes and overweight: Looming legacies of the biafran famine. *PLoS ONE*, 5(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013582>

- Jennings, T. D., Gonda, M. G., Underwood, K. R., Wertz-Lutz, A. E., & Blair, A. D. (2016). The influence of maternal nutrition on expression of genes responsible for adipogenesis and myogenesis in the bovine fetus. *animal*, 10(10), 1697–1705. <https://doi.org/10.1017/S1751731116000665>
- Kang, E. S., Nam, M., Kim, H. J., Kim, H. J., Myoung, S. M., Rhee, Y., ... Lee, H. C. (2006). Haplotype combination of Calpain-10 gene polymorphism is associated with metabolic syndrome in type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 73(3), 268–275. <https://doi.org/10.1016/J.DIABRES.2006.01.011>
- Keleher, M. R., Zaidi, R., Shah, S., Oakley, M. E., Pavlatos, C., Idrissi, S. El, ... Cheverud, J. M. (2018). Maternal high-fat diet associated with altered gene expression, DNA methylation, and obesity risk in mouse offspring. *PLoS ONE*, 13(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192606>
- Li, Y., Li, Y., Feng, Q., Arnold, M., & Peng, T. (2009). Calpain activation contributes to hyperglycaemia-induced apoptosis in cardiomyocytes. *Cardiovascular Research*, 84(1), 100–110. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp189>
- Li, Yanping, Jaddoe, V. W., Qi, L., He, Y., Lai, J., Wang, J., ... Ma, G. (2011). Exposure to the Chinese famine in early life and the risk of hypertension in adulthood. *Journal of Hypertension*, 29(6), 1085–1092. <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e328345d969>
- Lian, T., Wang, L., & Liu, Y. (2013, marzo). A new insight into the role of calpains in post-mortem meat tenderization in domestic animals: A review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, Vol. 26, pp. 443–454. <https://doi.org/10.5713/ajas.2012.12365>
- Limaye, P. B., Apte, U. M., Shankar, K., Bucci, T. J., Warbritton, A., & Mehendale, H. M. (2003). Calpain released from dying hepatocytes mediates progression of acute liver injury induced by model hepatotoxicants. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 191(3), 211–226. [https://doi.org/10.1016/S0041-008X\(03\)00250-3](https://doi.org/10.1016/S0041-008X(03)00250-3)
- Liu, A., Guo, E., Yang, J., Li, R., Yang, Y., Liu, S., ... Ouyang, M. (2016). Ischemic preconditioning attenuates ischemia/reperfusion injury in rat steatotic liver: role of heme oxygenase-1-mediated autophagy. *Oncotarget*, 7(48), 78372–78386. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13281>
- Łopatniuk, P., & Witkowski, J. M. (2011). Conventional calpains and programmed cell death. *Acta Biochimica Polonica*, Vol. 58, pp. 287–296. https://doi.org/10.18388/abp.2011_2238
- Lozano, W. M., Arias-Mutis, O. J., Calvo, C. J., Chorro, F. J., & Zarzoso, M. (2019). Diet-Induced Rabbit Models for the Study of Metabolic Syndrome. *Animals*, 9(7), 463. <https://doi.org/10.3390/ani9070463>
- Lusis, A. J., Attie, A. D., & Reue, K. (2008, noviembre). Metabolic syndrome: From epidemiology to systems biology. *Nature Reviews Genetics*, Vol. 9, pp. 819–830. <https://doi.org/10.1038/nrg2468>
- Mackenzie, R. W., & Elliott, B. T. (2014). Akt/PKB activation and insulin signaling: a novel insulin signaling pathway in the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity : targets and therapy*, 7, 55–64. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S48260>

- Maki, M., & Hitomi, K. (2000). Preparation of calpastatin samples for western blotting. En: Elce J.S. (eds) *Calpain Methods and Protocols. Methods in molecular biology* (Vol. 144, pp. 95–98). <https://doi.org/10.1385/1-59259-050-0:95>
- Maki, Masatoshi, Takano, E., Mori, H., Sato, A., Murachi, T., & Hatanaka, M. (1987). All four internally repetitive domains of pig calpastatin possess inhibitory activities against calpains I and II. *FEBS Letters*, 223(1), 174–180. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(87\)80531-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(87)80531-8)
- Marciniak, A., Patro-Małysza, J., Kimber-Trojnar, Ż., Marciniak, B., Oleszczuk, J., & Leszczyńska-Gorzela, B. (2017). Fetal programming of the metabolic syndrome. *Taiwanese journal of obstetrics & gynecology*, 56(2), 133–138. <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2017.01.001>
- Marshall, C., Hitman, G. A., Partridge, C. J., Clark, A., Ma, H., Shearer, T. R., & Turner, M. D. (2005). Evidence that an isoform of calpain-10 is a regulator of exocytosis in pancreatic β -cells. *Molecular Endocrinology*, 19(1), 213–224. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0064>
- Masuyama, H., Mitsui, T., Nobumoto, E., & Hiramatsu, Y. (2015). The Effects of High-Fat Diet Exposure In Utero on the Obesogenic and Diabetogenic Traits Through Epigenetic Changes in Adiponectin and Leptin Gene Expression for Multiple Generations in Female Mice. *Endocrinology*, 156(7), 2482–2491. <https://doi.org/10.1210/en.2014-2020>
- McCracken, E., Monaghan, M., & Sreenivasan, S. (2018). Pathophysiology of the metabolic syndrome. *Clinics in Dermatology*, 36(1), 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2017.09.004>
- Mehendale, H. M., & Limaye, P. B. (2005). Calpain: a death protein that mediates progression of liver injury. *Trends in Pharmacological Sciences*, 26(5), 232–236. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2005.03.008>
- Menchetti, L., Brecchia, G., Canali, C., Cardinali, R., Polisca, A., Zerani, M., & Boiti, C. (2015). Food restriction during pregnancy in rabbits: Effects on hormones and metabolites involved in energy homeostasis and metabolic programming. *Research in Veterinary Science*, 98, 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.11.017>
- Monzani, A., Rapa, A., Fuiano, N., Diddi, G., Prodam, F., Bellone, S., & Bona, G. (2014). Metabolic syndrome is strictly associated with parental obesity beginning from childhood. *Clinical endocrinology*, 81(1), 45–51. <https://doi.org/10.1111/cen.12261>
- Mushtaq, S., Ali, T., Altaf, F., Abdullah, M., & Murtaza, I. (2015). Stress-responsive factor regulation in patients suffering from type 2 diabetes and myocardial infarction. *Turkish journal of medical sciences*, 45(1), 148–152. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25790544>
- Napoli, C., Witztum, J. L., Calara, F., de Nigris, F., & Palinski, W. (2000). Maternal hypercholesterolemia enhances atherogenesis in normocholesterolemic rabbits, which is inhibited by antioxidant or lipid-lowering intervention during pregnancy: an experimental model of atherogenic mechanisms in human fetuses. *Circulation research*, 87(10), 946–952. <https://doi.org/10.1161/01.RES.87.10.946>

- Neitzke, U., Harder, T., Schellong, K., Melchior, K., Ziska, T., & Rodekamp, E. et al. (2008). Intrauterine Growth Restriction in a Rodent Model and Developmental Programming of the Metabolic Syndrome: A Critical Appraisal of the Experimental Evidence. *Placenta*, 29(3), 246-254. doi: 10.1016/j.placenta.2007.11.014
- Nikolic, D., Katsiki, N., Montalto, G., Isenovic, E. R., Mikhailidis, D. P., & Rizzo, M. (2013, marzo 18). Lipoprotein subfractions in metabolic syndrome and obesity: Clinical significance and therapeutic approaches. *Nutrients*, Vol. 5, pp. 928–948. <https://doi.org/10.3390/nu5030928>
- Ono, Y., Kakinuma, K., Torii, F., Irie, A., Nakagawa, K., Labeit, S., ... Sorimachi, H. (2004). Possible regulation of the conventional calpain system by skeletal muscle-specific calpain, p94/calpain 3. *The Journal of biological chemistry*, 279(4), 2761–2771. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308789200>
- Ono, Y., Ojima, K., Torii, F., Takaya, E., Doi, N., Nakagawa, K., ... Sorimachi, H. (2010). Skeletal muscle-specific calpain is an intracellular Na⁺- dependent protease. *Journal of Biological Chemistry*, 285(30), 22986–22998. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.126946>
- Ono, Y., Saido, T. C., & Sorimachi, H. (2016). Calpain research for drug discovery: challenges and potential. *Nature reviews. Drug discovery*, 15(12), 854–876. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.212>
- Ono, Y., & Sorimachi, H. (2012). Calpains — An elaborate proteolytic system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1824(1), 224–236. <https://doi.org/10.1016/J.BBAPAP.2011.08.005>
- Ort, T., Voronov, S., Guo, J., Zawalich, K., Froehner, S. C., Zawalich, W., & Solimena, M. (2001). Dephosphorylation of β 2-syntrophin and Ca²⁺/ μ -calpain-mediated cleavage of ICA512 upon stimulation of insulin secretion. *EMBO Journal*, 20(15), 4013–4023. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.15.4013>
- Otani, K., Han, D. H., Ford, E. L., Garcia-Roves, P. M., Ye, H., Horikawa, Y., ... Polonsky, K. S. (2004). Calpain system regulates muscle mass and glucose transporter GLUT4 turnover. *Journal of Biological Chemistry*, 279(20), 20915–20920. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400213200>
- Palinski, W., D'Armiento, F. P., Witztum, J. L., de Nigris, F., Casanada, F., Condorelli, M., ... Napoli, C. (2001). Maternal hypercholesterolemia and treatment during pregnancy influence the long-term progression of atherosclerosis in offspring of rabbits. *Circulation research*, 89(11), 991–996. <https://doi.org/10.1161/HH2301.099646>
- Pánico, P., Juárez-Nájera, A., Iturriaga-Goyon, E., Ostrosky-Wegman, P., & Salazar, A. M. (2019). Arsenic impairs GLUT1 trafficking through the inhibition of the calpain system in lymphocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 380, 114700. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.114700>
- Pánico, P., Salazar, A. M., Burns, A. L., & Ostrosky-Wegman, P. (2014). Role of Calpain-10 in the Development of Diabetes Mellitus and Its Complications. *Archives of Medical Research*, 45(2), 103–115. <https://doi.org/10.1016/J.ARCMED.2014.01.005>
- Pánico, P., Hiriart, M., Ostrosky-Wegman, P., & Salazar, A. M. (2020). TUG is a calpain-10

- substrate involved in the translocation of GLUT4 in adipocytes. *Journal of Molecular Endocrinology*, 65(3), 45–57. <https://doi.org/10.1530/JME-19-0253>
- Paul, D. S., Harmon, A. W., Winston, C. P., & Patel, Y. M. (2003). Calpain facilitates GLUT4 vesicle translocation during insulin-stimulated glucose uptake in adipocytes. *Biochemical Journal*, 376(3), 625–632. <https://doi.org/10.1042/BJ20030681>
- Peng, K., Mo, Z., & Tian, G. (2017). Serum Lipid Abnormalities and Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Adult Males. Recuperado de www.amjmedsci.com
- Perez-Martinez, P., Garcia-Rios, A., Delgado-Lista, J., Perez-Jimenez, F., & Lopez-Miranda, J. (2012). Metabolic syndrome: Evidences for a personalized nutrition. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56(1), 67–76. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201100531>
- Petersen, K. F., Dufour, S., Savage, D. B., Bilz, S., Solomon, G., Yonemitsu, S., ... Shulman, G. I. (2007). The role of skeletal muscle insulin resistance in the pathogenesis of the metabolic syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(31), 12587–12594. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705408104>
- Piątkiewicz, P., Czech, A., & Tatoń, J. (2007). Glucose transport in human peripheral blood lymphocytes influenced by type 2 diabetes mellitus. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 55(2), 119–126. <https://doi.org/10.1007/s00005-007-0015-9>
- Picone, O., Laigre, P., Fortun-Lamothe, L., Archilla, C., Peynot, N., Ponter, A. A. A., ... Chavatte-Palmer, P. (2011). Hyperlipidic hypercholesterolemic diet in prepubertal rabbits affects gene expression in the embryo, restricts fetal growth and increases offspring susceptibility to obesity. *Theriogenology*, 75(2), 287–299. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2010.08.015>
- Poore, K., & Fowden, A. (2002). The effect of birth weight on hypothalamo-pituitary-adrenal axis function in juvenile and adult pigs. *The Journal Of Physiology*, 547(1), 107-116. doi: 10.1113/jphysiol.2002.024349
- Randriamboavonjy, V., Kyselova, A., Elgheznavy, A., Zukunft, S., Wittig, I., & Fleming, I. (2017). Calpain 1 cleaves and inactivates prostacyclin synthase in mesenteric arteries from diabetic mice. *Basic Research in Cardiology*, 112(1). <https://doi.org/10.1007/s00395-016-0596-8>
- Ravelli, A. C. J., Van Der Meulen, J. H. P., Michels, R. P. J., Osmond, C., Barker, D. J. P., Hales, C. N., & Bleker, O. P. (1998). Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *Lancet*, 351(9097), 173–177. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)07244-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)07244-9)
- Rochlani, Y., Pothineni, N. V., Kovelamudi, S., & Mehta, J. L. (2017). Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds. *Therapeutic advances in cardiovascular disease*, 11(8), 215–225. <https://doi.org/10.1177/1753944717711379>
- Rosser, B. G., Powers, S. P., & Gores, G. J. (1993). Calpain Activity Increases in Hepatocytes Following Addition of ATP. Demonstration by a novel fluorescent approach.

THE JOURNAL Q, 268(31), 23593–23600. Recuperado de https://mail-attachment.googleusercontent.com/attachment/u/0/?ui=2&ik=b0d10b47ff&view=att&th=1616d75c1f30eaa1&attid=0.1&disp=inline&realattid=f_jdca21ka0&safe=1&zw&sadbat=ANGjdJ9EfU1ZzO7-pdWc1XVZwvYGITFrD_qw8xr1e4fj3zg4Jar88b-6aRkoWWviZe-7d1ZGwQQnQ1dF4Hr

- Salazar, A. M., Pánico, P., Burns, A. L., Díaz-Villaseñor, A., Torres-Arellano, J. M., Juárez-Nájera, A., ... Ostrosky-Wegman, P. (2019). Calpain Activity in Leukocytes is Associated with Diabetes Biochemical Markers. *Archives of Medical Research*, 50(7), 451–460. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2019.11.009>
- Samson, S. L., & Garber, A. J. (2014). Metabolic Syndrome. *Endocrinology and Metabolism Clinics of NA*, 43, 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2013.09.009>
- Samuelsson, A., Morris, A., Igosheva, N., Kirk, S., Pombo, J., & Coen, C. et al. (2010). Evidence for Sympathetic Origins of Hypertension in Juvenile Offspring of Obese Rats. *Hypertension*, 55(1), 76-82. doi: 10.1161/hypertensionaha.109.139402
- Santuré, M., Pitre, M., Marette, A., Deshaies, Y., Lemieux, C., Larivière, R., ... Bachelard, H. (2002). Induction of insulin resistance by high-sucrose feeding does not raise mean arterial blood pressure but impairs haemodynamic responses to insulin in rats. *British Journal of Pharmacology*, 137(2), 185–196. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704864>
- Sato, Y., Kuwajima, M., Kamiya, H., & Harashima, H. (2003). Calpain 10 as a Predictive Gene for Type 2 Diabetes: Evidence from a Novel Screening System Using White Blood Cells of Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) Rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 26(12), 1765–1768. <https://doi.org/10.1248/bpb.26.1765>
- Sawant, S. P., Dnyanmote, A. V, Mitra, M. S., Chilakapati, J., Warbritton, A., Latendresse, J. R., & Mehendale, H. M. (2006a). Protective effect of type 2 diabetes on acetaminophen-induced hepatotoxicity in male Swiss-Webster mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 316(2), 507–519. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.094326>
- Senemar, S., Edraki, M. R., & Toosi, S. (2016). Association between type 2 diabetes mellitus, biochemical factors and UCSNP-43 polymorphisms of CALPIN-10 gene in patients with atherosclerosis of coronary artery disease in Southern Iran population. *Journal of Cardiovascular and Thoracic Research*, 8(1), 13–19. <https://doi.org/10.15171/jcvtr.2016.03>
- Shinkai-Ouchi, F., Koyama, S., Ono, Y., Hata, S., Ojima, K., Shindo, M., ... Sorimachi, H. (2016). Predictions of Cleavability of Calpain Proteolysis by Quantitative Structure-Activity Relationship Analysis Using Newly Determined Cleavage Sites and Catalytic Efficiencies of an Oligopeptide Array. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 15(4), 1262–1280. <https://doi.org/10.1074/mcp.M115.053413>
- Slater-Jefferies, J., Hoile, S., Lillycrop, K., Townsend, P., Hanson, M., & Burdge, G. (2010). Effect of sex and dietary fat intake on the fatty acid composition of phospholipids and triacylglycerol in rat heart. *Prostaglandins, Leukotrienes And Essential Fatty Acids (PLEFA)*, 83(4-6), 219-223. doi: 10.1016/j.plefa.2010.07.006
- Sorimachi, H., & Ono, Y. (2012, octubre 1). Regulation and physiological roles of the

- calpain system in muscular disorders. *Cardiovascular Research*, Vol. 96, pp. 11–22. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs157>
- Spencer, M. J., & Mellgren, R. L. (2002). Overexpression of a calpastatin transgene in mdx muscle reduces dystrophic pathology. *Human molecular genetics*, 11(21), 2645–2655. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.21.2645>
- Sun, D. Q., Liu, W. Y., Wu, S. J., Zhu, G. Q., Braddock, M., Zhang, D. C., ... Zheng, M. H. (2016). Increased levels of low-density lipoprotein cholesterol within the normal range as a risk factor for nonalcoholic fatty liver disease. *Oncotarget*, 7(5), 5728–5737. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6799>
- Trajkovski, M., Mziaut, H., Altkrüger, A., Ouwendijk, J., Knoch, K.-P., Müller, S., & Solimena, M. (2004). Nuclear translocation of an ICA512 cytosolic fragment couples granule exocytosis and insulin expression in β -cells. *The Journal of cell biology*, 167(6), 1063–1074. <https://doi.org/10.1083/jcb.200408172>
- Trajkovski, M., Mziaut, H., Schubert, S., Kalaidzidis, Y., Altkrüger, A., & Solimena, M. (2008). Regulation of insulin granule turnover in pancreatic beta-cells by cleaved ICA512. *The Journal of biological chemistry*, 283(48), 33719–33729. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804928200>
- Turner, M. D., Cassell, P. G., & Hitman, G. A. (2005, noviembre). Calpain-10: From genome search to function. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, Vol. 21, pp. 505–514. <https://doi.org/10.1002/dmrr.578>
- Turner, M. D., Fulcher, F. K., Jones, C. V., Smith, B. T., Aganna, E., Partridge, C. J., ... Patel, Y. M. (2007). Calpain facilitates actin reorganization during glucose-stimulated insulin secretion. *Biochemical and biophysical research communications*, 352(3), 650–655. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.11.077>
- Van Huyen, J. P. D., Vessières, E., Perret, C., Troise, A., Prince, S., Guihot, A. L., ... Fassot, C. (2010). In utero exposure to maternal diabetes impairs vascular expression of prostacyclin receptor in rat offspring. *Diabetes*, 59(10), 2597–2602. <https://doi.org/10.2337/db10-0311>
- Vickers, M., Breier, B., McCarthy, D., & Gluckman, P. (2003). Sedentary behavior during postnatal life is determined by the prenatal environment and exacerbated by postnatal hypercaloric nutrition. *American Journal Of Physiology-Regulatory, Integrative And Comparative Physiology*, 285(1), R271-R273. doi: 10.1152/ajpregu.00051.2003
- Viveros Moreno, N. G. (2016). El efecto de la sobrenutrición materna por el consumo crónico de una dieta desequilibrada sobre el estado metabólico de la descendencia, en *Oryctolagus cuniculus* (Universidad Nacional Autónoma de México). Recuperado de http://oreon.dgbiblio.unam.mx/F/MLH6Y5E8U6GKRBK45C9BFLVNMVPC7GAHT42TYGEY2CL9QAUUCM-35994?func=find-b&request=nancy+graciela+viveros&find_code=WRD&adjacent=N&local_base=TESO1&x=0&y=0&filter_code_2=WYR&filter_request_2=&filter_code_3=WYR&filter_request_3=
- Wacher-Rodarte, N. (2009). Epidemiología del síndrome metabólico II. *Gac Méd Méx*, 145(5), 384–391.

- Waqar, A. B., Koike, T., Yu, Y., Inoue, T., Aoki, T., Liu, E., & Fan, J. (2010). High-fat diet without excess calories induces metabolic disorders and enhances atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis*, 213(1), 148–155. <https://doi.org/10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2010.07.051>
- Wong, S. K., Chin, K.-Y., Suhaimi, F. H., Fairus, A., & Ima-Nirwana, S. (2016). Animal models of metabolic syndrome: a review. *Nutrition & Metabolism*, 13(1), 65. <https://doi.org/10.1186/s12986-016-0123-9>
- Yajima, Y., Sato, M., Sorimachi, H., Inomata, M., Maki, M., & Kawashima, S. (2006). Calpain system regulates the differentiation of adult primitive mesenchymal ST-13 adipocytes. *Endocrinology*, 147(10), 4811–4819. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1647>
- Yang, L., Li, P., Fu, S., Calay, E. S., & Hotamisligil, G. S. (2010). Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance. *Cell Metabolism*, 11(6), 467–478. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.04.005>
- Yokoyama, S., Arakawa, R., Wu, C., Iwamoto, N., Lu, R., Tsujita, M., & Abe-Dohmae, S. (2012). Calpain-mediated ABCA1 degradation: Post-translational regulation of ABCA1 for HDL biogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1821(3), 547–551. <https://doi.org/10.1016/J.BBALIP.2011.07.017>
- Yu, L., Yin, M., Yang, X., Lu, M., Tang, F., & Wang, H. (2018). Calpain inhibitor I attenuates atherosclerosis and inflammation in atherosclerotic rats through eNOS/NO/NF- κ B pathway. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 96(1), 60–67. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2016-0652>
- Yuasa, T., Amo-Shiinoki, K., Ishikura, S., Takahara, M., Matsuoka, T., Kaneto, H., ... Hashida, S. (2016). Sequential cleavage of insulin receptor by calpain 2 and γ -secretase impairs insulin signalling. *Diabetologia*, 59(12), 2711–2721. <https://doi.org/10.1007/s00125-016-4102-5>
- Zatz, M., & Starling, A. (2005, junio 9). Mechanisms of disease: Calpains and disease. *New England Journal of Medicine*, Vol. 352, pp. 2413–2423. <https://doi.org/10.1056/NEJMra043361>
- Zhao, Q., Guo, Z., Deng, W., Fu, S., Zhang, C., Chen, M., ... He, X. (2016). Calpain 2-mediated autophagy defect increases susceptibility of fatty livers to ischemia–reperfusion injury. *Cell Death & Disease*, 7(4), e2186–e2186. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.66>
- Zhu, M. J., Du, M., Nathanielsz, P. W., & Ford, S. P. (2010). Maternal obesity up-regulates inflammatory signaling pathways and enhances cytokine expression in the mid-gestation sheep placenta. *Placenta*, 31(5), 387–391. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2010.02.002>