



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN

EFFECTO DEL EJERCICIO EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DE GLUTAMINA SINTETASA EN PERSONAS SANAS

TESIS

Que para obtener el título de Licenciado en Nutrición

PRESENTA

HUGO VILLAMIL RAMÍREZ

Bajo la Dirección del:

Dr. ALDO TORRE DELGADILLO



Pachuca, Hidalgo a 18 de Junio de 2008



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN



De acuerdo con el artículo 134 del Reglamento de Control Escolar vigente, el jurado de examen recepcional designado, autoriza para su impresión la Tesis titulada

"Efecto del Ejercicio en la Expresión Génica de Glutamina Sintetasa en Personas Sanas"

Que para obtener el Título de Licenciado de Nutrición sustenta el Pasante

C. Hugo Villamil Ramírez

ATENTAMENTE
Pachuca, Hidalgo., 19 de Mayo del 2008
"Amor, Orden y Progreso"

PRESIDENTE DEL JURADO	DR. HUGO NÁJERA PEÑA
SECRETARIO DE JURADO	L. NUTR. MARTHA PATRICIA REYES RAMÍREZ
1er. VOCAL DEL JURADO	DR. JOSÉ ANTONIO MORALES GONZÁLEZ
2º VOCAL DEL JURADO	DR. GABRIEL BETANZOS CABRERA
3er. VOCAL DEL JURADO	DR. ALDO TORRE DELGADILLO
SUPLENTE	DR. JORGE ALBERTO MENDOZA PÉREZ
SUPLENTE	M EN N.H. AMANDA PEÑA IRECTA



El presente trabajo fue elaborado en el laboratorio del Departamento de Gastroenterología del Hospital Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran bajo la dirección del Dr. Aldo Torre Delgadillo con coordinación del Dr. Aarón Domínguez López y del M en C Fausto Sánchez Muñoz., en colaboración del Dr. Orea Tejeda del Departamento de Cardiología del mismo Hospital y del Dr. Ángel Miliar García de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional.

AGRADECIMIENTOS

Que complicado se hace escribir los agradecimientos habiendo tantas personas que incluir que han hecho posible esta tan ansiada tesis. Debería haber agradecimientos en artículos, libros, aunque de Internet; los cuales poder copiar y pegar y vámonos. Casi todos los agradecimientos siempre comienzan con el ser supremo y yo no voy a ser la excepción, ya que es quien me motiva me cuida y quien acomodo todas las cosas para que yo pudiera estar escribiendo este trabajo GRACIAS DIOSITO. Que decir de mi familia que todo cuanto han podido me lo han dado, cariño, alegría, fortaleza, soporte, satisfacciones, regaños, orientación uff. mi mami Tere tan querida que nunca dejo de extrañar, que sufre y goza conmigo cada que llego a casa y me voy, como toda gran madre siempre el regaño oportuno me ha hecho lo poco que soy GRACIAS MAMI., mi "PA" José se que estas igual de emocionado que yo al saber que estoy apunto de titularme aunque no lo demuestres; el logro es tuyo gracias a tu trabajo y apoyo es a lo único que estoy dedicado, además de siempre ser el ejemplo numero uno en mi vida al que seguir e intentar superar, una labor imposible GRACIAS PAPI te Quiero mucho. Hijole chavo que decirte a ti que eres mi incansable amigo, siempre juntos y ganadores de diez mil batallas. Tus consejos como hermano siempre me ayudan y claro un ejemplo más que seguir, GRACIAS PEPE. A todos los integrantes del laboratorio de Gastroenterología, de forma especial al jefe del laboratorio por haberme dado la oportunidad de realizar mi tesis, y claro por sus consejos y experiencias de vida, sus sabias palabras las que prometí incluir –la naturaleza no se equivoca– pero claro me levanto cuando peor iba la investigación GRACIAS Dr. AARÓN. Y si no te hago caso de cambiar de protocolo que? Por tu orientación, platicas incansables y enseñanzas a lo largo de la tesis GRACIAS FAUSTO. A mi tutor principal por aceptarme y darme la oportunidad de investigar GS, de activarme todos los días con una palabra siempre acorde a la situación y por su apoyo GRACIAS Dr. ALDO. A mis compañeros por compartir de lunes a viernes el laboratorio, por disfrutar la presión diaria de nuestros tutores y vivir esos inolvidables congresos tan estresantes y divertidos GRACIAS GRUPO ILUSIÓN. Aún no te olvido, nunca lo haría como poder olvidar mi ayer, mi hoy y mi inspiración del mañana GRACIAS PAWY te quiero mucho.

1. ÍNDICE

1. Índice	2
2. Resumen	4
2.1. Abstract	5
3. Marco teórico	6
3.1. Cirrosis hepática	6
3.1.1. Etiología de la cirrosis	6
3.1.2. Fisiopatología de la cirrosis	7
3.1.3. Clasificación clínica de la cirrosis	8
3.1.4. Prevalencia de cirrosis hepática en México	9
3.1.5. Manifestaciones clínicas y complicaciones de la cirrosis	10
3.2. Encefalopatía hepática (EH)	10
3.2.1. Tipos de EH	11
3.2.2. Patogénesis de la EH	12
3.2.3. El astrocito en la EH	12
3.2.4. Metabolismo del amonio en la EH	14
3.2.5. Sistema glutamatérgico y EH	15
3.2.6. Sistema GABA-érgico y EH	15
3.2.7. Estrés oxidativo y EH	16
3.2.8. Interacción orgánica del amonio y EH	17
3.2.9. Tratamiento de la EH	18
3.2.10. Disacáridos no absorbibles	18
3.2.11. Antibióticos no absorbibles	19
3.3. Glutamina sintetasa (GS)	19
3.3.1. Niveles de glutamina sintetasa	21
3.3.2. Mecanismos de regulación de la expresión de glutamina sintetasa	21
3.4.1. Glutamina	22
3.4.2. Metabolismo hepático de la glutamina	23
3.5. Ejercicio	24
3.5.1. Clasificación del ejercicio	24
3.5.2. Sistema aeróbico en el ejercicio	24
3.5.3. Sistema metabólico muscular durante el ejercicio	25
3.5.4. Bioenergética: producción de ATP	26
3.5.5. Metabolismo en el ejercicio	30
3.5.6. Efecto del ejercicio en el metabolismo de las proteínas	33
3.5.7. Efectos de la actividad física en la salud.	34
4. Problema de investigación	36
5. Justificación	37
6. Objetivo general	38
7. Objetivos específicos	38
8. Hipótesis nula	39
8.1. Hipótesis alterna	39
9. Materiales y métodos	40
9.1. Diagrama metodológico	40
9.1. Descripción	41
9.1.1. Criterios del protocolo	42
9.1.2. Criterios de exclusión para sangre periférica	42
9.1.3. Criterios de exclusión para sangre periférica	43
9.1.4. Criterios de eliminación para sangre periférica	43
9.1.5. Criterios de inclusión para biopsias	43
9.1.6. Criterios de exclusión para biopsias	43
9.1.7. Criterios de eliminación para biopsias	43
9.2. Materiales y reactivos	44

9.3. Extracción de ARN	46
9.4. Integridad del ARN	48
9.5. Cuantificación del ARN	48
9.6. Retrotranscripción inversa (RT)	48
9.7. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR)	49
9.8. Análisis estadístico	51
10. Resultados	52
10.1. Electroforesis en gel de agarosa	52
10.2. Curvas de amplificación de la PCR	53
10.3. Expresión de GS para muestras de sangre periférica.	55
10.4. Expresión del ARN de GS en muestras de sangre periférica	56
10.5. Expresión del ARN de GS en biopsias	59
11. Discusión	61
12. Conclusiones	66
13. Bibliografía	67
15. Anexos	73
15.1. Secuencia del gen glutamina sintetasa	73
15.2. Secuencia del gen de referencia HPRT	75
16. Carta de consentimiento informado	77
17. Glosario de Términos	78

Índice de Tablas

Tabla 1. Principales causas de cirrosis hepática	7
Tabla 2. Clasificación clínica de Child-Pugh:	8
Tabla 3. Principales causas de mortalidad general, 2005. México.	9
Tabla 4. Comparación de los diferentes sistemas de producción de energía.	25
Tabla 5. Parámetros PCR-Tiempo real	50
Tabla 6. Características generales de la composición corporal del grupo de estudio	56

Índice de Figuras

Fig 1. Ciclo glutamato-glutamina.	14
Fig 2. Estructura del gen de la GS y ARNm	20
Fig 3. Estructura de una molécula de ATP.	27
Fig 4. Formula desarrollada de la fosfocreatina o fosfato de creatina	28
Fig 5. Ciclo glucosa-alanina	32
Fig 6. Componentes de la mezcla de reacción de PCR	51
Fig 7. Ejemplo de bandas de ARN de sangre periférica y biopsias extraídas por la técnica de TRIzol® y tratado con ADNasa	52
Fig 8. Eficiencia de amplificación de GS mediante curvas de calibración.	54
Fig 9. Expresión de GS y HPRT por PCR en tiempo real.	55
Fig 10. Expresión de ARN de GS en sangre periférica.	57
Fig 11. Expresión del ARN de GS en el grupo total de mujeres	58
Fig 12. Expresión del ARN de GS en el grupo total de hombres	58
Fig 13. Agua corporal total en hombres	59
Fig 14. Expresión de GS en biopsias de músculo esquelético	60
Fig 15. Expresión de GS en biopsias de grasa	60

2. RESUMEN

La glutamina (GL) es un aminoácido no esencial; la glutamina sintetasa (GS) es la única enzima capaz de sintetizar GL e interviene directamente en la detoxificación del amonio. Los principales sitios de expresión de GL son músculo esquelético e hígado. La disminución de su actividad ha sido asociada con enfermedades como cirrosis y presencia de encefalopatía hepática (EH). Se midió la expresión génica del ARN de GS en sujetos sanos antes y después de realizar una prueba de máximo esfuerzo en una banda sin fin. Se incluyeron 29 sujetos que fueron divididos en 3 grupos con respecto a edad y sexo; el primer grupo de 20-30 años (n=10), el segundo grupo de 31-50 años (n=10) y el tercer grupo de 51-60 años (n=9). La expresión génica de la GS se obtuvo a partir de muestras de sangre periférica colectadas en 6 tiempos: una antes del ejercicio y 5 después del ejercicio; a los 15, 60, 120 minutos, 6 y 24 horas respectivamente. Se extrajo ARN total mediante TRIzol®, se sintetizó ADNc por retrotranscripción inversa (RT) y se determinó la expresión de GS mediante reacción en cadena de la polimerasa en Tiempo Real (PCR) utilizando al gen hipoxantina fosforribosil transferasa (HPRT) como referencia. Se obtuvieron las medias \pm desviación estándar (DE) mediante análisis estadístico para pruebas no paramétricas de Friedman y Wilcoxon. La expresión del ARN de GS aumentó por efecto del ejercicio en el grupo total de personas: basal 0.98 contra 15 min 1.10 $p=0.076$, 60 min 1.26 $p^{**}=0.005$, 120 min 1.32 $p^{**}=0.003$ y 6 h 1.28 $p^{*}=0.05$. El aumento fue más significativo en el grupo de hombres. Basal: 0.987, 15 min 1.16 $p^{*}=0.04$, 60 min 1.37 $p^{**}=0.006$, 120 min 1.31 $p^{*}=0.02$. En el grupo de las mujeres, la expresión del ARN de GS sólo fue significativo comparando el valor basal 0.97 contra 6 h 1.55 $p^{*}=0.039$. En conclusión, la expresión génica de GS se estimula por el ejercicio. La expresión en hombres y mujeres difiere; en hombres presenta una expresión a partir de los 15 min la cual se mantiene y alcanza su máximo a los 60 min. En mujeres la expresión es menor, con un pico máximo a las 6 h. Estos resultados sugieren que el ejercicio controlado y constante en pacientes cirróticos estables puede ser una estrategia terapéutica orientada a la prevención de la EH.

Palabras Claves: Encefalopatía hepática, cirrosis hepática, amonio, Glutamina Sintetasa, ejercicio, expresión.

2.1 ABSTRACT

Glutamine is a non-essential amino acid; glutamine synthetase (GS) is the only enzyme capable to synthesize glutamine (GL) and it has a direct role in the ammonium detoxification process. One of the principal sites of GL expression is the skeletal muscle and liver. It has been proposed that a activity decreased in the GS is associated to cirrhosis and to the presence of hepatic encephalopathy (HE). Genetic expression of GS RNA was measured in blood of healthy subjects before and after the test of maximum effort in a band without end. The study included 29 subjects and were divided into 3 groups according to age and gender; first group 20-30 (n=10), second group 31-50 (n=10), third group 51-60 (n=9). Genetic expression of GS was obtained from sample of venous blood collected at 6 different times: one before beginning exercise and 5 after exercise (15, 60, 120 minutes, 6 and 24 h respectively). The total RNA was extracted with TRIzol®, cDNA was synthesized by Reverse Transcription (RT) and the expression of GS was determined by PCR in Real Time using the Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) gene as housekeeping. Means \pm Standard Deviations were determined and the statistical analysis was made with Friedman and Wilcoxon tests. The expression of GS RNA was increased after the exercise test in the total of subjects: basal 0.98 versus 15 min, 1.10 $p=0.076$, 60 min 1.26 $p^{**}=0.005$, 120 min 1.32 $p^{**}=0.003$ and 6 h 1.28 $p^{*}=0.05$. The increment was more significant in men group; Basal: 0.987, 15 min 1.16 $p^{*}=0.04$, 60 min 1.37 $p^{**}=0.006$, 120 min 1.31; $p^{*}0.02$. In women group, the expression of GS RNA was only significant comparing basal 0.97 versus 6 h 1.55 $p^{*}0.039$. In conclusion, the genetic expression of GS is stimulated by exercise. The expression was different between the woman and men: In men the GS expression increased in the 15 min and reached its maximum at 60 min. In women the expression is lesser, with a peak at 6h. The results obtained in this study suggest that a constant and controlled exercise in stable cirrhotic patients could be used as a therapy oriented to the prevention of EH.

Keywords: hepatic encephalopathy, hepatic cirrhosis, ammonium, Glutamine Synthetase, exercise, expression.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 CIRROSIS HEPÁTICA

La cirrosis hepática se considera el extremo de la afección hepática y la vía final de manifestaciones clínicas dentro de las que destacan la insuficiencia hepática y la hipertensión portal (Coss y Torre-Delgadillo, 2007). La cirrosis hepática tiene un mal pronóstico cuando comienza a ser sintomática, e incierto cuando se diagnostica con expresión subclínica o asintomática. Se manifiesta clínicamente por descompensación hidrópica (acumuló de líquido en la cavidad peritoneal como consecuencia de la hipertensión portal secundaria a cirrosis hepática), hipertensión portal o insuficiencia hepática o ambas. Con frecuencia, se desarrolla en los hígados cirróticos un hepatocarcinoma ocasionando una distorsión irreversible de la arquitectura normal del hígado caracterizada por lesión hepática, fibrosis y degeneración nodular (Mouritzen y col., 2005; Bolt, 1998).

3.1.1 ETIOLOGÍA DE LA CIRROSIS

La cirrosis hepática es uno de los principales problemas de salud en todo el mundo, con prevalencia diferente y etiologías diversas dependiendo del sitio donde se analicen (Coss y Torre-Delgadillo, 2007).

Es difícil determinar las principales etiologías en nuestro país debido a la falta de estudios epidemiológicos multicéntricos, pero se considera a la cirrosis hepática alcohólica, la principal causa de encefalopatía hepática en hombres en hospitales de segundo nivel de atención siendo las cirrosis post-necróticas asociadas a virus de hepatitis C la segunda causa (Coss y Torre-Delgadillo, 2007).

Las principales causas de cirrosis se presentan en la Tabla 1. La lesión inicial puede deberse a una diversidad amplia de procesos. Una característica crucial es que la

lesión hepática no es aguda ni de resolución espontánea, sino mas bien crónica y progresiva (Merli y col., 2004).

Tabla 1. Principales causas de cirrosis hepática

-
1. Alcoholismo
 2. Hepatitis Viral
 3. Alteraciones Metabólicas
 - Hemocromatosis
 - Enfermedad de Wilson
 - Glucogenosis
 - Galactosemia
 4. Enfermedad Biliares
 5. Obstrucción Venosa
 6. Drogas, medicamentos, tóxicos
 7. Derivaciones intestinales
 8. Criptogenia

Adaptado de: Merly y col., 2004.

3.1.2 FISIOPATOLOGÍA DE LA CIRROSIS

El principal evento en la génesis de la cirrosis es el aumento en la producción y depósito de tejido colágeno, esto es, el exceso de matriz extracelular con o sin inflamación o lo que se conoce comúnmente como fibrosis (Olivera, 2000).

El hígado cirrótico contiene hasta 6 veces las cantidades normales de colágena, se incrementan las colágenas de tipo I y III aunque en las bandas de fibrosis se encuentra un predominio de colágena de tipo I y la proporción de tipo I a tipo III puede llegar a ser de 4:1 en vez de la normal de 1:1 (Olivera, 2000).

Una de las peculiaridades de las bandas fibróticas en el hígado cirrótico es que se encuentran dentro de ellas numerosos miofibroblastos. Al tiempo que se incrementa la producción de estas colágenas, también, aumentan las concentraciones de otras glicoproteínas y proteoglicanos que pueden estar involucrados en la síntesis de dicha

colágena, o bien, ser parte del fenómeno que estimula la producción de colágena (Olivera, 2000).

Se produce un aumento en la poza de prolina junto con este aumento, también, se produce un aumento en la concentración de la enzima prolihidroxilasa, la cual, hidroxila a la prolina en la formación de colágena. Este evento tiene lugar aún antes de que se incremente la concentración de colágena lo que también traduce la posible necesidad de la prolihidroxilasa en la génesis de la cirrosis (Olivera, 2000).

3.1.3 CLASIFICACIÓN CLÍNICA DE LA CIRROSIS

Es fundamental recordar la importancia de la valoración del grado de función hepática en los pacientes cirróticos mediante la clasificación de Child-Pugh (escala de evaluación del grado de cirrosis hepática) que se muestra en la Tabla 2. (García y Alcántara, 2002).

Tabla 2. Clasificación clínica de Child-Pugh:

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

Adaptado de: García y Alcántara, 2002.

3.1.4 PREVALENCIA DE CIRROSIS HEPÁTICA EN MÉXICO

La epidemiología de la cirrosis se caracteriza por diferir en relación al sexo, grupos étnicos, regiones geográficas, entre otras. La naturaleza, frecuencia y el tiempo con que se adquieren principalmente las enfermedades desencadenantes de la cirrosis como hepatitis de virus B, hepatitis del virus C y enfermedad del hígado alcohólico, pueden explicar estas variaciones. (Méndez y col., 2005; Secretaría de Salud, 2007).

La infección del virus de la hepatitis C es una de las causas que conducen a la enfermedad del hígado en una etapa extrema que requiere el trasplante del mismo. En el año 2005, la enfermedad crónica del hígado era la quinta causa principal de la muerte en México (Tabla 3) pero en ese año entre los grupos de edad de 35 a 55 años fue la segunda causa más importante de muerte en nuestro país (Méndez y col., 2005; Secretaría de Salud, 2007).

Tabla 3. Principales causas de mortalidad general en México en el año 2005.

	Descripción	Defunciones	%
1	Diabetes mellitus	67,090	13.6
2	Enfermedades isquémicas del corazón	53,188	10.8
3	Cirrosis y otras enfermedades crónicas del hígado	27,566	5.6
4	Enfermedad cerebrovascular	27,370	5.5
5	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	20,253	4.1
6	Ciertas afecciones originadas en el periodo perinatal	16,448	3.3
7	Accidentes de tráfico de vehículo de motor	15,742	3.2
8	Infecciones respiratorias agudas bajas	14,979	3.0
9	Enfermedades hipertensivas	12,876	2.6
10	Nefritis y nefrosis	11,397	2.3

Adaptado de: Secretaría de salud. Bases de datos de información sobre mortalidad, 2007.

Actualmente en nuestro país, algunas enfermedades del hígado como son la esteatohepatitis no alcohólica y la infección crónica por el virus de la hepatitis C tienen un alta incidencia en la población y otras enfermedades tales como carcinoma hepatocelular o la falla hepática fulminante tienen una alta letalidad (Méndez y col., 2005).

3.1.5 MANIFESTACIONES CLÍNICAS Y COMPLICACIONES DE LA CIRROSIS

Dos son las principales causas de los signos y síntomas en el paciente cirrótico: la insuficiencia hepática y la hipertensión portal. (Bolt, 1998).

Las principales características de los pacientes cirróticos son:

- Encefalopatía hepática
- Retención hídrica
- Falla sintética.
- Hemorragia digestiva por hipertensión portal

3.2 ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA (EH)

La EH es la mayor complicación neuropsiquiátrica, tanto de la falla hepática aguda como de la crónica. Los síntomas de la EH incluyen déficit de atención, alteraciones del patrón del sueño, incoordinación muscular (Torre-Delgadillo y col., 2002). La EH constituye un síndrome neuropsiquiátrico reversible o progresivo caracterizado por alteraciones de la conciencia y la conducta, cambios en la personalidad, signos neurológicos fluctuantes (Lizardi y col., 2003) y alteraciones electroencefalográficas distintivas que se presentan tanto en hepatopatías agudas como en crónicas (García y Alcántara, 2002). La atención se ha orientado a dos áreas principales: la función de las neurotoxinas que atraviesan la barrera hematoencefálica y el papel fisiopatológico del astrocito. Los factores precipitantes son comunes, incluyen aumento en la carga oral de proteínas, estreñimiento, sangrado gastrointestinal, uso de sedantes, corto

circuitos transyugulares portosistémicos, infecciones y diuréticos entre otros (Torre-Delgadillo y col., 2002).

3.2.1 TIPOS DE ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA

La EH es clasificada considerando tres criterios principales; el tipo de anormalidad hepática, la duración y características de las manifestaciones neurológicas en enfermedades hepáticas crónicas (Torre-Delgadillo y col., 2002).

EH Tipo A: encefalopatía asociada con falla hepática fulminante.

EH Tipo B: asociada a cortocircuitos portosistémico y enfermedad hepatocelular no intrínseca.

EH Tipo C: asociada a cirrosis e hipertensión portal o cortocircuitos portosistémicos (Torre-Delgadillo y col., 2002).

Según la duración, se denomina:

EH episódica: puede tener factores precipitantes, o ser espontánea ante la ausencia de factor condicionante de la encefalopatía. Los factores precipitantes deben ser excluidos, como: hemorragia gastrointestinal, uremia, uso de medicamentos con acción en sistema nervioso central, diuréticos no cumplimiento de la dieta, infección, estreñimiento, hipocalcemia o hipercalemia e hiponatremia (Torre-Delgadillo y col., 2002).

EH persistente: incluye déficit cognitivo que impacta de manera negativa el funcionamiento ocupacional y social de la persona. La EH persistente se clasifica en leve (EH grado I) y grave (EH grado II-IV) según el grado de compromiso de autonomía (Torre-Delgadillo y col., 2002).

EH mínima: se aplica a la población con exploración neurológica normal, pero con pruebas psicométricas alteradas, con anormalidades selectivas en la función motora final y la alteración (Torre-Delgadillo y col., 2002).

3.2.2 PATOGÉNESIS DE LA ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA

Los mecanismos implicados en la patogénesis de la EH son aún materia de debate, y tal vez, haya muchos factores implicados en la génesis de este síndrome neurológico. Se deben considerar conceptos generales en el momento de tratar de establecer alguna teoría que trate de explicar la patogénesis de la EH, como: (Merli y col., 2004).

1. La encefalopatía se debe a la acumulación de una o más neurotoxinas.
2. Estas neurotoxinas se derivan de compuestos nitrogenados que se forman en el intestino.
3. El hígado sano es capaz de depurar estas sustancias para proteger el cerebro.
4. Debido a la hepatopatía crónica, que reduce la función hepática, crea cortocircuitos portosistémicos, los compuestos nitrogenados que se producen en el intestino llegan a la circulación sistémica penetrando en el cerebro, en donde alteran la neurotransmisión afectando el estado de conciencia y el comportamiento (Merli y col., 2004).

3.2.3 EL ASTROCITO EN LA ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA

El astrocito es la célula más abundante y dinámica en la corteza cerebral, e interviene en mecanismos de regulación de contenido de iones, neurotransmisión, mantenimiento de la integridad de la barrera hematoencefálica y del mismo Sistema Nervioso Central (SNC) (Torre-Delgadillo y col., 2002).

El edema del astrocito es el principal hallazgo en la EH aguda. En la falla crónica, los astrocitos toman forma balonoide, con núcleos prominentes, grandes y marginación de cromatina, cuyos cambios se conocen como astrocitosis tipo Alzheimer II. Son células dinámicas y metabólicamente activas en el mantenimiento y regulación del microambiente extracelular, con evidencia creciente de que el astrocito influye en la excitabilidad y la neurotransmisión neuronal. También, se encuentran involucrados en la osmorregulación, la provisión de nutrimentos y los neurotransmisores precursores de neuronas (glutamina, alanina, α -cetoglutarato, malato, succinato, lactato y piruvato), la desintoxicación de amoníaco, fármacos, hormonas, metabolismo de CO₂, eliminación de radicales libres, secuestro de metales, respuesta inmunitaria/inflamatoria, y neurotrofismo (Torre-Delgadillo y col., 2002).

Entre las funciones críticas del astrocito se encuentra la captación y el reciclaje del neurotransmisor excitatorio glutamato, manteniendo sus niveles normales para evitar excitotoxicidad, así como la desintoxicación y el metabolismo del amonio. La GS, localizada en las células gliales, cataliza la amidación de glutamato a glutamina en una reacción que consume ATP (Fig. 1). La GS normalmente trabaja a su máxima capacidad, y en estados de hiperamonemia aguda, por lo general, no se encuentra aumento de su actividad, en tanto que, en estados crónicos su actividad está disminuida. El metabolito glutamina es utilizado por las neuronas en la síntesis de glutamato mediante la enzima glutaminasa y constituye un osmolito cuyas concentraciones se correlacionan con gravedad de la encefalopatía. Cuando el amonio en exceso a nivel del SNC sobrepasa la capacidad de metabolismo de los astrocitos ocasiona efectos nocivos en la función de éstos y, en consecuencia en la función neuronal. El incremento en el osmolito glutamina en los astrocitos, secundario a la destoxicación del amonio puede producir edema cerebral de bajo grado, mismo que llega a revertirse después del trasplante hepático (Torre-Delgadillo y col., 2002).

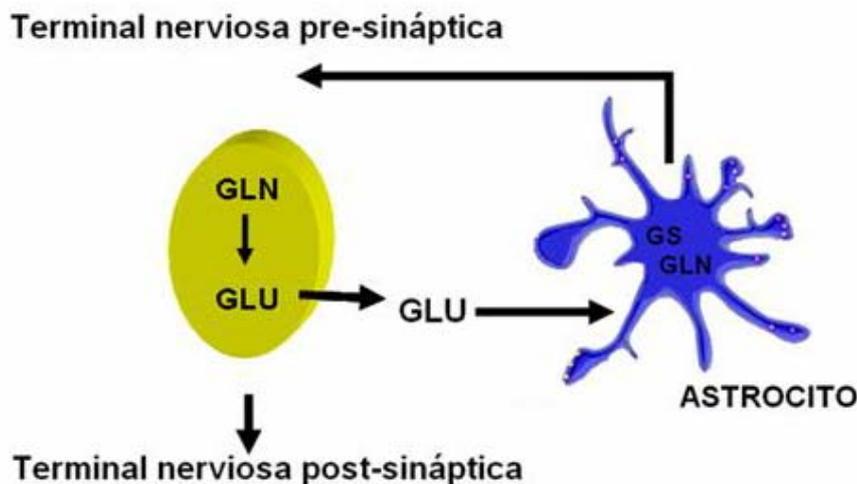


Fig. 1. Ciclo glutamato-glutamina.

Adaptado de: Torre-Delgadillo y col., 2002.

La captación de glutamato (GLU) hacia el astrocito va seguida por la amidación a glutamina (GLN) a través de la acción de la glutamina sintetasa (GS). La glutamina sale de las células gliales y entonces es tomada por las terminales nerviosas, donde es convertida a glutamato mediante la glutaminasa. Este ciclo sirve para desintoxicar amonio, removiendo glutamato del espacio extracelular, y proporcionando los precursores para los neurotransmisores (glutamato y GABA).

3.2.4 METABOLISMO DEL AMONIO EN LA EH

El amonio juega un papel central en la patogenia de la EH y es considerado el metabolito tóxico principal. En pacientes con encefalopatía se han detectado niveles elevados de amonio en sangre periférica e inclusive se considera que éstos pueden predecir la aparición de edema cerebral y muerte por herniación. Sin embargo, no es un marcador perfecto y la presencia de niveles normales no excluye un cuadro de encefalopatía, aunque esto no implique ausencia de niveles elevados de amonio en el SNC dada la incrementada permeabilidad de la barrera hematoencefálica inducida por el mismo (Shawcross y col., 2005).

Las fuentes principales de amonio en el organismo son, el metabolismo de las proteínas de la dieta por acción directa de las bacterias colónicas, el metabolismo de

la glutamina, las vías de desaminación y transaminación de aminoácidos (Iguar, 1995). En condiciones normales existen niveles circulantes de amonio muy bajos, controlados a través del ciclo de la urea y por el metabolismo de la glutamina a nivel de hígado, músculo, intestino delgado y SNC. Sin embargo, en presencia de insuficiencia hepática ocurre elevación del amonio en la circulación sistémica debido a una deficiente detoxificación, así como a la derivación portosistémica que puede ocurrir con la cirrosis (Falduto y col., 1989).

En altas concentraciones, el amonio incrementa el potencial de membrana en reposo e inhibe la conducción axonal y la formación de potenciales excitatorios post-sinápticos, deprimiendo así al SNC; aunque, también se ha reconocido un papel excitatorio paradójico inducido por amonio (Falduto y col., 1989).

3.2.5 SISTEMA GLUTAMATÉRGICO Y EH

El glutamato, sintetizado en las neuronas y liberado en las sinapsis, debe ser rápidamente captado por los astrocitos, dando fin a la señalización excitatoria y evitando así la sobreestimulación de sus receptores para un adecuado funcionamiento del sistema glutamatérgico y cerebral. Este mecanismo es de vital importancia para procesos mentales que involucran el aprendizaje, la memoria y el ciclo sueño-vigilia, afectados en la encefalopatía. Cualquier desviación a nivel neuronal o de los astrocitos en esta vía es causa de disfunción cerebral y se ha identificado que el exceso de amonio en el SNC ocasiona múltiples alteraciones en este sistema (Iguar, 1995).

3.2.6 SISTEMA GABA-érgico Y EH

El neurotransmisor ácido gama-aminobutírico (GABA) es el principal inhibidor a nivel del SNC que contrarregula las acciones del glutamato al unirse a su receptor GABA. Además del GABA, otros compuestos denominados benzodiazepinas endógenas o

naturales pueden unirse al receptor GABA. (Rengifo y col., 2005) La reversibilidad de la encefalopatía mediante antagonistas del receptor GABA constituye una evidencia que ha implicado a estas sustancias como involucradas en la fisiopatología de la encefalopatía. Se ha documentado que los agonistas del receptor de benzodiazepinas se encuentran elevados en estos pacientes, provenientes de fuentes dietéticas, de la conversión de precursores de benzodiazepinas por la flora bacteriana intestinal, o bien, de un metabolismo hepático anormal. De manera alterna, existen receptores periféricos de benzodiazepinas en las mitocondrias de las células gliales, que en presencia de hiperamonemia pueden incrementarse y dar lugar a la síntesis de neuroesteroides que actúan como agonistas potentes del receptor GABA. Paralelamente a la afección del sistema glutamatérgico, estos mecanismos juegan un papel importante en el desarrollo y mantenimiento de la encefalopatía (Igal, 1995).

3.2.7 ESTRÉS OXIDATIVO Y EH

Existe evidencia experimental de que las especies reactivas de oxígeno participan en la patogénesis de la encefalopatía, posiblemente mediante falla mitocondrial y edema de los astrocitos. Se sabe que el aumento en los niveles de amonio incrementa el estrés oxidativo a nivel del SNC (Igal, 1995).

En síntesis, las alteraciones en la neurotransmisión, mediadas principalmente por disfunción de los sistemas glutamatérgico, GABA-érgico y edema de los astrocitos, inducidos por incremento en los niveles de amonio a nivel del SNC, son la piedra angular de neurotoxicidad responsable de la encefalopatía. Esto hace suponer que los tratamientos que resulten efectivos para disminuir los niveles de amonio circulantes serán fundamentales para prevenir la presencia de EH (Igal, 1995).

3.2.8 INTERACCIÓN ORGÁNICA DEL AMONIO Y EH

Aunque, el hígado es el principal órgano que participa en el metabolismo del amonio, los sitios de metabolismo extrahepático juegan un papel primordial en la insuficiencia hepática, éstos serán descritos brevemente a continuación:

Metabolismo intestinal: El intestino delgado cuenta con una gran actividad de glutaminasa y contribuye ampliamente con la concentración circulante de amonio. En pacientes con encefalopatía mínima se ha identificado correlación con una actividad incrementada de glutaminasa (Romero y col., 2004).

Metabolismo muscular: Aunque la actividad de GS muscular es baja, cobra relevancia debido a la abundante masa de músculo esquelético y constituye así el tejido con mayor actividad de esta enzima. En pacientes sanos se ha observado que 50% del amonio circulante puede ser extraído por el músculo. Sin embargo, el balance neto del metabolismo muscular del amonio es neutro, probablemente porque la producción de amonio por el ejercicio contrarresta la actividad de GS. En contraste, en pacientes con cirrosis descompensada o con falla hepática aguda se ha identificado remoción muscular de amonio y producción desproporcionadamente alta de glutamina, proveniente no sólo de la actividad de GS, sino del catabolismo muscular. Así, el músculo puede constituir un tejido de detoxificación del amonio que compensa el alterado metabolismo hepático en la cirrosis, por lo menos en pacientes con función renal normal (Romero y col., 2004).

Metabolismo renal: En el riñón la GS y glutaminasa participa en la producción y remoción del amonio. La glutamina es el principal sustrato para la amoniagénesis, excretándose aproximadamente 30% del amonio producido en la orina y retornando 70% del amonio a la vena renal. Sin embargo, en condiciones experimentales de hiperamonemia estas proporciones pueden invertirse, por lo que el riñón se convierte en un órgano de detoxificación de amonio que puede complementar la

destoxificación muscular mediante la eliminación el grupo amonio de la glutamina (Tarter y col., 1997).

3.2.9 TRATAMIENTO DE LA EH

RESTRICCIÓN DE PROTEÍNAS DIETÉTICAS.

La ingestión de elevadas cantidades de proteínas en la dieta o la administración de una carga de proteínas a los pacientes con cirrosis hepática pueden aumentar el amonio en la sangre y empeorar los síntomas de la EH. Las proteínas de origen animal son más nocivas debido a su mayor contenido de aminoácidos aromáticos, aminoácidos de cadena ramificada y fibra. Se ha sugerido, por tanto, que la restricción de proteína dietética de origen animal es benéfica en pacientes con EH. Sin embargo, la disminución del aporte energético proteínico puede producir degradación de proteínas endógenas, que también es dañina. Al resolverse las manifestaciones neuropsiquiátricas deben reintroducirse las proteínas dietéticas en forma gradual hasta llegar a la ingestión recomendada de 1 a 1.2 g/Kg/día (Plauth y col., 1997). Asimismo, las dietas con alto contenido de fibra son benéficas, ya que disminuyen el tiempo de tránsito del alimento a través del intestino, el pH colónico y como resultado la fermentación bacteriana. (Torre-Delgadillo y col., 2002).

3.2.10 DISACÁRIDOS NO ABSORBIBLES

Los disacáridos no absorbibles (lactulosa y lactilol) administrados en forma oral llegan al colón sin modificarse, en donde actúan reduciendo la producción y absorción de amonio a través de diversos mecanismos. Primero, favorecen el crecimiento de la flora fermentativa, inhibiendo la flora proteolítica que produce amonio a partir de la urea; la flora fermentativa utiliza el amonio de la luz intestinal para su síntesis de proteínas, lo que lleva a la disminución todavía mayor de la absorción de amonio. Los disacáridos no absorbibles no pueden ser hidrolizados por las disacaridasas intestinales, produciendo diarrea osmótica y alterando el

metabolismo bacteriano, así mismo, estimulan la incorporación de amonio dentro de las proteínas bacterianas, reduciendo la cantidad disponible para la absorción intestinal, ya que solo el amonio no ionizado se difunde libremente a través de la pared intestinal y promueve el movimiento de amonio desde la sangre hasta el intestino para ser eliminado en las heces. Además la fermentación bacteriana disminuye el pH colónico reduciendo la absorción de amonio por difusión no iónica y promoviendo el crecimiento de lactobacilos no productores de amonio (Als-Nielsen y col., 2004; Plauth y col., 1997).

3.2.11 ANTIBIÓTICOS NO ABSORBIBLES

La inhibición de las bacterias involucradas en la amoniogénesis colónica es una de las primeras estrategias que tuvo éxito en los pacientes con EH. La familia de las Enterobacterias, son las principales productores de amonio a nivel intestinal. La neomicina es el antibiótico que más se utiliza y, la evidencia de su eficacia clínica parece tan clara que rápido se convirtió en el tratamiento de elección para estos pacientes. Una dosis fraccionada de 2 a 8 g al día suprime la flora colónica, reduce el amonio en sangre y mejora el estado mental en 79 a 80% de los pacientes (Plauth y col, 1997).

3.3 GLUTAMINA SINTETASA

La glutamina sintetasa es una enzima citosólica encargada de catalizar la conversión de glutamato y amonio en glutamina, reacción dependiente de ATP. Se encuentra formada por 8 subunidades idénticas, con algunas microheterogeneidades entre las subunidades, posiblemente debido a modificaciones pos transcripcionales, cada subunidad contiene un sitio activo de unión a glutamato, amonio y ATP (Smirnov y col., 2000; Shin y col., 2003), la molécula tiene un tamaño de 44 kDa.

La GS es activada por alfacetoglutarato y es inhibida por metionina sulfoximina, glicina y carbamoilfosfato (Häussinger y Schliess, 2007).

El gen que codifica la glutamina sintetasa tiene 10 Kb de longitud y está compuesto de 7 exones y 6 intrones (Fig. 2) (Taylor y Curthoys, 2004). El gen funcional de glutamina sintetasa está localizado en el cromosoma 1q31 del genoma humano. El genoma humano también contiene un pseudogen procesado y 3 homólogos no caracterizados que carecen de intrones pero comparte un alto nivel de identidad en la secuencia de nucleótidos con los exones de la glutamina sintetasa. Dos elementos de respuesta a glucocorticoides han sido identificados en el gen de glutamina sintetasa, uno está localizado alrededor de 6 Kb hacia arriba del sitio donde inicia la transcripción, y el segundo está localizado fuera del primer intron (Taylor y Curthoys, 2004).

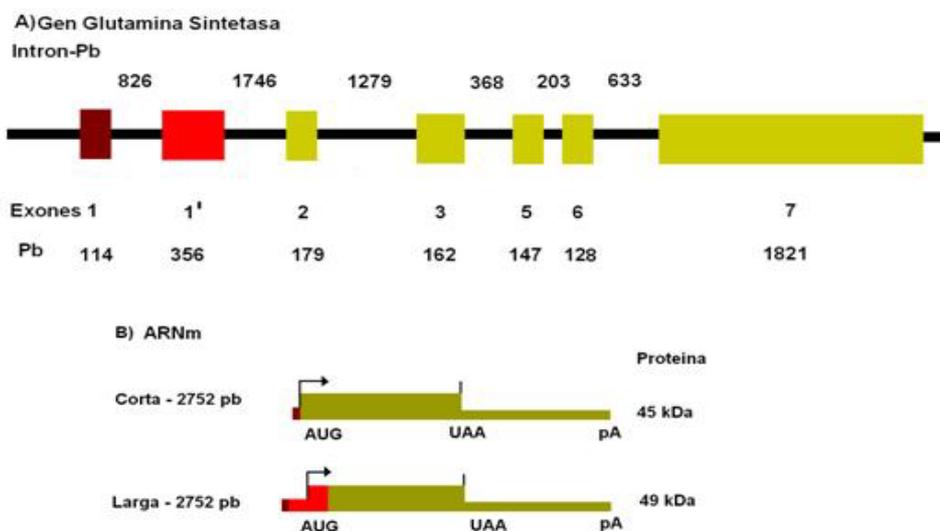


Fig. 2. Estructura del gen de la glutamina sintetasa y ARNm
Adaptado de: Taylor y Curthoys, 2004.

A) Los exones se muestran como cuadros y los intrones como líneas. La longitud de los exones y los intrones se muestra en pares de bases. B) Los dos ARNm de GS están formados por corte y empalme en el que cada uno termina o incorpora la secuencia contenida en el exon 1'

3.3.1 NIVELES DE GLUTAMINA SINTETASA

El gen de la glutamina sintetasa se expresa en diferentes niveles en un amplio rango de tejidos. La concentración de glutamina sintetasa por célula es muy amplia en tejidos en los cuales se encuentra presente en un pequeño número de células, tales como los hepatocitos pericentrales del hígado o los astrocitos del sistema nervioso central. Por otra parte, la concentración celular de la glutamina sintetasa por célula es muy baja en tejidos en los que se encuentra presente en un amplio número de células como el músculo. La concentración celular de glutamina sintetasa parece correlacionar con la función primaria de la enzima, los niveles celulares de glutamina sintetasa varía de 10 a 100 veces, teniendo valores más altos en células que remueven el glutamato y destoxifican el ión amonio (astrocitos y hepatocitos pericentrales, respectivamente) que en células productoras de glutamina (miocitos y adipocitos) (Taylor y Curthoys, 2004).

3.3.2 MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GLUTAMINA SINTETASA

La expresión de glutamina sintetasa en mamíferos es regulada principalmente por dos mecanismos:

- 1) Respuesta a la acción hormonal (transcripcional).
- 2) Respuesta a las concentraciones de glutamina en el ambiente (postranscripcional).

Durante el estrés fisiológico, el transporte de glutamina por el músculo esquelético se incrementa en asociación con el incremento en el consumo de glutamina por otros tejidos tales como el intestino, el hígado, el pulmón y el sistema inmune. Aunque la glutamina representa más del 50% de la reserva total de aminoácidos no esenciales en músculo esquelético, las cantidades de glutamina libre dentro del músculo son insuficientes para cubrir la cantidad de glutamina sintetasa liberada. Para mantener

la homeostasis, la glutamina es sintetizada del *Novo* a partir de glutamato y amonio en un proceso catalizado por la enzima glutamina sintetasa. Una vez que las reservas de glutamina se encuentran agotadas, la conversión de la proteína y de los aminoácidos del músculo en glutamina, proporciona una fuente importante de glutamina durante el estrés, cuando hay a menudo una demanda creciente o un suministro limitado de aminoácidos (Taylor y Curthoys, 2004; Chatauret y col., 2006). Las hormonas glucocorticoides son liberadas rápidamente como parte de la respuesta aguda al estrés y han demostrado que aumentan la expresión del gen glutamina sintetasa en músculo *in vitro* e *in vivo*. Además, los niveles de ARNm en músculo han demostrado incrementarse en respuesta al desafío de la endotoxina en una manera que es predominantemente, pero no completamente, dependiente de la glándula adrenal. Esta observación ha despertado la posibilidad de que otros mediadores además de los glucocorticoides pueden también regular la expresión del gen de glutamina sintetasa. Aunque, la actividad de glutamina sintetasa en músculo también aumenta en respuesta a los glucocorticoides o al estrés agudo, este aumento no es paralelo al incremento en el ARNm de glutamina sintetasa, sugiriendo que un mecanismo del control postranscripcional contribuye a la regulación de la expresión de glutamina sintetasa. Un mecanismo supuesto implica la regulación de la actividad por su producto glutamina. De hecho, se ha demostrado en una línea celular de músculo esquelético que la actividad de glutamina sintetasa aumenta por un mecanismo postrancricional en respuesta a la disminución de glutamina en el ambiente, sin embargo tales hallazgos no son contundentes (Taylor y Curthoys, 2004; Chatauret y col., 2006).

3.4.1 GLUTAMINA

La glutamina es el aminoácido no esencial mas abundante en los compartimentos extra e intracelulares, se encuentra normalmente presente en una concentración de 0.5 a 0.8 mM en el plasma arterial, donde constituye 20-25% de los aminoácidos libres circulantes. En el músculo la glutamina representa más del 50% de las

reservas de aminoácidos libres, donde se encuentra en rangos de 10 a 30 mM. (Taylor y Curthoys, 2004).

3.4.2 METABOLISMO HEPÁTICO DE LA GLUTAMINA

La oxidación completa de la mayoría de los carbohidratos y lípidos produce normalmente CO_2 y H_2O . En contraste, la oxidación de los aminoácidos también produce cantidades equivalentes de iones NH_4^+ y HCO_3^- . En humanos, la síntesis diaria de 0.5 moles de urea provee la ruta principal para combinar ambos iones y formar productos no iónicos que son fácilmente exhalados o excretados (Taylor y Curthoys, 2004).

Una gran proporción de cambios de la glutamina del plasma ocurren en las células epiteliales del intestino delgado. Este proceso cuenta para una fracción de los iones amonio que son generados por las viseras portales (Taylor y Curthoys, 2004).

La sangre venosa porta, pasa a través del hígado donde representa del 70 a 80% del aporte sanguíneo hepático. La función principal del hígado es detoxificar los iones amonio que son derivados de la sangre de la vena porta y generados por el catabolismo hepático de aminoácidos. Lo cual es, completado por la expresión diferencial de diversas enzimas dentro de pequeñas zonas del acino hepático (Taylor y Curthoys, 2004; Chatauret y col., 2006).

La utilización hepática y síntesis de glutamina son afectadas significativamente por cambios en el balance ácido base. Esta adaptación ocurre sin cambios significativos en los niveles de glutaminasa hepática o glutamina sintetasa. Sin embargo, esto podría reflejar, en parte, la activación recíproca de los perfiles de pH de ambas enzimas (Taylor y Curthoys, 2004; Chatauret y col., 2006).

3.5 EJERCICIO

Es todo tipo de movimiento corporal que realiza el ser humano durante un determinado periodo, aumentando el consumo de energía considerablemente y el metabolismo (Wilmore y Costilla, 2004 a).

3.5.1. CLASIFICACIÓN DEL EJERCICIO

El ejercicio puede clasificarse en dos tipos:

Anaeróbico: cuando las fuentes principales de energía son ATP y fosfocreatina preformada con producción de lactato como producto de la glucólisis sin presencia de oxígeno, resultando esto en un proceso menos eficiente (duración de segundos a < de 2 a 4 minutos).

Aeróbico: los procesos de generación de energía (glucólisis o sistema ácido láctico) muscular se llevan a cabo en presencia de oxígeno (duración mayor a 4 minutos) (Guyton, 2001).

3.5.2 SISTEMA AERÓBICO EN EL EJERCICIO

El sistema aeróbico significa la oxidación de los alimentos en las mitocondrias para proveer energía. Es decir, la glucosa, ácidos grasos y aminoácidos de los alimentos se combinan con el oxígeno para liberar enormes cantidades de energía que se utiliza para convertir AMP y ADP en ATP. Si se compara este mecanismo aeróbico de energía con el sistema glucógeno-ácido láctico y el sistema fosfágeno, las velocidades relativas máximas de generación de energía en términos de utilización de ATP son las que se muestran en la Tabla 4. (Wilmore y Costilla, 2004 b).

Tabla 4. Comparación de los diferentes sistemas de producción de energía.

Tipo de Sistema	Moléculas de ATP / min	Duración del sistema
Sistema aerobio	1	Tiempo ilimitado (mientras duren los nutrientes)
Sistema de glucógeno-ácido láctico	2.5	1.3 a 1.6 min.
Sistema de fosfágeno	4	8 a 10 s

Tomado de: Wilmore y Costilla, 2004 b.

3.5.3 SISTEMA METABÓLICO MUSCULAR DURANTE EL EJERCICIO.

FUENTES DE ENERGÍA

Los alimentos se componen principalmente de carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. Los enlaces moleculares en los alimentos son relativamente débiles y proporcionan poca energía cuando se descomponen. En consecuencia, los alimentos no se usan directamente para las operaciones celulares. En lugar de esto, en los enlaces de las moléculas de los comestibles, la energía se libera químicamente dentro de las células, almacenándose luego en forma de un compuesto altamente energético denominado ATP (Wilmore y Costilla, 2004 b).

CARBOHIDRATOS (CHO)

Los CHO se convierten en última instancia en glucosa, un monosacárido que es transportada por la sangre a los tejidos activos, donde se metaboliza. En reposo, la ingesta de CHO es absorbida por los músculos y el hígado, posteriormente se convierte en una molécula de azúcar mucho más compleja: glucógeno. Éste se almacena en el citoplasma hasta que las células lo utilizan para formar ATP. El glucógeno se deposita en el hígado, cuando se necesita, se convierte nuevamente en glucosa que es transportada por la sangre a los tejidos activos donde es metabolizada. Las reservas de glucógeno en el hígado y en los músculos son

limitados y pueden agotarse. Por lo tanto, dependemos fuertemente de nuestras fuentes dietéticas de almidones y azúcares para reponer nuestras reservas de CHO. Sin una ingesta adecuada de ellos, los músculos y el hígado pueden quedar desprovistos de su principal fuente de energía (Williams, 2006).

LÍPIDOS

Los lípidos se usan como fuente de energía. En el organismo se ocupa mucha más lípidos que CHO y la reserva energética de lípidos es mucho mayor que la de CHO. Pero los lípidos son menos accesibles para el metabolismo celular, porque primero deben ser reducidos desde su forma compleja (triglicéridos) a sus componentes básicos glicerol y ácidos grasos libres. Sólo éstos se pueden usar para formar ATP. Se obtiene sustancialmente más energía de una cantidad determinada de lípidos (9 kcal/g) que de la misma cantidad de CHO (4 kcal/g). No obstante el ritmo de liberación de energía de los lípidos es demasiado lento para satisfacer todas las demandas de energía de la actividad muscular intensa (Williams, 2006).

PROTEÍNAS

El proceso por el que las proteínas o las grasas se convierten en glucosa recibe el nombre de gluconeogénesis. Alternativamente, las proteínas pueden convertirse, a través de una serie de reacciones, en ácidos grasos. Esto recibe el nombre de lipogénesis.

Las proteínas pueden aportar entre el 5% y el 10% de la energía necesaria para mantener un ejercicio prolongado. Sólo las unidades más básicas de las proteínas (los aminoácidos) pueden usarse para obtener energía. Un gramo de proteína genera alrededor de 4.1 kcal (Williams, 2006).

3.5.4. BIOENERGÉTICA: PRODUCCIÓN DE ATP

La mayor parte de la energía liberada durante la oxidación de CHO, lípidos y proteínas proviene del ciclo del ácido cítrico. En el transcurso de la oxidación de la

acetil-CoA y como resultado de la actividad de deshidrogenadas específicas en el ciclo, se forman equivalentes reductores en forma de hidrógeno o electrones. Estos equivalentes reductores entran a la cadena respiratoria y en ella se generan grandes cantidades de ATP durante el proceso de la fosforilación oxidativa. Liberando 7.6 kcal/mol de ATP (Wilmore y Costilla, 2004 b) (Fig. 3).

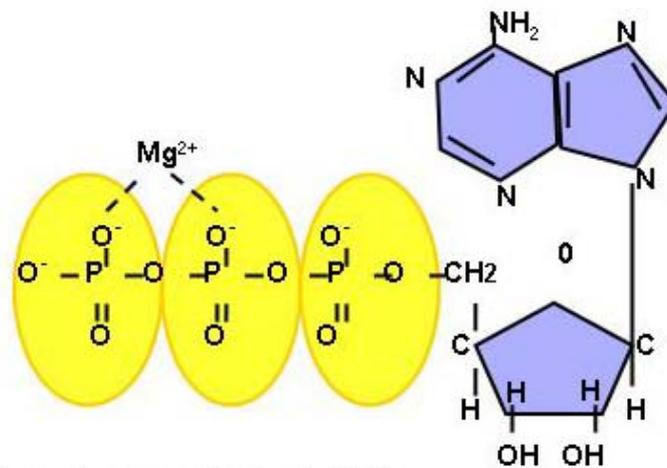


Fig. 3. Estructura de una molécula de ATP.

Adaptado de: Mayes, 2001

Estructura de una molécula de ATP, donde aparecen los enlaces de fosfato de alta energía, cuando el tercer fosfato de la molécula de ATP se separa de la adenosina por la acción de la ATPasa, se libera energía.

El proceso de almacenaje de energía formando ATP a partir de otras fuentes químicas recibe el nombre de fosforilación. Mediante varias reacciones químicas, un grupo fosfato se añade a un compuesto relativamente bajo en energía, el adenosindifosfato (ADP), convirtiéndose en ATP. Cuando estas reacciones se producen sin oxígeno, el proceso recibe el nombre de metabolismo anaeróbico. Cuando estas reacciones tienen lugar con la ayuda de oxígeno, el proceso global se denomina metabolismo aeróbico, y la conversión aeróbica de ADP a ATP es la fosforilación oxidativa.

Para comprender los límites de la actividad física, son extraordinariamente importantes las medidas cuantitativas especiales de las actividades de tres sistemas metabólicos: el sistema ATP-fosfocreatina (FC) o sistema de fosfágeno, sistema glucolítico o sistema glucógeno-ácido láctico y el sistema oxidativo o sistema aeróbico (Wilmore y Costilla, 2004 b).

SISTEMA DE FOSFAGENO (ATP-FC)

El más sencillo de los sistemas energéticos es el sistema ATP-PC. Además del ATP, las células tienen otra molécula de fosfato altamente energético que almacena energía. Esta molécula llamada fosfocreatina (FC) se muestra en la Fig. 4 (Guyton, 2001). A diferencia del ATP, la energía liberada por la descomposición del PC no se usa directamente para realizar trabajo celular. En vez de esto, reconstruye el ATP, la energía liberada por la descomposición de la FC no se usa directamente para realizar trabajo celular.

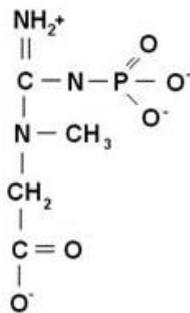


Fig. 4. Fórmula desarrollada de la fosfocreatina ó fosfato de creatina

Adaptado de: Sergeyeovich y Dmitriyevich, 2004.

La liberación de energía por parte del PC es facilitada por la enzima creatincinasa, que actúa sobre el PC para separar el Pi de la creatina. La energía liberada puede usarse entonces para unir Pi a una molécula de ADP, formando ATP. Con este sistema, cuando la energía es liberada por el ATP mediante la liberación de un grupo fosfato, las células pueden evitar el agotamiento del ATP reduciendo PC,

proporcionando energía para formar más ATP. El enlace del fosfato de alta energía de la fosfocreatina tiene más energía que el enlace del ATP (10.3 calorías por molécula, en comparación con 7.3). Por tanto, la fosfocreatina puede fácilmente proveer suficiente energía para reconstituir los enlaces de alta energía del ATP. La mayor parte de las células musculares poseen entre dos y cuatro veces más fosfocreatina que ATP, por tanto el trabajo muscular es más eficiente (Wilmore y Costilla, 2004 b).

SISTEMA GLUCOLÍTICO

Otro método de producción de ATP implica la liberación de energía mediante la degradación (lisis) de la glucosa. Este sistema se llama sistema glucolítico, puesto que incluye el proceso de la glucólisis, que es la descomposición de la glucosa a piruvato mediante las enzimas glucolíticas.

La glucosa es el 99% de la cantidad total de azúcares que circulan por la sangre. La glucosa de la sangre procede de la digestión de los CHO y de la descomposición del glucógeno hepático. El glucógeno es sintetizado a partir de la glucosa por un proceso llamado glucogénesis. Se almacena en el hígado o en los músculos hasta que se necesita. El glucógeno almacenado en el músculo se fragmenta y cada molécula de glucosa en dos moléculas de ácido pirúvico liberando energía para formar dos moléculas de ATP. El ácido pirúvico entra en la mitocondria de las células musculares reaccionando con el oxígeno para formar aún más moléculas de ATP. Sin embargo, si la cantidad de oxígeno para esta segunda etapa (la etapa oxidativa) del metabolismo de glucosa es insuficiente, la mayor parte del ácido pirúvico se convierte en ácido láctico, el cual, sale de las células musculares hacia el líquido intersticial y la sangre. Por lo tanto, en efecto, mucho del glucógeno muscular es convertido en ácido láctico, pero al hacerlo se forman cantidades considerables de ATP sin consumir oxígeno en absoluto. Este sistema glucógeno-ácido láctico puede proporcionar 1.3 a 1.6 minutos de actividad muscular máxima además de los 8 a 10 proporcionados por el sistema de fosfágeno (Wilmore y Costilla, 2004 b).

SISTEMA OXIDATIVO

El sistema final de producción de energía celular es el sistema oxidativo. Éste es el más complejo de los tres sistemas energéticos. El proceso mediante el cual el cuerpo descompone combustibles con la ayuda de oxígeno para generar energía se llama respiración celular. Dado que se emplea oxígeno, éste es un proceso aeróbico. Esta producción oxidativa de ATP se produce dentro de las mitocondrias.

Los músculos necesitan un aporte constante de energía para producir continuamente la fuerza necesaria durante las actividades de larga duración. A diferencia de la producción anaeróbica de ATP, el sistema produce una tremenda cantidad de energía, por lo que el metabolismo aeróbico es el método principal de producción de energía durante las pruebas de resistencia. Esto impone considerables demandas a la capacidad del cuerpo para liberar oxígeno en los músculos activos (Wilmore y Costilla, 2004 b).

3.5.5. METABOLISMO EN EL EJERCICIO

METABOLISMO DE LAS PROTEÍNAS

La proteína es una fuente menor de combustible durante el reposo, por lo general aporta menos de 5% del gasto total de energía. Sin embargo, debido a su importancia nutricional, se ha intentado determinar el efecto del ejercicio en el balance y requerimiento de proteína.

En el músculo pueden metabolizarse seis aminoácidos, lo cual brinda el nitrógeno necesario para la síntesis de amoníaco, alanina y glutamina. Durante el ejercicio, particularmente en el ejercicio aeróbico prolongado, se ha observado la salida de amoníaco, glutamina y alanina del músculo. Estos tres productos acarrean el exceso de nitrógeno del músculo hacia otras partes del cuerpo, más notablemente al hígado, para el reciclaje o conversión a urea (Williams, 2006).

El amoníaco, un subproducto nitrogenado del catabolismo de las proteínas, es un indicador de ruptura aumentada de aminoácidos musculares. Aunque no se ha identificado el mecanismo subyacente, se cree que los niveles altos de amoníaco en el cuerpo se han relacionado con la fatiga, de alguna manera comparable con la acumulación de ácido láctico. Otra teoría dice que los niveles altos de amoníaco en el músculo pueden trastornar los procesos oxidativos, disminuyendo de esta manera la producción de energía, mientras que otra sugiere que el aumento de amoníaco en el plasma puede dañar las funciones cerebrales e inducir fatiga central. Debido a que el amoníaco se forma en el músculo a partir del grupo amino, la eliminación del grupo amino por la alanina o la glutamina puede ayudar a disminuir la producción de amoníaco y retrasar la presentación de fatiga.

La glutamina liberada del músculo también aumenta durante el ejercicio, y es un combustible importante para varias células en el cuerpo, particularmente para el sistema inmunitario.

El principal aminoácido de cadena ramificada en el músculo que se oxida durante el ejercicio. Se ha demostrado que la oxidación de la leucina aumenta durante el ejercicio. En esencia, el grupo amino del catabolismo de la leucina eventualmente se combina con el piruvato en la célula muscular para formar alanina y el cetoácido alfa residual. Este último puede entrar en el ciclo de Krebs y usarse para producción de energía. La alanina se libera hacia el torrente sanguíneo y se transporta al hígado en donde se convierte en glucosa, entonces este puede liberarse hacia la sangre para usarse en sistema nervioso central y eventualmente encontrar su camino hacia el músculo contráctil para emplearse como una fuente de energía. La alanina parece ser el medio más importante de transporte del grupo amino hacia el hígado para la excreción como urea. (Williams, 2006).

Este proceso general que involucra a la gluconeogénesis, conocido como el ciclo glucosa-alanina se muestra en la Fig. 6.

Así, la proteína (aminoácidos) puede utilizarse durante el ejercicio para proveer energía directamente en el músculo y por la glucosa producida en el hígado, particularmente cuando los depósitos corporales de glucógeno y glucosa son bajos.

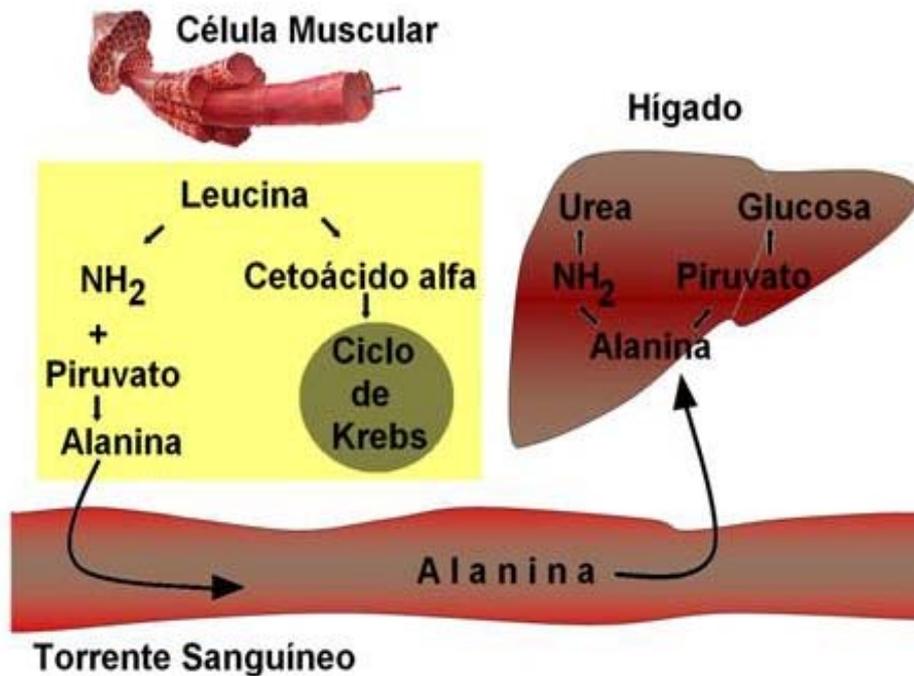


Fig. 5. Ciclo glucosa-alanina
Adaptado de: Melvin, 2006.

La alanina puede producirse en el tejido muscular a partir de la rotura de otros aminoácidos, el más notable es la leucina. La alanina es entonces liberada hacia la sangre y viaja al hígado para una conversión eventual a glucosa a través del proceso de gluconeogénesis.

Es importante mencionar como los CHO de la dieta influyen la proteína como fuente de energía durante el ejercicio. Una dieta baja en CHO que origina la disminución de niveles de glucógeno muscular provocará una mayor dependencia en la proteína como fuente de energía. Por otro lado, la adecuada ingesta de CHO antes y durante el ejercicio prolongado ayudará a reducir el uso de proteína corporal para este propósito, debido a que la presencia de glucógeno muscular adecuado parece inhibir a las enzimas que catabolizan la proteína muscular.

Aunque la evidencia disponible sugiere que el metabolismo de la proteína y su uso como fuente de energía están aumentados durante el ejercicio, la magnitud de su contribución puede depender de varios factores, como la intensidad y duración del ejercicio, y la disponibilidad de otros combustibles, como el glucógeno, en el músculo (Williams, 2006).

3.5.6. EFECTO DEL EJERCICIO EN EL METABOLISMO DE LAS PROTEÍNAS

La síntesis de proteínas parece predominar en los músculos durante la recuperación. Con el entrenamiento, o sesiones repetidas de ejercicio regular, los cambios en la estructura y función muscular son aditivos. Numerosos estudios han encontrado que después del ejercicio de resistencia, el balance de las proteínas se vuelve positivo. Los individuos entrenados, durante el reposo, experimentan una oxidación preferente de la grasa y ahorro de proteínas, como se mide por el metabolismo de la leucina y el cociente respiratorio. La actividad específica del ejercicio aparentemente estimula el ADN en el núcleo de la célula muscular para aumentar la síntesis de proteínas, y el tipo de ésta que se sintetiza es específico para el tipo de ejercicio. El ejercicio aeróbico estimula la síntesis de enzimas mitocondriales y oxidativas, las cuales se componen de proteínas y son necesarias para la producción de energía en la síntesis de oxígeno. El entrenamiento de resistencia promueve la síntesis de proteínas musculares contráctiles. Estas adaptaciones son los factores clave subyacentes al mejor desempeño (Williams, 2006).

Además de sus efectos favorables para aumentar la proteína estructural y funcional, importantes para el ejercicio aeróbico de resistencia o de fuerza, el entrenamiento puede influenciar el metabolismo de las proteínas en otras formas para ayudar a prevenir la fatiga prematura. El entrenamiento aeróbico de resistencia mejora la capacidad de la célula muscular para usar CHO y grasa como fuente de energía durante el ejercicio. Aunque no existe evidencia extensa disponible, se ha observado que después del entrenamiento de resistencia los músculos parecen desarrollar el

potencial para una mayor capacidad de oxidación de leucina y otros aminoácidos de cadena ramificada, los cuales son una fuente abundante de energía en los músculos. Así, el entrenamiento de resistencia puede aumentar la capacidad del músculo para derivar energía de proteína en una forma similar al aumento en la utilización de grasa, otras posibles medidas para ahorrar el uso de CHO son la glucosa sanguínea y el glucógeno muscular. Aunque estos cambios no parecen ahorrar el uso de proteína muscular, pero sí el de CHO, y de esta manera pueden ayudar a prevenir la fatiga (Williams, 2006).

En estos cambios relacionados con el entrenamiento apropiado parecen representar otros medios por los cuales el cuerpo se adapta al entrenamiento de resistencia con el fin de prevenir la fatiga. Por otro lado, el entrenamiento excesivo produce el síndrome de sobreentrenamiento relacionado con una disminución persistente en los aminoácidos plasmáticos, particularmente en la glutamina.

El efecto del entrenamiento en la producción de un balance de nitrógeno positivo o un balance proteico positivo, y posiblemente el efecto de prevenir el síndrome de sobreentrenamiento, depende de un aporte adecuado de proteínas y calorías en la dieta (Williams, 2006).

3.5.7. EFECTOS DE LA ACTIVIDAD FÍSICA EN LA SALUD.

El ejercicio tiene un poderoso papel en el mantenimiento de una óptima salud física. De hecho, la American Heart Association recientemente reconoció que un estilo de vida sedentario sin realizar ejercicio físico, o la inactividad física es tan importante como el fumar, hipertensión o colesterol alto en su contribución al desarrollo de enfermedad cardiovascular (Guyton, 2001). El ejercicio contribuye a una buena salud en dos formas. Primero, a largo plazo la realización de actividad física contribuye a la prevención de muchas enfermedades crónicas modernas; segundo, el ejercicio

ayuda a la rehabilitación de este mismo tipo de enfermedades (Sergeyevich y Dmitriyevich, 2004).

La actividad física puede mejorar la calidad de vida y reducir los síntomas de muchos desordenes clínicos, incluyendo la obesidad, diabetes tipo 2, enfermedad coronaria. Los efectos de la actividad física en el músculo esquelético son mediados por la activación de la cascada de señalización músculo-específica que incrementa la masa muscular, los niveles de proteína citoesquelética, y la fuerza de contracción sin incrementar el número de miofibrillas (Sergeyevich y Dmitriyevich, 2004).

4. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La encefalopatía hepática es una complicación frecuente de la cirrosis hepática que suele verse en pacientes con insuficiencia hepática grave. (Lizardi y col., 2003).

Alrededor de 28% de los pacientes con insuficiencia hepática crónica o cirrosis desarrollarán encefalopatía hepática durante el transcurso de su enfermedad, usualmente 10 años después del diagnóstico de cirrosis. La encefalopatía hepática ha ganado importancia en la práctica clínica porque su presencia se asocia a un claro deterioro de la calidad de vida del paciente cirrótico y la incapacidad para realizar sus actividades normales diarias (Duarte y col., 2007).

5. JUSTIFICACIÓN

Los avances en el entendimiento de la fisiopatología de la encefalopatía hepática han permitido reconocer a la GS como una enzima que puede participar activamente en el metabolismo extrahepático del amonio. (Chatauret y col., 2006)

Un estudio experimental analizó la capacidad de remoción de amonio, mediante el metabolismo de la glutamina sintetasa en ratas con hiperamonemia por falla hepática aguda, demostrando que el músculo es capaz de incrementar la remoción de amonio circulante mediante la inducción de esta enzima (Chatauret y col., 2006). Otros estudios experimentales han evidenciado que el músculo puede convertirse en el principal tejido responsable del metabolismo del amonio en modelos animales de cirrosis. En un modelo de ejercicio en ratas con cirrosis se observó que esta intervención fue capaz de disminuir los niveles de glutamato e incrementar los de glutamina, lo que hace suponer que se logro inducir la actividad de GS (Duarte y col., 2007). Esto hace suponer que las medidas que logren incrementar el metabolismo muscular del amonio pueden dar lugar a una modalidad preventiva y terapéutica efectiva.

Sin embargo hoy en día no existe un estudio que demuestre que la realización de ejercicio físico controlado en humanos logre inducir GS. Por tanto, sería de importancia determinar si el ejercicio es capaz de inducir la expresión del ARNm de glutamina sintetasa en los linfocitos de sangre periférica para atenuar la toxicidad del amonio y retrasar el curso natural de la enfermedad y por tanto poder utilizarse como una posible medida terapéutica en pacientes que cursen episodios de encefalopatía hepática. Así mismo determinar si un período de ejercicio aeróbico moderado cotidiano aumenta los niveles basales del ARNm de la GS en músculo esquelético contribuyendo a la destoxicación hepática del amonio para así poder tener una nueva alternativa en la prevención de los síntomas de encefalopatía hepática en pacientes con cirróticos estables (Torre-Delgado y col., 2002; Duarte y col., 2007).

6. OBJETIVO GENERAL

Medir la expresión génica del ARN de GS en sangre periférica de sujetos sanos antes y después de realizar ejercicio controlado.

7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar los niveles de expresión del ARNm de GS en sangre periférica de mujeres y hombres sanos de 3 grupos de edad antes y después de realizar ejercicio controlado.
- Realizar un análisis de cuantificación relativa comparando los niveles de expresión del RNA de GS pre y post ejercicio.
- Comparar los niveles de expresión de ARNm de GS entre mujeres y hombres
- Medir la expresión génica de GS en biopsias de 10 mujeres obesas antes y después de ser sometidas a 3 meses de ejercicio aeróbico moderado.
- Relacionar los niveles de expresión de ARNm de GS en biopsias de músculo y sangre periférica.

8. HIPÓTESIS NULA

La expresión de GS no aumenta después de la realización de ejercicio físico moderado.

8.1 HIPÓTESIS ALTERNA

La expresión de GS es igual antes y después de realizar ejercicio físico moderado.

9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1 DIAGRAMA METODOLÓGICO

En las figuras 8 y 9 se muestran los diagramas en forma secuencial la metodología en las muestras de sangre periférica como en las biopsias de músculo esquelético.

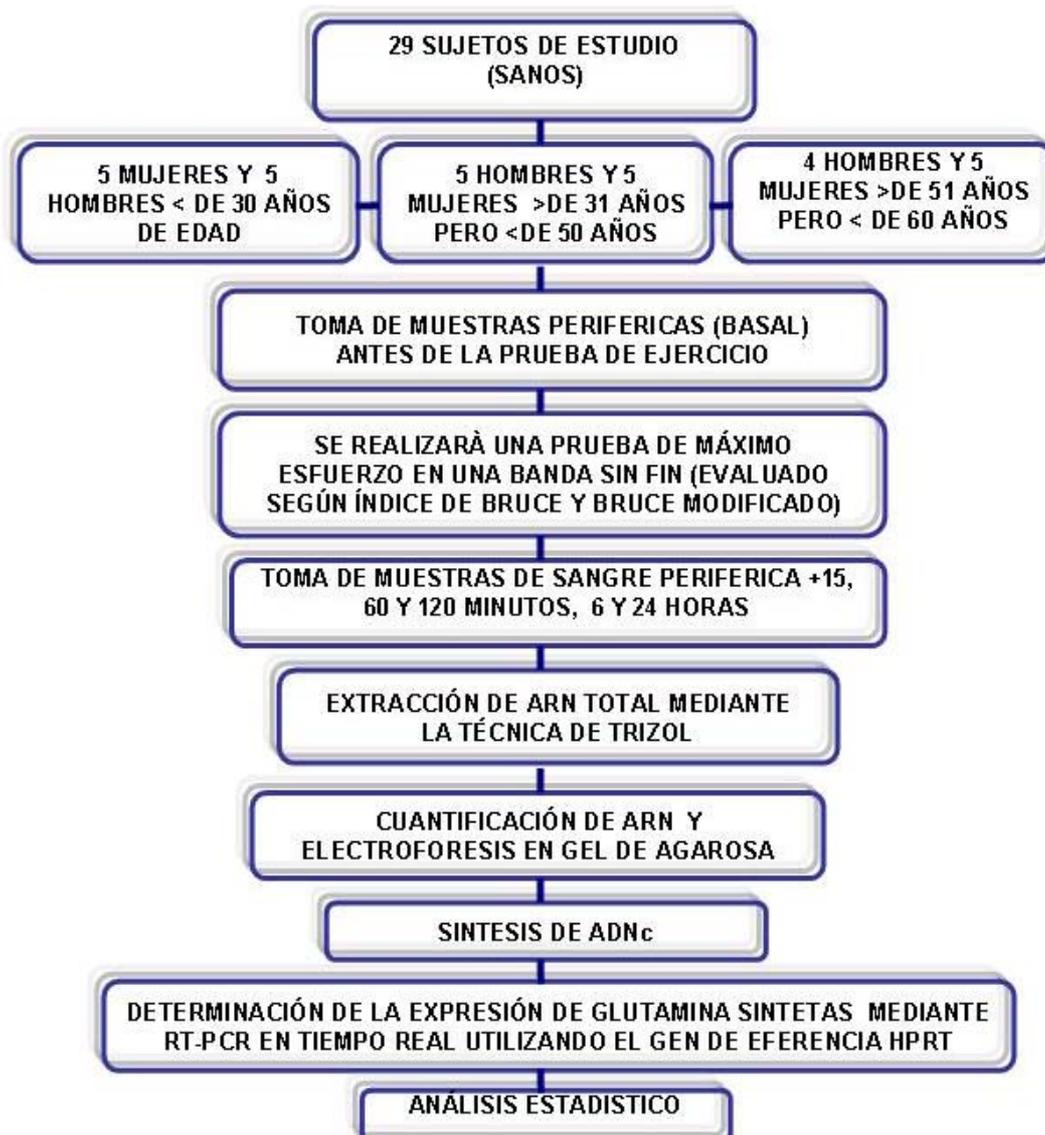


Fig. 8 Diagrama metodológico para muestras de sangre periférica

Se muestra la secuencia que se siguió para poder obtener la expresión génica de GS con respecto a las muestras de sangre periférica de 29 sujetos sanos sometidos a una prueba de máximo esfuerzo

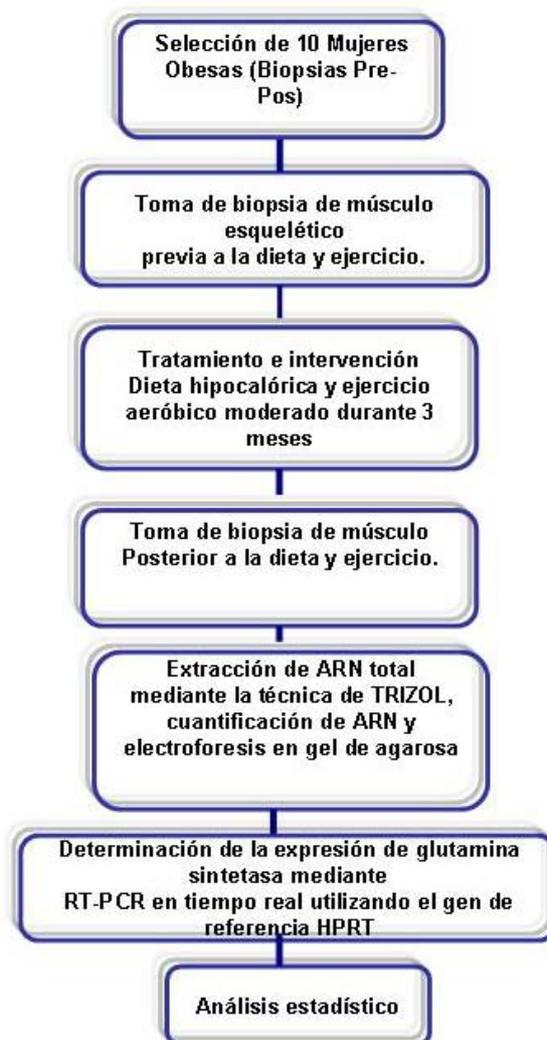


Fig. 9 Diagrama metodológico para biopsias de músculo esquelético

En esta figura se muestra la secuencia que se siguió para poder obtener la expresión génica de GS con respecto a las muestras de biopsias de 10 mujeres obesas.

9.2 DESCRIPCIÓN

Se incluyeron de forma aleatoria 29 sujetos clínicamente sanos divididos en 3 grupos con respecto a edad y género; de 20 a 30 años (5 hombres y 5 mujeres), de 31 a 50 (5 hombres y 5 mujeres), de 51 a 60 (4 hombres y 5 mujeres), quienes realizaron una prueba ergonómica a máximo esfuerzo evaluadas según índice de Bruce y Bruce modificado (American College of Sports Medicine, 2007.) que consiste en realizar

ejercicio controlado en un aparato de banda sin fin; en relación al máximo de pulsaciones permitidas de acuerdo al género y edad. Con las siguientes condiciones para ser incluidos en el estudio: no haber realizado ejercicio físico 72 h previas así como no haber consumido ningún tipo de bebida alcohólica. A los individuos participantes se les administró dos horas antes al ejercicio una fórmula dietética definida de 355 kcal.

La expresión génica de la GS se obtuvo a partir de muestras de sangre periférica. Se tomaron aproximadamente 3mL de sangre en tubos BD Vacutainer® con anticoagulante EDTA (ácido etilen-diamino-tetra-acético; concentración 0.342 mol/L, pH 7.2) colectadas en seis tiempos: previa al ejercicio (basal) y posterior al ejercicio a los 15, 60, 120 minutos, 6 y 24 h.

Para el caso de las biopsias de músculo esquelético; se reclutaron 10 mujeres con IMC de 30 a 40 Kg/m² de 20 a 50 años de edad sometidas a la toma de biopsia de músculo previa a realizar ejercicio aeróbico moderado (caminata en un aparato de banda sinfin) y a la administración de una dieta hipocalórica personalizada (en base a su peso, talla y edad); que realizaron durante 3 meses. Una vez terminado el programa se tomó una segunda biopsia muscular. Las biopsias fueron almacenadas en crioviales con solución estabilizadora de ARN (RNAlater®) a -70°C.

9.1.1 CRITERIOS DEL PROTOCOLO SANGRE PERIFÉRICA

9.1.2 Criterios de exclusión

- Mujeres y hombres presuntamente sanos (de 20 a 60 años de edad)
- Personas que acepten ser sometidas a toma de muestras de sangre periférica de los 6 diferentes tiempos.
- Personas que acepten realizar la prueba de ejercicio a máximo esfuerzo.
- Personas sedentarias

9.1.3 Criterios de exclusión

- Personas con algún padecimiento físico que no les permita realizar la prueba de ejercicio.
- Personas con alguna patología diagnosticada.

9.1.4 Criterios de eliminación

- Ejercicio previo antes de 72 h a la prueba
- No haber consumido la formula dietética establecida
- No hayan cumplido con las tomas de sangre necesaria
- Personas que hayan consumida algún tipo de medicamento previo al ejercicio.

BIOPSIAS

9.1.5 Criterios de inclusión

- Mujeres
- Índice de masa corporal de 30 a 40 kg/m²
- Edad de 20 a 50 años
- Pacientes que no padezcan otra enfermedad crónica degenerativa.
- Personas que acepten donar biopsias de músculo esquelético.
- Que tengan disponibilidad de tiempo, a las sesiones de ejercicio

9.1.6 Criterios de exclusión

- Mujeres con IMC menor a 30 o mayor a 41 kg/m²
- Mujeres menores de 18 años o mayores de 60 años de edad
- Pacientes con diabetes, enfermedades cardiovasculares.
- Pacientes que hayan seguido algún tratamiento para reducción de peso < a 3 meses
- Pacientes que estén tomando algún tratamiento hormonal

9.1.7 Criterios de eliminación

- Personas que se hayan negado a la toma de biopsia
- Pacientes que no se adhieran al tratamiento
- Pacientes que no acudan a sus sesiones de ejercicio
- Que la biopsia obtenida no sea suficiente para extracción de ARN

9.2 MATERIALES Y REACTIVOS

REACTIVOS:

EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ARN

- Solución amortiguadora intermediaria de rompimiento de células (TRIzol® Reagent, Invitrogen®)
- Solución de estabilizadora de RNA (RNA later ® Tissue Collection Ambion®)
- Cloroformo CHCl₃ (Reactivos J.T. Baker®)
- Isopropanol C₃H₈O (SIGMA®)
- Alcohol Etilico al 75%. CH₃CH₂OH (Ferm. nt®)
- Enzima para inhibición de DNA DNase I recombinant, RNase-free® (ROCHE®)
- Inhibidor protector de ARNasa® VolAct: 40u/uL (50 ul) (ROCHE®)
- Agua grado PCR H₂O (ROCHE®)
- Agarosa grado analítico (Promega®)
- Bromuro de Etidio (10 mg/dL)
- Solución amortiguadora de TBE Tris Borato de EdtA 10% y 1% (Tris-Hcl 0.9 M (pH=7), Acido bórico 0.9M, NA₂EDTA.2H₂O 2.5mM)
- Agua DEPC (dietilpirocarbonato)

RETROTRANSCRIPCIÓN INVERSA (RT)

- Enzima transcriptasa reversa M-MLV (Promega®) (>5Kb)
 - M-MLV RT Buffer 5 X (concentrado al 5µL)
- Iniciador Random Hexamero 600µM(Roche®)

- Inhibidor de ARNasa® VolAct: 40u/uL(50 µL) (ROCHE®)
- Mezcla de desoxirribunucleotidos
 - dATP, 10µM
 - dCTP, 10µM
 - dGTP, 10µM
 - dTTP, 10µM
- Agua grado PCR H₂O (ROCHE®)

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

- Reactivos para la mezcla maestra de reacción (Roche)r®
 - Enzima (concentración 5x)
 - Mezcla de reacción (concentración 5x)
 - Agua grado PCR (2 x 1 mL)
- Sonda de la librería humana # 28 (GS) y # 73 (HPRT gen constitutivo) (Roche®). Ver anexos en la pagina 69.
- Iniciador de glutamina sintetasa para humana (GLUL) derecha he izquierda (Roche®) Iniciador para HPRT para humano derecha he izquierda.
- Muestra de ADNc

Materiales:

- Pipetas 10mL, 20mL, 100mL, 200mL y 1000mL. (GILSON®)
- Pipetas de 0.2 a 2µL, 0.5 a 10µL, 20µL, 100µL (GILSON®)
- Pipetas de transferencia 5 mL (Kendall®)
- Microtubos 1.5, 0.6 mL (Axygen®)
- Puntas de acrílico para Micropipetas. 10, 50, 100 y 1000 µL (Axygen®)
- Tubos EDTA de 4 mL (BD Vacutainer®)
- Capilares de 20µL (Roche®)
- Caja fría de 2 a 8 °C (LigthCycler®) Adaptadores para centrifugación de capilares (Roche®)

- Dispositivo para taponar capilares (Roche®)
- Carrusel de 20µL (Roche®)
- Liberador de capilares (Roche®)

EQUIPO:

- Centrifuga Refrigerada Mikro 22 R (Hettich®)
- Centrifuga Sorvall TC6 (DU PONT®)
- Vortex (Maxi Mix II®)
- Fuente de Poder 3000 (BIO-RAD®)
- Cámara de Electroforesis Horizontal 58 (LIFE TECHNOLOGIES®)
- Balanza de Plato (OHAUS®)
- Microondas (Samsung®)
- Espectrofotómetro UV/VIS Lambda E2201 (Perkin Elmer®)
- Cámara de luz ultravioleta UVP. (Dual-intensity Transilluminator®)
- Homogenizador PT 1300 D. (Kinematica AG®)
- Termociclador convencional 9600 (Perkin Elmer®)
- Termociclador tiempo real LigthCycler 2.0® (Roche®)
- Computadora portátil Inspiron 600m (DELL®)

9.3 EXTRACCION DE ARN

La extracción de ARN se realizó por el método de isotiocianato de guanidina y fenol-cloroformo. Las muestras de sangre periférica aproximadamente 3 mL, se centrifugaron (Centrifuga Sorvall® TC6) a 20 min a 2200 revoluciones por minuto (rpm) a temperatura ambiente. Se obtuvieron dos fases. Se tomaron las células blancas que se encuentran entre el plasma y glóbulos rojos aproximadamente 300 µL; Se colocaron en un microtubo de 1.5 mL al que se le adicionaron 750 µL de solución amortiguadora (TRIzol®). Se homogeneizó en el vortex durante 60 segundos, consecutivamente se le adicionó 150 µL de cloroformo y nuevamente se homogeneizó con el vortex durante 15 segundos, se sometió a centrifugación a 4°C

durante 15 min a 14000 rpm. En la muestra se observaron 4 fases; de abajo hacia arriba la fase roja ó de proteínas, solución amortiguadora (TRIzol®), ADN y fase acuosa ó transparente donde se encuentra disuelto el ARN. Esta última se transfirió a un microtubo nuevo cuidando no succionar ADN. Siguiendo con la técnica se adicionaron 375 μ L de Isopropanol se mezcló por inmersión y se incubó de 5 a 10 min en hielo, se centrifugó a 4°C durante 10 min a 14000 rpm. Una vez que terminó la centrifugación se extrajo del microtubo el sobrenadante y se desechó (sin tocar el botón de ARN que se encontraba precipitado en el fondo del tubo). Se adicionó al mismo microtubo que contiene el botón; 750 μ L de etanol al 75%. Con esto se lavó el botón. Se centrifugó a 4°C x 2 minutos, se eliminó el etanol y se repitió el lavado. Se eliminó el etanol y se seco el botón durante 10 min aproximadamente a temperatura ambiente. El ARN ó botón se resuspende en 25 μ L de Agua DEPC (dietil pirocarbonato).

Con esta primer extracción el ARN no es puro, aun contiene ADN. Para poder obtener ARN con pureza satisfactoria se sometió el botón de ARN a tratamiento con los reactivos para inhibición de ADN y ARNasa de Roche® El Tratamiento se conformó por: solución amortiguadora 20 μ L, DNasa 2 μ L, Inhibidor 1.4 μ L, Agua 26.6 μ L y 25 μ L de ARN. Con un volumen final de 50 μ L. Se agregó a la muestra, se mezcló con vortex unos cuantos segundos y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 15 min. Se sometió el ARN nuevamente a una segunda extracción con TRIzol® siguiendo los pasos anteriores.

Para el caso de las biopsias de músculo esquelético; fueron almacenadas con solución estabilizadora de ARN de Ambion® como sustancia protectora del ARN, las biopsias fueron homogeneizadas con el homogenizador y el ARN total de las biopsias se obtuvo por medio de solución amortiguadora de rompimiento de células (TRIzol) siguiendo el procedimiento anterior de extracción.

9.4 INTEGRIDAD DEL ARN

Para corroborar la integridad del ARN de las muestras de sangre periférica como las de tejido se realizó electroforesis en gel de agarosa; La migración se realizó en gel de agarosa al 2%, en 35 mL de solución amortiguadora TBE. El ARN (1 μ L) se mezcló con azul de bromofenol (1 μ L) al 0.05% utilizado como colorante. La migración se efectuó a 65 volts por 20 min Se observó en un transiluminador de luz UV (Sambrook y cols., 1990).

9.5 CUANTIFICACION DEL ARN

Para la cuantificación de ARN se colocaron 498 μ L de agua DEPC + 2 μ L de ARN (dilución 1:250) en una celda de cuarzo. Se midió en espectrofotómetro la concentración (concentración = Absorbancia a 260 nm x Factor de Dilución (para ARN es 0.04 mg/ μ L) x dilución (250) = a concentración de ARN mg/ μ L) obtenida con una longitud de onda a 260 nm.

9.6 RETROTRANSCRIPCIÓN INVERSA (RT)

La ADN polimerasa dependiente de ARN (conocido como transcriptasa inversa) sintetiza moléculas de ADN utilizando como molde una cadena de ARN. Si se copian moléculas de ARNm se generan moléculas de ADN denominadas ADN copia o ADN complementario (ADNc), las cuales se caracterizan por contener únicamente los segmentos codificantes de un gen, es decir, carecen de intrones o secuencias no codificantes (Guízar, 2001 a). Esta reacción se realizó mediante la enzima transcriptasa reversa MMLV (Virus de la leucemia murina de Maloney) de Promega® la mezcla fue conformada por 5 μ L de M-MLV RT solución amortiguadora 5 X (concentrado a 5 μ M), 1.5 μ L de iniciador Random Hexamero de Roche®, 0.625 μ L de Inhibidor de ARNasa de ROCHE®, 1.25 μ L desoxinucleotidos (dATP, dCTP,

dGTP y dTTP) y Agua grado PCR (ROCHE®) cantidad variable según la cantidad de ARN. Se ajustó la concentración del ARN a 1ng/μL. Se sometió a 70°C por 5 minutos (templado) y una incubación de 60 minutos a 37°C en un termociclador convencional 9600 (Perkin Elmer®).

9.7 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La PCR permite producir en el laboratorio millones de copias de un segmento del gen que se desea analizar y que se encuentra en muy bajas cantidades en el material clínico a investigar (Guízar, 2001 b). La PCR se realiza en ciclos y cada uno comprende tres pasos: (tabla 5)

Desnaturalización: La reacción se calienta a altas temperaturas para reducir la doble hélice del ADN a cadenas simples. Estas cadenas se tornan accesibles a los iniciadores.

Amplificación: Se enfría la mezcla de reacción. Las cadenas se aparean con un par de oligonucleótidos sintéticos específicos, de los cuales uno es complementario al extremo 5´ del gen o fragmento de DNA que se desea amplificar y el otro se aparea con el extremo 3´ del mismo, pero en la cadena opuesta.

Los cebadores hibridan con las regiones complementarias de las cadenas del ADN patrón, y se forman nuevamente cadenas dobles entre los cebadores y las secuencias complementarias.

Enfriamiento: Los oligonucleótidos actúan como iniciadores para que la ADN polimerasa termoestable sintetice a partir de los cuatro desoxirribonucleótidos que usa como sustrato, las dos nuevas cadenas de ADNc a las cadenas originales. Este ciclo se repite 45 veces, lográndose en cada ciclo doblar la cantidad de ADN blanco.

Posteriormente, basta un análisis directo por cortes con enzimas de restricción o hibridaciones con sondas no radiactivas para comprobar la identidad del gen amplificado.

Tabla. 5 Parámetros PCR-Tiempo real

Análisis	Ciclos	Temperatura	Tiempo	Modo
	Pre-Incubación			
Ninguno	1	95°C	10 min	Ninguno
	Amplificación			
Cuantificación	Desnaturalización	95°C	10 s.	Ninguno
45 ciclos	Alineación	60°C	30 s.	Ninguno
	Extensión	72°C	1 s.	Único
	Enfriamiento			
Ninguno	1	40°C	30 s.	Ninguno

Adaptada de Roche Applied science. LightCycler® TaqMan® Master, 2007.

La expresión de GS se determinó mediante PCR en Tiempo Real (Termociclador LigthCycler 2.0 de Roche®). Los procesos de amplificación y detección se produjeron de manera simultánea en el mismo capilar de 20µL (Roche®), mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN formado. A la mezcla se le adicionaron 2.0 µL de la mezcla maestra de reacción (Roche®), 0.1 µL del iniciador de glutamina sintetasa para humano (GLUL) (Roche®) los cuales se han diseñado de tal manera que estén entre dos exones, para evitar posibles amplificación de ADN genómico contaminado, que podría dar falsas señales de expresión génica: Iniciador sentido 0.2 µL (1µM) Iniciador antisentido 0.2 µL (1µM), Las sondas utilizadas fueron las de hidrólisis, denominadas también sondas TaqMan marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor (Costa, 2004); se utilizó la Sonda de la librería humana # 28 para GS, (Roche®), 2.5 µL de ADNc (1 µg/µL) y 5 µL de H₂O. Se utilizó HPRT como gen de referencia utilizando la Sonda # 73 (Roche®). En la Figura 7. Se muestra dicha reacción.

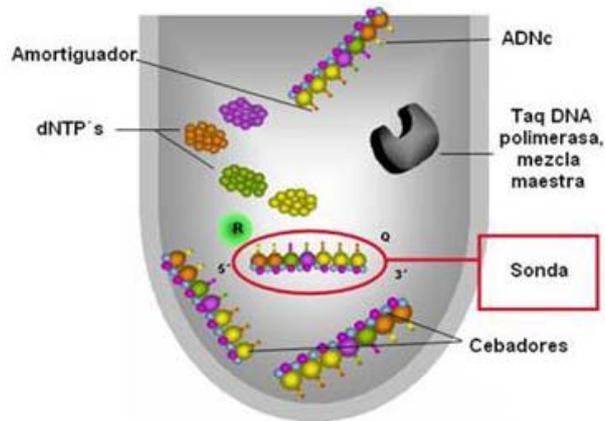


Fig. 6 Componentes de la mezcla de reacción de PCR
 La reacción de PCR esta compuesta de: Mezcla maestra TaqMan® (solución amortiguadora, dNTP's), Sondas específicas, cebadores y agua. Se ejemplifica el capilar con la reacción lista para introducirse al termociclador.

9.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se hizo análisis estadístico con el programa SPSS® para Windows versión 13.0 Las diferencias entre los grupos fueron calculadas usando las pruebas no paramétricas de Friedman y Wilcoxon. Los coeficientes de correlación fueron calculados usando la prueba de correlación bivariada de Spearman. Las significancia estadística fue inferida como significativa para los valores de $P < 0.05$.

10. RESULTADOS

10.1 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA Y CUANTIFICACIÓN DEL ARN

Se comprobó la integridad del ARN por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2 % (Sambrook y col., 1990). En la Fig.10 se observan 6 muestras de sangre periférica correspondientes a los diferentes tiempos incluidos en el estudio; así como las biopsias de músculo esquelético pre y pos ejercicio. El promedio de pureza del ARN para cada muestra fue de 1.85; siendo 2 el valor referente por excelencia. Se obtuvo un rendimiento total de ARN de 15 µg promedio para cada muestra.

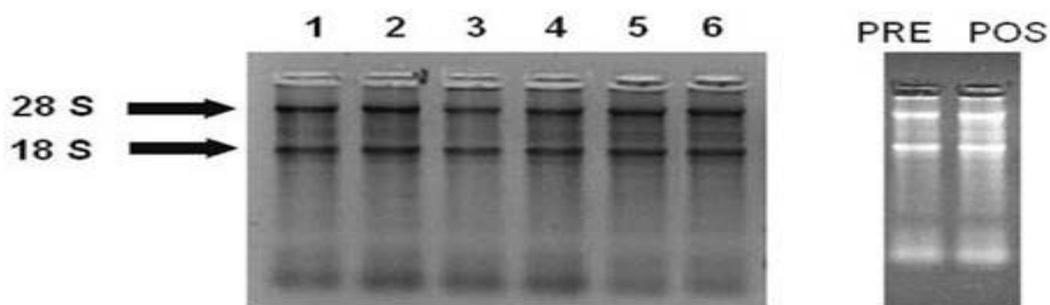


Fig. 7 Ejemplo de bandas de ARN de sangre periférica y biopsias extraídas por la técnica de TRIzol® y Tratado con ADNasa
Se observan 6 muestras de ARN de sangre periférica de un mismo paciente, al igual que el ARN de biopsias pre y pos ejercicio. 28 s y 18 s muestran el ARN ribosomal. 1) Basal 2)15 min 3)60 min 4)120 min 5) 6h 6) 24h

10.2 CURVAS DE AMPLIFICACIÓN DE LA PCR

El programa del aparato de PCR a tiempo real registró el incremento de fluorescencia (proporcional al aumento de ARN) en cada ciclo; esta información se reflejó gráficamente en curvas de cinética de la reacción para cada una de las muestras y controles. Por tanto, se pudo controlar la amplificación en las fases iniciales, cuando la concentración de los reactivos todavía no era limitante y el efecto de la variabilidad en la eficiencia de amplificación es menos importante.

Para cada muestra el programa calculó el número de ciclo en el que el lector empieza a detectar un incremento de fluorescencia significativo, con respecto a la señal de base. El ciclo en el que se empezó a detectar el aumento de fluorescencia se denomina punto de cruce o ciclo umbral y es inversamente proporcional a la concentración inicial de ARN diana presente en la muestra. Con las concentraciones previamente conocidas de los controles externos y sus puntos de cruce correspondientes se dibujó una curva patrón. Interpolando en ella los valores de los puntos de cruce de cada muestra problema pudiéndose inferir su concentración de ARN inicial. Para corroborar que las concentraciones tanto de la sonda, como de ADNc que se utilizaron para la reacción de PCR fueran las correctas se realizaron corridas de estandarización y de calibración a diferentes concentraciones. Dando como resultado las concentraciones mencionadas en los materiales y métodos apartado PCR.

Se realizaron curvas de amplificación obtenidas a partir de diluciones seriales de ADNc de linfocitos de sangre periférica (1:1, 1:5, 1:25, 1:50), obteniendo como resultado la curva de calibración y una eficiencia aceptable de 1.875 (85%) con un error de regresión lineal de 0.00331 para el gen blanco GS y para el gen constitutivo HPRT (Figura 8).

Una vez comprobada la eficiencia de la amplificación para el gen blanco y para el gen constitutivo, se determino la expresión de ambos genes en muestras de ADNc de sangre periférica de las personas incluidos en el estudio (Figura 9).

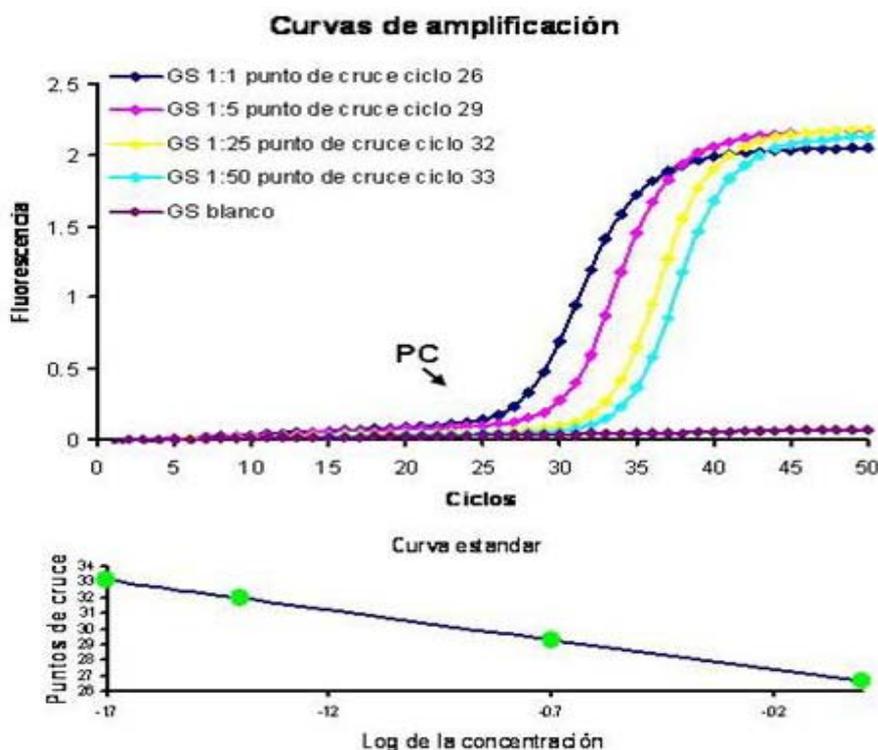
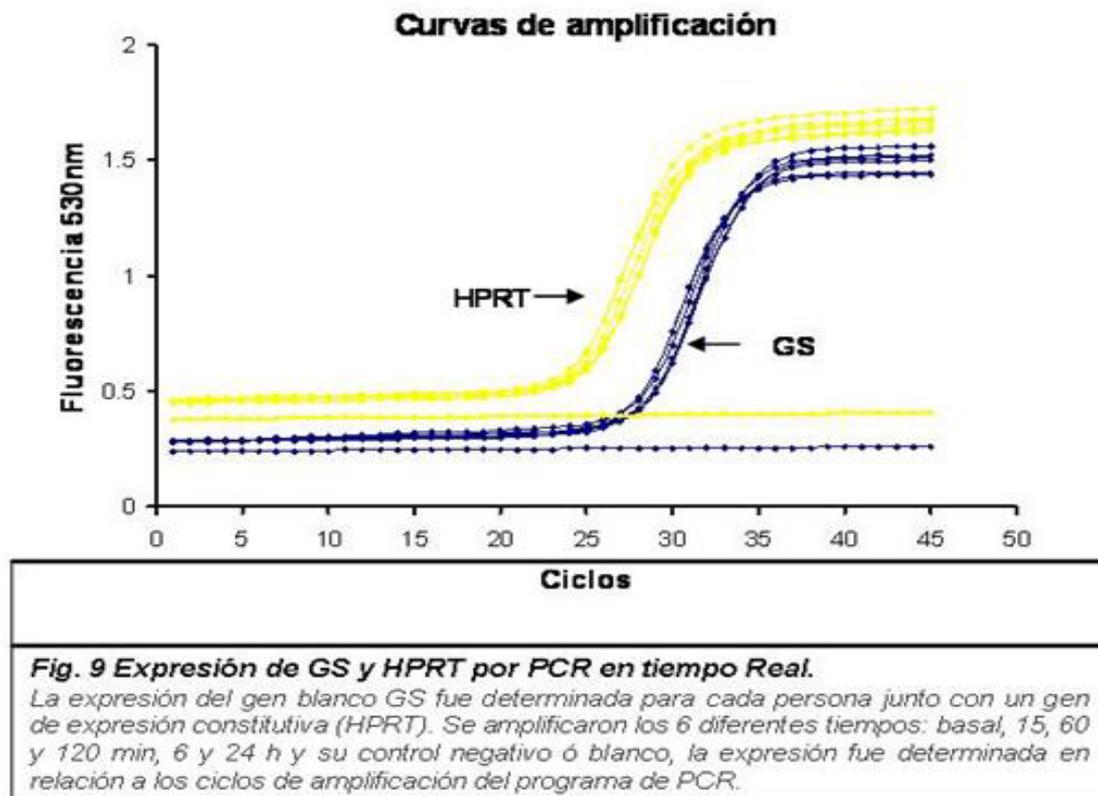


Fig. 8 Eficiencia de amplificación de GS mediante curvas de calibración. Curvas de amplificación de GS con diferente concentración de ARN en las que se muestra la fluorescencia contra los ciclos de amplificación. Cada una de las muestras con puntos de corte distinto, pudiéndose inferir su concentración de ARN inicial hasta su saturación final por medio del programa específico del Termociclador LigthCycler 2.0 de Roche®. La cinética de amplificación de GS esta representada por 4 puntos de cruce contra el logaritmo de la concentración. Se muestra la linealidad de la reacción en la curva estándar al graficar los puntos de cruce de la amplificación de GS; representada por 4 puntos de cruce contra el logaritmo de la concentración. El punto de cruce se representa con puntos sobre la línea es el ciclo en el que se empieza a detectar el aumento de fluorescencia.



10.3 EXPRESION DE GS PARA MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA.

Los participantes fueron divididos en 6 grupos respecto a edad y genero. Se realizó un análisis de correlación de la expresión de GS en relación a la composición corporal de los participantes en el estudio, así mismo se determinaron las diferencias entre los grupos. Se encontraron diferencias significativas en cuanto el IMC entre el grupo de hombres menores de 30 años ($26.7 \pm 4.3^*$) y el grupo de mujeres mayores a 50 años ($31.3 \pm 6.8^*$) ($p < 0.05$). En relación a la MG se encontró tendencia de mayor porcentaje de forma individual en el grupo de mujeres (46.74 ± 5.92) mayores a 50 años; para MM se encontró una tendencia de mayor porcentaje en el grupo de hombres (75.23 ± 3.95) menores a 30 años.

Tabla. 6 Características generales de la composición corporal del grupo de estudio

	Edad < 30 años (24 media edad 26)		Edad >30 y < 50 (36 media edad 34)		Edad > 50 años (56 media edad 58)	
	♂ (5)	♀(5)	♂(5)	♀(5)	♂(4)	♀(5)
Expresión GS	0.16 ±0.07	0.13±0.0 5	0.19±0.0 5	0.17±0.0 7	0.11±0.0 3	0.12±0.05
IMC	26.7±4.3*	28.3±2.9	29.9±2.8	28.1±2.6	26.7±1.9	31.3±6.8*
MG	24.77±3. 95	39.32±3. 15	32.01±3. 83	36.37±4. 40	37.80±0. 34	46.74±5.9 2
MM	75.23±3. 95	60.68±3. 15	67.99±3. 83	63.64±4. 40	62.20±0. 34	53.27±5.9 2

Se muestra la expresión de GS, el Índice de masa corporal (IMC), masa grasa (MG) y masa muscular (MM) por grupos con respecto a género y edad. Los valores son expresados como promedios +/- DE. Las diferencias entre los grupos fueron determinadas por medio de la pruebas no paramétricas de Friedman y Wilcoxon y las correlaciones fueron determinadas por medio de la prueba de Spearman *p<0.05.

10.4 EXPRESIÓN DEL ARN DE GS EN MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA

Se realizó un análisis de la expresión génica de ARN de GS en sangre periférica de 29 sujetos sanos (15 mujeres y 14 hombres) sometidos a una prueba de máximo esfuerzo a 6 diferentes tiempos (basal y 15, 60, 120 min, 6, 24 h), en donde encontramos un aumento significativo a partir de los 15 minutos 1.10 (± 0.38) comparado con el tiempo basal 0.98 (± 0.05) p* = 0.076, a los 60 minutos 1.26 (± 0.44) p** = 0.005, a los 120 minutos 1.32 (± 0.60) p** = 0.003, en el que se alcanza la máxima expresión del ARN de GS, así también se muestra en la Figura 13 una ligera disminución de la expresión a las 6 horas 1.28 (± 0.78) sin embargo se mantienen valores significativos p* = 0.054 y finalmente se observa una disminución a las 24 horas al nivel basal.

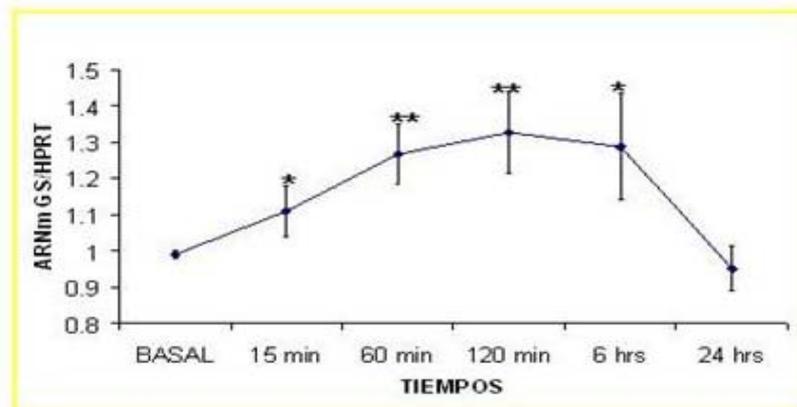


Fig. 10 Expresión de ARN de GS en sangre periférica
 Expresión de ARN de GS en sangre periférica de 29 sujetos sanos sometidos a la prueba de máximo esfuerzo en relación a los 6 diferentes tiempos de toma de muestra (basal y 15, 60, 120 min, 6 y 24 h posterior a la prueba de máximo esfuerzo) medidos por RT-PCR en tiempo real. Las cantidades de ARN de GS fueron normalizadas en relación al gen de referencia HPRT. Los valores son expresados como promedios \pm DE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$.

Una vez establecida la expresión génica del ARN de GS en sangre periférica de personas sanas, se realizó un análisis de la expresión en relación al género de las personas incluidas en el estudio a los 6 diferentes tiempos analizados previamente, En la Figura 14 se observa que la expresión del ARN de GS en las 15 mujeres incluidas en el estudio tiene un aumento progresivo, el cual solo alcanzo significancia estadística a las 6 horas posteriores a la prueba de máximo esfuerzo $1.55 (\pm 1.19)$ * $p = 0.039$, en relación al tiempo basal $0.97 (\pm 0.05)$. Así mismo en la Figura 15 se muestra que el análisis de la expresión del ARN de GS en sangre periférica de los 14 hombres sanos incluidos en el estudio, se encontró un aumento gradual en la expresión a los 15 minutos $1.16 (\pm 0.36)$ en relación al basal $0.987 (\pm 0.07)$ $p^* 0.04$, a los 60 minutos $1.37 (\pm 0.43)$ $p^{**} 0.006$, a los 120 minutos $1.31 (\pm 0.47)$ * $p = 0.02$. Sin embargo se muestra una disminución de la expresión casi al nivel del basal a las 6 horas $1.05 (\pm 0.41)$ y 24 horas $0.999 (\pm 0.37)$.

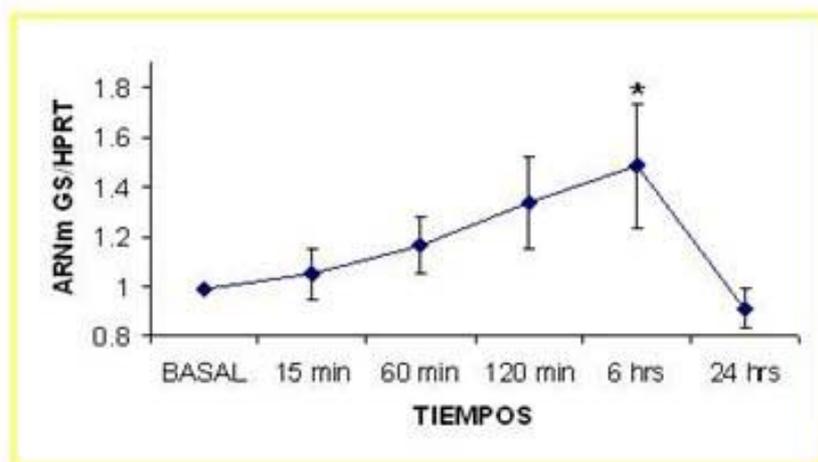


Fig. 11 Expresión del ARN de GS en el grupo total de mujeres
 Expresión del ARN de GS en sangre periférica de 15 mujeres sometidas a la prueba de máximo esfuerzo en relación a los 6 diferentes tiempos de toma de muestra (basal y 15, 60, 120 min, 6 y 24 horas posterior a la prueba de máximo esfuerzo) medidos por RT-PCR en tiempo real. Las cantidades de ARN de GS fueron normalizadas en relación al gen de referencia HPRT. Los valores son expresados como promedios \pm DE. * $p < 0.05$.

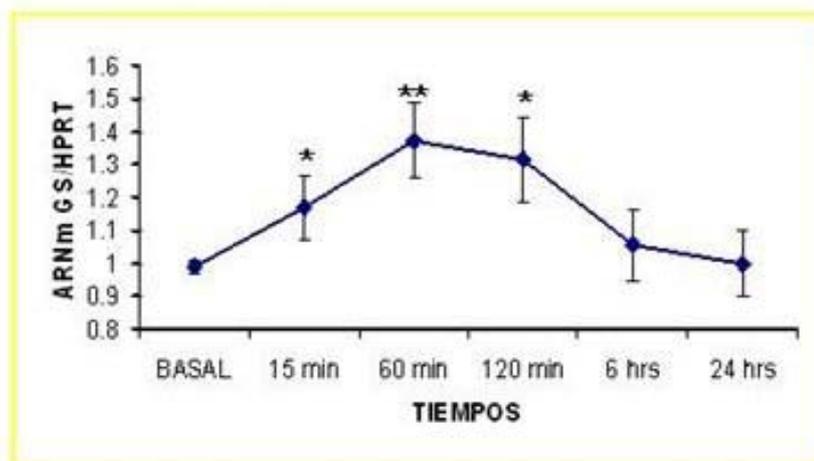


Fig. 12 Expresión del ARN de GS en el grupo total de hombres
 Expresión del ARN de GS en sangre periférica de 15 mujeres sometidas a la prueba de máximo esfuerzo en relación a los 6 diferentes tiempos de toma de muestra (basal y 15, 60, 120 min, 6 y 24 horas posterior a la prueba de máximo esfuerzo) medidos por RT-PCR en tiempo real. Las cantidades de ARN de GS fueron normalizadas en relación al gen de referencia HPRT. Los valores son expresados como promedios \pm DE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$.

Se realizó un análisis de correlación de la expresión del ARN de GS en relación al porcentaje de agua corporal total en los 14 hombres incluidos en el estudio, evaluado por medio de una bioimpedancia realizada posterior a la aplicación de la prueba de máximo esfuerzo. Se encontró una correlación negativa de $r = -0.704$ con un valor significativo de $*p = 0.016$, es decir a mayor expresión de GS es menor el porcentaje de agua corporal total.

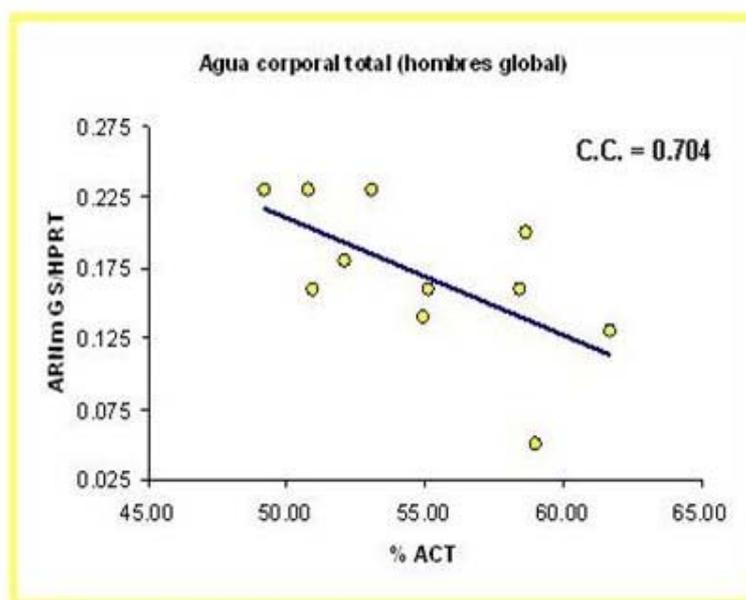


Fig. 13 Agua corporal total en Hombres
Correlación de la expresión génica del ARN de GS en los 14 hombres incluidos en el estudio en relación al contenido de agua corporal total, el cual se muestra en relación a 100, Las cantidades de ARN de GS fueron normalizadas en relación al gen de referencia HPRT.

10.5 EXPRESIÓN DEL ARN DE GS EN BIOPSIAS

La expresión del ARN de GS se determinó en biopsias de tejido muscular y de tejido adiposo de 10 mujeres con IMC de 30 a 40kg/m², las biopsias fueron obtenidas antes y después de la realización de ejercicio aeróbico moderado durante 3 meses, el cual fue realizado en un aparato de banda sin fin y monitoreado en relación a tiempo y velocidad. En la Figura 17 se muestra la disminución de la expresión de ARN de GS en biopsias de tejido muscular posterior a la realización de ejercicio en

relación a las muestras pretratamiento, la cual no fue significativa. En la figura 18 se muestra la disminución de la expresión del ARN de GS en biopsias de tejido adiposo posterior a la realización durante 3 meses de ejercicio aeróbico controlado.

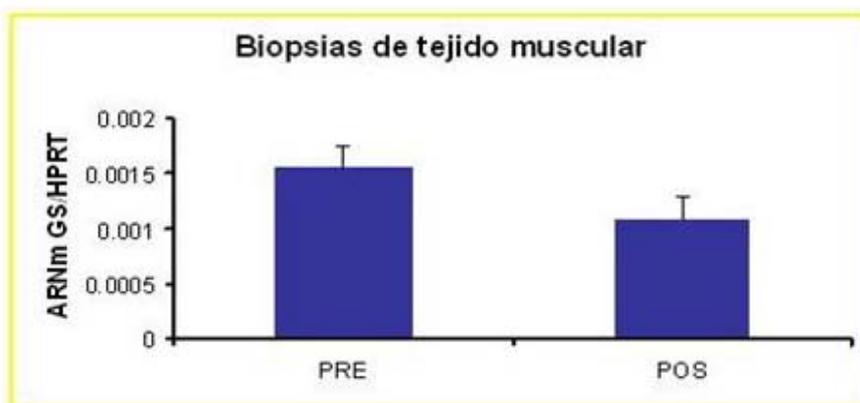


Fig. 14 Expresión del ARN de GS en biopsias de músculo esquelético
Expresión del ARN de GS en biopsias de tejido muscular de 10 mujeres sometidas a 3 meses de ejercicio aeróbico, las biopsias fueron tomadas antes y al finalizar el periodo de acondicionamiento, medidos por RT-PCR en tiempo real. Las cantidades de ARN de GS fueron normalizadas en relación al gen de referencia HPRT. Los valores son expresados como promedios \pm DE.

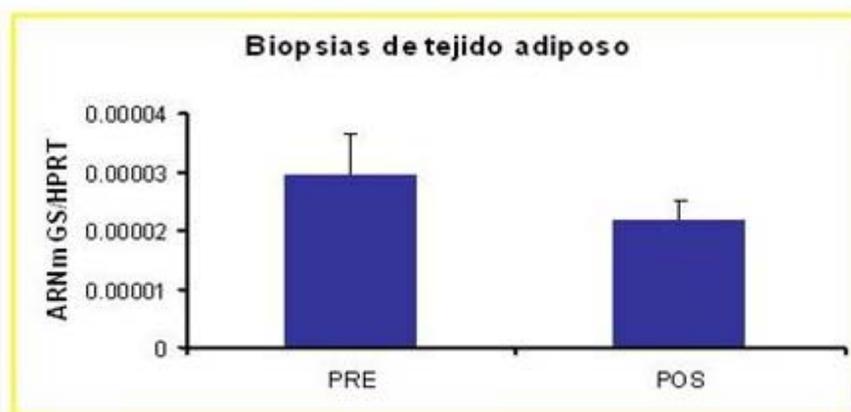


Fig. 15 Expresión del ARN de GS en biopsias de Grasa

Expresión del ARN de GS en biopsias de tejido adiposo de 10 mujeres sometidas a 3 meses de ejercicio aeróbico, las biopsias fueron tomadas antes y al finalizar el periodo de acondicionamiento, medidos por RT-PCR en tiempo real. Las cantidades de ARN de GS fueron normalizadas en relación al gen de referencia HPRT. Los valores son expresados como promedios \pm DE.

11. DISCUSIÓN

La cirrosis hepática se considera el extremo de la afección hepática y la vía final de manifestaciones clínicas dentro de las que destacan la insuficiencia hepática y la hipertensión portal. Una de las principales afecciones de los pacientes cirróticos es la encefalopatía hepática en la cual el amonio juega un papel central en la patogenia de dicha enfermedad y es considerada el principal metabolito tóxico. En pacientes con EH se han detectado niveles elevados de amonio en sangre periférica, siendo las fuentes principales en el organismo el metabolismo de las proteínas de la dieta, el metabolismo de glutamina, las vías de desaminación y transaminación de aminoácidos. La glutamina es un aminoácido no esencial; La glutamina sintetasa es la única enzima capaz de sintetizar glutamina e interviene directamente en la detoxificación del amonio. Los principales sitios de expresión de GL son músculo esquelético e hígado. En este contexto se busco determinar si la expresión del ARNm de GS se encuentra estimulada por ejercicio controlado a corto plazo. En este estudio se incluyeron 29 sujetos que fueron divididos en 3 grupos con respecto a edad y sexo; el primer grupo de 20-30 años (n=10), el segundo grupo de 31-50 años (n=10) y el tercer grupo de 51-60 años (n=9). La expresión génica de la GS se obtuvo a partir de muestras de sangre periférica colectadas en 6 tiempos, antes y después del ejercicio. Así mismo se incluyo un grupo de 10 mujeres con diagnostico de obesidad que realizo ejercicio moderado durante un periodo de tres meses. La expresión del ARNm de GS se determino a partir de biopsias de tejido muscular y adiposo, las cuales fueron obtenidas antes y al finalizar el periodo de acondicionamiento físico.

Diversos estudios han demostrado que la GS es una enzima que puede participar activamente en el metabolismo extrahepático del amonio. (Chatauret y col., 2006). El concepto de músculo como un órgano alternativo para el metabolismo hepático del amonio no es nuevo (Ganda y Ruderman, 1976), si no una propuesta basada en múltiples evidencias. Resultados basados en un modelo de hiperamonemia por anastomosis portocaval demostró que la actividad de la GS se redujo

considerablemente en tejido hepático, sin cambios en cerebro, y se incremento significativamente en tejido muscular (Girard y Butterworth, 1992). Otros estudios experimentales en los que se administro infusiones de sales de amonio (Leweling y col., 1996) y un modelo de insuficiencia hepática aguda también corroboraron un incremento de la GS muscular; Sin embargo los niveles del ARNm de GS no pudieron ser demostrados, sugiriendo un efecto postranscripcional (Chatauret y col., 2006). En humanos, en pacientes con falla hepática aguda también se apoya esta teoría, ya que se ha puesto de manifiesto que la disminución en los niveles de amonio en músculo esquelético correlacionan con la liberación de glutamina, sugiriendo la actividad de la GS (Clemmensen y col., 2000).

Hoy en día, una maniobra clínicamente posible para inducir el incremento en la expresión de GS muscular no ha sido probada, sin embargo estudios en animales evidencian que el ejercicio podría lograr este aumento en GS. Se sometió a ratas a ejercicio moderado en una banda rodante, demostraron una reducción en los niveles sericos de glutamato en varios tejidos y en sangre periférica, acompañado de un aumento de glutamina después del ejercicio, lo cual sugiere inducción de GS; sin embargo, los niveles de la enzima no fueron probados directamente (Miyazaki y col., 2003). En el presente estudio hemos podido demostrar la inducción de la actividad de GS por ejercicio a corto plazo, ya que se mostró un aumento en los niveles de ARNm de GS en sangre periférica después de una prueba de máximo esfuerzo en una banda sin fin, en sujetos sanos lo que hace suponer que se logró aumentar los niveles de glutamina y posiblemente la remoción del amonio circulante, sin embargo, no se determinaron los niveles de amonio en tales personas. Estos resultados sugieren un efecto transcripcional de GS. Por otra parte la expresión de glutamina sintetasa es diferente en hombres y mujeres, probablemente debido a las diferencias en cuanto al porcentaje y distribución corporal de masa grasa y masa muscular entre géneros; encontrándose en hombres un aumento en la expresión de GS a partir de los 15 minutos posteriores a la realización de ejercicio, el cual alcanza su máxima expresión a los 60 minutos, además la expresión de GS correlaciono positivamente

con el porcentaje de masa muscular siendo más evidente en el grupo de edad de menores de 30 años, lo cual sugiere un origen muscular de glutamina sintetasa. En el grupo de mujeres la expresión es menor, y el pico máximo se encontró a las 6 horas, por lo cual, no parece haber correlación entre la expresión de GS en relación a la composición corporal (MG, MM), probablemente en el grupo mayor a 51 años la expresión puede estar regulada a nivel de MG.

Durante el ejercicio, la glutamina es liberada por las células musculares a la circulación sanguínea, lo que representa aumento de los niveles sericos de glutamina, y podría ser perjudicial para el SNC (Albrecht y Norenberg, 2006). Esto se basa en una reciente teoría que propone que la toxicidad del amonio en los astrocitos es mediada por el metabolismo de la glutamina en la mitocondria a través de la glutaminasa fosfato, causando una disfunción mitocondrial por estrés oxidativo (Albrecht y Norenberg, 2006), Sin embargo, dado que el transporte de glutamina a través de la barrera hematoencefálica esta disminuida, y la mayor parte de la glutamina en el SNC es sintetizada endogenamente (Albrecht y col., 2007), esta posibilidad es poco probable. Otro aspecto importante es que la actividad de la glutaminasa en otros tejidos (como los riñones) podría revertir el efecto de detoxificación de amonio por el ejercicio sin ninguna perdida neta de amonio. Sin embargo, se ha demostrado que durante la acidosis, la aminogenesis de los riñones puede incrementar la tasa de expresión de amoniaco en la orina (en lugar de regresar a la sangre) del 30 al 70% (Olde Damink, 2002). Dado que la acidosis es una respuesta fisiológica y transitoria al ejercicio (Robergs y col., 2004), es posible pensar que en pacientes con una función renal normal, la unión de GS en músculo y la glutaminasa en el riñón puede incrementar la detoxificación y la disminución neta de amonio, mejorando la hiperamonemia en la cirrosis. Finalmente, esta disminución neta de amonio a través de la orina puede disminuir los niveles de glutamina en SNC. Dado que es el amonio que atraviesa la barrera hematoencefálica para ser transformada en glutamina por la GS de los astrocitos y el único que activa en la

mitocondria la glutaminasa fosfato para disminuir el amonio mitocondrial, causando mejoramiento en el metabolismo mitocondrial (Albrecht y Norenberg, 2006).

En relación al agua corporal total obtenida por bioimpedancia eléctrica, la expresión del ARN de GS parece guardar una correlación inversa, esto probablemente debido al efecto que el ejercicio tiene sobre el equilibrio hemodinámico, lo cual es un aspecto importante en el caso de pacientes con cirrosis hepática ya que es bien sabido que este tipo de pacientes tienden a acumular una mayor cantidad de agua corporal por ascitis refractaria.

Acerca de las cuestiones de seguridad, se ha recomendado tradicionalmente para pacientes cirróticos no ejercitarse, debido a que el riesgo de sangrado varicoso puede incrementarse. Esta declaración se basa principalmente en un reporte previo de García-Pagan y col. en el cual un incremento agudo en el gradiente de presión venosa hepática fue registrado durante el ejercicio, volviendo a su nivel basal después de 5 minutos de descanso (García-Pagán y col., 1996). Sin embargo el mismo grupo informo posteriormente que este efecto podría ser prevenido efectivamente por pretratamiento con un bloqueador beta (Bandi y col., 1998) lo que abre la posibilidad de ejercitarse con bajo riesgo de hemorragia.

En relación al grupo de mujeres obesas que fueron sometidas a un programa de ejercicio controlado a largo plazo (3 meses) no hubo un aumento en la expresión de GS en biopsias de tejido muscular, esto probablemente debido a que en personas obesas el metabolismo muscular no es eficiente y el tejido muscular se encuentra disminuido por la mayor cantidad de tejido graso, así mismo puede sugerir que el efecto del ejercicio en la expresión de GS es solo a corto plazo y puede estar limitado por la vida media de la proteína.

A pesar de los hallazgos obtenidos en este trabajo aún falta determinar el efecto del ejercicio en la expresión de GS en pacientes cirróticos y en el metabolismo del

amonio, así como determinar los efectos deletéreos al realizar una rutina controlada de ejercicio a largo plazo debido a que hay evidencia de que en pacientes con cirrosis, la posibilidad de inducir un estado hiperdinámico puede, a corto plazo, resultar perjudicial para la hipertensión portal y favorecer el sangrado variceal. En un estudio con 8 sujetos con hipertensión portal no hemorrágica, (García-Pagán y col., 1996) demostraron que el ejercicio incrementaba el gradiente de presión hepática retornando a niveles basales después de 5 minutos de reposo. Por lo que se desconoce el efecto a largo plazo del ejercicio como un programa de rehabilitación, que bien podría llevar a complicaciones de las varices esofágicas, gastropatía congestiva, mayor riesgo de sangrado, o bien sentar mecanismos de adaptación fisiológica en el metabolismo del amonio que disminuyan este riesgo.

Sobre la base de nuestros conocimientos, este es el primer estudio direccionado a la inducción de GS por el ejercicio en sujetos sanos. Si esto también resulta ser cierto en pacientes cirróticos estables, el ejercicio podría convertirse en una nueva estrategia para la reducción de amonio para el tratamiento de pacientes con encefalopatía hepática mínima (en una etapa baja y con capacidad para ejercitarse), o para prevenir su manifestación. En cualquier caso, varias consideraciones a propósito de las rutas de detoxificación del amonio y su seguridad deben tenerse en cuenta.

12. CONCLUSIONES

- La expresión génica de GS en sangre periférica está estimulada por el ejercicio en pacientes sanos.
- La expresión de GS en sangre periférica es mayor en hombres que en mujeres.
- La composición corporal puede intervenir en la regulación de la expresión génica de GS.
- La expresión de GS en las biopsias de músculo y grasa puede ser tardía a diferencia de las muestras de sangre periférica; posiblemente debido a que el músculo necesita ser expuesto a estrés crónico. Sin embargo para poder comprobar este hallazgo se necesita ampliar la muestra.
- Con base en los resultados se sugiere que el ejercicio aeróbico moderado controlado y prolongado en pacientes estables con cirrosis hepática aguda puede ser una posible maniobra terapéutica orientada a prevenir la presencia de encefalopatía hepática. Sin embargo estos hallazgos no son suficientes; por lo que se hace necesario implementar este mismo trabajo en pacientes cirróticos.

13. BIBLIOGRAFÍA

- Albrecht J y Norenberg MD. 2006. Glutamine: a Trojan horse in ammonia neurotoxicity. *Hepatology*. 44:788-94.
- Albrecht J, Sonnewald U, Waagepetersen HS, Schousboe A. 2007. Glutamine in the central nervous system: function and dysfunction. *Front Biosci*. 12:332-43.
- Als-Nielsen, B., Gluud, L.L., Gluud, C. 2004. Nonabsorbable disaccharides for hepatic encephalopathy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2 :CD003044.
- Ambion, The RNA Company. RNA later ® Tissue Collection: RNA Stabilization
Dirección: http://www.ambion.com/techlib/prot/bp_7020.pdf Actualización y Acceso: 15/10/07.
- American college of Sport Medicine. 2007. Prueba de esfuerzo clínica. En: Manual ACSM para la valoración y prescripción de ejercicio. 2da Edición. Paidotribo. Barcelona, España. pp: 324-365.
- Bandi JC, García-Pagán JC, Escorsell A, François E, Moitinho E, Rodés J, Bosch J. 1998. Effects of propranolol on the hepatic hemodynamic response to physical exercise in patients with cirrhosis. *Hepatology* 28:677-82.
- Bolt, R.B. 1998. Fisiopatología de enfermedades vesiculares. En: *Fisiología clínica de Sodeman*. (ed) Torre, W.A. y Torre, T.M. Mc. Graw-Hill, España. pp: 924-927.
- Chatauret, N., Desjins, P., Zwingmann C., Rose, C., Rama, R.K.V., Butterworth, R.F. 2006. Direct molecular and spectroscopic evidence for increased ammonia removal capacity of skeletal muscle in acute liver failure. *J Hepatol*. 44: 1083-1088.
- Clemmesen JO, Kondrup J, Ott P. 2000. Splanchnic and leg exchange of amino acids and ammonia in acute liver failure. *Gastroenterology*. 118:1131-9.
- Costa, J. 2004. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 22(5):299-305.

- Coss, A. y Torre-Delgadillo A. 2007. Cirrosis Hepática. Artículo científico. *En proceso*.
- Duarte, R.A., Torre-Delgadillo, A., León, R.S.P. 2007. Tesis de Maestría. *En proceso*.
- Falduto, M.T., Hickson, C.R., Young, P.A. 1989. Antagonism by glucocorticoides and exercise on correlates of correlate synthetase in skeletal muscle. *FASEB J.* 3: 2623-2628.
- Ganda OP, Ruderman NB. 1976. Muscle nitrogen metabolism in chronic hepatic insufficiency. *Metabolism.* 25:427-35.
- García, C.M. y Alcántara, B.R. 2002. Complicaciones agudas de la cirrosis hepática. En: Manual de urgencias y emergencias. (ed) Morell, O.M., Buforn, G.A., Vergara, O.J.M., Domínguez, R.L. Virgen de La Victoria de Málaga, España. pp: 1–34.
- García-Pagán JC, Santos C, Barberá JA, Luca A, Roca J, Rodriguez-Roisin R, Bosch J, Rodés J. 1996. Physical exercise increases portal pressure in patients with cirrhosis and portal hypertension. *Gastroenterology.* 111:1300-6.
- Genome Explorations Discovery Through Innovation. TRIzol Reagent Total RNA Isolation Reagent.
Dirección:http://genomeexploration.com/related/TRIzol_Method.pdf
Actualización y Acceso: 15/10/2007.
- Girard G, Butterworth RF. 1992. Effect of portocaval anastomosis on glutamine synthetase activities on liver, brain, and skeletal muscle. *Dig Dis Sci.* 37:1121-6.
- Guízar, J.J. 2001. Bases moleculares de la herencia. En: *Genética clínica.* (ed) Guízar, J.J. Manual Moderno. México. pp: 6-7.
- Guízar, J.J. 2001b. Biología molecular y medicina. En: *Genética clínica.* (ed) Guízar, J.J. Manual Moderno. México. pp: 109,110.

- Guyton, C.A. 2001. Fisiología del deporte. En: Tratado de fisiología médica. 10ma Edición. (ed) Guyton, C.A. y Hall, E.J. Mc Graw Hill, Barcelona, España. pp: 1167-1179.
- Häussinger, D., Schliess, F. 2007. Glutamine metabolism and signaling in the liver. *Frontiers in Bioscience*. 12: 371-391.
- Igual, M.M. 1995. El sistema glutamatérgico (II): aspectos fisiopatológicos, clínicos y terapéuticos. *Med Clin (Barc)*. 105: 306-316.
- Leweling H, Breitzkreutz R, Behne F, Staedt U, Striebel JP, Holm E. 1996. Hyperammonemia-induced depletion of glutamate and branched-chain amino acids in muscle and plasma. *J Hepatol*. 25:756-62.
- Lizardi, C.J., Uribe, E.M., Guevara-González, L. 2003. Encefalopatía hepática. En: *Conceptos actuales en hepatología*. (ed) Méndez, S.N. y Uribe, E.M. Masson Doyma, México. pp: 147 – 154.
- Méndez, S.N., Uribe, E.M., Villa, R.A., Chávez, T.C., Ponciano, R.G., Almeda, V.P., González, D. 2005. Correl in liver disease prevalence in Mexico from 2005 to 2050 through mortality data. *Ann Hepatol*. 4 (1): 52-55.
- Merli, M., Masini, A., Gentilini, F., Rigió, O. 2004. Actualidades en la patogénesis y tratamiento de la encefalopatía hepática. En: *Nutrición y gastroenterología temas selectos*. (ed) Milke, G.M.P. Y Carmona, R. Masson Doyma, México. pp: 171-186.
- Mayes, A. 2001. Bioenergética: La función del ATP. En: *Bioquímica de Harper*. (ed) Murray, R., Granner, D., Mayes, P. y Rodwell, V. Manual Moderno, México. pp: 145-174.
- Miyazaki T, Matsuzaki Y, Karube M, Bouscarel B, Miyakawa S, Tanaka N. 2003. Amino acid ratios in plasma and tissues in a rat model of liver cirrhosis before and after exercise. *Hepatol Res*. 27:230-237.
- Mouritzen, P., Noerholm, M., Nielsen, P.S., Jacobsen, N., Lomholt, C., Pfundheller H.M., Tolstrup, N. 2005. ProbeLibrary: A new method for faster

design and execution of quantitative real-time PCR. *Nature Methods*. 2: 313-17.

- Olde Damink SW, Deutz NE, Dejong CH, Soeters PB, Jalan R. 2002. Interorgan ammonia metabolism in liver failure. *Neurochem Int*. 41:177-88.
- Olivera, M.M.A. 2000. Cirrosis. En: *Principios de Gastroenterología*. (ed) Villalobos, J.J., Valdovinos, M.A. y Olivera, MA. Méndez editores, México. pp: 585 – 593.
- Plauth, M., Merly, M., Kondrup, J., Weimann, A., Ferenci, P. y Muller, M. 1997. ESPEN guidelines nutrition in liver disease and transplantation. *Clin. Nutr*. 16:43-55.
- Promega Corporation - Precision Design for Life. M-MLV Reverse Transcriptase Product Information Sheet, 9PIM170. Dirección: <http://www.promega.com/tbs/9pim170/9pim170.pdf>. Actualización y acceso: 15/10/07.
- Robergs RA, Ghiasvand F, Parker D. 2004. Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 287:R502-16.
- Rengifo, A., Tapiero, C. y Spinel, C. 2005. Receptor GABA (Acido gaba-aminobutírico) y su relación con la dependencia del alcohol. *ISNN*. 1(1):77-96.
- Roche Applied science. DNase I recombinant, RNase-free
- Dirección: <https://www.roche-applied-science.com/pack-insert/4716728a.pdf> Actualización: 15/10/07. Acceso: 15/10/07.
- Roche Applied science. LightCycler® TaqMan® Master. Dirección: <https://www.roche-applied-science.com/pack-insert/4535286a.pdf> Actualización: 15/10/07. Acceso: 15/10/07.
- Roche Applied Science. Universal Probe Library.
- Dirección: <https://www.rocheappliedscience.com/servlet/RCConfigureUser?URL=StoreFramesetView&storeId=10201&catalogId=10201&langId=3&countryId=de>. Actualización: 14/10/07. Acceso: 15/10/07.

- Roche Applied Science. Universal Probe Library. Dirección: <https://qpcr2.probefinder.com/solution.jsp;jsessionid=5F72A807412E94AFE3198A024CF012AC> Actualización: 14/10/07. Acceso: 15/10/07.
- Roche Applied Science. LightCycler® Capillaries (20 µl). Dirección: <https://www.roche-applied-science.com/pack-insert/1909339a.pdf> Actualización: 1/10/07. Acceso: 15/10/07.
- Roche Applied Science. Universal Probe Library. Dirección: <https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/adc.jsp> Actualización y Acceso: 30/06/07.
- Roche Applied Science. Universal Probe Library. Dirección: <https://qpcr2.probefinder.com/solution.jsp;jsessionid=5F72A807412E94AFE3198A024CF012AC> . Actualización y Acceso: 15/10/07.
- Rodríguez, S.P. y Barrera, S.H. 2004. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL*. 3:323-335.
- Romero, G.M., Ramos, G.R., Grande, L., Terán, L.C., Corpas, R., Camacho, I., Bautista, J.D. 2004. Intestinal glutaminase activity is increased in liver cirrosis and Correlates with minimal hepatic encephalopathy. *J Hepatol*. 41 (1): 49-54.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 239:487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, F.E., Maniatis, T. 1990. Agarose Gel Electrophoresis. En: *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. (ed) Cold Spring Harbor Laboratory Press, United Status of America. Capitulo: 6.3-6.15.
- Sergeevich, M.V. y Dmitriyevich, M.V. 2004. Factores fisiológicos limitantes del rendimiento especial de los deportistas. En: *Fisiología del deportista*. (ed) Sergeevich, M. V y Dmitriyevich, M. V. Paidotribo, España. pp: 95 – 130.
- Secretaría de Salud, Base de datos de información sobre mortalidad en:http://www.salud.gob.mx/apps/htdocs/estadisticas/mortalidad/tabs/m_005.xls Actualización: 13/06/2007; acceso: 20/08/2007.

- Shawcross, D.L., Damink, S.W., Butteerworth, R.F. y Jalan R. 2005. Ammonia and hepatic encephalopathy: the more things change, the more they remain the same. *Metab Brain Dis.* 20 (3): 169-179.
- Shin, D., Park, S., Park, C. 2003. A splice variant acquiring an extra transcript leader region decreases the translation of glutamine synthetase gene. *Biochem J.* 374:175-84.
- Smirnov, A.V, Tumani, H., Henne, S., Barchfeld, S., Olgemoller, U., Wiltfang, J., Lange, P., Mader, M., Nau, R. 2000. Glutamine synthetase in experimental meningitis: increased ratio of the subunits 3 and 2 may indicate enhanced activity. *Clin. Chim.* 292: 1-12.
- Tarter, R.E., Panzak, G., Switala, J., Lu, S., Simkevitz, H. y Van Thiel. 1997. Isokinetic muscle strength and its association with neuropsychological capacity in cirrhotic alcoholics. *Alcohol clin exp res.* 21(2): 191-196.
- Taylor, L. y Curthoys, N.P. 2004. Glutamine Metabolism. *BAMBED.* 32 (5):291–304.
- Torre-Delgadillo, A., Terra, C., Arroyo, V. 2002 Encefalopatía portosistémica: Patogenia y nuevos tratamientos. En: *Problemas clínicos en hepatología.* 1er Edición. (ed) Uribe, E. M., y Vargas, V. F. Masson Doyma, México. pp: 153–166.
- Williams, M.H. 2006. Proteína: la constructora de tejido. En: *Nutrición para la salud, condición física y deporte.* (ed) Williams, M.H. EUA. pp: 207–248.
- Wilmore, J.H. y Costilla, L.D. 2004a. Regulación hormonal del ejercicio. En: *Fisiología del esfuerzo y del deporte.* (ed) Wilmore, J.H. y Costilla. Paidotribo, España. pp: 157 – 164.
- Wilmore, J.H. y Costilla, L.D. 2004b. Introducción a la fisiología del esfuerzo y del deporte. (ed) Wilmore. En: *Fisiología del esfuerzo y del deporte.* (ed) Wilmore, J.H. y Costilla. Paidotribo, España. pp: 33.

15. ANEXOS

15.1 SECUENCIA DEL GEN GLUTAMINA SINTETASA

Se muestra el número de sonda que se utiliza para el gen GS, y la secuencia del mismo donde encontramos subrayado el amplicón, marcado con línea punteada el codón de inicio y marcado con línea doble el codón terminal.

Numero de acceso_002065.4 Homo sapiens glutamate-ammonia ligase (glutamina sintetasa) (GLUL), variante transcripcional 1, del ARNm (Roche Applied Science. Universal Probe Library®, 2007)

Detalles del análisis:

Utilizar la sonda de la librería: #28

Código	ID de la sonda	Primer	Longitud	Posición	Tm	%GC	Secuencia
NM_002065.4	#28 cat. No. 04687604001	Izquierda	19	96 – 114	60	58	<u>tctcgggcttagctttac</u>
		Derecha	20	164 – 183	59	45	<u>cattcgttcttctctctg</u>
Amplicon (88 nt)							
tctcgggcttagctttaccgcccgcctgctcggcgaccagcggggatctccccagc							
cgcaagtccacgaagaagcaacgaatg							

Homo sapiens glutamate-ammonia ligase (glutamina sintetasa)(GLUL), variante transcripcional 1, mRNA.

ggtgcggggctgctggcggctctgcagagtcgagagtgaggagaagagcggagcgtgtgagcagtactgcccctcc
tctcctctcctaacctcgctctcgggcttagctttacccgcccgcctgctcggcgaccagcggggatcctccc
ccagccgcaagtccacgaagaagcaacgaatgaaaattatgaagacaacgagaagtcagactcctccgggtcgc
gctccagctgcttcggcttcgtcgcctactctgtgaactccggggagagatctcgagtcaagattaagaccttaaccac
caacctgcctgttcggacacccccggccggcgcctgctgtgtccccttctccatcgccctctcccagaaagctccggtg
cttgaccagctagagtctgagaaagaggagaggcgcgaacgccactccaaaagagaagggttaaagagggc
aacctaacgatacgttgactttctgtggctggaacacctccaccatgaccacctcagcaagttcccacttaataa
aggcatcaagcaggtgtacatgtccctgcctcagggtgagaaagtcaggccatgtatatctggatcgatggtactgga
gaaggactgcgctgcaagaccggaccctggacagtgagcccaagtggtggaagagttgcctgagtggaatttoga
tggctctagfactttacagtctgagggttccaacagtgacatgtatctcgtgcctgctgccatgtttcgggacccttccgta
aggaccctaacaagctggtgtatgtgaagtttcaagtacaatcgaaggcctgcagagaccaatttgaggcacacctg

taaacggataatggacatggtgagcaaccagcaccctggttggcatggagcaggagtataccctcatggggacag
atgggcaccccttgggtggcctccaacggctcccagggccagggccatattactgtggtggtgggagcagacag
agcctatggcaggacatcgtggaggcccattaccgggcctgctgtatgctggagtcaagattgcggggactaatgc
cgaggtcatgctgccagtggaatttcagattggacctgtgaaggaatcagcatgggagatcatctctgggtggcc
cgtttcatcttgcacgtgtgtgtgaagactttggagtgatagcaacctttgatcctaagcccattcctgggaactggaatgg
tgaggctgccataccaactcagcaccaaggccatgcgggaggagaatggtctgaagtacatcgaggaggccatt
gagaaactaagcaagcggcaccagtaccacatccgtgcctatgatccaagggaggcctggacaatgcccgact
ctaactggattccatgaaacctccaacatcaacgacttttctgctggtgtagccaatcgtagcggcagcatacgcattcc
ccggactgttggccaggagaagaagggtactttgaagatcgtcgcccctctgccaactgcgacccttttcggtgaca
gaagccctcatccgcacgtgtcttcaatgaaaccggcgatgagccctccagtacaaaaattaagtggactagacct
ccagctgttgagcccctcctagttctcatcccactccaactctccccctctcccagttgtcccgattgtaactcaaagggt
ggaatatcaaggctgtttttcattccatgtgccagtaatcttgcttcttggctgggatagaggggtcaagtattaa
tttctcacacctaccctcctttttccctatcactgaagcttttagtcattagtgaggaggagggtggggagacataacc
actgctccatttaatgggggtgcacctgtccaataggcgtagctatccggacagagcacgfttgcagaaggggggtctct
ctccaggtagctgaaaggggaagacctgacgtactctggttaggttaggacttgcctcgtggtggaaacttttctaaa
aagttataaccaactttctattaaagtggaattaggagagaaggtaggggtgggaatcagagagaatggcttgg
tctctgctgtgggactagcctggctgggactaaatgccctgctctgaacacgaagcttagtataaactgatggatatcc
ctacctgaaagaagaaaaggttctactgcttggctctgattatcacacaaagcagaatagtattttatattaaatgta
aagacaaaaaactatatgtatggtttgtggattatgtgttttctaaaggaaaaaacatccaggtcacggggcacc
aaattgagacaaatagtcggattagaaataaagcatctcattttgagtagagagcaaggggaagtgttcttagatggtg
atctgggattaggccctcaagaccctttgggttctgcctgcccaccctctggagaaggtgggactggattagtaac
agacaacacgftactagcagtcactgatctccgtggctttggtttaaagacacactgtccacatagggttagagataa
gagttggctggtcaactgagcatgtfactgacagaggggtattgggttatttctggttaggaatagcatgtcactaaa
gcaggcctttgatattaaattttaaaaagcaaaattatagaagtttagatttaatacaattttagggttctaggaat
tacagaattgctgtttgctcaactgtctcctacctctgctctggaggagatggggacagggctggagtcaaaacacttg
taatttgtatcttgatgtcttggtaagactgctgaagaattttttctttataataaggaataaacccaccttattcctc
atttcatctaccattttctggttctgtgtggctgtggcaggccagctgtggtttctttgcatgacaacttcaattgcatgt
acagtatgtcaaagtcaaataactcctcattgtaacaaactgtgtaactgccaaagcagcactataaatcagccta
acataagatctctgatgtgttggattcttcaaatccctatgtgccattatattctttatttctaaaacaggcaaaaataa
gctcaagttatgtactctgagtttttaaacactggagtgatgttctgaccagccgttctctacctctcaagttgggtatt

tgggacttaagggattaagttttcacctagacttagttacacacaatctggcatttcctagcctagaggtttagcaggg
 tacaagccccactcctccccctccttgcctcccctgagtttggtttggcttaccataacattgtttgaccattcctagcctaa
 tacaatagcctaacataatgtaagatt

15.2 SECUENCIA DEL GEN DE REFERENCIA HPRT

Se muestra el numero de sonda que se utiliza para el gen constitutivo HPRT, y la secuencia del mismo donde encontramos subrayado el amplicón, marcado con línea punteada el codón de inicio y marcado con línea doble el codón terminal.

1. **NM_000194.1** Homo sapiens hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (Lesch-Nyhan syndrome) (HPRT1), mRNA. (Roche Applied Science. Universal Probe Library®, 2007)

Detalles del análisis:

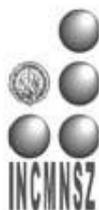
Utilizar la sonda de la librería: #73

Código	ID de la sonda	Primer	Longitud	Posición	Tm	%GC	Secuencia
NM_04688961001	#73	Izquierda	24	136-139	59	33	<u>tgacctgattat</u> <u>tttgcatacc</u>
		Derecha	20	218 - 237	60	55	<u>cgagcaagacgttcagctc</u>
Amplicon (102 nt)							
Tgacctgattat <u>tttgcatacc</u> <u>taacattatgctgaggattg</u> <u>gaaagggtgtttat</u> <u>tcctcatggactaattatggac</u> <u>aggactgaacgtctgctc</u> <u>g</u>							
ttatggacaggactgaacgtctgctc							

tcttgctgcgctccgcctcctcctgctccgccaccggcttctcctcctgagcagtcagcccgcgcccggccggct
 ccgttatggcgacccgcagccctggcgtcgtgattagtgatgaaccagggtattgacctgattattttgcatacc
aatcattatgctgaggattggaaagggtgtttattcctcatggactaattatggacaggactgaacgtctgctcgag
 atgtaggaaggagatgggaggccatcacattgtagccctctgtgtgctcaaggggggctataaattcttgctgacctg
 ctggattacataaagcactgaatagaaatagtgatagatccattcctatgactgtagatttatcagactgaagagctatt
 gtaatgaccagtcaacaggggacataaaaagtaattggtggagatgatctctcaacttaactggaagaatgtcttgatt
 gtggaagatataattgactggcaaaacaatgcagactttgcttcccttggtcaggcagtataatccaaagatggtcaa

ggtcgcaagcttgctggtgaaaaggacccacgaagtgttgatataagccagactttgttgattgaaattccagac
aagtttgtgtaggatatgcccttgactataatgaatacttcagggatttgaatcatgtttgtgcattagtgaaactggaaaa
gcaaaatacaaagcctaagatgagagttcaagttgagtttgaaacatctggagtcctattgacatcgccagtaaaatt
atcaatgttctagttctgtggccatctgcttagtagagcttttgcagtatcttctaagaatttatctgtttgtactttagaaatgt
cagttgctgcattcctaaactgttatttgcactatgagcctatagactatcagttcccttgggcggttgtttaaactgtaa
atgaaaaaattctctaaaccacagcactattgagtgaaacattgaactcatatctgtaagaaataaagagaagatata
ttagtttttaattggtattttaattttatataatgcaggaaagaatagaagtgattgaatattgtaattataaccaccgtgttag
aaaagtaagaagcagtcattttcacatcaaagacagcatctaagaagtttgttctgtcctggaattattttagtagtgttc
agtaatgttgactgtattttccaactgttcaaattattaccagtgaatcttgtcagcagttcccttttaaatgcaaatcaataa
att

16. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO



CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

Lugar y Fecha _____

Por medio de la presente acepto participar en el proyecto de investigación titulado EFECTO DEL EJERCICIO EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DE GLUTAMINA SINTETASA EN PERSONAS SANAS.

Registrado ante el Comité de Ética del INCMNSZ.

El objetivo del estudio es

Posible Maniobra Terapéutica para la Prevención de Encefalopatía Hepática en Pacientes Cirróticos.

Se me ha explicado que mi participación consistirá en realizar ejercicio controlado en un aparato de banda sin fin, y se me tomarán muestras de sangre periférica a diferentes tiempos

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio.

El investigador principal se ha comprometido a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le planteé acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación o con mi tratamiento (en caso de que el proyecto modifique o interfiera con el tratamiento habitual del paciente el investigador se comprometera a dar información oportuna sobre cualquier procedimiento alternativo adecuado que pudiera ser ventajoso para mi tratamiento).

Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo en el INCMNSZ.

Nombre y firma del paciente

Nombre, firma del investigador principal.

Testigos

Dirección: Vasco de Quiroga 15, Colonia Tlalpan, C.P.14000. México D.F., México
Teléfonos: +(52 55) 5487 0900 +(52) 5573 0611 Fax: (52) 5655 1076
Correo-e: innsz@quetzal.innsz.mx

17. GLOSARIO DE TERMINOS

Fisiología del esfuerzo: Es el estudio de cómo las estructuras y funciones de nuestros cuerpos se ven alteradas cuando estamos expuestos a series agudas y crónicas de ejercicio (Wilmore y Costilla, 2004).

Fisiología del Deporte ó Fisiología del ejercicio: entrenamiento del deportista y a mejorar el rendimiento deportivo del mismo. Por lo tanto la fisiología del deporte deriva de la fisiología del esfuerzo (Wilmore y Costilla, 2004).

Aparatos Ergómetros: (ergo = trabajo, mete = medida) instrumentos para hacer ejercicio que permite controlar ó estandarizar y medir la intensidad y el ritmo del esfuerzo físico de una persona. Encontramos; cicloergómetro: en bicicleta, ergométrica: en banda sin fin, etc. (Wilmore y Costilla, 2004).

Cintas Ergométricas: Las cintas ergométricas actualmente son unas de las pruebas mas utilizadas para realizar investigación en el deporte. Con estos instrumentos, un sistema compuesto por un motor y una polea hace girar una larga cinta sobre la que se puede caminar o correr. La longitud y amplitud de la cinta debe acomodar el tamaño de nuestro cuerpo y la longitud de nuestra zancada. Resulta poco menos que imposible probar a deportistas sobre cintas ergométricas demasiado estrechas o cortas. Las cintas ergométricas ofrecen cierto número de ventajas. A diferencia de las **cicloergómetros**; la intensidad del esfuerzo sobre una cinta ergométrica no es preciso controlarla estrechamente; sino avanzamos a la misma velocidad que la cinta, seremos arrastrados hacia la parte posterior del aparato. Caminar sobre una cinta ergométrica es una actividad muy natural, por lo que los individuos se adaptan normalmente a la técnica requerida en 1 ó 2 minutos. Asimismo, la gente normal casi siempre alcanza sus valores fisiológicos más elevados sobre la cinta ergométrica, aunque algunos deportistas consiguen valores más altos sobre ergómetros que encajan de forma más precisa con su tipo de entrenamiento o de competición.

Las cintas ergométricas también tienen sus desventajas como la dificultad para poder obtener una medición precisa de la tensión arterial durante el ejercicio en la cinta se puede complicar por el ruido asociado al funcionamiento normal de la misma, la obtención de muestras de sangre de una persona que está sobre una cinta ergométrica también es difícil.

Las cintas ergométricas generalmente producen valores extremos más elevados para casi todas las variables fisiológicas valoradas, tales como la frecuencia cardíaca, la ventilación y el consumo de oxígeno (Wilmore y Costilla, 2004).

Biopsia Muscular: Las muestras se extraen mediante biopsia muscular, que implica extraer del vientre de un músculo un trozo muy pequeño para su análisis. El área de donde se toma la biopsia se adormece primero mediante un anestésico local, luego se practica una pequeña incisión (aproximadamente de 0.5 cm.) con un escalpelo a través de la piel, del tejido subcutáneo y de la aponeurosis. Luego se inserta una aguja hueca hasta la profundidad adecuada en el músculo. Se empuja un pequeño émbolo a través del interior de la aguja para recortar una muestra muy pequeña de músculo.

La aguja de la biopsia se retira, y la muestra, que pesa entre 10 y 100 mg, se extrae, se limpia de sangre, se introduce en un tubo previamente preparado con RNA later; el cual mantiene el RNA de la muestra estable y se almacena en congelación a -70°C (Wilmore y Costilla, 2004).

Desoxirribonucleótidos (dNTPs): Los cuatro dNTPs (dATP, dTTP, dCTP y dGTP; distinguibles por sus bases nitrogenadas) son la base para conformar las nuevas cadenas de ADN. La variación en su concentración afecta la especificidad y fidelidad de la reacción. Concentraciones altas de los mismos hacen disminuir la fidelidad con la que la polimerasa efectúa su trabajo, e incluso pueden llegar a inhibir su actividad. También afecta a la fidelidad de la reacción el uso de concentraciones

desbalanceadas de estos cuatro ingredientes, siendo las concentraciones usuales, en la mayoría de los casos, entre 0.2 a 1 mM (Rodríguez y Barrera, 2004).

Taq Polimerasa: El ADN polimerasa, conocido como 'Taq polimerasa', se denominó así por la bacteria *Thermus aquaticus* que fue aislada originalmente de aguas termales. El enzima puede resistir las altas temperaturas necesarias para la separación de las cadenas del ADN, permaneciendo en el tubo de la reacción. (Saiki, 1998).