



EL SABER DE MIS HIJOS
HARA MI GRANDEZA

UNIVERSIDAD DE SONORA

UNIDAD REGIONAL SUR

DIVISION DE CIENCIAS E INGENIERIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUIMICO-BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

EXPRESION DE GENES GLUCOLITICOS
HK2, PFK-M, GAPDH Y PK2 Y BIOSINTESIS DE
LIPIDOS GPD1 Y GPAT DURANTE LA PREÑEZ Y
POSPARTO EN VENTRICULO IZQUIERDO DE
RATA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO BIOLOGO CLINICO

PRESENTA

*Magally Luisa Elena Hernández
Palomares*

NAVOJOA, SONORA

JUNIO DEL 2015

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

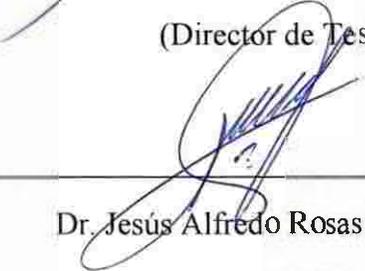
FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del Jurado designado para revisar la Tesis Profesional de Magally Luisa Elena Hernández Palomares la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el Título de Químico-Biólogo Especialidad de Análisis Clínicos.



Dr. José Guadalupe Soñanez Organiz

(Director de Tesis)



Dr. Jesús Alfredo Rosas Rodríguez

(Secretario)



Dra. Gloria Yépiz Plascencia

(Vocal)



Dra. Guadalupe González Ochoa

(Suplente)

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora, por ser parte de esta institución, a todos mis maestros, gracias por brindarme sus conocimientos y su amistad a lo largo de mi estancia,

Al Dr. José Soñanez, por usted conocí lo interesante que es el área de investigación, porque gracias a usted sé que puedo hacer más de lo que creí, gracias por su apoyo durante esta etapa, estoy profunda y eternamente agradecida por guiarme, enseñarme, brindarme parte de su experiencia y ser un gran ejemplo a seguir. Fue para mí un honor haber trabajado con usted.

Al Dr. Jesús Rosas, gracias por sus enseñanzas en clase y en laboratorio, sus consejos, por estar al pendiente del trabajo de mi tesis y por todo su apoyo. Le estoy muy agradecida por permitirme trabajar con usted.

A cada uno de los miembros de mi comité de tesis Dra. Gloria Yépiz y Dra. Guadalupe González, por sus comentarios y sugerencias a mi tesis.

A mis compañeros del laboratorio Cesar Muñoz, Cesar Jeravy, Arquimides, Chipres, Daniel, Mariazel, Patricia, Luis y Fernanda, por haberme dado su apoyo y encontrar en cada uno de ustedes una gran amistad.

DEDICATORIA

A Dios

Por haberme permitido la vida, gracias por todo lo que me has enseñado, gracias por no soltar mi mano y mantenerme a tu lado contra viento y marea, gracias por darme cada día la oportunidad de disfrutar y compartir junto a mi familia y amigos cada etapa de mi vida.

A mis padres Pedro y Rafaela

Dios me ha bendecido con tenerlos a ustedes, gracias por darme su apoyo, consejos y amor en todo momento, por estar conmigo en mis victorias y en mis fracasos, brindándome una palabra de aliento y un abrazo para darme fuerza a seguir adelante.

A mis hermanos Luz, Leonardo, Marisol, Cristina, Armando y Rafael.

Agradezco al cielo por darme hermanos y hermanas con quien compartir momentos de felicidad y tristeza, que pase lo que pase siempre estamos juntos para apoyarnos y enfrentar cualquier circunstancia. Gracias por darme a mis niños y niñas que son una luz en mi vida y alegran todos mis días.

A mi Familia

A mi abuela Luz Elena, que siempre tiene un beso y un abrazo para cada uno de nosotros, es también una mamá que me cuidó, educó y siempre me dio amor.

A mi Tía Antonia, por estar al pendiente de todos y cuidarnos en todo momento, gracias a toda mi familia porque aunque no los vea, sé que me apoyan y están conmigo.

Mando una dedicatoria al cielo, en donde tengo ángeles que siempre van a mi lado.

INDICE

FORMA DE APROBACIÓN.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
INDICE.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABLAS.....	vii
OBJETIVOS.....	1
HIPÓTESIS.....	2
JUSTIFICACIÓN.....	3
INTRODUCCION.....	4
ANTECEDENTES.....	6
I. EL CORAZÓN.....	6
1.1. Estructura y Función.....	6
1.2. Hipertrofia Cardíaca.....	8
1.3. El Corazón Durante la Preñez.....	12
II. METABOLISMO CARDIACO.....	13
2.1. Sustratos para la Producción de Energía (A TP).....	13
2.2. Metabolismo de Carbohidratos.....	14
2.2.1. <i>Hexocinasa</i>	18
2.2.2. <i>Fosfofructocinasa</i>	19
2.2.3. <i>Piruvato cinasa</i>	20
2.2.4. <i>Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa</i>	21
2.3. Metabolismo de Ácidos Grasos.....	21
2.3.1. <i>Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa</i>	24
2.3.2. <i>Glicerol 3-fosfato aciltransferasa</i>	24
2.4. Metabolismo Durante Hipertrofia Cardíaca.....	25
2.5. Reprogramación del Metabolismo Durante Hipertrofia Cardíaca.....	28
MATERIALES Y METODOS.....	30
3.1. Manejo de Animales y Colección de las Muestras.....	30

3.2. Extracción de RNA Total y Digestión de DNA Genómico	31
3.3. Digestión de DNA Genómico y Síntesis de DNA Complementario	31
3.4. Diseño de Oligonucleótidos	32
3.5. Cuantificación del mRNA	36
3.6. Análisis Estadístico	37
RESULTADOS Y DISCUSION	38
4.1. Integridad y Pureza del RNA Total	38
4.2. Amplificación y Curvas Estándar de HK2, PFK-M, PK2, GAPDH, GPD1 y GPAT.	38
4.3. Niveles de Expresión de Genes Glucolíticos y de Biosíntesis de Lípidos.....	41
CONCLUSIONES	46
BIBLIOGRAFIA	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cámaras huecas que dividen al corazón, con dos a la izquierda y dos a la derecha	7
Figura 2. Cortes histológicos teñidos con hematoxilina eosina donde se aprecia el engrosamiento de las paredes miocárdicas y el alargamiento del apex	10
Figura 3. Morfología del corazón durante la preñez (P) y no preñez (NP) de ratón.....	11
Figura 4. Diagrama general del metabolismo del miocardio.....	16
Figura 5. Diagrama general de la glucólisis	17
Figura 6. Correlación de la glucólisis y la biosíntesis de <i>novo</i> de TAG.....	23
Figura 7. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas usadas para el diseño de los oligonucleótidos específicos para cada gen.....	34
Figura 8. Análisis de la integridad del RNA total extraído de ventrículo izquierdo	39
Figura 9. Productos de PCR obtenidos a partir de DNAc de ventrículo izquierdo utilizados para realizar las curvas de calibración.....	40
Figura 10. Expresión relativa de los genes glucolíticos en ventrículo izquierdo de rata.	42
Figura 11. Expresión relativa de genes de biosíntesis de lípidos en ventrículo izquierdo de rata	43

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Concentraciones séricas maternas de los sustratos utilizados para la obtención de energía durante el embarazo	27
Tabla 2. Características de oligonucleótidos utilizados para cada gen	35

OBJETIVOS

Objetivo General

Cuantificar la expresión de los genes para HK2, PFK-M, GAPDH, PK2, GPD1 y GPAT antes, durante y después de la preñez en ventrículo izquierdo de rata.

Objetivos Específicos

- 1) Extraer RNA total y sintetizar DNA complementario de ventrículo izquierdo de ratas durante la preñez y posparto.
- 2) Diseñar oligonucleótidos específicos para cada gen.
- 3) Cuantificar el mRNA para HK2, PFK-M, GAPDH, PK2, GPD1 y GPAT antes, durante y después de la preñez en ventrículo izquierdo de rata, por medio de PCR cuantitativo.

HIPÓTESIS

Los genes de las enzimas glucolíticas (HK2, PFK-M, GAPDH y PK2) y los genes involucrados en biosíntesis de lípidos (GPD1 y GPAT) son inducidos durante el embarazo, y su inducción es reversible durante el posparto en el ventrículo izquierdo de rata.

JUSTIFICACIÓN

La hipertrofia cardíaca es el aumento en la masa del miocardio y tamaño de los miocitos, provocada por una sobrecarga de volumen o presión. Durante el embarazo, el corazón desarrolla hipertrofia cardíaca reversible de manera natural para mantener su capacidad de bombeo, la cual involucra una reprogramación del metabolismo cardíaco para satisfacer sus demandas energéticas. Dicha reprogramación, depende de la activación en la expresión de genes involucrados en el metabolismo de glucosa y biosíntesis de lípidos, respectivamente. Lo anterior, provoca un aumento en el flujo de la glucólisis y la relación glucosa/lípido a través de la vía del glicerol-3-fosfato. Sin embargo, la expresión de genes glucolíticos y biosíntesis de lípidos se desconoce en hipertrofia fisiológica inducida por el embarazo y su proceso reversible el posparto. Por lo tanto, este trabajo plantea investigar la expresión de genes glucolíticos (HK2, PFK-M, GAPDH y PK2) y biosíntesis de lípidos (GPD1 y GPAT) durante la preñez y posparto en ventrículo izquierdo de rata.

INTRODUCCION

Para satisfacer la demanda de oxígeno y nutrientes durante el embarazo, el corazón sufre un crecimiento hipertrófico para compensar el aumento del volumen cardíaco. La hipertrofia cardíaca consiste en la ampliación de los ventrículos y puede ser fisiológica (benéfica y adaptativa) o patológica (dañina y detrimental) (Wilkins y Molkenin, 2002). La hipertrofia cardíaca patológica conduce a la insuficiencia cardíaca si el estímulo persiste durante un tiempo prolongado, mientras que la hipertrofia cardíaca fisiológica mantiene la función del corazón y es reversible sin efectos perjudiciales en la función cardíaca (Carabello, 2002; Pluim et al., 1999; Schanmwell et al., 2002). El embarazo, es una de las principales condiciones que inducen hipertrofia cardíaca fisiológica y está acompañado por drásticos cambios hormonales y metabólicos (Eghbali et al., 2006).

Los ácidos grasos son la principal fuente de energía utilizada por el corazón en condiciones fisiológicas normales. En contraste, el corazón disminuye el consumo de ácidos grasos y aumenta el consumo de glucosa durante la hipertrofia. La reprogramación del metabolismo cardíaco durante la hipertrofia patológica es regulada a nivel transcripcional por el factor inducido por hipoxia 1 (HIF-1) y el receptor de peroxisoma-proliferador-activado gamma (PPAR γ). HIF-1 juega un papel importante en la adaptación celular a bajas condiciones de oxígeno induciendo genes involucrados en el metabolismo celular (Semenza, 1998), mientras que PPAR γ participa en el metabolismo de lípidos mediante la inducción de genes involucrados en la degradación de ácidos grasos y biosíntesis de triacilglicéridos en tejido adiposo e hígado (Cao et al., 2006; Patsouris et al., 2004).

Durante la hipertrófica patológica, HIF-1 activa los genes de la hexocinasa (HK), fosfructocinasa (PFK), gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y piruvato cinasa (PK) que son claves en el metabolismo de glucosa, mientras que PPAR γ regula los genes de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD) y la glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT) involucrados en la biosíntesis de lípidos. Lo anterior, promueve el aumento en la velocidad de la glucólisis y la proporción de glucosa-lípidos vía la ruta del glicerol-3-fosfato (Krishnan et al., 2009). Sin embargo, se desconoce la expresión de genes involucrados en la reprogramación metabólica durante hipertrofia fisiológica inducida por el embarazo y su proceso reversible (posparto). Por lo tanto, este trabajo plantea cuantificar los niveles de expresión de genes de enzimas glucolíticas (HK2, PFK-M, GAPDH y PK2) y de los genes de las enzimas involucradas en la biosíntesis de lípido (GPD1 y GPAT) antes, durante y después del embarazo en el ventrículo izquierdo de rata. Lo anterior, permitirá obtener información para comprender los mecanismos moleculares y de señalización asociados con la reprogramación metabólica cardíaca durante el embarazo.

ANTECEDENTES

I. EL CORAZÓN

1.1. Estructura y Función

El corazón humano es un músculo que contiene cuatro cámaras situadas a la izquierda de la cavidad torácica, cuya función es bombear sangre a todos los órganos, tejidos y células para mantener la demanda de oxígeno y nutrientes. El pericardio exterior, miocardio medio y pericardio interior son las tres capas que comprenden la pared del corazón. El pericardio, consiste en tejido conectivo y tejido adiposo que protege el corazón al reducir la fricción. El miocardio grueso está hecho de tejido muscular cardíaco organizado en planos y ricamente suministrado por capilares sanguíneos, capilares linfoides y fibras nerviosas. El endocardio se compone de epitelio y tejido conectivo con muchas fibras elásticas y colagenosas (Berne, 1981).

El interior del corazón está dividido en cuatro cámaras huecas, con dos a la izquierda y dos a la derecha (Figura 1). Las cámaras superiores son llamadas aurículas y reciben sangre regresándola al corazón, mientras que las cámaras inferiores son llamados ventrículos y reciben sangre de la aurícula para bombear hacia las arterias. La aurícula y ventrículo izquierdo están separados de la aurícula y ventrículo derecho por una pared sólida llamada septum evitando que la sangre se mezcle (Berne, 1981).

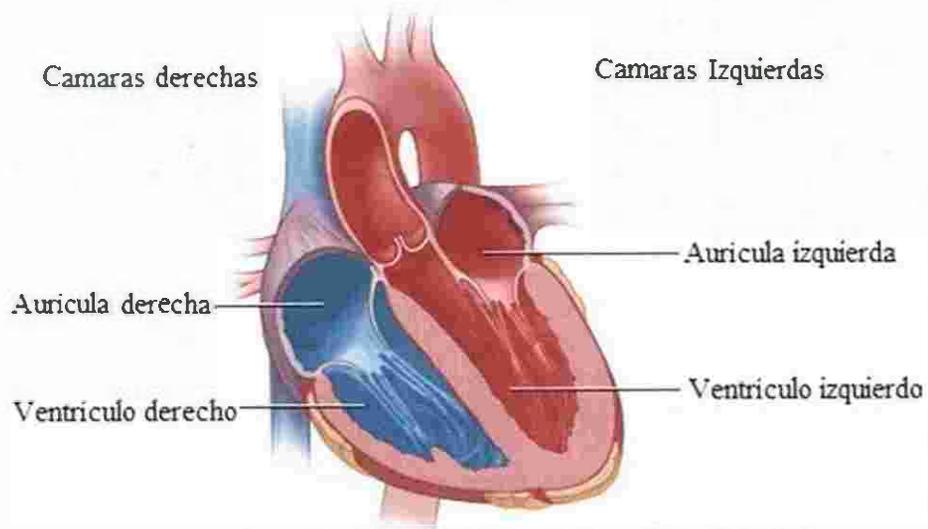


Figura 1. Cámaras huecas que dividen al corazón, con dos a la izquierda y dos a la derecha: 1) las cámaras superiores llamadas aurícula y 2) las cámaras inferiores llamadas ventrículo.

La aurícula derecha recibe sangre de la vena cava superior, cava inferior y la más pequeña (seno coronario), la cual drena sangre al interior de la aurícula derecha del miocardio del corazón. La pared del músculo ventricular derecho es más delgada que el ventrículo izquierdo, debido a que solo bombea sangre a los pulmones con una baja resistencia al flujo de sangre (Berne, 1981).

El ventrículo izquierdo es más grueso debido a que bombea sangre a todas las partes del cuerpo con mayor presión. Estructuralmente, es más corto y tiene mayor forma cónica que el derecho y forma parte del ápex del corazón. El ventrículo izquierdo tiene la capacidad de: 1) relajarse rápidamente por lo que participa en la relajación diastólica y de llenado, 2) contraerse rápidamente por lo que participa en la contracción sistólica y de eyección, y 3) aumentar o disminuir su capacidad de bombeo durante cambios de presión o volumen de sangre (Berne, 1981).

1.2. Hipertrofia Cardíaca

Las enfermedades cardíacas son de las principales causas de muerte en todo el mundo durante las últimas décadas. La hipertrofia cardíaca es considerada un factor de riesgo determinante de la morbilidad y mortalidad por enfermedades cardíacas (Assayag et al., 1997; Haider et al., 1998). La hipertrofia cardíaca es una enfermedad asociada con el miocardio y se caracteriza por el engrosamiento de la pared del ventrículo del corazón y la consiguiente reducción en la capacidad de contraer el corazón para bombear la sangre.

La hipertrofia le permite al miocardio adaptarse ante alteraciones funcionales por sobrecarga asociada a un desafío fisiológico (como el embarazo o el entrenamiento

físico) o un daño (Wilkins y Molkenin, 2002). El entrenamiento físico incrementa la capacidad cardiovascular, la calidad de vida de los individuos y reduce la mortalidad en pacientes con falla cardíaca (Belardinelli et al., 1999; Willenheimer et al., 1998). Estos efectos pueden obtenerse sin un crecimiento importante en el tamaño del corazón como se ha demostrado en animales experimentales (Mokelke et al., 1997; Moore et al., 1993), y además, son reversibles como se ha demostrado en atletas profesionales (Shepard, 1996; Lonhurtst y Stebbins, 1997).

La hipertrofia cardíaca se clasifica como fisiológica y patológica, las cuales pueden ser concéntricas o excéntricas, la primera es ocasionada por la sobrecarga de presión y la segunda por sobrecarga de volumen. Durante un estímulo patológico, la sobrecarga de presión produce un aumento en la presión sistólica que resulta en hipertrofia concéntrica, la cual se caracteriza por alargamiento del ápex y engrosamiento de las paredes miocárdicas por la acumulación de colágena (Shimoyama et al., 1999; Van Eickels et al., 2001). Este tipo de hipertrofia patológica es la respuesta del miocardio a cualquier enfermedad como la hipertensión arterial, infartos de miocardio y mutaciones genéticas (Figura 2).

En la hipertrofia fisiológica hay una sobrecarga de volumen (Figura 3), produciendo un aumento de la tensión de la pared diastólica que resulta en hipertrofia excéntrica que se caracteriza por un incremento en el diámetro transversal y se observa un ápex redondeado (Brower y Janicki, 2001; Eghbali et al., 2005). Este tipo de hipertrofia está presente en algunas alteraciones como en las insuficiencias valvulares cardíacas y en respuestas fisiológicas adaptativas reversibles como el ejercicio, entrenamiento y el embarazo.

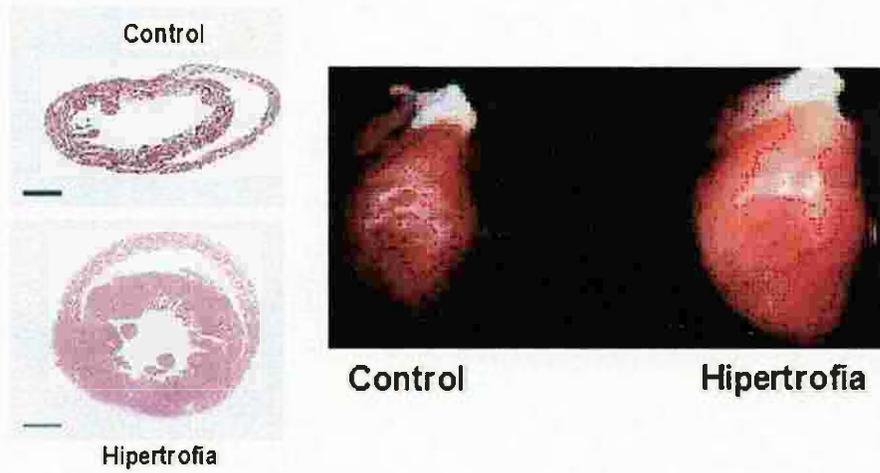


Figura 2. Cortes histológicos teñidos con hematoxilina eosina donde se aprecia el engrosamiento de las paredes miocárdicas durante la hipertrofia por sobrecarga de presión (panel izquierda), y en el panel de la derecha se observa el alargamiento del ápex. Tomado de Eghbali et al., 2005.

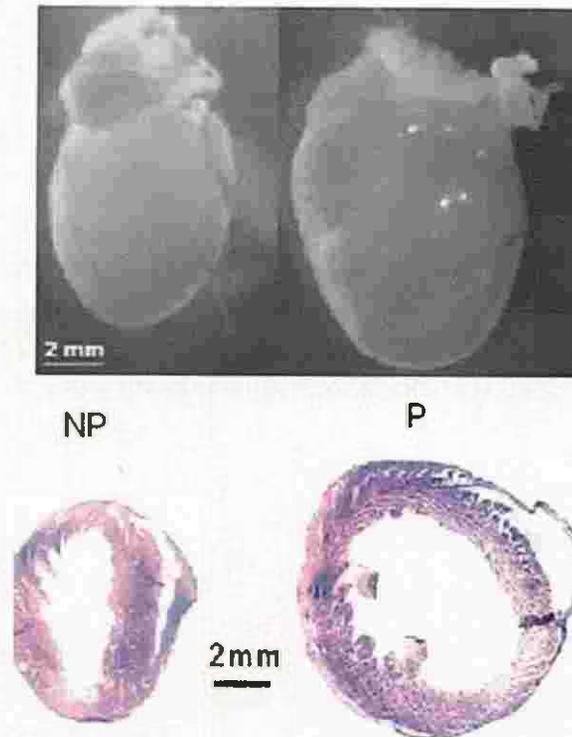


Figura 3. Morfología del corazón durante la preñez (P) y no preñez (NP) de ratón. Se aprecian las diferencias tanto en la fotografía tomada como en los cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina. Tomada de Van Eickels et al., 2001.

1.3. El Corazón Durante la Preñez

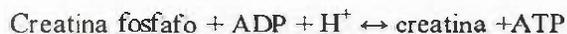
Durante la preñez, el corazón desarrolla un crecimiento hipertrófico fisiológico reversible en respuesta a la mecánica del estrés y el aumento del gasto cardíaco. El desarrollo de hipertrofia cardíaca, es uno de los principales cambios en la preñez y está acompañada con el aumento en: 1) el gasto cardíaco (30-40%), 2) el volumen latido, 3) el volumen sanguíneo (40%), 4) la frecuencia cardíaca, 5) la actividad del sistema renina-angiotensina-aldosterona, 6) el flujo sanguíneo renal y 7) la tasa de filtración glomerular. Además, se presenta una disminución en: 1) la resistencia vascular periférica, 2) la presión sanguínea media durante el segundo y tercer trimestre, y 3) la disminución del tiempo de eyección del ventrículo izquierdo a lo largo de todo el periodo de gestación (Katz et al., 1978; Capeless y Clapp, 1989; Gilson et al., 1992; Mabie et al., 1994; Slangen et al., 1997; Chapman et al., 1997; Spaanderman et al., 2000).

La hipertrofia cardíaca es iniciada por el estrés sobre las paredes miocárdicas (miocitos y membrana extracelular) del ventrículo izquierdo (Grossman et al., 1975; Nagatomo et al., 1999), los cuales determinan su tamaño, forma y propiedades contráctiles y de relajación. En el caso de la preñez, la distensión durante el llenado ventricular es un indicador inicial de hipertrofia. La hipertrofia por sobrecarga de volumen generalmente es menor que la producida por sobrecarga de presión (Nagamoto et al., 1999; Spaanderman et al., 2000).

II. METABOLISMO CARDIACO

2.1. Sustratos para la Producción de Energía (ATP)

La demanda metabólica del corazón es mayor a la de cualquier órgano del cuerpo, y utiliza adenosina trifosfato (ATP) para mantener su función contráctil y viabilidad. Los ácidos grasos (AG), cuerpos cetónicos, carbohidratos (CHO), lactato y piruvato son los sustratos que utiliza el corazón para generar ATP (Figura 4). El corazón puede cambiar de un sustrato a otro dependiendo del consumo de alimentos, ejercicio y estados patológicos (Lewin et al., 2003). En cardiomiocitos, el ATP es usado por la miosina-actina ATPasa para realizar procesos de relajación y contracción. En el retículo sarcoplásmico, el ATP es utilizado por la Ca^{2+} ATPasa para soportar el reconsumo de Ca^{2+} , mientras que en el sarcolema la Na^+/K^+ ATPasa lo utiliza para mantener el potencial de membrana (Weiss y Maslov, 2004). La creatina fosfato es otra de las fuentes de energía que proporciona ATP al corazón, y sirve como una fuente de energía a través de la rápida y reversible reacción catalizada por la enzima creatina cinasa (CK):



Durante la isquemia, los niveles de creatinina fosfato disminuyen rápidamente para mantener elevados los niveles de ATP. Además, la reacción de la CK transfiere fosfatos de alta energía del sitio de generación al sitio de utilización, a través de la presencia de una enzima mitocondrial y una citoplasmática, actuando como solución amortiguadora (Weiss y Maslov, 2004).

A pesar de que la concentración de fosfatos de alta energía es mayor en músculo respecto a otros órganos, se consideran niveles bajos en base a las tasas de utilización de

ATP del miocardio. Las reservas de ATP en el músculo cardíaco pueden disminuir en menos de 15 segundos si la síntesis de ATP es detenida y si las velocidades de utilización cambian. Por lo tanto, las velocidades de producción y utilización de ATP en el miocardio deben estar coordinadas para mantener niveles normales (Weiss y Maslov, 2004).

Debido a que las demandas de energía química del corazón son altas y sus reservas de energía son limitadas, los miocitos son capaces de utilizar una variedad de sustratos para generar ATP. Además, los miocitos contienen una gran cantidad de mitocondrias para la generación de ATP a través de los mecanismos de fosforilación a nivel sustrato y la fosforilación oxidativa, siendo esta última la que sintetiza el 95% de ATP en el corazón. Los AG y CHO son los principales sustratos de carbono utilizados para la síntesis de ATP en el miocardio, y son catabolizados vía beta-oxidación y glucólisis, respectivamente (Weiss y Maslov, 2004).

2.2. Metabolismo de Carbohidratos

La glucólisis es una vía catabólica para la utilización de glucosa en todos los seres vivos que convierte una mol de glucosa en dos moles de piruvato, NADH y ATP mediante la acción de 10 enzimas citoplasmáticas (Figura 5) (Ladish et al., 2005). El destino metabólico del piruvato y el NADH depende del estado de oxigenación de la célula. Durante una adecuada oxigenación (glucólisis aerobia), el piruvato es oxidado y metabolizado en el ciclo de Krebs generando NADH y FADH, que junto con el NADH producido en glucólisis, es re-oxidado por la cadena de transporte de electrones de la

mitocondria. Lo anterior, genera un gradiente de protones en la membrana interna de la mitocondria, que es utilizado para sintetizar ATP mediante la ATP sintasa. Cuando el oxígeno disminuye (glucólisis anaerobia), el NADH no puede ser re-oxidado por lo que es usado para reducir el piruvato a lactato, convirtiéndose así en la principal ruta de producción de ATP. En condiciones normales, el miocardio utiliza alrededor del 4% del ATP producido por glucólisis, mientras que en condiciones de isquemia o anaeróbicas aumenta considerablemente (Weiss y Maslov, 2004). Además, un corazón adulto sano obtiene un 30-50% de su ATP a partir de la oxidación del piruvato (Lewin et al., 2003).

Las enzimas hexocinasa (HK), fosfofructocinasa (PFK) y piruvato cinasa (PK) regulan el flujo y velocidad de la glucólisis (Figura 5). Estas enzimas pertenecen a una familia de fosfotransferasas, donde HK y PFK son dependientes de ATP y Mg^{2+} mientras que PK es dependiente de ADP y Mg^{2+} . La actividad catalítica intracelular de estas enzimas está influenciada por las concentraciones de sus efectores o por la presencia de isoenzimas tejido-específico (Vora et al., 1980; Magnuson et al., 2003). Otra enzima importante es la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) que cataliza la oxidación de gliceraldehído-3-fosfato (G3AP) a 1,3-bisfosfoglicerato.

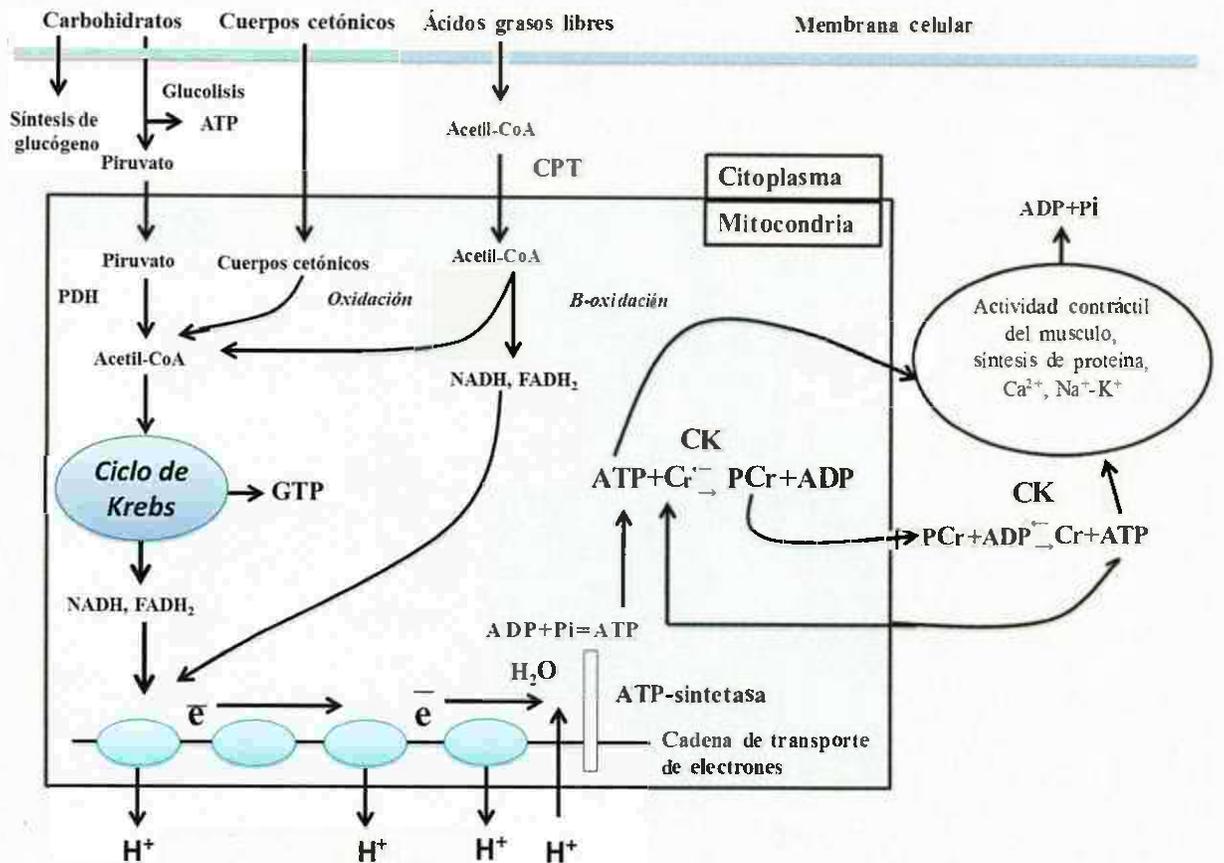


Figura 4. Diagrama general del metabolismo del miocardio. ATP=adenosin trifosfato; acetil-CoA: acetil coenzima A; PDH= piruvato deshidrogenasa; NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido; FADH₂: flavina adenina dinucleótido; GTP= guanosina trifosfato; CK= creatina cinasa; PCr= creatina fosfato; ADP= difosfato de adenosina; Pi= fosfato inorgánico. Imagen tomada de Weiss y Maslov, 2004.

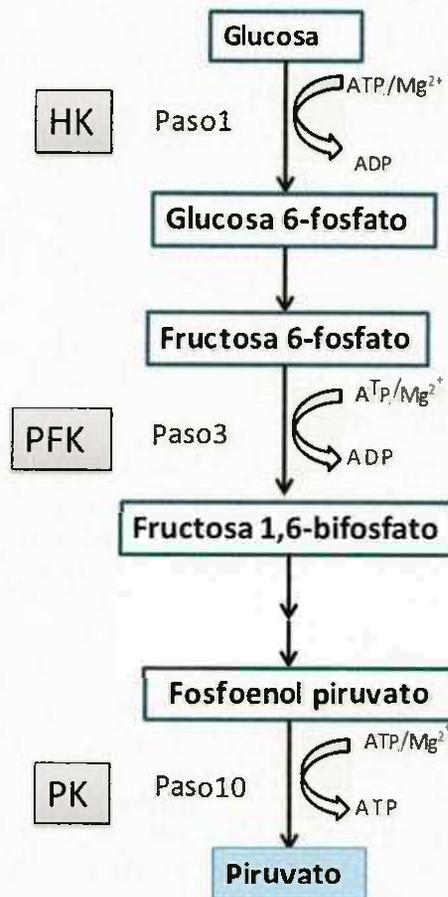


Figura 5. Diagrama general de la glucólisis donde se muestran sus intermediarios y puntos clave de regulación. Hexocinasa (HK), Fosfofructocinasa (PFK), Piruvato cinasa (PK).

2.2.1. Hexocinasa

La HK (E.C. 2.7.1.1.) cataliza la primera reacción de la glucólisis transfiriendo un grupo fosfato del ATP a la glucosa y usando como cofactor al Mg^{2+} para formar glucosa-6-fosfato (G6P) y ADP:



Debido a que la G6P tiene destinos metabólicos alternos, como la síntesis de glucógeno y la vía de hexosas monofosfato, la reacción de la HK se considera el paso inicial en el metabolismo de glucosa para varias rutas alternas de producción de energía (Mathews y Van Holde, 1996). Además, las HKs son consideradas un regulador de la alta demanda del metabolismo energético rápido en algunos tejidos, como el corazón, ya que se encuentran ligadas en el exterior de los poros de la membrana mitocondrial y son más sensibles a las demandas inmediatas de ATP de la célula (Wilson, 1995; Duvernell y Eanes, 2000).

Las HKs son enzimas estructuralmente conservadas que se diferencian principalmente por su masa molecular y tejido donde se expresan (Cárdenas et al., 1998, Iynedjian, 1993). En mamíferos existen cuatro isoenzimas: las HKs 1, 2 y 3 de 100 kDa, poseen alta afinidad por glucosa ($K_m = 7\text{-}200 \mu\text{M}$) y son inhibidas por G6P, y la HK 4 o D de 50 kDa. Esta última isoenzima, también llamada glucocinasa tiene baja afinidad por glucosa ($K_m = 5\text{-}12 \text{ mM}$), no es regulada por G6P y se expresa principalmente en hígado y páncreas, así como en células específicas del cerebro y del intestino (Wilson, 2003; Wilson, 1995; Caceres et al., 2003). Las HKs 1, 2 y 3 se encuentran presentes en

la mayoría de los tejidos, siendo el corazón en donde se expresa principalmente la HK2 (Postic et al. 1994, Osawa et al. 1995).

2.2.2. Fosfofructocinasa

La PFK (EC 2.7.1.11) fosforila la D-fructosa-6-fosfato transfiriendo un grupo fosfato del ATP a la fructosa-6-fosfato usando como cofactor al Mg^{2+} para formar la D-fructosa-1,6-bisfosfato (F1,6BP):



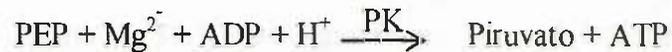
La reacción catalizada por la PFK es irreversible sobre condiciones intracelulares normales y es considerada la principal enzima alostérica que regula la glucólisis. Su actividad depende de la carga energética de la célula y de las concentraciones de diversos intermediarios glucolíticos como el fosfoenol piruvato (PEP) y la fructosa-2,6-bisfosfato (F2,6BP), así como algunos cofactores que intervienen en la reacción como el ADP, ATP, Mg^{2+} y el citrato (Mathews y Van Holde, 1996).

La PFK de mamíferos proviene de la duplicación, fusión y divergencia de un gen ancestral de procariontes. En mamíferos existen tres genes que codifican a isoformas distintas llamadas PFK-M, PFK-L y PFK-P debido a que se expresan principalmente en músculo, hígado y plaquetas, respectivamente (Dunaway, 1983; Currie y Sullivan, 1994). Las isoformas pueden asociarse en dímeros, tetrámeros o multi-complejos que resultan en distintas formas de la enzima y se clasifican en base a sus propiedades fisicoquímicas y cinéticas. Cada isoforma se expresa de manera tejido-específico; el músculo esquelético es el único tejido que expresa la PFK-M, mientras que los demás

tejidos pueden expresar distintos niveles de las tres isoformas (Dunaway, 1983; Currie y Sullivan, 1994).

2.2.3. Piruvato cinasa

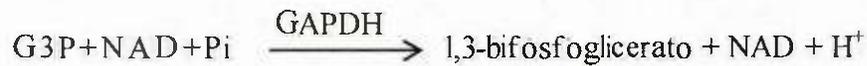
La PK (EC 2.7.1.40) cataliza la transfosforilación irreversible de PEP y ADP a piruvato y ATP (Kayne, 1973; Valentini et al., 2000).



En mamíferos existen cuatro tipos de PKs que van de 1827-2200 pb que codifican para enzimas de 58 a 63 kDa. Estas enzimas se expresan principalmente en: músculo esquelético (M1 y M2, también llamadas PK1 y PK2), hígado (L) y sangre (R). Cada una de estas proteínas provienen de distintos genes; L y R son producidas por la utilización de promotores distintos, mientras que M1 y M2 son producidas por splicing alternativo (Chien et al., 1999). Las isoenzimas resultantes de estos procesos tienen diferentes propiedades cinéticas que reflejan los requerimientos metabólicos del tejido (Muñoz y Ponce, 2003). Las isoformas M1 y M2 presentan propiedades cinéticas que permiten altos intercambios glucolíticos, mientras que la tipo L se encuentra regulada hormonalmente y la tipo R se presenta durante desarrollo y en tejidos neoplásicos (Imamura y Tanaka, 1972).

2.2.4. Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa

La GAPDH (EC 1.2.1.12) cataliza la reacción de oxidación del gliceraldehido-3-fosfato a 1,3-bisfosfoglicerato a partir de fosfato inorgánico y NAD.



La GAPDH es una enzima homo-tetramérica importante en la generación del primer intermediario de alta energía y NADH, los cuales posteriormente serán incorporados en la cadena transportadora de electrones para la producción de ATP (Marín-Hernández, 2009). En esta reacción se requiere NAD^+ como aceptor de los electrones del sustrato que está oxidando y generar NADH a nivel del citosol, siendo necesario re-oxidar el NADH para que la glucólisis continúe. El gen que codifica para la GAPDH es constitutivamente expresado a altos niveles en la mayoría de los tejidos o células (Carbo, 2003).

2.3. Metabolismo de Ácidos Grasos

La β -oxidación es la vía catabólica por la cual los AG generan 1 mol de acetil-CoA, NADH y FADH. La acetil-CoA es metabolizada en el ciclo de Krebs generando NADH y FADH, que junto con los generados en β -oxidación, son re-oxidados por la cadena de transporte de electrones en la mitocondria. Lo anterior, genera un gradiente de protones en la membrana interna mitocondrial que es usado para sintetizar ATP mediante la enzima ATP sintasa. Debido a que durante la β -oxidación se genera 1 mol de acetil-CoA por cada dos átomos de carbono liberados, y que las cadenas carbonadas de los AG son variables, esta vía genera elevadas cantidades de ATP en comparación a glucólisis

(Teijon-Rivera et al., 2006). Por lo tanto, un corazón adulto sano obtiene un 50-70% de su ATP a partir de la β -oxidación de AG (Lewin et al., 2003).

Los AG requeridos por los miocitos cardiacos son suministrados como ácidos grasos libres (FFA) o como AG liberados de los triacilglicéridos (TAG). Sin embargo, condiciones como el embarazo, isquemia o diabetes, pueden alterar drásticamente los niveles normales de AG (0.2 a 0.6 mM) (Lewin et al., 2003). Ante las anteriores condiciones, el corazón puede mantener los niveles de AG mediante la biosíntesis de glicerolípidos que finaliza con la acumulación de TAG. La síntesis de TAG requiere FFA y de manera obligatoria el intermediario glicerol-3-fosfato (G3P), el cual puede ser generado a partir del intermediario glucolítico dihidroxiacetona fosfato (DHAP). La glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD1) y glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT) son enzimas claves para la biosíntesis de *novo* de TAG a partir de DHAP (Figura 6) (Lewin et al., 2003).

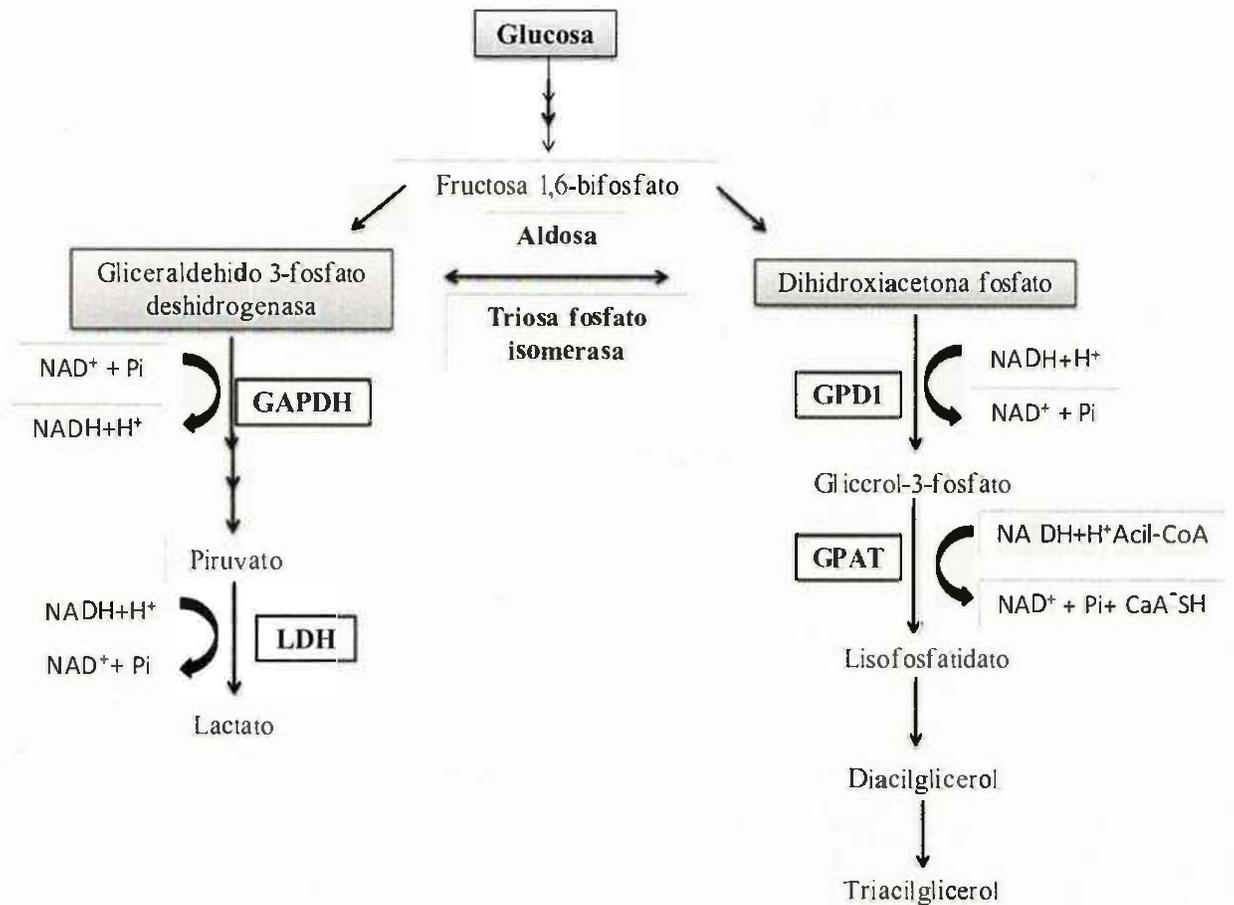


Figura 6. Correlación de la glucólisis y la biosíntesis de *novo* de TAG. La hipertrofia induce la acumulación de HIF-1 α que induce la expresión de enzimas glucolíticas y la activación directa de PPAR γ , el cual induce la expresión de los genes GPD1 y GPAT. Modificado de Krishnan et al., 2009.

2.3.1. *Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa*

La glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD1, EC 1.1.1.8) es una deshidrogenasa dependiente de NAD que cataliza la conversión reversible de DHAP a G3P (Xianjin et al., 2006).



GPD1 juega un papel importante en la síntesis de TAG y en el transporte de equivalentes reductores desde el citosol a la mitocondria (Gao et al., 2010). En mamíferos, también existe la isoforma GPD2 la cual se encarga de catalizar la reacción reversible de G3P a DHAP y se expresa en la mayoría de los tejidos al igual que la GPD1 (Gao et al., 2010).

2.3.2. *Glicerol 3-fosfato aciltransferasa*

La GPAT (EC 2.3.1.15) cataliza la síntesis del ácido lisofosfatídico a partir de G3P, un acil-CoA de cadena larga y NAD⁺.



Existen cuatro isoformas homologas provenientes de genes separados, y las cuatro pertenecen a la familia de aciltransferasa glicerolipidos. GPAT1, se expresa principalmente en tejido adiposo e hígado, y tiene un papel importante en la regulación de la síntesis de TAG controlando el flujo de Acil-CoA y su uso en la β-oxidación. La GPAT2 se encuentra en la membrana mitocondrial pero no tiene preferencia por Acil-CoA de cadena larga, por lo que su aporte en la síntesis de TAG es menor. La isoforma GPAT3 se encuentra en retículo endoplásmico y es altamente expresada en tejido adiposo de epidídimo. Por otro lado, GPAT4 se encuentra en el retículo endoplásmico y su expresión es baja en hígado (Wendel et al., 2009).

2.4. Metabolismo Durante Hipertrofia Cardíaca

Los AG son el combustible predominante para un corazón adulto en condiciones fisiológicas normales (Castro et al., 2010). En corazones hipertrofiados o enfermos, provocado por hipoxia o isquemia, la utilización energética cambia de AG a glucosa para optimizar la obtención de energía. En las condiciones anteriores, el flujo de oxígeno es bajo y la demanda celular de ATP es constante por lo que causa un déficit energético que se recupera activando las vías anaerobias. Sin embargo, las vías anaerobias no son capaces de sostener las demandas energéticas debido a la disponibilidad de sustratos (Castro et al., 2010). En hipertrofia cardíaca fisiológica inducida por deporte las células deben coordinar la producción y utilización de ATP. Al iniciar la actividad física, incrementa la oxidación de AG y glucosa. A medida que aumenta la actividad, hay una disminución en depósitos de glucosa, por lo que AG aumenta, debido a la frecuencia y gasto cardíaco (Leal et al, 2011).

Se conoce muy poco sobre los cambios metabólicos inducidos en la hipertrofia cardíaca fisiológica inducida por embarazo, los estudios en humanos son casi inexistentes. Estudios en sangre, demuestran que el metabolismo se altera con el fin de cubrir las necesidades del feto en desarrollo, por lo que se afectan todos los órganos incluyendo el corazón. En las etapas tempranas del embarazo, el metabolismo es anabólico y el gasto cardíaco aumenta de un 20-50% para soportar las demandas próximas (Hall et al., 2011). En cambio, durante la etapa tardía del embarazo el metabolismo se convierte a catabólico por el crecimiento rápido del feto y el aumento del gasto cardíaco materno que llega a su pico más alto. Por lo tanto, en el corazón ocurre una reprogramación en el metabolismo causado por la desviación de glucosa al feto. Lo anterior, aumenta la

resistencia a insulina, disminuye la concentración de glucosa y aumenta el metabolismo de AG y TAG (Tabla 2). El proceso reversible sucede dos semanas posteriores al parto, retomando los niveles normales (Liu y Arany, 2014). Estudios en ratas, demuestran que la utilización de glucosa disminuye hasta un 75% iniciando durante la preñez temprana, progresando a través del embarazo y llegando a su pico más alto durante la preñez tardía (Sugden et al., 1992; Sugden y Holness, 1993).

Tabla 1. Concentraciones séricas maternas de los sustratos utilizados para la obtención de energía durante el embarazo.

	No embarazada	Embarazo temprano (5-12 semanas)	Embarazo tardío (> 32 semanas)
BMR (KJ/24h)	5.430 ± 660 ^{un}	5.540 ± 660	7,180 ± 1,180
El volumen plasmático (ml)	2699 ^b	2768	3689
Valores séricos			
Glucosa en ayunas (mmol / L)	4.6 ^c	4.2	3.9
Insulina en ayunas (mU / ml)	5.5 ^c	4.5	7.5
Ácidos grasos libres (eq / L)	n.r	814	900
Triglicéridos (mg / dL)	77 ± 34	79±27	245 ± 73
LDL (mg / dL)	99 ± 23	90 ± 17	136 ± 33
HDL (mg/dL)	69 ± 10	67± 12	81 ± 17

BMR (tasa metabólica basal), un (pre-embarazo), b (6-8 semanas después del parto), c (10-12 semanas después del parto). Tomado de Liu y Arany, 2014

2.5. Reprogramación del Metabolismo Durante Hipertrofia Cardíaca

La reprogramación del metabolismo cardíaco es una característica común de la hipertrofia patológica. Los AG son el combustible predominante para un corazón adulto sobre condiciones fisiológicas normales. Sin embargo, los corazones hipertrofiados y defectuosos muestran un incremento en la liberación de glucosa y una disminución en la utilización de AG (Lehman y Kelly, 2002). Dicho cambio en la utilización de sustratos puede ser provocado como resultado de un desajuste entre la demanda de oxígeno del miocardio y el suministro durante el estrés inducido por hipertrofia (MacLellan y Schneider, 2000). Lo anterior, provoca que las necesidades para satisfacer las demandas energéticas del corazón se alteren, contribuyendo a fallas en el corazón. Estas alteraciones en el metabolismo cardíaco en respuesta a la disponibilidad de sustratos involucran cambios en el control transcripcional de genes involucrados en el transporte y metabolismo de AG y glucosa.

En mamíferos, la disminución en la disponibilidad de oxígeno estimula a la célula a reprogramar su metabolismo oxidativo mitocondrial a su forma glucolítica para la producción de ATP. El factor inducido por hipoxia (HIF) es un factor de transcripción que coordina la respuesta a baja concentración de oxígeno, y es un dímero compuesto por una subunidad α (HIF-1 α , -2 α y -3 α) regulada y una subunidad β (HIF-1 β , -2 β y -3 β /ARNT1, ARNT2 y ARNT3) constitutiva (Semenza, 1998). Las subunidades de HIF α son constitutivamente degradadas sobre normoxia debido a la actividad de proil hidroxilasas, las cuales marcan a HIF α para su degradación por la proteína supresora de tumores von Hippel-Lindau (pVHL). Consecuentemente, la pérdida de pVHL o disminución de oxígeno activa a HIF que induce genes involucrados en la regulación del

metabolismo celular, incluyendo transportadores de glucosa y enzimas glucolíticas favoreciendo la utilización de glucosa y glucólisis, respectivamente (Gassmann et al. 1997; Kallio et al. 1997; Chandel et al. 2000; Wenger 2000; Guzy et al. 2005).

Los receptores de peroxisoma-proliferador-activado (PPAR) son una familia de receptores nucleares que contienen un dominio de unión al DNA en su amino terminal y un dominio de unión a ligando en su extremo carboxilo terminal. Después de interactuar con su agonista, PPAR es translocado al núcleo y heterodimeriza con el receptor X retinoide (RXR) para inducir genes involucrados en diferenciación celular y varios procesos metabólicos, especialmente en la homeostasis de glucosa y lípidos (Mangelsdorf et al., 1995). PPAR γ es un miembro de la familia de PPAR que contribuye específicamente al metabolismo de los lípidos mediante la estimulación de absorción de FFA y acumulación de TAG en tejido adiposo e hígado por la inducción de genes involucrados en la biosíntesis de acilgliceroles (Cao et al., 2006; Patsouris et al., 2004).

En humanos y ratón, HIF-1 α y PPAR γ son coordinadamente inducidos durante miocardiopatía hipertrófica y cooperan para mediar cambios en el metabolismo cardíaco que contribuyen a las formas comunes de enfermedades cardíacas. HIF-1 α activa los genes glucolíticos GLUT1, HK-2, PFK-M, GAPDH y PDK4, y PPAR γ activa los genes de la biosíntesis de glicerolípidos GPD1 y GPAT en respuesta al estrés patológico. Por lo tanto, estos cambios aumentan el flujo de la glucólisis y la relación glucosa-lípido a través de la vía de G3P (Krishnan et al., 2009). En humanos, se ha demostrado que HIF-1 α y PPAR δ , otro receptor nuclear de la familia de PPAR, son inducidos en músculo esquelético durante ejercicio agudo y entrenamiento (Egan y Zierath, 2013).

MATERIALES Y METODOS

3.1. Manejo de Animales y Colección de las Muestras

Los procedimientos experimentales y cuidados con las ratas fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Colima, siguiendo las bases descritas en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (US Department of Health, NIH). Se usaron ratas hembras Sprague-Dawley de tres meses de edad que fueron separadas en los siguientes grupos: 1) controles o no preñadas (NP, peso de 260 ± 10 g, $n = 6$); 2) preñez temprana (P12, ratas con 12 días de gestación, 300 ± 10 g, $n = 4$); 3) preñez tardía (P18, ratas con 18-21 días de gestación, 350 ± 10 g, $n = 4$); y 4) ratas posparto (PP, 7 días, 270 ± 10 g, $n = 3$).

Todas las ratas fueron provistas con agua y alimento, y mantenidas individualmente en cajas de acrílico en ciclos de 12:12 horas de luz-obscuridad con una temperatura y humedad promedio de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ y 60-70%, respectivamente. Las ratas fueron anestesiadas vía intraperitoneal con 50 mg/kg de pentobarbital sódico antes de ser sacrificadas. Inmediatamente se realizó la extracción de corazón y la disección de ambos ventrículos, derecho e izquierdo, los cuales fueron rápidamente congelados por inmersión en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C para los análisis posteriores.

3.2. Extracción de RNA Total y Digestión de DNA Genómico

El RNA total se extrajo a partir de 50 mg de tejido que se colocaron en microtubos. La extracción se realizó usando el reactivo de TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), que inactiva ribonucleasas (RNasas), permitiendo mantener su integridad. La extracción se realizó siguiendo las especificaciones del proveedor y haciendo las modificaciones que se describen a continuación. El tejido se homogenizó usando un Politron (10 pulsos de 5 segundos en hielo) en 0.5 mL de TRIzol más 100 μ L de cloroformo, se incubó por 5 min y se centrifugó a 12,000 g por 15 min a 4°C. Teniendo especial cuidado de no tomar la interfase que contiene el DNA, se separó la fase acuosa (superior con el RNA) en un tubo nuevo y se le agregó 300 μ L de isopropanol frío, se centrifugó 12,000 g por 20 min a 4°C. Finalmente, el pellet formado fue lavado con 500 μ L etanol frío al 75% y resuspendido en 50 μ L de agua tratada con DEPC.

La concentración y pureza del RNA total se determinó por la absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 V3.2. Una vez cuantificado, se evaluó la integridad del RNA total por electroforesis en gel de agarosa al 1% cuidando y limpiando el material utilizado de contaminación con RNasa mediante RNasaZap (Invitrogen).

3.3. Digestión de DNA Genómico y Síntesis de DNA Complementario

Para asegurar que las muestras de RNA total estén libres de DNA genómico contaminante se procedió a su eliminación usando DNasa I (Roche, Indianapolis, IN, USA). La limpieza se realizó calculando que la concentración final de RNA total fuera de 100 ng/ μ L, usando 5 unidades de DNasa, en una reacción que se llevó a cabo por 10

mina 37 °C. Para detener la reacción se agregó 1 μ L de EDTA (0.2 M) y se incubó a 75°C por 10 min.

Se realizó la síntesis de DNA complementario (cDNA) de cada tejido usando el kit de QuantiTect Reverse Transcription (Qiagen, Valencia, CA, USA), 500 ng de RNA total y 0.5 μ L oligo-dT (50 μ M) siguiendo las recomendaciones del proveedor.

3.4 Diseño de Oligonucleótidos

El diseño de oligonucleótidos específicos para HK2, PFK-M, GAPDH, PK2, GPD1 y α Actina, se realizó mediante alineamientos múltiples en el software ClustalW (Higgins et al., 1992) disponible en [http://www.ebi.ac.uk/clustalw/](#) (Figura 7). Para GPAT, solo se encontró una secuencia disponible para rata en la base de datos del GenBank, la cual fue usada para el diseño de los oligonucleótidos. Los números de acceso al GenBank de las secuencias nucleotídicas usadas para el diseño de oligonucleótidos se encuentran en la Tabla 2. Una vez identificadas las regiones diferentes, los oligonucleótidos específicos fueron diseñados usando el programa Primer3 software (<http://frodo.wi.mit.edu>) (Rozen and Skaletsky, 2000). Los oligonucleótidos diseñados se muestran en la Tabla 2 y tienen las siguientes características: 1) longitud de 20-23 nucleótidos; 2) amplifican fragmentos de PCR de 150-200 pares de bases; 3) temperatura de alineación (T_m) de 60 °C; 3) porcentajes de G-C de 55-60%; 4) no forman estructuras secundarias o dímeros de oligonucleótidos.

HK2

		>>> HK2F2 >>>>	
HK1	CT-----CCC GGGA TTATAATCCA----ACAG-----	CCTCCGTCAAGAT	188
HK2	A-----GGAGCTACCACGCACCC TACAG -----	CAGCTGTGAAAAAT	104
HK3	TCTGTGTTCCATGGAGCAGGCCTGAAGGGACAGGACAGTCCCGCTCCTTCTGTCCGGAT		221
HK4	-----		
>>>>>			
HK1	GCTGCCACCTTCGTCCGGTCCATTCCGGACGGCTCAGAAAAGGGGATTTCAATTGCCCT		248
HK2	GTTGCC TACCTTTGTGAGGTCAACTCCGGATGGGACAGAACATGGGGAGTTCCTGGCTCT		164
HK3	GTTGCCACATACGTGAGGTCCACACCAATGGCACCGAGCAAGGAGACTTCCTGGTGCT		281
HK4	-----		
<<<<<< HK2R2 <<<<<<			
HK1	GGATCTCGG-----CGGGTCTTCCTTTCGAATCCTGCGGGTGCAGGTGAACCACGAGAA		302
HK2	GGATCTTGG-----AGGAACCAACTTCCGTGT	GCTCCGAGTAAGGGTGACGGACAATGG	218
HK3	GGAGCTGGGGGCCACAGGAGCCTCACTACGTGTGTTGTGGTAACACTGACGGGCACCAA		341
HK4	-----		

PFK-M

		>>>>> PFKmF2 >>>>>	
PFK-M	CCAAGGCA-ACCGAGTGCTGG TCGTGCATGATGGCTTTGAGGGTCTGGCCAAAGGTCAGA		1342
PFK-L	CCGAGGGACACACAGTGTACGTTGTGCATGATGGCTTTGAGGGCCTGGCCAAAGGTCAGG		1339
PFK-P	CAGAGGGCCACAAGATGTTTCGAATCTATGACGGCTTTGATGGCCTCGCCAATGGC CAAA		1372
	* ** *		
<<<<< PFKmR2 <<<<<			
PFK-M	GTACTAAAA GGACTCTACCCAAGAAGAA CCTGGAA CAGATCAGTGCC -AACATAACCAAG		1461
PFK-L	GGACCAAGAGGACCCCTGCCAAGCCCCACCTGGA---GGCCATTGTAGAAAATCTCCGTA		1456
PFK-P	GGACGAAACGCACCC TACCCGAAA GTA CTT GGA---GAAGATCGCAGAACAGATGCACT		1489
	* *		

PK-M

		>>>>> PK2F2 >>>>>	
PK-M	ACCGCAGAGGTGGAGCTGAAGAAGGGAGC CACACTGAAGATCACCTGG ACAA CGCCTAC		444
PK-R	GAGTCGGAGGTGGAAATGTGAAGGGCTCACAGGTGCTGGTGA CGGTGGACCCGAA GTTTC		480
PK-L	GAGTCGGAGGTGGAAATGTGAAGGGCTCACAGGTGCTGGTGA CGGTGGACCCGAA GTTTC		480
	.. * .*****..* .:*****. * .. . * .:*. *		
<<<<<< PK2R2 <<<<<<			
PK-M	GAGGTGGGCAGCAAGATCTACGTGGACGATGGGCT CATCTCCCTGCAGGTGAAGG AGAAA		564
PK-R	GCAGTGGGGGGCCGCATCTACATTGACGACGGGCTCA TCTCCTTAGTGGTACAGAAAATC		600
PK-L	GCAGTGGGGGGCCGCATCTACATTGACGACGGGCTCA TCTCCTTAGTGGTACAGAAAATC		600
	* .***** *		

GPD1

		>>>>> GPD1F1 >>>>>		
GPD1	AGAG	<u>CCTTGGC</u>	---ATCCCT-----ATGAGCG	TGCTGATGGGGGCCAACATT----- 456
GPD2	GCTGCCACGGCCAATTACATGGAGGTGGTGAGCTTGCTCAAGAAGACAGACCCCGAAACT			780
	.	:***:	*** :*.*. *	.***** ***** *:*.*.*.*.***.
		<<<<<< GPD1R1 <<<<<<		
GPD1	-	<u>GGTACAAGAGGTG-GACACAG</u>	TGGAGATCTGTGGGG	----CCTTGAAGAATATAGTGCC 623
GPD2	AACTACCTGAGTTGCGACGTTGAAGTGAGAAGAGGGGATGTCTCTGGCAGCGTGGAGTGCC			1200
	**	.*** ** **	:*:*:***	:*:*:*** ** * ** * ** *

αActina

		>>>> aActinF1 >>>>		
aActina		<u>ATGTGTGACGACGAGGAGAC</u>	CA	CAGCTTTGGTGTGCGACAATGGCTCCGGACTGGTGAAG 60
bActina	ATGGATGACGAT-----ATCGCTGCGCTCGTCGTGACACACGGCTCCGGCATGTGCAAG			54
	***	.*****	* *.*:** * **	***** ***** .** ***
		<<<<< aActinR1 <<<<<		
aActina	CGCCACCAGGGTGT	CATGGTAGGTATGG	<u>GGCAGAAAGACTCCTATGTAG</u>	GTGACGAGGCT 180
bActina	AGGCACCAGGGTGTGATGGTGGTATGGGT	CAGAAGGACTCCTACGTGGGCGACGAGGCC		174
	*	*****	*****	***** ***** ** ** *****

Figura 7. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas usadas para el diseño de los oligonucleótidos específicos para HK2, PFK-M, PK2, GPD1 y αActina de rata. Los oligonucleótidos para cada gen se muestran en gris y subrayados. Los asteriscos (*) indican los nucleótidos idénticos entre cada una de las secuencias.

Tabla 2. Características de oligonucleótidos utilizados para cada gen.

Nombre del oligonucleotide	Secuencia (5'-3')	Tamaño del amplicón (Pb)	Número de acceso al GeneBank
αActin			
aActinF1	ATGTGTGACGACGAGGAGACC	169	X80130.1
aActinR1	CTACATAGGAGTCTTTCTGCC		
GPD1			
GPD1F1	CCTGGCATCCCTATGAGCG	173	NM_022215.2
GPD1R1	CTGTGTCCACCTCTTGTACC		
GPAT			
GPATF2	GATGTCAGTCCTGGCCTTGC	145	NM_017274.1
GPATR2	GCTCCTTGGCCTGGCTCACC		
HK2			
HK2F2	GCAGCTGTGAAAATGTTGCC	120	NM_012735.2
HK2R2	CCGTCACCCTTACTCGGAGC		
PFKm			
PFKmF2	CCAAGGCAACCGAGTGCTGG	150	BC094212.1
PFKmR2	GGTTCTTCTTGGGTAGAGTCC		
GAPDH			
GAPDHF1	GGACATTGTTGCCATCAACG	234	NM_017008.4
GAPDIR1	CTCCATGGTGGTGAAGACGC		
PK2			
PK2F2	CACACTGAAGATCACCTGG	146	NM_053297.2
PK2R2	CCTTCACCTGCAGGGAGATG		

3.5. Cuantificación del mRNA

Para evaluar la expresión de los genes HK2, PFK-M, GAPDH, PK2, GPD1 y GPAT se utilizaron los oligonucleótidos que se muestran en la Tabla 2. Como estándar interno para normalizar la expresión de cada gen se utilizó la expresión del gen de α Actina. Las condiciones del programa para PCR fueron las siguientes: 94°C por 3 minutos; seguido de 40 ciclos con 94°C por 30 segundos, 58°C por 40 segundos y 72°C por 40 segundos y finalmente 72°C por 7 minutos. Para cada gen se obtuvieron fragmentos de 200-250 pb a partir de cDNA y fueron purificados usando el kit de GFX PCR y Gel Band Purification (GE Healthcare). A partir de cada fragmento de PCR purificado se realizaron curvas de calibración usando diluciones seriadas de 5×10^{-3} a 5×10^{-8} ng/ μ L.

La cuantificación de la expresión de cada gen en ventrículo izquierdo se realizó por PCR cuantitativo en un equipo Step-One Real-Time PCR system (Applied Biosystems,). Las reacciones de PCR fueron en un volumen final de 15 μ l conteniendo 7.5 μ l de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 5 μ l of H₂O miliQ, 0.25 μ l de cada oligonucleótido (20 μ M) y 2 μ l de cDNA. Las condiciones de amplificación y detección de los amplicones fueron las siguientes: 95 °C por 10 min; 95 °C por 15 segundos y 60 °C por 1 minuto (40 ciclos) con una única medición de fluorescencia. Las curvas para cada gen fueron usadas como controles positivos, mientras que las reacciones sin templado y solo con los oligonucleótidos fueron usadas como control negativo. Los niveles de expresión de cada gen (ng/ μ L) fueron normalizados a α Actina y reportados como valores de expresión relativa de cada gen entre α Actina.

3.6. Análisis Estadístico

El diseño estadístico fue un diseño completamente al azar. Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA). Para verificar la normalidad de los datos se sometieron a la prueba de Kolmogorov-Smirnov y para evaluar diferencias entre cada tratamiento se usó la prueba de comparación múltiple de Duncan a un nivel de probabilidad del 95%, usando el software estadístico NCSS (2007).

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Integridad y Pureza del RNA Total

Para medir la expresión de cada uno de los genes en el periodo de preñez y posparto, se realizó la extracción de RNA total de ventrículo izquierdo siguiendo las instrucciones del protocolo TRIzol® descrito anteriormente. Se comprobó la eficiencia del proceso de extracción y la integridad de las muestras al observar RNA ribosomales 28S y 18S con bandas definidas (Figura 8). Así mismo, se obtuvo un cociente de 2.03 ± 0.1 en relación de absorbancia 260/280 para todas las muestras de RNA extraído, lo cual indica la pureza del RNA. El RNA se limpió de DNA genómico contaminante y se utilizó como templado para la síntesis de cDNA para evaluar la expresión de cada uno de los genes.

4.2. Amplificación y Curvas Estándar de HK2, PFK-M, PK2, GAPDH, GPDI y GPAT.

Se evaluó que los productos de PCR utilizados para la preparación de las curvas estándar de cada uno de los genes, amplificaran una sola banda con tamaños entre 170 a 250 pb para cada gen (Figura 9). Además, cada producto de PCR fue amplificado por PCR cuantitativo presentando una sola temperatura de disociación de ~ 82 °C para cada uno de los genes. Lo anterior, indica que los oligonucleótidos utilizados solo amplifican un solo fragmento de PCR para cada gen evaluado y su especificidad. También, las curvas estándar para cada uno de genes tuvieron una eficiencia de amplificación promedio de 99% (± 3) indicando la precisión y reproductibilidad del experimental.

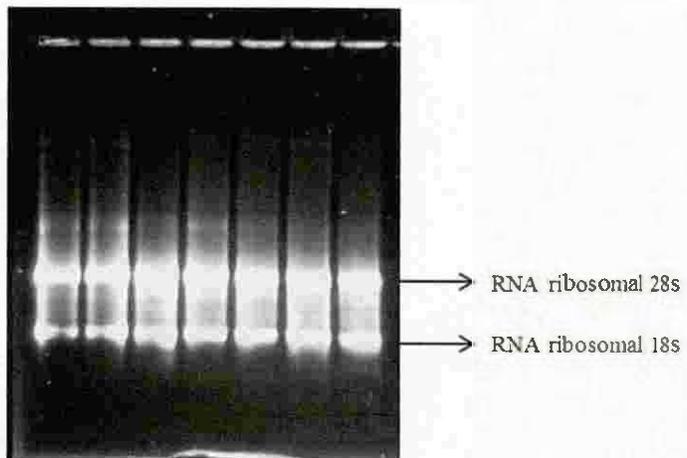


Figura 8. Análisis de la integridad del RNA total extraído de ventrículo izquierdo. La evaluación se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 1%.



Figura 9. Productos de PCR obtenidos a partir de DNAc de ventriculo izquierdo utilizados para realizar las curvas de calibración de α Actina (carril 1), GAPDH (carril 2), HK2 (carril 3), PK2 (carril 4), PFK-M (carril 5), GPD1 (carril 6) y GPAT (carril 7). Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.2%; MP, marcador de peso molecular 1KB Plus DNA Ladder.

4.3. Niveles de Expresión de Genes Glucolíticos y de Biosíntesis de Lípidos

Los niveles de expresión del mRNA para HK2, PFK-M, GAPDH, PK2, GPD1 y GPAT fueron evaluados en ventrículo izquierdo de rata para determinar su relación con la reprogramación metabólica en respuesta a la preñez y posparto (Figuras 10 y 11). Los transcritos para los genes glucolíticos HK2, PFK-M y GAPDH aumentaron ($P<0.05$) 1.7, 3.2 y 2 veces durante la preñez tardía (18 días de gestación) en ventrículo izquierdo, respectivamente, comparado a los no preñadas (controles) y posteriormente disminuyeron a los niveles basales durante el posparto. En contraste, los niveles de mRNA de PK2 disminuyeron ($P<0.05$) 2 veces durante la preñez tardía comparado a los no preñadas y aumentaron a los niveles basales durante el posparto. Durante la preñez tardía (12 días de gestación), no se detectaron cambios significativos en los niveles de expresión de todos los genes glucolíticos comparados a los controles y posparto.

Por otro lado, los transcritos para los genes de biosíntesis de glicerolípidos GPD1 aumentaron ($P<0.05$) 2.5 y 3.1 veces durante la preñez temprana y tardía, respectivamente, comparados a los controles y posteriormente disminuyeron a los niveles basales durante el posparto (Figura 11). En contraste, los transcritos para GPAT disminuyeron ($P<0.05$) 5 veces durante la preñez temprana y aumentaron ($P<0.05$) 13 veces durante la preñez tardía comparado a los controles, mientras que durante el posparto los niveles retomaron los valores basales de los controles.

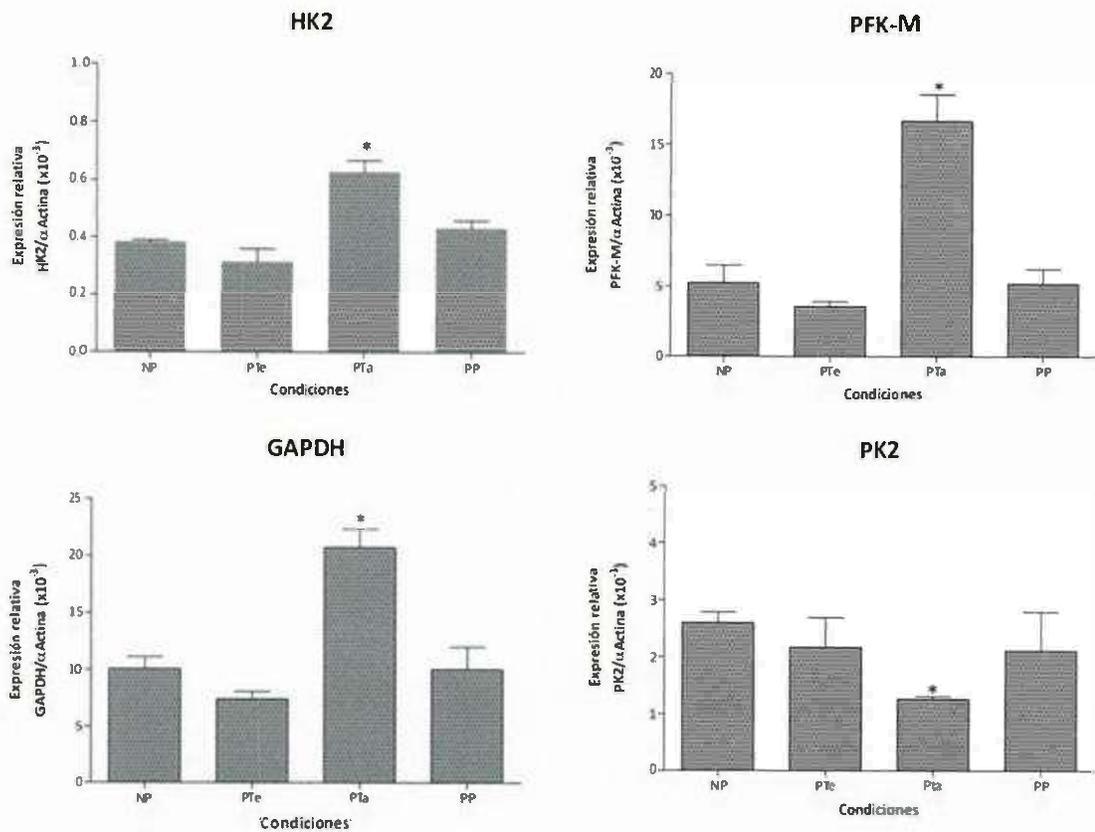


Figura 10. Expresión relativa de los genes glucolíticos en ventrículo izquierdo de rata. Las condiciones experimentales se muestran de la siguiente manera: no preñadas o control (NP), ratas en preñez temprana (PTe), ratas en preñez tardía (PTa) y ratas posparto (PP). Las barras representan la media \pm errores estándar. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas con respecto al control (ANOVA $p < 0.05$).

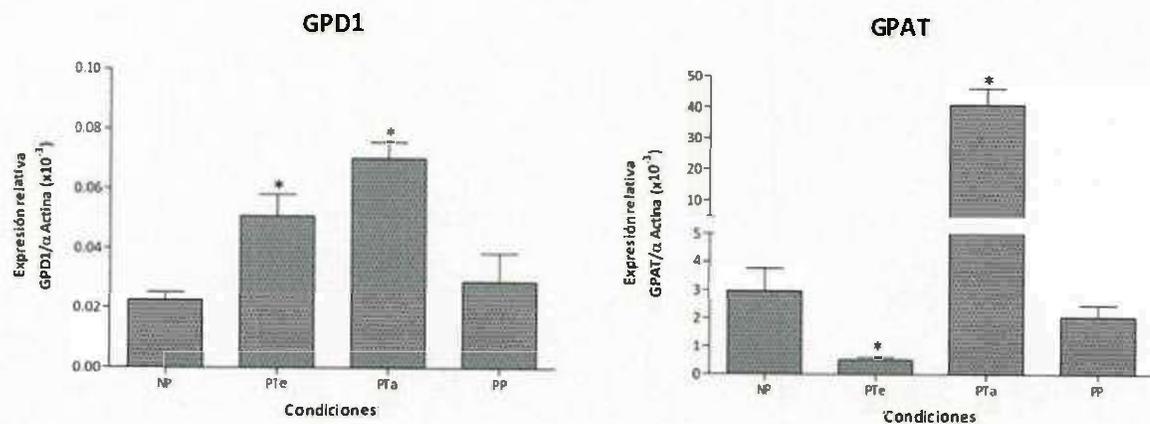


Figura 11. Expresión relativa de genes de biosíntesis de lípidos en ventrículo izquierdo de rata. Las condiciones experimentales se muestran de la siguiente manera: no preñadas o control (NP), ratas en preñez temprana (PTe), ratas en preñez tardía (PTa) y ratas posparto (PP). Las barras representan la media \pm errores estándar. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas respecto al control (ANOVA $p < 0.05$).

El aumento de los genes glucolíticos (HK2, PFK-M y GAPDH) y biosíntesis de lípidos (GPD1 y GPAT) en ventrículo izquierdo de rata durante la preñez tardía, sugiere un aumento en glucólisis y biosíntesis de lípidos para satisfacer las demandas del feto en desarrollo y la demanda de AG materno, respectivamente. Además, la inducción de estos genes fue reversible durante el posparto lo que sugiere una reprogramación del metabolismo de CHO y AG. Datos generados en nuestro laboratorio (datos no publicados) demuestran que los transcritos de HIF-1 α y PPAR γ son inducidos durante la preñez tardía en ventrículo izquierdo de rata, y que dicha inducción es reversible durante el posparto. Por lo anterior, el aumento de los genes glucolíticos y biosíntesis de lípidos durante la preñez tardía sugiere que son inducidos vía HIF-1 α y PPAR γ . Además, comparado a hipertrofia patológica en donde la activación de HIF-1 α y PPAR γ induce cambios en el metabolismo cardíaco que son característicos y contribuyen a enfermedades del corazón. La inducción reversible de HIF-1 α y PPAR γ junto con la de los genes glucolíticos y biosíntesis de lípidos durante el posparto, sugiere que la reprogramación del metabolismo en ventrículo izquierdo permite al corazón no sufrir daños que lo lleven a desarrollar patologías.

El metabolismo cardíaco normal del corazón se basa principalmente en la obtención de energía a partir de AG y en porcentaje menor de glucosa. Factores patológicos, como enfermedades de hipertensión e infartos los cuales son irreversibles, alteran el metabolismo cardíaco provocando una reprogramación en el uso de sustrato para la obtención de energía. En las condiciones anteriores, el uso de AG disminuye y glucólisis aumenta como un mecanismo para mantener las demandas de energía y adaptación a la sobrecarga de presión (Leal et al., 2009). Además, en este tipo de hipertrofia la

expresión de genes involucrados en el metabolismo de glucosa y AG son inducidos a nivel transcripcional por HIF-1 α y PPAR γ . En humanos y ratón, se ha demostrado que HIF-1 α activa los genes glucolíticos GLUT1, HK-2, PFK-M, GAPDH y PDK4, y PPAR γ activa los genes de la biosíntesis de glicero-lípidos GPD1 y GPAT en respuesta al estrés patológico (Krishnan et al., 2009).

En contraste, la hipertrofia cardíaca fisiológica inducida por el ejercicio, que se caracteriza por ser reversible, aumenta la oxidación de glucosa y AG para la generación de ATP. Cuando la actividad pasa de los 10 minutos se activa el sistema glucolítico, y a medida que la actividad física se incrementa, la glucólisis es reemplazada por β -oxidación de AG (Leal E. et al., 2009). En corazones de ratas ejercitadas, se demostró una inducción en la expresión de genes involucrados en el metabolismo de glucosa (HK1, PFK, piruvato deshidrogenasa fosfatasa y proteína reguladora de glucocinasa) y AG (proteína desaclopadora 2 y proteína transportadora CD36) (Strom et al., 2005).

Durante la hipertrofia cardíaca fisiológica inducida por preñez, el gasto cardíaco va aumentando, en especial el metabolismo cardíaco se altera para satisfacer las necesidades del feto y el aumento de la demanda de trabajo cardíaco. Poco se conoce sobre los cambios metabólicos que ocurren en el corazón durante el embarazo. Estudios previos en sangre, demuestran que en la etapa temprana del embarazo el metabolismo materno es anabólico en preparación para las demandas próximas, mientras que en la etapa tardía del embarazo el metabolismo se convierte a catabólico por el crecimiento rápido del feto. Por lo tanto, la mayoría de la glucosa es utilizada por el feto en desarrollo, mientras que para el consumo materno aumentan AG como combustible para satisfacer sus demandas energéticas.

CONCLUSIONES

- ✓ La preñez induce cambios en la expresión de genes glucolíticos (HK2, PFK-M y GAPDH) y de biosíntesis de lípidos (GPD1 y GPAT) en ventrículo izquierdo de rata, y los cuales son reversibles durante el posparto.
- ✓ La inducción de genes glucolíticos y biosíntesis de lípidos sugiere una reprogramación del metabolismo de CHO y AG durante la preñez y el posparto.
- ✓ El aumento en la expresión de genes glucolíticos durante la preñez tardía sugiere un aumento en la glucólisis que permite satisfacer las demandas de DHAP necesario para la biosíntesis AG utilizado para la producción de energía en el corazón.

BIBLIOGRAFIA

- Assayag, P., Carré, F., Chevalier, B., Delcayre, C., Mansier, P., y Swynghedauw, B. (1997). Compensated cardiac hypertrophy: arrhythmogenicity and the new myocardial phenotype. I. Fibrosis. *Cardiovascular research*, 34, 439-444.
- Basel-Vanagaite, L., Zevit, N., Zahav, A. H., Guo, L., Parathath, S., Pasmanik-Chor, M. y Shamir, R. (2012). Transient infantile hypertriglyceridemia, fatty liver, and hepatic fibrosis caused by mutated GPD1, encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1. *The American Journal of Human Genetics*, 90, 49-60.
- Belardinelli, R., Georgiou, D., Cianci, G., y Purcaro, A. (1999). Randomized, controlled trial of long-term moderate exercise training in chronic heart failure effects on functional capacity, quality of life, and clinical outcome. *Circulation*, 99, 1173-1182.
- Berne, R.M. (1981). Cardiovascular physiology. *Annual Review of Physiology*, 43, 357-358.
- Brower, G.L. y Janicki, J.S. (2001). Contribution of ventricular remodeling to pathogenesis of heart failure in rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 280, H674-H683.
- Cáceres, A.J., Portillo, R., Acosta, H., Rosales, D., Quiñones, W., Avilan, L. y Concepción, J. L. (2003). Molecular and biochemical characterization of hexokinase from *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and biochemical parasitology*, 126, 251-262.
- Cao, J., Li, J. L., Li, D., Tobin, J. F. y Gimeno, R. E. (2006). Molecular identification of microsomal acyl-CoA: glycerol-3-phosphate acyltransferase, a key enzyme in *de*

- novo* triacylglycerol synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 103, 19695-19700.
- Capeless, E. L. y Clapp, J. F. (1989). Cardiovascular changes in early phase of pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 161, 1449-1453.
- Carabello, B. A. (2002). Evolution of the Study of Left Ventricular Function Everything Old Is New Again. *Circulation*, 105, 2701-2703.
- Carbó, R. y Guarner, V. (2003). Cambios en el metabolismo cardíaco y su posible aprovechamiento en la terapéutica (parte I). *Archivos de Cardiología de México*, 73, 218-229.
- Cárdenas, M. L., Cornish-Bowden, A. y Ureta, T. (1998). Evolution and regulatory role of the hexokinases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 140, 242-264.
- Castro, P., Gabrielli, L., Verdejo, H., Greig, D., Mellado, R., Concepción, R. y Lavandero, S. (2010). Metabolismo energético del corazón y sus proyecciones en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca. *Revista Médica de Chile*, 138, 1028-1039.
- Chapman, A. B., Zamudio, S., Woodmansee, W., Merouani, A., Osorio, F., Johnson, A. y Schrier, R. W. (1997). Systemic and renal hemodynamic changes in the luteal phase of the menstrual cycle mimic early pregnancy. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 273, F777-F782.
- Currie, P. D. y Sullivan, D. T. (1994). Structure and expression of the gene encoding phosphofructokinase (PFK) in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 24679-24687.

- Dunaway, G. A., Kasten, T. P., Sebo, T. y Trapp, R. (1988). Analysis of the phosphofructokinase subunits and isoenzymes in human tissues. *Biochemistry. J.*, 251, 677-683.
- Duvernell, D. D. y Eanes, W. F. (2000). Contrasting molecular population genetics of four hexokinases in *Drosophila melanogaster*, *D. simulans* and *D. yakuba*. *Genetics*, 156, 1191-1201.
- Egan, B. y Zierath, J. R. (2013). Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metabolism*, 17, 162-184.
- Eghbali, M., Wang, Y., Toro, L. y Stefani, E. (2006). Heart hypertrophy during pregnancy: a better functioning heart?. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 16, 285-291.
- Eghbali, M., Deva, R., Alioua, A., Minosyan, T. Y., Ruan, H., Wang, Y. y Stefani, E. (2005). Molecular and functional signature of heart hypertrophy during pregnancy. *Circulation Research*, 96, 1208-1216.
- Gao, Y. Z., Jiang, Y., Wu, X., Bai, C. Y., Pan, Y. C. y Sun, Y. Z. (2011). Molecular characteristics and expression profiles of glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (GPD1) gene in pig. *Molecular Biology Reports*, 38, 1875-1881.
- Gilson, G. J., Mosher, M. D. y Conrad, K. P. 1992. Systemic hemodynamics and oxygen transport during pregnancy in chronically instrumented, conscious rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 263, H1911-H1918.
- Grossman, W., Jones, D. y McLaurin, L. P. (1975). Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *Journal of Clinical Investigation*, 56, 56.

- Haider, A. W., Larson, M. G., Benjamin, E. J. y Levy, D. (1998). Increased left ventricular mass and hypertrophy are associated with increased risk for sudden death. *Journal of the American College of Cardiology*, 32, 1454-1459.
- Kahn, A. (1997). Transcriptional regulation by glucose in the liver. *Biochimie*, 79, 113-118.
- Katz, R., Karliner, J. S. y Resnik, R. (1978). Effects of a natural volume overload state (pregnancy) on left ventricular performance in normal human subjects. *Circulation*, 58, 434-441.
- Kayne, F. J. (1973). 11 Pyruvate Kinase. *The enzymes*, 8, 353-382.
- Leal, E., Aparicio, D., Luti, Y., Acosta, L., Finol, F., Rojas, B. E. y Cabrera, M. M. (2009). Actividad física y enfermedad cardiovascular. *Revista Latinoamericana de Hipertensión*, 4.
- Lehman, J. J., y Kelly, D. P. (2002). Gene regulatory mechanisms governing energy metabolism during cardiac hypertrophic growth. *Heart failure reviews*, 7, 175-185.
- Lewin, T. M., y Coleman, R. A. (2003). Regulation of myocardial triacylglycerol synthesis and metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1634, 63-75.
- Longhurst, J. C. y Stebbins, C. L. (1997). The power athlete. *Cardiology clinics*, 15, 413-429.
- Lynedjian, P. B. (1993). Mammalian glucokinase and its gene. *Biochemical Journal*, 293, 1.

R.T 170060

- Mabie, W. C., DiSessa, T. G., Crocker, L. G., Sibai, B. M. y Arheart, K. L. (1994). A longitudinal study of cardiac output in normal human pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology*, 170, 849-856.
- MacLellan, W. R. y Schneider, M. D. (2000). Genetic dissection of cardiac growth control pathways. *Annual Review of Physiology*, 62, 289-320.
- Marín-Hernández, A. (2009). El factor inducido por la hipoxia-1 (HIF-1) y la glucólisis en las células tumorales. *Revista de educación bioquímica*, 28, 42-51.
- Mathews, C. K. y Van Holde, K. E. (1996). *Biochemistry*, 2a edition, The Benjamin/Cummings Publishing company.
- Moore, R. L., Musch, T. I., Yelamarty, R. V., Scaduto, R. C., Semanchick, A. M., Elensky, M. y Cheung, J. Y. (1993). Chronic exercise alters contractility and morphology of isolated rat cardiac myocytes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 264, C1180-C1189.
- Mokelke, E. A., Palmer, B. M., Cheung, J. Y. y Moore, R. L. (1997). Endurance training does not affect intrinsic calcium current characteristics in rat myocardium. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 273, H1193-H1197.
- Muñoz, M. E. y Ponce, E. (2003). Pyruvate kinase: current status of regulatory and functional properties. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 135, 197-218.
- Nagatomo, Y., Carabello, B. A., Hamawaki, M., Nemoto, S., Matsuo, T. y McDermott, P. J. (1999). Translational mechanisms accelerate the rate of protein synthesis during canine pressure-overload hypertrophy. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 277, H2176-H2184.

- Osawa, H., Printz, R. L., Whitesell, R. R. y Granner, D. K. (1995). Regulation of hexokinase II gene transcription and glucose phosphorylation by catecholamines, cyclic AMP, and insulin. *Diabetes*, *44*, 1426-1432.
- Ou, X., Ji, C., Han, X., Zhao, X., Li, X., Mao, Y. y Rao, Z. 2006. Crystal structures of human glycerol 3-phosphate dehydrogenase 1 (GPD1). *Journal of Molecular Biology*, *357*, 858-869.
- Patsouris, D., Mandard, S., Voshol, P. J., Escher, P., Tan, N. S., Havekes, L. M. y Kersten, S. (2004). PPAR α governs glycerol metabolism. *Journal of Clinical Investigation*, *114*, 94.
- Pluim, B. M., Swenne, C. A., Zwinderman, A. H., Maan, A. C., Van der Laarse, A., Doornbos, J. y Van der Wall, E. E. (1999). Correlation of heart rate variability with cardiac functional and metabolic variables in cyclists with training induced left ventricular hypertrophy. *Heart*, *81*, 612-617.
- Postic, C., Leturque, A., Printz, R. L., Maulard, P., Loizeau, M., Granner, D. K. y Girard, J. E. (1994). Development and regulation of glucose transporter and hexokinase expression in rat. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *266*, E548-E559.
- Schannwell, C. M., Zimmermann, T., Schneppenheim, M., Plehn, G., Marx, R. y Strauer, B. E. (2001). Left ventricular hypertrophy and diastolic dysfunction in healthy pregnant women. *Cardiology*, *97*, 73-78.
- Shephard, R. J. (1996). The athlete's heart: is big beautiful?. *British Journal of Sports Medicine*, *30*, 5-10.

- Shimoyama, M., Hayashi, D., Takimoto, E., Zou, Y., Oka, T., Uozumi, H. y Komuro, I. (1999). Calcineurin plays a critical role in pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Circulation*, *100*, 2449-2454.
- Slangen, B. F., Out, I. C., Janssen, B. J. y Peeters, L. L. (1997). Blood pressure and heart rate variability in early pregnancy in rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, *273*, H1794-H1799.
- Spaanderman, M. E. A., Meertens, M., Van Bussel, M., Ekhart, T. H. A. y Peeters, L. L. H. (2000). Cardiac output increases independently of basal metabolic rate in early human pregnancy. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, *278*, H1585-H1588.
- Strom, C. C., Aplin, M., Ploug, T., Christoffersen, T. E., Langfort, J., Viese, M. y Sheikh, S. P. (2005). Expression profiling reveals differences in metabolic gene expression between exercise-induced cardiac effects and maladaptive cardiac hypertrophy. *Federation of European Biochemical Societies Journal*, *272*, 2684-2695.
- Valentini, G., Chiarelli, L., Fortin, R., Speranza, M. L., Galizzi, A. y Mattevi, A. (2000). The allosteric regulation of pyruvate kinase A site-directed mutagenesis study. *Journal of Biological Chemistry*, *275*, 18145-18152.
- Van Eickels, M., Grohé, C., Cleutjens, J. P., Janssen, B. J., Wellens, H. J. y Doevendans, P. A. (2001). 17 β -Estradiol attenuates the development of pressure-overload hypertrophy. *Circulation*, *104*, 1419-1423.
- Vaulont, S., Munnich, A., Decaux, J. F. y Kahn, A. (1986). Transcriptional and post-transcriptional regulation of L-type pyruvate kinase gene expression in rat liver. *Journal of Biological Chemistry*, *261*, 7621-7625.

- Weiss, R. G. y Maslov, M. (2004). Normal myocardial metabolism: fueling cardiac contraction. *Advanced Studies in Medicine*, 4, S457-S463.
- Wendel, A. A., Lewin, T. M. y Coleman, R. A. (2009). Glycerol-3-phosphate acyltransferases: rate limiting enzymes of triacylglycerol biosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1791, 501-506.
- Wilkins, B. J. y Molkentin, J. D. (2002). Calcineurin and cardiac hypertrophy: where have we been? Where are we going?. *The Journal of Physiology*, 541, 1-8.
- Willenheimer, R., Erhardt, L., Cline, C., Rydberg, E. y Israelsson, B. (1998). Exercise training in heart failure improves quality of life and exercise capacity. *European Heart Journal*, 19, 774-781.
- Wilson, J. E. (1995). Hexokinases. In *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Volume 126* (pp. 65-198). Springer Berlin Heidelberg.
- Wilson, J. E. (2003). Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *Journal of Experimental Biology*, 206, 2049-2057.
- Vaulont, S., Munnich, A., Decaux, J. F. y Kahn, A. (1986). Transcriptional and post-transcriptional regulation of L-type pyruvate kinase gene expression in rat liver. *Journal of Biological Chemistry*, 261, 7621-7625