



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

CENTRO UNIVERSITARIO UAEM AMECAMECA

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
“SALVADOR ZUBIRÁN”

LABORATORIO DE GASTROENTEROLOGÍA

**“EFECTO DEL EJERCICIO FÍSICO SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE
LA GLUTAMINA SINTETASA EN UN MODELO ANIMAL DE DAÑO
HEPÁTICO”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE LA
LICENCIATURA EN NUTRICIÓN

PRESENTAN:

JUÁREZ GALICIA DAFNE

VÁZQUEZ CARCAÑO LIZBETH MIRIAM

BAJO LA ASESORIA DE:

M. EN E.S. NARCISO CAMPERO GARNICA

COASESORIA DE:

DR. MIGUEL ANGEL TORRES VEGA



INCMNSZ

MARZO - 2018, ESTADO DE MÉXICO

AGRADECIMIENTOS

Un simple, gracias resulta insuficiente para poder expresar con palabras la gratitud que siento hacia tantas personas por todo el apoyo brindado.

Para encabezar la lista, agradezco con todo mi corazón a la persona que más admiro, y que sin escatimar, siempre me ha apoyado en todo; mi amada **MAMITA**, y por supuesto a mis hermanos **Peter** y **Roly**, por todo su amor, comprensión y paciencia.

Dirijo un agradecimiento muy pero muy especial al **Dr. Miguel A. Torres** por depositar en mí, confianza, libertad y alegría para trabajar, por darme los mejores consejos en el ámbito profesional y por guiarme de fondo en lo que conllevó a la realización de este trabajo.

Así mismo debo mi gratitud al **Dr. Aarón** por tratarme siempre con amabilidad, a Fausto por transmitirme parte de su conocimiento y experiencia en el laboratorio, al **M. en E.S. Narciso Campero**, por todo el apoyo académico recibido y tratarme con tanta virtud que solo una persona de excelencia puede dar.

A la **Lic. Miriam Valencia** y a la **Lic. Claudia Eneida Díaz** por su gran apoyo y disponibilidad en la culminación de esta etapa tan importante para mí.

A **Dafne** y **Beto** por ser un buen equipo de trabajo y excelentes cómplices en todo el camino recorrido y su valiosa amistad. A **Laura E. Méndez**, a **Nayeli Aguirre** e **Isaí Carreón** quienes como buenos amigos siempre están conmigo. Me siento honrada por tener a unos amigos como ustedes (**Buddy, Daf, Lau, Nay e Isita**).

DEDICATORIA

“Una vida, un amor, un Dios”.

Dedico este trabajo, a ti, **Abbá**, en quien encuentro mi verdadera identidad y origen, con quien descubro mi propósito y destino. Gracias por ser mi fuente de inspiración, paciencia y gozo para concretar la titulación profesional que hace tiempo te prometí.

Te amo.

“Porque tú formaste mis entrañas, me hiciste en el seno de mi madre. Te alabaré, porque asombrosa y maravillosamente he sido hecho; maravillosas son tus obras, y mi alma lo sabe muy bien. No estaba oculto de ti mi cuerpo, cuando en secreto fui formado, y entretejido en las profundidades de la tierra. Tus ojos vieron mi embrión y en tu libro se escribieron todos los días que me fueron dados, cuando no existía ni un solo de ellos. ¡Cuán preciosos también son para mí, oh Dios, tus pensamientos! ¡Cuán inmensa es la suma de ellos! Si los contara, serían más que la arena; al despertar aún estoy contigo”.
Sal 139: 13-18

Agradecimientos.

Gracias Señor por tu amor, por ponerme en este camino, y permitirme concluir este trabajo, fruto de los dones que me permitiste ejercitar aún con mis limitaciones. ¡Cristo Rey Nuestro!

A ti LIZ. Por tus locuras que permitieron consolidar este trabajo, por tu compañerismo y amistad.

A Isi y al †P. José Luis Arguelles. Por compartir el ejercicio del servicio, enseñarme a encontrar sentido a la vida y a cada situación que se presenta. Gracias por empujar el motor para concluir no solo la licenciatura, sino seguir adelante y amar a toda persona sin discriminar.

A mi familia. Mabu y †abuelo Chenchó por ser también mis padres, aceptarnos como hijas y permitirme compartir con ustedes. A mi mamá por estar. A ti Bibi por ser ejemplo de fortaleza y lucha en la escuela.

A mis tíos †Jorge y Yoly, que con tanto cariño nos reciben y acogen.

Al Dr. Miguel Ángel Torres Vega, por permitirme incursionar en el mundo de la investigación y compartir sus conocimientos. Gracias por su apoyo incondicional y su exigencia, aún con tantas brechas. A la †Sra. Mari, por recibirme con tanto cariño y confianza, gracias por su compañía.

Al INNSZ, departamento de gastroenterología, gracias por sus experiencias y apoyo. Betito no olvidaré el ánimo que me dabas, Almita gracias por tu amistad, Rosi Muñoz gracias por tu confianza.

Al Instituto de Biotecnología de la UNAM, Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Dra. Laura Palomares y Dr. Tonatiuh Ramírez. Especialmente a ti Ruth Pastor porque me diste ejemplo de la docencia que no se deslinda de la investigación, mostrándome que el saber se puede compartir con quien menos imaginas, y permitirme aprender y aprehender tanto conocimiento con disciplina y pasión sin ser egoísta. A todos los chicos especialmente a Ramsi, Lili Gallo, Vane y Lili, por compartir su amistad, tiempo y experiencia.

Al laboratorio del Dr. Alagón, gracias Alejandro Olvera por tu apoyo y tu invitación.

Al departamento de división de nutrición, al Dr. Armando Tovar por su confianza y a Iván por su apoyo.

Al Centro Universitario UAEM, Amecameca, planta docente, a cada le haré énfasis personal de su legado en mí, pues me han regalado algo invaluable en mi formación humana y profesional, creando una mezcla con lo mejor de cada uno.

Dedicatorias.

A la memoria de mi †Tío Alfredo, por inculcarme disciplina y respeto por lo que se hace, enseñarme que lo que se inicia se acaba, y que lo que se hace se debe hacer siempre bien.

A la† M. Anita Durán Ibarra, por depositar su apoyo y confianza incondicional desde el primer momento que nos topamos en las aulas y hasta el final.

A ti †Meli, que te hubiera gustado llegar.

“El que no vive para servir, no sirve para vivir”.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	7
2. MARCO TEÓRICO.....	9
2.1 Generalidades del hígado.....	9
2.1.1 Arquitectura anatómico-fisiológica del hígado.....	9
2.1.2 Células hepáticas y sus funciones.....	10
2.2 Daño hepático.....	12
2.2.1 Fibrosis hepática.....	12
2.2.2 Cirrosis hepática.....	14
2.2.2.1 La encefalopatía hepática en la cirrosis.....	16
2.3 Prescripción dietética en pacientes con daño hepático crónico y encefalopatía hepática	18
2.4 Intervención del músculo en la eliminación del amonio durante la cirrosis (Teoría del tráfico inter-órgano del amonio).....	21
2.4.1 La glutamina sintetasa en la remoción de amonio.....	23
2.5 Músculo esquelético.....	24
2.6 El ejercicio físico como intervención terapéutica en la encefalopatía hepática	27
2.7 Modelos animales de daño hepático.....	29
2.8 Marcadores moleculares de daño hepático	30
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	32
4. JUSTIFICACIÓN.....	33
5. OBJETIVO GENERAL.....	35
6. HIPÓTESIS.....	36
7. DISEÑO METODOLÓGICO.....	37

7.1 Tipo de estudio.....	37
7.2 Límites de tiempo y espacio.....	37
7.3 Variable independiente.....	37
7.4 Variable dependiente.....	37
7.5 Tamaño de muestra.....	37
7.6 Criterios de inclusión.....	38
7.7 Criterios de exclusión.....	38
7.8 Criterios de eliminación.....	38
7.9 Diagrama metodológico.....	39
7.10 Definición de grupos.....	39
7.11 Material y métodos.....	40
7.11.1 Desarrollo del modelo experimental.....	40
7.11.2 Eutanasia de las ratas.....	42
7.11.3 Extracción de ácido ribonucleico total de músculo esquelético e hígado.....	44
7.11.4 Ácido ribonucleico total tratado con desoxirribonucleasa I recombinant, libre de ribonucleasa A.....	46
7.11.5 Cuantificación, integridad y concentración del ácido ribonucleico.....	47
7.11.6 Síntesis de ácido desoxirribonucleico complementario a partir de ácido ribonucléico (transcripción reversa).....	49
7.11.7 Cuantificación de la expresión génica por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.....	50
7.11.8 Curvas de amplificación de PCR en tiempo real.....	53
7.12 Pruebas estadísticas	54
7.13 Recursos materiales y humanos.....	55
8. RESULTADOS.....	57
8.1 Caracterización del modelo de daño hepático	57

8.1.1 Variación de peso en las ratas durante el período de experimentación.....	57
8.1.2 Cambios morfológicos en el hígado de las ratas tratadas con DEN.....	60
8.1.3 Determinación de daño hepático por pruebas histopatológicas.....	61
8.1.4 Cuantificación de la expresión de los genes a nivel del ARN mensajero.....	64
8.1.4.1 Cuantificación e integridad del ARN.....	64
8.1.5 Expresión génica de GS, HNF4- α , PC4 y GP46 en el hígado.....	65
8.1.6 Expresión génica de la glutamina sintetasa en el músculo de ratas del L-T12.....	67
8.1.7 Expresión génica de la glutamina sintetasa en el músculo de ratas del L-T16.....	68
9. CONCLUSIONES.....	70
10. SUGERENCIAS.....	71
11. BIBLIOGRAFÍA.....	72
12. ANEXOS.....	82
14. GLOSARIO.....	106

1. INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas se han hecho grandes avances en el campo de la genética abriendo nuevas áreas de investigación. La aplicación de las técnicas de la biología molecular y el gran proyecto del Genoma Humano han permitido comprender mejor el proceso en el que intervienen los factores ambientales en la regulación de genes.¹

Las interacciones de los genes con los nutrientes, estudiadas en la nutrición molecular, se han abordado en dos ciencias esenciales. Por un lado, está la nutrigenómica que estudia la influencia de los nutrientes en la expresión de genes, y por el otro, la nutrigenética, la cual, da a conocer las variaciones genéticas y la respuesta del organismo a los componentes de la dieta.¹

La alimentación y el ejercicio son dos de los factores ambientales incluidos en estilo de vida que intervienen en la modulación genética. Mientras que miles de sustancia presentes en los alimentos ingeridos pueden alterar la expresión del genoma de manera directa e indirecta. El ejercicio físico, es capaz de modificar la expresión génica de enzimas, receptores, transportadores u hormonas, involucrados en el metabolismo y dependiendo del tipo de ejercicio se pueden provocar cambios inmediatos estructurales o químicos en las moléculas del ADN.¹

El presente trabajo está enfocado en estudiar el efecto que tiene la práctica de ejercicio físico en la expresión génica de una enzima involucrada en la eliminación de amonio por la vía de síntesis de glutamina en un modelo animal de daño hepático.

Actualmente la prescripción de actividad física estructurada está bien establecida en algunas enfermedades crónico-degenerativas no transmisibles como la obesidad, diabetes mellitus, arterosclerosis, etc. No así para el paciente con fibrosis, cirrosis o cáncer hepático.

El tema central se encuentra basado en el papel del profesional de nutrición en nuevos campos de investigación que permiten generar evidencia para explorar terapias de ejercicio que puedan ser benéficas en el tratamiento integral del paciente con algún tipo de daño en el hígado.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades del hígado

El hígado es el órgano interno más voluminoso del cuerpo humano, ocupa el cuadrante superior derecho del abdomen, situándose debajo del diafragma, por encima del estómago, riñón derecho, duodeno y colon; está rodeado de una capa fibrosa, posee un color marrón rojizo oscuro y su peso promedio en el adulto es de 1,5 kg.^{2,3}

2.1.1 Arquitectura anatomo-fisiológica del hígado

El hígado muestra una estructura conformada por lóbulos; divididos en numerosos lobulillos considerados como una unidad funcional, y se organizan en torno a una vena central, representando una forma hexagonal. Alrededor de la vena central las células hepáticas o hepatocitos se sitúan en hileras que irradian hacia fuera. En la periferia de los lobulillos se disponen ramas intralobulillares de la arteria hepática, de la vena porta y del conducto hepático biliar (Figura 1-A).⁴

Las ramas intrahepáticas arteriales y la vena porta convergen en los sinusoides, los cuales son grandes espacios revestidos por células endoteliales, que confirieren una vasta permeabilidad para mantener al hígado en óptimo estado.^{5,6}

Entre los cordones de hepatocitos y las células epiteliales sinusoidales se localiza el espacio de Disse, donde se encuentra una mezcla de proteínas denominada matriz extracelular (MEC), que refuerza la arquitectura del órgano.^{6,7}

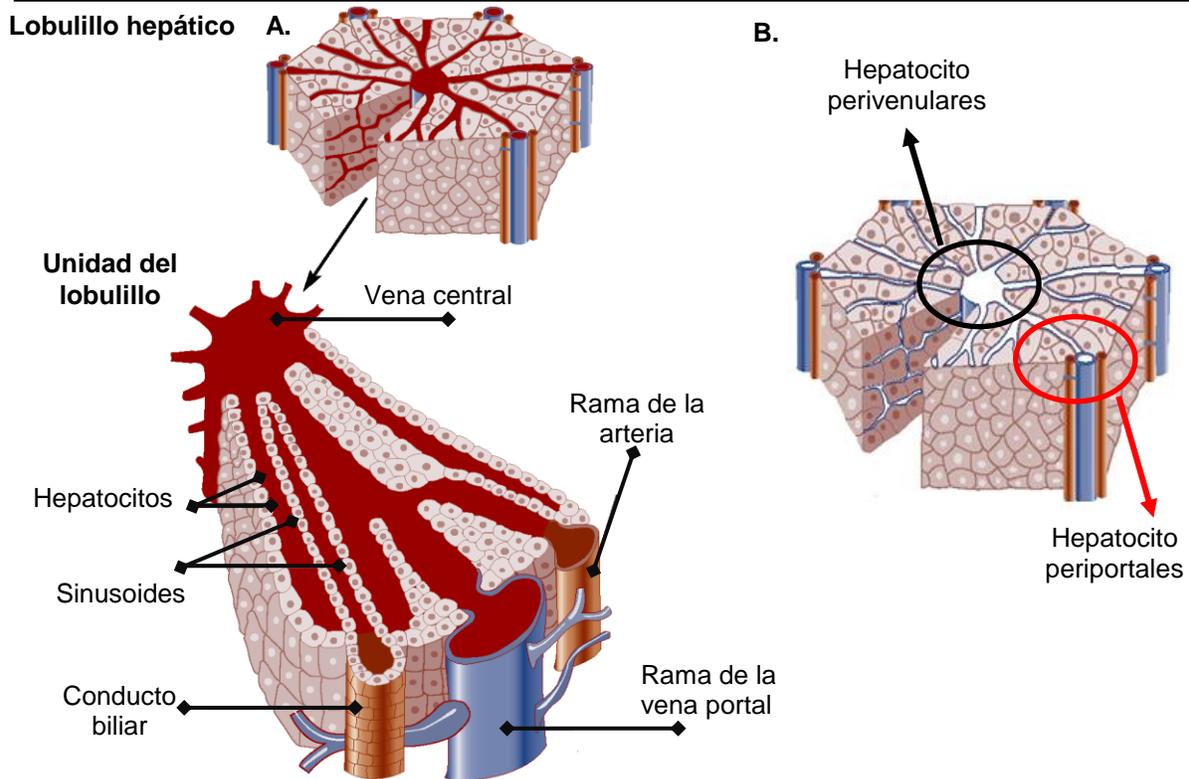


Figura 1-A. Representación de la arquitectura de los lobulillos del hígado. La sangre entra en los lobulillos a través de ramas de la vena porta y de la arteria hepática, después atraviesa los pequeños canales sinusoidales que se alinean con las células hepáticas, para entonces salir del lobulillo a través de la vena central. **B. Representación de los hepatocitos cercanos a la vena porta y vena central.**

Adaptado de: Cunningham y Van Honr, 2003

2.1.2 Células hepáticas y sus funciones

El hígado cuenta con diversas poblaciones celulares organizadas estratégicamente para cumplir con diferentes funciones. Los hepatocitos representan la mayor parte del tejido hepático y son fundamentales para desempeñar las funciones metabólicas, su actividad primordial es mantener el balance de la energía y del nitrógeno, al realizar la captación o la liberación de la glucosa y los aminoácidos. Éstos se encargan del metabolismo de los hidratos de carbono, aminoácidos, ácidos grasos y colesterol, se ocupan de la síntesis de albúmina y urea, así como de la formación de bilirrubina conjugada.^{3,8}

Los hepatocitos que se encuentran más cercanos a las ramas de la vena porta (periportales) tienen grandes mitocondrias y actividades oxidativas altas, desempeñan un papel predominante en la gluconeogénesis, beta-oxidación de los ácidos grasos, síntesis de colesterol, en el ciclo de la urea y la secreción de ácidos biliares. En cambio, los hepatocitos próximos a la vena central (perivenulares) del lobulillo están implicados en la glucólisis, la lipogénesis, la eliminación del amonio por medio de la glutamina sintetasa, y la detoxificación o transformación de fármacos (Figura 1-B).³

Además de las funciones metabólicas, los hepatocitos participan en la síntesis de la mayoría de los factores de coagulación (II, VII, IX y X), producen, colinesterasa plasmática, inhibidores de proteasas (antitrombina III, alfa-1-antitripsina y alfa-2-antiplasmina), proteínas de transporte como la transferrina, haptoglobina y ceruloplasmina, así como la proteína C reactiva y proteínas de fase aguda como el fibrinógeno.³

Las células sinusoidales realizan importantes funciones en el hígado. Se pueden encontrar cuatro tipos de células sinusoidales: endoteliales, estelares, de Kupffer y células “naturalmente asesinas”. Las más numerosas son las células endoteliales, las cuales se encargan de transportar sustancias entre el sinusoides y el espacio de Disse, participan en la fibrinólisis, la regulación de la presión sanguínea sinusoidal y el metabolismo de los lípidos.⁴

Las células estelares actúan en la producción y el mantenimiento de la matriz extracelular, el control del flujo sanguíneo sinusoidal, el depósito de retinoides y la regeneración del hígado secundaria a la necrosis; se localizan en el espacio de Disse. Las células de Kupffer (macrófagos) se encuentran en la luz del sinusoides, realizan las funciones de fagocitosis, de pinocitosis y la producción de proteasas y citocinas. Por último, las células “naturalmente asesinas” o linfocitos NK se sitúan sobre el endotelio; son un mecanismo de defensa contra las infecciones virales y las células metastásicas (Figura 2-A.)^{3,4,8}

2.2 Daño hepático

El hígado es un órgano vulnerable a una amplia variedad de agresiones tóxicas, biológicas y neoplásicas, que declinan su integridad una vez que se acentúan provocando un daño; el cual se divide en agudo o crónico, basado en su duración o persistencia. El daño hepático agudo es de pronta resolución cuando se elimina el agente nocivo, llevando a la restitución de la arquitectura y función normal del hígado; sin embargo, la permanencia del daño hepático agudo conduce a un estadio crónico y en su progresión al desarrollo de cirrosis y cáncer.⁹

En el daño hepático crónico los agentes agresores que actúan en forma persistente sobrepasan la capacidad de defensa y reparación del hígado, por lo cual se produce una respuesta caracterizada por regeneración celular desordenada, necrosis, apoptosis, producción de inflamación y fibrosis, condicionando a una paulatina disminución de la masa hepatocelular y a una progresiva distorsión anatómica y funcional.¹⁰

2.2.1 Fibrosis hepática

La fibrosis es una característica del daño progresivo del hígado, en el que se involucran múltiples eventos celulares y moleculares, como una respuesta de cicatrización a diversos estímulos crónicos.^{6,11} El evento celular clave en la fibrosis es la activación de las células estelares, en donde pierden el ácido retinoico, se vuelven altamente proliferativas y producen una excesiva cantidad de proteínas de la matriz extracelular de tipo fibrilar, principalmente colágeno tipo I y III. Esto provoca cambios morfológicos importantes sobre el parénquima hepático, afectando así las funciones del hígado (Figura 2-B).^{6,12,13}

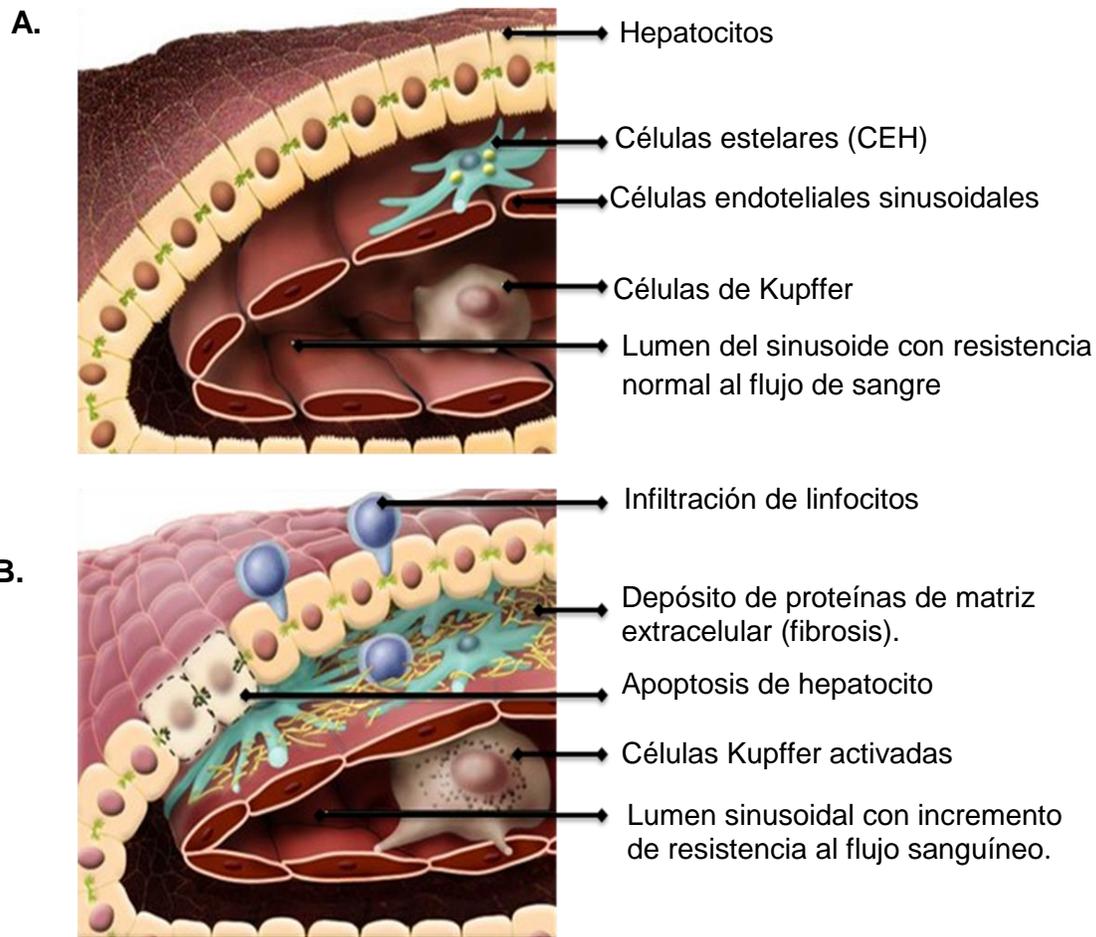


Figura 2. Eventos celulares durante el desarrollo de la fibrosis. **A.** Arquitectura hepática en condiciones normales, **B.** Durante el daño hepático crónico los linfocitos inflamatorios infiltran el parénquima hepático y algunos hepatocitos experimentan la pérdida de microvellosidades o apoptosis; la activación de las células estelares (CEH) lleva a la acumulación de la matriz extracelular, las células endoteliales sinusoidales pierden sus huecos, y la contracción tónica de las CEH causa un aumento de la resistencia al flujo sanguíneo dentro del sinusoides. También ocurre la activación de la célula de Kupffer (macrófago) que a su vez acompaña la lesión del hígado y contribuye a la activación parácrina de las CEH.

Adaptado de: Bataller y Brenner, 2005

Una vez que se acentúan estos eventos moleculares sobre un largo tiempo, la fibrosis pasa de una condición aguda a un proceso crónico como lo es la cirrosis.⁶

2.2.2 Cirrosis hepática

La cirrosis hepática es el estadio final de un gran número de padecimientos hepáticos inflamatorios crónicos. Se caracteriza por la alteración de la arquitectura hepática, presencia de fibrosis y nódulos de regeneración.¹²

La prevalencia y causas de la cirrosis hepática varían dependiendo del lugar donde se analicen.¹² En México es la sexta causa de mortalidad general y la tercera en hombres de 15 a 64 años de edad. Este padecimiento es una de las 10 principales causas de hospitalización en las instituciones de salud, a nivel global la infección crónica por Virus de Hepatitis B (VHB), Virus de Hepatitis C (VHC) y el abuso del alcohol, son las principales causas de cirrosis. Según datos reportados por la Organización Mundial de la Salud, cerca de 350 millones de personas tienen infección crónica por VHB y 170 millones se encuentran infectadas por el VHC.^{12,13}

En México, de acuerdo con información publicada en el 2009, el abuso del alcohol ocupa el primer lugar como causa de la cirrosis con un 39.9 % de los casos reportados, seguido de la infección crónica por el virus de hepatitis C con un 36.6% y en tercer lugar la cirrosis criptogénica con el 10.4%.^{14,15}

Las causas de cirrosis menos frecuentes son las alteraciones metabólicas: hemocromatosis, enfermedad de Wilson, glucogénesis, galactosemia; así como enfermedades biliares, obstrucción venosa, exposición a tóxicos y derivaciones intestinales.^{14,15}

Independientemente de las causas que originan esta enfermedad, clínicamente puede clasificarse en fase compensada o asintomática y fase descompensada. Se denomina descompensada cuando se desarrollan complicaciones mayores: ictericia, hemorragia visceral, ascitis y encefalopatía hepática, implicando un mal pronóstico.^{14,16}

El método predominante para valorar el pronóstico del paciente cirrótico es la clasificación de Child-Pugh que se expone en la Tabla 1.¹⁶

Tabla 1: Clasificación clínica de CHILD-PUGH

Parámetro	Rango	Puntos
1. Encefalopatía	No Grados I y II Grados III y IV	1 2 3
2. Ascitis	No Ligera Masiva	1 2 3
3. Bilirrubina (mg/dL)	Menor de 2 Entre 2-3 Mayor de 3	1 2 3
4. Albúmina (g/dL)	Mayor de 3.5 Entre 2.8-3.5 Menor de 2.8	1 2 3
5. Tasa de protrombina	Mayor de 50% Entre 30-50% Menor de 30%	1 2 3
	GRADO A GRADO B GRADO C	Entre 5-6 puntos. Entre 7-9 puntos. Entre 10-15 puntos.

Fuente: Bajaj J.S., 2010

Las complicaciones de la cirrosis se producen de la distorsión estructural del hígado, que a su vez tienen dos importantes efectos: perturbaciones de la función hepatocelular y la hipertensión portal. Ambas son iniciadoras de diferentes trastornos que afectan al metabolismo de los hidratos de carbono, los lípidos y la síntesis proteica, también son responsables de trastornos hidroelectrolíticos, vitamínicos, defectos hormonales, traslocación bacteriana, aumento de las

citoquinas proinflamatorias y de deficiente eliminación de compuestos de degradación.¹⁶

2.2.2.1 La encefalopatía hepática en la cirrosis

La encefalopatía hepática (EH), que está incluida dentro de la clasificación de Child Pugh, es una complicación mayor de la cirrosis. La encefalopatía hepática es un complejo síndrome con manifestaciones neuropsiquiátricas, neuromusculares y de conducta, que afecta hasta a un 80 % de los pacientes con cirrosis. La presencia de dicha complicación tiene un efecto detrimental sobre la calidad de vida total y cuando es clínicamente evidente es una indicación para el trasplante de hígado en estos pacientes.^{14,16}

En la patogenia de la EH, el amonio es considerado el metabolito tóxico más importante. Los niveles de amonio en la sangre mayores a 100 μM provocan a nivel cerebral, edema y cambios morfológicos y fisiológicos en las células que conforman la glía, específicamente en los astrocitos, desencadenando así alteraciones en la neurotransmisión y en las redes cerebrales, que secundariamente afectan a las actividades psicomotoras, intelectuales, cognitivas, emocionales/afectivas, de comportamiento y motoras finas del paciente cirrótico.¹⁷

Las características clínicas de la EH incluyen un amplio rango de síntomas neuropsiquiátricos que van desde signos leves de alteración de la función cerebral hasta el coma profundo. Ninguno de estos síntomas es específico para la encefalopatía y la presencia simultánea tanto de estos síntomas como de la enfermedad hepática crónica, no es suficiente para hacer el diagnóstico de EH. Por ello, se debe hacer una cuidadosa evaluación neurológica y de la función motora para excluir otras enfermedades, teniendo en cuenta los cambios sutiles de la vida diaria, alteración del ritmo del sueño, deterioro del estado de conciencia y de la función cognitiva.^{16,17}

En el examen de la función motora se puede encontrar aumento del tono muscular, reducción de la velocidad de los movimientos, ataxia, deterioro postural o reflejos posturales, la presencia de movimientos anormales tales como el temblor y particularmente la asterixis.^{16,17}

El sistema de graduación clínica más utilizado para la EH es el de West Haven, el cual clasifica cuatro grados de esta patología y se basa en cambios del estado de conciencia, la función intelectual y comportamiento.¹⁶

Tabla 2. Clasificación de las alteraciones de la EH de acuerdo al criterio West Haven.

Grado 1	<ul style="list-style-type: none"> ▪ No estar alerta ▪ Euforia o ansiedad ▪ Un período de atención corto ▪ Dificultad para ejecutar sumas aritméticas
Grado 2	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Letargo o apatía ▪ Un poco de desorientación sobre el tiempo y el lugar ▪ Cambios sutiles de personalidad ▪ Comportamiento inapropiado ▪ Dificultad para ejecutar restas aritméticas
Grado 3	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Somnolencia o semiestupor, pero respuesta a estímulos verbales ▪ Confusión ▪ Desorientación muy marcada
Grado 4	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Coma (sin respuesta a estímulos verbales o nocivos)

Fuente: Bajaj J.S., 2010

2.3 Prescripción dietética en pacientes con daño hepático crónico y encefalopatía hepática.

La mayor parte de los adultos con cirrosis compensada toleran adecuadamente una alimentación oral sin restricciones. La estimación de las necesidades mediante la clásica ecuación de Harris Benedict, la cual mide el gasto energético diario según el sexo, el peso corporal y la altura, no es adecuada para más del 50% de los pacientes con cirrosis. Por lo que el uso de fórmulas de cálculo rápido, permite la óptima administración de energía (Tabla 3).¹⁸

Tabla 3. Recomendaciones nutricionales en la cirrosis hepática

	<i>Cirrosis hepática compensada</i>	<i>Cirrosis hepática descompensada</i>
Aporte calórico	25 a 35 Kcal/kg/día	35-40 kcal/kg/día
Macronutrientes	Hidratos de carbono 55-60 % Proteínas 20 a 30 % (1-1.5g/kg/día) Lípidos 10 a 20 %	Hidrato de carbono 50-60 % Proteínas 25-30 % (1.2 – 1.5 g/kg/día) Lípidos 25-35%
Otras recomendaciones	<ul style="list-style-type: none"> ● Evitar restricciones alimentarias innecesarias. ● Hacer entre 4 y 6 comidas al día, incluyendo una antes de dormir rica en hidratos de carbono. ● Suplementar vitaminas (A, D, E y K), zinc, selenio y calcio si es necesario. ● Aportar alimentos adecuados para favorecer la masticación y deglución. ● Prohibición del alcohol. 	<ul style="list-style-type: none"> ● 5-6 comidas al día evitando periodos prolongados de ayuno. ● Restricción de líquidos solo en caso de hiponatremia. ● Restricción de sodio si hay ascitis o edema. ● Fibra 30 g al día. ● Suplementación con aminoácidos de cadena ramificada (ACR). ● Zinc: suplementar como sulfato de zinc 220 mg/día.

Fuente: Jurado-García, J. 2012 y Cortés-García 2013

En cambio, el tratamiento de la encefalopatía hepática se ha dirigido a la eliminación de los factores precipitantes (infección, hemorragia gastrointestinal, deshidratación, alteraciones electrolíticas, sedantes o estreñimiento severo), así como reducir la producción y la absorción de toxinas en el intestino, a través de la modificación en la ingesta de fuentes nitrogenadas o de la alteración de la flora intestinal.¹⁸

El amonio es un producto normal del catabolismo proteico, razón por la cual, la disminución de la ingesta de proteínas fue hace tiempo la piedra angular del tratamiento dietético de la encefalopatía hepática tanto aguda como crónica.¹⁸ No obstante, recientes estudios, tanto controlados como no controlados, han demostrado que la restricción proteica suele ser innecesaria en la encefalopatía hepática aguda, y en un estado avanzado (EH crónica) el aporte de proteínas no debe ser menor de 1.0 g/kg de peso al día; la prescripción dietética se describe en la tabla 4.^{18,19}

Tabla 4. Recomendaciones nutricionales para la encefalopatía hepática

<ul style="list-style-type: none"> • Se recomienda un aporte calórico de 30-35 kcal/kg/día.
<ul style="list-style-type: none"> • Macronutrientes <ul style="list-style-type: none"> - Hidratos de carbono 50-60%. - Proteínas 20-30% (1-1.5 g/kg/día). - Lípidos 10-20%.
<ul style="list-style-type: none"> • Hacer 5-6 tiempos de alimentación al día incluyendo una antes de dormir.
<ul style="list-style-type: none"> • Sustitución de proteínas de origen animal, específicamente la carne, por las proteínas de los lácteos (leche y queso), de los vegetales y del huevo, ya que son mejor toleradas debido a la calidad del contenido aminoacídico (mayor contenido de aminoácidos ramificados y cantidades menores de metionina y otros aminoácidos aromáticos).
<ul style="list-style-type: none"> • La suplementación con ACR (valina, leucina e isoleucina) puede ayudar a pacientes con intolerancia al consumo de proteínas, evitando la degradación de las proteínas endógenas, lo cual representa una herramienta válida en el tratamiento de aquellos casos en una fase avanzada de la enfermedad.

<ul style="list-style-type: none"> • La restricción de sodio (< 2 g/día) dependerá de la etiología y de la presencia de complicaciones.
<ul style="list-style-type: none"> • Suplementar vitaminas (A, D, C, E, K y complejo B), zinc y calcio si es necesario.
<ul style="list-style-type: none"> • La ingesta de probióticos ayuda a impedir la adherencia de patógenos al epitelio y la mucosa, y estimulan a la IgA secretora permitiendo restaurar o mantener a la flora intestinal.
<ul style="list-style-type: none"> • La nutrición enteral puede indicarse en pacientes con EH y malnutrición, que no sean capaces de mantener una adecuada ingesta oral.

Fuente: Bajaj, J. S. 2010; Jurado-García, J. 2012 y Cortés-García 2013.

Los cambios en el pH y en la población de bacterias de la flora intestinal, favorecen el tratamiento de la encefalopatía hepática. Los disacáridos lactulosa y lactilol al no ser absorbibles en el intestino delgado pasan al ciego y al colon derecho, donde son metabolizados, induciendo una disminución del pH intraluminal y a su vez, beneficiando el crecimiento de la flora fermentativa; asimismo, inhiben las bacterias productoras de la ureasa, estimulan la incorporación del amonio a las proteínas bacterianas reduciendo así la cantidad disponible para su absorción, aceleran el tránsito intestinal y aumentan la excreción de nitrógeno.^{18,19}

Los antibióticos no absorbibles como la Neomicina y Rifaximin actúan directamente sobre las bacterias involucradas en la amoniogénesis colónica, a pesar de esto, hoy en día han sido cuestionados por su potencial toxicidad y la generación de organismos multiresistentes.¹⁹ Aun cuando en algunos cuantos protocolos clínicos de alta calidad se ha demostrado que la Rifaximina y los disacáridos reducen significativamente varios signos y síntomas de la EH, estas medicamentos comúnmente causan diversos efectos adversos tales como dolor de cabeza, constipación, diarrea, flatulencia, vómito, anorexia, dolor abdominal y reacciones de la piel como urticaria. Otras estrategias dirigidas para reducir la toxicidad del amonio son el uso de agentes farmacológicos como L-ornitina L-

aspartato (LOLA) y L-ornitina fenilacetato (LOPA), además del trasplante de hígado.¹⁹

2.4 Intervención del músculo en la eliminación del amonio durante la cirrosis (Teoría del tráfico inter-órgano del amonio)

De manera habitual, el amonio producido en el intestino alcanza el hígado por vía portal y es destoxificado mediante el ciclo de la urea, cuyas enzimas se sitúan en los hepatocitos periportales. Es la vía más eficaz ya que retira un alto porcentaje del amonio portal y no consume energía. El amonio que no es procesado en los hepatocitos periportales es metabolizado hacia la síntesis de glutamina mediante la actividad de la enzima glutamina sintetasa (GS), localizada en los hepatocitos perivenulares.²⁰

Sin embargo, en el hígado cirrótico ocurre un descenso de hasta un 80% en la ureogénesis y una disminución en la expresión de la GS que es paralela a la disfunción hepática. Esto, aunado a un aumento en la producción intestinal y renal del amonio y la presencia de comunicaciones porto-sistémicas que irrigan la sangre directamente del intestino a la circulación sistémica sin pasar por la filtración en el hígado, suelen provocar hiperamonemia.^{20,21}

Durante la cirrosis, se ha propuesto que el músculo esquelético se convierte en el tejido fundamental para la remoción del amonio de la circulación (Figura 3). En observaciones realizadas en ratas, se ha distinguido la captación de este metabolito por el músculo esquelético para sintetizar glutamina por la actividad de la glutamina sintetasa, sin una liberación posterior del aminoácido, de tal forma que el músculo extrae la mayor parte del amonio arterial permaneciendo en el tejido como reserva de amonio no tóxico.^{20,21}

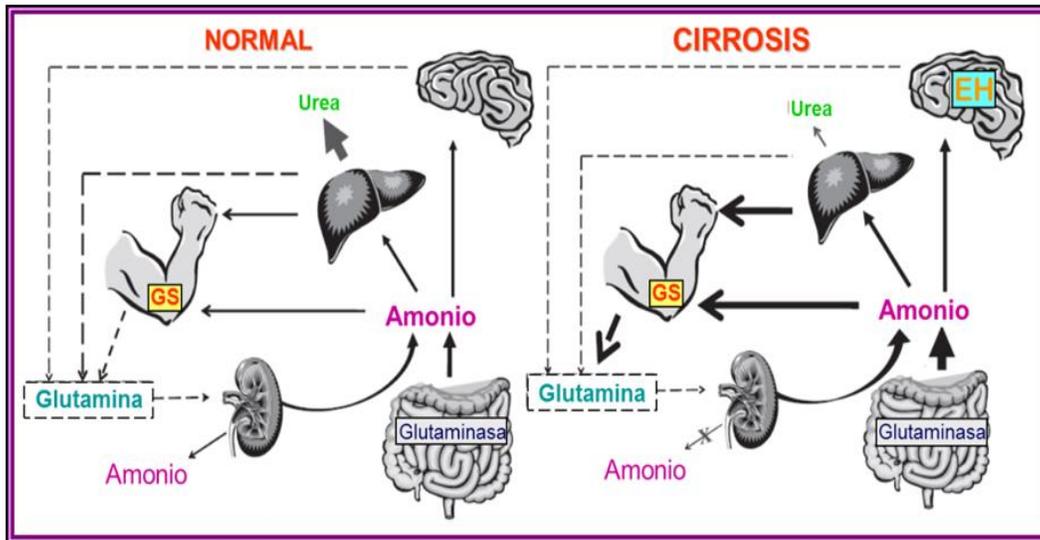


Figura 3. Tráfico inter-órgano del amonio. El amonio producido en el intestino llega al hígado y es metabolizado en urea, adicionalmente se produce glutamina por acción de la glutamina sintetasa, al igual que en el músculo. En el riñón las enzimas glutaminasa y glutamina sintetasa participan en la producción y remoción del amonio, respectivamente. En la cirrosis, el músculo produce glutamina en exceso para remover el amonio de la circulación.

Fuente: Adeva, M.M. et al. 2012

La relevancia de la participación del músculo en la remoción de amonio se demostró en un estudio elaborado por el grupo de Lamers (2010). En este trabajo se crearon ratones knock-out para eliminar la expresión de la glutamina sintetasa (GS) exclusivamente de músculo esquelético, a fin de evaluar directamente la intervención de la enzima en dicho tejido sobre la producción de glutamina y la detoxificación del amonio. Los ratones deficientes de GS demostraron que la producción de esta enzima por el músculo esquelético es primordial, al encontrar que estos animales knock-out no eran capaces de incrementar los niveles de glutamina que sí se observaba en los ratones silvestres (± 4 veces) bajo condiciones de ayuno por 20 horas; a su vez, en los ratones knock-out la producción de amonio se cuantificó ± 5 veces por encima que en los ratones normales.

Otro resultado importante surgió al inyectar a los ratones sin la GS muscular y los controles con dosis crecientes de amoníaco, revelando que el músculo normal puede remover $\pm 2.5 \mu\text{mol amonio/g}\cdot\text{h}$ (Figura 4) de forma dependiente de GS, lo que realza la participación del tejido muscular en la destoxificación del amonio.

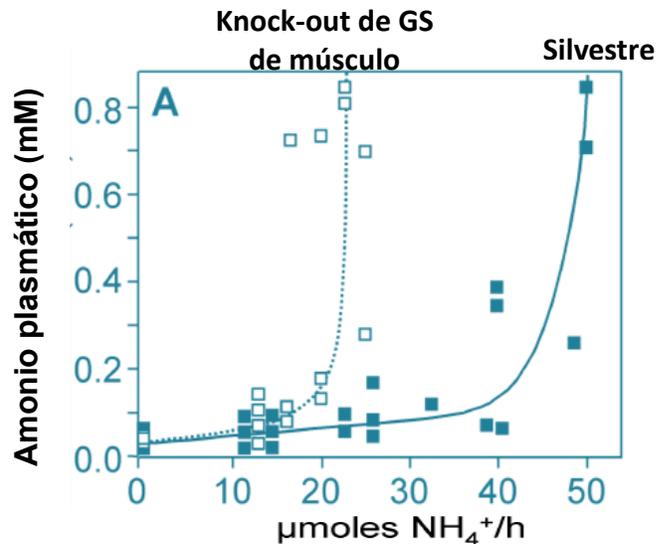


Figura 4. Concentración de amonio plasmático en ratones Knock-out de GS vs silvestre. Se muestra la concentración de amonio en plasma de ratones a los que se les administro una infusión bicarbonato de amonio (NH_4HCO_3) a dosis crecientes. Ratones silvestres (Símbolos cerrados) y Knock-out /GS (Símbolos abiertos).

Fuente: Lamers, W. et al. 2010

2.4.1 La glutamina sintetasa en la remoción de amonio

La glutamina sintetasa o GS (Figura 5) es una enzima citosólica, su expresión es variable en muchos tejidos siendo abundante en músculo esquelético, hígado, riñón y cerebro.²² La GS juega un papel muy relevante en la remoción del amonio (destoxificación); esta enzima de 44 KDa (en mamíferos) utiliza al ATP para catalizar la unión del amonio y del glutamato, con lo cual se sintetizan glutamina y agua.²³ La glutamina es un aminoácido que actúa como

portador no tóxico del nitrógeno, el cual sirve como combustible obligatorio para las células intestinales y la rápida división del sistema inmune.²³

La concentración celular de la glutamina sintetasa se correlaciona con la cantidad de glutamina intracelular, variando de 10 a 100 veces; los valores de la enzima son más altos en las células que remueven el glutamato y el ion amonio, como los astrocitos y hepatocitos perivenulares, que en las células encargadas de producir glutamina (miocitos y adipocitos).^{24,25}

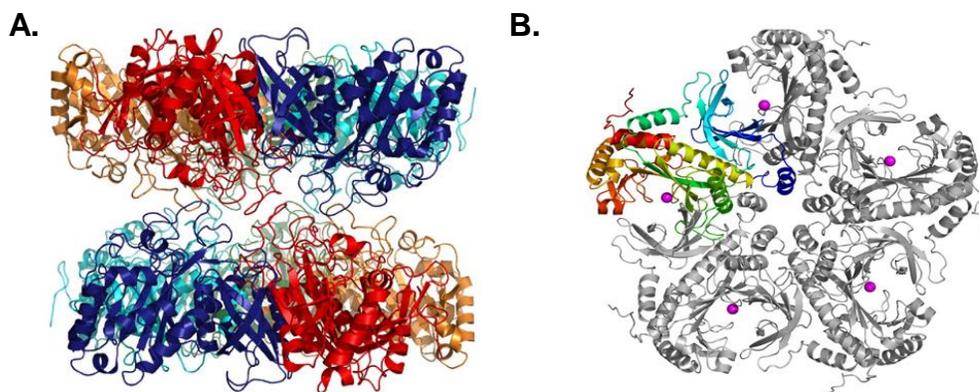


Figura 5. Estructura cristalina de la glutamina sintetasa de mamíferos. A. La glutamina sintetasa (GS; EC 6.3.1.2) es una enzima formada por 10 subunidades idénticas, organizadas en dos anillos pentaméricos que están uno encima del otro, unidos por enlaces de hidrógeno. Cada subunidad (coloreada de azul y rojo) contiene un sitio activo de unión al glutamato, amonio y ATP, como lo muestra la figura B. Las esferas en magenta representan iones de manganeso, que actúan como cofactores.

Fuente: Häberle, J., et al. 2005; Krajewski, W.W., 2008

2.5 El músculo esquelético

El músculo esquelético es un tipo de músculo estriado unido al esqueleto, representa alrededor del 40-50% del peso corporal. Está formado por fibras musculares polinucleadas, largas y cilíndricas. Las fibras musculares miden de 10 a 90 mm de diámetro y varios cm de largo.²⁷

Los elementos estructurales fundamentales de las fibras musculares son:

- Sarcolema: membrana de la célula muscular.
- Sarcoplasma: protoplasma especializado de la fibra muscular. Contiene túbulos transversales (túbulos T), a través de estos se transmiten los impulsos nerviosos a la miofibrilla, así como el transporte de glucosa, oxígeno e iones. También contiene una red de túbulos longitudinales, llamado retículo sarcoplasmático que envuelve las miofibrillas y sirve como depósito de calcio.
- Componentes subcelulares: lípidos, glucógeno, mioglobina, fosfocreatina, adenosintrifosfato (ATP), minerales, núcleo, mitocondrias, miofibrillas, sistema de túbulos.
- Sarcómero: la unidad funcional de la miofibrilla, en el que se pueden diferenciar dos filamentos de proteínas. Las áreas claras y oscuras que dan aspecto estriado al músculo corresponden a bandas formadas por diferentes filamentos proteicos. Los filamentos delgados están compuestos por actina, tropomiosina y troponina (I, T y C). los filamentos gruesos están compuestos por miosina II.²⁸

Las fibras musculares están rodeadas por tejido conectivo denominado endomisio. El conjunto de fibras musculares forma un fascículo, envuelto por una membrana llamada perimisio. Un conjunto de fascículos forman el músculo que está cubierto por el epimisio. Ver la figura 6.^{27,28}

La clasificación de las fibras musculares es la siguiente:

- Tipo I (ST): rojas de contracción lenta.
- Tipo II (FT): contracción rápida.
 - IIa: rápidas puras (blancas).
 - IIb: intermedias (rojiza).²⁸

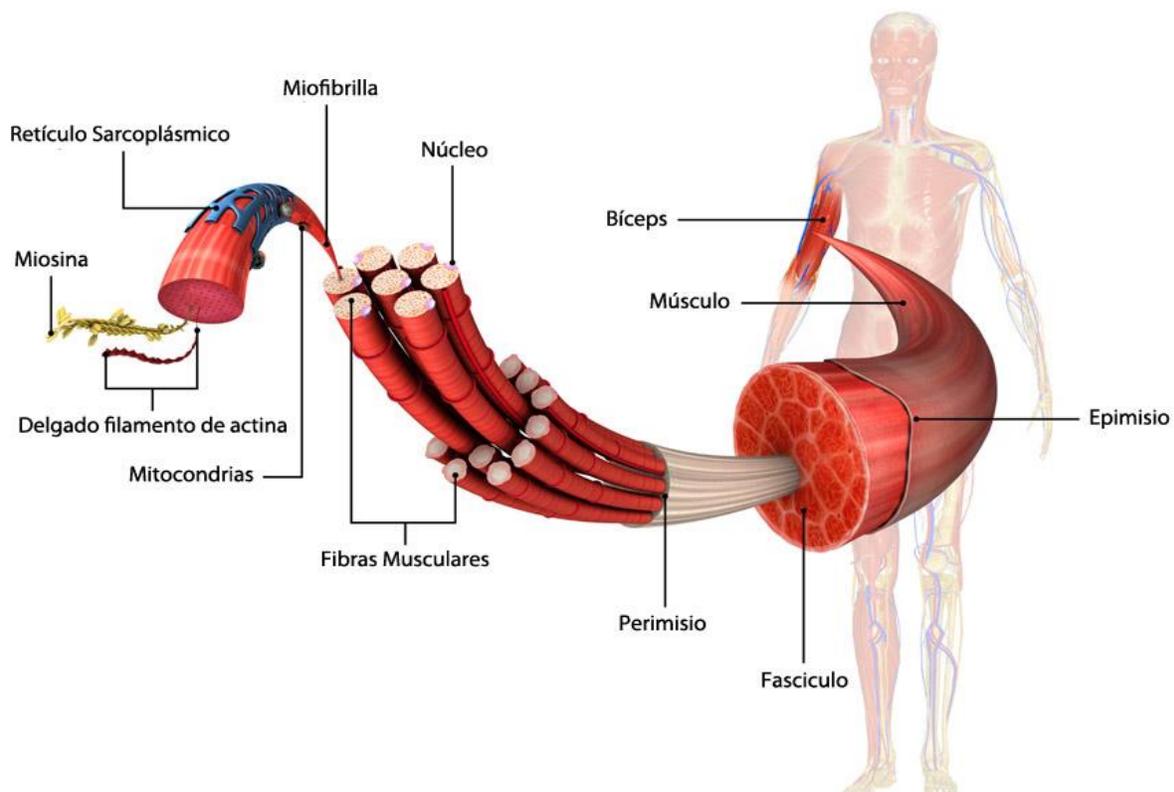


Figura 6. Elementos estructurales de las fibras musculares.

Fuente: Adaptado de Genetics Home Reference, (2018).

El músculo esquelético en condiciones de actividad física intensa sufre, en las diversas estructuras que lo conforman, variaciones morfológicas que le permiten adaptarse a la nueva situación fisiológica para conseguir mejor respuesta; ésta depende y es directamente proporcional, del número de fibras constituyentes y del área de su sección transversal. El ejercicio físico puede modificar las dimensiones del músculo hacia un aumento de volumen. Este aumento es consecuencia de la hipertrofia muscular e incluso, según algunos autores, de la hiperplasia de las fibras musculares. Pero no sólo las fibras musculares sufren cambios, sino que, estructuras ajenas a la propia célula muscular, pueden verse afectadas en esta adaptación. Es el caso del tejido

conectivo y el sistema vascular del músculo. Todo ello compone la adaptación del músculo esquelético al ejercicio.^{27,30}

2.6 El ejercicio físico en la prevención de la encefalopatía hepática

La eliminación del amonio por la acción de la glutamina sintetasa del músculo esquelético, durante la cirrosis ha sido objeto de estudio desde hace varios años atrás. El músculo esquelético es capaz de producir ~70% de la glutamina endógena en el hombre, del cual el 15% surge de la proteólisis y el resto de la síntesis de *novo*. En condiciones catabólicas como en la enfermedad crónica y aguda del hígado la síntesis de glutamina puede llegar a ser crucial cuando sus niveles son bajos en la circulación.^{31,32}

Existe diferente información donde se demuestra que los pacientes cirróticos con masa muscular esquelética disminuida son más propensos a desarrollar encefalopatía hepática.³³ En este sentido, la búsqueda de nuevas terapias menos costosas y/o complementarias a la prescripción dietética que logren preservar la integridad muscular y puedan inducir la expresión y/o la actividad de la enzima sintetizadora de glutamina (GS) resultarán de gran relevancia en la prevención o tratamiento de la enfermedad.

Una propuesta sin explorarse a fondo es la aplicación de un programa de ejercicio físico en pacientes cirróticos, que incluya una recomendación estandarizada en cuanto al tipo, intensidad y duración del ejercicio. El ejercicio físico es un tipo de actividad física planificada, estructurada y repetitiva que tiene como finalidad el mantenimiento o la mejoría de uno o más componentes de la forma física, considerando una intensidad ligera-moderada sin fatiga excesiva. La práctica regular de ejercicio físico trae beneficios para la salud, incluyendo incremento en la densidad ósea, sensibilidad a la insulina, mejor calidad de vida; y disminuir el riesgo de cáncer y enfermedades cardiovasculares y metabólicas

como la diabetes mellitus tipo 2 y dislipidemias, así mismo ayuda a reducir los síntomas de muchos desordenes clínicos.^{33,34}

El ejercicio físico estimula de forma importante la regulación no solo de múltiples procesos metabólicos sino también transcripcionales en el músculo esquelético al incrementar la captación de glucosa, perfusión capilar, velocidad de síntesis de glucógeno, sensibilidad a la insulina; también lleva a una remodelación estructural de las células y a una hipertrofia compensatoria en ejercicios de los efectos de la actividad física en el músculo esquelético son mediados por la activación de la cascada de señalización específica del músculo que incrementa la masa muscular, las proteínas citoesqueléticas y la fuerza de contracción sin incrementar el número de miofibrillas, lo que podría aumentar el aclaramiento muscular de amonio, así como la reducción a la predisposición a desarrollar encefalopatía^{34,35,36}

Hasta el momento no se conoce una terapia establecida de ejercicio controlado en pacientes con daño hepático crónico. En varios modelos de insuficiencia hepática se ha determinado un aumento en la cantidad de la proteína y la actividad de la GS en el músculo esquelético, lo que podría compensar la baja expresión de la GS en el hígado.^{36,37}

Una intervención promisoriosa ha sido sugerida por algunos modelos experimentales de ejercicio: Santos et al. (2007), mostró una disminución en los niveles de glutamato y amonio en el plasma de ratas con ejercicio moderado, mientras que Miyazaki et al. (2003), encontró niveles de glutamato reducidos, asociados con un incremento de glutamina en el plasma y en el músculo, tanto en ratas sanas como cirróticas sometidas a ejercicio.³⁹

Estas publicaciones sugieren que, durante el ejercicio o el recobro de éste, el amonio puede ser metabolizado dentro del músculo esquelético para producir glutamina, probablemente a través de la acción de la GS. Sin embargo, ninguno

de los estudios mencionados ha cuantificado directamente el nivel de expresión del gen de GS en un modelo clínicamente relevante de daño hepático, ni determinado el efecto del ejercicio sobre este patrón de transcripción enzimático.

2.7 Modelos animales de daño hepático

Los modelos animales tienen un papel fundamental en los estudios de enfermedades crónicas del hígado, dadas las dificultades que supone la investigación en pacientes. Los modelos animales de daño hepático también se han utilizado debido a su conveniente estructura de tiempo. Las características del proceso fibrogénico dependen de la naturaleza del daño. Agentes nocivos como tetracloruro de carbono (CCl₄), dietilnitrosamina (DEN) o galactosamina generan una significativa necrosis de hepatocitos asociada con una marcada inflamación y fibrosis.⁴⁰

En especial la dietilnitrosamina es un derivado de las nitrosaminas con propiedades alquilantes, mutagénicas y cancerígenas. Los compuestos N-nitroso (nitrosaminas) muestran una actividad biológica similar en los tejidos animales y humanos, sugiriendo que las observaciones en el modelo experimental podrían extrapolarse al hombre.^{41,42} Este agente hepatocarcinogénico puede inducir daño en muchas enzimas involucradas en la reparación del ADN.

La dietilnitrosamina es convertida por las enzimas hepáticas a una forma electrofílica, dañando el ADN y, por consiguiente, causando la muerte de las células y la regeneración descontrolada del tejido hepático, que posteriormente conduce a la formación del carcinoma hepatocelular.^{41,42}

La elección de este carcinogénico en pruebas experimentales animales se basa en la capacidad de producir daño hepático progresivamente pasando de fibrosis a cirrosis y hepatocarcinoma, como suele ocurrir en la enfermedad humana.^{41,42}

2.8 Marcadores moleculares de daño hepático, HNF4-, PC4 y GP46

El Factor Nuclear de los Hepatocitos 4- α (HNF4- α) es una proteína compuesta de distintos dominios funcionales, requeridos para iniciar o regular la transcripción de la mayoría de los genes en las células hepáticas, interviniendo en la diferenciación o maduración morfológica y funcional de estas células, a la acumulación de glucógeno y la generación del epitelio sinusoidal. Este factor modifica la expresión de un gran número de genes (más de 55) implicados en las diferentes vías metabólicas como hidratos de carbono, lípidos, esteroides, xenobióticos, y el metabolismo de los aminoácidos.⁴³

La pérdida de la actividad de HNF4- α conduce a la expresión alterada de los genes involucrados en el transporte de la glucosa y la glucólisis, y de los genes pericentrales y periportales incluyendo a la glutamina sintetasa, (GS) que está encargada de la detoxificación del amonio.⁴⁴ En un estudio realizado con ratones a los que se les suprimió la expresión de HNF4- α , se determinó una desorganización en la arquitectura del parénquima hepático al realizar pruebas de histología.⁴³

En recientes investigaciones se ha identificado la interacción de HNF4- α con el Cofactor transcripcional positivo 4 (PC4), que incide en la regulación de la transcripción. PC4 también está implicado en la replicación y la reparación del ADN, y puede prevenir la mutagénesis que surge de la oxidación del ADN por la interacción con las especies reactivas de oxígeno.^{44,45} La carencia de HNF4- α , PC4 y GS se traduce en alteraciones metabólicas, estructurales y de procesos mutagénicos en el hígado que llevan a la disfunción del órgano.^{44,45,46}

La proteína de choque térmico 47 (HSP47) es una chaperona molecular específica de colágeno requerida para la síntesis y maduración de varios tipos fibrilares de esta proteína. Se ha demostrado una cercana asociación entre el aumento en la expresión de HSP47 y una excesiva acumulación de colágenos en

tejidos cicatrizales de humanos y en enfermedades fibróticas experimentales. Los niveles aumentados de HSP47 promueven un excesivo ensamblaje y procesamiento intracelular de moléculas de procolágena y así contribuyen a la formación de lesiones fibróticas.⁴⁷

La activación génica de las proteínas de choque térmico (HSP) ocurre como una consecuencia de diferentes factores, que pueden actuar de forma aislada o simultánea. La depleción de energía, situaciones de hipoxia, acidosis o isquemia y las especies reactivas del oxígeno, pueden provocar una clara liberación de HSP por lo menos a nivel muscular tras diferentes tipos de esfuerzos. Factores como la edad, el género, el nivel de entrenamiento y la intensidad del ejercicio realizado o el tipo de fibra muscular, parecen tener una relación directa con las adaptaciones biológicas relacionadas con las HSP durante el ejercicio.^{47,48}

La chaperona específica de colágeno GP46 es un homólogo en rata de la proteína de choque térmico 47 (Heat Shock Protein 47, o Hsp47) de humano.⁴⁸ La GP46 facilita la secreción de colágena y también se ha implicado en la síntesis de procolágena, la cual se ha demostrado que se acumula como colágena insoluble causando la fibrosis.^{48,49}

En un estudio realizado por el equipo de Niitsu et al. (2008), se demostró que un ARN interferente pequeño (ARNip) encapsulado en liposomas de vitamina A, diseñado para bloquear la expresión génica de la chaperona específica de colágeno GP46, logró resolver la fibrosis desarrollada en un modelo de cirrosis hepática inducida por la administración de dietilnitrosamina. En el año 2013, Niitsu y sus colaboradores, utilizaron el mismo tratamiento para la fibrosis pancreática y obtuvieron los mismos resultados. La fibrosis pancreática se resolvió después de bloquear la expresión génica de la chaperona GP46 por medio de un ARNip encapsulado en liposomas de vitamina A. Estos datos resaltan la implicación de la chaperona GP46 en el desarrollo de la fibrosis y el blanco terapéutico que puede revertir la condición fibrótica.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente uno de los problemas de salud que con mayor frecuencia se observa durante la consulta clínica en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán es el incremento de pacientes con fibrosis o cirrosis. Hasta un 80% de los pacientes con cirrosis desarrolla encefalopatía hepática, llevando a un desafortunado pronóstico.¹² La alteración en el metabolismo del amonio como consecuencia del daño hepático crónico resulta ser la clave en la patogenia de la encefalopatía hepática.

Durante la cirrosis la remoción del amonio en el hígado declina significativamente, de tal forma que el músculo esquelético se convierte en el principal órgano de detoxificación al sintetizar glutamina por la acción de la GS; sin embargo, el estado hipercatabólico que se presenta en la cirrosis puede provocar la disminución de las reservas proteicas musculares. Esto implica que las medidas que logren preservar las reservas proteicas y/o incrementen el metabolismo muscular del amonio, darán lugar a una terapéutica efectiva de la encefalopatía hepática. La evidencia experimental indica de manera indirecta el incremento de la actividad de la GS en modelos animales con cirrosis sometidos a una rutina de ejercicio, aunque ninguno de estos estudios ha cuantificado la expresión del gen a nivel de ARNm o proteína.

Considerando los beneficios que la práctica del ejercicio físico puede ofrecer sobre la regulación de múltiples procesos metabólicos y transcripcionales en el músculo esquelético, se plantea: ¿Cuál es el efecto del ejercicio físico moderado en la expresión génica de la glutamina sintetasa en un modelo de daño hepático inducido con dietilnitrosamina en ratas?

4. JUSTIFICACIÓN

La cirrosis es uno de los extremos de la afección hepática y suele preceder al desarrollo de manifestaciones clínicas graves como la encefalopatía hepática y el cáncer primario de hígado. A pesar de los grandes avances en la detección y el tratamiento de las enfermedades hepáticas crónicas, la tasa de mortalidad sigue siendo alta.

La presencia de encefalopatía hepática en pacientes cirróticos tiene un efecto detrimental sobre la calidad de vida total, impide la ejecución de tareas complejas como manejar y cuando es clínicamente evidente, es una indicación para el trasplante de hígado en estos pacientes.

El soporte nutricional que puede brindarse a un paciente cirrótico con encefalopatía está limitado a la eliminación de amonio a nivel intestinal. Colateralmente, se ha estimado que el costo total de la terapia para un paciente con EH grado 2, incluyendo fármacos, visitas al cuarto de emergencia y cuidado hospitalario, si es tratado con el fármaco lactulosa es de \$ 13,285 dólares por año, y con Rifaximin es de \$ 7,958 dólares por año.⁵²

Ante el elevado consumo de alcohol en México, el alto porcentaje de los pacientes con cirrosis que desarrollan la EH, los costos fuertes que deben derogarse en la atención a un paciente con esta enfermedad, y los problemas de aceptación y de emergencia de organismos multiresistentes con los tratamientos actuales, surge la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas con mayor eficacia y menores costos, que mejoren la calidad de vida de los pacientes con HE en el país y de manera global.

Estudios recientes han determinado que el amonio es la neurotoxina principal en el desencadenamiento de la encefalopatía hepática. El interés creciente sobre el tráfico inter-órgano del amonio ha permitido distinguir al músculo esquelético como un tejido alternativo que puede reducir las

concentraciones de amonio circulante, donde destaca la glutamina sintetasa, siendo la enzima encargada de mantener bajo control los niveles de amonio en la sangre.

Por lo tanto, una propuesta de terapia que ayudaría a destoxificar el amonio en el músculo por medio de la regulación de la expresión de la glutamina sintetasa, es a través del ejercicio, lo que implicaría incrementar el metabolismo de amonio y con ello disminuir la toxicidad dada por la hiperamonemia. Éste punto es de total intervención nutricional dado que recae sobre la capacitación en un estilo de vida que le permita al paciente obtener beneficios.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del ejercicio físico moderado sobre la expresión génica de la glutamina sintetasa (GS) en el músculo esquelético de ratas con daño hepático inducido por dietilnitrosamina (DEN).

5.1- Objetivos específicos:

1. Determinar el grado de daño hepático en el modelo animal a través de la variación de peso de las ratas durante el período de experimentación, los cambios morfológicos, histopatológicos y la expresión de los marcadores genéticos GS, HNF4- α , PC4 y GP46 en el hígado.
2. Determinar las adaptaciones genéticas al cuantificar el ARNm de GS en el músculo esquelético de las ratas de los diferentes grupos (Salina, Salina + Ejercicio, DEN, DEN + Ejercicio) de estudio, por RT-PCR en tiempo real.
3. Contrastar el efecto del ejercicio físico moderado sobre ARNm de GS en las ratas de los grupos Salina, Salina + Ejercicio, DEN, DEN + Ejercicio.

6. HIPÓTESIS

El ejercicio físico moderado incrementa la expresión génica de la glutamina sintetasa en el músculo esquelético de ratas con daño hepático inducido por dietilnitrosamina.

7. DISEÑO METODOLÓGICO

7.1 Tipo de estudio:

Para realizar el trabajo de investigación se llevó a cabo un estudio experimental de casos y controles, longitudinal, retrospectivo parcial.

7.2 Límites de tiempo y espacio:

Se consideraron 11 meses para culminar la fase experimental del proyecto: en la primera etapa se desarrolló el modelo de daño hepático, se programó de enero a abril para el L-T12, y de marzo a julio para el L-T16, en el Departamento de Investigación Experimental y Bioterio. En la segunda etapa, se realizaron las pruebas y metodologías en el laboratorio del Departamento de Gastroenterología del INCMNSZ de agosto a diciembre del 2017.

7.3 Variable independiente

- Ejercicio físico moderado.

7.4 Variable dependiente

- Expresión génica de la glutamina sintetasa.

7.5 Tamaño de muestra:

Fueron utilizadas 40 ratas Wistar organizadas en dos lotes L-T12 y L-T16, agrupándose mediante aleatorización.

7.6 Criterios de inclusión

- Ratas macho cepa Wistar con un rango de peso de 150 a 200 g, sanas y sin ningún padecimiento físico o discapacidad.

7.7 Criterios de exclusión

- Ratas hembra
- Ratas con un peso menor a 150 g o mayor a 200 g al inicio del experimento.
- Ratas con algún padecimiento físico o discapacidad.

7.8 Criterios de eliminación

Las ratas que presentaron uno o más de los siguientes criterios clínicos antes del término del período de experimentación establecido en el protocolo fueron destinadas a eutanasia:

- Pérdida de peso corporal > 25% en menos de una semana
- Postura encorvada persistentemente
- Piloerección en todo el cuerpo (más un síntoma severo adicional)
- Respiración con dificultad persistente
- Convulsiones continuas > a 10 minutos
- Distensión abdominal muy pronunciada (A+++)
- Abatimiento persistente, sin respuesta a actividad extraña o provocación
- Pérdida de pelo en un área mayor al 25% de la superficie corporal
- Sangrado evidente desde cualquier orificio
- Lesiones que interfieran con comer, beber
- Trauma autoinducido persistente.

7.9 Diagrama metodológico

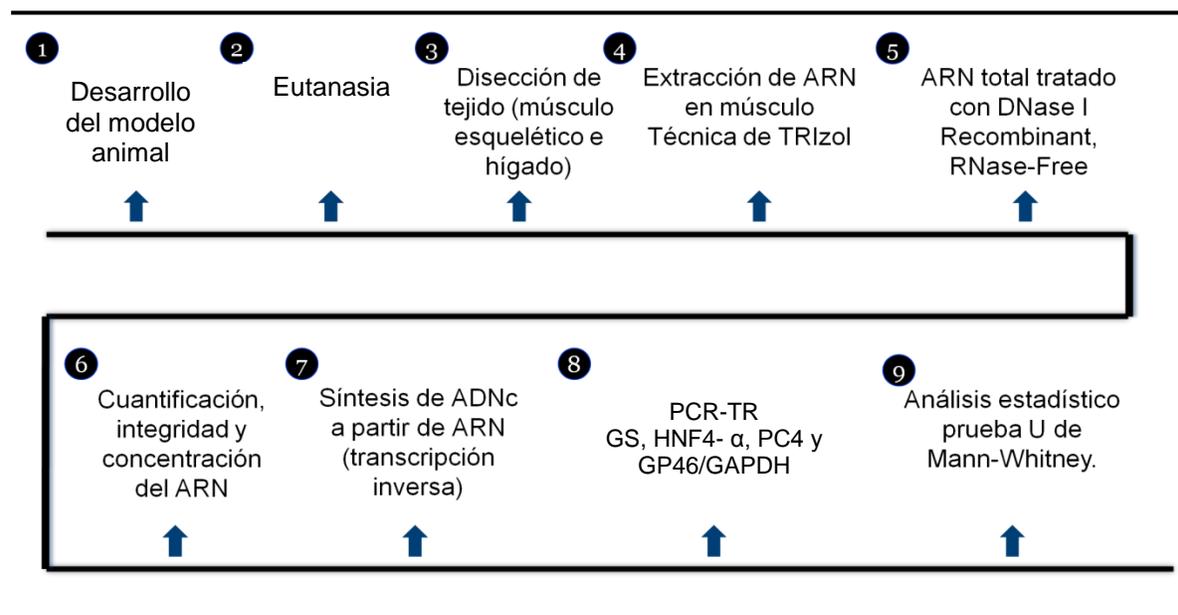


Figura 7. Diagrama metodológico. Se muestra los principales procedimientos a seguir para determinar la expresión génica de GS en músculo y de HNF4- α , PC4 y GP46 en hígado, utilizando como gen constitutivo GAPDH. Al final se analizaron los resultados con el programa SPSS 17.0 para comparar los niveles de expresión de GS entre las ratas controles y las experimentales.

7.10 Definición de grupos:

El diseño experimental consistió en organizar dos lotes de ratas (L-T12, n=16 y L-T16, n=24). Cada lote fue dividido en 4 grupos; “SALINA” (S), “DEN” (D), “DEN/EJ” (DE), “SALINA/EJ” (SE). Las ratas del grupo S recibieron una inyección del placebo (solución salina) mientras que los animales del grupo D recibieron inyecciones de dietilnitrosamina periódicamente (las dosis se describen en el 7.11.1 de la metodología). La rutina de ejercicio fue realizada por las ratas de los grupos DE y SE. El número de animales por cada grupo, el tiempo de exposición al fármaco y la rutina de ejercicio se muestran en la figura 8.

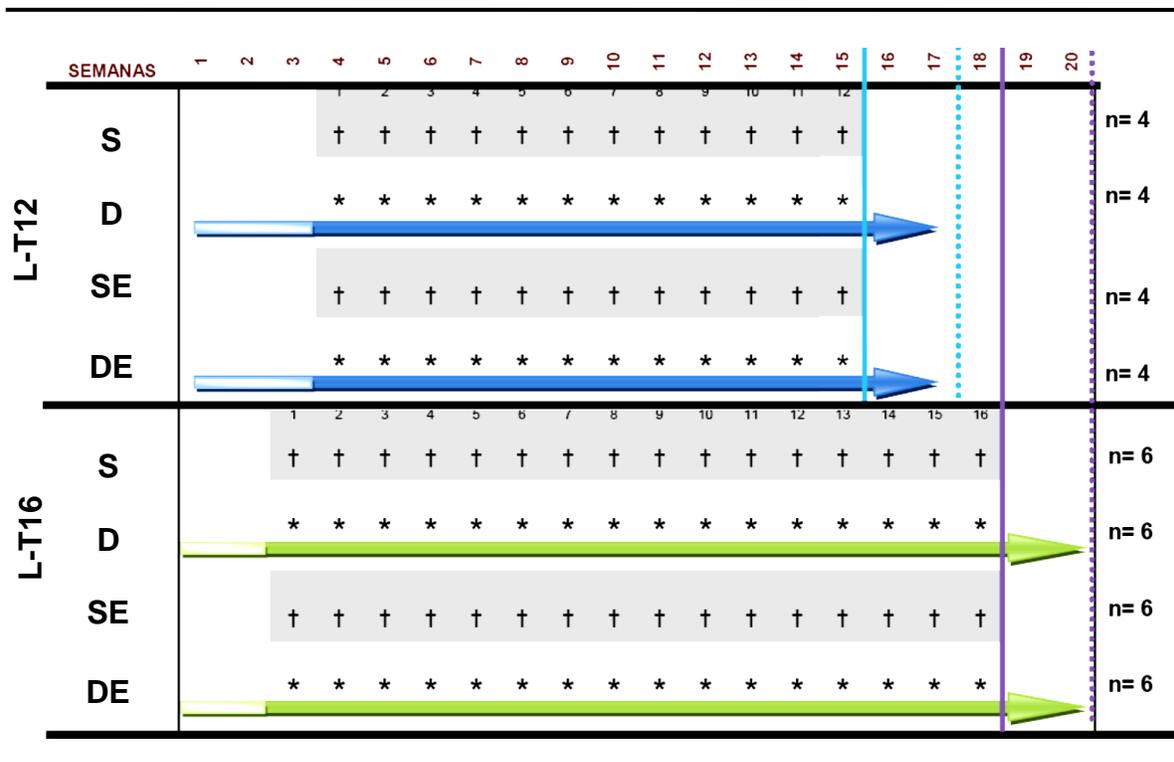


Figura 8. Definición de grupos. Se muestra el modelo de inducción de daño hepático L-T12 (arriba) y L-T16 (abajo). Las cruces y asteriscos representan la aplicación de solución salina o DEN (0.5 mL) semanalmente; para el L-T12 se administraron 12 inyecciones del placebo o la droga según lo correspondiente a cada grupo. Para el L-T16 se aplicaron 16 inyecciones. Las líneas verticales continuas muestran el final de la aplicación y las líneas punteadas indican el tiempo de la eutanasia. El inicio sombreado de las flechas demuestra el tiempo de acondicionamiento de las ratas para la rutina de ejercicio y la punta indica el tiempo final de la aplicación de la rutina.

7.11 Material y métodos

7.11.1 Desarrollo del modelo experimental

Reactivos

- Dietilnitrosamina (DEN) de presentación líquida (Sigma-Aldrich®)
- Solución salina

Materiales

- Cajas de policarbonato de piso sólido

- Aserrín
- Comederos de acero inoxidable
- Botellas de vidrio
- Jeringas estériles de plástico de 1mL con aguja 27G X 13mm (BD Plastipak®)

Equipo

- Treadmill STYLCO (Letica Scientific®), Modelo: L18706.

Descripción del procedimiento

Se utilizaron ratas Wistar, a las cuales se les administro placebo (0.5 mL) o DEN a razón de 50 mg/kg de peso corporal, a través de una inyección intraperitoneal cada 7 días durante el período de experimentación, conformando el grupo “SALINA” o “DEN”, respectivamente. Las ratas de los grupos DEN/EJ y SALINA/EJ además de recibir la inyección realizaron una rutina de ejercicio que consistió en 5 minutos de calentamiento a una velocidad de 24.9 cm/min y 25 minutos de caminata a 41.5 cm/min (intensidad de 60% del VO_2 max). Realizaron la rutina 3 veces por semana utilizando una caminadora (Treadmill) STYLCO hasta cumplir las semanas programadas, suspendiéndose un día antes de la eutanasia. Fueron consideradas de 2 a 3 semanas para que los animales se adaptaran y aprendieran a caminar (acondicionamiento).⁵³ En este período los animales pasaron de reconocer la caminadora a aumentar progresivamente la velocidad y el tiempo de la caminata hasta llegar a las condiciones de la rutina de ejercicio.

Mediciones fisiológicas y ambientales

Las ratas se pesaron semanalmente antes de la inyección de DEN o solución salina y antes de recibir eutanasia. Se mantuvieron en cajas de policarbonato de piso sólido, con cama de aserrín y un ciclo luz-oscuridad de 12 horas a temperatura ambiente, bajo condiciones libres de patógenos.

Alimentación y agua

Los animales recibieron una dieta con alimento en forma de pellets y agua *ad libitum* acidificada con HCl, utilizando comederos para rata de acero inoxidable y botellas de vidrio, durante todo el tiempo del experimento.

**Tabla 5. Contenido nutrimental del alimento para roedor RQ22-5 ZEIGLER
saco de 22.67kg (50 lbs).**

Información nutrimental	Porcentaje %
Proteína Cruda: (mínima)	22.0 %
Grasa: (mínima)	5.0%
Fibra Cruda: (máxima)	4.0 %
Ceniza: (máxima)	7.0%

Ingredientes: trigo, maíz, avena, harinilla de trigo, harina de pescado, harina de soya, harina de alfalfa, gluten de maíz, aceite de soya, fosfato bicálcico, levadura de cerveza deshidratada, carbonato de calcio, sal, suplemento de vitamina D3, bisulfito sódico de menadiona (fuente de Vitamina K, activada), mononitrato de tiamina, niacina, acetato de vitamina A, suplemento de vitamina B12, suplemento de vitamina E, pantotenato de calcio, suplemento de riboflavina, hidrocloreuro de piridoxina, biotina, ácido fólico, óxido de magnesio, sulfato ferroso, óxido de manganeso, sulfato de cobre, óxido de zinc, yodato de calcio, carbonato de cobalto, hidrocloreuro de colina.

7.11.2 Eutanasia de las ratas

Reactivos

- Pentobarbital sódico
- Solución salina fisiológica (NaCl 0.9%)

- Alcohol etílico al 70% para limpieza de la mesa de trabajo y material de disección
- Nitrógeno líquido

Material

- Jeringas estéril de plástico con aguja de 1ml y 10 ml (BD Plastipak®)
- Instrumental de disección
- Microtubos Eppendorf de 1.5 mL
- Bolsas para residuos peligrosos biológico-infecciosos
- Contenedor de polipropileno para residuos peligrosos punzocortantes biológico-infecciosos

Equipo

- Báscula de plato
- Revco

Descripción del procedimiento

Después de cumplir el período de experimentación, las ratas fueron sometidas a eutanasia siguiendo los lineamientos descritos en la Norma Oficial Mexicana NOM062-ZOO-1999. Se aplicó pentobarbital (35-50 mg/1Kg peso corporal) inyectado intraperitonealmente con una jeringa estéril de 1 mL y una aguja 27 G X 13 mm, y se pesaron en una balanza de plato. Utilizando instrumental de disección estéril se cortaron pequeños fragmentos de músculo gastrocnemio e hígado lavados con solución salina fisiológica (NaCl 0.9%) fría, los cuales se colocaron en microtubos Eppendorf de 1.5 mL previamente esterilizados; posteriormente, se congelaron en nitrógeno líquido y las muestras se almacenaron en el Revco a -70°C hasta realizar los ensayos posteriores. Fue necesario llevar a cabo el procedimiento en el menor tiempo posible para evitar la degradación del ARN.

7.11.3 Extracción de ácido ribonucleico total de músculo esquelético e hígado

Reactivos

- Solución de rompimiento de células, compuesta por isotiocianato de guanidina y fenol (TRIzol® Reagent, Invitrogen®)
- Cloroformo CHCl₃ (J.T. Baker®)
- Isopropanol C₃H₈O (Sigma- aldrich®)
- Etanol al 70% C₃H₆O (J.T. Baker®)
- Agua con DEPC (Dietilpirocarbonato)
- Agua grado PCR (Roche®)

Material

- Microtubos de 1.5 mL Eppendorf®
- Pipetas de volumen ajustable de 1000 µL, (Gilson®)
- Puntas de acrílico para pipeta automática de 1000 µL (Eppendorf®).

Equipo

- Polytrón (homogenizador) PT 1300 D (kinematica AG®)
- Centrífuga refrigerada Mikro 22 R (Hettich®)
- Campana de extracción
- Thermoblock

Descripción del procedimiento

El ARN total fue aislado a partir de fragmentos de tejido muscular esquelético e hígado por medio del método de extracción fenólica con reactivo de TRIzol®. El reactivo TRIzol es una solución monofásica compuesta por isotiocianato de guanidina y fenol capaz de lisar las células y separar la muestra en dos fases (acuosa y orgánica), seguida de la extracción con cloroformo y precipitación con isopropanol del ARN total a partir de la fase acuosa.

Para optimizar el funcionamiento de los reactivos se almacenaron en el refrigerador o cuarto frío a 4°C.

En 1 mL de solución de TRIzol® se homogenizaron de 100 a 200 mg de tejido muscular de cada rata con el polytrón, a 12 000 rpm durante 4 minutos máximo (debido a la toxicidad de este reactivo el procedimiento se realizaron en una campana de extracción); en la homogenización o lisis de la muestra, el reactivo TRIzol® mantiene la integridad del ARN, mientras que disgrega y disuelve los componentes de la célula. Posteriormente, el tejido homogenizado se dejó reposar por 30 minutos y se procedió a centrifugar a 11 000 rpm durante 10 minutos, a 4°C; al final de la centrifugación, se observó en el fondo del tubo el tejido disgregado compactado y en la parte superior un sobrenadante, el cual se transfirió a un microtubo limpio. Al tejido compactado se le agregó nuevamente 500 µL de TRIzol® para después volver a homogenizar; una vez que se mezcló el sobrenadante de ambas homogenizaciones se le agregaron 200 µL de cloroformo, se agitó manualmente durante 25 segundos, y se centrifugó una vez más a 11 000 rpm durante 10 minutos, a 4 °C. A este nivel se obtuvieron 2 fases: fase orgánica que contuvo a las proteínas y la fase acuosa la cual contuvo el ARN total de las células del tejido homogenizado o lisado, de igual forma el sobrenadante se transfirió a un microtubo limpio y se le adicionaron 750 µL de isopropanol; posteriormente se dejó precipitando el ARN con el isopropanol durante la noche a 4°C, para luego ser centrifugado a 14 000 rpm durante 15 minutos a 4°C. De esta manera el ARN se quedó en el fondo del tubo simulando un pellet o botón. El sobrenadante fue removido y el pellet fue lavado con 1 mL de etanol al 70 % mezclado con 30% de agua tratada con DEPC; para ello, se agitó en vortex durante algunos segundos, se centrifugó a 7700 rpm 5 minutos a 4°C, se retiró el sobrenadante de etanol, se dejó evaporar los residuos de etanol durante 10 minutos, y por último el pellet se resuspendió en 50 µL H₂O grado DEPC calentándose a 60°C en un thermoblock.

7.11.4 Ácido ribonucleico total tratado con desoxirribonucleasa I recombinant, libre de ribonucleasa A

Reactivos

- Buffer de incubación 10X (Roche®)
- Enzima para remoción de ADN, DNase I recombinant, RNase-free® (Roche®)
- Inhibidor de RNasa® (Roche®)
- Agua libre de RNasa o grado PCR (Roche®)
- TRIzol® Reagent (Invitrogen®)

Material

- Microtubos 1.5 mL (Eppendorf®)
- Pipetas automáticas de microvolumen ajustable de 0.1 a 2.5µL, 0.5 a 10µL, y puntas de acrílico para micropipeta automática de 10µL y 100µL (Eppendorf®)

Equipo

- Vortex y thermoblock

Descripción del procedimiento

La ADNsa I recombinante libre de ARNsa (DNase I Recombinant, RNase-Free®, Roche®) es expresada en *Pichia pastoris* (levadura capaz de crecer en metanol) y se utiliza para degradar el ADN genómico obtenido durante la lisis de células, que contamina la preparación de ARN. Por esta razón, 20 µg de ARN total de cada muestra fue sometida a un tratamiento con el kit de degradación de ADN con ADNsa (Roche®). Las cantidades utilizadas de cada componente por muestra fueron las siguientes: 5 µL de buffer de incubación, 0.5 µL de ADNasa, 0.25 µL de inhibidor de ARNasa y 19.25 µL de H₂O grado PCR; el volumen final de la reacción será de 50 µL. Posteriormente los microtubos con el ARN y los componentes mezclados del kit se agitaron en vortex durante pocos segundos, se incubó a 37°C por 20 minutos en un thermoblock, se dejaron a temperatura

ambiente 2 minutos. Para remover a la ADNsa se procedió a realizar una segunda extracción de la muestra con TRIzol®.

Al microtubo con el ARN tratado con ADNsa se le agregó 750 µL de TRIzol®, se agitó suavemente por algunos segundos, se colocaron 150 µL de cloroformo, se agitó con fuerza y rapidez durante 20 segundos, y se centrifugo a 11000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Después se retiró el sobrenadante y se colocó en un microtubo limpio y se agregaron 375 µL de isopropanol dejando precipitar durante la noche a 4°C, para luego ser centrifugado a 14 000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Entonces el sobrenadante fue removido y al pellet se le agregó 1 mL de etanol al 70 % mezclado con 30% de agua tratada con DEPC para lavarlo, se agitó en vortex durante algunos segundos y se centrifugó a 7700 rpm durante 5 minutos a 4°C; posteriormente se retiró el sobrenadante y se dejaron evaporar los residuos de etanol durante 10 minutos, y por último el pellet se resuspendió en 50 µL H₂O grado PCR calentándose a 60°C en un thermoblock.

7.11.5 Cuantificación, integridad y concentración del ácido ribonucleico

Reactivos

- Solución amortiguadora de Tris Borato-EDTA (TBE)
 - Tris-HCl 0.9 M
 - Ácido bórico 0.9 M
 - EDTA 0.5 M pH 8
- Agarosa grado analítico (Promega®)
- Agua destilada
- Bromuro de Etidio 10 mg/dL
- Amortiguador de carga azul de bromofenol

Material

- Pipetas automáticas de microvolumen ajustable de 0.1 a 2.5µL, 0.5 a 10µL, con sus respectivas puntas de acrílico (Eppendorf®)

- Microtubos 0.6 y 1.5 mL (Eppendorf®)

Equipo

- Cámara de electroforesis horizontal (Life technologies®)
- Balanza de plato (Ohaus®)
- Microondas (Samsung®)
- Espectrofotómetro NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Scientific®)
- Cámara de luz ultravioleta UVP (Dual-intensity Tranilluminator®)

Descripción del procedimiento

Para cuantificar el ARN se midió la concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de 1.5 μL del ARN suspendido en H_2O grado PCR; la lectura se realizó antes de tratar el ARN con ADNasa I recombinante para calcular los μg requeridos en el proceso, y también después de la segunda extracción, a través de un espectrofotómetro (NanoDrop™ 2000/2000c) con absorbancias a 260 y 280 nm. La pureza fue considerada óptima si la tasa entre las lecturas a 260 y 280 se acerca a 2.0

La integridad del ARN total extraído se demostró a través de una electroforesis. Para ello, se preparó un gel de agarosa al 1.5 % en 50 mL de solución amortiguadora de TBE, calentándose en el microondas hasta observarse completamente transparente; fue teñido con 0.5 μL de bromuro de etidio que funciona como colorante fluorescente al intercalarse entre las bases nitrogenadas del ARN. Se mezcló de 1 a 2 μL de ARN con azul de bromofenol (3 a 4 μL), que indicó el frente de la corrida. La migración y separación del ARN cargado en el gel de agarosa se efectuó a 70 voltios durante 30 minutos (Figura 8); una vez transcurrido el tiempo, el gel se observó en un transiluminador de luz UV.

La solución amortiguadora de Tris-Boratos-EDTA (TBE) se preparó a 5X y se utilizó a 0.5X. Para preparar 1 l. de una solución 5X TBE se mezcló: 54 g de Tris Base, 27.5 g de ácido bórico, 4.7 g de EDTA sódico, se llevó a 1 L. con agua y se esterilizó en autoclave.

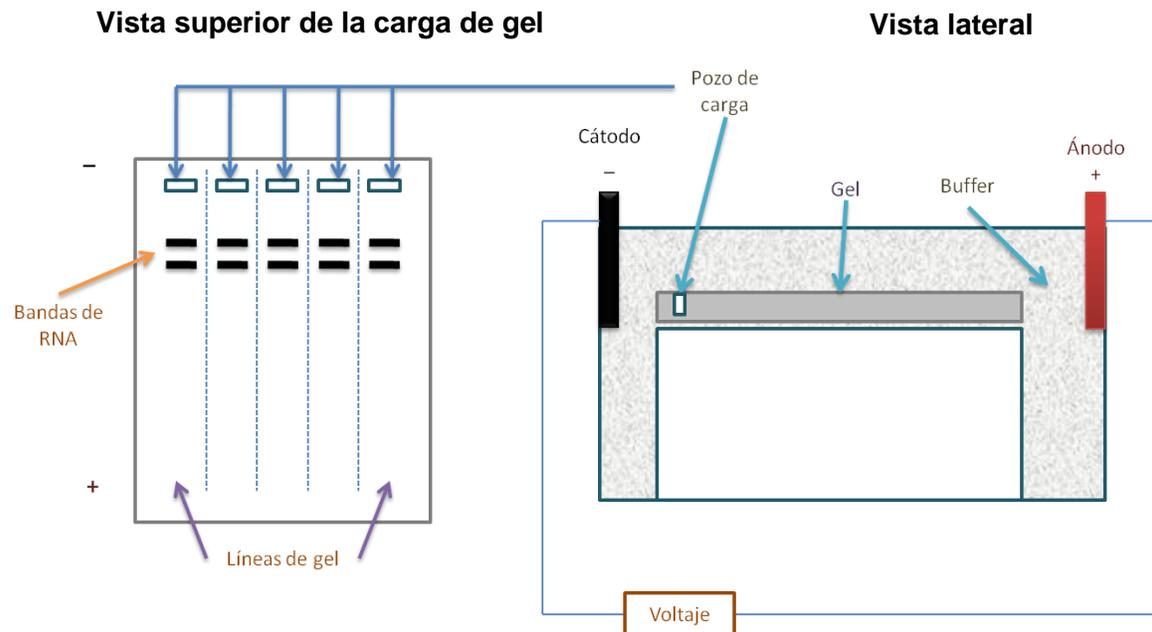


Figura 8. La electroforesis. Es un método de separación y análisis de macromoléculas como el ARN. El principio fisicoquímico en el que se basa es que cualquier partícula cargada al ser puesta en un campo eléctrico migra por efecto de la atracción de cargas opuestas. Los ácidos nucleótidos poseen una carga negativa debido a los grupos fosfatos, por los que en la electroforesis estos migran hacia el polo positivo (ánodo).

7.11.6 Síntesis de ácido desoxirribonucleico complementario a partir de ácido ribonucleico (transcripción reversa)

Reactivos

- Mezcla de desoxiribonucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- Inhibidor de RNasa (Roche®)
- Buffer (5 μ M) o solución amortiguadora (Roche®)
- Enzima Transcriptasa Reversa M-MLV (Virus de la leucemia murina de Maloney, Promega®)
- Iniciador Random Hexámero 600 μ M (Roche®)
- Agua grado PCR (Roche®)

Material

- Puntas de acrílico para micropipeta automática de 10 µL, 100 µL, 1000 µL,
- Pipetas de volumen ajustable de 20 µL, 100 µL, y 1000 µL, (Gilson®)
- Microtubos 0.6 y 1.5 mL (Eppendorf®)
- Pipetas automáticas de microvolumen ajustable de 0.1 a 2.5 µL, 0.5 a 10 µL (Eppendorf®)

Equipo

- Termociclador 9600 (Perkin Elmer®)

Descripción del procedimiento

El ADN complementario o copia (ADNc) fue sintetizado *in vitro* a partir de ARN total por medio de la enzima transcriptasa reversa (una ADN polimerasa dependiente de ARN), de desoxiribonucleótidos y hexámeros. Las moléculas de ARN funcionan como templado y los hexámeros al azar actúan como iniciadores o “primers”. Los desoxiribonucleótidos (dNTPs) sirven como sustrato para la enzima dando como resultado la síntesis de hebras de ADNc, que están listas para realizar la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.⁵⁴ La concentración de ARN fueron ajustada a 2 ng/µL y la reacción estuvo constituida por 2 µL de desoxiribonucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0.5 µL de inhibidor de RNasa, 4 µL de Buffer, 0.5 µL de la enzima transcriptasa reversa M-MLV, 2 µL de Iniciador Random Hexámero y H₂O grado PCR (cantidad ajustable, dependiendo de la cantidad de ARN). La reacción se llevó a cabo a tres temperaturas diferentes: 10 minutos a 25°C, 30 minutos a 55°C y 10 minutos a 85°C, utilizando el termociclador, una vez terminadas las incubaciones el ARN se almacenó a -20°C.

7.11.7 Cuantificación de la expresión génica por reacción en cadena de la polimerasa tiempo real

Reactivos

- Enzima - Tag ADN polimerasa concentración 5x (Roche®)

- Sondas (58, 2, 1, 68, 84, 26) y primers para la amplificación de los genes GS, HNF4- α , PC4 y GP46/ GAPDH de la librería universal Roche®. Ver anexos.

Material

- Microtubos 0.6 y 1.5 mL (Eppendorf®)
- Pipetas de volumen ajustable de 20 μ L, 100 μ L, y 1000 μ L, (Gilson®)
- Pipetas automáticas de microvolumen ajustable de 0.1 a 2.5 μ L, 0.5 a 10 μ L, (Eppendorf®)
- Puntas de acrílico para micropipeta automática de 10 μ L, 100 μ L y 1000 μ L
- Cajas con 96 capilares de 20 μ L (Roche®)
- Caja fría de 2 a 8°C (LigthCycler®) con adaptadores para capilares
- Dispositivo para tapar capilares (Roche®)
- Carrusel para 31 capilares de 20 μ L (Roche®)
- Liberador de capilares (Roche®)

Equipo

- Termociclador para Tiempo Real 2.0 LigthCycler®.
- Microcentrífuga Spin (Eppendorf®)
- Software light cyclers 4.1.1.2

Descripción del procedimiento

La reacción en cadena de la polimerasa o "Polymerase Chain Reaction" (PCR), es una técnica que fue desarrollada a mediados de los años 80 por Kary Mullis, con la cual se pueden producir múltiples copias de un fragmento de ADN específico *in vitro*, incluso en presencia de millones de otras moléculas de ADN. La técnica se basa en la actividad de la enzima Tag ADN polimerasa, que es capaz de fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. Para ello se requiere de nucleótidos (adenina, timina, citosina y guanina) en el medio funcionando como la materia base para fabricar el ADN, y un par de oligonucleótidos que pueda unirse al fragmento de ADN que se quiera copiar sirviendo como cebadores ("primers" en inglés). En el PCR en Tiempo Real, que es una variación del esquema inicial de PCR, además se utiliza un fragmento de

ADN complementario a la parte intermedia del gen de interés, es decir sondas específicas. Estas sondas llamadas Taqman llevan una molécula fluorescente y otra molécula que inhibe esta fluorescencia, de tal forma que la acción de la ADN polimerasa permite la liberación de la molécula fluorescente al desplazar la sonda de su sitio. La fluorescencia emitida durante cada ciclo de la PCR es directamente proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando. De este modo se puede cuantificar el material genético presente en una muestra.

En todo tipo de PCR; el proceso incluye tres pasos básicos que se repiten varias veces.

- Desnaturalización. La mezcla de reacción se calienta a 95°C para separar la doble hebra de ADN y convertirlas en hebras sencillas, facilitando la acción de los iniciadores o cebadores.
- Alineación. La mezcla de reacción se enfría a alrededor de 60°C durante 30 segundos. Los oligonucleótidos se hibridan o asocian con las cadenas del ADN de interés para formar cadenas dobles, de los cuales uno es complementario al extremo 5' y otro al extremo 3' del gen o región del ADN que se amplificará.
- Polimerización o extensión. La ADN polimerasa extiende los "primers", en el espacio comprendido entre ambos iniciadores, y coloca desoxinucleótidos trifosfatados (dNTP's) de 5'a 3' leyendo el templado de ADN de 3'a 5'. De esta forma sintetiza la secuencia complementaria de las hebras de DNA molde; se efectúa usualmente a 72 °C.⁵⁴

La amplificación y la cuantificación de los ARN mensajeros para GS se hizo utilizando oligonucleótidos específicos, que además estuvieron diseñados para evitar la posible amplificación del ADN de su gen. La reacción de amplificación se llevó a cabo con el Kit LightCycler TaqMan Master (Roche Applied Science), y la cuantificación del ADN se hizo de manera simultánea en el mismo capilar de 20 µL (LightCycler, Roche Applied Science) a través de la detección de la fluorescencia

generada por las sondas de hidrólisis TaqMan, empleando el Termociclador LigthCycler® 2.0.

Para realizar la reacción se utilizó 2 µL de mezcla maestra de reacción, 0.2 µL de iniciadores derecha e izquierda para glutamina sintetasa de rata, 0.1 µL de sonda de la librería universal # 58, # 68 para HNF4 α , # 84 - PC4 y #26 - GP46; 2.5 µL de H₂O grado PCR y 5 µL de ADNc. Para el gen de referencia se utilizó la sonda # 1 para GAPDH. Ver anexos.

7.11.8 Curvas de amplificación de PCR en tiempo real

Durante la cuantificación de la expresión de los genes por medio de PCR en tiempo real, el incremento de la fluorescencia, que es proporcional al aumento del ADN en cada ciclo, fue registrado por el programa del termociclador de PCR en tiempo real. La información se reflejó gráficamente en curvas cinéticas de la reacción para cada muestra. El ciclo en el que se empezó a detectar el aumento de fluorescencia se denomina ciclo umbral, y es inversamente proporcional a la concentración inicial de los ARN mensajeros de interés, sintetizados a ADNc, presentes en la muestra. Ver figura 9.

Figura 9. Cinética de la PCR-TR.

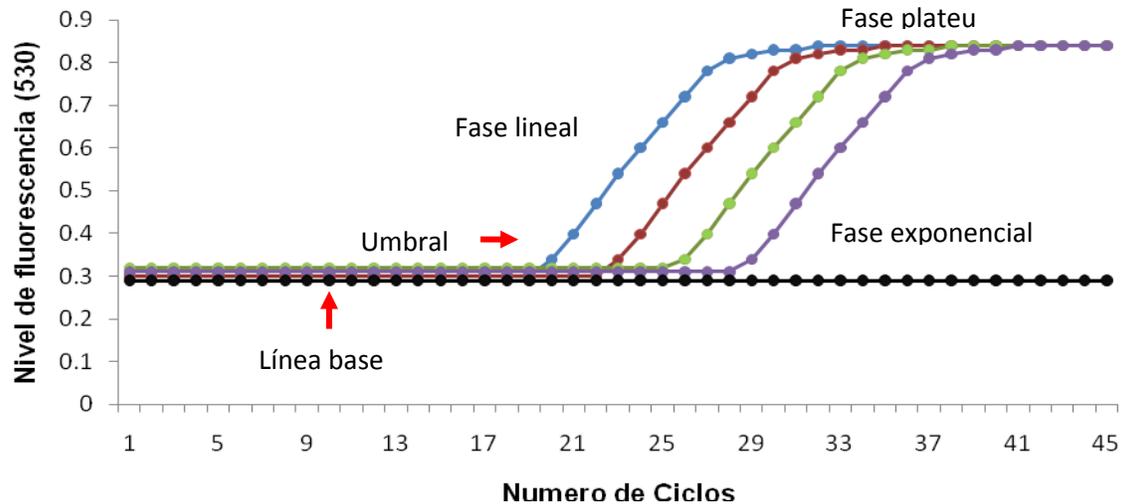


Figura 9. Cinética de amplificación de PCR-TR. Ct o Cp: (ciclo del umbral o punto de cruce o corte) es el ciclo en el cual la fluorescencia supera al umbral y es detectada. La línea de base es el nivel basal o background de fluorescencia durante los primeros ciclos de PCR. El umbral es el nivel de fluorescencia fijo por encima de la línea base. En la fase exponencial temprana la fluorescencia supera el umbral. En la fase logarítmica lineal se duplica exactamente el producto en cada ciclo (óptima amplificación), y en la fase de plateau, los reactivos se han consumido, por lo que la reacción se detiene (reacción de punto final).

7.12 Prueba estadísticas

Se obtuvieron las medias \pm desviación estándar y se hizo el análisis estadístico mediante pruebas no paramétricas, utilizando el programa SPSS® para Windows versión 17.0.

- a) Friedman, para el análisis comparativo entre los grupos, control o experimental, tanto del modelo inducido de cirrosis como el modelo inducido de hepatocarcinoma. Análisis de varianza

- b) Mann-Whitney, para el análisis entre los subgrupos control y los administrados con DEN, al mismo tiempo pos-inyección.
- c) Krustal-Wallis, para el análisis entre los grupos con una rutina normal y aquellos que realizaron rutina de ejercicio.

7.13 Recursos humanos y materiales

El grupo de trabajo en este proyecto estuvo conformado por: el Dr. Miguel Ángel Torres Vega, jefe del proyecto e Investigador en Ciencias Médicas del INCMNSZ; un técnico en cuidado y mantenimiento de animales de laboratorio, bajo la supervisión del Dr. Octavio Villanueva Sánchez, y las pasantes. de la Lic. en Nutrición Dafne Juárez Galicia y Lizbeth Miriam Vázquez Carcaño para la realización de la metodología y desarrollo de proyecto.

Las áreas importantes que fueron consideradas en el proyecto dentro del Departamento de Gastroenterología del INCMNSZ son: cuarto para realizar Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), área de lavado y esterilización de material, dos cuartos de almacenamiento de material o reactivos, cuarto frío (-4°C) y área de trabajo experimental.

El equipo que se utilizó es el siguiente: un termociclador Perkin Elmer de alta capacidad, cámaras de electroforesis horizontales, dos fuentes de poder de alto voltaje, campanas de extracción para el manejo de reactivos peligrosos, equipo de PCR en tiempo Real modelo 2.0 LightCycler de Roche®, con el software necesario para el análisis de la cuantificación de la expresión génica, pipetas de volumen ajustable de 0.1-2.5, 0.5-10, 2-20, 10-100, 20-200, 100-1000 µL marcas Gilson® y Eppendorf®, centrifugas refrigeradas, microcentrífuga, nanodrop, balanzas de plato, microondas utilizado en la preparación del gel de agarosa, congeladores de -4°C y -20°C, Revco® para almacenar muestras de tejidos (-70°C), analizador Roche/Hitachi 912, cámara de luz ultravioleta y polytrón.

En el Departamento de Investigación y Bioterio se ocupó la infraestructura y materiales para el mantenimiento y cuidado de los animales de laboratorio, de tal forma que se alimentaron bajo condiciones libres de patógenos, con control de temperatura y con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas.

La caminadora se colocó en un lugar específico del Bioterio para realizar la rutina de ejercicio, aislado del sonido para evitar la modificación de la conducta en los animales.

El financiamiento del proyecto será solventado por el Departamento de Gastroenterología, tanto de los reactivos como de los gastos para el mantenimiento de los animales de laboratorio, con una suma total aproximada de **\$ 75,000 M.N.**

8. RESULTADOS

Cuarenta ratas macho Wistar fueron organizadas para conformar los lotes L-T12 (n=16) y L-T16 (n=24), de las cuales, una se eliminó por no realizar la rutina y otra falleció antes de lo programado. La muestra final fue de treinta y ocho animales. Cada lote fue dividido en 4 grupos SALINA (**S**), DEN (**D**), SALINA/EJE (**SE**) y DEN/EJE (**DE**). Para el lote T12, ocho ratas recibieron una inyección intraperitoneal de dietilnitrosamina (DEN) cada siete días hasta completar doce inyecciones; cuatro de estas ratas además de recibir la inyección de DEN realizaron una rutina de ejercicio descrita en la metodología. En el lote T16, seis ratas recibieron el fármaco y realizaron la misma rutina de ejercicio que en el lote T12.

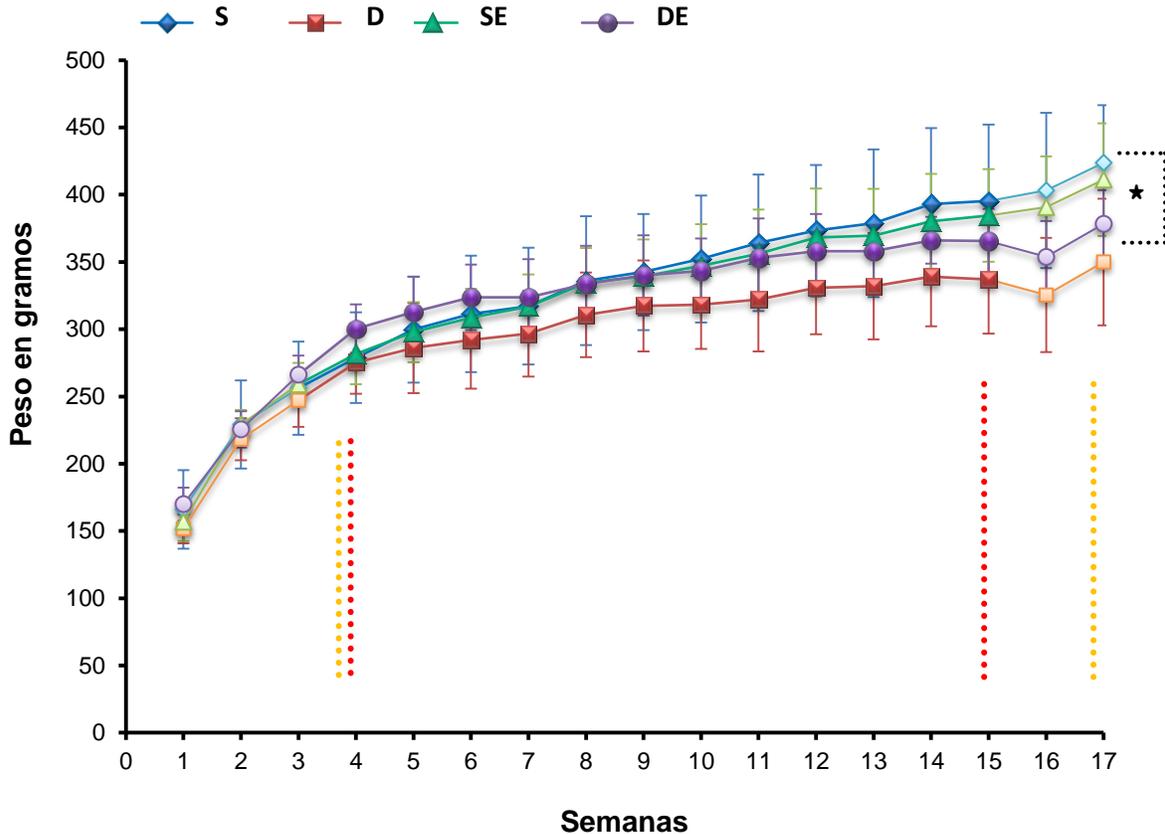
Para cumplir con el objetivo de esta investigación, en primera instancia, se analizó la variación de peso de los animales descrita en las gráficas 1 y 2. El día de la eutanasia se extrajo el hígado y se realizaron observaciones morfológicas. Posteriormente se procesaron cortes tisulares para pruebas histopatológicas y se cuantificó la expresión génica de los marcadores moleculares para determinar el grado de daño hepático. El músculo gastrocnemio de ambas piernas de cada animal se extrajo para cuantificar el ARNm de la glutamina sintetasa.

8.1 Caracterización del modelo de daño hepático

8.1.1 Variación de peso en las ratas durante el período de experimentación

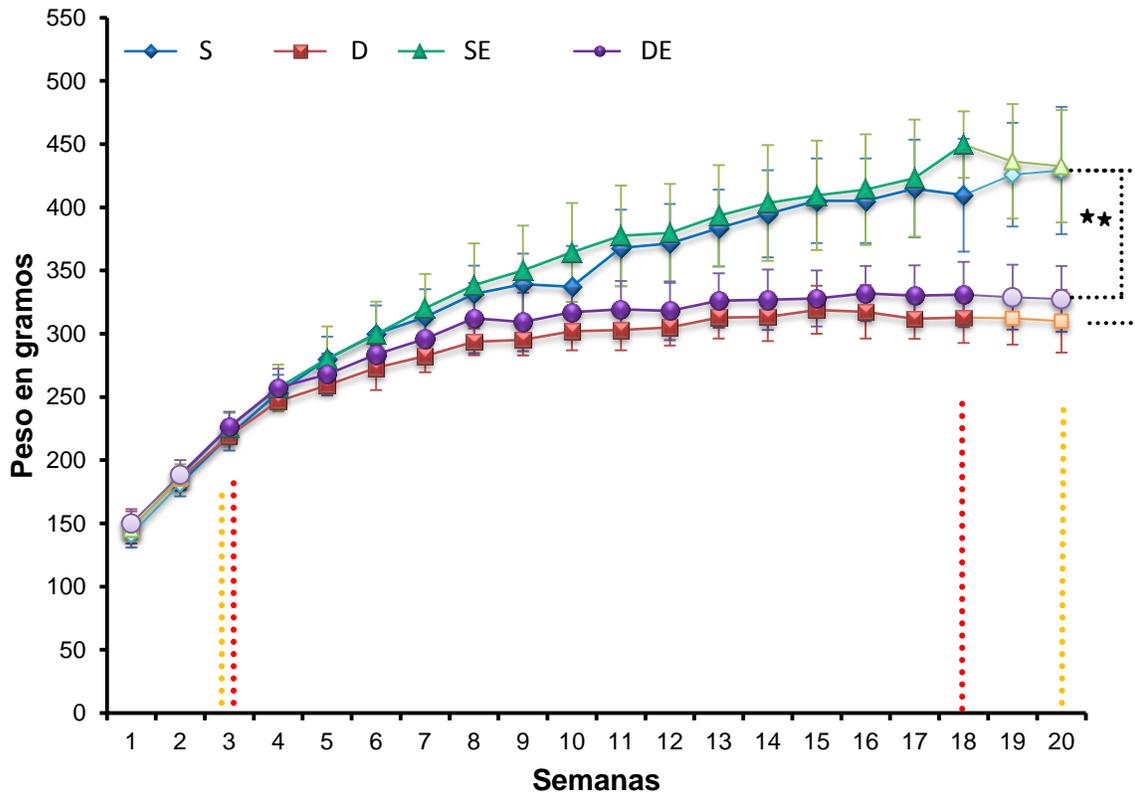
Las ratas de los grupos D y DE en ambos lotes mostraron una disminución de ganancia de peso progresiva, al compararse con las ratas sanas. En las gráficas 1 y 2 se muestra el promedio y la desviación estándar del peso semanal de cada grupo.

Gráfica 1. Variación de peso en las ratas del L-T12



Grafica 1. Variación de peso en las ratas del L-T12. El primer punto indica el promedio del peso inicial de cada grupo. Las líneas verticales rojas delimitan el tiempo de administración del fármaco. Se ocuparon 2 semanas para el período de ambientación a la caminadora y acondicionamiento. Después del período de ambientación, las ratas de los grupos SE y DE realizaron la rutina de ejercicio programada hasta la eutanasia, las líneas verticales amarillas delimitan este periodo. Dos semanas después de la última administración se llevó a cabo la eutanasia de los animales. En el día de la eutanasia, la diferencia de peso entre los grupos D y S del L-12, fue del 17% o 73.5g ($350\text{g} \pm 47.1$ vs $423.8\text{g} \pm 42.3$, $*p= 0.057$).

Gráfica 2. Variación de peso en las ratas del L-T16



Gráfica 2. Variación de peso en las ratas del L-T16. La diferencia de peso encontrada en los grupos D y S del L-T16 fue del 27.7% o 119.2g ($310\text{g} \pm 24.7$ vs $429.2\text{g} \pm 50.3$, $**p=0.004$); y entre los grupos DE y SE fue de 105g lo que representa el 24.3 % ($327.5\text{g} \pm 26.1$ vs $432.5\text{g} \pm 44.5$, $**p= 0.002$).

Las ratas de los grupos D y DE con 12 inyecciones de la droga, mostraron menor disminución en la ganancia de peso, en comparación con las ratas tratadas por 16 semanas. Esto se debió posiblemente por la diferencia de peso y edad encontrada en la primera aplicación de DEN entre los animales de ambos lotes.

Las ratas programadas a 12 semanas tuvieron entre 56 y 74 gramos más de peso, y 10 días más de edad.

A mayor edad la maduración de los órganos se completa y se mejora la capacidad metabólica del animal.⁵⁵ Las ratas del L-T16 fueron más jóvenes y pudieron tener mayor vulnerabilidad al efecto provocado por la droga, además de acentuar el daño al recibir la administración de DEN por un tiempo más prologado. No obstante, cabe resaltar que no se cuantificó el consumo de alimento de las ratas; medir la cantidad de alimento ingerido pudo ser importante para conocer si la pérdida de peso se debió a una ingesta deficiente.

Sin embargo, los resultados obtenidos pueden compararse con las observaciones en la práctica clínica. Los pacientes cirróticos suelen presentar pérdida de peso, variabilidad en la composición corporal o incluso desnutrición calórico-proteica, que pueden desarrollarse por una serie de factores como, la anorexia, la mala-absorción, un aumento de las pérdidas intestinales de proteínas, una disminución de la síntesis de proteínas hepáticas, la utilización anormal de sustratos y el hipermetabolismo.⁵⁶

8.1.2 Cambios morfológicos en el hígado de las ratas tratadas con DEN

Se observó de forma macroscópica la formación de nódulos blanquecinos o necróticos de diferentes tamaños (indicados con flecha amarilla y naranja respectivamente), superficie irregular, palidez y resistencia al tacto en el hígado de las ratas de los grupos D y DE, en comparación con el grupo de ratas a las que se les administró placebo, S y SE, las cuales mostraron un hígado normal. Los cambios fueron más evidentes en el hígado de las ratas del L-T16, como se aprecia en las siguientes imágenes.

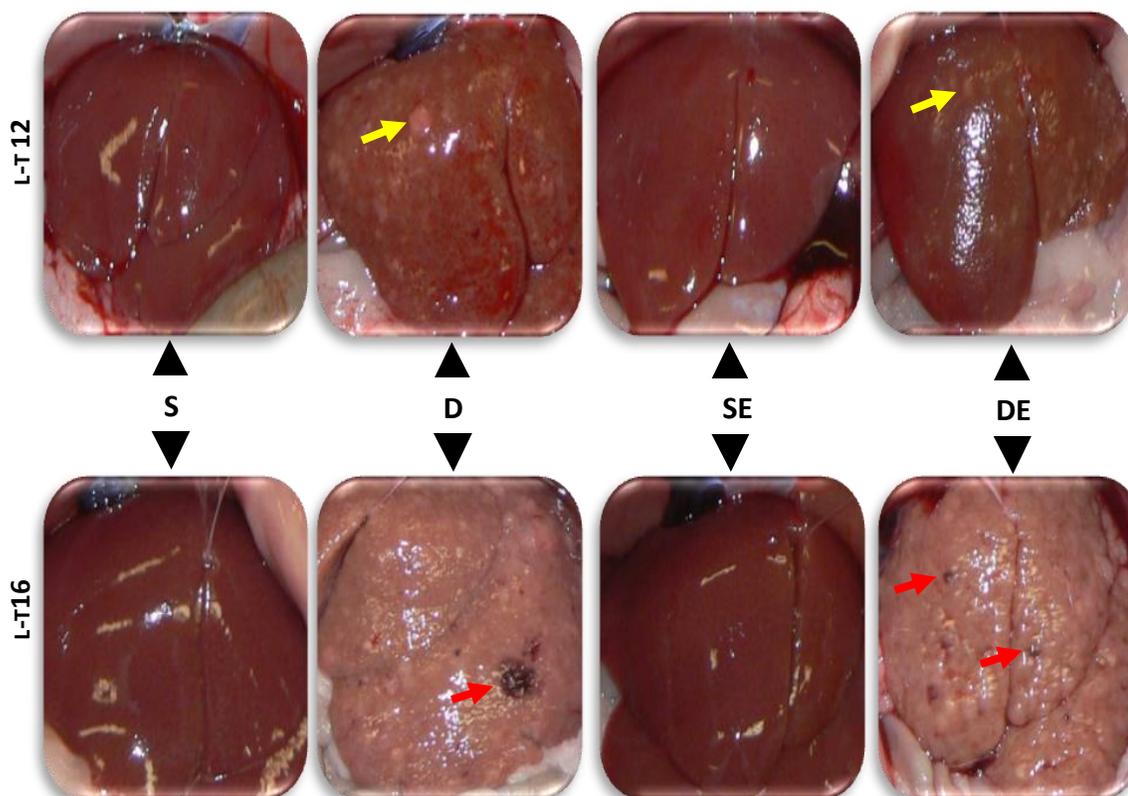


Figura 9. Morfología hepática. Imágenes macroscópicas representativas del hígado en los diferentes grupos. S y SE de ambos lotes mostraron una morfología normal, mientras que en D y DE se observó daño hepático, siendo mayor en el L-T16.

8.1.3 Determinación de daño hepático por pruebas histopatológicas.

El grado de daño hepático fue evaluado por un patólogo del INCMNSZ a través de pruebas histopatológicas especiales en cortes tisulares incluidos en parafina (tinción con hematoxilina/eosina y Masson-Goldner), para inspeccionar la organización y el estado general de las células y visualizar la formación de fibras de colágeno.

El resumen de los datos histopatológicos se encuentra en las tablas 6 y 7. De acuerdo con el diagnóstico del patólogo, el 100% de las ratas controles (S y

SE) mostraron el hígado normal, mientras que en las ratas de los grupos D y DE en ambos lotes, se determinó daño hepático a diferentes etapas desde fibrosis hasta cirrosis más hepatocarcinoma. Solo una rata fue diagnosticada con cirrosis más hepatocarcinoma,

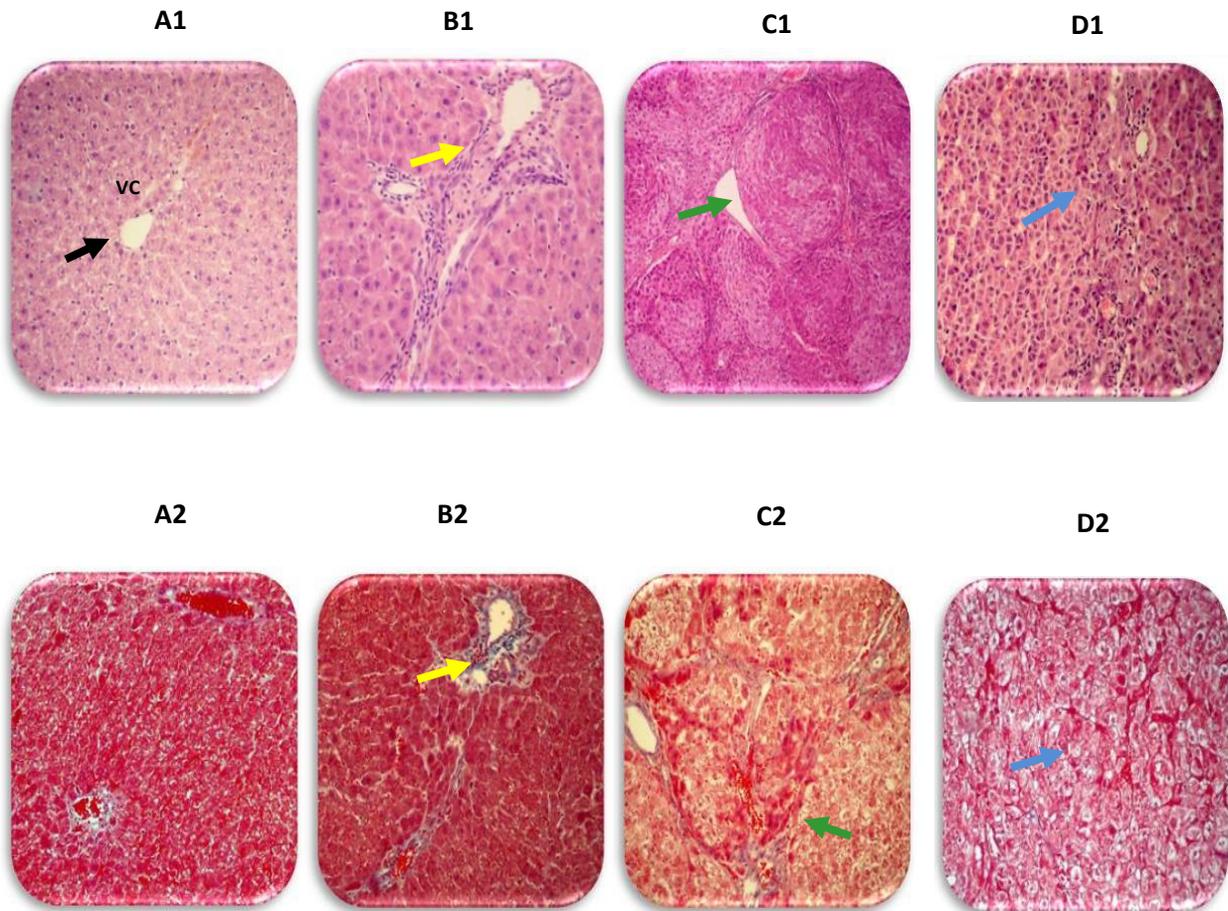


Figura 10. Pruebas histopatológicas. A1 a D1, muestras representativas de las tinciones con hematoxilina/eosina, y A2 a D2, de las tinciones de Masson-Goldner, realizadas en el Departamento de Patología del INCMNSZ. A1 y A2. Muestran la arquitectura hepática normal, B1 y B2. Muestran una condición de fibrosis. Se puede observar como las fibras de colágena se forman alrededor de la vena central extendiéndose a la vena porta del lobulillo como se muestra con las flechas amarillas. C1 y C2. Representa la formación de septos fibrosos que delimitan nódulos de parénquima hepático de tamaño variable, flechas verdes. D1 y D2. Se observa el desorden en la arquitectura hepática y alteraciones en la forma y tamaño de las células, flechas azules.

Tabla 6. Análisis histológico del hígado de ratas L-T12

Grupos	No. de animales	Diagnóstico Patológico	Porcentaje
S	4	Normales	100%
D	4	Cirrosis	100%
SE	4	Normales	100%
DE	3	Cirrosis Fibrosis	67% 33%

Tabla 7. Análisis histológico del hígado de ratas L-T16

Grupos	No. de animales	Diagnóstico Patológico	Porcentaje
S	6	Normales	100%
D	5	Cirrosis Cirrosis + Displasia Cirrosis + HCC	60% 20% 20%*
SE	6	Normales	100%
DE	6	Cirrosis Cirrosis + Displasia	83.3% 16.7%

*Nota: cabe señalar que en solo el 20% de las ratas se generó el HCC aun cuando en el protocolo de Shiffer se demostró alcanzar este nivel de daño.

La administración de DEN en ratas Wistar, sí reprodujo las modificaciones morfológicas e histológicas observadas en la enfermedad hepática humana (Figuras. 9 y 10). Sin embargo, de acuerdo con el diagnóstico histopatológico, el grado de daño hepático esperado a las 12 y 16 semanas de la administración de DEN, no se obtuvo de manera homogénea en todos los animales (Tablas 6 y 7). La variabilidad biológica de cada animal para responder ante el agente dañino, así

como el reagrupar a los animales por similitud de peso para calcular la dosis de la droga, y no dosificar de forma individualizada conforme al peso de cada animal, son factores que pudieron intervenir en la heterogeneidad de los resultados.

8.1.4 Cuantificación de la expresión de los genes a nivel de ARN mensajero

8.1.4.1 Cuantificación e integridad del ARN

La expresión génica de los marcadores moleculares de daño hepático GS, HNF4- α , PC4, y GP46 solo se determinó en el L-T16, debido a que en estudios anteriores no se encontró significancia en el tiempo 12 (Domínguez-Cruz, *et al.*, 2010). La integridad del ARN total tanto de hígado como de músculo, se comprobó a través de electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % antes y después de tratarlo con DNasa I recombinante. La migración del ARN por el gel de agarosa permitió observar a las bandas 28 S con mayor intensidad y definición en comparación con las delineadas bandas 18 S en una relación de 2 a 1 (Figura 11). El rendimiento total promedio de ARN obtenido fue de 15.6 μg en hígado y 11.4 μg en músculo. La pureza encontrada en promedio fue de 1.87 A_{260}/A_{280} .

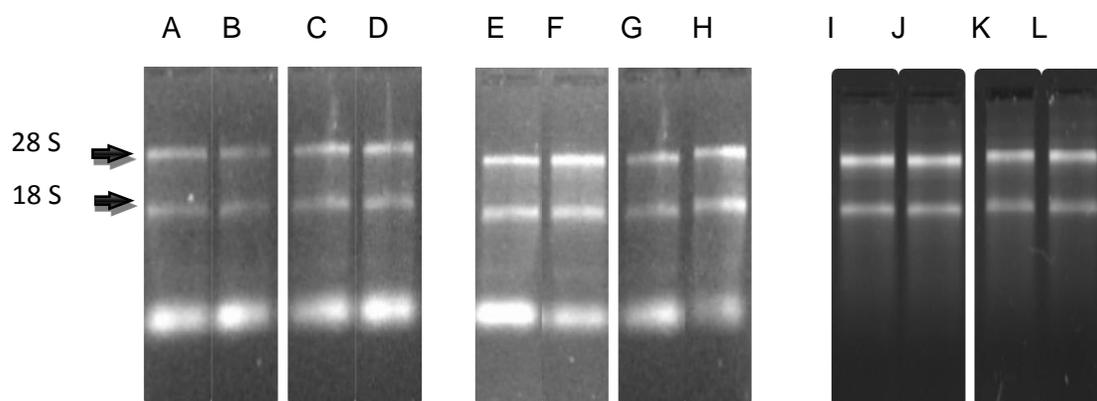
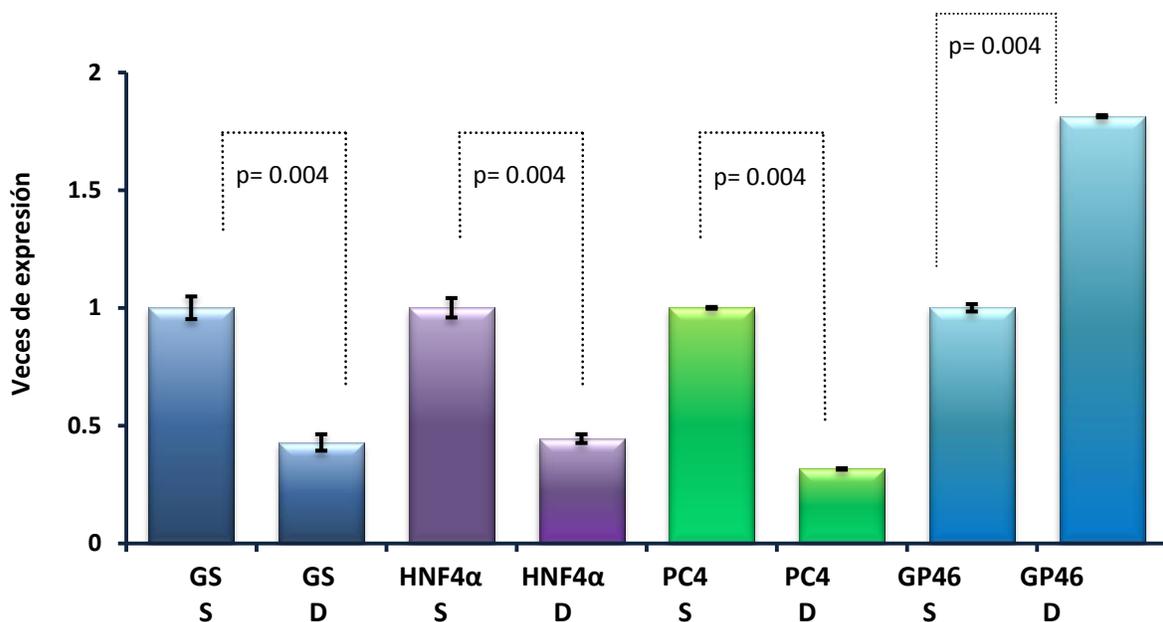


Figura 11. Determinación de la integridad del ARN total por electroforesis en gel de agarosa. Las bandas 28 S y 18 S son ARN ribosomales. En las figuras A-D se presentan los ARN extraídos de hígado y E-L de músculos.

8.1.5 Expresión génica de GS, HNF4- α , PC4 y GP46 en el hígado.

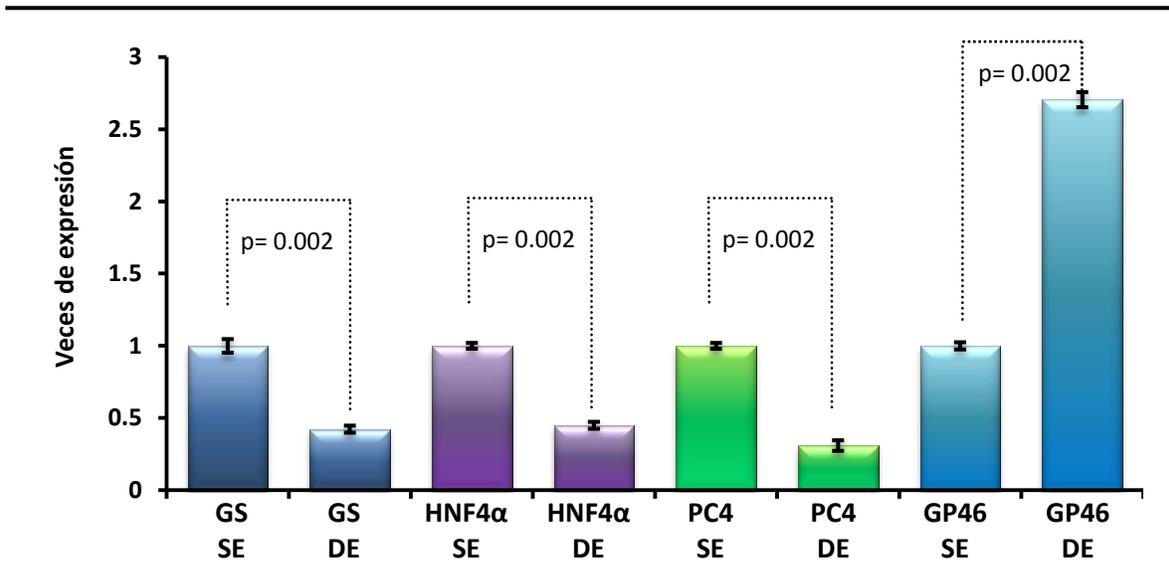
La expresión de los genes GS, HNF4- α y PC4 disminuyó significativamente en las ratas con daño hepático (Gráficas 3 y 4). En cambio, la expresión de la chaperona GP46 aumentó hasta 1.7 veces (Gráfica 4). La medición de estos genes mostró gran sensibilidad para detectar alteraciones moleculares en el hígado, sobre todo en la expresión de la chaperona GP46, la cual, parece ser más susceptible a la modificación de su expresión con la práctica de ejercicio.

Gráfica 3. Marcadores de daño hepático en S/D, L-T16



Gráfica 3. Expresión de marcadores de daño hepático del L-T16. La expresión de los genes se normalizó en relación con el gen constitutivo GAPDH. El ARN mensajero de GS, HNF4- α y PC4 disminuyó significativamente en el grupo D (A, $p=0.004$) mientras que la expresión de GP46 aumentó 0.8 veces. La expresión de GS en hígado de la rata con cirrosis más HCC específicamente fue de 0.3 veces de expresión.

Gráfica 4. Marcadores de daño hepático en SE/DE, L-T16



Gráfica 4. Expresión de marcadores de daño hepático del L-T16. La expresión de los genes se normalizó en relación con el gen constitutivo GAPDH. El ARN mensajero de GS, HNF4- α y PC4 disminuyó significativamente en el grupo DE (B, $p=0.002$), mientras que la expresión de GP46 aumentó a 1.7 veces.

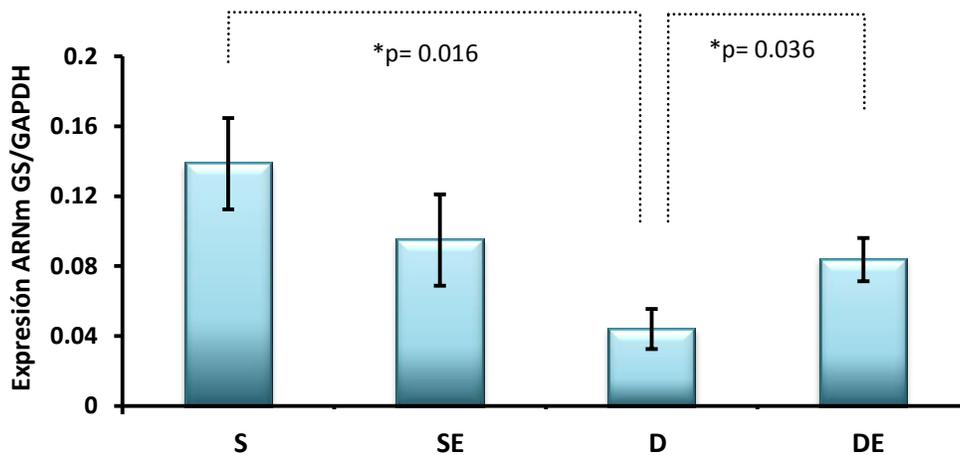
Los resultados obtenidos del análisis de los marcadores moleculares muestran que los niveles de ARNm de GS, PC4, y HNF4- α disminuyeron significativamente 2.3, 3.2 y 2.3 veces, respectivamente, como era esperado. La disminución de la expresión de la GS en el hígado de los animales de esta investigación es un dato relevante, debido a que se ajusta a lo reportado en trabajos anteriores. Así mismo, esta reportado que la chaperona GP46 al sobre-expresarse contribuye fuertemente en el deterioro de la arquitectura hepática, al facilitar la secreción del colágeno y causar la fibrosis (Sato *et al.*, 2008). En este estudio, el aumento de la expresión génica de GP46, sugiere que en estas condiciones el ejercicio pudo actuar como un factor de estrés independiente al DEN. De acuerdo con el análisis histológico todas las ratas fueron diagnosticadas con cirrosis con o sin displasia o hepatocarcinoma. Esto indica que el aumento de

la expresión de la chaperona GP46 contribuye a la formación de septos fibrosos característicos de la cirrosis no así al cáncer.

8.1.6 Expresión génica de la glutamina sintetasa en el músculo de ratas del L-T12.

La expresión del ARN mensajero (ARNm) de GS determinada por PCR en tiempo real en el músculo gastrocnemio de las ratas sanas (S y SE) no mostró ningún cambio significativo por efecto del ejercicio (Gráficas 5 y 6).

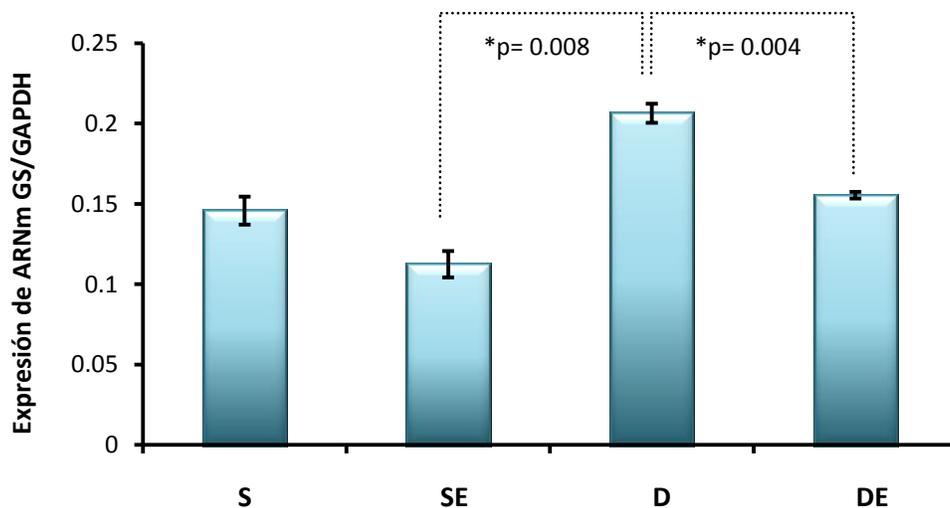
Por otra parte, la expresión de GS en DE fue 2.8 veces mayor en comparación con D, con una $*p= 0.036$, indicando la modificación positiva de la expresión de GS en músculo de ratas con daño hepático por efecto del ejercicio.



Gráfica 5. Expresión génica de GS muscular del L-T12. La expresión del ARNm de GS en músculo fue normalizada con GAPDH como gen de referencia. Entre los grupos S y D también se encontró una diferencia significativa ($p=0.016$).

8.1.7 Expresión génica de la glutamina sintetasa en el músculo de ratas del L-T16

Al cuantificar el ARNm de GS en el músculo de las ratas del L-T16, se observó que en SE vs S el ejercicio disminuyó 0.7 veces la expresión de GS, con una $p= 0.004$ (Gráfica 6). En cambio, al comparar D vs S hubo un aumento en el ARNm de GS de 0.7 veces, con una $p= 0.008$. Los niveles de GS en DE se igualan a los niveles de las ratas sanas sin ejercicio (DE 0.155 ± 0.002 vs S 0.146 ± 0.009); En esta condición, el efecto que provocó el ejercicio no fue tan relevante como en el tiempo 12. En apariencia negativo sobre la expresión de GS en las ratas que recibieron dietilnitrosamina.



Grafica 6. Expresión génica de GS muscular del L-T16. Se muestra gráficamente el promedio por grupos, de la expresión del ARNm de GS en músculo esquelético de las ratas en experimentación. La expresión génica de la GS en la rata con cirrosis más HCC fue en promedio de 0.195 veces de expresión.

La expresión de la GS en el músculo del grupo DE es similar a los valores encontrados en una condición sana (grupos S). La explicación a este fenómeno se podría discernir al reconocer por una parte, que una de las principales

características del estado canceroso es el desgaste muscular y por otra parte, la incapacidad del hígado para metabolizar los sustratos. Cabe resaltar que no se valoró si los animales presentaron anorexia, sin embargo, se sabe que durante el ayuno, las proteínas musculares son degradadas para proveer aminoácidos que se utilizan para la gluconeogénesis y que en largos periodos de inanición, la degradación proteica se encuentra disminuida para conservar el nitrógeno y mantener la masa magra corporal.⁵⁷ Esta capacidad, que es esencial para la conservación del nitrógeno cuando se reduce la ingesta, parece que está ausente en el cáncer, conduciendo a una reducción de las proteínas vitales.

El músculo esquelético, que contiene más de la mitad de toda la proteína corporal, está severamente afectado en la caquexia cancerosa, y se ha demostrado que el desgaste de proteína muscular se halla asociado a tasas aumentadas de recambio.⁵⁷ Probablemente todos estos eventos se suscitaron en los animales de experimentación y pudieron contribuir en los resultados obtenidos.

CONCLUSIONES

Se determinó que la administración del fármaco dietilnitrosamina causó el daño hepático en el modelo animal.

Se determinó el grado de daño hepático en el modelo animal a través de la variación significativa de peso. La ganancia de peso en las ratas de los grupos de estudio (DE y D), fue más significativa en el tiempo 16. Los cambios morfológicos mostraron una evidente alteración en el hígado al observar la presencia de nódulos blanquecinos y nódulos necróticos. El grado de daño hepático en los estudios histopatológicos fue en general para el L-T12 fibrosis y cirrosis, mientras que para el L-T16 fue de Cirrosis más displasia o HCC. La expresión de los marcadores genéticos GS, PC4, y HNF4- α disminuyeron de manera significativa, en cambio la Chaperona específica de colágeno GP46 aumento hasta 1.7 veces en el L-T16.

En el L-T12 la expresión de GS se expresó de manera significativa por el ejercicio. La expresión génica de la GS en el L-T16 se expresa de manera similar a una condición sana.

Con un nivel de significancia del 5 % se comprueba que hay diferencia significativa entre los grupos D y DE al tiempo 12 lo que comprueba la siguiente hipótesis: "El ejercicio físico moderado incrementa la expresión génica de la glutamina sintetasa en el músculo esquelético de ratas con daño hepático inducido por dietilnitrosamina".

SUGERENCIAS

Se sugiere que en futuras investigaciones además de las variables de este estudio se considere individualizar la dosis de dietilnitrosamina y posiblemente aumentar el número de la muestra, para que la reproducción de la enfermedad se obtenga con mayor homogeneidad.

Se sugiere realizar ensayos para diferenciar entre expresión génica a nivel de ARNm y actividad enzimática, considerando la cuantificación de los sustratos glutamato y amonio, y el producto glutamina así como de expresión proteica.

Incluso se podrían realizar curvas de tolerancia a diferentes intensidades de ejercicio de acuerdo al VO_2 max y duración de la rutina.

Se propone determinar la expresión no solo de los marcadores moleculares utilizados en este estudio para la caracterización de la enfermedad, si no la inclusión de la proteína Hsp47 y su correlación con el desarrollo de fibrosis, así como, caracterizar el tipo de colágeno depositado en las ratas tras la rutina de ejercicio para identificar si responde a un proceso patológico o solo es un efecto adaptativo del ejercicio.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Martínez-López, E., García-García, M. R., Campos-Pérez, W. Y., González-Becerra, K. (2013) Genómica nutricional: Conceptos y expectativas. *Endocrinología y Nutrición*. 21(1):22-34
2. Franciscus, A., Highleyman, L. (2012). Introducción sobre hígado y la enfermedad de la hepatitis C. Versión 4. pp: 1-4.
3. Krowdleyk, (2006). Anatomía topográfica del hígado. En: *Gastroenterología*. (ed) Martín, H.F. Elsevier Masson, España. pp: 662-678
4. Rajender-Reddy, K. y Long, B. W. (2006). Hígado. En: *Los Requisitos en Gastroenterología*. Elsevier, España 3:1-15
5. Gal-Iglesias, B., López-Gallardo, M., Martín-Velasco, A. I., Prieto-Montalvo, J. (2007). Hígado. En: Bases de la fisiología 2ª edición. (ed) Gal-Iglesias, B., López-Gallardo, M., Martín-Velasco, A. I., Prieto-Montalvo, J. Tebar, México. pp: 286-287
6. Ganong, W. F. (2004). Circulación a través de regiones especiales. En: *Fisiología Médica*. 19ª edición. (ed) Ganong, W.F. Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V. México D.F. pp: 661-676
7. Senties-Gómez, M. D., Gálvez-Gastélum, F. J., Meza-García, E. y Armendáriz-Borunda, J. (2005). Fibrosis Hepática El papel de las metaloproteinasas y de TGF- β . *Gac Méd Méx*. 141(4):315-322.
8. Cunningham, C. C. y Van Horn, C. G. (2003). Energy availability and alcohol-related liver pathology. *Alcohol Research & Health*. 27(4):281-299.

9. Malhi, H. y Gores, G .J. 2008. Cellular and Molecular Mechanisms of Liver Injury. *Gastroenterol.* **134**:1641-1654.
10. Glasinovic, J.C. Daño hepático crónico. De: <http://escuela.med.puc.cl/paginas/curso/integradodeclínicas/dañohepático/html>. Actualización: 13/06/2009; acceso: 10/07/2016
11. Bataller, R. y Brenner, D. (2005). Liver fibrosis. *The Journal the clinical investigation.* 115: 209-218
12. Torre-Delgadillo, A., (2011). Encefalopatía Hepática. *Revista de gastroenterología de México*, **76**: 1
13. Uribe, M., Morales-Blanhir, J., Rosas-Romero, R., Campos-Cerda, R.,L. Poo, J., (2012). Epidemiología, fisiopatología y diagnóstico de la hipertensión arterial pulmonar (HAP) en el cirrótico. *Gaceta Médica de México.* **148**:153-161
14. Tagle-Arróspide, M. (2007). Complicaciones frecuentes en la cirrosis. *Acta médica peruana.* **24**(1): 4-5
15. Méndez- Sánchez, N., Aguilar-Ramírez, J. R., Reyes, A., Dehesa, M., Juárez, A. (2004). Etiology of liver cirrosis in México. *Ann Hepatol.* **3**: 30-33.
16. Bajaj J.S. (2010). The modern management of hepatic encephalopathy. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics.* **31**: 537–547.
17. Häussinger, D. y Schliess, F. (2008). Pathogenetic mechanisms of hepatic encephalopathy. *Gut.* 57:1156-65
18. Jurado-García, J., Costán-Rodero, G., Calañas-Continente, A., (2012). Importancia de la nutrición en enfermos con encefalopatía hepática. *Nut. Hosp.* **27**(2):372-381

19. Cortés-García, L., (2013). Papel de la nutrición en la encefalopatía hepática: es tiempo de cambiar. *Nutr. clín. diet. hosp.* **33**(2):89-97
20. Felipo, V., Urios, A., Montesinos, E., Molina, I., Garcia-Torres M.L., Civera, M., Olmo, J.A., Ortega, J., Martinez-Valls J., Serra M.A., Cassinello, N., Wassel, A., Jorda, E., Montoliu, C., (2012). Contribution of hyperammonemia and inflammatory factors to cognitive impairment in minimal hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* **27**: 51-58.
21. Felipo V. (2013) Hepatic encephalopathy: effects of liver failure on brain function. *Nat. Rev. Neurosc.* **14**: 851-858.
22. Adeva, M.M., Souto, G., Blanco, N., Donapetry, C., (2012). Ammonium metabolism in humans. *Metabolism Clinical and Experimental.* **61**: 1945-1511.
23. Van-Straaten, W. M., He, Y., Van-Duist, M. M., Labruyere, W. T., Vermeulen, L. M., Dijk, J. V., Ruijter, J. M., Lamers, W. H. y Hakvoort B. M. (2006). Cellular concentrations of glutamine synthetase in murine organs. *Biochem. Cell Biol.* **84**: 215-231
24. Gebhardt, R., Baldysiak-Figiel, A., Krügel, V., Ueberham, E. y Gaunitz, F. (2007). Hepatocellular expression of glutamine synthetase: an indicator of morphogen actions as master regulators of zonation in adult liver. *Progress Histochem. Cytochem.* **41**: 201-66
25. Häberle, J., Görg, B., Rutsch, F., Boris Görg, B., Schmidt, E., Toutain, A., Benoist, J. F., Gelot, J., Suc, A. L., Höhne, W., Schliess, F., Häussinger, D., y Hans, G. Koch, M. D (2005). Congenital glutamine deficiency with glutamine synthetase mutations. *N. Engl. J. Med.* **353**:1926-1933.

26. Krajewski, W. W., Collins, R., Holmberg-Schiavone, L., Jones, T. A., Karlberg, T. and Mowbray, S. L. (2008). Crystal structures of mammalian glutamine synthetases illustrate substrate-induced conformational changes and provide opportunities for drug and herbicide design. *J. Mol. Biol.* **375**: 217-28
27. Onzari Marcia (2014). Fisiología del deporte. En: *Fundamentos de nutrición en el deporte*. 2ª edición. (ed) Onzari, M. Editorial El Ateneo, Grupo ILHSA S.A. Argentina. pp: 10-22.
28. Risco Ortiz, Cristina (1988). Adaptación del músculo esquelético al ejercicio: adaptaciones morfológicas y cambios en proteínas contráctiles. *Apunts. Bioquímica y Biol. Mol.* **25**:105-111.
29. Actin-accumulation myopathy. [Internet]. Unated States: Genetics Home Reference, Lister Hill National Center for Biomedical Communications., c2018 [citado 20 de febrero de 2018]. Pdf [5]. Disponible en: ghr.nlm.nih.gov/condition/actin-accumulation-myopathy#
30. Purdom, T., Kravitz, L., Dokladny K., and Mermier, C. (2018). Understanding the factors that effect maximal fat oxidation. *Journal of the International Society of Sports Nutrition.* **15**:3 (1-10).
31. Taylor, L. y Curthoys, N. P. (2004). Glutamine Metabolism. *BAMBED.* **32**(5): 291-304
32. Lamers, W. H., Youji, H., Hakvoort, M., Eleonore, S., Deutz, P., (2010) Glutamine Synthetase in Muscles Required for Glutamine Production during Fasting and Extrahepatic Ammonia Detoxification. *Journal of Biological Chemistry.* **285** (13): 9516–9524

33. Ruiz-Margáin A, Macías-Rodríguez, R. U., Ríos-Torres, S.L, Román-Calleja, B.M, Méndez-Guerrero, O., Rodríguez-Córdova, P., Torre, A. (2017). Efecto de una dieta rica en proteínas y alta en fibra más la suplementación con aminoácidos de cadena ramificada sobre el estado nutricional de pacientes con cirrosis. *Revista de Gastroenterología de México*. 392:1-7
34. Katzmarzyk, P.T. y Janssen I. (2004). The economic costs associated with physical inactivity and obesity in Canada: an update. *Can J Appl Physiol* **29**: 90–115.
35. Ventura-Clapier, R. (2009). Exercise training energy metabolism and heart failure, *Appl Physiol Nutr Metab*, **34**(3): 336-339
36. Sánchez-Benito, J. L. (2009). Efectos del ejercicio físico y una dieta saludable. *Nutr Clin diet Hosp*. **29**(1): 46-53
37. Pérez-León, M. B., (2007). Fisiología del ejercicio. *inFARMAte*. **11**: 1-8
38. Santos, R.V., Caperuto, E.C., Costa Rosa LF. (2007). Effects of acute exhaustive physical exercise upon glutamine metabolism of lymphocytes from trained rats. *Life Sci* **80**: 573-578.
39. Miyazaki, T., Matsuzaki, Y., Karube, M. (2003). Amino acid ratios in plasma and tissues in a rat model of liver cirrhosis before and after exercise. *Hepato Res*. **27**: 230-237.
40. Tuñon, M. J., Álvarez, M., Culebras, J. M. y González-Gallego, J. Modelos animales de fallo hepático fulminante. *Nutr Hosp*. 2007. **22**(2):199-209
41. Al-Rejaie Salim, S., Aleisa Abdulaziz, M., Al-Yahya Abdulaziz, A., Bakheet Saleh, A., Alsheikh, A., Fatani Amal, G., Al-Shabanah Othman, A., Sayed-

- Ahmed, M. M. (2009). Progression of diethylnitrosamine-induced hepatic carcinogenesis in carnitine-depleted rats. *World J Gastroenterol*; **15**(11): 1373-1380
42. Schiffer, E., Housset, C., Cacheux, W., Wendum, D., Desbois-Mouthon, C., Rey, C., Clergue, F., Poupon, R., Barbu, V., Rosmorduc, O. (2005). Gefitinib, an EGFR inhibitor, prevents hepatocellular carcinoma development in the rat liver with cirrhosis. *Hepatology* **41**: 307-314.
43. Stanulovic, Vesna S., Kyrnizi, Irene., Kruithof-de Julio, Marianna., Hoogenkamp, Maarten., Vermeulen, Jacqueline., Ruijter, Jan M., Talianidis, Iannis., Hakvoort, Theodorus., H. Lamers, Wouter. (2007). Hepatic HNF4_α Deficiency Induces Periportal Expression of Glutamine Synthetase and Other Pericentral Enzymes. *Hepatology* **45**:433-444.
44. González, F. J. (2006). Role of HNF4 α in the superinduction of the IL-1 β -activated iNOS gene by oxidative stress. *Biochem. J.* **394**:379-390
45. Chuan, Y.; Yong, L.; Xin, Z.; Yue-Xiang, C., Xin, Z., Hai-Yan, Y.; Jun-Liang H.; Xing, D.; Jun-Ping, Z.; Ze-Guang; H.; and Wei-Fen, X. (2008) Differentiation Therapy of Hepatocellular Carcinoma in Mice with Recombinant Adenovirus Carrying Hepatocyte Nuclear Factor-4_α Gene. *Hepatology.* **48**(5):1528-1539.
46. Jonker, H. R. A., Wechselberger, R. W., Boelens, R., Kaptein, R. Y Folkers, G. E. 2006. The intrinsically unstructured domain of PC4 modulates the activity of the structured core through inter- and intramolecular interactions. *Biochem.* **45**(15):5067-5081.
47. Dominguez Cruz, S., (2010). Determinación de la expresión de los genes HNF4 α y PC4 durante el desarrollo de daño hepático a través del agente dietilnitrosamina en rata. *Tesis.* pp: 30-50.

48. Taguchi, T. y Razzaque, M. S. (2006). The collagen-specific molecular chaperone HSP47: is there a role in fibrosis?. *Trends Mol Med.* **13**(2):45-53.
49. Carrasco, L.; Sañudo, B.; Martínez, I.C. y De Hoyo, M. (2010). Proteínas de estrés y ejercicio físico. *Revista Internacional de Medicina y Ciencias de la Actividad Física y el Deporte.* **10**: 1-21
50. Sato, Y.; Murase, K.; Kato, J.; Kobune, M.; Sato, T.; Kawano, Y.; Takimoto, R.; Takada, K.; Miyanishi, K.; Matsunaga, T.; Takayama, T.; Niitsu, Y. (2008). Resolution of liver cirrhosis using vitamin A-coupled liposomes to deliver siRNA against a collagen-specific chaperone. *Nat Biotechnol.* **26**(4):431-42
51. Ishiwatari, H.; Sato, Y.; Murase, K.; Kato, J.; Kobune, M.; Sato, T.; Kawano, Y.; Takimoto, R.; Takada, K.; Miyanishi, K.; Matsunaga, T.; Takayama, T.; Niitsu, Y. (2013). Treatment of pancreatic fibrosis with siRNA against a collagen-specific chaperone in vitamin A-coupled liposomes. *Gut.* **62**(9):218-225
52. Morgan, M.Y., Blei, A., Grüngreiff, K., Jalan, R., Kircheis, G., Marchesini, G., Riggio, O., Weissenborn K. (2007). The treatment of hepatic encephalopathy. *Met. Brain. Dis.* **22**: 389-405.
53. Anderson, E.J., Yamazaki, h., Neuffer, D. (2007). Induction of Endogenous Uncoupling Protein 3 Suppresses Mitochondrial Oxidant Emission during Fatty Acid-supported Respiration. *The journal of biological chemistry.* **282**(43). 31257–31266
54. Bustin, S. A., (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay. *Journal of Molecular Endocrinology.* **25**: 169-193

55. Hill, Richard y Wyse, Gordon. (2006). Alteraciones de la digestión y de la absorción en otros marcos de tiempo. En: Fisiología animal. (ed) Hill y Wyse, Editorial Médica Panamericana, España. pp: 138-141.
56. Peng, S., Plank, L. D., McCall, J. L., Gillanders, L. K., McIlroy, K. y Gane, E. J. (2007). Body composition, muscle function, and energy expenditure in patients with liver cirrhosis: a comprehensive study¹⁻³. *J Clin Nutr*, **85**:1257- 66.
57. Argilés, J. M., Busquets, S., López-Soriano, F. y Figueras, M. (2006). Fisiología de la sarcopenia. Similitudes y diferencias con la caquexia neoplásica. *Nutr. Hosp.* **21**(3): 38-45.
58. Invitrogen productos y servicios. Dirección: <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/15596018?CID=Search-Product>. Actualización: 17/04/2009. Acceso: 17/04/2009.
59. Roche Applied Science. Dirección: <http://www.roche-applied-science.com/pack-insert/4716728a.pdf> Actualización: 4/03/2009. Acceso: 20/04/2009.
60. Roche Applied Science. Dirección: <http://www.roche-applied-science.com/pack-insert/4535286a.pdf> Actualización: 25/01/2009. Acceso: 20/04/2009.
61. Roche Applied Science. Universal Probe Library. Dirección: <https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/adc.jsp>. Actualización: 18/06/2009; Acceso: 26/06/2009.
62. Liu, Y., Wang, D-A. (2015). Viral vector-mediated transgenic cell therapy in regenerative medicine: safety of the process. *Expert Opinion on Biological Therapy*. **15**(4):559-67
63. Lyupina, V.Y., Dmitrieva, B. S., Timokhova, V.A., Bjeljelarskaya, N.S., Zatsepina, G. O., Evgen'ev. B. M., Mikhailov, S. V. (2010). An important role of

the heat shock response in infected cells for replication of baculoviruses. *Virology* .**406**: 336–341

64. Rangel, G.A., Raquel De Melo, R., (2017). Gene therapy: advances, challenges and perspectives. *Reviewing Basic Sciences*. **15**(3):369-75
65. Rhormann, G.F., (2013). Baculovirus Molecular Biology [Internet]. Unated States: National Center Biotechnology Information., c2008 [citado 22 de febrero de 2013]. pdf [357]. Disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24479205
66. Odom, D.T., Dowell, R.D., Jacobsen, E.S., Gordon, W., Danford, T.W., MacIsaac, K.D., Rolfe, P.A., Conboy, C.M., Gilford, D.K., Frankel, E. (2007). Tissue-specific transcriptional regulation has diverged significantly between human and mouse. *Nature Genetics*. **39**:730–732
67. Bryson, T.E., Anglin, C.M., Bridges, P.H., Cottle, R.N. (2017). Gene Therapies for Inherited Metabolic Diseases of the Liver. *Yale journal of biology and medicine*. **90**:553-566.
68. Inoue, T., Suzuki, H., Okada, H. (2012). Targeted expression of a pan-caspase inhibitor in tubular epithelium attenuates interstitial inflammation and fibrogenesis in nephritic but not nephrotic mice. *Kidney International*. **82**: 980–989
69. Guide to Baculovirus Expresión Vector Systems (BEVS) and Insect Cell Culture Techniques [Internet]. México: Invitrogene; c2002 [citado 22 de febrero de 2018]. pdf. [30 pantallas]. Disponible en: www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/bevtest.pdf

70. Chen, H.Z., Wu, C. P., Chao, Y. C., Liu, C.Y. (2011). Membrane penetrating peptides greatly enhance baculovirus transduction efficiency into mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 405(2): 297-302
71. Luo, W-Y., Shih, Y-S., Lo, W-H., Chen, H-R., Wang, S-C., Wang, C-H., Chien, C-H., Chian, C-S., Chuang, Y-J., Hu, YC. (2001). Baculovirus vectors for antiangiogenesis-based cancer gene therapy. *Cancer Gene Therapy*. **18**(9):637-45
72. Jordan, K.R., Crawford, F., Kappler, J.W., Slansky, J.E. (2009). Vaccination of mice with baculovirus-infected insect cells expressing antigenic proteins. *Current protocols in immunology*. **2.15**:1-24
73. Chen, C-Y., Lin, C-Y., Chen, G-Y., Hu, Y-C. (2011). Baculovirus as a gene delivery vector: recent understandings of molecular alterations in transduced cells and latest applications. *Biotechnology Advances*. **29**(6):618-31
74. Juárez, D., Vázquez, L. M., Uribe, M., Arias, C.F., Palomares, L.A., Torres, M.A. (2009). Expresión de proteínas para terapia génica por medio de virus asociados con adeno recombinantes. *Congreso nacional de virología: UNAM*
75. Torres, M.A., Vargas, R.Y., Montiel, A G., Muñoz, R.M., Zamorano, A., Pastor, A.R., Palomares, A.R. (2015). Delivery of glutamine synthetase gene by baculovirus vectors: a proof of concept for the treatment of acute hyperammonemia. *Gene Therapy* **22**, 58–64.

12. ANEXOS

Anexo 1. Se muestra el número de sonda de la Librería Universal de Sondas para rata que se utilizará para el gen de glutamina sintetasa y del gen constitutivo o de referencia GAPDH al igual que la secuencia de los mismos.

NM_017073.3: glutamina sintetasa (GLUL) de Rattus norvegicus.

Detalle del análisis

Bases nitrogenadas del ADN, A= Adenida G=Guanina C=Citosina T=Timina

Sonda a utilizar: #58, Cat. No. 04688554001					
Primer	Longitud	Posición	Tm	%GC	Secuencia
Izquierda	20	326 - 345	59	55	agtctgaaggctccaacagc
Derecha	19	368 - 386	59	53	aaggggtctcgaaacatgg

Amplicon (61 nt)

agtctgaaggctccaacagcgcacatgtacctccatcctgtggccatgtttcgagaccctt

NM_003722.1 gliseraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

Bases nitrogenadas del ADN, A= Adenida G=Guanina C=Citosina T=Timina

Sonda a utilizar para GAPDH Cat. No. 55 046 220 001					
Primer	Longitud	Posición	Tm	%GC	Secuencia
Izquierda	22	1546 - 1567	59	41	gtagcagggaggcagacc
Derecha	20	1590 - 1609	59	45	tgaaggagaagatgctgctgt

Amplicon (64 nt)

gtagcagggaggcagaccggaagccggcctcttccccaaccctgtccccttcccaaacaggcctgggacta
ccctgactctaactataggactgcagtttctaagagacagcagcatcttctcctca

Bases nitrogenadas del ADN, A= Adenida G=Guanina C=Citosina T=Timina

Gen	# Sonda	Secuencia izquierda	Secuencia derecha
HNF4 α	68	caagagggtccatggtgttca	ccgagggacgatgtagtcat
PC4	84	ggcatcctccaagcagagta	tgacatatctcatctttccaatctg
GP46	26	cctgcctgagagcgagtg	gtgcaccacagaggacctg

Anexo 2. Alternativa a la sobreexpresión de glutamina sintetasa por medio del ejercicio en el daño hepático, mediante el uso de terapia génica.

Este Proyecto fue apoyado por el Instituto de Ciencia y Tecnología de la Ciudad de México (ICyT-DF).

Colaboración con el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBT-UNAM), Laboratorio de Biomedicina Molecular y Bioprocesos, Cuernavaca, Morelos.

La terapia génica es una estrategia que permite la introducción de genes en las células de un organismo para expresar una o varias proteínas, o secuencias de ADN o ARN, con el propósito de corregir una deficiencia o una enfermedad. Existen diferentes vectores virales, eficaces y eficientes para infectar células blanco (diana) sin ser patógenos al organismo humano, que pueden transportar los genes terapéuticos.^{62,63,64}

Los baculovirus son virus pertenecientes a la familia *Baculoviridae*, portadores de un genoma, ADN de doble cadena, (bácmido) de 80 a 180 kb⁶⁵, covalentemente cerrado, lo que le brinda una estructura circular. Los plásmidos facilitan los procesos de clonación de proteínas terapéuticas al poder insertarse en su cassette por medio de procesos químico-enzimático. Estos virus pueden infectar a insectos del orden Lepidóptera, Himenóptera y Díptera, pero sin una patogenicidad al organismo humano; sin embargo, de llegar a infectar, estos proceden a enquistarse en el hígado.⁶³ Hepatocitos y células renales han sido usadas como células blanco.^{66,67,68} Los baculovirus recombinantes son un sistema de expresión de proteínas y para el tratamiento de diversas enfermedades son un vector de terapia; ofrecen diferentes ventajas, pues el tamaño de su genoma permite insertar casi cualquier gen.⁶⁹ Además, posee alta capacidad de replicación de hasta $>1 \times 10^7$ partículas virales por litro⁶⁹ y también se ha demostrado que son eficaces en la transducción de células de mamífero^{70,71} sin tener efectos citotóxicos,^{71,72} ni poseer un potencial de replicación en líneas celulares de mamífero. El promotor de citomegalovirus (CMV) es el más usado (incluyendo este protocolo) para los casetes de transferencia génica, debido a los altos niveles de expresión de proteínas terapéuticas en células de mamífero.⁷³

De acuerdo con este razonamiento, podemos incrementar la expresión de la enzima GS que cataliza la unión de glutamato y amonio para formar glutamina en el organismo humano, y disminuir los niveles de amonio en la sangre durante los procesos de cirrosis y hepatocarcinoma, y con ello los síntomas de la encefalopatía hepática con sus respectivas consecuencias. Utilizando un vehículo que porte el ADNc de la GS, como el baculovirus, se puede transducir diferentes líneas celulares para ensayos in vitro e in vivo (de acuerdo a la teoría del tráfico inter-organo), y con ello promover la sobre-expresión de la proteína GS y favorecer la remoción del amonio circulante. Es una alternativa en el INCMNSZ, para generar terapias enfocadas a pacientes bajo condiciones en las que el ejercicio físico no se encuentre recomendado por la situación clínica en que se encuentren.

Metodología de la producción de partículas de baculovirus recombinantes para la expresión del gene terapéutico GS in vitro e in vivo.

Se observa la producción del baculovirus recombinante Bac-GS (Figura 12) en el que: el gen de interés (en estecas o GS) se aisló, clonó y amplificó en células *E.Coli* químicamente competentes por medio de un método químico; el material genético fue caracterizado, secuenciado y purificado. Subsecuentemente el gen de GS se subclonó en el vector donador pFastBac para ser transposicionado con el genoma viral; el bácmido recombinante (Figura 13 y 14) se aisló para ser transfectado en células de insecto *Spodoptera Frugiperda* (SF9) para la producción de baculovirus recombinantes portadores del gen terapéutico GS y futuros ensayos para la producción y uso de las partículas virales.

Plásmido pFBCGS-C2.

Plasmid name: pFBCGS-C2

Plasmid size: 7835pb

Construction by:
Dafne Juárez Galicia /
Dr. Miguel Angel Torres Vega.

Construction
date: 3rd/August/2009.

Amp: 589-1446
857 pb

IRT: 3917-4057,
7044-7184
140 pb c/u

Promotor
CMV: 4119-4777
658 pb

Beta-globin
intron: 4785-5277
492 pb

GS: 5339 -6460
1121 pb

Kozac: 5330 -534
4796 pb

hGH pA: 6468 -6954
486 pb

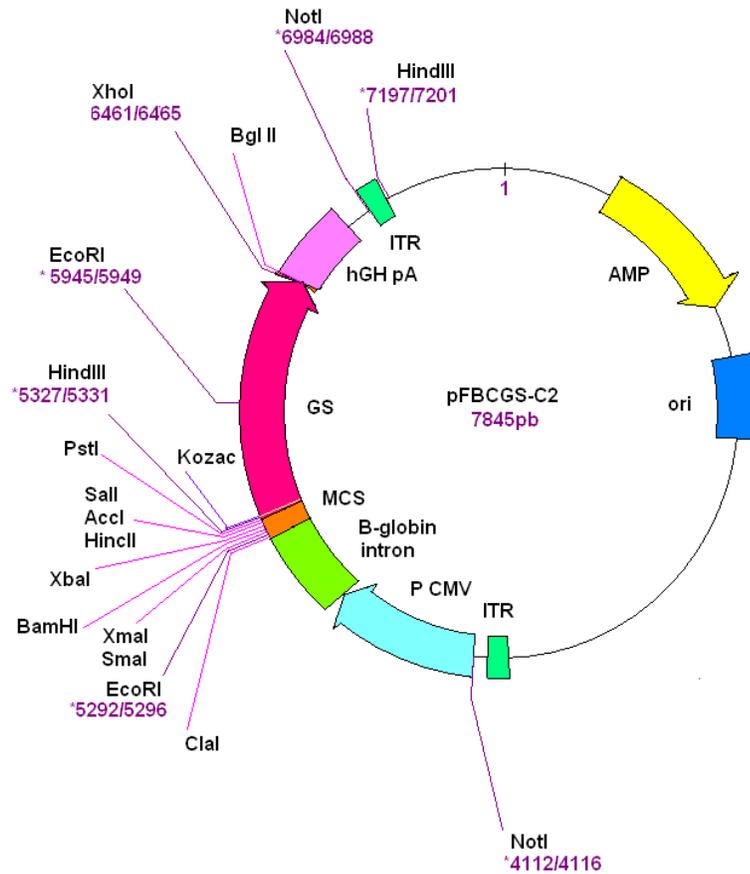


Figura 13. Plásmido pFBCGS-C2. Mapa de la construcción en donde se especifica la posición y el tamaño de cada elemento (leer de derecha a izquierda), así como el tamaño de las secuencias en pares de bases, las enzimas específicas para los diversos sitios de corte y la posición en donde se encuentran. Para fines de los ensayos experimentales se usó la misma construcción, omitiendo la secuencia de la proteína de interés en el caso del control negativo (Bac-control) y sustituyendo GS por EGFP en el caso del control positivo (Bac-EGFP).

Secuencia completa de pFBCGS-C2

gacgcgcacctgtagcggcgacattaagcgcggcggggtggtggttacgcgcagcgtgacccgctacacttgcca
gcgcacctagcgcgcgctcctttcgctttcttcccttcccttctcgcgcacgctcgcgcgctttcccgctcaagc
tctaaatcgggggctccttttaggggttcgatttagtgctttacggcaacctcgacccccaaaaaacttgattag
ggtgatgggtcacgtagtgggcatcgccctgatagacgggtttttcgccctttgacggtggagtcacggttct
ttaatagtggaactcttggtccaaactggaacaacactcaaccctatctcggctctattcttttgattataagg
gattttgccgatttcggcctattggttaaaaaatgagctgatttaacaaaaatthaacgcgaattttaacaaa
atattaacggtttacaatttcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaacccctatttggtttatttttct
aaatacattcaaataatgtatccgctcatgagacaataaacctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaa
gagtatgagtatccaacatttcogtgcgccttattcccttttttcggcattttgccttccctggtttttgct
caccagaaaacgctggtgaaagttaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggttacatcgaactgg
atctcaacagcggtaagatccttgagagttttcgccccgaagaacggtttccaatgatgagcacttttaaagt
tctgctatgtggcgcggtattatcccgctattgacgcgggcaagagcaactcggtcgcgcgatacactattct
cagaatgacttggttgagtactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattat
gcagtgctgccataaccatgagtgataaacactgcccgaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaagga
gctaaccgcttttttgacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaa
gccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgctgtagcaatggcaacaacggttgcgcaaaactattaactg
gcaactacttactctagcttccgggcaacaattaatagactggatggaggcggataaaagtggcaggaccact
tctcgcctcggcccttcgggctgggtttcttctgataaaactcggagcgggtgagcgtgggtctcgcggt
atcattgcagcactggggccagatggtaagcctcccgatcgtagtctacacgacggggagtcaggcaaa
ctatggatgaacgaaatagacagatcgtgagataggtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagacca
agtttactcatatatacttttagattgatttaaaacttcatttttaatttaaaaggatctaggtgaagatcctt
tttgataatctcatgacaaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaaga
tcaaaggatcttcttgagatcctttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctacc
agcgggtgggtttggttgccggatcaagagctaccaactctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcag
ataccaataactgtccttctagtgtagccgtagtttagggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacat
acctcgtctgctaatcctgttaccagtggtgctgctgccagtgggcgataagtctgtcttaccgggttggactc
aagacgatagttaccggataaaggcgcagcggctcgggctgaacgggggggttcgtgcacacagcccagcttggag
cgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagcattgagaaaagcgcacgcttcccgaggggagaa
aggcggacaggtatccggtaagcggcagggctcggaaacaggagagcgcacaggggagcttccagggggaaacgc
ctggtatctttatagtcctgtcgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcaggg
gggaggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggcctttttacgggttccctggccttttgccttttgcct
acatgttcttctcgtgcttatccctgatctctgtggataaacgctattaccgcctttgagtgagctgataccgc
tcgcgcgagccgaacgaccgagcgcagcagtgctgagcggaggaagcgggaagagcgcctgatgcggatatttt
ctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcagaccagccgcgtaacctggcaaaaatcgggttacgggttgag
taataaatggatgcccctgcgtaagcgggtgtgggcccgaacaataaagtcttaaaactgaacaaaatagatctaaa
ctatgacaataaagtcttaaaactagacagaatagttgtaaaactgaaatcagtcagttatgctgtaaaaaagc
atactggacttttgttatggctaaagcaaaccttctattttctgaagtgcataattgcccctgataaaagag
gggctggccaagggtatggtaagactatattcgcggcgttgtgacaatttaccgaacaactccgcggccgg
gaagcggatctcggctgaaacgaattgttaggtggcggtaacttgggtcgatataaaagtgcatacacttctcc
cgtatgcccactttgtatagagagccactcggggatcgtcaccgtaatctgcttgacgtagatcacataag
caccaagcgcgttggcctcatgcttgaggagattgatgagcgcgggtggcaatgcccctgcctccgggtgctcgc
ggagactgcgagatcatagatatagatctcactacgcggctgctcaaacctgggcagaacgtaagccgcgaga
gocccaacaaccgcttcttggctogaaggcagcaagcgcgatgaatgtcttactacggagcaagttcccgagggt
aatcggagtcggctgatgttgggagtaggtggctacgtctccgaactcacgaccgaaaagatcaagagcagc
ccgatggatttgacttggctcagggccgagcctacatgtgcgaatgatgccataacttgagccacctaacctt
gttttagggcgactgcccctgctgogtaacatcgttgcgtgctgcgtaacatcgttgcgtgctccataacatcaaa
catcgacccacggcgtaacgcgcttgcgtgcttggatgcccagggcatagactgtacaaaaaacagtcataac
aagccatgaaaaccgcccactgcgcggttaccaccgctgcgttcgggtcaagggttctggaccagttgcgtgagcg
catacgtacttgcattacagtttacgaaccgaacaggcttatgtcaactgggttcgtgccttcatccggttc
cacgggtgctgcctcaccggcaaccttgggcagcagcgaagtgcagggcatttctgtcctggctggcgaacgagc
gcaagggtttcggctccacgcgatcgtcaggcattggcggccttgcgtgttcttctacggcaagggtgctgtgcac
ggatctgcccctggcttcaggagatcggaaagacctcggccgtcgcggcgcttgcgggtgggtgctgaccccggat
gaagtgggttcgcatcctcgggtttctggaaggcagcagcagcttgggttcgcccaggactctagctatagttcta
gtgggtggctacattattgaagcattttatcaggggttattgtctcagacctgcaggcag **CTGCGCGCTCGCTCG**
CTCACTGAGGCCGCCGGGCAAGCCCCGGGCGTCCGGCGACCTTTGGTCCGCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAG

CGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCTTGTAGTTAATGATTAAACCCGCCATGCTACTT
ATCTACGTAGCCATGCTctagagcGGCCGCACGCGTCTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTTCATTAGT
TCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAAATTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGAC
CCCCGCCCATTTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAAT
GGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTAT
TGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGG
CAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGAT
AGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTTGTTTTGGCACCAAAA
TCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATTTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGG
GAGGCTATATAAGCAGAGCTCGTTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACC
TCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGATTCGAATCCCGGCCGGGAACGGTGCATTGGAACGC
GGATTTCCCGTGCCAAGAGTGACGTAAGTACCGCCTATAGAGTCTATAGGCCACAAAAAATGCTTTCTTCTT
TTAATATACTTTTTTTGTTTTATCTTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTCTTTTCAGGGCAATAATGATACA
ATGTATCATGCCTCTTTGCACCATTCTAAAGAATAACAGTGATAATTTCTGGGTTAAGGCAATAGCAATATTT
CTGCATATAAATATTTCTGCATATAAATTGTAAGTGTATGTAAGAGGTTTTCATATTGCTAATAGCAGCTACAAT
CCAGCTACCATTCTGCTTTTTATTTTATGGTTGGGATAAGGCTGGATTATTCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTT
GCTAATCATGTTTCATACCTCTTATCTTCCCTCCACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTCTGTGTGCTGGCCAT
CACTTTGGCAAAGAATTGGGATTTCGAACATCGATTGAATTTCCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGAAAG
CTTGCCACCATGGCCACCTCAGCAAGTTCCCACTTGAACAAAGGCATCAAGCAGATGTACATGAACCTGCCCC
AGGGCGAGAAGATCCAACCTCATGTATATCTGGGTTGATGGTACCGGGGAAGGGCTACGCTGCAAGACCCGTAC
TCTGGACTGTGACCCCAAGTGTGTAGAAGAGTTACCCGAGTGGAACTTTGATGGTTCTAGTACGTTTCAGTCT
GAAGGCTCCAACAGCGACATGTACCTCCATCCTGTGGCCATGTTTTGAGACCCCTTCCGCAGAGACCCCAACA
AGCTGGTGTCTGCGAAGTATTCAAGTATAACCGGAAGCCCGCAGAGACCAACCTGAGGCACAGCTGTAAGCG
TATAATGGACATGGTGAGCAGCCAGCACCCCTGGTTTTGGAATGGAACAGGAGTATACTCTCATGGGAACAGAC
GGCCACCCTTTCCGGCTGGCCTTCTAATGGCTTCCCTGGACCCCAAGGACCCTATTACTGCGGTGTGGGAGCTG
ACAAGGCTTATGGCCGAGATATCGTGGAGGCTCACTACCGGCCTGCTTGTATGCTGGAATCAAGATCACAGG
GACAAATCCCGAGGTTATGCCTGCCAGTGGGAATTCAGATAGGACCCTGCGAAGGATCCGCAATGGGCAAG
CATCTCTGGGTAGCCCGTTTTATCTTGCATCGGGTATGCGAAGACTTTGGGGTGATAGCAACCTTTGACCCCA
AGCCCATTCAGGGAACCTGGAATGGGGCAGGCTGCCACACCAACTTTAGCACCAAGGCCATGCGGGAGGAGAA
TGGTCTGAGGTGCATTGAGGAGGCCATTGATAAACTGAGCAAGAGGCACCAGTACCACATCCGTGCCTACGAC
CCCAAGGGGGCCTGGACAACGCCCGCCGTCTGACTGGATTCCACGAAACCTCCAACATCAACGACTTTTTCCG
CTGGCGTTGCCAACCGCAGCGCCAGTATCCGCATTCCCGGATTGTGCGCCAGGAGAAGAAGGGTTACTTTGA
AGACCGTCCGCCCTTCTGCCAATTGCGACCCCTATGCGGTGACGGAAGCCATCGTCCGCACGTGTCTCCTCAAC
GAAACTGGCGACGAGCCCTTCCAATACAAGAACTAACTTCGAGAGATCTACGGGTGGCATCCCTGTGACCCCTC
CCCAGTGCCTCTCCTGGCCCTGGAAGTTGCCACTCCAGTGCCACCAGCCTTGTCTAATAAAAATTAAGTTGC
ATCATTTTTGTCTGACTAGGTGTCTTCTATAAATATTATGGGGTGGAGGGGGTGGTATGGAGCAAGGGCAAG
TTGGGAAGACAACCTGTAGGGCCTGCGGGTCTATTGGGAACCAAGCTGGAGTGCAGTGGCACAATCTTGCT
CACTGCAATCTCCGCTCCTGGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTTGTTGGGATTCCAGGCA
TGCATGACCAGGCTCAGCTAATTTTTGTTTTTTTTGGTAGAGACGGGGTTTTACCATATTGGCCAGGCTGGTCT
CCAACCTCCTAATCTCAGGTGATCTACCCACCTTGGCCTCCCAAATTGCTGGGATTACAGGCGTGAACCACTGC
TCCCTTCCCTGTCTTCTGATTTTTGTAGGTAACCACGTGCGGACCGA **GCggccgctctagaGCATGGCTACGT**
AGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACTACAAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTG
CGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGACCAAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCTCAG
TGAGCGAGCGAGCGCGCAGctgacctgcaggcatgcaagctgtaagcttgtcgagaagtactagaggatcataa
tcagccataaccacatthgtagaggthttacttgccttaaaaaacctcccacacctccccctgaacctgaaaca
taaaatgaatgcaattgthgtgtaacttgtttattgagcttataatggttacaataaagcaatagcatc
acaaatthcacaataaagcattthtttactgcatcttagttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatctt
atcatgtctggatctgatcactgatatcgcttaggagatccgaaccagataagtgaaatctagttccaaacta
ttttgtcattthtaattthtcgtattagcttacgacgctacaccagttcccatctattthtgcactcttccct
aaataatccttaaaaactccattthccacctcccagttcccactattthtgcgccccagcggggcattt
ttcttctgtatgthtttaatacaacatcctgccaactccatgtgacaaacgctcatcttccgctactthtt
ctctgtcacagaatgaaaatthttctgtcatctcttctgttattaatgthttgtaattgactgaatatcaacgct
tatttgcagcctgaatggcgaatg

Caracterización de los b́acmidos. Para identificar el ADNc de la protéina GS clonada en los b́acmidos recombinantes se realizó PCR de las colonias DH10Bac positivas.

En un inicio, los oligos utilizados reconocieron espećicamente el sitio de transposici3n 5' del ADN del b́acmido y el flanco 3' del gen de inter3s. De las colonias PCR positivas, se purific3 el ADN y se realiz3 un segundo an3lisis por PCR para verificar la integridad del gen GS y/o de la construcci3n de b́acmido control (Figs. B y C). Con el ADN de los b́acmidos seleccionados se realiz3 la transfecci3n de las c3lulas de insecto Sf9 (Figura 14). Los detalles de las reacciones realizadas para la Figura 14 se observan en las tablas 8 , 9 y 10.

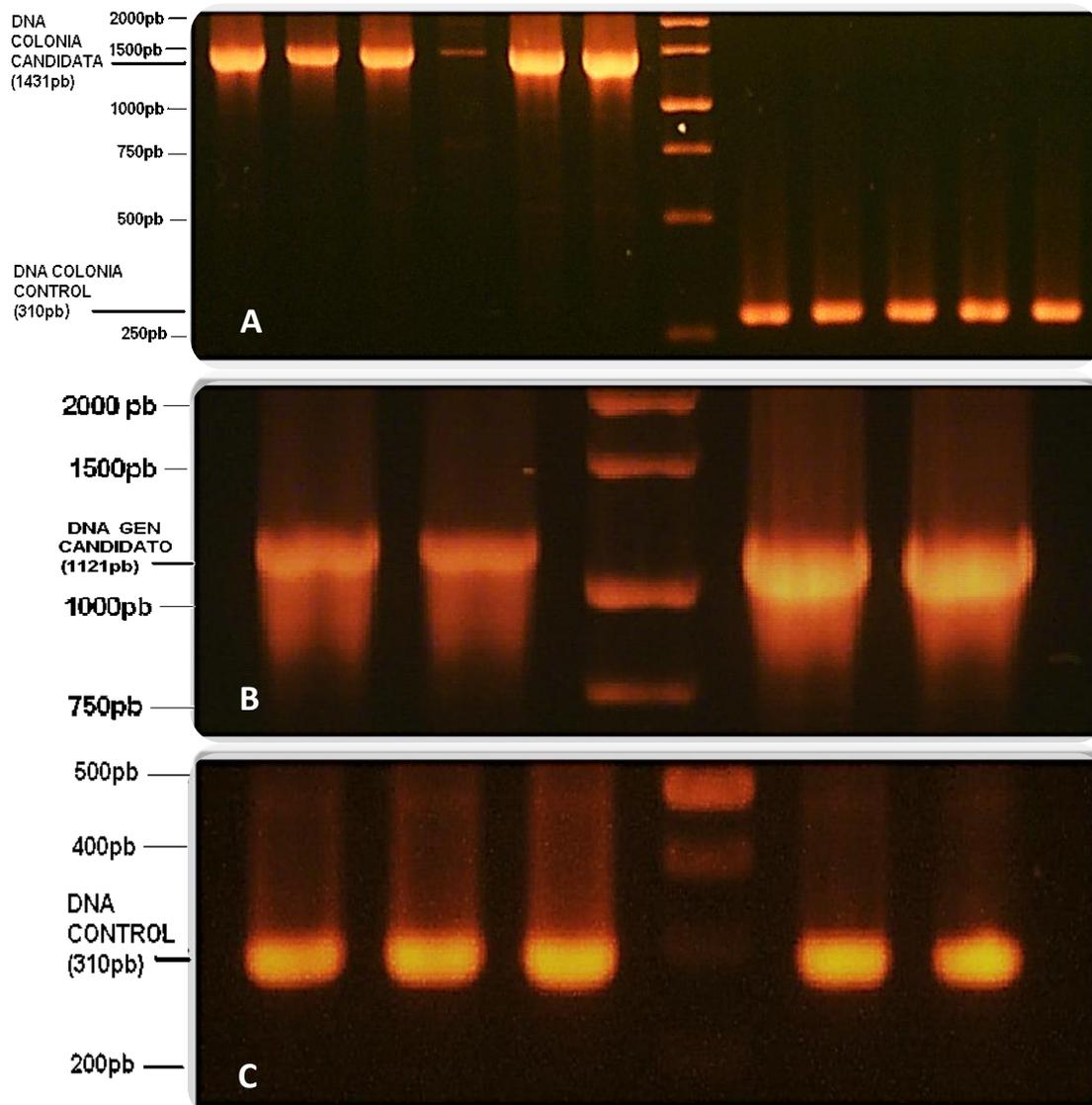


Figura 14. Obtención de los b́acmidos recombinantes. **A.** Se observan los productos de la amplificaci3n de las colonias DH10Bac recombinantes portadoras del gen de la prote3na de inter3s (1431pb) a la izquierda del marcador de ADN, y a la derecha ampl3meros de colonias de una construcci3n control, esto es, que excluye el gen de inter3s (310pb). En el ADN purificado de las colonias DH10Bac PCR positivas se amplific3 el gen de GS completo con oligos espec3ficos para los extremos 5' y 3' del mismo (1121pb) **B)**, y un fragmento de la construcci3n control (310pb) con oligos 5' del sitio de transposici3n y 3' del inserto **C).**

Adaptado de: Ju3rez, D., et al. 2009.

Tabla 8. Caracterización de los bácmidos: Reacciones para PCR. Para PCR con combinación de oligos se ajustó el volumen a 10.0 μL por reacción, usando el volumen y la concentración de oligos específico para cada uno y promediando las TM.

<p>A) <i>Oligo pCMV 1084</i> Secuencia de 20 pb (5' - >3')</p> <p>ATTCTGAGTCCAAGCTAGGC</p> <p><i>Oligo pCMV 1358</i> Secuencia de 20 pb (5' - >3')</p> <p>TAGAAGGACACCTAGTCAGA</p>	
<p>B) <i>Oligo XhoIGS</i> Secuencia de 31 pb (5' - >3')</p> <p>GGTGCTCGAGTTAGTTCTTGTATTGGAAGGG</p> <p><i>Oligo HindIII GS</i> Secuencia de 30 pb (5' - >3')</p> <p>AAAAAGCCACCATGGCCACCTCAGCT</p>	
ADN (plasmídico 1.0ng/ μL o picar colonia, según sea el caso respectivo)	0.5 μL
Enzima Pfu turbo (2.5u/ μL)	0.5 μL
Buffer Pfu (10X, NEB®)	2.5 μL
Oligos (100ng/ μL)	0.5 μL
dNTP´s (10mM,NEB®)	0.5 μL
dH ₂ O	20.0 μL
Volumen final	25.0 μL

Tabla 9. Caracterización de los bácmidos: Programa para PCR para caracterización (termociclador con gradiente de temperatura Palm®). Gel de agarosa 1% TBE, 100V/30minutos: 1µL de Buffer de carga (Fermentas 6X®) y 5µL de ADN por muestra, y, 1µL de Buffer de carga (Fermentas 6X®) y 4 µL del marcador Ladder 1Kb o 5Kb según sea el caso.

Desnaturalización inicial	94°C/3 minutos.	1 ciclo.
Desnaturalización. Alineación. Extensión.	94°C/45 segundos. 57°C/30 segundos. 72°C/3minutos.	30 ciclos.
Extensión final.	72°C/7 minutos.	1 ciclo.
Enfriamiento.	4°C/3 minutos.	1 ciclo.

Tabla 10. Caracterización de los bácmidos: Programa para PCR para caracterización (termociclador con gradiente de temperatura Palm®). Gel de agarosa 1% TBE, 100V/30minutos: 1µL de Buffer de carga (Fermentas 6X®) y 5µL de ADN por muestra, y, 1µL de Buffer de carga (Fermentas 6X®) y 4 µL del marcador Ladder 1Kb o 5Kb según sea el caso (se ajustó según el volumen de la reacción).

Desnaturalización inicial	94°C/3 minutos.	1 ciclo.
Desnaturalización. Alineación. Extensión.	94°C/45 segundos. 65°C/30 segundos. 72°C/3-4minutos.	30 ciclos.
Extensión final.	72°C/7 minutos.	1 ciclo.
Enfriamiento.	4°C/3 minutos.	1 ciclo.

Producción de Baculovirus recombinantes (transfección).

Para la producción de baculovirus recombinantes se transfectaron células Sf9 con un 98.09% de viabilidad (Figura 15), que fueron sembradas en C6 (cajas de seis pozos), a una densidad de 1,000,000 células/mL de medio SF900II GIBCO® aforando a 2mL por pozo; se incubaron por 1hr a 26°C (para fijación). Simultáneamente se preparó medio de cultivo 1mL con 750ng de DNA del báculo recombinante y 20µL de celfectina®; pasada la incubación se sustituyó el medio de cultivo por el mix descrito anteriormente, dejándose en agitación por 4hrs para posteriormente agregar 1ml de medio de cultivo, 1% de suero fetal (20 µl) y 20 µl de antibiótico para células Sf9. Las partículas virales se cosecharon en el sobrenadante a las 96hrs de incubación a 26°C. Se generaron stocks (tubos corning) y se almacenaron a 4°C, protegiéndolos de la luz (los baculovirus son fotolábiles).

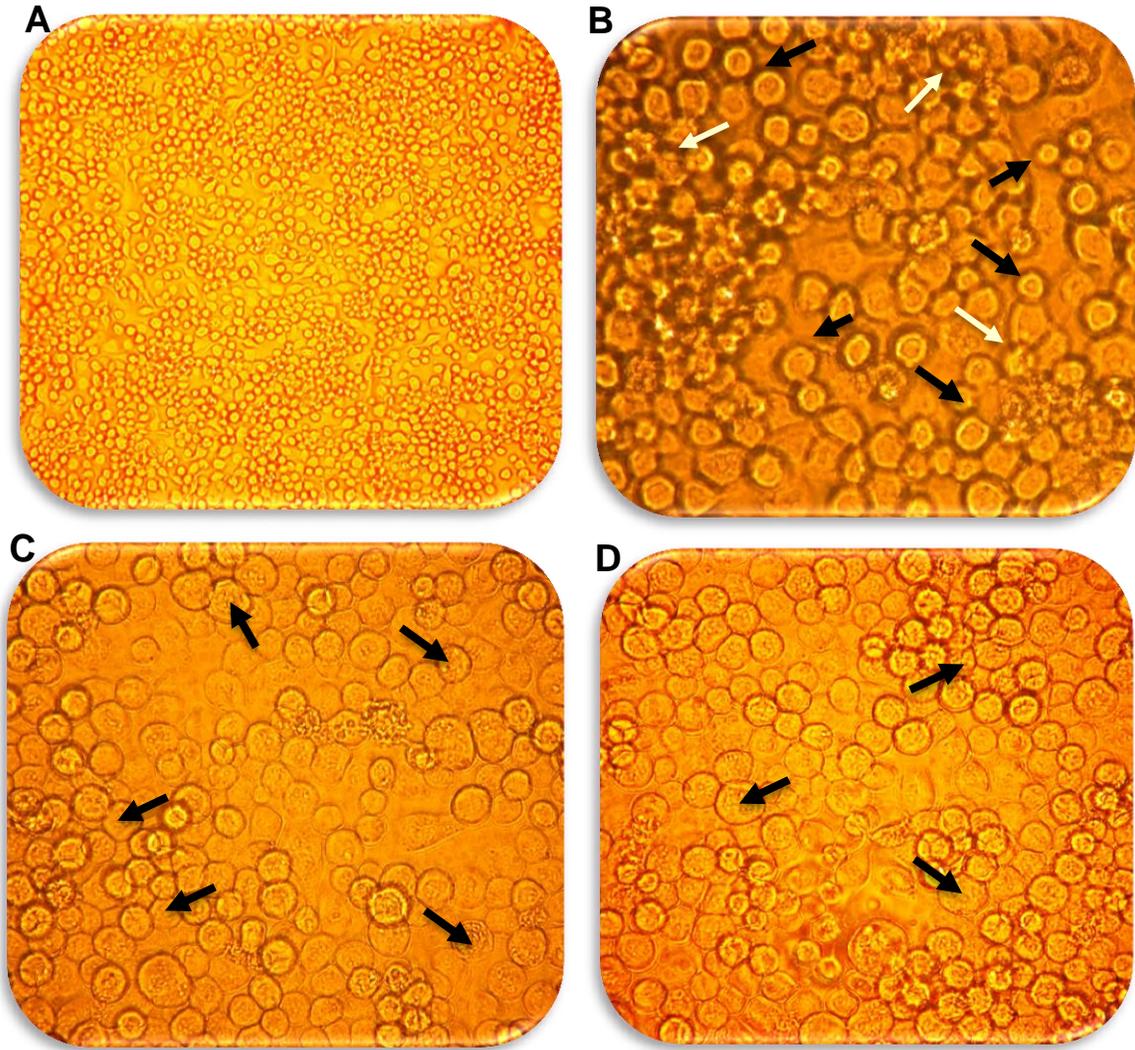


Figura 15. Transfección. Células Sf9 a las 24 horas post-transfección. **A.** Células de insecto sin transfectar, de aspecto homogéneo. **B.** Células transfectadas con el ADN del báculo recombinante control, en el que se observan algunas células normales de estructura redondeada y homogénea (flechas oscuras), y células con aspecto rugoso (flechas claras). **C** y **D.** Células transfectadas con el báculo recombinante portador del ADNc de GS en el que se observa el efecto citopático.

Caracterización del baculovirus por medio de PCR.

Posterior a la cosecha para la conformación de los stocks virales, se obtuvo la segunda generación del baculovirus portador de GS, por lo que se procedió nuevamente a infectar a las células Sf9. Usando el protocolo Isolation of ADN from Baculovirus, protocol#7 EASY-ADN-KIT from genomic ADN isolation, INVITROGENE® se extrajo el material genético de las muestras (cuatro, dos de la primera y dos de la segunda generación). Se procedió a realizar el PCR (Figura 16) usando los oligos externos a GS (pCMV 1048 y pCMV 1358), se cargaron 2 µl del ADN respectivo, corriendo un gel de agarosa al 1%. Los detalles de las reacciones realizadas para la Figura 16 se observan en las tablas 11 y 12.

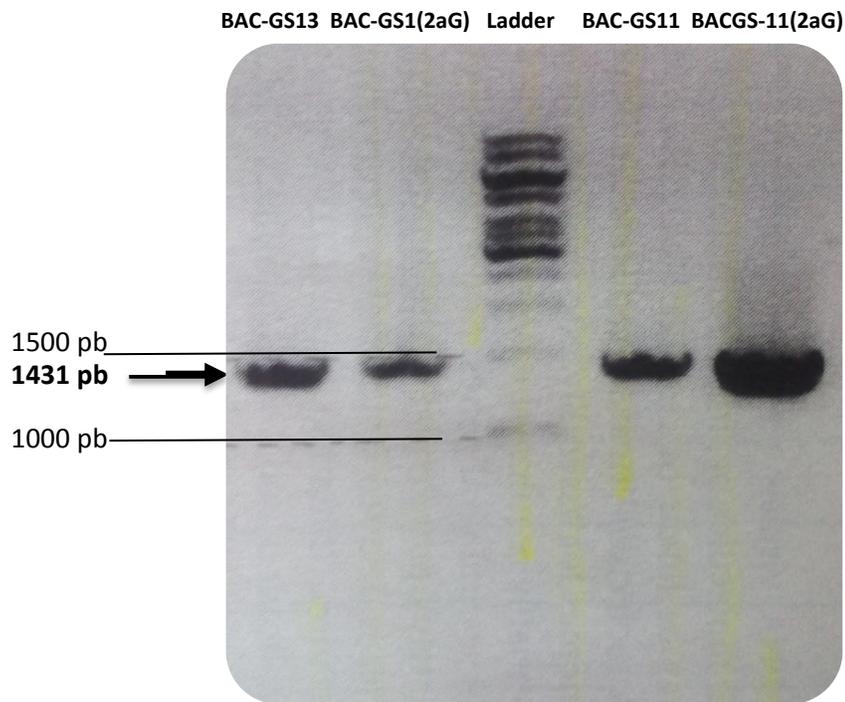


Figura 16. Caracterización del baculovirus por medio de PCR. Se obtuvo el peso esperado de 1431pb para las cuatro muestras. Se observa en los carriles de izquierda a derecha baculovirus BAC-GS13, BAC-GS13 (2aG), Ladder 1Kb (Fermentas®), baculovirus BAC-GS11 BACGS-11(2aG). En el caso de la muestra BAC-GS13 (2a G), se observó una gran cantidad de material, congruente con la medición en nanodrop del ADN, por lo que se eligió esta misma muestra para la amplificación y titulación del virus.

Tabla 11. Caracterización del baculovirus: Reacción para PCR.

ADN (respectivamente 2.2, 1.1, 1.9 y 52.2 ng/ μ L)	2.0 μ L
Enzima Taq Polimerasa (BioLabs 5.000u/mL)	0.1 μ L
Buffer Taq Pol (10X, Termopol, Biolabs®)	1.0 μ L
Oligos externos pCMV1084 (100.0 ng/ μ L) pCMV1358 (100.0 ng/ μ L)	0.5 μ L 0.5 μ L
dNTP's 10 mM (100 mM, Fermentas®)	0.5 μ L
H ₂ O	5.4 μ L
Volumen final	10 μ L

Tabla 12. Caracterización del baculovirus: Programa para PCR para caracterización (Palm®). Gel de agarosa 1% TBE, 100V/30minutos: 1 μ L de Buffer de carga (Fermentas 6X®) y 5 μ L de ADN por muestra, y, 1 μ L de Buffer de carga (Fermentas 6X®) y 4 μ L del marcador Ladder 1Kb ([Fermentas®).

Desnaturalización inicial	94°C/4 minutos.	1 ciclo.
Desnaturalización.	94°C/45 segundos.	30 ciclos.
Alineación.	57°C/30 segundos.	
Extensión.	72°C/2 minutos.	
Extensión final.	72°C/7 minutos.	1 ciclo.
Enfriamiento.	4°C/3 minutos.	1 ciclo.

Título viral.

Se amplificaron los virus seleccionados tomando 300 μ L el stock correspondiente y mezclando con 50mL de medio de un cultivo conteniendo 1.5 millones de células Sf9/ml; se dejaron crecer por 96hrs alcanzando un 94.9% de viabilidad para los virus portadores de GS y 94.4% para el control. Una vez

amplificados los baculovirus se generaron los nuevos stocks, se corrió un PCR bajo las condiciones anteriores, purificando el ADN viral usando el kit QIAquick PCR Purification de QIAGEN® y se almacenaron bajo las condiciones anteriores. Posteriormente se procedió a la titulación (que permitiera el desarrollo posterior de ensayos para caracterización y uso de los baculovirus portadores de GS y control), que consiste en la cuantificación de las partículas virales (Figura 17).

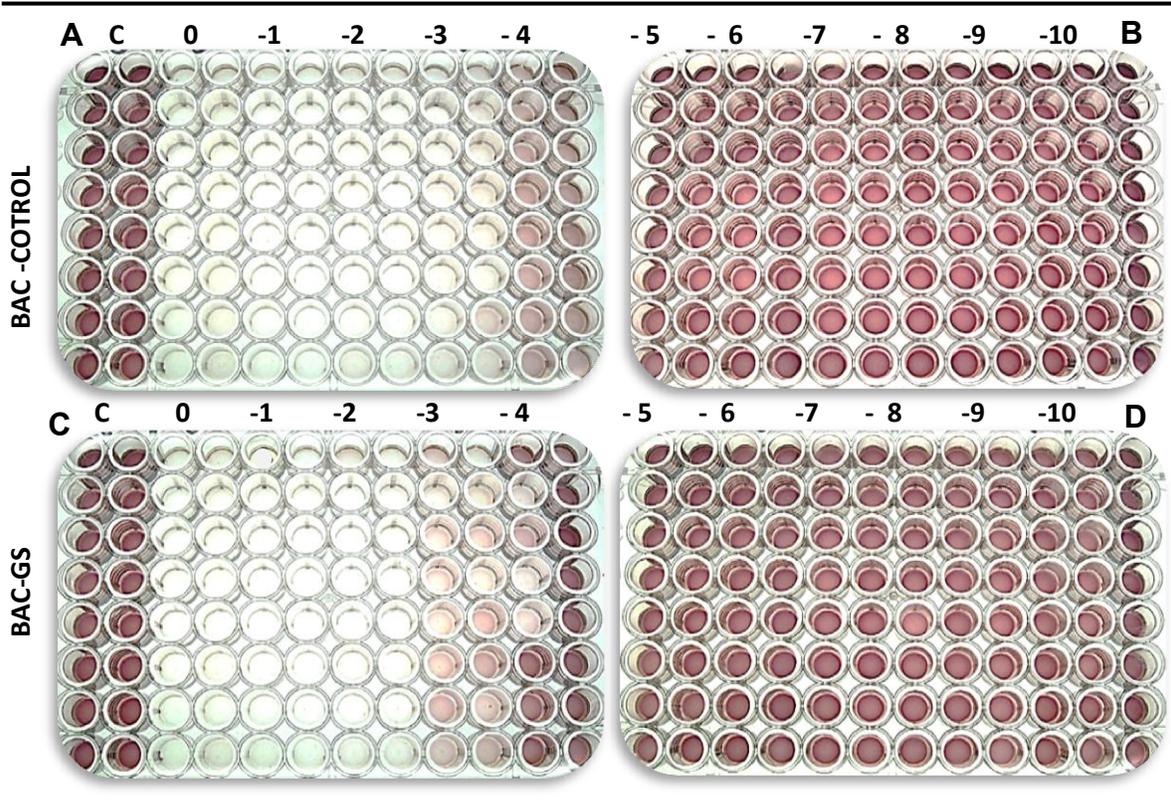


Figura 17. Título viral. Se sembraron 150,000 células Sf9/ml con una viabilidad de 97%. Y se colocaron 900µl de medio de cultivo y 100µL del stock de baculovirus BAC-GS y BAC-CONTROL y también 500µl del baculovirus respectivo para ser el control (C). Se realizaron diluciones seriadas 1:10 desde cero, donde no hay presencia de baculovirus hasta llegar a -10, en C se observa el control. **A.** La replicación celular no se observa de los pozos -1 a -3, a partir del pozo -4 hay replicación. **C)** no hay crecimiento en -1 y -2, a partir de -3 hay crecimiento, **B y D)** Del pozo -5 en adelante el crecimiento es similar. Usando el programa Sigma Plot®, se obtuvieron títulos virales, para BAC-GS de 6.8×10^6 , BAC-CONTROL (sin GS) de 2.7×10^7 , y para BAC EGFP de 3.7×10^7 .

Ensayo *in vitro* de expresión de GS en células de mamífero (infección de células MA104 mediada por baculovirus recombinantes).

Una vez cosechados los baculovirus recombinantes se procedió a ensayos de infección y caracterización. Se infectaron células MA104 (de epitelio de riñón de mono) con una viabilidad del 95% y una confluencia del 70%, a una multiplicidad de 10pfu/ml de cada baculovirus; se usó medio de cultivo DMEM (Figura 18).

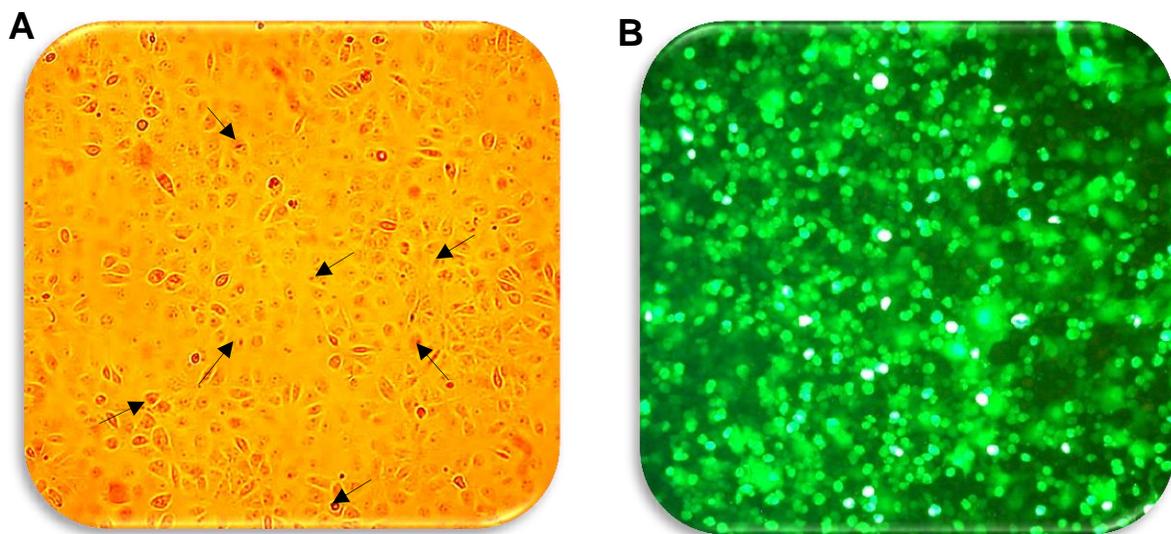


Figura 18. Infección de células MA104 mediada por baculovirus recombinantes. Como control positivo para BAC-GS se construyó de manera alterna un baculovirus control positivo, que contiene todos los elementos de expresión del cassette, excepto el gene de GS, que fue sustituido por el gene de GFP, denominado baculovirus EGFP Rep52 (proporcionado por Dra. Lili Gallo, IBT UNAM). Alrededor de las 36 hrs. post-infección se observaron las células infectadas con este baculovirus para contabilizar fluorescencia. **A.** Células MA104 infectadas con BAC-EGFP, se observa el efecto citopático y la forma característica de las células. **B.** al usar filtro verde, se observa la presencia de la fluorescencia expresada por el gene de EGFP en el 100% de las células. Dicha proteína es de efecto irrelevante, lo que evita el efecto patológico a mamíferos, pudiendo usarse su gene como un control directo anclándolo posteriormente al cassette en BAC-GS para identificar de manera directa la expresión del gene GS.

PCR para identificar la expresión de GS a nivel de ARNm mediada por el baculovirus BAC-GS.

Se llevó a cabo la extracción de ARNm viral 1 mL/tubo o fracción a trabajar, a un número $>1 \times 10^7$ células /mL infectadas con BAC-GS a una multiplicidad de 6.8×10^6 pfu/mL (RNeasy Minkit (so) cat No. 74104, QUIAGENE®) y posteriormente se realizó la síntesis de ADNc (Mix RT, Quik Protocol-1 Revert Aid HMinus First Strand cDNA Synthesis Kit. Fermentas®). Para realizar el PCR de células MA104 infectadas con el baculovirus BAC-GS (Figura 18) se digirió previamente el ADNc (2.5 μ L) usando las enzimas de restricción XhoI_{GS} y HindIII_{GS}, y el análisis se hizo corriendo un gel de agarosa al 1%, 100V/30 minutos. Los detalles de las reacciones realizadas para la Figura 19 se observan en las tablas 13 y 14.

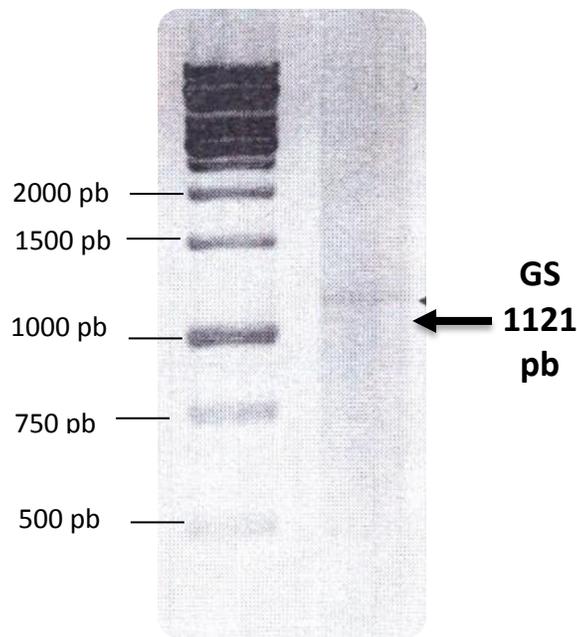


Figura 19. PCR para identificar la expresión de GS a nivel de ARNm mediada por el baculovirus BAC-GS. De izquierda a derecha se observa el marcador Ladder 1Kb (Fermentas®) y el ADN amplificado, observando que existe expresión de GS a nivel de ARNm. Se decide confirmar la expresión del gene terapéutico por medio de PCR debido a la sensibilidad de la prueba. Para identificar la expresión de la proteína, se realizó un ensayo de inmunodetección.

Tabla 13. PCR 10uL por muestra para identificar la expresión de GS a nivel de ARNm mediada por el baculovirus BAC-GS.

ADNc (RT)	2.5µL
Enzima Taq Polimerasa	0.25µL
Buffer (10X, Termopol, NEB®)	1.0µL
Oligos externos	
XhoIGS	0.5µL
HindIIIGS	0.5µL
dNTP's	0.5µL
H ₂ O	4.75µL
Volumen final	10µL

Tabla 14. PCR para identificar la expresión de GS a nivel de mRNA mediada por el baculovirus BAC-GS: Programa para PCR para caracterización (Palm®). Gel de agarosa 1% TBE, 100V/30minutos: 1µL de Buffer de carga (Fermentas 6X®) y 5µL de DNA por muestra, y, 1µL de Buffer de carga (Fermentas 6X®) y 4 µL del marcador Ladder 1Kb.

Desnaturalización inicial	94°C/4 minutos.	1 ciclo.
Desnaturalización.	94°C/30 segundos.	
Alineación.	65°C/30 segundos.	30 ciclos.
Extensión.	72°C/1minuto,10segundos.	
Extensión final.	72°C/5 minutos.	1 ciclo.
Enfriamiento.	4°C/3 minutos.	1 ciclo.

Ensayo de infección con baculovirus recombinante a células de mamífero para Westrn Blot (WB).

Se tomaron frascos F75 con MA104 a un 100% de confluencia (criterios de crecimiento y lisis de Susana Gonzales IBT UNAM), que se infectaron con BAC

GS a una multiplicidad de 15.5 ufp/mL, y luego se procedió a lisar y recuperar tres fracciones (F1, sobrenadante, F2 lisado y F3 pellet), en placa Elisa se determina la concentración de proteína a una absorbancia de 570 nm cuantificando por colorimetría usando el método de Bradford (por triplicado) y se montó un ensayo de inmunodetección para GS mediante WB de transferencia húmeda (Figura 20). Se tiñó con azul de Coomacie para ser transferido a membrana (el sobrenadante se recupera y almacena en refrigeración).

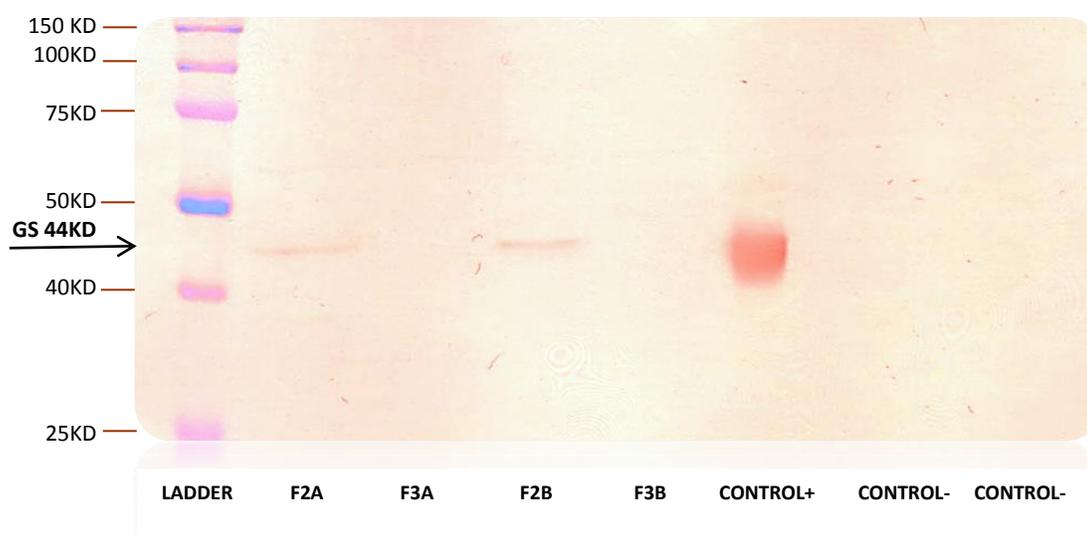


Figura 20. Ensayo de inmunodetección para GS. Transferencia de proteínas a membrana donde se observan proteínas desnaturalizadas de MA104 infectadas con Baculovirus para expresar la proteína de interés. Se observa de izquierda a derecha: Ladder; fracción de lisado celular (F2A y 2B) se observa la expresión de la proteína de interés a nivel citoplasmático; fracción de pellet (F3A y B); control+, lisado de cerebro expresando GS en ensayo de ELISA (Torres, M.A., Resultados sin publicar 2009); y control- células MA104 sin infectar. La membrana fue tratada con un anticuerpo primario específico a la proteína de interés y con un anticuerpo secundario (goat anti- rabbit IgG HRP 1:1500), dicha proteína con un peso de 44kD se observa al revelar la membrana con una solución de TMB; fracción de sobrenadante (F2A y B) la GS se encuentra expresada en el citoplasma, lo cual se refleja en las células lisadas. Cada muestra está realizada con duplicado y se usaron 10µg de proteína total.

Ensayo de infección con baculovirus recombinante a células de mamífero para PCRTR de baculovirus recombinantes.

Estas partículas fueron ensayadas para determinar la expresión mediada del gene terapéutico en células MA104. Para ello, se llevó a cabo un ensayo de PCR en tiempo real (Figura 21), en donde se cuantificó una expresión 7 veces mayor del RNA mensajero de GS en las células infectadas con BAC-GS, en comparación con las células infectadas con un virus control (BAC-CONTROL).

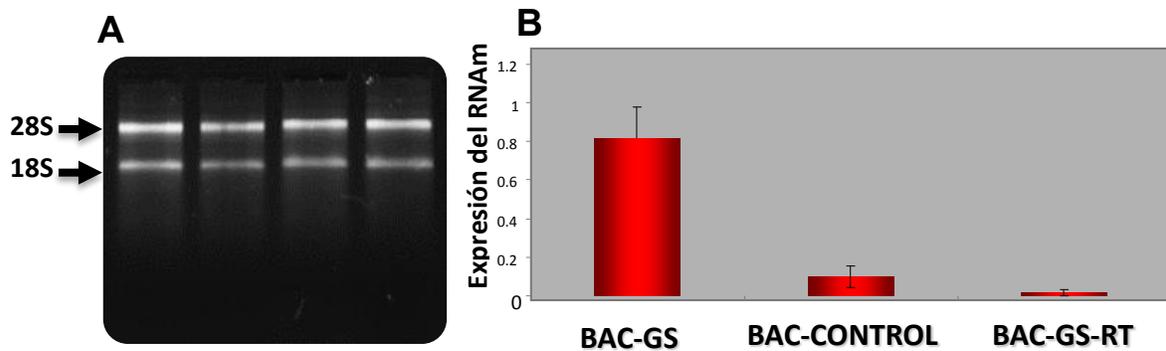


Figura 21. PCR-TR de células de mamífero infectadas con baculovirus recombinante. El análisis de la expresión se llevó a cabo por medio de PCR-TR (Lizbeth Mirian Vázquez Carcaño, INNSZ). Para ello, primero **A**. Se aisló el ARN total de las células infectadas (cuatro muestras). **B**. PCR en tiempo real. Se observa la integridad de los ARN ribosomales. En BAC-GS-RT se omitió a la transcriptasa reversa (RT) de la síntesis de ADNc. Se muestran los promedios y las SD de tres experimentos independientes por duplicado.

Adaptado de: *Torres, M.A, et al (2015)*.

Esquema del cassette de expresión con el gene terapéutico de GS y su caracterización.

Los stocks virales generados en este estudio se almacenaron de manera adecuada; sin embargo, para ser empleados en otros protocolos de investigación

deben ser nuevamente caracterizados, esto permite identificar la integridad del gen terapéutico (Figura 22).

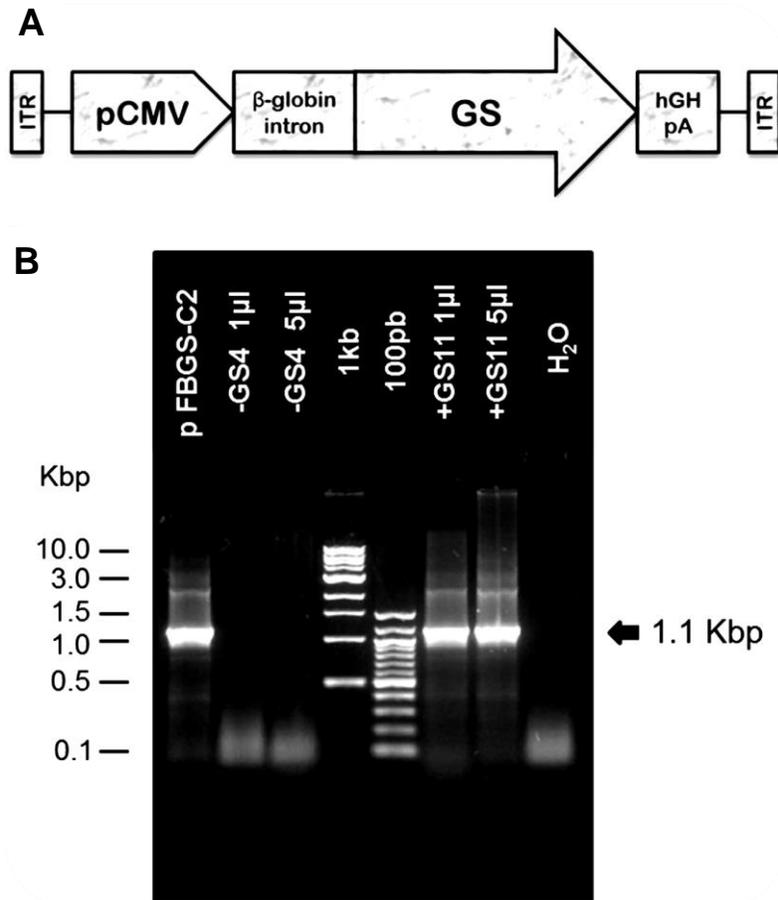
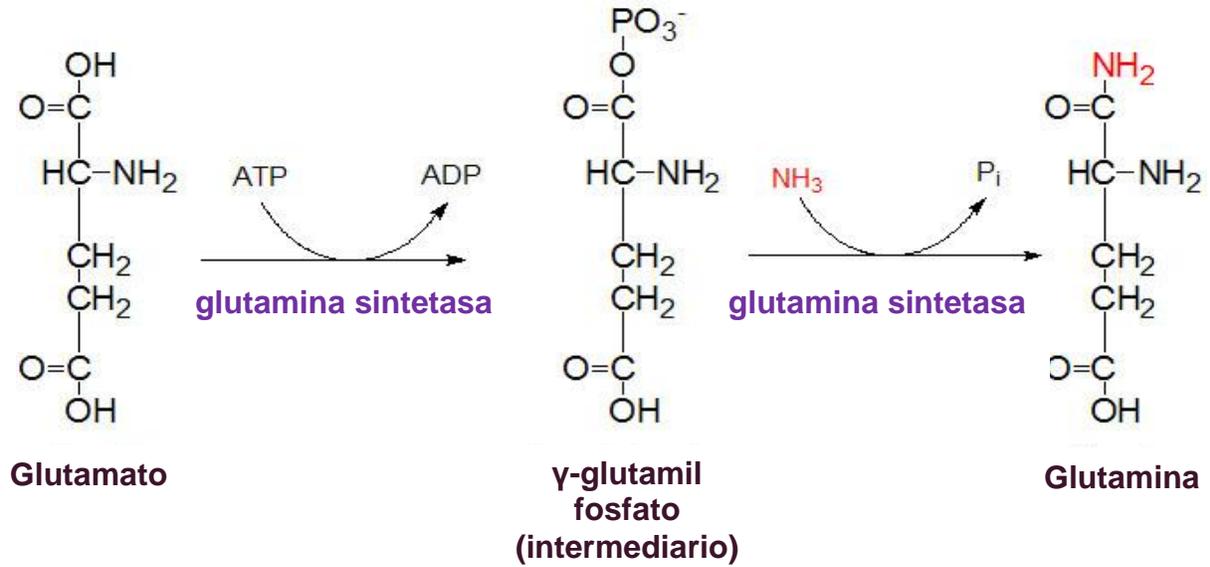


Figura 22. Caracterización de stocks virales para otras investigaciones. A. Cassette de expresión de GS de PFBCGS-C2. **B.** Caracterización de los stocks de baculovirus portando el gene terapéutico GS por PCR. Uno o 5µL del ADN genómico purificado del stock de BAC-GS (+GS11) se utilizó como un templado para PCR con oligos específicos para GS. Se obtuvieron fragmentos de ADN de 1.1Kbp correspondientes al tamaño esperado del ADNc de GS (líneas 6 y 7). Una banda con el mismo tamaño se amplificó de pFBGS-C2 (lineal), pero no del ADN de BAC-CONTROL (-GS4, líneas 2 y 3), ni de agua (línea 8).

Adaptado de: Torres, M.A, et al (2015).

Anexo 3. Reacción de la glutamina sintetasa



14. GLOSARIO

Ácido desoxirribonucleico (ADN):

Es una molécula lineal de gran longitud con estructura tridimensional (doble hélice), constituida por una secuencia de bases que portan la información genética en dos cadenas nucleotídicas con orientación anti paralela y opuesta que hibridan entre sí debido a la unión no covalente por puentes de hidrógeno, específico entre las bases (nucleótidos adenina, timina, guanina y citosina). Conforman el código genético cuya secuencia nucleotídica codifica para una proteína.

Ácido ribonucleico (ARN):

Macromolécula lineal de longitud variable, constituida generalmente por una sola hebra o cadena de nucleótidos (adenina, timina, guanina y uracilo) unidos por enlaces covalentes y fosfodiéster (una sola hélice). Funge como templado para dar lugar a copias o hebras y a partir del apareamiento o alineación de dos da lugar al ADN. Participa activamente en la síntesis de proteínas.

Ácido ribonucleico interferente pequeño (ARNip o siRNA por sus siglas en inglés):

ARN bicatenario de longitud de 20 a 25 nucleótidos, altamente específico para la secuencia de nucleótidos de ARNm diana, interfiriendo por ello con la expresión del gene respectivo.

Ácido ribonucleico mensajero (ARNm):

ARN de tamaño variado que es sintetizado en el núcleo, son moléculas lineales de cadena sencilla; lleva la información necesaria para la síntesis de una o algunas proteínas particulares al ribosoma. Posee una vida media corta.

Ácido ribonucleico ribosomal (ARNr):

Es el componente mayoritario de los ribosomas, ya que constituye hasta el sesenta y cinco por ciento de estos aproximadamente. Se ubica dentro de los ribosomas, y se reconocen varias clases por su coeficiente de sedimentación, mismo que es distinto entre procariontes y eucariontes.

Ácido ribonucleico recombinante (ADN recombinante):

En ingeniería genética es un polímero de nucleótidos, producto de la combinación de fracciones de material genético, por un lado, el procedente de una célula y por otro una fracción o secuencia o genes completos insertados para su expresión.

ADN polimerasa:

Enzima que cataliza uniones fosfodiéster entre di nucleótidos trifosfatados (dNTP's) generando replicación.

Cadena complementaria de ácido desoxirribonucleico o Ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc):

Copia de una molécula de ARNm, sintetizada a partir de manera enzimática o por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se suele utilizar para la amplificación de genes y clonación.

Clona:

Producto de la reproducción asexual sin intercambio de material genético, donde se conserva la herencia genética del organismo progenitor por lo que se consideran organismos genéticamente idénticos. La clonación molecular es una manipulación dirigida del material genético por recombinación *in-vitro* y su multiplicación o propagación se realiza dentro de células hospederas donde se sintetizan copias de información genética que pueden ser una secuencia o genes completos; su introducción en las células que serán portadoras de la información de interés puede realizarse por medio de métodos enzimáticos o físicos.

Confluencia:

En un cultivo celular se relaciona con el ciclo de crecimiento del cultivo sobre la superficie en que se cultiva y se reporta en porcentaje, es decir, en términos sencillos, del total de la placa, caja o pozo de cultivo, al ritmo de crecimiento de la línea celular, cuánto se ha cubierto o cuanto se han agrupado.

Expresión génica:

Es el proceso por medio del cual se transforma la información codificada por los ácidos nucleicos en las proteínas necesarias para el desarrollo, funcionamiento y reproducción de los organismos. Depende de diferentes señales de regulación.

Gen (gene):

Unidad de la herencia. Secuencia lineal de ADN que codifica para una proteína o para un ARN ribosomal o de transferencia maduros. Especifica el orden de los residuos de aminoácidos en la proteína para la que codifica. De acuerdo al “dogma central” el paso de la información de ADN hasta la proteína se lleva a cabo en dos etapas fundamentales, la transcripción y la traducción.

Knock-out:

Referente al bloqueo genético o inactivación génica. Es una Técnica de ingeniería genética que consiste en suprimir la expresión de un gen específico en un organismo sustituyendo el gen original por una versión modificada del mismo para generar una versión no funcional, que será incapaz de dar lugar a la proteína para la que codificaba el gen original, consiguiendo. Los organismos vivos genéticamente modificados que no expresan el gen diana en un tejido específico o en su organismo completo, se denominan organismos knock-out y son de relevancia para la investigación, pues pueden servir como control en diferentes investigaciones.

Oligos u oligonucleótidos:

Secuencias genéticas pequeñas de bases definidas, son moléculas cortas de ADN o ARN que sirven como iniciadores de la síntesis de material genético, son complementarios a las regiones opuestas de la secuencia de interés e hibridan en las regiones que flanquean la misma secuencia. Son templados para la síntesis de proteínas, pero también poseen otras funciones como la construcción de genes, su uso en la PCR, la hibridación de ácidos nucleicos, la construcción de y edición de ADN, rastreo de genes, secuenciación de ADN, entre otras.

Plásmido:

Molécula circular de ADN o anillo de ADN circular covalentemente cerrado. Son vectores o vehículos para transportar, amplificar, aislar, secuenciar y manipular ADN por medio de ingeniería genética, por lo tanto, es un vector para la expresión génica.

Proteína recombinante:

Macromolécula producto de la traducción de una molécula de ADN recombinante.

Proteína verde fluorescente o Green fluorescent protein (GFP):

Proteína no patógena de carácter irrelevante, de gran importancia en la biología molecular ya que funge como una de varias proteínas reporteras. Al ser insertada en una secuencia de interés y expresarse, se puede observar bajo un microscopio con filtro verde, y dando cuenta de su ubicación en ensayos *in-vitro* e *in-vivo* ubica junto con ella el resto de la secuencia de interés.

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-RT):

Técnica de ingeniería genética utilizada para determinar la expresión de un gene a nivel de mensajero cuantificando los cambios en tiempo real a partir de un templado por medio del que se amplifica la información que se observa a través de ciclos con crecimiento exponencial, siendo proporcional a la reacción inicial u original para distinguir cambios en la reacción. La amplificación se realiza de manera específica debido a los oligos que se adhieren a la cadena gracias a la acción de la enzima polimerasa.

Reacción en cadena de la polimerasa punto final (PCR):

Técnica de ingeniería genética utilizada para amplificar un gene o secuencia a partir de un templado y la acción de la reacción de la enzima polimerasa. A partir del templado se obtiene un producto.

Temperatura de fusión (TM):

Es una medición cuantitativa de las variaciones en las secuencias nucleotídicas que dependen de la energía y estabilidad nucleotídica. Esta energía para la hibridación decae según la estabilidad de los “vecinos próximos”. Son variaciones alélicas. La TM de un oligo depende de factores como la longitud que posee, secuencia, contenido de guanina +citocina (G+C), y el tipo y concentración de los cationes presentes, particularmente el ion Na+.

Traducción:

Proceso subsecuente a la transcripción, da lugar a la síntesis de proteínas de acuerdo a la información génica y su conversión de acuerdo al “código genético”.

Transcripción:

Proceso por el cual la información de un gen codificado en el ADN de doble cadena (cadena codificadora) se transfiere para formar una molécula de ARN de cadena sencilla.

Transducción:

Transferencia de genes mediante ingeniería genética, en donde el material genético de una bacteria es llevado hasta otra por medio de un bacteriófago. Este infecta a una célula y al entrar en el ciclo lítico algunos fagos se encapsidan ADN cromosomal de una bacteria en lugar de solamente ADN viral. Cuando estas partículas infectan una bacteria nueva, introducen el ADN mixto en la bacteria huésped y la recombinación puede llevarse a cabo mediante regiones similares u homólogas de DNA.

Transfección:

Transferencia o introducción de información genética externa hacia el interior de una célula eucariota por métodos químicos y físicos.

Transformación:

Paso del material genético recombinado (ADN) *in-vitro* a través de las membranas de las células huésped y su incorporación en la célula como un elemento estable. Transferencia genética de un organismo a otro donde el ADN transferido se recombina con el del material genético del que lo recibe. En este caso, los fragmentos de ADN liberados al medio por una célula rota son tomados por una célula viva. Existen algunos organismos naturalmente competentes para realizarlo, pero la ingeniería genética puede transformar células para hacerlas competentes mediante inducción química, física o eléctrica.

Transposición:

Arreglo del material genético mediante eventos del desarrollo evolutivo en el lapso de vida de un organismo, teniendo como fuente de cambio elementos transponibles o elementos de inserción. Estas secuencias pueden moverse de una localidad de un cromosoma e insertarse en otra, o bien generar copias idénticas que se insertan.

Vector viral:

Virus de diferentes familias, caracterizados por no ser patógenos al organismo humano, los cuales al manipularse por medio de la ingeniería genética pueden ser portadores de genes, secuencias o proteínas terapéuticas. Su función es la de infectar células de acuerdo a su tropismo y entregar el material genético de interés y al cumplir su ciclo vital se eliminan del organismo.

Viabilidad celular:

En un cultivo celular es el número de células vivas, se reporta como en número de células por mililitro de medio de cultivo después de contar un número en una muestra del total del cultivo y se traduce a porcentaje. Un porcentaje igual o mayor al ochenta por ciento representa un cultivo viable, pues el número de células vivas garantiza su óptimo manejo y con ello producción de proteínas u otras sustancias; por el contrario, un cultivo con una viabilidad menor al ochenta por ciento refleja que la mayoría de las células están muertas y están

muriendo, por lo que su uso no es recomendable ya que disminuiría la producción. Es importante ya que muchas líneas celulares requieren cierto número de organismos para poder crecer y sobrevivir debido a que secretan factores de crecimiento al medio de cultivo que en conjunto garantizan la vida del cultivo.

VO₂MAX: Es el parámetro más importante del acondicionamiento físico, el valor se expresa en porcentaje y es considerado equivalente al VO₂ obtenido en el pico de esfuerzo. Se relaciona con la aptitud cardiorrespiratoria los mecanismos de regulación que determinan el VO₂máx son tanto circulatorios como neurales.

Western Blot:

Técnica analítica usada para detectar y cuantificar proteínas específicas. Es una técnica de inmunodetección realizada mediante una electroforesis que separa las proteínas para luego transferirlas a una membrana adsorbente y detectar la proteína de interés mediante la unión antígeno-anticuerpo.