

**INDUCCIÓN DE LA ENZIMA GLUTAMINA SINTETASA MEDIANTE EJERCICIO**

**Andrés Duarte Rojo**

**Aspirante al Grado de Maestro en Ciencias Médicas**

**Aldo Torre Delgadillo**

**Médico Adscrito al Departamento de Gastroenterología, INCMNSZ**

**Tutor**

**Sergio Ponce de León Rosales**

**Subdirector de Servicios Paramédicos, INCMNSZ**

**Tutor**

**Departamento de Gastroenterología  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán  
Vasco de Quiroga No. 15, Sección XVI, Tlalpan 14000, México, D.F.  
Teléfono 5487 0900 Ext. 2706  
Correo electrónico: [aduarter76@yahoo.com.mx](mailto:aduarter76@yahoo.com.mx)  
No. de Cuenta UNAM: 502043554**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## ÍNDICE

	Página
1. Resumen.....	4
2. Antecedentes.....	6
3. Definición del problema y justificación.....	15
4. Hipótesis.....	16
5. Objetivo.....	17
6. Material y métodos.....	18
7. Resultados.....	30
8. Conclusiones y discusión.....	33
9. Referencias.....	41
10. Tablas y figuras.....	49

## RESUMEN

**Antecedentes:** La encefalopatía hepática es una complicación frecuente de la cirrosis hepática resultado de alteraciones en el metabolismo del amoníaco. Existe evidencia de que el músculo es capaz de metabolizar el amoníaco mediante acción de la enzima glutamina sintetasa (GS), que convierte amoníaco y glutamato en glutamina. La evidencia sobre el papel del ejercicio en la inducción de la enzima es contradictoria. Si esta maniobra fuese exitosa se podría beneficiar a muchos pacientes con cirrosis y encefalopatía hepática, al estimular un metabolismo no hepático del amoníaco.

**Objetivos:** Determinar en individuos sanos si una prueba de esfuerzo submáxima es capaz de inducir la expresión génica (ARN mensajero o ARNm) de la enzima GS, y si existe disminución en los niveles de amoníaco. Los objetivos secundarios fueron: establecer si el grado de inducción de GS correlaciona con la masa muscular o con el grado de actividad física previa.

**Material y Métodos:** Como subrogado del ARNm de GS muscular se estudiaron células periféricas mononucleares. El cálculo del tamaño de muestra fue de 14 individuos. Se tomaron muestras sanguíneas cada 2 horas (de 8 a 14 horas), inicialmente en un día sin ejercicio (control), y posteriormente un segundo día con una prueba de esfuerzo (ejercicio) después de la primera toma. La masa muscular se estimó mediante antropometría, y se aplicó un cuestionario para determinar el grado de actividad física previa. La expresión de ARNm de GS se determinó mediante RT-PCR en tiempo real, usando 2 genes de referencia (hipoxantina fosforribosil transferasa, HPRT;  $\beta$ -actina). Además, se midieron niveles de amoníaco, creatina fosfoquinasa y lactato en plasma o suero. Las comparaciones se realizaron con estadística no paramétrica y se construyeron áreas bajo la curva (ABC) para un mejor análisis.

**Resultados:** Se incluyeron 7 hombres y 7 mujeres con edades entre 41 y 56 años, notándose un incremento de ARNm de GS entre 25 y 50% (HPRT y  $\beta$ -actina, respectivamente) a las 2 horas durante el día de ejercicio, que no alcanzó significancia estadística. Después de construir ABC se pudo observar inducción en el día con ejercicio en hasta 6 de 12 pacientes, sin significancia estadística. No hubo diferencia en los resultados entre hombres y mujeres. En lo referente al amoníaco, sólo en los hombres se observó un ABC menor en el día con ejercicio ( $p=0.028$ ). El nivel de expresión basal de ARNm de GS se correlacionó negativamente con el grado de actividad física, y en las mujeres con la masa magra ( $r=-0.900$ ,  $p=0.037$ ), pero sólo en el conjunto de datos con HPRT como referencia ( $p=-0.822$ ,  $p=0.002$ ). La magnitud de la inducción (ABC) del día con ejercicio correlacionó con los equivalentes metabólicos alcanzados en la prueba de esfuerzo ( $r=0.655$ ,  $p=0.021$ ), sólo cuando  $\beta$ -actina se usó como referencia. Creatina fosfoquinasa y lactato no mostraron cambios.

**Conclusiones:** En el presente estudio se pudo demostrar cambio en la tasa de transcripción de GS en sujetos sometidos a un episodio de ejercicio, aunque sin la significancia estadística esperada para la muestra calculada. El hallazgo de que los hombres tuvieron un ABC más baja de amoníaco en el día que realizaron ejercicio, hace suponer metabolismo del mismo en relación con el ejercicio. La asociación negativa entre expresión basal de ARNm de GS y actividad física o masa muscular, no apoyan al ejercicio como inductor de ARNm de GS; aunque el ABC del ARNm en el día de ejercicio sugiere que a mayor actividad muscular en la prueba de esfuerzo mayor es la inducción. Los resultados no son concluyentes para demostrar inducción del gen de GS o del metabolismo de amoníaco mediante ejercicio y deberán ser tomados en cuenta antes de buscar los mismos objetivos en pacientes con cirrosis.

**Resultados:** Se incluyeron 7 hombres y 7 mujeres con edades entre 41 y 56 años, notándose un incremento de ARNm de GS entre 25 y 50% (HPRT y  $\beta$ -actina, respectivamente) a las 2 horas durante el día de ejercicio, que no alcanzó significancia estadística. Después de construir ABC se pudo observar inducción en el día con ejercicio en hasta 6 de 12 pacientes, sin significancia estadística. No hubo diferencia en los resultados entre hombres y mujeres. En lo referente al amoníaco, sólo en los hombres se observó un ABC menor en el día con ejercicio ( $p=0.028$ ). El nivel de expresión basal de ARNm de GS se correlacionó negativamente con el grado de actividad física, y en las mujeres con la masa magra ( $r=-0.900$ ,  $p=0.037$ ), pero sólo en el conjunto de datos con HPRT como referencia ( $p=-0.822$ ,  $p=0.002$ ). La magnitud de la inducción (ABC) del día con ejercicio correlacionó con los equivalentes metabólicos alcanzados en la prueba de esfuerzo ( $r=0.655$ ,  $p=0.021$ ), sólo cuando  $\beta$ -actina se usó como referencia. Creatina fosfoquinasa y lactato no mostraron cambios.

**Conclusiones:** En el presente estudio se pudo demostrar cambio en la tasa de transcripción de GS en sujetos sometidos a un episodio de ejercicio, aunque sin la significancia estadística esperada para la muestra calculada. El hallazgo de que los hombres tuvieron un ABC más baja de amoníaco en el día que realizaron ejercicio, hace suponer metabolismo del mismo en relación con el ejercicio. La asociación negativa entre expresión basal de ARNm de GS y actividad física o masa muscular, no apoyan al ejercicio como inductor de ARNm de GS; aunque el ABC del ARNm en el día de ejercicio sugiere que a mayor actividad muscular en la prueba de esfuerzo mayor es la inducción. Los resultados no son concluyentes para demostrar inducción del gen de GS o del metabolismo de amoníaco mediante ejercicio y deberán ser tomados en cuenta antes de buscar los mismos objetivos en pacientes con cirrosis.

## ANTECEDENTES

La encefalopatía hepática (EH) y su forma mínima son complicaciones que llegan a afectar hasta a 80% de los pacientes con cirrosis y confieren un mal pronóstico, con costos importantes para los sistemas de salud (Córdoba 2008, Haussinger 2008, Poordad 2007). El edema astrocitario es el resultado final de diversos factores que ocasionan EH, y es considerado actualmente el daño fundamental de esta enfermedad (Haussinger 2008). Se sabe que el amoníaco juega un papel primordial en su fisiopatogenia (Stewart 2005) y se acepta que sus niveles sanguíneos correlacionan con el estadio de gravedad (Ong 2003, Odeh 2005). La toxicidad dada por el amoníaco deriva de la falla hepática en su remoción, por lo que los astrocitos, y en general el sistema nervioso central, quedan expuestos a concentraciones excesivas de este metabolito, causando incremento en el estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, déficit energético y en última instancia, edema celular y alteración en la neurotransmisión (Stewart 2005, Rose 2005, Albrecht 2006).

### *Metabolismo del amoníaco*

En condiciones normales, el nivel de amoníaco en el organismo depende de la actividad global y balance neto de tejidos u órganos productores o consumidores del mismo. Las vías con principal involucro en el metabolismo del amoníaco son las siguientes:

- 1) Conversión de glutamato y amoníaco en glutamina mediante acción de la enzima glutamina sintetasa (GS), por un mecanismo dependiente de ATP (Rose 2005); y la reacción inversa, esto es, el paso de glutamina a amoníaco y glutamato, que esta dado por la enzima glutaminasa (Rose 2005).
- 2) El ciclo de la urea, en el cuál se unen de amonio y CO<sub>2</sub> formando carbamoil-fosfato, que a su vez se une a aspartato dando lugar a urea, para ser excretada por el riñón, llevando a una pérdida neta de amoníaco.
- 3) Metabolismo (ciclo) de nucleótidos purínicos, en el cual los derivados de adenosina y guanina son desaminados, liberando amoníaco, para su conversión a inositol monofosfato, permitiendo la recuperación de los derivados purínicos (vía de salvamento de purinas); o bien, son transformados a ácido úrico para su eliminación.

En breve, el metabolismo interorgánico en condiciones de salud y en EH será descrito a continuación:

Metabolismo intestinal: El intestino delgado cuenta con una gran actividad de glutaminasa y contribuye ampliamente con la concentración circulante de amoníaco, al desamidar diversos productos nitrogenados (Olde-Damnik 2002). En pacientes con EH se ha identificado correlación con una actividad incrementada de glutaminasa (Romero-Gómez 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 el amoníaco circulante puede ser extraído por el músculo. Sin embargo, el balance neto del metabolismo muscular del amoníaco suele ser neutro, probablemente porque la producción de amoníaco 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 (Olde-Damink 2002, Chatauret 2004).

Metabolismo renal: El riñón contiene actividad enzimática de GS y glutaminasa y puede participar en la producción y remoción del amoníaco. 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 destoxificación de amoníaco que puede complementar la destoxificación muscular mediante la desamidación de la glutamina (Olde-Damink 2002).

Metabolismo hepático: La mayor parte del amoníaco en el cuerpo es eliminado mediante el ciclo de la urea hepático, localizado en los hepatocitos periportales, mientras que el amoníaco que escapa a esta vía es transformado a glutamina mediante la GS en los hepatocitos perivenosos (Haussinger 1990), manteniendo la homeostasia del amoníaco. La falla en la destoxificación del amoníaco deriva de la menor actividad del ciclo de la urea, y de la GS, que se reduce hasta en un 80% en pacientes con cirrosis (Kaiser 1988).

Metabolismo astrocitario: En el sistema nervioso central es el astrocito el que contiene actividad de GS y elimina el exceso de amoníaco y glutamato. Sin embargo, estudios experimentales han puesto en evidencia que la actividad de GS en los astrocitos disminuye también (o al menos no se ve incrementada) en estados de hiperamoniemia (Rose 2005).

*Actividad de GS muscular y su posible papel destoxicador de amoníaco en EH*

Desde hace más de tres décadas se ha propuesto que la GS del músculo pueda constituir una vía alterna para el metabolismo del amoníaco en pacientes con cirrosis. En un estudio con 14 pacientes con cirrosis descompensada se demostró un gradiente de amoníaco que sugería extracción muscular de esta molécula a nivel del brazo, que era más notable en pacientes con mayor masa muscular, mientras que en controles sanos no se identificó algún cambio (Ganda 1976). Asimismo, estos autores demostraron que la remoción de amoníaco se asoció con incremento en la producción de glutamina, sugiriendo actividad incrementada de GS muscular (Ganda 1976). En otro estudio clínico en pacientes con HE se pudieron demostrar gradientes arterio-venosos consistentes con disminución de glutamato e incremento concomitante de glutamina, que dada su alta correlación estequiométrica, sugieren fuertemente activación de una vía de metabolismo muscular del amoníaco, y específicamente, actividad de GS muscular (Clemmensen 2000). Por otra parte, estudios experimentales realizados por diversos grupos de investigadores han demostrado que en estados de hiperamoniemia o falla hepática aguda la actividad de GS en el músculo se incrementa, brindando actividad destoxicadora de amoníaco. Así, Hod y cols, en un modelo de ratas con hiperamoniemia generado por la oclusión de la vena porta pudieron demostrar que se producía un descenso arterio-venoso de amoníaco en estos animales, asociado con la amidación de glutamato en glutamina e incremento de casi 6 veces en la actividad de GS en el músculo esquelético, en comparación con un grupo control (Hod 1982). Leweling y cols, en un modelo basado en la infusión de sales de amonio encontraron descenso en los niveles plasmáticos y musculares de aminoácidos ramificados, y especialmente de glutamato, asociado con incremento en los niveles de glutamina (Leweling 1996). En otros dos modelos con ratas se investigó además el cambio concomitante en músculo y otros tejidos. En el primero se pudo observar que después de una anastomosis porto-cava, la actividad de GS en hígado y

sistema nervioso central disminuyeron en alrededor del 30%, mientras que la actividad muscular se incrementó en un 52%, sin evidenciarse cambios en los niveles de proteína o de ARNm en músculo (Desjardins 1999). En el segundo, se realizó anastomosis porto-cava y ligadura de arteria hepática, confirmando los resultados previos en músculo y sistema nervioso central, y demostrando además incremento en los niveles de la proteína GS (aunado al de la actividad enzimática) (Chatauret 2006). Todas las publicaciones mencionadas son consistentes en que ante un estado de hiperamoniemia el músculo esquelético se convierte en un órgano para la detoxificación del amoníaco, a través de la actividad de GS, brindando una vía alterna a la reducida actividad de la misma enzima en hepatocitos y astrocitos.

#### *Maniobras para modular el metabolismo del amoníaco mediante GS en EH*

El conocimiento profundo del metabolismo del amoníaco ha permitido en años recientes la incorporación de la L-ornitina-L-aspartato al armamentario terapéutico de la EH con base en estudios clínicos (Haussinger 2008). El fundamento farmacodinámico de este compuesto es su actividad de estimulación a nivel del ciclo de la urea, aunque se propone también que pueda estimular la actividad de GS muscular (Gebhardt 1997, Rose 1999, Chatauret 2004). A la fecha, no se han estudiado otras maniobras capaces de inducir GS a nivel del músculo, o bien en otros tejidos, con intención de favorecer algún metabolismo alterno del amoníaco.

#### *Ejercicio y entrenamiento físico*

A grandes rasgos, el ejercicio puede dividirse en anaeróbico, cuando las fuentes de energía principales son ATP y creatina fosfato preformados, así como la vía anaeróbica de la glucólisis con producción de lactato (en general con duración de segundos a < 2-4 minutos); y en aeróbico, en el cual la energía proviene de una fosforilación oxidativa eficiente que proporciona ATP para el trabajo muscular al mismo tiempo que se está produciendo (duración mayor a 4 minutos) (McCardle 2001).

#### *Ejercicio y metabolismo del amoníaco*

En condiciones de salud, se ha demostrado que durante el ejercicio se produce amoníaco derivado del ciclo de nucleótidos de purina. Investigaciones en laboratorio (con extremidades de rata aisladas) evidenciaron producción incrementada de

amoníaco asociada con decremento en moléculas ricas en energía como creatina fosfoquinasa, adenosina mono-, bi- y trifosfato; así como correlación positiva con el incremento en inositol monofosfato (producto de la vía de salvamento de las purinas). Esto sugiere que durante el ejercicio el consumo de moléculas que contienen adenina ocasiona su catabolismo y genera amoníaco por vía de la adenosina desaminasa, es decir, se activa el ciclo de los nucleótidos de purina para salvamento de adenosina. También se ha evidenciado una clara relación entre el incremento del amoníaco y la elevación del lactato, como consecuencia de una activación en la glucólisis anaeróbica, siendo los cambios más notables a mayor intensidad de la activación muscular, y en presencia de hipoxia (Goodman 1977). Diversos estudios en deportistas han confirmado el incremento en los niveles de amoníaco a consecuencia del ejercicio (Wilkerson 1975, Babik 1983). Eriksson y cols realizaron un experimento en el que 11 sujetos sanos fueron sometidos a 3 rutinas de ejercicio con distinta intensidad, con mediciones de amoníaco, lactato y aminoácidos. Los resultados relevantes se muestra en la tabla 1. Como se puede observar en las 4 primeras líneas, el amoníaco y lactato se incrementan durante el ejercicio, retornando a niveles basales después de 30 a 60 minutos de recuperación, con una muy buena correlación estequiométrica ( $r=0.85$ ,  $p < 0.001$ ) entre éstos (Eriksson 1985). Es notable que a mayor intensidad del ejercicio, mayor es la producción de estos dos metabolitos, o bien, tomando la correlación con lactato, mientras éste no se eleve y el ejercicio sea aeróbico con consumo energético eficiente (derivado de fosforilación oxidativa) no existe elevación importante de amoníaco. Esto es de gran importancia para pacientes con cirrosis y EH en tanto que la realización de ejercicio pueda no causar elevación de amoníaco y empeorar así un estado de hiperamoniemia.

#### *Inducción de GS muscular mediante ejercicio*

Estudios experimentales en animales han mostrado inducción de GS de manera indirecta, mediante la actividad física, lo cual pudiera ser relevante para mejorar el estado de hiperamoniemia en pacientes con cirrosis y EH. En un modelo de ejercicio moderado en ratas se observó disminución simultánea de amoníaco y glutamato plasmáticos, en comparación con animales sedentarios (Santos 2007). Asimismo, Miyazaki y cols demostraron disminución de glutamato e incremento en glutamina, tanto a nivel plasmático como muscular, en animales sin y con cirrosis, cuando se compararon con los grupo control (Miyazaki 2006). En la tabla 1 (líneas 5 a 10) se

puede observar que los niveles de glutamato disminuyeron durante ejercicio, mientras que los de glutamina se vieron incrementados, de manera similar a lo encontrado en animales por Santos y cols y Miyazaki y cols. (Eriksson 1985, Santos 2007, Miyazaki 2006). Además, en este estudio se pudo comprobar que en el estado basal y durante la recuperación existió captación neta de amoníaco; y se observó captación de glutamato y producción de glutamina concomitantes, lo que fuertemente sugiere actividad de GS muscular (Eriksson 1985). Otro hallazgo interesante es el de liberación de alanina, que fue similar al de glutamina (aunque más intenso) y se correlacionó con el amoníaco ( $r=0.75$ ,  $p<0.001$ ) sugiriendo que este último fue precursor en su generación desde piruvato, de manera similar a lo ocurrido con glutamina. El hallazgo de que el músculo, al igual que el hígado, puede metabolizar amoníaco (aunque a menor escala) ya ha sido sugerido por otros autores (Bessman 1955, Chatauret 2006). En conclusión, estos trabajos sugieren que se logró activar a la enzima GS a nivel muscular, aunque su metodología no incluyó la expresión de ARNm de GS.

#### *Ácido láctico, acidemia y estrés oxidativo durante ejercicio*

La elevación de lactato o ácido láctico durante el ejercicio supone el desarrollo de acidemia durante el mismo. Múltiples estudios han demostrado que la realización de ejercicio produce acidosis metabólica, dando lugar a estrés oxidativo (Radak 2001, Bloomer 2004). Esto ocurre tanto en sujetos entrenados como en aquéllos sin entrenamiento (Rietjens 2007), y es consecuencia del recambio de ATP no mitocondrial y no del ácido láctico (Robergs 2004). Inclusive, se ha demostrado que el ácido láctico no es un buen parámetro para determinar la presencia de hidrogeniones como respuesta al ejercicio (Juel 2004). El estrés oxidativo puede generar importantes cambios deletéreos en la función celular y está considerado como uno de los factores fisiopatogénicos de la EH. Uno de los efectos sistémicos del estrés oxidativo es la carbonilación de proteínas, que se ha detectado inclusive minutos después de un evento único de ejercicio (Bloomer 2007, Michailidis 2007).

#### *Propuesta de una nueva terapéutica para EH de bajo grado en pacientes con cirrosis*

Los antecedentes ya plasmados hacen suponer que las interacciones inter-orgánicas de amoníaco, puedan no sólo cobrar trascendencia en pacientes con cirrosis, sino ser manipulados con un beneficio terapéutico. En este sentido, se propone que el metabolismo muscular de amoníaco estimulado mediante ejercicio pueda mejorar el

estado de la EH en pacientes con cirrosis, entre otros posibles beneficios. Esto implicaría el desarrollo de un programa de entrenamiento físico que contemple diversos aspectos de seguridad en pacientes con cirrosis, que quedan fuera del alcance de este documento. Sin embargo, la demostración de inducción de GS mediante ejercicio en voluntarios sanos podría sentar las bases fisiológicas para posteriormente perseguir este objetivo en pacientes con cirrosis.

### **DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN**

La EH es un problema común en la cirrosis con mal pronóstico y terapéutica limitada. El presente estudio busca explorar vías metabólicas en voluntarios sanos, que puedan ser aplicables a pacientes con cirrosis, con la intención final de poder brindar en un futuro una alternativa terapéutica a los pacientes con EH de bajo grado y cirrosis, mediante la inducción de GS dada por el entrenamiento físico. Así, este estudio tiene como intención confirmar la inducción génica de GS en voluntarios sanos sometidos a una prueba de esfuerzo, y demostrar funcionalidad de la vía enzimática mediante determinación del cambio en el amoníaco. De manera secundaria se buscará asociación con la masa muscular estimada mediante bioimpedancia, así como posibles cambios agudos en oxido-reducción y evidencia de daño muscular.

## **HIPÓTESIS**

El ejercicio incrementa en forma aguda (mediante una prueba de esfuerzo) la expresión génica de GS en voluntarios sanos.

La inducción de GS se asocia con funcionalidad de una vía alterna de detoxificación de amoníaco, demostrada por disminución en sus niveles.

Una prueba de esfuerzo incrementa el estrés oxidativo (determinado mediante carbonilación de proteínas) pero no genera daño muscular.

La expresión génica de GS se correlaciona directamente con la masa muscular estimada mediante bioimpedancia. Asimismo, se asume que los sujetos con mayor actividad física rutinaria tienen niveles basales de expresión GS más altos y pueden inducir la enzima con mayor intensidad.

## **OBJETIVO PRIMARIO**

Determinar en individuos sanos si una prueba de esfuerzo submáxima (ejercicio) es capaz de inducir la expresión génica (ARN mensajero o ARNm) de la enzima GS, en un período de observación menor a 6 horas, así como establecer si existe reducción en el amoníaco que sugiera funcionalidad catalítica de la misma.

## **Objetivos secundarios**

Documentar que la prueba de esfuerzo incrementa el estrés oxidativo a nivel sistémico determinado mediante carbonilación de proteínas, pero no genera daño muscular, estimados mediante incremento en los niveles de creatina fosfoquinasa (CPK).

Establecer si la inducción de GS se correlaciona de manera directa con la masa muscular estimada mediante bioimpedancia.

Comprobar que los sujetos con mayor actividad física de forma rutinaria tienen niveles basales de expresión de ARNm de GS más altos y pueden inducir la enzima con mayor intensidad.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### *Diseño del estudio*

Se trata de un estudio experimental, comparativo (mismos voluntarios antes y después de la maniobra), longitudinal, que investiga un mecanismo fisiológico.

### *Reclutamiento e identificación de voluntarios sanos*

Mediante convocatoria abierta se invitaron a participar a sujetos presumiblemente sanos entre 40 y 65 años. La identificación de algún estado mórbido se realizó mediante historia clínica, exploración física, y en casos necesarios se solicitaron estudios de laboratorio y/o gabinete. Se incluyeron pacientes en quienes se descartó la presencia de alguna enfermedad cardiovascular, metabólica o muscular, o que requiriesen algún medicamento de manera cotidiana que pudiese afectar el estado neuromuscular. Antes de la realización de los estudios pertinentes se recabó el consentimiento informado.

### *Expresión génica de GS: músculo vs células periféricas mononucleares*

Aunque la demostración de la inducción de ARNm de GS a nivel muscular mediante ejercicio debe realizarse en tejido muscular, esto implica la realización de biopsias musculares seriadas, lo cual constituye un conflicto ético. Por este motivo, y dado que existía evidencia de que la expresión génica en células periféricas mononucleares (PBMC) reflejan la expresión génica a nivel muscular durante entrenamiento físico (Zweig 2004), se decidió usar éstas como subrogado.

### *Identificación y caracterización de la enzima GS en linfocitos*

Previo a la cuantificación de ARNm de GS en PBMC mediante transcripción reversa-reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (RT-PCT) se identificó y caracterizó la proteína GS mediante inmunofluorescencia indirecta y Western Blot. La metodología se destaca a continuación:

Inmunofluorescencia indirecta: Se extrajo sangre de voluntarios sanos por la mañana y antes de cualquier actividad física relevante y se procesó para obtener linfocitos, mediante un gradiente de Ficoll. Los linfocitos purificados fueron fijados con paraformaldehído al 4%, permeabilizados con tritón al 1% y bloqueados con una solución de suero bovino fetal al 1% / albúmina al 1%. En esta etapa, los linfocitos

fueron incubados con un anticuerpo anti-GS (dilución 1:500, Sigma), seguido de incubación con un anticuerpo anti-IgG de conejo FITC (1:50, Sigma). La señal fluorescente se registró en un microscopio confocal Leica (TCS SP5 Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Como control positivo para inmunolocalizar a la GS se utilizó un fragmento de hígado de rata.

Western Blot: Este se realizó para caracterizar el peso molecular de la proteína GS en los linfocitos. Una muestra de linfocitos aislados se mezcló con amortiguador de carga y se resolvió en un gel de SDS-acrilamida al 10%. Después se transfirieron las proteínas a una película de nitrocelulosa, la que fue bloqueada con una solución de leche libre de grasas al 5% / tween 0.2%. Esta membrana se incubó con anticuerpo anti-GS (1:500, Sigma) seguido de incubación con un anticuerpo Alexa 480 anti-IgG de conejo (1:300, Invitrogen). La señal fluorescente se capturó en un equipo Typhoon (GE Healthcare). Como control positivo para identificar a la GS se utilizó un extracto de cerebro de rata (Clontech, Mountain View, USA).

Mediante esta investigación preliminar con sangre obtenida de voluntarios del Laboratorio de Gastroenterología se pudo identificar que la proteína de GS se encuentra presente en los linfocitos humanos, caracterizada por una banda de 44 kDa (Figura 1).

#### *Cálculo del tamaño de muestra*

Con conocimiento de que la GS se expresa en linfocitos, se realizó un estudio piloto con 6 individuos sanos con determinaciones de ARNm de GS mediante RT-PCR en tiempo real, en los siguientes tiempos: basal, 15 min., 1, 2, 6 y 24 horas. Esto se realizó en dos días: uno en el que cada sujeto llevó cabo las actividades cotidianas (control) y otro en el que se realizó además una prueba de esfuerzo entre el tiempo basal y 15 min (ejercicio). Los resultados se muestran en la Figura 2. Como puede notarse, el día de realización de la prueba de esfuerzo se observó incremento en la expresión génica en las primeras 2 h después de la misma. Se calcularon áreas bajo la curva (ABC) de las primeras 2 h, observándose un incremento en 17.5 unidades en el promedio obtenido para el grupo control y el grupo con ejercicio (127.6 y 145.1, respectivamente). También se calculó la diferencia entre las ABC de los dos grupos, encontrando un promedio y desviación estándar (DE) de  $48.7 \pm 25.11$  unidades. Así,

de acuerdo a la fórmula de medias pareadas, y tomando 20 como la diferencia esperada mínima ( $\Delta$ ), y 25.11 como la DE de la diferencia ( $\sigma d$ ); así como errores  $\alpha$  y  $\beta$  de 0.05 y 0.2 (o bien, una K de 7.8), se realizó el siguiente cálculo:

$$n \geq (K) (\sigma d)^2 / \Delta^2 = (7.8) (25.11)^2 / (20)^2 = 12.29$$

Aunque se requería un mínimo de 13 sujetos sanos, se decidió por conveniencia incluir 14, equilibrando así los géneros (7 hombres y 7 mujeres).

### *Descripción de las maniobras*

#### Prueba de esfuerzo y determinación del grado de entrenamiento físico previo

Se realizó en el Departamento de Cardiología por un médico especialista en el área. En cada voluntario se obtuvo previamente un electrocardiograma de base. La prueba de esfuerzo se realizó en banda sin fin según protocolo de Bruce, hasta alcanzar 85% de la frecuencia cardíaca máxima (estimada mediante la fórmula: 220 - edad en años). En todos los casos la prueba se realizó en ayuno a las 8:00 horas  $\pm$  30 minutos.

#### Toma de muestras sanguíneas

Se llevó a cabo de la siguiente manera: a su llegada a las 8:00 horas cada individuo fue canalizado con un catéter vascular 16 a 18 G, obteniendo la muestra basal, con extracciones posteriores a las 10:00, 12:00 y 14:00 horas. Después de la primera toma se colocó un tapón estéril y se instiló solución salina entre las tomas posteriores. Este mismo protocolo se realizó el primer día de estudio (sin prueba de esfuerzo), así como el segundo día, con la realización de prueba de esfuerzo inmediatamente después de la primera toma sanguínea. En cada toma se extrajo el equivalente a 12-15 mL en tubos para suero (1) y plasma (1 con EDTA y 1 con heparina sódica). Excepto por las mediciones de amoníaco, lactato y CPK (que fueron procesadas inmediatamente), todas las muestras fueron preparadas para su congelamiento a  $-70^{\circ}\text{C}$  y estudio posterior. En caso de que ocurriese algún retraso en la toma de muestra inicial, o bien, en la prueba de esfuerzo, los horarios de las tomas de muestra subsecuentes fueron ajustaron para mantener un período de 2 horas entre cada toma. En todos los casos, el paciente se mantuvo en ayuno hasta las 10:00 horas (segunda toma) después de lo cual se otorgó un desayuno estandarizado.

### Antropometría

El primer día del estudio se tomaron peso, talla, circunferencias de cintura y cadera, así como una impedancia bioeléctrica para calcular la masa grasa y la masa libre de grasa (estimado de la masa muscular), según protocolo estándar (Lukasaki 1985) y tomando como referencia los valores normales validados para la población mexicana (Macias 2007).

### Aplicación del Cuestionario de Actividad Física de la Universidad de Laval

Este cuestionario (CAF-Laval) ya validado en la población mexicana (López-Alvarenga 2001) se entregó a cada voluntario el primer día del estudio, para ser completado en casa y entregado en los días siguientes.

### *Determinación de ARNm de GS en PBMC*

#### Obtención de PBMC

El ARNm empleado para la detección de cambios de expresión del mensajero de la GS se aisló de células mononucleares de sangre periférica de los voluntarios. Con el fin de utilizar en forma eficiente la sangre total obtenida a la que se le había retirado el plasma se modificó un protocolo estándar basado en la recuperación de PBMC (principalmente linfocitos), mediante un gradiente de Ficoll (Bøyum 1977). Brevemente el procedimiento consistió en reconstituir el paquete de eritrocitos y demás componentes celulares en la mitad del volumen del paquete con solución salina isotónica amortiguada con fosfatos (PBS: NaCl 150 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, pH 7.4); por ejemplo a un paquete de 6 mL se le añadieron 3 mL de PBS. Después de resuspender el paquete celular por inversión se diluyó 1:1 con PBS en tubos cónicos de 15 mL. En un segundo tubo cónico de 15 mL se depositaron 3 mL de una preparación comercial de Ficoll (Lymphoprep<sup>TM</sup> de Nycomed). Sobre el ficol se depositaron 9 mL de la sangre diluida evitando mezclar el ficol con la suspensión de sangre total. La suspensión se centrifugó a 2000 rpm en una centrífuga clínica Sorvall durante 30 min a temperatura ambiente. Las células mononucleares se separaron de los eritrocitos al formar un anillo blanquecino que se recuperó con micropipeta en un volumen no mayor a 3 mL, repartido en dos tubos eppendorff de 1.5 mL. Las células se sedimentaron en una centrífuga eppendorff a 1200 x g por 30 seg a 4°C. Los sobrenadantes se removieron por aspiración y los paquetes celulares se resuspendieron en 500 µL de PBS estéril, para ser mezclados en uno de los dos tubos

ependorff y centrifugados nuevamente a 1200 x g por 30 seg a 4°C. El sobrenadante se eliminó por aspiración y el paquete celular pasó al proceso de aislamiento de RNA.

#### Obtención de ARN total

El ARNm de las células mononucleares de sangre periférica se extrajo por medio del reactivo TRIzol (Invitrogen No de catálogo 15596026) basado en el método de extracción con fenol cloroformo y precipitación de Piotr Chomczynski (Chomczynski 1987). El proceso consistió en agregar 1 mL de la solución con fenol de TRIzol al paquete de células mononucleares concentradas en un tubo eppendorff de 1.5 mL como se describió en la sección anterior. El paquete se dispersó pipeteando la suspensión celular repetidamente hasta obtener una suspensión homogénea y fluida sin residuos del paquete celular. Después de adicionar 200 µL de cloroformo, los tubos se mezclaron vigorosamente por inversión y se dejaron reposar por 3 min. Las fases se separaron por centrifugación a 11,750 x g por 5 min a 4 °C. Se recuperó la fase superior (aproximadamente 500 µL), correspondiente a la fase acuosa, misma que se transfirió a tubos eppendorff de 1.5 mL y se mezcló con el mismo volumen (500 µL) de isopropanol. Después de agitación vigorosa por 15 seg en vortex y de dejar reposar a temperatura ambiente por 10 min, el RNA total precipitado se recuperó centrifugando a 11 750 x g por 10 min a 4 °C. Una vez descartado el sobrenadante, la pastilla se lavó con 1 ml de una mezcla de etanol:agua 75%:25%. Los tubos se agitaron vigorosamente con vortex por 30 seg antes de volver a centrifugar a 11 750 x g por 5 min a 4 °C. El sobrenadante se aspiró y el RNA total precipitado se dejó secar por 30 min en una campana estéril de flujo laminar.

El ARN total precipitado se solubilizó en 22 µl de agua estéril tratada con DEPC. Después de 3 incubaciones a 37 °C por 15 min seguidas de vortex y centrifugación se tomaron 2 µL y se diluyeron con 8 µL de agua estéril tratada con DEPC (dilución 1:5). Se midió la densidad óptica de esta dilución a 260 y a 280 nm por medio de un micro espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific). Después de realizar las diluciones necesarias para que la densidad óptica cayera dentro del rango lineal (entre 0.1 y 1 unidades de densidad óptica) se evaluó la calidad de la preparación por medio de la relación de la absorbancia a 260 nm/280 nm. Todas las muestras tuvieron

relaciones  $Abs_{260}/Abs_{280}$  entre 1.5 a 1.7. El rendimiento promedio fue de  $2 \pm 1 \mu\text{g}$  de ARN total/preparación.

La integridad de todas las muestras se verificó corriendo 500 ng de cada muestra de ARN total en geles desnaturalizantes de agarosa al 1%. Los geles se prepararon fundiendo 0.3 gramos de agarosa en 24.4 ml de  $H_2O$  con 600  $\mu\text{L}$  de un amortiguador de Tris EDTA y acetato concentrado (TAE 50%), una vez que la temperatura alcanzó  $55^\circ\text{C}$  se añadieron 5 mL de formaldehído. Cinco  $\mu\text{L}$  de cada muestra de ARN total se mezclaron con 5  $\mu\text{L}$  de la solución de carga (25% de glicerol, xilen-cianol y azul de bromofenol al 0.25%, suplementada con 25% de formamida, 15  $\mu\text{L}$  de formaldehído y 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de bromuro de etidio). Las muestras se calentaron a  $55^\circ\text{C}$  por 15 min antes de cargarse en los geles desnaturalizantes de agarosa donde se corrieron a 57 mV (sin limitación de corriente) por 20 min., tiempo al cual se obtuvo una imagen digitalizada del patrón de corrimiento. La señal fluorescente de las 3 bandas de ARNs ribosomales (5, 18 y 28 S) se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta y la imagen se capturó con un equipo Eagle-Eye y la ayuda de un programa de control de la adquisición de Kodak. En todos los casos se apreciaron las tres bandas bien definidas indicando que no hubo degradación del ARN en ninguna de las muestras.

### Retro-transcripción

Después de cuantificar y valorar la integridad del ARN total obtenido para cada muestra se procedió a realizar una retro-transcripción en un volumen final de 20  $\mu\text{L}$  empleando un estuche comercial para síntesis de ADNc (ADN complementario) (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, Roche 04897030001). Para cada reacción se emplearon 10  $\mu\text{L}$  de cada muestra de ARN total diluida para tener entre 50 y 200 ng. El ARN total se mezcló con 1  $\mu\text{L}$  de  $H_2O$ , 1  $\mu\text{L}$  de hexámeros al azar, 2  $\mu\text{L}$  de solución amortiguadora concentrada 10X, 1  $\mu\text{L}$  de cada uno de los dNTPs (4  $\mu\text{L}$  en total), 0.5  $\mu\text{L}$  de inhibidor de ARNasas y 0.5  $\mu\text{L}$  de transcriptasa del estuche. Las mezclas de reacción se prepararon para series de 10 reacciones de retro-transcripción que incluían las 8 muestras de cada individuo (4 muestras del día sin prueba de esfuerzo y 4 muestras del día con realización de prueba de esfuerzo), un control negativo y un control positivo. Una vez mezclados en tubos de 250  $\mu\text{L}$  con

tapa se aplicó el siguiente protocolo en una máquina de PCR MJ Reserach modelo PT480: 55 °C por 30 min, 85 °C por 5 min y refrigeración permanente 4 °C.

#### Reacciones de amplificación por PCR en tiempo real

Los ARNm de GS, hipoxantina fosforibosil transferasa (HPRT) y  $\beta$ -actina (actina) se amplificaron a partir del ADNc total generado de acuerdo a lo descrito en la sección de retro-transcripción. Las reacciones se llevaron a cabo empleando un estuche de reactivos Lightcycler Taqman Master (Roche) y capilares de 20  $\mu$ L (Roche) en un equipo Lightcycler (Roche) con un programa operativo y de análisis Lightcycler 4.05 (Roche). Se prepararon dos series de 10 muestras a partir del esquema empleado en la reto-transcripción: 8 muestras de cada individuo (los cursos temporales con y sin prueba de esfuerzo) un control negativo y un control positivo. Una serie se empleó para amplificar al ADNc de GS y la segunda serie para amplificar los ADNc de HPRT y actina. Ambas series de tubos se corrieron en paralelo dentro de un mismo cassette de PCR.

Para amplificar GS se emplearon 5  $\mu$ L del ADNc diluido 1:5 en H<sub>2</sub>O suplementados con 2  $\mu$ L de mezcla de reacción (ya con enzima Taqman, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> y solución amortiguadora), 0.2  $\mu$ L del cebador sentido (L) y 0.2  $\mu$ L del cebador antisentido (R) a una concentración final de 200 nM, 0.1  $\mu$ L de la sonda fluorescente (clave de la biblioteca universal de sondas de Roche: 55<sub>glu</sub> 530nm, 04688520001) a una concentración final de 100 nM y 2.5  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O.

Los amplicones de HPRT y actina y se amplificaron en la misma reacción empleando 5  $\mu$ L del ADNc diluido 1:5 en H<sub>2</sub>O suplementados con 2  $\mu$ L de mezcla de reacción (ya con enzima Taqman, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> y solución amortiguadora), 0.5  $\mu$ L del cebador sentido (L) y 0.5  $\mu$ L del cebador antisentido (R) a una concentración final de 200 nM, 0.1  $\mu$ L de la sonda fluorescente (clave de la biblioteca universal de sondas de Roche: 22<sub>HPRT</sub> 530nm, 04686969001) a una concentración final de 100 nM, 0.1  $\mu$ L de una mezcal con los cebadores R y L para el ADNc de actina a una concentración final de 200 nM, 0.12  $\mu$ L de la sonda fluorescente (clave de la biblioteca universal de sondas de Roche: 34<sub>beta</sub> 560nm, 04687671001) a una concentración final de 100 nM y 1.68  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O.

La amplificación se inició con calentamiento a 95 °C (desnaturalización) por 10 min. Para la amplificación se realizaron 45 ciclos del siguiente protocolo: 10 segundos a 95 °C (desnaturalización), 30 segundos a 60 °C (hibridación) y 1 segundo a 72 °C (extensión). Al finalizar el último ciclo la temperatura se mantuvo a 77 °C (extensión final) por 10 min. antes de enfriar a 4 °C.

#### *Determinación de amoníaco*

Cincuenta µL del tubo con EDTA fueron extraídos para medición inmediata de este metabolito según las indicaciones de un kit comercial (Roche, Mannheim, Alemania). El tiempo entre la toma de muestra y el procesamiento fue menor a 20-30 minutos.

Oxido-reducción: En una muestra de suero se determinó la carbonilación de proteínas mediante la prueba de Oxyblot®, de acuerdo a los lineamientos del fabricante (Millipore, Chemicon, EEUU).

#### *Determinaciones de lactato y CPK*

Serán determinados con el uso de 200 y 400mcL de plasma obtenidos de la muestra con heparina sódica en nuestro laboratorio central.

#### *Criterios de eliminación del estudio*

En los sujetos reclutados, se consideraron los siguientes criterios para eliminación el estudio: falta a alguna las tomas de sangre programadas, fallo en alcanzar la frecuencia cardíaca máxima en la prueba de esfuerzo o aparición de complicaciones durante la prueba de esfuerzo.

#### *Análisis estadístico*

Debido a la dispersión observada en los datos, y a que al aplicar la prueba de Shapiro-Wilks se observó una distribución no normal, los datos se expresaron como medianas e intervalo intercuartilar, y se utilizó estadística no paramétrica. Asimismo, por el comportamiento ascendente-descendente de los marcadores bioquímicos evaluados se decidió construir áreas bajo la curva (ABC) para realizar un análisis más apropiado de los datos (Matthews 1990). En el caso del ARNm de GS, los datos se expresaron

como incremento porcentual con respecto a la mediana de la determinación basal para cada día. En los casos en que el análisis se realizó entre grupos diferentes se realizó análisis estadístico con la prueba U de Mann-Whitney, mientras que al tratarse de comparaciones entre días de los mismos sujetos, se utilizaron los rangos señalados de Wilcoxon. Las ABC de ARNm de GS se correlacionaron con otras variables de interés mediante la prueba de Spearman. El análisis estadístico se realizó con STATA y SPSS, a dos colas, tomando como significativo un valor de  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS

### *Caracterización de la población*

Se incluyeron 14 voluntarios (50% mujeres) con edad media de 48.5 años (41 a 56 años). En lo referente a los antecedentes, se trató de una población con nivel de educación en años entre 9 y 23, y con bajo consumo de alcohol (0 a 20 g/d), que aunque se reportaron sanos, después de estudios de laboratorio realizados a su solicitud, se identificaron 4 sujetos con hipertrigliceridemia (niveles entre 181 y 380 mg/dL), y 2 con pre-hipertensión (uno de ellos con hipertrigliceridemia y posible síndrome metabólico por presentar además HDL bajo y glucosa en ayuno de 105 mg/dL). En todos ellos se inició terapia dietética y ha brindado seguimiento clínico para su adecuado manejo. Ninguno de los voluntarios cumplió con algún criterio de eliminación.

### *Antropometría, grado de actividad basal e intensidad de la prueba de esfuerzo*

La descripción de las variables antropométricas se muestran en la tabla 2. Como era esperable, los hombres tuvieron mayor peso, y mayor masa magra, así como menor índice de masa corporal, en relación con las mujeres. Los resultados referentes al grado de actividad basal e intensidad de la prueba de esfuerzo pueden observarse en la tabla 3. No se encontró diferencia en el CAF-Laval, ni tampoco en el tiempo en banda o los METs alcanzados en la prueba de esfuerzo (protocolo de Bruce) entre ambos géneros.

### *Expresión génica de GS (ARNm)*

La determinación seriada de ARNm de GS en PBMC se realizó con 12 pacientes debido a la pérdida de 2 durante el manejo de muestras. Los resultados se muestran en la figura 3, tanto en relación con el amplicón HPRT, como con el de  $\beta$ -actina. Puede observarse que en el día de ejercicio (Día 2) la transcripción del gen de GS sufrió una ligera inducción después de la prueba de esfuerzo (a las 10 horas, entre 25 y 50% contra la referencia de HPRT y  $\beta$ -actina, respectivamente), aunque hacia las 14 horas se identificó disminución en la tasa de transcripción en la muestra en el referente con actina (aproximadamente 50%). Sin embargo, ninguno de estos cambios alcanzó significancia estadística. Se procedió a calcular las ABC, mismas que se presentan en la tabla 4, y nuevamente se identificó que aunque las medianas presentan incremento

con el ejercicio, no se alcanzó significancia estadística y se observó mucha dispersión de los datos. En el caso de HPRT 5 de 12 pacientes mostraron inducción, mientras que el de  $\beta$ -actina fueron 6 de 12. No se observó diferencia en la expresión entre hombres y mujeres.

#### *Niveles de amoníaco, lactato y creatina-fosfoquinasa.*

En la figura 4 se puede apreciar el comportamiento de estos marcadores a través del tiempo, en los días con y sin ejercicio. Es evidente que no existió variación relevante, inclusive en el análisis de ABC (tabla 5). Sin embargo, al evaluar los géneros de manera separada es notable que en el día 1 los niveles de amoníaco demostraron una tendencia a ser mayores en los hombres en comparación con con las mujeres, mientras que en los hombres los niveles de amoníaco fueron menores el día 2, en relación con el día 1. También se observó que el día de ejercicio (día 2) las mujeres tuvieron tendencia a elevar los niveles de lactato, en relación con los hombres.

#### *Asociación entre inducción de ARNm de GS y antropometría/actividad física*

Para evaluar la posible asociación entre el nivel de expresión génica basal de GS y diversas variables de antropometría y actividad física, éstas se correlacionaron con la expresión promedio de las 8 horas en ambos días, como se muestra en la tabla 6. Sólo se observaron correlaciones negativas con el CAF-Laval para el grupo total y especialmente en hombres, y con el porcentaje de masa muscular en las mujeres, cuando se usaron los datos obtenidos con el testigo de HPRT. No se identificaron asociaciones con la expresión de GS usando actina como testigo. El mismo análisis se realizó también para buscar asociaciones con el ABC del día 2, o bien, con el cambio inducido por ejercicio (tabla 7). Los resultados de esta parte del estudio cuando se tomaron los datos de inducción de GS en referencia a HPRT como gen testigo, no demostraron significancia estadística. Sin embargo, en todos los sujetos se correlacionó positivamente el tiempo de actividad física en banda y los equivalentes metabólicos alcanzados en la prueba de esfuerzo (METs), cuando se usaron los datos obtenidos con actina como gen testigo. Cuando se compararon los METs logrados en la prueba de esfuerzo entre los pacientes que sí lograron inducir el gen de GS contra los que no lo indujeron, se encontró una tendencia estadística a mayor esfuerzo en el primer grupo (mediana [intervalo intercuartilar]: 10.1 [7-12.8] vs 7 [7-10.1],  $p=0.12$ ).

*Cauntificación de cambios en estrés oxidativo (carbonilación de proteínas)*

A pesar de que se siguieron de manera estricta los lineamientos establecidos por el fabricante en la realización de este ensayo, al término del mismo no fue posible detectar alguna señal en el espectrofotómetro.

## CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

La GS es una de las enzimas más importantes en el metabolismo del nitrógeno, y está íntimamente ligada a la destoxificación del amoníaco en pacientes con encefalopatía hepática. Su producto catalítico, la glutamina es el aminoácido libre más abundante en el cuerpo, y su principal fuente es el músculo esquelético, de donde es liberada a la circulación sanguínea para ser transportada a diversos tejidos (Curi 2007). La glutamina cumple múltiples funciones intracelulares, entre las que destacan: sustrato energético, gluconeogénesis, formación de ácidos nucleicos y glutatión (Curi 2007). Así, glutamina es un aminoácido ubicuo y necesario para todas las células, y por lo tanto la GS es considerada una enzima del metabolismo basal.

Se ha informado que el cortisol es un regulador de la transcripción génica de GS (Avisar 1999). Inclusive, en estudios con diversos tejidos de animales se ha logrado identificar que en regiones 5' (río arriba) del gen de la GS existen elementos de respuesta para glucocorticoides (Chandrasekhar 1999, Avisar 1999), y se ha reportado en el músculo de rata su incremento en respuesta a corticosteroides (Max 1990). Puesto que se sabe que el ejercicio incrementa la secreción de ACTH y a su vez de cortisol, es lógico pensar que el ejercicio pueda incrementar la tasa de transcripción de la GS mediante la liberación de cortisol a la circulación sanguínea (McCardle 2001). La glutamina, es otro regulador de la enzima, como se observó en un estudio con cultivos de células musculares en los que la adición de glutamina redujo la actividad de GS, pero no los niveles de ARNm, por lo que se le atribuye en efecto post-transcripcional (Feng 1990).

A pesar del sustento teórico de que el ejercicio debe inducir ARNm de GS, y de que la glutamina no debe alterar este efecto, los mecanismos de regulación del gen deben ser más complejos dado que investigaciones sobre esta vía de inducción han brindado resultados contradictorios. Kelso y cols demostraron en un modelo de hipertrofia de músculo plantar delgado que la actividad de GS se incrementaba 5.5 veces después de transcurridos 7 días (Kelso 1989). Sin embargo, un estudio con metodología similar realizado por otro grupo de investigadores no logró demostrar variación en la actividad enzimática, aunque si evidenció reducción en los niveles de ARNm de GS, con niveles de glutamina conservados (Falduto 1992). Estos resultados apoyaron conclusiones de otro estudio en el que un modelo de entrenamiento de resistencia en

ratas durante 12 a 16 semanas redujo los niveles de ARNm de GS. Asimismo, se demostró que el ejercicio se opone al efecto de inducción de ARNm de GS dado por corticosteroides (Falduto 1989). Esta evidencia controversial aunada a los estudios ya mencionados en la introducción, en los que de manera indirecta se demostró inducción de GS (aunque sin determinación de ARNm de GS) (Eriksson 1985, Santos 2007, Miyazaki 2006), hacen difícil establecer de antemano cuál sería el efecto que una exposición aguda a ejercicio podría ejercer en la transcripción de ARNm en humanos.

En el presente estudio se pudo demostrar cambio en la tasa de transcripción de GS en PBMC de sujetos sometidos a un episodio de ejercicio, aunque no se detectó la significancia estadística esperada según el cálculo de tamaño de muestra. La falta de significancia contrasta con lo observado previamente en el estudio piloto. En éste se incluyeron 36 voluntarios sanos con determinación de ARNm de GS, siendo 29 sometidos a ejercicio y 13 controles (6 pacientes tuvieron mediciones con y sin ejercicio, mismos que se usaron para el cálculo del tamaño de muestra). En la investigación piloto (Figura 5) se pudo observar inducción génica de GS mediante ejercicio, notándose una diferencia estadísticamente significativa en las ABC a las 2 y 6 horas ( $p=0.021$  y  $p=0.037$ ), motivo por el cuál el estudio actual se limitó a estudiar las primeras 6 horas. Aunque las gráficas que denotan la expresión a través del tiempo son similares en ambos estudios, se puede observar que en el actual la magnitud de la inducción fue ligeramente menor en comparación con el piloto (percentilas 75 máximas de 1.5 y 1.6, medianas máximas de 1.25 y 1.3, respectivamente) además de que la variabilidad de los resultados de ARNm medido por RT-PCR fue mayor en el actual, con gran traslape entre las dos poblaciones de estudio. Estos dos argumentos podrían explicar la ausencia de significancia estadística en la presente tesis. La menor inducción del estudio actual puede ser debida a que en esta ocasión se incluyeron voluntarios entre 41 y 56 años, mientras que en el ensayo piloto había más sujetos jóvenes (10 con menos de 30 años, 10 con edades entre 30 y 50 años, y 9 mayores a 50 años) notándose una correlación inversa entre la edad y la inducción de ARNm de GS ( $r=-0.368$ ,  $p<0.05$ ). La mayor variabilidad de los resultados de RT-PCR pueden ser debidas a diferencias inherentes a la técnica empleada, a la falta de mediciones por duplicado, y por supuesto, a variabilidad biológica entre individuos.

En esta ocasión además de utilizar al amplicón HPRT como testigo, se evaluó a la  $\beta$ -actina como otro gen testigo. En las gráficas de la figura 3 se puede observar que en el ensayo con  $\beta$ -actina se demostró mayor inducción en las primeras 4 horas del estudio, con un descenso posterior no observado con HPRT. Es ya conocido que una sesión de ejercicio puede inducir ambos genes (Hasten 2000, Hellsten-Westing 1993), y posiblemente la reducción identificada en el ensayo con  $\beta$ -actina represente una mayor activación de este gen, en relación con el de HPRT. Estas diferencias deberán ser tomadas en cuenta en estudios posteriores.

En lo que respecta a los niveles de amoníaco (tabla 5), era esperable encontrar mayores niveles en los hombres, en asociación con una mayor masa magra o muscular, y por lo tanto, un mayor metabolismo de compuestos nitrogenados. Por otra parte, el hallazgo de que los hombres tuvieron un ABC más baja de amoníaco en el día que realizaron ejercicio, hace suponer metabolismo del mismo en relación con el ejercicio. Desgraciadamente no se cuenta con los resultados de glutamina, que de presentar un incremento paralelo, brindarían información indirecta de mayor actividad de GS. Esto ya había sido demostrado en humanos en el estudio de Eriksson y cols (Eriksson 1985), así como en animales en los estudios de Miyazaki y cols, y Santos y cols (Miyazaki 2006, Santos 2007).

Los análisis de lactato y CPK se encontraron prácticamente en la totalidad de casos dentro de parámetros normales, suponiendo que no ocurrió metabolismo anaeróbico o daño muscular significativos. Se sabe que los niveles de lactato se incrementan ante el fallo del metabolismo aeróbico, permitiendo la regeneración de NADP para la obtención de energía mediante ATP de la vía de la glucólisis (Robergs 2007). En consecuencia, la estabilidad en sus niveles hace suponer que no hubo metabolismo anaeróbico importante. Es relevante hacer notar que las mujeres presentaron una tendencia a elevar más los niveles de lactato en el día de ejercicio, en comparación con los hombres, lo que puede estar asociado con un menor entrenamiento físico, como puede verse en el menor tiempo que toleraron en la banda, y los menores METs alcanzados. Aunque la CPK es un marcador inexacto para daño muscular y puede elevarse sólo como consecuencia de inflamación muscular sin daño celular (Koller 2005), ya ha sido usado por otros investigadores para determinar daño de manera

gruesa (Saunders 2004). Así, la observación de niveles persistentemente normales hace suponer que no ocurrió daño muscular.

Los resultados de la búsqueda de asociaciones entre expresión de ARNm de GS y variables de antropometría y actividad física fueron inesperados, especialmente en lo que respecta a las correlaciones negativas de la expresión basal con el CAF-Laval y el porcentaje de masa magra, dado que se esperaban correlaciones positivas. Cabe señalar que aunque los resultados de gasto energético obtenidos en el CAF-Laval son elevados, fueron similares a los reportados en el estudio de validación en México (López-Alvarenga 2001). En el estudio piloto ya se había encontrado una correlación positiva entre el porcentaje de masa muscular (magra) determinado mediante antropometría ( $r=0.412$ ,  $p<0.05$ ), lo que contrasta aún más con estos resultados. Sin embargo, si el entrenamiento físico y la masa muscular tienen un efecto negativo en la inducción de ARNm de GS (Falduto 1992 y 1989) estas asociaciones cobrarían sentido biológico y deberán ser tomadas en cuenta en estudios posteriores. En cualquier caso, no se puede descartar que se trate de un error tipo I inherente a las comparaciones múltiples. Se requieren más estudios para poder determinar la validez de estas asociaciones.

En cuanto a lo observado en las correlaciones con el ABC del día de ejercicio, los resultados apoyan que a mayor esfuerzo físico es mayor la inducción del gen de GS, un resultado esperado, pero opuesto a lo observado con la expresión basal. Asimismo, el hallazgo de que los pacientes que sí lograron inducir el gen tenían una tendencia a mayor esfuerzo físico en la prueba, hace suponer que la suspensión prematura de la prueba de esfuerzo también tuvo relación con la falta de significancia en nuestros resultados de inducción génica. Esto puede ser debido a que la prueba fue suspendida tomando como único criterio la frecuencia cardíaca y no se utilizó el consumo de oxígeno o la escala de Borg (McCardle 2001) para establecer el momento de suspensión de la prueba. En estudios posteriores se deberá utilizar alguno de estos métodos (además de la frecuencia cardíaca) para decidir el momento de suspensión de la prueba de esfuerzo.

En conclusión, se logró observar un incremento no significativo en la expresión de ARNm de GS, resultado que no cumplió con nuestro objetivo primario. Esta falta de

significancia puede ser debida entre otras cosas a la variabilidad del ensayo y a que no todos los sujetos lograron inducción del gen con el esfuerzo físico al que se sometieron. Sin embargo, se logró identificar en hombres una reducción significativa en el ABC de amoníaco, lo que sugiere metabolismo del mismo, aunque el significado biológico de este hallazgo es difícil de establecer dado que la reducción se observó en el ABC, mientras que todos los valores reales se encontraron dentro de parámetros normales. Con base en los resultados, este metabolismo de amoníaco no puede ser atribuido a actividad muscular dado que no realizamos gradientes arteriovenosos de las extremidades. Aunque no fue posible reproducir los resultados previamente encontrados en el estudio piloto, este ensayo ha permitido identificar algunas variables que deben ser controladas de mejor manera para estudios posteriores, a saber: mejorar la intensidad del trabajo físico en la prueba de esfuerzo utilizando algún otro método para indicar su suspensión además de la frecuencia cardiaca, considerar utilizar algún otro gen testigo que no presente cambios agudos con el ejercicio, mejorar la técnica de RT-PCR tiempo real, lo que podría implicar la medición por duplicado o triplicado para disminuir la variabilidad, e incluir mediciones de glutamina y glutamato para una mejor caracterización de la vía metabólica.

En cualquier caso se debe considerar que los cambios a observar en una exposición aguda pueden diferir de lo que pudiera ocurrir en sujetos sometidos a un programa de entrenamiento físico (con exposición repetida al ejercicio), lo que no descarta la posibilidad de que un programa de este tipo pueda tener efecto benéfico en los niveles de amoníaco en pacientes con EH. Habrá que considerar que así como no se observó inducción de ARNm de GS en todos los voluntarios sanos (6 de 12 en relación al amplicón de  $\beta$ -actina) esta maniobra no debiera ser benéfica en todos los casos de EH. En otros estudios con voluntarios sanos se ha determinado que para lograr la inducción de algunas enzimas involucradas en la regeneración de ATP se requiere la realización de ejercicio por más de 5 a 10 días (McCardle 2001) y en el caso de la GS esto podría ser aplicable, abriendo la posibilidad de encontrar resultados positivos con un programa de exposición repetida al ejercicio. Una propuesta de cómo el ejercicio podría beneficiar a pacientes con EH se muestra en la figura 6. De lograrse la inducción sostenida, el metabolismo muscular del amoníaco dado por la GS debe ir ligado a amoniagénesis renal y eliminación del grupo nitrogenado de la glutamina a

mediante amonio, por lo que los pacientes con cirrosis a estudiar deberán contar con una función renal normal. Además, el entrenamiento físico debe ser titulado para evitar que sea tan intenso como para incrementar los niveles de amoníaco de manera aguda, a través de la activación del ciclo de los nucleótidos de purina o desaminación de proteínas. Existe evidencia en atletas de que la intensidad del ejercicio, determinado mediante consumo de oxígeno ( $VO_2$ ), se correlaciona con el incremento en los niveles de amoníaco a partir de una  $VO_{2max} >50\%$  ( $VO_{2max}$ : consumo máximo de  $O_2$  observado en un individuo) (Wilkerson 1977, Babij 1983, Katz 1986, Urhausen 1992, Derave 1997), que depende principalmente de la presencia de fibras musculares tipo II (Dudley 1983), especialmente después de alcanzarse un estado de metabolismo anaeróbico (Itoh 1990). Sin embargo, poco se sabe acerca de lo que ocurre en la fase de recuperación, o bien, después de un programa de entrenamiento prolongado. Denis y cols reportaron en 11 sujetos pre-entrenados que después de un programa de entrenamiento de 8 a 12 sesiones manteniendo la  $VO_{2max}$  a 80%, se logró reducción en los niveles de amoníaco en sangre (Denis 1989). En otro estudio con 11 sujetos sin entrenamiento previo se logró reducir el incremento de amoníaco causado por el ejercicio entre 2 y 4 veces (intensidades de trabajo entre 65 y 85% respectivamente) después de un período de 7 semanas (42 sesiones) (Lo 1987). Por tanto, con miras a lograr un beneficio terapéutico en pacientes con EH y cirrosis, se debe caracterizar la vía metabólica del amoníaco en exposición aguda a ejercicio, tal como se ha realizado en este trabajo para voluntarios sanos, y evaluar los posibles cambios a un programa prolongado, tomando en cuenta los efectos que pudieran ocurrir según la intensidad o porcentaje de la  $VO_{2max}$  alcanzada.

## REFERENCIAS

1. Cordoba J, Minguez B. Hepatic encephalopathy. *Sem Liver Dis.* 2008;28:70-80.
2. Häussinger D, Schliess F. Pathogenetic mechanisms of hepatic encephalopathy. *Gut.* 2008;57:1156-65.
3. Poordad FF. Review article: the burden of hepatic encephalopathy. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007;25 Suppl 1:3-9.
4. Stewart CA, Cerhan J. Hepatic encephalopathy: a dynamic or static condition. *Metab Brain Dis.* 2005;20:193-204.
5. Ong JP, Aggarwal A, Krieger D, Easley KA, Karafa MT, Van Lente F, et al. Correlation between ammonia levels and the severity of hepatic encephalopathy. *Am J Med.* 2003;114:188-193.
6. Odeh M, Sabo E, Sruogo I, Oliven A. Relationship between tumor necrosis factor-alpha and ammonia in patients with hepatic encephalopathy due to chronic liver failure. *Ann Med.* 2005;37:603-612.
7. Rose C, Felipe V. Limited capacity for ammonia removal by brain in chronic liver failure: potential role of nitric oxide. *Metab Brain Dis.* 2005;20:275-283.
8. Albrecht J, Norenberg MD. Glutamine: a Trojan horse in ammonia neurotoxicity. *Hepatology.* 2006;44:788-794.
9. Olde Damink SW, Deutz NE, Dejong CH, Soeters PB, Jalan R. Interorgan ammonia metabolism in liver failure. *Neurochem Int.* 2002;41:177-188.
10. Romero-Gómez M, Ramos-Guerrero R, Grande L, et al. Intestinal glutaminase activity is increased in liver cirrhosis and correlates with minimal hepatic encephalopathy. *J Hepatol.* 2004;41:49-54.
11. Chatauret N, Butterworth RF. Effects of liver failure on inter-organ trafficking of ammonia: implications for the treatment of hepatic encephalopathy. *J Gastroenterol Hepatol.* 2004;19:S219-S223.
12. Häussinger D. Nitrogen metabolism in liver: structural and functional organization and physiological relevance. *Biochem J.* 1990;267:281-290.
13. Kaiser S, Gerok W, Häussinger D. Ammonia and glutamine metabolism in human liver slices: new aspects on the pathogenesis of hyperammonemia in chronic liver disease. *Eur J Clin Invest.* 1988;18:535-542.
14. Ganda OP, Ruderman NB. Muscle nitrogen metabolism in chronic hepatic insufficiency. *Metabolism.* 1976;25:427-435.

15. Clemmesen JO, Kondrup J, Ott P. Splanchnic and leg exchange of amino acids and ammonia in acute liver failure. *Gastroenterology*. 2000;118:1131-1139.
16. Hod G, Chaouat M, Haskel Y, Lernau OZ, Nissan S, Mayer M. Ammonia uptake by skeletal muscle in the hyperammonaemic rat. *Eur J Clin Invest*. 1982;12:445-450.
17. Leweling H, Breitreutz R, Behne F, Staedt U, Striebel JP, Holm E. Hyperammonemia-induced depletion of glutamate and branched-chain amino acids in muscle and plasma. *J Hepatol*. 1996;25:756-762.
18. Desjardins P, Rao KV, Michalak A, Rose C, Butterworth RF. Effect of portocaval anastomosis on glutamine synthetase protein and gene expression in brain, liver and skeletal muscle. *Metab Brain Dis*. 1999;14:273-280.
19. Chatauret N, Desjardins P, Zwingmann C, Rose C, Rao KV, Butterworth RF. Direct molecular and spectroscopic evidence for increased ammonia removal capacity of skeletal muscle in acute liver failure. *J Hepatol*. 2006;44:1083-1088.
20. Gebhardt R, Beckers G, Gaunitz F, Haupt W, Jonitza D, Klein S, Scheja L. Treatment of cirrhotic rats with L-ornithine-L-aspartate enhances urea synthesis and lowers serum ammonia levels. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997;283:1-6.
21. Rose C, Michalak A, Rao KV, Quack G, Kircheis G, Butterworth RF. L-ornithine-L-aspartate lowers plasma and cerebrospinal fluid ammonia and prevents brain edema in rats with acute liver failure. *Hepatology*. 1999;30:636-640.
22. McCardle WD, Katch FI, Katch VL. Exercise physiology. Energy, nutrition and performance. 5<sup>th</sup> Ed. Lippincott William & Wilkins. Philadelphia 2001.
23. Goodman MN, Lowenstein JM. The purine nucleotide cycle. Studies of ammonia production by skeletal muscle in situ and in perfused preparations. *J Biol Chem*. 1977;252:5054-5060.
24. Wilkerson JE, Batterton DL, Horvath SM. Ammonia production following maximal exercise: treadmill vs. bicycle testing. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1975;34:169-172.

25. Babij P, Matthews SM, Rennie MJ. Changes in blood ammonia, lactate and amino acids in relation to workload during bicycle ergometer exercise in man. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1983;50:405-411.
26. Eriksson LS, Broberg S, Björkman O, Wahren J. Ammonia metabolism during exercise in man. *Clin Physiol*. 1985;5:325-336.
27. Santos RV, Caperuto EC, Costa Rosa LF. Effects of acute exhaustive physical exercise upon glutamine metabolism of lymphocytes from trained rats. *Life Sci*. 2007;80:573-578.
28. Miyazaki T, Matsuzaki Y, Karube M, Bouscarel B, Miyakawa S, Tanaka N. Amino acid ratios in plasma and tissues in a rat model of liver cirrhosis before and after exercise. *Hepatol Res*. 2003;27:230-237.
29. Bessman SP, Bradley JE. Uptake of ammonia by muscle; its implications in ammoniagenic coma. *N Engl J Med*. 1955;253:1143-1147.
30. Radak Z, Taylor AW, Ohno H, Goto S. Adaptation to exercise-induced oxidative stress: from muscle to brain. *Exerc Immunol Rev*. 2001;7:90-107.
31. Bloomer RJ, Goldfarb AH. Anaerobic exercise and oxidative stress: a review. *Can J Appl Physiol*. 2004;29:245-263.
32. Rietjens SJ, Beelen M, Koopman R, VAN Loon LJ, Bast A, Haenen GR. A single session of resistance exercise induces oxidative damage in untrained men. *Med Sci Sports Exerc*. 2007;39:2145-2151.
33. Robergs RA, Ghiasvand F, Parker D. Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004;287:R502-R516.
34. Juel C, Klarskov C, Nielsen JJ, Krstrup P, Mohr M, Bangsbo J. Effect of high-intensity intermittent training on lactate and H<sup>+</sup> release from human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004;286:E245-E251.
35. Bloomer RJ, Fry AC, Falvo MJ, Moore CA. Protein carbonyls are acutely elevated following single set anaerobic exercise in resistance trained men. *J Sci Med Sport*. 2007;10:411-417.
36. Michailidis Y, Jamurtas AZ, Nikolaidis MG, et al. Sampling time is crucial for measurement of aerobic exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc*. 2007;39:1107-1113.

37. Zeibig J, Karlic H, Lohninger A, Dumsgaard R, Smekal G. Do blood cells mimic gene expression profile alterations known to occur in muscular adaptation to endurance training? *Eur J Appl Physiol* 2005;95:96-104.
38. Aggarwal D, Freake HC, Soliman GA, Dutta A, Fernandez ML. Validation of using gene expression in mononuclear cells as a marker for hepatic cholesterol metabolism. *Lipids Health Dis* 2006;5:22.
39. Torres-Vega MA, Sánchez-Muñoz F, Domínguez-Cruz S, Villamil-Ramírez H, Duarte-Rojo A, Domínguez-López A, Uribe M, Torre A. La expresión de glutamina sintetasa de linfocitos humanos puede ser aumentada por el ejercicio. Trabajo presentado en el Congreso Nacional de Bioquímica a celebrarse en Mérida en noviembre de 2008.
40. Lukaski HC, Johnson PE, Bolonchuk WW, Lykken GI. Assessment of fat-free mass using bioelectrical impedance measurements of the human body. *Am J Clin Nutr* 1985;41:810-817.
41. Macias N, Alemán-Mateo H, Esparza-Romero J, Valencia ME. Body fat measurement by bioelectrical impedance versus air displacement plethysmography: a cross-validation study to design bioelectrical impedance equations in Mexican adults. *Nutr J* 2007;6:18.
42. López-Alvarenga JC, Reyez-Díaz S, Castillo-Martínez L, Dávalos-Ibáñez A, González-Barranco J. Reproducibilidad y sensibilidad de un cuestionario de actividad física en población mexicana. *Salud Publica Mex* 2001;43:306-12.
43. Bøyum A. Separation of lymphocytes, lymphocyte subgroups and monocytes: a review. *Lymphology* 1977;10:71-76.
44. Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987 162:156-9.
45. Matthews JN, Altman DG, Campbell MJ, Royston P. Analysis of serial measurements in medical research. *BMJ* 1990;300:230-235.
46. Curi R, Newsholme P, Procopio J, Lagranha C, Gorjao C, Gorjao R, Pithon-Curi TC. Glutamine, gene expression, and cell function. *Front Biosci.* 2007;12:344-57.
47. Avisar N, Shiftan L, Ben-Dror I, Havazelet N, Vardimon L. A silencer element in the regulatory region of glutamine synthetase controls cell type-

- specific repression of gene induction by glucocorticoids. *J Biol Chem.* 1999;274:11399-11407.
48. Chandrasekhar S, Souba WW, Abcouwer SF. Identification of glucocorticoid-responsive elements that control transcription of rat glutamine synthetase. *Am J Physiol.* 1999;276:L319-L331.
  49. Max SR. Glucocorticoid-mediated induction of glutamine synthetase in skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc.* 1990;22:325-330.
  50. Feng B, Shiber SK, Max SR. Glutamine regulates glutamine synthetase expression in skeletal muscle cells in culture. *J Cell Physiol.* 1990;145:376-380.
  51. Kelso TB, Shear CR, Max SR. Enzymes of glutamine metabolism in inflammation associated with skeletal muscle hypertrophy. *Am J Physiol.* 1989;257:E885-E894.
  52. Falduto MT, Hickson RC, Young AP. Antagonism by glucocorticoids and exercise on expression of glutamine synthetase in skeletal muscle. *FASEB J.* 1989;3:2623-2628.
  53. Falduto MT, Young AP, Smyrniotis G, Hickson RC. Reduction of glutamine synthetase mRNA in hypertrophied skeletal muscle. *Am J Physiol.* 1992;262:R1131-R1136.
  54. Hasten DL, Pak-Loduca J, Obert KA, Yarasheski KE. Resistance exercise acutely increases MHC and mixed muscle protein synthesis rates in 78-84 and 23-32 yr olds. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000;278:E620-E626.
  55. Hellsten-Westing Y, Balsom PD, Norman B, Sjödén B. The effect of high-intensity training on purine metabolism in man. *Acta Physiol Scand.* 1993;149:405-412.
  56. Koller A. Creatine phosphokinase and muscle damage. *Med Sci Sports Exerc* 2005;37:166.
  57. Saunders MJ, Kane MD, Todd MK. Effects of a carbohydrate-protein beverage on cycling endurance and muscle damage. *Med Sci Sports Exerc* 2004;36:1233-1238.
  58. Wilkerson JE, Batterton DL, Horvath SM. Exercise-induced changes in blood ammonia levels in humans. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1977;37:255-263.

59. Katz A, Broberg S, Sahlin K, Wahren J. Muscle ammonia and amino acid metabolism during dynamic exercise in man. *Clin Physiol*. 1986;6:365-379.
60. Urhausen A, Kindermann W. Blood ammonia and lactate concentrations during endurance exercise of differing intensities. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1992;65:209-214.
61. Derave W, Bouckaert J, Pannier JL. Gender differences in blood ammonia response during exercise. *Arch Physiol Biochem*. 1997;105:203-209.
62. Dudley GA, Staron RS, Murray TF, Hagerman FC, Luginbuhl A. Muscle fiber composition and blood ammonia levels after intense exercise in humans. *J Appl Physiol*. 1983;54:582-586.
63. Itoh H, Ohkuwa T. Peak blood ammonia and lactate after submaximal, maximal and supramaximal exercise in sprinters and long-distance runners. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1990;60:271-276.
64. Denis C, Linossier MT, Dormois D, Cottier-Perrin M, Geysant A, Lacour JR. Effects of endurance training on hyperammonaemia during a 45-min constant exercise intensity. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1989;59:268-272.
65. Lo PY, Dudley GA. Endurance training reduces the magnitude of exercise-induced hyperammonemia in humans. *J Appl Physiol*. 1987;62:1227-1230.

**Tabla 1.** Cambios en el metabolismo del amoníaco y lactato en 11 sujetos sanos sometidos a ejercicio.

	<b>Basal</b>	<b>1ª Rutina</b>	<b>2ª Rutina</b>	<b>3ª Rutina</b>	<b>30 min</b>	<b>60 min</b>
<i>Intensidad</i>	-	35 ± 2	55 ± 3	80 ± 4	-	-
<sup>1</sup> <i>FC</i>	61 ± 10	113 ± 4	154 ± 3	184 ± 4	-	-
<sup>2</sup> <i>Lactato</i>	0.5 ± 0	1.0 ± 0.2	2.3 ± 0.5	7.7 ± 1.6	2.3 ± 0.6	1 ± 0.2
<sup>2</sup> <i>NH<sub>3</sub></i>	22 ± 2	27 ± 2	46 ± 6	84 ± 12	27 ± 4	20 ± 2
<sup>2</sup> <i>Glutamato</i>	58 ± 2	37 ± 3	31 ± 4	27 ± 3	60 ± 3	60 ± 4
<sup>2</sup> <i>Glutamina</i>	538 ± 15	616 ± 17	606 ± 17	666 ± 23	160 ± 5	605 ± 35
<sup>3</sup> <i>Capt. NH<sub>3</sub></i>	2.4 ± 0.5	-4 ± 3	-14 ± 2	-46 ± 15	-0.1 ± 0.7	1.8 ± 0.9
<sup>3</sup> <i>Capt. *Glu</i>	9 ± 2	20 ± 4	19 ± 9	15 ± 7	12 ± 2 <sup>***</sup>	
<sup>3</sup> <i>Capt. **Gln</i>	-14 ± 4	-25 ± 23	-47 ± 30	-95 ± 80	-10 ± 8 <sup>***</sup>	

<sup>1</sup>Frecuencia cardiaca. <sup>2</sup>Mediciones arteriales expresadas como promedio ± EE de mmol/L.

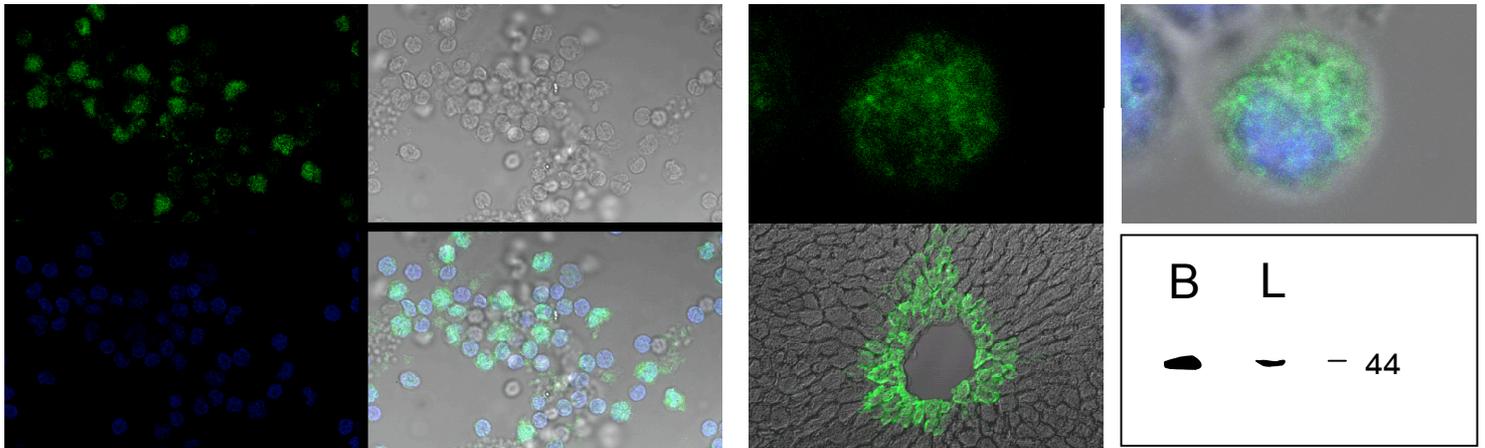
<sup>3</sup>Captación de amoníaco, \*glutamato y \*\*glutamina en miembro pélvico, expresado como promedio ± EE de µmol/min. Hace referencia a la captación (signo positivo) o liberación (signo negativo) expresada como la diferencia entre determinaciones de arteria y vena femorales (arterial – venosa).

<sup>\*\*\*</sup>Sólo se expresa una medición para el estado de recuperación, sin especificar el tiempo.

Los decimales fueron redondeados a su unidad más cercana.

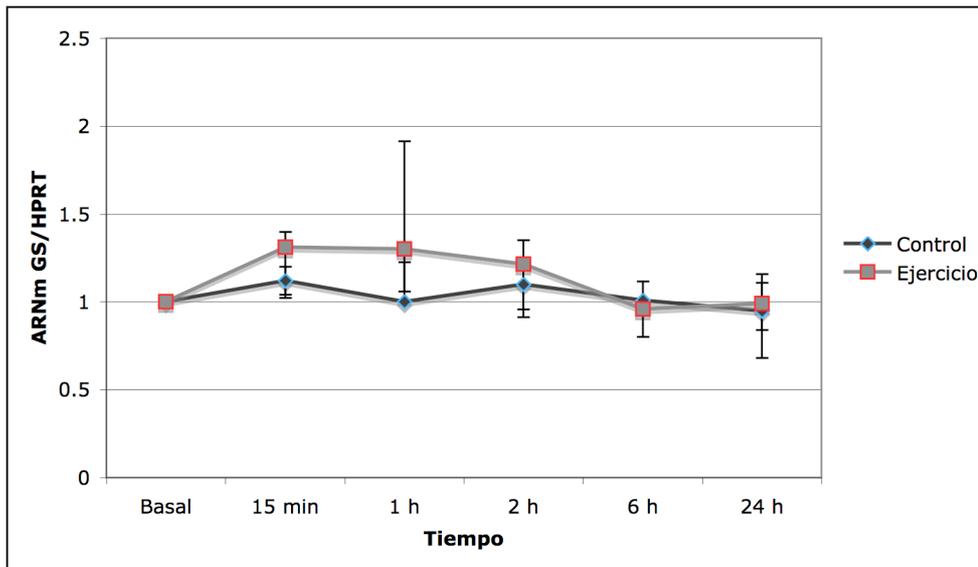
Tomado de Eriksson y cols 1985.

**Figura 1. Expresión de ARNm de glutamina sintetasa en células mononucleares circulantes en voluntarios sanos.**



En verde se observa la señal del anticuerpo contra GS en linfocitos. El corte histológico corresponde a hígado de rata (control positivo) con evidencia de GS en los hepatocitos perivenulares. En el último recuadro se observan los pesos moleculares en cerebro de ratón (B) y linfocitos humanos (L), que son similares.

**Figura 2. Expresión de ARNm de GS en estudio piloto (6 pacientes).**



Los resultados muestran incremento en número de veces con respecto al nivel basal (los resultados de todas las muestras de cada paciente fueron divididas entre su basal).

**Tabla 2. Resultados de la antropometría.**

	Todos	Mujeres	Hombres	$p^4$
Peso	72.5 (70-78.7)	70 (61.8-71.6)	75.8 (73.3-81.4)	0.034
IMC <sup>1</sup>	27.6 (25.9-31)	29.6 (25.1-33.4)	27.5 (25.9-28.6)	0.48
RCC <sup>2</sup>	0.92 (0.86-0.96)	0.86 (0.81-0.92)	0.93 (0.92-0.97)	0.025
Masa magra (%) <sup>3</sup>	62.7 (55.6-68.9)	55.6 (52.5-60.2)	69 (65.5-72.1)	0.001

Los datos se muestran como medianas (intervalo intercuartilar). Peso expresado en kilogramos.

<sup>1</sup>Índice de Masa corporal, expresado en kg/m<sup>2</sup>. <sup>2</sup>Razón cintura cadera. <sup>3</sup>Porcentaje de masa magra (muscular) estimada mediante bioimpedancia. <sup>4</sup>Prueba de Mann-Whitney.

**Tabla 3. Grado de actividad basal e intensidad de prueba de esfuerzo**

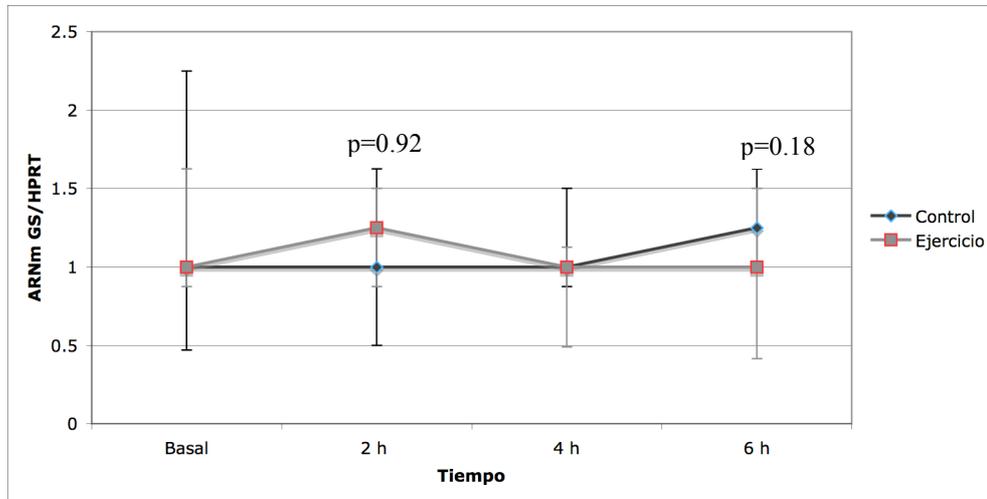
	Todos	Mujeres	Hombres	$p^1$
CAF-Laval	3698 (3405-3895)	3643 (3000-3890)	3698 (3405-4226)	0.47
Prueba Esfuerzo				
Tiempo	6.8 (6.2-9.2)	6.24 (4.28-9.17)	7.24 (6.27-9.39)	0.20
METs	8.6 (7-10.1)	7 (7-10.1)	10.1 (7-10.1)	0.54

Los datos se muestran como medianas (intervalo intercuartilar).

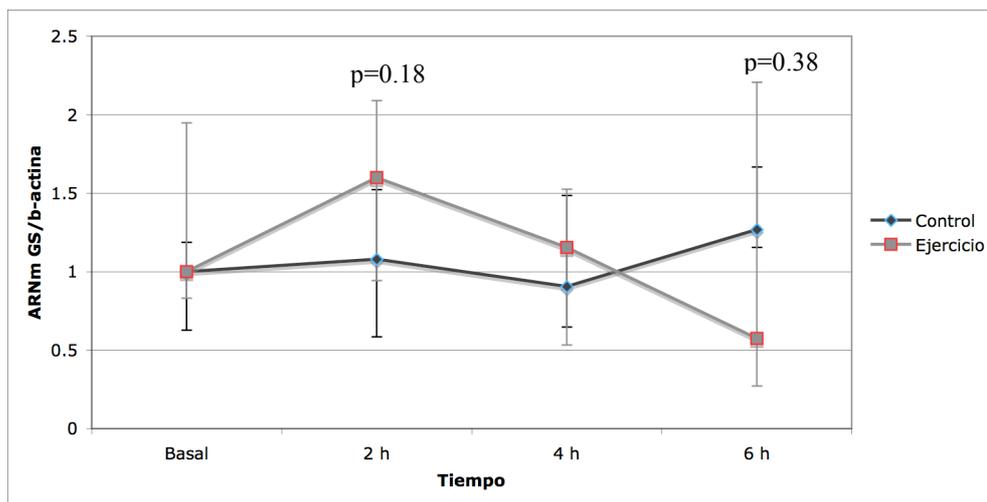
Tiempo expresado en minutos. <sup>1</sup>Prueba de Mann-Whitney.

**Figura 3. Expresión génica de ARNm de GS en relación a tiempo.**

a. En relación con HPRT



b. En relación con  $\beta$ -actina



Los resultados muestran incremento en número de veces con respecto a la mediana basal (los resultados de todas las muestras de cada paciente fueron divididas entre la mediana de la basal). Comparaciones realizadas con rangos señalados de Wilcoxon.

**Tabla 4. Áreas bajo la curva de las determinaciones seriadas de ARNm.**

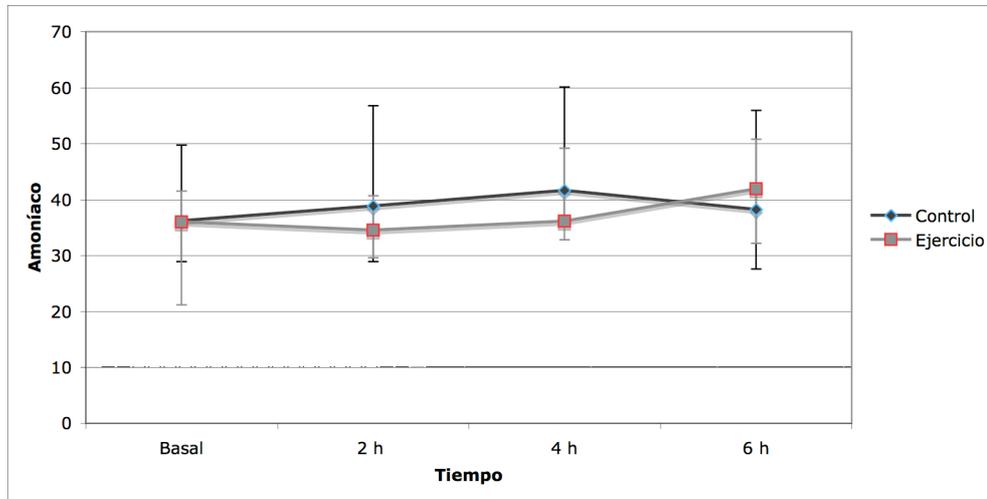
		Todos	Mujeres	Hombres	$p^1$
GS/HPRT					
	Día 1	6.7 (5-10.2)	7 (3.4-12)	6.4 (5-8.4)	1
	Día 2	7.1 (4.5-8.8)	5.4 (3.9-6.8)	8.5 (5-9.9)	0.27
	$p^2$	0.58	0.35	0.86	
GS/actina					
	Día 1	6.6 (5.1-8.1)	6 (6-8.2)	7.1 (3.9-8.1)	0.64
	Día 2	7.3 (5.1-12.7)	7.5 (7.2-8.3)	4.6 (5.7-15.3)	1
	$p^2$	0.64	0.69	0.24	

Los datos se muestran como medianas (intervalo intercuartilar).

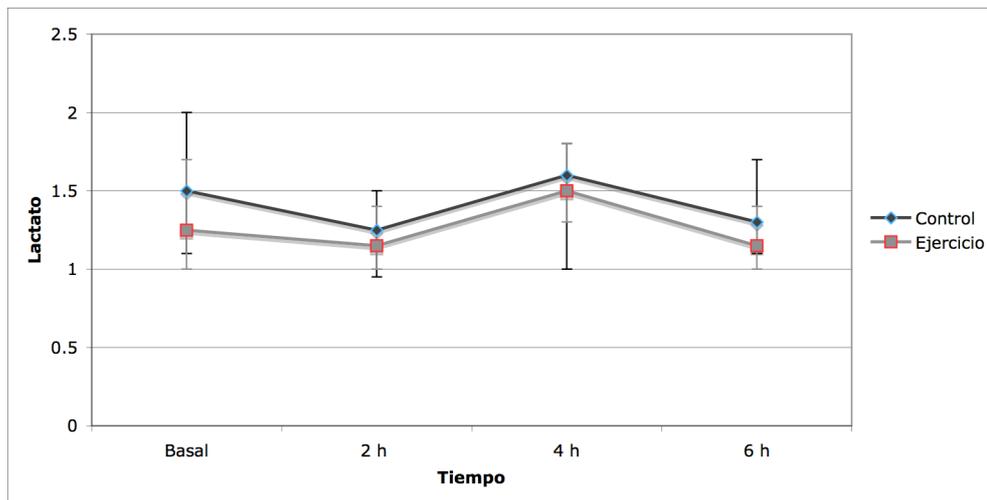
<sup>1</sup>Prueba de Mann-Whitney. <sup>2</sup>Rangos señalados de Wilcoxon.

**Figura 4. Niveles de amoníaco, lactato y cretina-fosfoquinasa.**

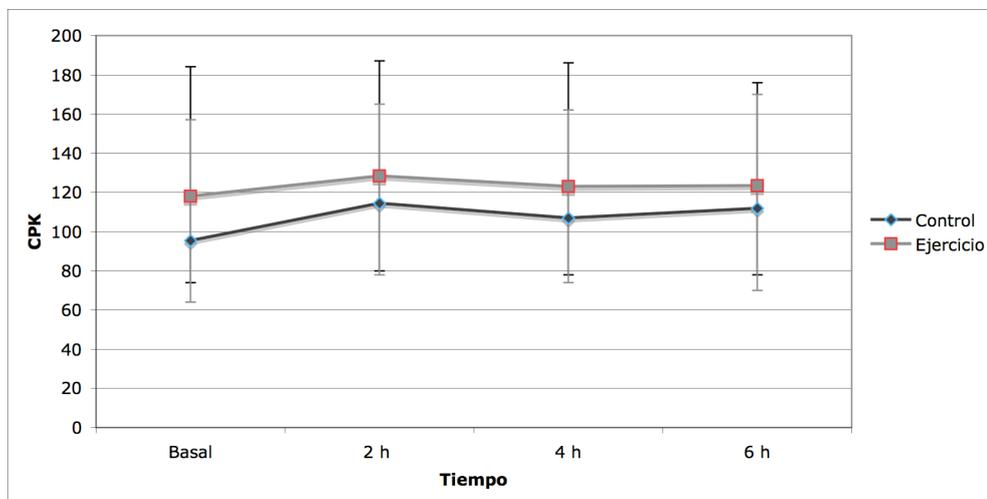
**a. Amoníaco**



**b. Lactato**



**c. Creatina-fosfoquinasa (CPK)**



**Tabla 5. Áreas bajo la curva de las determinaciones seriadas de amoníaco, lactato y creatina-fosfoquinasa.**

		Todos	Mujeres	Hombres	$p^1$
Amoníaco					
	Día 1	208 (187-313)	234 (166-261)	306 (275-338)	0.073
	Día 2	235 (189-261)	248 (189-267)	225 (184-261)	0.62
	$p^2$	0.19	0.61	0.028	
Lactato					
	Día 1	8.2 (7.4-10)	8.3 (7.2-10.5)	8.1 (7.4-10)	0.9
	Día 2	8.5 (6.7-9.3)	9.2 (7.5-9.5)	6.7 (6.3-8.8)	0.097
	$p^2$	0.27	0.93	0.13	
CPK					
	Día 1	645 (468-1106)	533 (375-809)	662 (628-1306)	0.21
	Día 2	739 (443-981)	680 (359-805)	744 (526-1397)	0.26
	$p^2$	0.59	0.61	0.61	

Los datos se muestran como medianas (intervalo intercuartilar).

<sup>1</sup>Prueba de Mann-Whitney. <sup>2</sup>Rangos señalados de Wilcoxon.

**Tabla 6. Correlación de Spearman entre expresión basal de ARNm de GS y variables de antropometría y actividad física.**

a. Gen de referencia: HPRT.

		Antropometría				CAF-Laval	Prueba de esfuerzo	
		Peso	IMC	RCC	MM%		Tiempo	METs
Todos	<i>r</i>	0.137	0.157	-0.35	-0.155	-0.822	-0.056	-0.028
	<i>p</i>	0.67	0.63	0.91	0.63	0.002	0.86	0.93
Mujeres	<i>r</i>	0.667	0.500	-0.200	-0.900	-0.8	-0.300	-0.410
	<i>p</i>	0.22	0.39	0.78	0.037	0.20	0.62	0.49
Hombres	<i>r</i>	0.250	0	0.143	0.071	-0.929	0	0.231
	<i>p</i>	0.59	1	0.76	0.88	0.003	1	0.62

b. Gen de referencia:  $\beta$ -actina.

		Antropometría				CAF-Laval	Prueba de esfuerzo	
		Peso	IMC	RCC	MM%		Tiempo	METs
Todos	<i>r</i>	0.049	0.144	0.161	-0.175	-0.418	0.147	0.311
	<i>p</i>	0.88	0.66	0.62	0.59	0.20	0.65	0.33
Mujeres	<i>r</i>	0.564	0.200	0.400	-0.300	0.400	0.400	0.359
	<i>p</i>	0.32	0.75	0.50	0.62	0.6	0.50	0.55
Hombres	<i>r</i>	0.286	0.288	0.536	-0.036	-0.607	0.250	0.463
	<i>p</i>	0.54	0.53	0.22	0.94	0.15	0.59	0.30

r= coeficiente de correlación de Spearman.

**Tabla 7. Correlación de Spearman entre inducción de ARNm (Día 2) de GS y variables de antropometría y actividad física.**

a. Gen de referencia: HPRT.

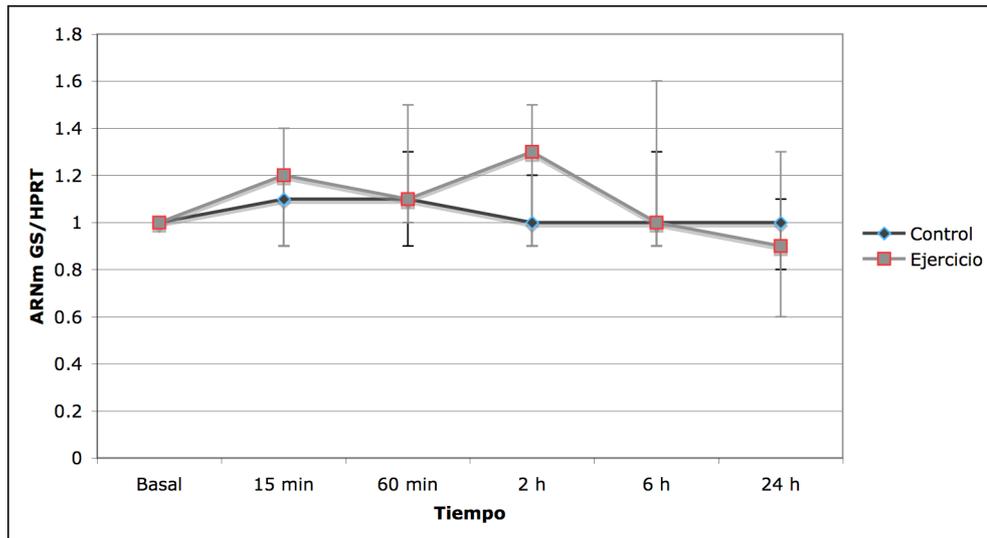
		Antropometría				CAF-Laval	Prueba de esfuerzo	
		Peso	IMC	RCC	MM%		Tiempo	METs
Todos	<i>r</i>	0.375	0.270	0.396	-0.284	-0.150	0.494	0.473
	<i>p</i>	0.23	0.40	0.20	0.37	0.66	0.10	0.12
Mujeres	<i>r</i>	0.616	0.900	0.300	-0.600	0.800	0.800	0.718
	<i>p</i>	0.27	0.37	0.62	0.29	0.20	0.10	0.17
Hombres	<i>r</i>	-0.180	-0.400	0.018	-0.270	-0.667	0.292	0.198
	<i>p</i>	0.70	0.37	0.97	0.56	0.10	0.53	0.67

b. Gen de referencia:  $\beta$ -actina.

		Antropometría				CAF-Laval	Prueba de esfuerzo	
		Peso	IMC	RCC	MM%		Tiempo	METs
Todos	<i>r</i>	0	0.284	0.322	-0.091	-0.027	0.524	0.655
	<i>p</i>	1	0.37	0.31	0.78	0.94	0.08	0.021
Mujeres	<i>r</i>	0.051	0.600	0.800	-0.100	0.800	0.800	0.872
	<i>p</i>	0.94	0.29	0.10	0.87	0.20	0.10	0.054
Hombres	<i>r</i>	0.107	0.216	0.607	-0.107	.0321	0.464	0.579
	<i>p</i>	0.82	0.64	0.15	0.82	0.48	0.29	0.17

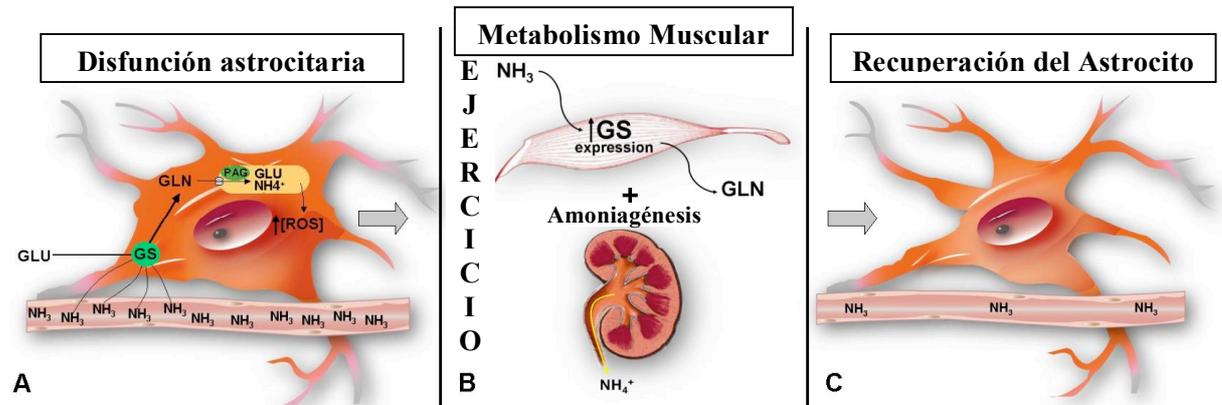
r= coeficiente de correlación de Spearman.

**Figura 5. Expresión de ARNm de GS en estudio piloto.**



Los resultados muestran incremento en número de veces con respecto al nivel basal (los resultados de todas las muestras de cada paciente fueron divididas entre su basal).

**Figura 6. Propuesta de una nueva terapéutica para encefalopatía hepática de bajo grado en pacientes con cirrosis.**



A. Edema y disfunción astrocitarios causados por hiperamoniemia y el estrés oxidativo derivado, propios de la encefalopatía hepática. B. Con el ejercicio se propone la inducción de GS muscular con el consecuente metabolismo de amoníaco a glutamina, en paralelo con amoniagénesis a nivel renal que desamina a la glutamina y excreta amonio en la orina. C. Recuperación astrocitaria dada por la reducción en los niveles circulantes de amoníaco.  $\text{NH}_3$ : amoníaco, GLU: glutamato, GS: glutamina sintetasa, GLN: glutamina, PAG: glutaminasa,  $\text{NH}_4$ : amonio, ROS: especies reactivas de oxígeno.