

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**ALTERACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE IL-6 EN RESPUESTA AL
EJERCICIO EN LA INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA
EXPERIMENTAL**

**TESIS ENTREGADA A LA UNIVERSIDAD DE CHILE
PARA OPTAR AL GRADO DE**

DOCTOR EN BIOQUÍMICA

POR

NATALIA HILDA DÜNNER MORENO

Directores de Tesis

Prof. Dr. Luis Michea

Prof. Dr. Enrique Jaimovich

2011

1 ÍNDICE GENERAL

1	ÍNDICE GENERAL.....	II
2	ÍNDICE DE FIGURAS y TABLAS.....	V
3	RESUMEN.....	VII
4	ABSTRACT.....	IX
5	ABREVIATURAS	X
6	INTRODUCCIÓN.....	1
6.1	Miopatía urémica.....	1
6.2	Alteraciones en la fibra muscular esquelética urémica	3
6.3	El calcio en la regulación de la expresión génica	5
6.4	Interleuquina-6.....	6
6.5	IL-6 en el músculo esquelético.....	8
6.6	IL-6 en la IRC.....	10
7	HIPÓTESIS.....	13
8	OBJETIVO GENERAL	13
9	OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	13
10	MATERIALES Y METODOS.....	14
10.1	Reactivos	14
10.2	Animales	14
10.3	Modelo experimental de insuficiencia renal crónica.....	14
10.4	Determinación del <i>clearance</i> de creatinina.....	15

10.5	Medición de la presión sanguínea sistólica	16
10.6	Estimulación eléctrica <i>in situ</i>	16
10.7	Prueba natatoria	18
10.8	Extracción de RNA.....	18
10.9	Cuantificación del RNA	19
10.10	Transcripción inversa	20
10.11	PCR en tiempo real.....	20
10.12	Electroforesis de DNA.....	21
10.13	Extracción y cuantificación de proteínas	22
10.14	Western blot.....	22
10.15	Cortes histológicos.....	24
10.15.1	Tinción histoquímica succinato deshidrogenasa (SDH).....	25
10.15.2	Tinción hematoxilina-eosina y medición del área de sección transversal.....	25
10.16	Expresión de resultados y análisis estadístico	25
11	RESULTADOS	27
11.1	Validación del modelo de IRC experimental.....	27
11.2	Efecto de IRC experimental en músculo esquelético.....	27
11.2.1	Morfología.....	27
11.2.2	Función contráctil.....	29
11.3	Alteración de la inducción del mRNA de IL-6 estimulada por el ejercicio en la uremia.....	30
11.4	Alteraciones en la vía de inducción de IL-6 estimulada por la despolarización muscular.	32

11.5	Estudio del tipaje en el EDL de ratas sham y NPX.....	39
11.6	Alteración de la inducción del mRNA de IL-6 estimulada por su retroalimentación positiva.	41
11.7	Análisis de la abundancia del mRNA de atrogina-1.....	46
12	DISCUSION.....	48
12.1	Vía de retroalimentación positiva de IL-6	48
12.2	Vía activada por la despolarización muscular.....	50
12.3	Alteración de la expresión de IL-6.....	51
12.4	Efectos fisiopatológicos de IL-6.....	52
12.5	EDL vs Soleo	54
13	CONCLUSIONES	57
14	REFERENCIAS	59

2 ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Modelo de regulación de la expresión génica de IL-6 en músculo esquelético.	12
Tabla 1. Partidores utilizados en los PCR en tiempo real.....	21
Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados en los <i>Western Blots</i>	24
Tabla 3. Anticuerpos secundarios utilizados en los <i>Western Blots</i>	24
Tabla 4. Parámetros fisiológicos de las ratas NPX.....	27
Figura 2. Frecuencia de distribución del tamaño de las fibras musculares en ratas sham y NPX.....	28
Figura 3. Disminución de la fuerza contráctil del músculo <i>Tibialis Anterior</i> en ratas NPX.....	29
Figura 5. Inducción del mRNA de IL-6 luego de la estimulación <i>in situ</i> y la natación en soleo de los animales NPX.	32
Figura 6. Diferencias en la expresión del mRNA de c-jun después de los protocolos de ejercicio en el EDL.....	33
Figura 7. Expresión de la proteína c-Jun después de los protocolos de ejercicio en el EDL.	34
Figura 8. Diferencias en la expresión del mRNA de c-jun después de los protocolos de ejercicio en el soleo.	35
Figura 9. Medición de la activación de NFκB inducida por el ejercicio en el EDL de ratas sham y NPX.....	36
Figura 10. Efecto de la nefrectomía y el ejercicio sobre la expresión del mRNA de TnIs en el EDL de ratas sham y NPX.....	37
Figura 11. Expresión de TnIs en el EDL de ratas sham y NPX.	38
Figura 12. Abundancia relativa del mRNA TnIs en soleo basal y después del ejercicio.	39
Figura 13. Tipaje del músculo EDL en ratas sham y NPX.....	40
Figura 14. Efecto de la nefrectomía y la natación sobre la abundancia del mRNA de IL-6R en ratas sham y NPX.	41
Figura 15. Efecto de la nefrectomía y la natación sobre la abundancia del mRNA de gp130 en ratas sham y NPX.	42

Figura 16. Efecto de la nefrectomía y la natación sobre JAK2 en el EDL.....	43
Figura 17. Inhibición de la fosforilación de STAT3 en el EDL de ratas urémicas.....	44
Figura 18. Inhibición de la abundancia del mRNA de SOCS3 estimulada por la natación en ratas NPX.....	45
Figura 19. Disminución de la fosforilación de AMPK α en el EDL de ratas NPX.	46
Figura 20. Abundancia del mRNA de Atrogina-1 en ratas NPX en condiciones basales y luego del ejercicio.	47
Figura 21. Modelo propuesto para la alteración de la vía de retroalimentación positiva de IL-6 en el músculo urémico.	55

3 RESUMEN

La insuficiencia renal crónica (IRC) induce una serie de alteraciones metabólicas en el músculo esquelético, debilidad muscular y disminución de la resistencia al ejercicio. Interleuquina-6 (IL-6) es una citoquina que se produce en el músculo esquelético y que es inducida por el ejercicio a través de dos vías: vía activada por la despolarización muscular y una vía de retroalimentación positiva por IL-6. Se ha postulado que IL-6 es un sensor de energía, con efectos autocrinos en el metabolismo muscular. Varios estudios han demostrado que la expresión basal de IL-6 se encuentra alterada en la IRC. Sin embargo, se desconoce si la IRC afecta la respuesta de IL-6 al ejercicio.

La serie de alteraciones musculares descritas en la IRC permitió plantear la siguiente hipótesis: “la regulación de la expresión de IL-6 muscular frente al ejercicio se encuentra alterada en la IRC experimental”. Ratas Sprague-Dawley macho fueron sometidas a nefrectomía 5/6 (NPX) y pareadas por peso y comida a controles (operación ficticia, sham). La respuesta al ejercicio se evaluó en el músculo *extensor digitorum longus* (EDL) y el soleo mediante dos protocolos: una estimulación eléctrica *in situ* a través del nervio ciático o después de nadar. Al final de los protocolos, EDL y soleo fueron disecados para la evaluación del mRNA y proteína. Las mayores diferencias se observaron en el EDL. Terminada la estimulación *in situ* el mRNA de IL-6 aumentó $85,4 \pm 8,0$ veces en las ratas sham y sólo $22,7 \pm 5,5$ en las NPX. En la natación, el mRNA de IL-6 de las ratas sham incrementó $85,7 \pm 50,3$ veces y $7,6 \pm 2,7$ veces en las ratas NPX. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la abundancia basal del mRNA de IL-6. Las mayores alteraciones en la regulación de la expresión de IL-6 se observaron en la vía IL-6/receptor de IL-6 (IL-6R)-gp130/JAK2. En las ratas NPX no se observaron alteraciones en los mRNA de los receptores de IL-6; no obstante, la expresión total de la proteína JAK2 decreció en un 37,1% con respecto a los controles. Esta alteración se asoció a una baja activación río abajo de JAK2, con una disminución de p-STAT3 y una reducción de la expresión del mRNA de SOCS3. Parte de los efectos metabólicos de IL-6 son mediados por la kinasa activada por AMP (AMPK). Los niveles basales de p-AMPK se encontraron reducidos en un 45,5% del control, diferencia que se mantuvo en un 39% después de la natación.

Estos resultados muestran, por primera vez, una alteración en la inducción en respuesta al ejercicio del mRNA de IL-6, producto de una resistencia del músculo esquelético a esta citoquina, la cual podría ser responsable del disminuido desempeño en el ejercicio en la IRC.

4 ABSTRACT

Chronic renal failure (CRF) induces a series of metabolic alterations in the skeletal muscle, muscular weakness and decreased exercise endurance. Interleukin-6 (IL-6) is a cytokine that is produced in the skeletal muscle and it is induced by exercise through two pathways: one activated by muscle depolarization and the other, via IL-6 positive feedback. It has been postulated that IL-6 is an energy sensor, with autocrine effects in muscle metabolism. Several studies have shown that basal expression of IL-6 is impaired in CRF, but whether CRF affects the response to exercise, is still unknown. The number of muscle disorders described in CRF allowed proposing the following hypothesis: "the regulation of IL-6 expression in response to exercise is altered in experimental CRF". Male Sprague-Dawley rats were given 5/6 nephrectomy (NPX) and paired by weight and food to controls (placebo surgery, sham). The response to exercise was evaluated in the *extensor digitorum longus* (EDL) and soleus by two protocols: *in situ* electrical stimulation through the sciatic nerve or after swimming. At the end of the protocols, EDL and soleus muscles were dissected for mRNA and protein evaluation. The largest differences were observed in the EDL. After *in situ* stimulation, IL-6 mRNA increased 85.4 ± 8.0 fold in the sham rats and only 22.7 ± 5.5 in NPX rats. Upon swimming, the IL-6 mRNA of sham was increased 85.7 ± 50.3 fold and 7.6 ± 2.7 fold in the NPX rats. However, there were no significant differences in basal mRNA abundance of IL-6. The major alterations in the regulation of IL-6 expression were observed in the IL-6/IL-6R-gp130/JAK2 pathway. NPX rats showed no alterations in the IL-6 receptors mRNA, however, the total expression of JAK2 was decreased by 37.08% compared to controls. This alteration was associated with low activation downstream of JAK2, decreased p-STAT3 and reduced expression of SOCS3 mRNA. Part of the metabolic effects of IL-6 is mediated by AMP-activated protein kinase (AMPK). Basal levels of p-AMPK were reduced by 45.48% of control; this difference also present (by 39.01%) after swimming.

These results show, for the first time, an impaired induction of IL-6 mRNA in response to exercise, caused by skeletal muscle resistance to this cytokine, which may be responsible of the reduced exercise performance in the CRF.

5 ABREVIATURAS

aa	= aminoácidos
ACC	= Acetil-CoA Carboxilasa
AMPK	= proteína kinasa activada por AMP
ATP	= Adenosina trifosfato
CPT1	= Carnitina Palmitoil Transferasa 1
DHPR	= Receptor de Dihidropiridina.
DTT	= Ditionotreitól
EDL	= Músculo extensor largo de los dedos
EE	= Error Estándar
ERC	= Enfermedad Renal Crónica
g	= gramo
GH	= Hormona de Crecimiento
gp130	= glicoproteína de 130 kDa
h	= Hora
I κ B α	= Inhibidor del Factor Nuclear-kappa B alfa
IL-1ra	= Antagonista del receptor de IL-1
IL-6	= Interleuquina-6
IL-6R	= Receptor de IL-6
IP ₃	= inositol-1,4,5-trifosfato
IP ₃ R	= Receptor de IP ₃
IRC	= Insuficiencia Renal Crónica
JAK2	= Kinasa Janus 2
kDa	= Kilo Dalton
mRNA	= RNA mensajero
mg	= Milígramo
μ g	= Microgramo
min	= Minuto
mL	= Mililitro
μ L	= Microlitro

NF κ B	= Factor Nuclear kappa B
NPX	= Ratas 5/6 nefrectomizadas
PBS	= Amortiguador fosfato salino
Prom	= Promedio
rcf	= Fuerza centrífuga relativa
RNA	= Ácido ribonucleico
SDH	= Succinato Deshidrogenasa
SDS	= Dodecil sulfato de sodio
sgp130	= gp130 soluble
sham	= Operación ficticia
sIL-6R	= IL-6R soluble
SOCS3	= Supresor de la señalización de citoquinas 3
STAT3	= Transductor de Señal y Activador de la Transcripción 3
TA	= Músculo Tibial Anterior
TnIs	= Troponina Esquelética Inhibitoria Lenta
VFG	= Velocidad de Filtración Glomerular

6 INTRODUCCIÓN

La enfermedad renal crónica (ERC) es un problema de salud grave que impacta de manera significativa a las personas afectadas, su familia, la sociedad y los servicios de salud. Frecuentemente, se asocia a otras patologías como la diabetes mellitus, la hipertensión arterial y el envejecimiento de la población (1). La insuficiencia renal crónica (IRC) terminal es la última etapa irreversible en la historia natural de la ERC, siendo su tratamiento la terapia de sustitución renal (diálisis o trasplante). En la IRC terminal la función renal se encuentra muy reducida, afectando todas sus funciones homeostáticas y endocrinas. Se produce una acumulación de productos metabólicos finales, cambios en la homeostasis del agua, electrolitos y ácido-base, alteraciones endocrinas y nutricionales, y anormalidades asociadas en el metabolismo de los lípidos, carbohidratos y proteínas. A este complejo síndrome que presenta características interrelacionadas, se le denomina uremia (2).

Según encuestas de la Sociedad Chilena de Nefrología, el 43,3% de los pacientes en diálisis presentan actividad limitada o incapacidad de autocuidado (3). Así la terapia de diálisis ha mejorado la supervivencia, pero no la calidad de vida (4).

6.1 Miopatía urémica

La miopatía urémica es una alteración del músculo esquelético en la IRC terminal, que se manifiesta como una debilidad muscular, resistencia al ejercicio limitada, pérdida de la masa muscular y fatiga rápida (5, 6). Esta enfermedad fue descrita por primera vez en 1967, al observarse debilidad muscular progresiva en pacientes con IRC. Debido a dificultades técnicas para su diagnóstico, no hay estudios sistemáticos sobre la prevalencia de la miopatía urémica en pacientes dializados. Sin embargo, se estima que se presenta en aproximadamente un 50% de los pacientes en hemodiálisis (7). Fahal *et al* (6) mostraron, al hacer mediciones de la fuerza de los cuádriceps en 49 pacientes, que el 71% de los pacientes IRC en diálisis presentaba debilidad muscular y relajación muscular más lenta. El máximo consumo de oxígeno en IRC es aproximadamente la mitad del consumo de los individuos sanos, incluso después de

corregir la anemia. Esto se explicaría en parte por una disminución de la densidad capilar del músculo esquelético (8).

Varios factores de riesgo, a menudo interrelacionados, han sido identificados en la miopatía urémica. Esta enfermedad aparece usualmente con una velocidad de filtración glomerular (VFG) menor a 25 mL/min y es rara con una mayor VFG. La progresión de la miopatía evoluciona paralela a la declinación de la función renal, y sus manifestaciones clínicas se vuelven más aparentes cuando la IRC llega a etapa V (VFG < 15mL/min). Otros factores que han sido asociados con la miopatía urémica son: diabetes mellitus, resistencia a la insulina, anemia, hipertensión arterial, hipertrofia del ventrículo izquierdo, acumulación de toxinas urémicas, malnutrición, anormalidades en el metabolismo de la vitamina D e hiperparatiroidismo secundario (5). Actualmente, no existe un tratamiento específico o efectivo para la miopatía urémica; no obstante, el aumento de la actividad física en pacientes en diálisis ha demostrado ser altamente beneficioso (5). Los programas de entrenamiento aeróbico, de fuerza o combinados mejoran el consumo de oxígeno, desempeño físico y algunos factores de riesgos cardiovasculares en estos pacientes (9, 10). Además, el ejercicio es beneficioso en la progresión de la ERC en ratas; sin embargo, este efecto no se ha visto en humanos (11). Algunos estudios no han logrado ver aumento del peso corporal (12) ni de la masa muscular (11, 13, 14). La capacidad aeróbica de los pacientes en hemodiálisis es sólo la mitad del valor esperado para individuos sanos (11). Estas personas a menudo citan la fatiga muscular, más que las limitaciones cardiopulmonares, como la razón para terminar el test de ejercicio máximo (15).

En un modelo de IRC experimental en ratón, ejercicios de fuerza y resistencia mitigan las anormalidades en el metabolismo proteico muscular y la función de las células progenitoras musculares o células satelitales, aunque ninguno de estos ejercicios permitió alcanzar valores normales de los parámetros medidos (16)

Todos estos resultados sugieren la existencia de factores etiopatogénicos asociados a la uremia, más allá del sedentarismo y que no son reversibles con ejercicio.

6.2 Alteraciones en la fibra muscular esquelética urémica

Se ha postulado que la miopatía urémica es causada por un desorden intrínseco de la función muscular, presumiblemente secundario a la uremia. Sin embargo, los mecanismos etiopatogénicos de la miopatía urémica no están claros (5). Estudios en pacientes dializados han descrito atrofia de las fibras, la que representa el cambio histológico más común en la miopatía urémica, involucrando predominantemente fibras tipo IIb (fibras rápidas con metabolismo anaeróbico) (5). Se cree que la pérdida de la masa muscular en la IRC puede deberse al resultado de un desbalance entre señales de catabolismo y anabolismo, afectando por tanto la síntesis como la degradación proteica (17). Algunos mecanismos responsables serían la malnutrición (18), el procedimiento de diálisis *per se* (19), la resistencia a la insulina (20, 21), aumento de algunas citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6 y leptina (22) y la acidosis metabólica (17, 23).

La proteólisis estaría dada por la activación de caspasa 3, que se encargaría de romper las estructuras complejas del músculo como las miofibrillas y la actomiosina. Posteriormente, la actina, miosina y sus fragmentos son los sustratos para el sistema ubiquitinación-proteasoma, que los rompe hasta dejar sólo pequeños péptidos que son degradados a aminoácidos por peptidasas citoplasmáticas (24). Atrogina-1 es una ubiquitin ligasa (E3) clave en el proceso de degradación proteica, ya que otorga la especificidad determinando que proteínas serán degradadas. En modelos animales de IRC se ha observado un aumento importante en la expresión del mRNA de atrogina-1, por lo que ahora su contenido muscular es considerado como un biomarcador de la velocidad de proteólisis (25). Estudios más recientes han demostrado que el aumento de núcleos apoptóticos y de miostatina, un regulador negativo de la masa muscular esquelética, también mediarían la atrofia muscular (26, 27).

Además de la atrofia muscular, biopsias musculares de pacientes urémicos moderados y severos mostraron cambios de tipaje (28). Se observó un aumento de las fibras IIa (fibras rápidas de metabolismo aeróbico) a expensas de las IIb, que correlacionó negativamente con la capacidad máxima al ejercicio. La cantidad de fibras I (fibras lentas de metabolismo aeróbico) se mantuvo con respecto a los controles.

Estos cambios podrían, en parte, explicar la reducida capacidad al ejercicio. Otros estudios han demostrado que los mecanismos de fatiga incluyen fallas en el metabolismo energético y la excitabilidad de la unión neuro-muscular (29). Johansen *et al* (29), encontraron alterados todos los parámetros metabólicos en los pacientes dializados al final de un test de ejercicio. La fatiga muscular correlacionó negativamente con el potencial oxidativo entre estos pacientes (calculado desde la porción lineal de la pendiente entre fuerza y fosfato inorgánico/ fosfocreatina). Además, en el músculo urémico se ha visto una disminución de la síntesis de proteínas mitocondriales y de la actividad de enzimas mitocondriales oxidativas (30). El contenido de glicógeno muscular es normal o levemente elevado; sin embargo, su recambio se encuentra aumentado (31). En animales nefrectomizados se observó una disminución de la β -oxidación de ácidos grasos de cadena larga, debido a una disminución de la actividad de carnitina palmitoil transferasa 1 (CPT1), enzima limitante de la oxidación, que permite el pasó de estos ácidos grasos hacia la matriz mitocondrial (32).

Otras alteraciones incluyen un retraso en la regeneración de músculos esqueléticos dañados y una disminución de la expresión de MyoD y miogenina, genes maestros de la activación de células satelitales, sugiriendo que la IRC altera la proliferación y diferenciación de célula satelitales (33)

En la miopatía urémica se han demostrado consistentemente anomalías en la homeostasis del calcio, que podrían ser parte del mecanismo fisiopatológico (34). Diversos estudios han observado un estado de incremento generalizado del *pool* de calcio intracelular en la IRC (34, 35). El aumento en la concentración basal de calcio ha sido observado en distintos tipos celulares, que incluyen células mesenquimales, miocitos cardiacos, hepatocitos (34, 35) y músculo esquelético (36, 37). En biopsias de fibras musculares esqueléticas de pacientes urémicos predializados, se encontró un aumento de seis veces en la concentración del calcio intracelular en reposo (670 ± 56 nM, intervalo = 450-834 nM) (37).

En modelos animales urémicos, se ha demostrado una disminución de la actividad de la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa, la Ca^{2+} ATPasa de la membrana plasmática y el intercambiador $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$. Además, es posible observar una disminución en el contenido de ATP (34, 35). El aumento del calcio citoplasmático afectaría la oxidación mitocondrial reduciendo

la producción y el contenido de ATP, lo que disminuiría la actividad de las bombas. Por otro lado, se ha observado una alteración en la abundancia del mRNA de las subunidades catalíticas de la Na⁺-K⁺ ATPasa (38). Todas estas alteraciones provocarían un aumento del Na⁺ y una disminución del pH intracelular, afectando la actividad del intercambiador Na⁺-Ca²⁺.

También se han encontrado alteraciones electroquímicas en el músculo esquelético de pacientes urémicos, caracterizadas por un aumento del contenido intracelular Na⁺ y Cl⁻ con una disminución del K⁺ intracelular y una baja diferencia de potencial de membrana en reposo (-78,5 ± 2,1 mV), que tiende a subir transitoriamente con la diálisis (-87,8 ± 1,3 mV) (39), pero sin lograr normalizar la función de los túbulos-T (40). Sin embargo, otros autores no han encontrado perturbaciones en el potencial de membrana en reposo (36) ni en el acoplamiento excitación-contracción (6).

Estas alteraciones iónicas se han relacionado con la disfuncionalidad que presentan estas células (34).

6.3 El calcio en la regulación de la expresión génica

En el músculo esquelético existe un fino control del proceso de acoplamiento excitación-contracción que involucra la activación de los receptores de dihidropiridina (DHPR) que se encuentran físicamente acoplados a los receptores de rianodina en el retículo sarcoplasmático. DHPR actúa primariamente como un sensor del potencial de membrana, acoplando la despolarización a la liberación del calcio intracelular al activar los receptores de rianodina. Por otro lado, DHPR también es capaz de generar una segunda señal de menor velocidad, al aumentar el calcio intracelular desde depósitos internos, activando la vía del IP₃ (41). Powell *et al* (42) demostraron que estas ondas de calcio se encuentran involucradas en la regulación de la expresión génica en células musculares. Estas señales de calcio inducen una activación transitoria de los factores transcripcionales AP-1, ERK, NF-κB y CREB; aumenta la expresión de diversos genes, como los mRNAs de los genes tempranos c-fos, c-jun y egr-1, y de otros genes como troponina esquelética inhibitoria lenta (TnIs) (43, 44) e interleuquina-6 (IL-6) (45) (Figura 1A).

Estudios en cultivos primarios de miotubos, han demostrado que la despolarización induce aumentos de IL-6 observables luego de 3 horas (45). Por otro lado, el promotor de IL-6 presenta un elemento de respuesta a AP-1 y NF- κ B. Juretić *et al* (45), utilizando un gen reportero luciferasa, demostraron que mutaciones en los elementos de respuesta a AP-1 y NF- κ B dentro del promotor de IL-6, disminuían significativamente la actividad luciferasa.

La Troponina I es una proteína miofibrilar involucrada en la regulación mediada por calcio de la contracción del músculo estriado. TnIs se expresa mayormente en las fibras lentas. Estimulaciones de baja frecuencia o entrenamientos de baja carga y altamente repetitivos, causan diferenciación de las fibras musculares hacia un fenotipo de resistencia a la fatiga (46). Como parte de esta transición fenotípica de fibras rápidas a lentas, se produce un aumento importante de la expresión de TnIs, por lo que esta proteína es usada como un marcador de estos cambios.

Por lo tanto, la señal lenta de calcio estaría involucrada en la capacidad de respuesta y adaptación a los cambios físicos y metabólicos impuestos por la actividad contráctil (41).

6.4 Interleuquina-6

Interleuquina-6 es una citoquina perteneciente a la familia de citoquinas de receptor tipo 1, que se caracterizan por tener una estructura proteica helicoidal y compartir al receptor gp130 (47). A esta familia también pertenecen IL-11, factor inhibitorio de leucemia, cardiotrofina-1 y oncostatina M entre otros (47).

IL-6 humana es sintetizada como una proteína precursora de 212 aminoácidos (aa) (48, 49). Después de la remoción de la secuencia señal de 28 aa, el segmento de 184 aa sufre múltiples N- y O-glicosilaciones generando proteínas de pesos variables (22-28 kDa) dependiendo del tipo celular donde se genera. Por ejemplo, IL-6 secretada por monocitos muestra un patrón de glicosilación similar al de fibroblastos, consistente de 5 o 6 formas diferentes (49). IL-6 murina consta de 211 aa que incluye un péptido señal de 24 residuos y sólo presenta múltiples O-glicosilaciones. Las secuencias IL-6

humana y murina presentan una baja similitud, siendo a nivel de cDNA de 65% y a nivel proteico de 42%. Sin embargo, ambas IL-6 son biológicamente activas en sistemas heterólogos (49).

El receptor de IL-6 (IL-6R) carece de un motivo conocido de transducción de señal, por lo que el complejo IL-6/IL-6R debe asociarse a la proteína transmembrana gp130. Esta proteína se encuentra asociada a la tirosina quinasa no receptora *Janus Kinase* (JAK) (50-52). Diversos estudios han demostrado que ambas proteínas se encuentran fuertemente unidas, ya que presentan la misma dinámica de difusión y vida media (51). La estimulación de IL-6R provoca la homodimerización de gp130, y la activación de la proteína JAK asociada a través de la transautofosforilación (Tyr 1007/1008) en su *loop* de activación. Posteriormente, JAK fosforila residuos de tirosina de la región citoplasmática de gp130, los cuales sirven de sitios de acoplamiento para activar diversas cascadas de señalización intracelular (Figura 1B) (51, 53). Una de estas vías comienza al reclutarse la proteína *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STAT), que es fosforilada por JAK, luego dimeriza y viaja al núcleo donde activa la expresión de diversos genes (50). Entre estos genes se encuentra un regulador negativo de la vía de IL-6, llamado *Suppressor of Cytokine Signaling* (SOCS) (50, 53-55), que inhibe la actividad quinasa de JAK a través de su motivo inhibitorio de quinasa, que funciona como pseudo-sustrato. Además, SOCS es capaz de reclutar ubiquitin-transferasas que llevan a la degradación de las proteínas JAK/STAT (50, 53).

El receptor gp130 presenta una expresión ubicua en el organismo, sin embargo, la expresión de IL-6R es restringida y altamente regulada. Aún así, todas las células del organismo son capaces de responder a la estimulación de IL-6 gracias a la existencia de la forma soluble del receptor (sIL-6R) (53, 56). sIL-6R es producido mediante la proteólisis limitada del receptor de membrana o del *splicing* alternativo del mRNA (53, 56, 57). IL-6 se une a sIL-6R con la misma afinidad que a su receptor de membrana pero esta forma soluble también es capaz de prolongar la vida media de IL-6 (56). Por otro lado, existe una forma soluble de gp130 (sgp130) que a diferencia de sIL-6R, presenta una actividad antagónica, modulando la respuesta sistémica de esta citoquina (53, 56).

IL-6 es una citoquina multifuncional que regula respuestas humorales y celulares, jugando un rol central en la inflamación y daño tisular (49). IL-6 ha sido asociada a la mantención de distintos estados inflamatorios como diabetes, obesidad, hipertensión y varios tipos de cáncer (58, 59). Además, sus niveles aumentan en forma paralela a otros biomarcadores que reflejan procesos dañinos (60). Todo esto ha llevado a clasificar a IL-6 como una citoquina pro-inflamatoria nociva. Este concepto ha crecido principalmente debido a correlaciones estadísticas en estudios clínicos y estudios en cultivos celulares *in vitro* utilizando concentraciones suprafisiológicas de IL-6 (60). No obstante, IL-6 también presenta efectos anti-inflamatorios. IL-6 es un inductor de las proteínas de fase aguda derivadas de los hepatocitos, muchas de las cuales tienen actividades anti-inflamatorias (49). Además, IL-6 reprime directamente la expresión de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α y IL-1, y es un potente inductor de IL-1ra (antagonista del receptor de IL-1) (60, 61).

IL-6 es producida por varios tipos celulares, pero las principales fuentes *in vivo* son monocitos/macrófagos estimulados, fibroblastos y células del endotelio vascular (62). Durante condiciones de reposo el 10-35% de la IL-6 circulante proviene del tejido adiposo (63).

6.5 IL-6 en el músculo esquelético

En los últimos años se ha demostrado que la concentración plasmática de IL-6 puede incrementarse hasta más de 100 veces durante el ejercicio (50, 64). Este aumento proviene del músculo esquelético contraído (64-67). Inicialmente se creyó que esta respuesta representaba una reacción al daño muscular inducido por el ejercicio; sin embargo, estudios posteriores demostraron que este aumento se produce en ausencia de marcadores de inflamación o daño muscular (62, 65). La expresión génica de IL-6 en el músculo esquelético en reposo es baja, pero sube de manera casi exponencial con el ejercicio (68). El nivel máximo de IL-6 se alcanza al final o poco después de terminado el ejercicio, regresando rápidamente a los valores basales (64, 68). Este incremento casi exponencial de IL-6 se debería en parte a un mecanismo de retroalimentación positiva, es decir, el músculo bajo contracciones sostenidas libera IL-

6, que actúa de manera autocrina estimulando su propia producción (Figura 1B) (67, 69). Este aumento de IL-6 es dependiente de calcio intracelular (69).

El incremento de la concentración de IL-6 inducido por el ejercicio depende de la intensidad del ejercicio, la duración de éste, la cantidad de masa muscular reclutada y la capacidad de resistencia al ejercicio que presenta cada individuo (70). Se ha planteado que los músculos de un individuo entrenado son más sensibles a IL-6, puesto que normalmente el ejercicio aumenta la expresión de IL-6R y existe una asociación negativa entre la cantidad de actividad física y los niveles de IL-6 que se alcanzan, es decir, el entrenamiento produce una disminución de la producción y liberación de IL-6 muscular durante el ejercicio (57, 71).

Otro factor que regula la expresión de IL-6 es el contenido de glicógeno muscular. Steensberg *et al*, demostraron que los músculos en contracción con menores contenidos de glicógeno expresan mayores niveles de mRNA de IL-6 y aumentan la velocidad de liberación de esta citoquina (72). Por otro lado, varios estudios han descrito que la ingestión de carbohidratos durante el entrenamiento, atenúa el aumento de IL-6 plasmática sin afectar la inducción del mRNA de IL-6 muscular (73, 74). Estos resultados dieron paso a pensar que IL-6 podría estar regulando el metabolismo energético.

Los ratones *knockout* de IL-6 desarrollan obesidad en la adultez presentando disturbios en el metabolismo de los carbohidratos y lípidos (75). Estos ratones presentan una disminuida resistencia y gasto energético durante el ejercicio, sugiriendo que IL-6 es necesario para tener una capacidad normal de realizar ejercicio (76). Por otra parte, ratones que sobre-expresan IL-6 muscular presentan una pérdida de peso y grasa corporal, hiperinsulinemia e hipoglicemia, junto a una disminuida captación de glucosa estimulada por insulina en el músculo esquelético. En estos animales no se hicieron estudios de la función muscular (77).

Los efectos metabólicos inducidos por IL-6 en el músculo esquelético, serían mediados por el receptor gp130, y que llevarían a la activación de *AMP-activated protein kinase* (AMPK) (78-81). AMPK es un sensor de la carga energética celular, ubicuamente expresado. AMPK inhibe procesos anabólicos que consumen ATP y activa procesos catabólicos que producen ATP, vía la fosforilación la diversas enzimas

metabólicas y afectando la transcripción de diversos genes (82, 83). IL-6 es capaz de activar a AMPK al aumentar la concentración de AMPc y secundariamente, la razón AMP/ATP (84). AMPK fosforila a la enzima acetil-CoA carboxilasa (ACC) inhibiendo su actividad. ACC cataliza la conversión de acetil-CoA en malonil-CoA, quien inhibe alostéricamente la actividad de CPT1. Por lo tanto, un aumento en la actividad de AMPK inhibe a ACC, disminuyendo los niveles de malonil-CoA lo que des-reprime a CPT1, aumentando la entrada de ácidos grasos a la mitocondria y por consiguiente, la β -oxidación (85).

IL-6 también tiene efectos en el trofismo muscular. Se ha demostrado que IL-6 es necesaria para la completa diferenciación de los mioblastos C₂C₁₂ (86) y la proliferación de células satelitales (87), siendo esta citoquina un regulador esencial de la hipertrofia mediada por las células satelitales (88).

6.6 IL-6 en la IRC

El porcentaje de pacientes que presentan inflamación aumenta progresivamente con caída de la función renal, sugiriendo que la liberación y/o depuración de las citoquinas se encuentra alterada en la uremia (89). Se han postulado diversas fuentes que podrían ser responsables de aumentos de la producción de IL-6 en los pacientes IRC. La hemodiálisis ha sido asociada con el aumento de la expresión y liberación de IL-6 (90, 91) y varios estudios demuestran que IL-6 sería liberada por células mononucleares de sangre periférica durante la hemodiálisis. Además, se ha observado un aumento del mRNA y la proteína de IL-6 muscular, implicando al músculo esquelético en el incremento plasmático de esta citoquina (91, 92). El aumento de IL-6 se presenta tanto en pacientes ERC como hemodializados, pero sólo en estos últimos se observó una asociación entre la liberación de IL-6 desde tejidos periféricos con un incremento de la pérdida de proteínas musculares, sugiriendo que el aumento de IL-6 aumentaría el catabolismo proteico en estos pacientes (92, 93). Pacientes IRC en hemodiálisis con una alta concentración de IL-6 plasmática, pierden más del 4% de su peso corporal en 3 años (11).

Por otra parte, el incremento de IL-6 en IRC terminal sería independiente de la caída en la depuración (94) ya que su remoción del organismo depende mayoritariamente del hígado (95).

Sin bien se ha determinado que la expresión de IL-6 muscular en reposo se encuentra alterada en la ERC, se desconoce si existe una alteración de la expresión de IL-6 muscular estimulada por el ejercicio. En base a los antecedentes expuestos, alteraciones en la inducción de IL-6 por el ejercicio podrían tener un rol fisiopatológico en la miopatía urémica, afectando el trofismo y/o el metabolismo energético.

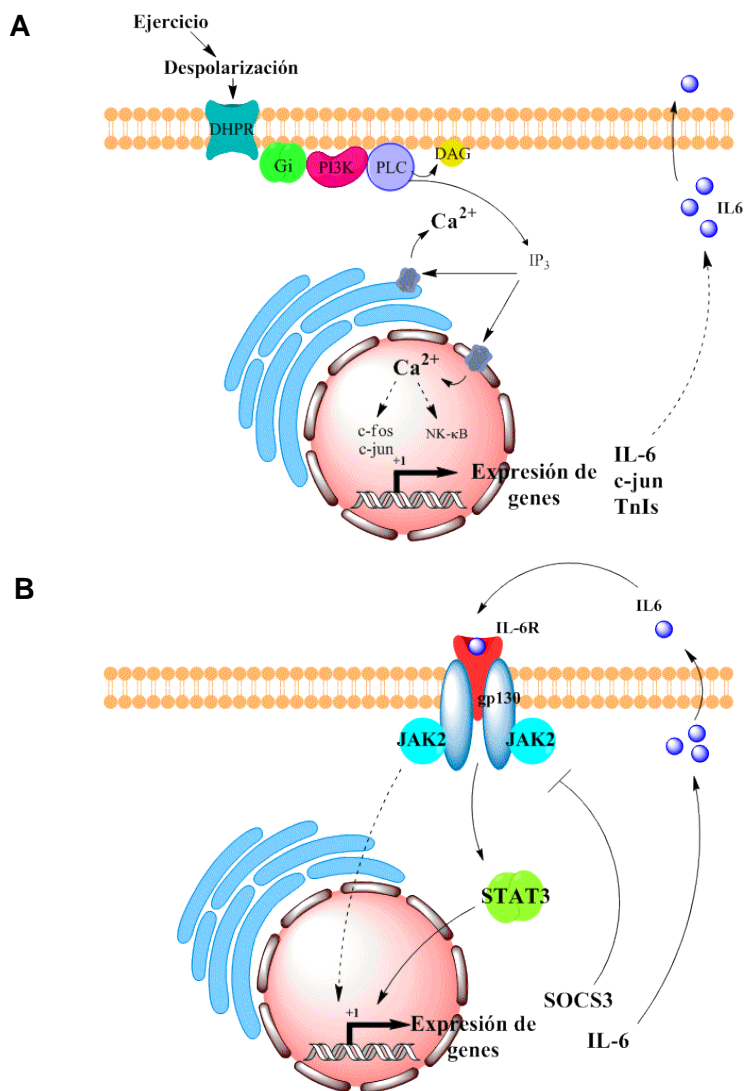


Figura 1. Modelo de regulación de la expresión génica de IL-6 en músculo esquelético.

(A) Vía de regulación de la expresión de IL-6 estimulada por la despolarización muscular: La despolarización de la membrana sarcoplasmática durante el ejercicio, activa al receptor de dihidropiridina (DHPR) llevando a un aumento de la producción de IP₃, que actúa sobre su receptor induciendo la liberación de calcio en el retículo sarcoplasmático y núcleo. Este calcio activa diferentes factores transcripcionales que llevan a un incremento de la expresión de IL-6, c-jun y TnIs (B) Vía de retroalimentación positiva de IL-6: IL-6 actuando de manera autocrina o paracrina se une a su receptor IL-6R/gp130 activando diferentes vías de señalización intracelular, como por ejemplo STAT3 que dimeriza y viaja al núcleo, produciendo un aumento de la expresión de IL-6 y SOCS3.

7 HIPÓTESIS

En base a los antecedentes mostrados anteriormente se propone que:

“La regulación de la expresión muscular de IL-6 frente al ejercicio se encuentra alterada en la IRC experimental”.

8 OBJETIVO GENERAL

Identificar alteraciones de la expresión muscular de IL-6 y las vías de señalización intracelular asociadas en respuesta al ejercicio en la uremia experimental.

9 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar los niveles basales de expresión de IL-6 en tejido muscular de ratas nefrectomizadas (uremia experimental) vs los niveles en ratas normales.
2. Determinar abundancia del mRNA de IL-6 luego de estimular eléctricamente *in situ* los músculos esqueléticos de la extremidad posterior de ratas NPX.
3. Determinar abundancia del mRNA de IL-6 luego de que la rata NPX ha sido sometida a una prueba física natatoria.
4. Medir la abundancia y/o activación de proteínas involucradas en la vía dependiente de la despolarización muscular asociada a la regulación de IL-6, en ratas NPX sometidas a las pruebas nombradas anteriormente.
5. Medir la abundancia y/o activación de proteínas de la vía IL-6/IL-6R en músculo esquelético de ratas NPX sometidas a la estimulación eléctrica *in situ* o prueba natatoria.

10 MATERIALES Y METODOS

10.1 Reactivos

Todos los reactivos fueron adquiridos en Merck, Fluka, Winkler o Sigma, a menos que se especifique lo contrario.

10.2 Animales

Ratas macho *Sprague-Dawley*, con un peso inicial de 180-200 g, se mantuvieron en jaulas individuales con un ciclo controlado de 12 horas luz/oscuridad, una temperatura y una humedad controladas de $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y 40-50%, respectivamente. Para realizar la estimulación *in situ*, los animales fueron divididos aleatoriamente en 2 grupos experimentales: ratas controles y nefrectomizadas; y en la prueba natatoria los animales fueron divididos aleatoriamente en 4 grupos experimentales: ratas controles con operación ficticia y nefrectomizadas con o sin ejercicio.

Los animales controles y nefrectomizados fueron pareados por comida y alimentados con dieta estándar teniendo libre acceso al agua potable.

La mantención y los procedimientos quirúrgicos contaron con la aprobación del Comité de Bioética de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile (protocolo CBA# 0252).

10.3 Modelo experimental de insuficiencia renal crónica

El modelo de uremia crónica se indujo mediante una nefrectomía parcial (5/6, NPX) en dos tiempos según la metodología en uso en el laboratorio de Fisiología Integrativa. Bajo anestesia intraperitoneal (ketamina 80 mg/kg y xilazina 10 mg/kg), la cirugía se realizó por abordaje dorsal según método descrito por nuestro grupo (38). Luego de la disección por planos y exposición del riñón derecho, éste fue removido después de realizar una ligadura doble del pedículo renal. Se realizó una sutura por planos, con técnica aséptica. Una semana más tarde, aplicando el mismo protocolo de anestesia,

se procedió a la remoción de los 2 polos renales (cefálico y caudal). Como grupo control se utilizaron animales sometidos a una operación ficticia (sham), consistente en un abordaje dorsal izquierdo bajo anestesia, exposición renal y cierre con sutura por planos.

Las ratas fueron mantenidas por 6 a 7 semanas hasta su sacrificio.

10.4 Determinación del *clearance* de creatinina

48 horas antes del sacrificio, las ratas fueron colocadas individualmente en jaulas metabólicas (Nalgene). Las primeras 24 horas permitieron que el animal se acostumbrara a la jaula; pasado este tiempo la jaula fue meticulosamente lavada y enjuagada con agua destilada. Se les colocó 250 mL de agua potable y se llenó el comedero con comida estándar pulverizada. Al final de las siguientes 24 horas, se procedió a medir el volumen de orina y tomar una muestra. Se recogieron 3 mL de orina que se centrifugaron a 800 rcf por 5 minutos a 4°C. El sobrenadante fue traspasado a un nuevo tubo y guardado a -20°C.

La muestra de plasma se obtuvo justo antes del sacrificio de la rata. Con este fin, el animal fue anestesiado intraperitonealmente (ketamina 80 mg/kg y xilazina 10 mg/kg). Luego se procedió a realizar una incisión en la región abdominal, línea mediana teniendo la precaución de no pasar a la región torácica para evitar la formación de un neumotórax. Se apartaron las vísceras hasta exponer el retroperitoneo, se identificó la vena cava inferior y se extrajo sangre con una jeringa de 5 mL (21G, Nipro) previamente heparinizada (heparina sódica 25.000 U.I./5 mL, LaboratorioChile) colocada en un ángulo de 45° con el bisel dirigido hacia la cara posterior de la vena. La sangre fue centrifugada a 5900 rcf por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido fue traspasado a un tubo de 1,5 mL y guardado a -20°C.

Para la determinación de creatinina, las muestras de plasma y orina fueron llevadas al laboratorio clínico Diagnóstika o IEMA.

Finalmente el *clearance* de creatinina se cálculo con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{volumen orina (mL/minuto)} \times \text{creatinuria } \left(\frac{\text{mg}}{\text{dl}}\right)}{\text{creatinemia} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dl}}\right)}$$

10.5 Medición de la presión sanguínea sistólica

Para obtener una adecuada lectura de la presión sanguínea, los animales deben permanecer tranquilos por el período de la medición presión, debido a esto, las ratas fueron acostumbradas a un modelo de refrenamiento que expone la cola, en la cual se pone un manguito de compresión y el transductor de señal (ADInstruments). Ambos se encontraban conectados a un Power Lab 4/25T (ADInstruments) y este a un computador para permitir el monitoreo de la presión sanguínea sistólica en la pantalla mediante el programa Chart 5.4.2 (ADInstruments). Una vez detectado el pulso, se procedió a realizar una serie de ciclos de compresión y descompresión con el manguito en la cola, donde la compresión detiene las pulsaciones por oclusión del flujo sanguíneo y el sensor detecta el retorno de las pulsaciones en cada ciclo de descompresión. Esto se llevó a cabo en un compartimiento temperado a 37°C por 10 a 20 minutos/día por una semana antes de la medición. El día del sacrificio, los animales son estabilizados por 5 a 10 minutos en el compartimiento y posteriormente son introducidos al sistema de refrenamiento donde se procedió a la lectura de presión que involucró 10 mediciones de los ciclos compresión y descompresión. La lectura fue aceptada si al menos 6 de 10 mediciones fueron adecuadas (libre de artefactos gruesos y teniendo pulso detectable). La presión sanguínea sistólica fue calculada como el promedio de las determinaciones.

10.6 Estimulación eléctrica *in situ*

Todo el protocolo fue realizado bajo anestesia intraperitoneal (ketamina 80 mg/kg y xilazina 10 mg/kg). La anestesia se mantuvo con una bomba de infusión a jeringa (SP101i, WPI), a una velocidad de flujo de 0,02 mL/min. Posterior a esto, se procedió a

intubar la rata y conectarla a un balón de O₂ 100%. El oxígeno se hizo pasar por una trampa con agua para humedecer el sistema. La saturación de oxígeno fue monitoreada durante todo el experimento con un oxímetro de pulso con un sensor para neonatos (PM-50, Mindray). Luego se realizó una incisión en el glúteo paralela al trayecto del nervio ciático. Se hizo una disección roma para acceder al nervio, el cual fue enganchado a un electrodo conectado a un estimulador eléctrico (SD9, Grass).

Por otro lado, se fijó la posición de la rodilla y se realizó una disección parcial hacia distal en el músculo *tibialis anterior* (TA) a través de la fascia, evitando la sección de vasos sanguíneos, luego se ligó el tendón mediante sutura quirúrgica con transfricción para fijarlo al transductor de fuerza (MLT1030/D, ADInstruments) el cual estaba conectado a un Bridge Amp - Powerlab 4/30 (ADInstruments) y este a un computador. Los datos se analizaron en el programa Chart 5.4.2 (ADInstruments). Para buscar las condiciones óptimas del protocolo, primero se buscó el voltaje mínimo necesario para obtener la mayor fuerza del TA (entre 2 - 4 volts). Además, utilizando un micrómetro unido al transductor, se buscó la tensión óptima del músculo, la cual se definió como la tensión que genera la mayor fuerza con una sacudida muscular única. Finalmente, se procedió a dar un protocolo de fatiga: 6 minutos a 100 Hz (frecuencia a la que se obtuvo un tétano totalmente fusionado), cada tétano duró 300ms dado cada 3s con pulsos de 300µs cada uno.

Una vez finalizado el protocolo de fatiga, el sistema se mantuvo con la rata anestesiada en la misma posición por 1 hora, para dar tiempo a que se produjeran cambios en la transcripción de los genes estudiados. Para evitar que los músculos de la pata posterior expuestos se enfriaran y secaran, el TA fue bañado con buffer Krebs-Ringer bicarbonato (KRB, KCl 4,2 mM, KH₂PO₄ 1,18 mM, NaCl 120 mM, MgSO₄ x H₂O 1,2 mM, NaHCO₃ 25 mM y glucosa anhidra 5 mM, pH 7,4, oxigenado con una mezcla de O₂ 95% y CO₂ 5%) calentado a 37°C en un baño termostático (Tectron Bio, J.P Selecta) a un flujo constante (bomba peristáltica Dynamax RP-1, Rainin).

Adicionalmente, los músculos fueron calentados en forma intermitente con una ampolla infrarroja. Se monitoreó la temperatura del TA con un termómetro infrarrojo (FT60, Beurer). Posteriormente se procedió al sacrificio y a disecar los músculos.

10.7 Prueba natatoria

Inmediatamente antes de la prueba natatoria la rata fue pesada, y un peso equivalente al 2,5% de su peso corporal fue atado a la base de la cola para evitar que el animal flotara, forzando un nado continuo. Cada peso consistía de un tubo de 2 mL relleno con balines de plomo (Round 4.5, Gamo) unido a un gancho que fue fijado a una banda elástica colocada en la base de la cola.

Cada rata nadó primero por 2 horas en un tanque plástico (48,5 cm de altura, 34,5 cm diámetro superior y 27 cm diámetro inferior) llenado con agua a 34°C, dejando un borde libre de 15 cm. Luego se le permitió 30 minutos de descanso. Para esto, el animal fue sacado del agua, levemente secado con papel absorbente y colocado en una almohadilla eléctrica (Aerolite) frente a una lámpara con luz infrarroja, para evitar que se enfriara. Posteriormente, la rata nadó nuevamente por otras 2 horas en el tanque relleno con agua limpia a 34°C. Al final del ejercicio, el animal fue sacado rápidamente del agua, secado, colocado en la almohadilla eléctrica y anestesiado (ketamina 80 mg/kg y xilazina 10 mg/kg). Posteriormente se procedió al sacrificio y disección de los músculos.

10.8 Extracción de RNA

La extracción de RNA se realizó inmediatamente después de diseccionar los músculos *Extensor Digitorum Longus* (EDL) y Soleo, los cuales fueron limpiados en buffer PBS 1X frío. Se homogenizaron 20 mg de tejido 4 veces por 10 segundos cada vez, en 1 mL de TRIzol (Invitrogen) a 4°C con el homogenizador Pro 200 (ProScientific Inc.). El lisado obtenido fue traspasado a un tubo de 1,5 mL, se agregó 0,2 mL de cloroformo, se mezcló 20 veces por inversión y 20 segundos en vortex. Se incubó 3 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifugó a 11.200 rcf durante 15 minutos a 4°C en la centrifuga 5415 R (Eppendorf). Después de la centrifugación se forman 2 fases, la fase superior acuosa fue traspasada a un nuevo tubo de 1,5 mL, a la cual se le agregó 0,5 mL de isopropanol 100% frío y 2 μ L de GlycoBLue (Ambion) usado como co-precipitante y para poder visualizar el *pellet* de RNA de color azul. La muestra se

guardó a -20°C por lo menos 30 minutos y luego fue centrifugada a 11.200 rcf por 10 minutos a 4°C con lo que el RNA sedimentó y formó un *pellet* azul. El sobrenadante fue removido y se lavó el *pellet* con 1 mL de etanol 75% frío, se agitó en vortex y se centrifugó a 6.900 rcf por 5 minutos a 4°C . El sobrenadante fue eliminado nuevamente y se dejó secar el RNA a temperatura ambiente por 10 minutos, luego de lo cual se resuspendió el *pellet* en 30 μl de agua libre de nucleasas (Integrated DNA Technologies, Inc.)

Inmediatamente después, se llevó a cabo un tratamiento con DNAsa usando el kit DNA-free (Ambion) para eliminar la contaminación con DNA genómico. Para esto se agregaron 3 μL de buffer 10X DNAsa I más 1 μL de DNAsa I (2U/ μL). La reacción fue incubada a 37°C por 30 minutos y luego detenida con 3 μL del reactivo de inactivación de DNAsa por 2 minutos a temperatura ambiente, con agitación ocasional. Posteriormente, se centrifugó a 11.200 rcf por 2 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se tomó el sobrenadante y este fue alicuotado en 3 tubos. El RNA fue guardado a -80°C hasta su uso.

10.9 Cuantificación del RNA

Para cuantificar el RNA se usó el protocolo de medición Quan-iT (Molecular Probes, Invitrogen). Luego del tratamiento con DNAsa, el RNA fue diluido 1:1 con agua libre de nucleasas. Se preparó una solución de trabajo diluyendo 1:200 el reactivo Quant-iT RNA en el buffer del Kit, se cargaron 50 μl de esta solución en los pocillos de una microplaca de 96 pocillos de fondo plano. Se hizo una curva estándar (0, 2, 4, 8 y 10 ng/ μL) agregando 2 μl de cada punto de la curva a los pocillos. Para las muestras se tomaron 4 μl . Se midió la fluorescencia en el fluorímetro (Glomax Multi+ Detection System, Promega) a una longitud de excitación/emisión de aproximadamente 644/673 nm.

10.10 Transcripción inversa

La reacción de transcripción inversa se llevó a cabo utilizando el sistema Improm II (Promega). 0,4 µg de RNA total se mezclaron junto con partidores hexámeros 1 µg, llevando la mezcla a un volumen de 10 µL con H₂O libre de nucleasas. Se incubó a 70°C por 5 minutos y luego a 4°C por otros 5 minutos en un termociclador (ATC 401, Nyx Technik). Pasada esta incubación, el termociclador fue puesto en pausa para agregar 30 µL de la siguiente mezcla de reacción: buffer Improm II 5X, MgCl₂ 3,75 mM, transcriptasa inversa Improm II 2 µL, inhibidor de ribonucleasas 1 µL y dNTPs 0,5 mM. Luego se incubó a 25°C por 5 minutos, 42°C por 60 minutos, y finalmente la enzima fue inactivada a 70°C por 15 min. Los cDNAs obtenidos fueron almacenados a -20°C.

10.11 PCR en tiempo real

Las reacciones se realizaron con un termociclador para PCR en tiempo real Mx3000P (Stratagene) en un volumen final de 20 µL. Se agregaron 2 µL de cDNA a una mezcla de reacción que contenía: 0,4 µL Go Taq Flexi DNA Polimerasa (Promega), MgCl₂ 1,5 o 2,5 mM dependiendo de los partidores utilizados, partidores sentido y antisentido 0,5 µM, Sybr Green 1/20.000 (Molecular Probes), dNTPs 0,2 mM y Buffer Go Taq Flexi 5X. Para cada mezcla de reacción se hicieron 2 controles negativos con agua. Las secuencias de los partidores utilizados se muestran en la Tabla 1. El perfil térmico varió levemente para optimizar la reacción con cada par de partidores, pero en general fue: un ciclo de 2 minutos a 95°C, 40 ciclos de 20 segundos a 94°C, 20 segundos a 60°C (64°C para atrogina-1), 20 segundos a 72°C, una lectura de 7 segundos a 86°C y una curva de disociación de 72 a 94°C. Todas las reacciones de PCR tuvieron una eficiencia de 100 ± 10%. El valor del ciclo umbral (Ct), indicativo de la cantidad de mRNA del blanco, fue determinado automáticamente por el equipo. Las cantidades del mRNA estudiado se calcularon utilizando una curva de calibración para cada set de partidores, hecha de diluciones seriadas del producto de PCR.

Partidor	Sentido (5' - 3')	Antisentido (5' - 3')
18S	CGACGACCCATTCTGAACGTCT	GCTATTGGAGCATGGAATTACCG
IL-6	AGTTGCCTTCTTGGGACTGA	ACAGTGCATCATCGCTGTTC
c-jun	CTCCCGTCTGGTTGTAGGAA	CACAGCGCATGCTACTTGAT
TnIs	TTCCAAACACAAGGTGTCCA	GCTTGAACCCAAGAGAGCTG
Atrogina-1	CAGACCTGCATGTGCTCAGT	CCAGGAGAGAATGTGGCAGT
Socs3	GGGGGCGAGAAGATCCCGCT	TGCCTCGGAGGAGAGGCGAC
IL6-Rα	GCAACGAGTGTCTCGCCCC	CGGCTTCAGCGGTCCCAAGG
gp130	TGCAAGATGTCCGCACTAAG	CATGGTTTGTCTTCCACAC

Tabla 1. Partidores utilizados en los PCR en tiempo real.

Las secuencias se muestran en orientación 5' a 3'. Los partidores fueron diseñados a partir de las secuencias de rata disponibles en bases de datos.

10.12 Electroforesis de DNA

Se confirmó la identidad del producto de PCR y su cuantificación utilizando el método de electroforesis horizontal en gel de agarosa 1,5% (v/v), más un colorante de ácidos nucleicos (Gelstar, Cambrex Bio Science Rockland, Inc.) en buffer TBE (Tris-borato 0,045 M, pH 8,0, EDTA 0,001 M). Las muestras fueron mezcladas con el buffer de carga 6X (Fermentas) y cargadas en el gel. Para determinar el tamaño de los productos de PCR, se usó el marcador de peso molecular Mass Ruler Low Range DNA Ladder (Fermentas) Además, este estándar permitió cuantificar los productos amplificados al poseer concentraciones conocidas y distintas de cada banda. Las muestras fueron separadas utilizando la fuente de poder Power Station 300 (Labnet International, Inc.) a 90 volts. La exposición del gel a la luz ultravioleta permitió observar los fragmentos de DNA y obtener la imagen digital (Digimage System DI-01, Mayor Science Co.) que fue analizada con el programa Adobe Photoshop CS3. Para determinar la concentración de los productos se calculó la integral de la intensidad de cada banda, cada valor fue interpolado a la curva generada con el estándar de peso molecular (integral de la intensidad de banda v/s concentración ng/ μ L).

10.13 Extracción y cuantificación de proteínas

Luego de disecar el músculo EDL, este fue limpiado en buffer PBS frío. Se pesaron 70 mg de tejido que fueron rápidamente congelados en nitrógeno líquido y guardados a -80°C hasta la extracción de proteínas. Al momento de su uso, el tejido congelado fue homogenizado 6 veces por 20 segundos cada vez, en 1 mL de buffer de lisis (Tris – HCl 50 mM pH 7,4, EGTA 1,2 mM, $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 2,5 mM, sacarosa 250 mM, fluoruro de sodio 39 mM, ortovanadato de sodio 4,9 mM, pirofosfato de sodio 9,8 mM y una tableta de inhibidores de proteasa (complete mini, Roche) por cada 40 mL de solución) a 4°C con el homogenizador Pro 200 (Pro Scientific Inc.). Luego el lisado fue centrifugado a 800 rcf por 10 minutos a 4°C . El sobrenadante fue alicuotado en 3 tubos de 0,6 mL y guardado a -80°C . Para su cuantificación se utilizó el método de Bradford. 500 μL de Coomassie Plus (Thermo Scientific) se mezclaron con 498 μL de agua y 2 μL de la muestra de proteínas. Se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. La curva de calibración se hizo con cantidades crecientes de albúmina de suero de bovino (2 mg/ml, Thermo Scientific). Se midió la absorbancia de las muestras a 595nm por duplicado en el espectrofotómetro (Biophotometer plus, Eppendorf). Luego, las muestras fueron mezcladas con buffer de carga 4X (Tris Base 0,3M, SDS 8%, Glicerol 32%, DTT 0,1M, azul de bromofenol 0,04%) y hervidas por 5 minutos. Las muestras listas para usarse fueron guardadas a -20°C .

10.14 Western blot

Para la electroforesis de proteínas, se utilizaron geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) armados con el sistema Mini-PROTEAN 3 (Biorad). Se hicieron geles de 1,5 mm de espesor con un gel resolutivo al 10 o 12%, dependiendo del peso de la proteína estudiada. Se utilizó un estándar de proteína preteñido (Precision Plus Protein Kaleidoscope, Biorad) para determinar el peso de las bandas. Entre 60 a 70 μg de proteínas fueron separadas en buffer de corrida 1X (Tris 25mM, glicina 192 mM, SDS 0,1% (p/v)).

En la transferencia se usaron membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF, Inmobilon-P, Millipore) utilizando el sistema de transferencia húmeda (Biorad). El cassette se armó sumergido en buffer de transferencia 1X (Tris 25 mM, Glicina 192 mM pH 8.3, metanol 20%) para evitar la formación de burbujas, siguiendo el orden desde el cátodo de la cámara al ánodo: esponja, 2 papeles filtro, gel, membrana PVDF (previamente sumergida en metanol técnico), 2 papeles filtro, esponja. Los cassettes fueron colocados en la cubeta la cual fue llenada con buffer de transferencia frío. La transferencia se llevó a cabo a 4°C, 400 mA por 90 minutos para todas las proteínas exceptuando a JAK2, transferencia que se realizó a 60 mA toda la noche a 4°C.

La correcta transferencia se comprobó tiñendo la membrana por 15 min en solución Rojo Ponceau (Ponceau S 0,5%, ácido acético 1%). Para eliminar la tinción, se realizaron varios lavados sucesivos en buffer solución salina Tris (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 137 mM) más Tween 20 0,1% (TBS-T). La membrana fue bloqueada por 1 hora con agitación a temperatura ambiente usando leche descremada 5% en TBS-T. Luego se incubó toda la noche con el anticuerpo primario diluido 1:1000 en TBS-T 5% leche a 4°C. La membrana fue lavada 3 veces por 15 minutos cada vez, en TBS-T con agitación a temperatura ambiente y luego incubada con un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rabanito (HRP) en TBS-T 5% leche por 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Nuevamente la membrana fue lavada por 3 veces por 15 minutos cada vez. Finalmente la membrana fue incubada por 3 minutos con el reactivo quimioluminiscente (Rapid EDL Reagent, Calbiochem) y utilizando películas (CL-XPosure Film, Thermo Scientific) fue expuesta en un cassette autoradiográfico (Fisher Scientific) por el menor tiempo necesario para visualizar las bandas.

Para probar la membrana con otro anticuerpo primario, esta fue desnudada utilizando la solución Re-Blot Plus Strong (Millipore) por 22 minutos a temperatura ambiente con agitación. Terminado este tiempo se hicieron 3 lavados rápidos con TBS-T y se continuó el protocolo desde el bloqueo.

Anticuerpo	código	Origen	Marca
TnIs	(ab58783)	Conejo	Abcam
c-Jun	(60A8)	Conejo	Cell Signaling
I κ B α	(L35A5)	Ratón	Cell Signaling
p-JAK2 (Tyr1007/1008)	(C80C3)	Conejo	Cell Signaling
JAK2	(D2E12)	Conejo	Cell Signaling
p-Stat3(Tyr705)	(D3A7)	Conejo	Cell Signaling
Stat3	(H-190)	Conejo	Santa Cruz Biotechnology
p-AMPK α (Thr172)	(40H9)	Conejo	Cell Signaling
AMPK α	(23A3)	Conejo	Cell Signaling
α -tubulina	(11H10)	Conejo	Cell Signaling

Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados en los *Western Blots*.

Anticuerpo	dilución	Marca
anticonejo-HRP	1:2000	Thermo Scientific
antiratón-HRP	1:4000	Thermo Scientific

Tabla 3. Anticuerpos secundarios utilizados en los *Western Blots*.

10.15 Cortes histológicos

Los músculos fueron lavados en PBS 1X y levemente secados en papel absorbente. Luego fueron montados en medio de inclusión Shandon Cryomatrix (Thermo Scientific) y rápidamente congelados en isopentano super-enfriado en nitrógeno líquido. Los tejidos fueron almacenados a -80°C. Los músculos fueron cortados en el criostato (CM1510 S, Leica) con un grosor de 10 - 12 μ m. Se colocaron 3 cortes por portaobjeto (Star Frost, Knittel Gläser), cada uno aproximadamente a 200 μ m de distancia dentro del músculo. Todas las imágenes fueron adquiridas con el microscopio Leica DM2500.

10.15.1 Tinción histoquímica succinato deshidrogenasa (SDH)

Los cortes fueron incubados a 37°C por 20 a 40 minutos con Nitroazul de tetrazolio 1mg/ml en una solución 1:1 de succinato de sodio 0,2 M y buffer fosfato (Na_2HPO_4 1,6 M, KH_2PO_4 0,04 M, pH 7,4). La reacción se detuvo al lavar los cortes con agua destilada. Luego, los cortes fueron deshidratados con etanol (70, 80, 90 y 100%) y xilol. Finalmente se montaron en Entellan (Merck).

10.15.2 Tinción hematoxilina-eosina y medición del área de sección transversal

Los cortes fueron fijados en metanol por 30 minutos a -20°C. Luego se dejaron secar 5 minutos a temperatura ambiente y se hidrataron en agua destilada por 5 minutos. Se tiñeron con hematoxilina (Harris) por unos pocos segundos y fueron lavados con agua de la llave hasta que se obtuvo una coloración azul. Luego se tiñeron con eosina e inmediatamente se lavaron con agua destilada. Los cortes de deshidrataron con etanol (70, 80, 90 y 100%) y xilol. Finalmente los tejidos fueron montados en Entellan (Merck). Para determinar el área de la sección transversal se utilizó una lámina de calibración (Motic) y la imágenes fueron analizadas con el programa Image J 1.43u.

10.16 Expresión de resultados y análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como promedio \pm error estándar, exceptuando los datos de los parámetros fisiológicos que corresponden a promedio \pm desviación estándar. Para graficar la abundancia relativa, arbitrariamente se le dio valor 1 a un valor sham basal. Todos los demás valores (sham y NPX, en condiciones basales y estimuladas) se calcularon como una razón con respecto a este valor. Los gráficos de veces de cambio se calcularon como una razón entre los valores estimulados (sham o NPX) y el promedio de su basal, sham o NPX respectivamente.

Se determinaron las diferencias estadísticas entre dos grupos utilizando el test t de Student. En los experimentos con dos variables independientes (nefrectomía y ejercicio) se usó el análisis de varianza ANOVA de dos vías para mediciones no repetidas, seguido del post-test Bonferroni. En estos análisis se asumió distribución normal de los datos, ya que con el pequeño número de datos obtenidos no es posible determinar correctamente la normalidad, ni es posible utilizar un test no paramétrico por su poco poder estadístico en estas circunstancias.

Las diferencias de frecuencia de distribución del área de sección transversal de las fibras musculares fueron analizadas con el test no paramétrico Mann-Whitney.

Las diferencias entre los grupos fueron consideradas estadísticamente significativas con un valor $P < 0,05$.

11 RESULTADOS

11.1 Validación del modelo de IRC experimental

Ratas Sprague Dawley 5/6 nefrectomizadas (NPX) y sus controles fueron pareados desde un comienzo por peso y por cantidad de comida ingerida durante 6 a 7 semanas hasta su sacrificio. Este modelo experimental representa uno de los modelos animales de insuficiencia renal más usados, que se caracteriza por una severa reducción inicial del número de nefrones que llevan a una falla renal progresiva (96-98). Como muestra la Tabla 4, los animales NPX presentaron una disminución del *clearance* de creatinina de un 61,6% comparado a los controles. La caída en la velocidad de filtración glomerular se acompañó de un 42,6% de aumento en la presión sanguínea sistólica. Estos datos confirmaron la disminución de la función renal, validando el uso de este modelo.

		sham (n=13)		NPX (n=14)		
PCF	g	389	± 42,5	352	± 45,9	*
peso EDL	mg	214	± 15,8	186	± 18,8	*
peso Soleo	mg	197	± 19,8	176	± 16,8	*
PSS	mmHg	110	± 10,1	157	± 20,9	**
<i>Clearance</i> Creatinina	mL/min	2,55	± 0,25	0,98	± 0,52	**

Tabla 4. Parámetros fisiológicos de las ratas NPX.

Todos los parámetros fueron determinados el día del sacrificio como se describe en Materiales y Métodos. PCF= Peso Corporal Final; PSS= Presión Sanguínea Sistólica. PROM ± DE, *P<0,05, **P<0,0001.

11.2 Efecto de IRC experimental en músculo esquelético

11.2.1 Morfología

Las ratas NPX presentaron una disminución de un 9,5% del peso corporal final (Tabla 1), que se vio reflejada en la disminución del peso de los músculos EDL (13,11%) y soleo (10,73%). Para determinar si esta disminución se debía a atrofia

muscular, se midió el área de la sección transversal de las fibras musculares en cortes histológicos teñidos con hematoxilina/eosina (Figura 2). El análisis estadístico Mann-Whitney reveló una diferencia significativa entre las medianas de sham y NPX en el músculo EDL (3260,41 y 2753,19 μm^2 , respectivamente) demostrando una disminución del área de sección transversal en las ratas NPX. Esta diferencia no fue significativa en el soleo (sham = 2603,14 μm^2 versus NPX= 2597,69 μm^2).

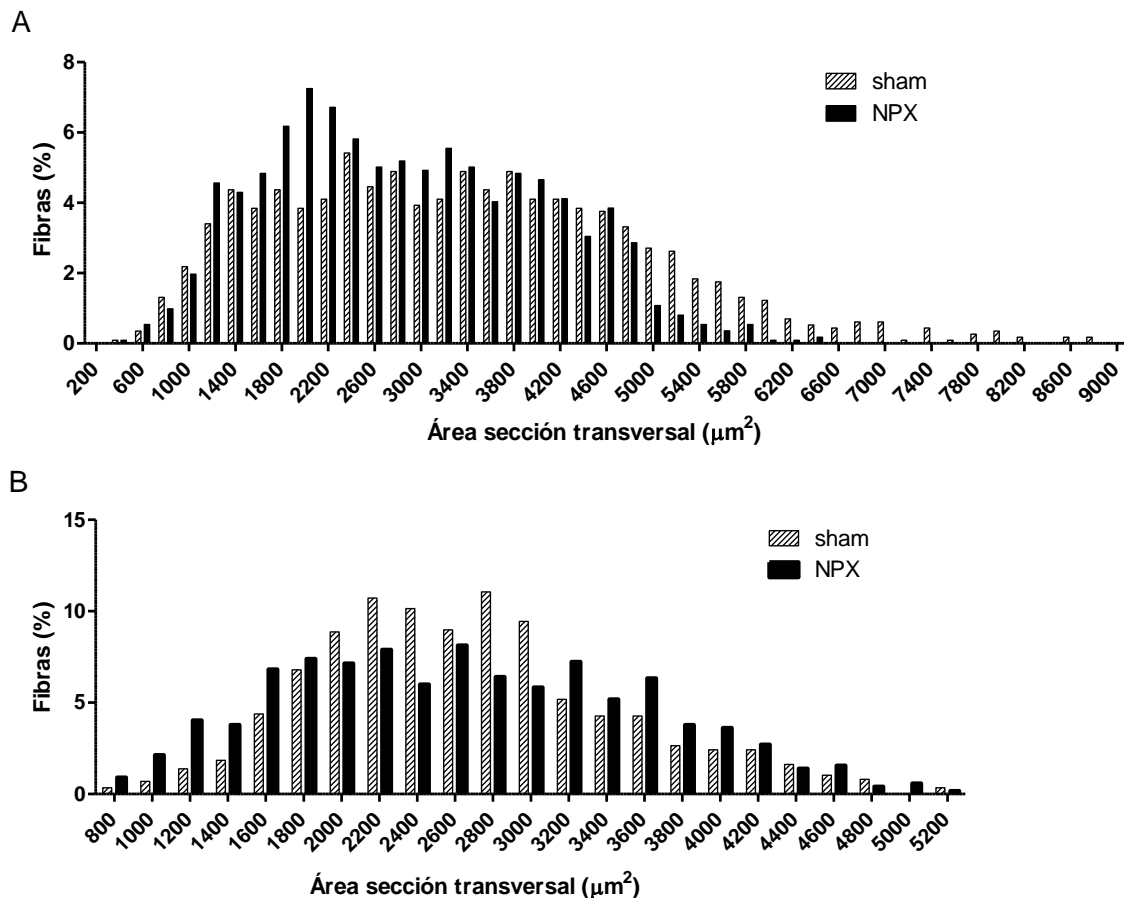


Figura 2. Frecuencia de distribución del tamaño de las fibras musculares en ratas sham y NPX.

Se midió el área de sección transversal de las fibras musculares en (A) EDL y (B) Soleo. (A) sham n=3, 1145 fibras; NPX n= 4, 1117 fibras, ***P<0,0001 diferencia entre las medianas. (B) sham n=5, 868 fibras; NPX n=5, 1217 fibras.

El EDL de las ratas NPX, presentó una marcada disminución de fibras de mayor tamaño (23,14% de las fibras en las ratas sham se encuentra entre los 4600 – 8800

μm^2 y sólo 10,38% en las ratas NPX) que fue compensado con un aumento de la cantidad de fibras con un área entre los 1600 – 2600 μm^2 . En este intervalo se encontraron un 35,8% de todas las fibras del EDL de la rata NPX en comparación a un 26,08% de la rata sham.

11.2.2 Función contráctil

Se determinó la respuesta contráctil del músculo *tibialis anterior* (TA) utilizando un protocolo de estimulación eléctrica *in situ* a través del nervio ciático, descrito en materiales y métodos (Figura 3). El TA de la rata NPX presentó una disminución significativa de la tensión tetánica máxima (sham= 242,1 \pm 6,9 g v/s NPX= 199,9 \pm 14,5 g) y de la razón tensión tetánica máxima/tensión sacudida muscular (sham= 3,52 \pm 0,23 v/s NPX= 2,88 \pm 0,11). Los tiempos de fatiga no se vieron alterados.

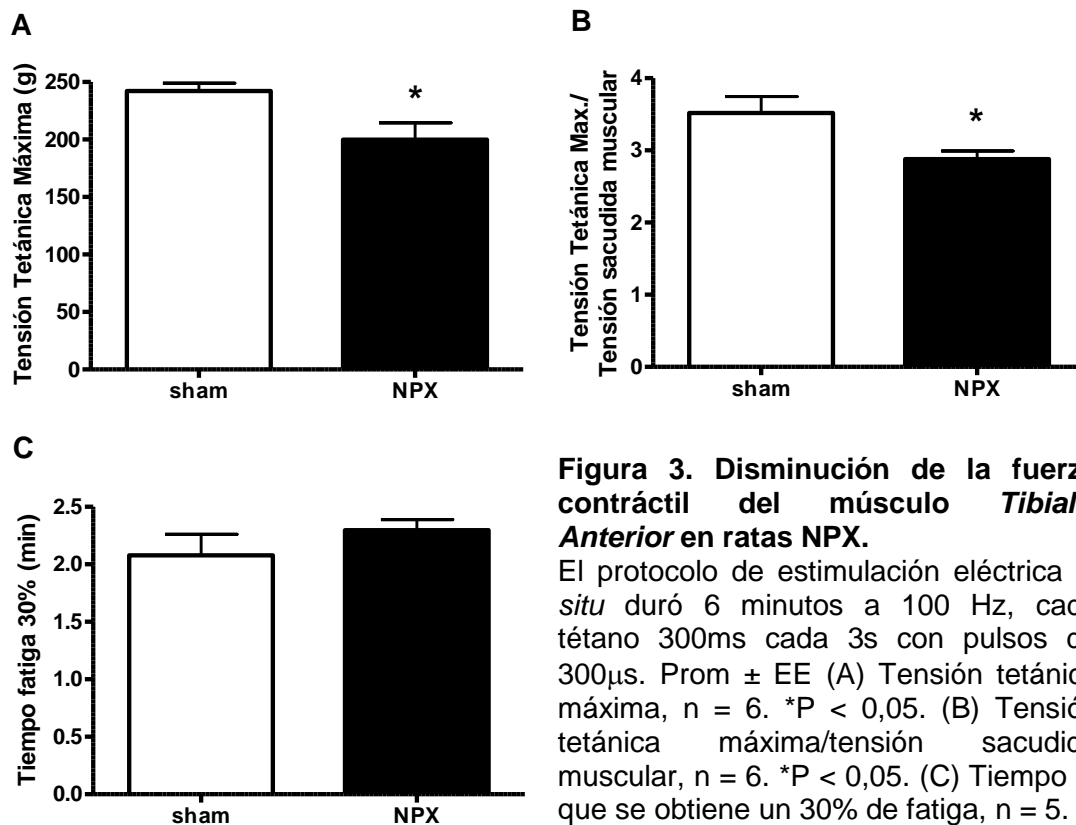


Figura 3. Disminución de la fuerza contráctil del músculo *Tibialis Anterior* en ratas NPX.

El protocolo de estimulación eléctrica *in situ* duró 6 minutos a 100 Hz, cada tétano 300ms cada 3s con pulsos de 300 μ s. Prom \pm EE (A) Tensión tetánica máxima, n = 6. *P < 0,05. (B) Tensión tetánica máxima/tensión sacudida muscular, n = 6. *P < 0,05. (C) Tiempo al que se obtiene un 30% de fatiga, n = 5.

11.3 Alteración de la inducción del mRNA de IL-6 estimulada por el ejercicio en las ratas urémicas.

Los niveles basales de mRNA IL-6 fueron similares al comparar los valores observados en músculo de ratas NPX y ratas sham. Para determinar si la inducción del mRNA de IL-6 por el ejercicio se encontraba alterada en los animales NPX, se llevaron a cabo 2 protocolos de ejercicio: la estimulación eléctrica *in situ* y la natación. La estimulación eléctrica *in situ* de la pata posterior de estos animales permite dar un protocolo de fatiga controlado, sin la influencia de factores cardiovasculares; sin embargo, este protocolo produce contracciones no fisiológicas. Por otro lado, las ratas son excelentes naturales nadadoras, lo que ha hecho que protocolos de ejercicio basados en la natación hayan sido comúnmente usados (99-101). En este trabajo se utilizó la natación como un protocolo de ejercicio fisiológico.

Como muestra la Figura 4, en el EDL, ambos protocolos producen un aumento importante del mRNA de IL-6, tanto en ratas sham como en NPX. Sin embargo, el incremento del mRNA IL-6 es significativamente menor en las ratas urémicas (Figura 4). En la estimulación *in situ*, el aumento de IL-6 con respecto a su basal fue $85,43 \pm 8,03$ veces en las ratas sham; en las ratas NPX fue de sólo $22,67 \pm 5,47$ veces el nivel basal; en la natación IL-6 se incrementó $85,7 \pm 50,33$ veces en las ratas sham y $7,59 \pm 2,69$ veces en las NPX.

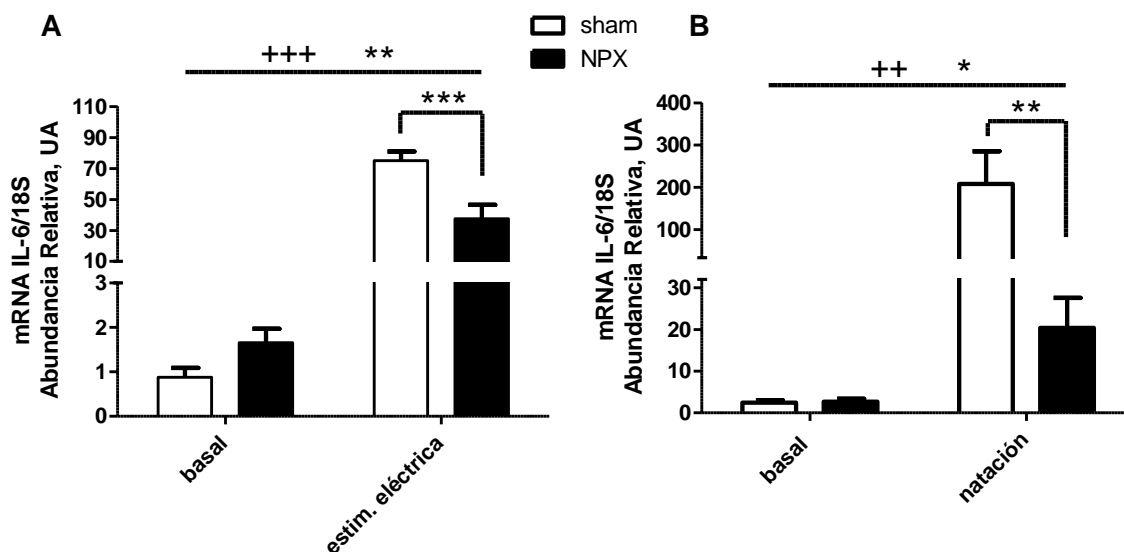


Figura 4. Inhibición de la inducción del mRNA de IL-6 luego de la estimulación *in situ* o la natación en EDL de los animales NPX.

Abundancia relativa del mRNA de IL-6 fue determinada por RT-PCR en tiempo real y normalizada por la abundancia del mRNA 18S. Prom \pm EE. (A) Protocolo de estimulación *in situ*, n = 7. ***P < 0,001, +++P < 0,0001 efecto general del ejercicio, **P < 0,01 efecto general de la nefrectomía. (B) Protocolo de natación, n = 6. **P < 0,01, ++P < 0,01 efecto general del ejercicio; *P < 0,05 efecto general de la nefrectomía.

En el soleo tampoco se observaron diferencias significativas en el mRNA de IL-6 entre los basales (Figura 5). Los protocolos de ejercicio indujeron un aumento del mRNA de IL-6 tanto en ratas sham como NPX, pero este fue similar en ambos animales, por lo que la nefrectomía no tuvo mayor efecto a nivel del mRNA de IL-6 en este músculo. En la estimulación *in situ*, los datos de abundancia del mRNA de IL-6 presentaron una gran dispersión, por lo que sólo fue posible apreciar la inducción expresándola como veces de cambio del músculo estimulado con respecto a su basal (Figura 5A).

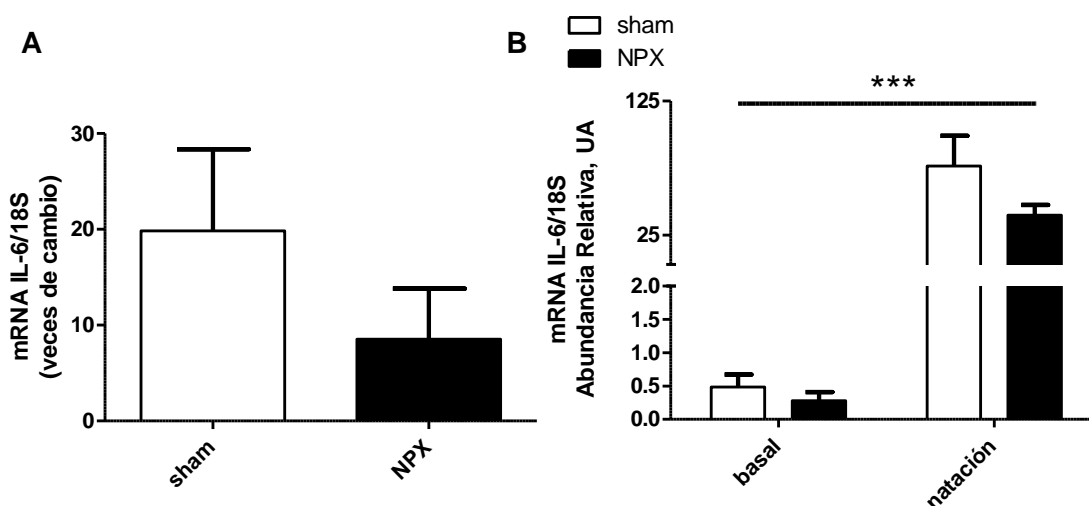


Figura 5. Inducción del mRNA de IL-6 luego de la estimulación *in situ* y la natación en soleo de los animales NPX.

Abundancia relativa del mRNA de IL-6 fue determinada mediante RT-PCR en tiempo real y normalizada por la abundancia del mRNA 18S. Prom \pm EE. (A) veces de cambio de IL-6 entre el soleo estimulado *in situ* y su basal, n = 6. (B) Protocolo de natación, n = 5. ***P < 0,001 efecto general del ejercicio.

11.4 Alteraciones en la vía de inducción de IL-6 estimulada por la despolarización muscular.

Con el fin de determinar si existen cambios en la vía de inducción de IL-6 estimulada por la despolarización muscular, se midió tanto la abundancia de c-jun y TnIs, como la activación de NF- κ B, en ambos protocolos de ejercicio.

La expresión basal del mRNA de c-jun en el EDL no se encuentra alterada en los animales NPX (Figura 6). Sin embargo, la estimulación eléctrica indujo un aumento del mRNA c-jun, el cual fue significativamente menor en las ratas enfermas (Figura 6A). En las ratas sham c-jun aumentó $2,01 \pm 0,45$ veces y en las ratas NPX $1,48 \pm 0,12$ veces. Por otra parte, en el protocolo de natación, que es de mayor duración, se observó una inhibición del mRNA de c-jun similar en ratas sham y NPX (Figura 6B).

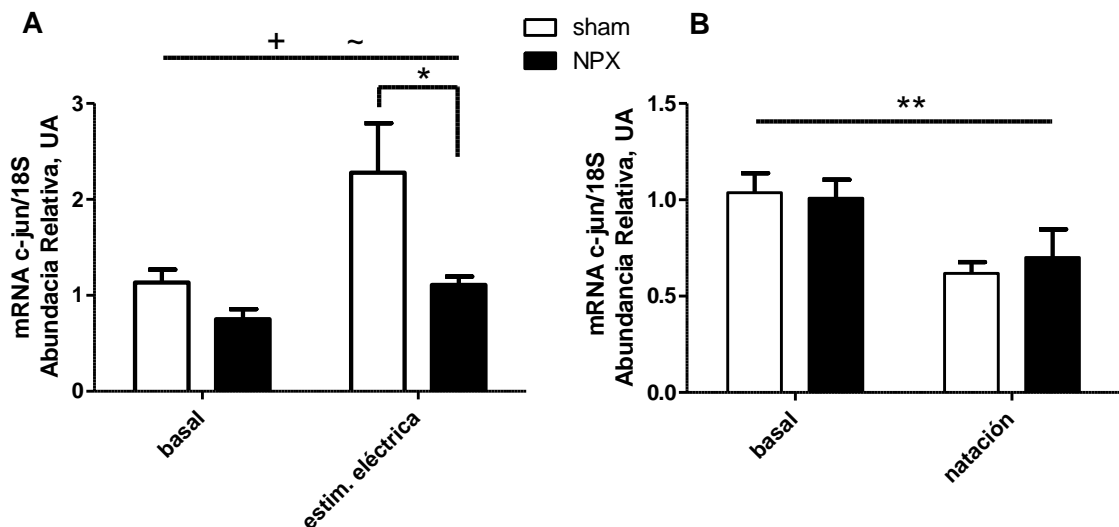


Figura 6. Diferencias en la expresión del mRNA de c-jun después de los protocolos de ejercicio en el EDL.

Abundancia relativa del mRNA de c-jun fue determinada mediante RT-PCR en tiempo real y normalizada por la abundancia del mRNA 18S. Prom \pm EE. (A) Protocolo de estimulación *in situ*, n = 6. *P < 0,05, +P < 0,05 efecto general de la nefrectomía, ~P < 0,05 efecto general del ejercicio. (B) Protocolo de natación, n = 6. **P < 0,01 efecto general del ejercicio.

En la estimulación *in situ* del EDL, se observa una reducción de la abundancia de la proteína c-Jun producto de la nefrectomía, pero no se encuentran cambios en la expresión producto de este protocolo de ejercicio (Figura 7A). En la natación no se detectaron diferencias de c-Jun entre en los EDL basales ni en los estimulados de las ratas sham y NPX (Figura 7B).

Las diferencias de los basales de c-Jun que se advierte en la estimulación eléctrica pero no en la natación, pueden deberse a un artefacto del primer protocolo (ver discusión).

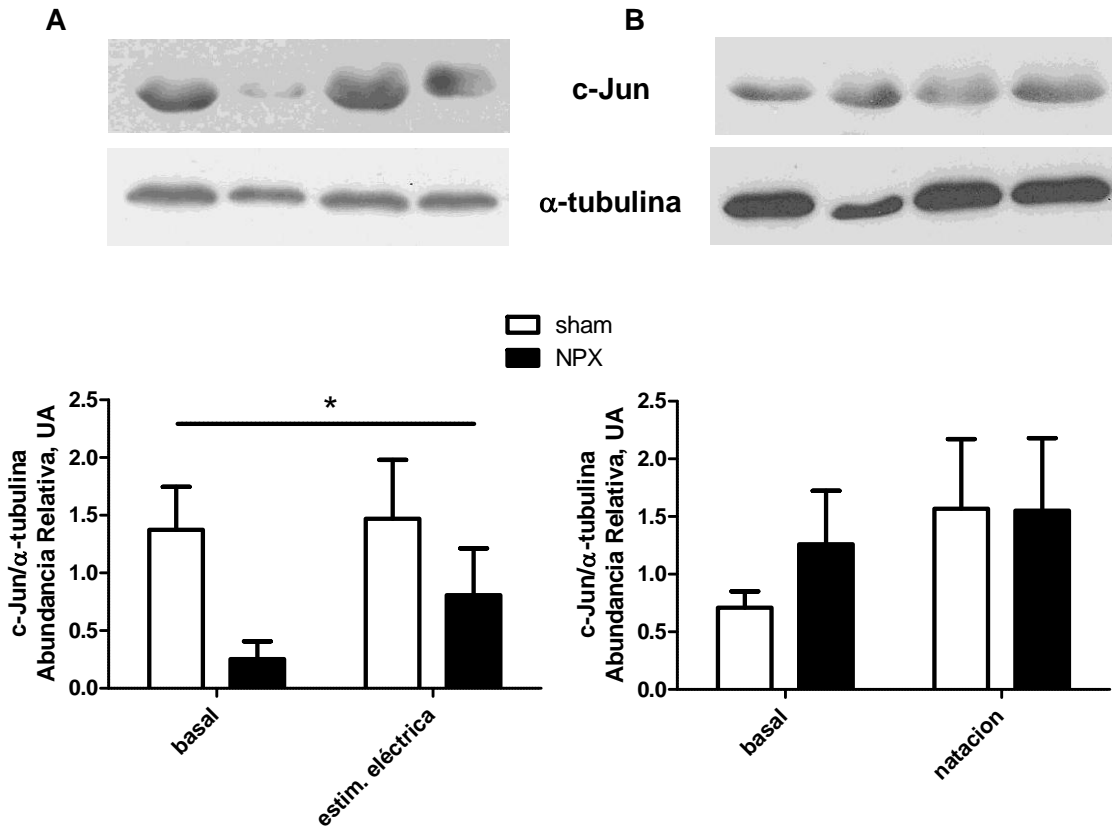


Figura 7. Expresión de la proteína c-Jun después de los protocolos de ejercicio en el EDL.

Abundancia relativa de la proteína de c-jun fue normalizada por la abundancia de α -tubulina. Prom \pm EE. (A) Protocolo de estimulación *in situ*, n = 3. *P < 0,05 efecto general de la nefrectomía. (B) Protocolo de natación, n = 6.

En el soleo, la estimulación *in situ* indujo una disminución de la abundancia del mRNA de c-jun tanto en animales sham como en NPX (Figura 8A). La nefrectomía por su parte, disminuyó la abundancia de c-jun tanto en la condición basal como estimulada. La natación también generó una reducción del mRNA de c-jun (Figura 8B), que al analizarla como veces de cambio, en las ratas sham se produjo una disminución de $0,72 \pm 0,07$ y en las ratas NPX $0,46 \pm 0,08$.

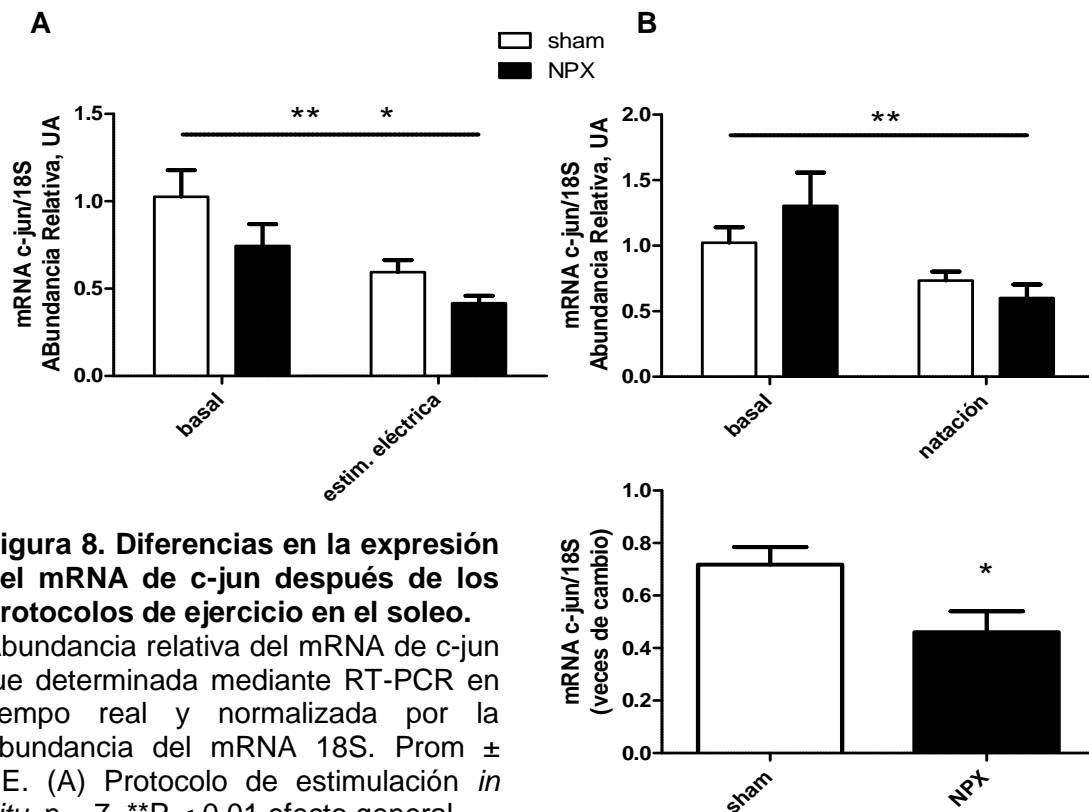


Figura 8. Diferencias en la expresión del mRNA de c-jun después de los protocolos de ejercicio en el soleo.

Abundancia relativa del mRNA de c-jun fue determinada mediante RT-PCR en tiempo real y normalizada por la abundancia del mRNA 18S. Prom \pm EE. (A) Protocolo de estimulación *in situ*, n = 7. **P < 0,01 efecto general del ejercicio, *P < 0,05 efecto general de la nefrectomía (B) Protocolo de natación, n = 6. *Panel superior*: abundancia relativa del mRNA de c-jun basal y después de la natación. **P < 0,01 efecto general del ejercicio. *Panel inferior*: veces de cambio del mRNA de c-jun entre el soleo ejercitado y su basal. *P < 0,05.

El análisis de la activación del factor de transcripción nuclear NF- κ B se hizo mediante *western blot* midiendo la degradación de I κ B α . NF- κ B se encuentra en el citosol en un estado inactivo formando un complejo con las proteínas inhibitorias I κ B.

La activación ocurre vía la fosforilación de I κ B, que resulta en su ubiquitinación y degradación dependiente del proteasoma. Particularmente, se midió la isoforma I κ B α , que presenta una cinética de fosforilación y degradación más rápida que I κ B β y I κ B ϵ .

En el EDL no se encontraron diferencias significativas en la abundancia de los basales de I κ B α entre las ratas sham y NPX (Figura 9). Tampoco se pudo observar la activación de NF- κ B con ninguno de los protocolos de ejercicio.

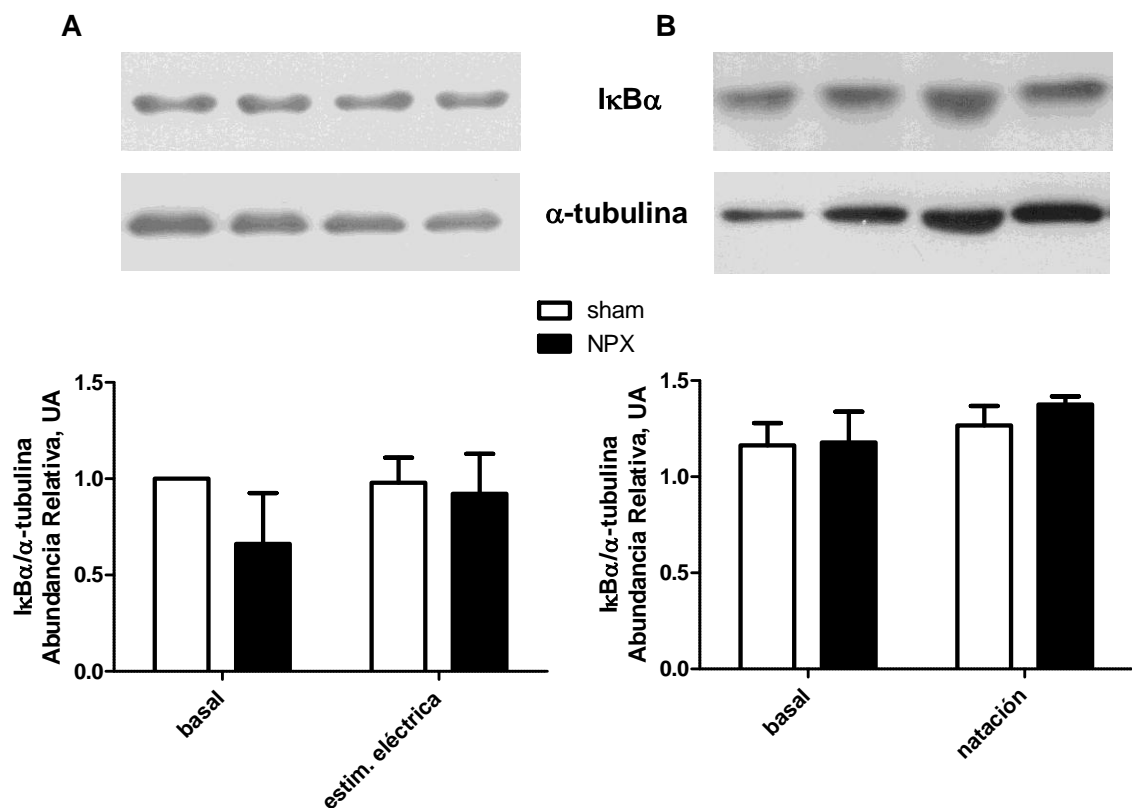


Figura 9. Medición de la activación de NF κ B inducida por el ejercicio en el EDL de ratas sham y NPX.

La activación de NF- κ B se midió a través de la degradación de la proteína inhibitoria I κ B α mediante *western blot*. La abundancia de I κ B α fue normalizada por la abundancia de α -tubulina. Prom \pm EE. (A) Protocolo de estimulación *in situ*, n = 3. (B) Protocolo de natación, n = 4

Se midió la abundancia basal y estimulada por los ejercicios de la Troponina inhibitoria lenta (TnIs) que, al igual que IL-6, muestra inducción de expresión por la despolarización vía la señal lenta de calcio, pero a diferencia de IL-6, es independiente de la vía IL-6R/gp130.

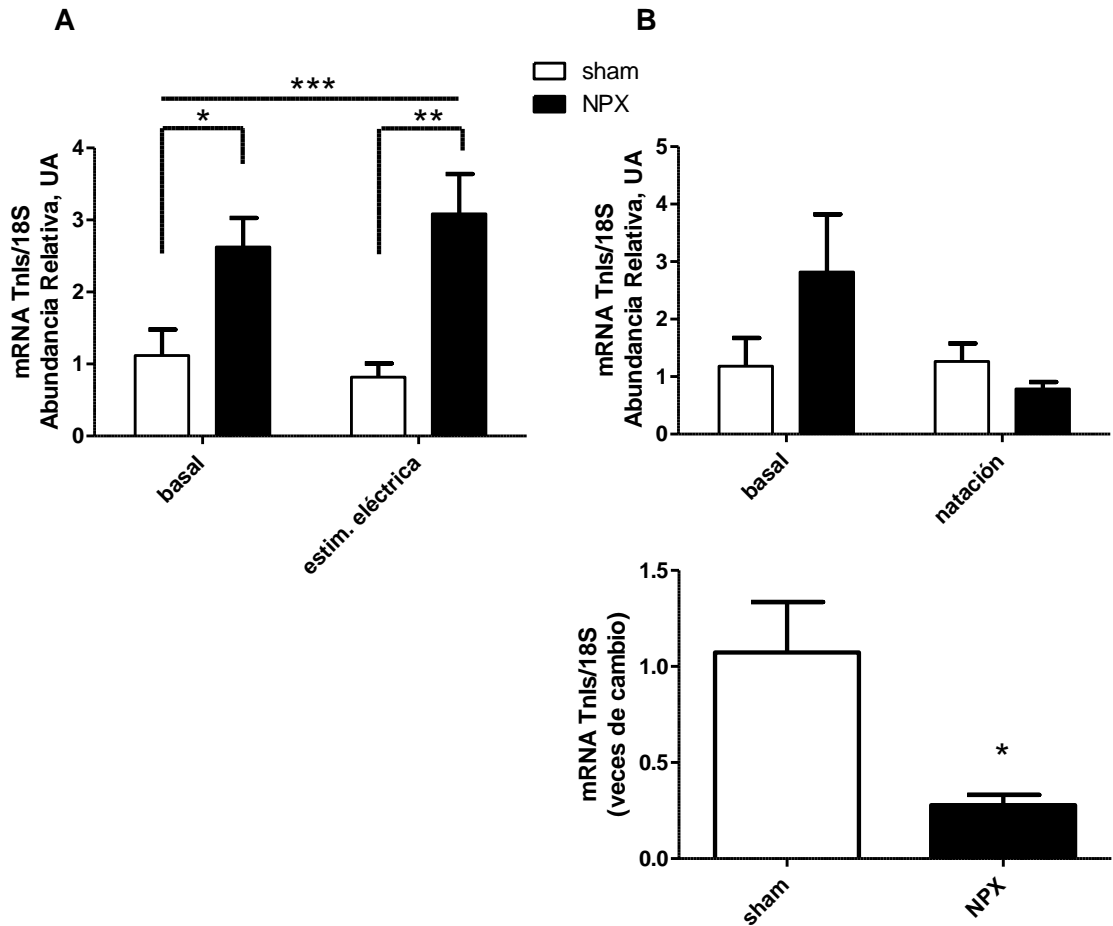


Figura 10. Efecto de la nefrectomía y el ejercicio sobre la expresión del mRNA de TnIs en el EDL de ratas sham y NPX.

Abundancia relativa del mRNA de TnIs fue determinada mediante RT-PCR en tiempo real y normalizada por la abundancia del mRNA 18S. Prom \pm EE. (A) Protocolo de estimulación *in situ*, n = 6. ***P < 0,001 efecto general de la nefrectomía, **P < 0,01, *P < 0,05. (B) Protocolo de natación, n = 6. *Panel superior*: abundancia relativa del mRNA de TnIs basal y después de la natación *. *Panel inferior*: veces de cambio del mRNA de TnIs entre el EDL ejercitado y su basal. *P < 0,05.

En el EDL se observó una mayor expresión basal del mRNA de TnIs en ratas urémicas, cambio que se mantuvo luego de la estimulación eléctrica (Figura 10A). No se encontraron diferencias en la abundancia de TnIs luego de la estimulación *in situ*.

En la natación se observa el aumento de la abundancia basal de este mRNA pero no alcanzó a ser significativo. Sin embargo, en este protocolo el mRNA de TnIs del EDL estimulado de las ratas sham no presentó variaciones con respecto a su basal ($1,07 \pm 0,26$ veces de cambio), en cambio las ratas NPX presentaron una significativa disminución ($0,28 \pm 0,05$ veces) (Figura 10B).

Se estudió en el EDL la abundancia de la proteína TnIs de animales sham y NPX en las condiciones basales de la natación (Figura 11). En el gráfico se puede observar que también existe un aumento en la cantidad de proteína, pero éste no alcanza a ser significativo.

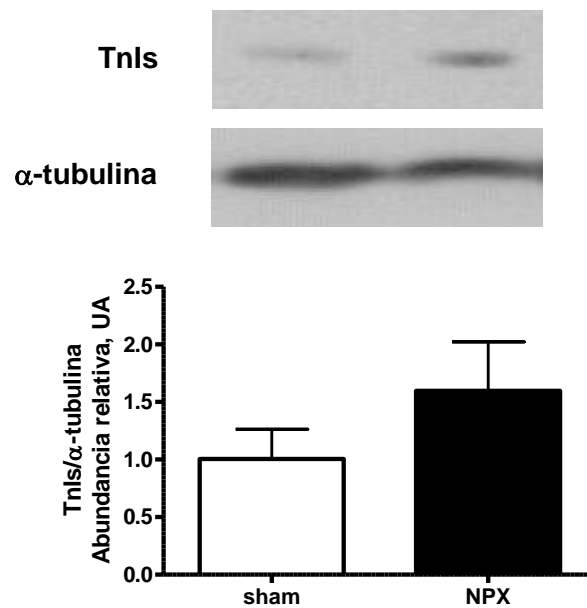


Figura 11. Expresión de TnIs en el EDL de ratas sham y NPX.

La abundancia de la proteína TnIs fue determinada mediante *western blot* y normalizada por la abundancia de α -tubulina. Las muestras corresponden a EDL en condición basal. Prom \pm EE, n = 6.

También se analizó la abundancia relativa del mRNA de TnIs en el soleo (Figura 12). No se encontraron diferencias entre los basales sham y NPX. Ninguno de los protocolos de ejercicio indujo cambios en la cantidad de este mRNA.

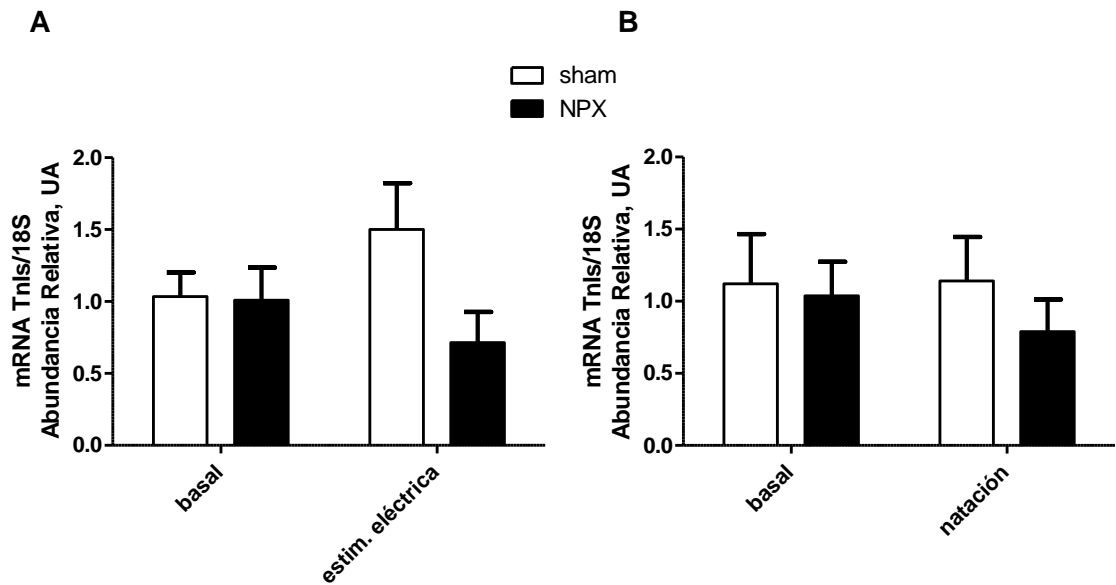


Figura 12. Abundancia relativa del mRNA TnIs en soleo basal y después del ejercicio.

Abundancia relativa del mRNA de TnIs fue determinada mediante RT-PCR en tiempo real y normalizada por la abundancia del mRNA 18S. Prom \pm EE. (A) Protocolo de estimulación *in situ*, n = 7. (B) Protocolo de natación, n = 6.

11.5 Estudio del tipaje en el EDL de ratas sham y NPX.

TnIs es una proteína estructural presente exclusivamente en las fibras lentas, por consiguiente, el aumento de su expresión basal en el EDL de las ratas NPX, podría deberse a un aumento en el porcentaje de fibras lentas en este músculo. Para estudiar esta posibilidad se hizo un estudio histoquímico de tipaje detectando la actividad de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa (SDH). En cortes histológicos de EDL se adicionó Nitroazul de tetrazolio que, resultado de la actividad de la enzima SDH, genera un producto insoluble de color azul llamado formazán. Aquellas fibras con un

alto contenido de mitocondrias se tiñen de un azul intenso, y por el contrario, aquellas con pocas mitocondrias casi no se tiñen (Figura 13A).

Como se puede ver en la Figura 13B no se encontraron diferencias entre los porcentajes de los distintos tipos de fibras en el EDL de ratas sham y NPX.

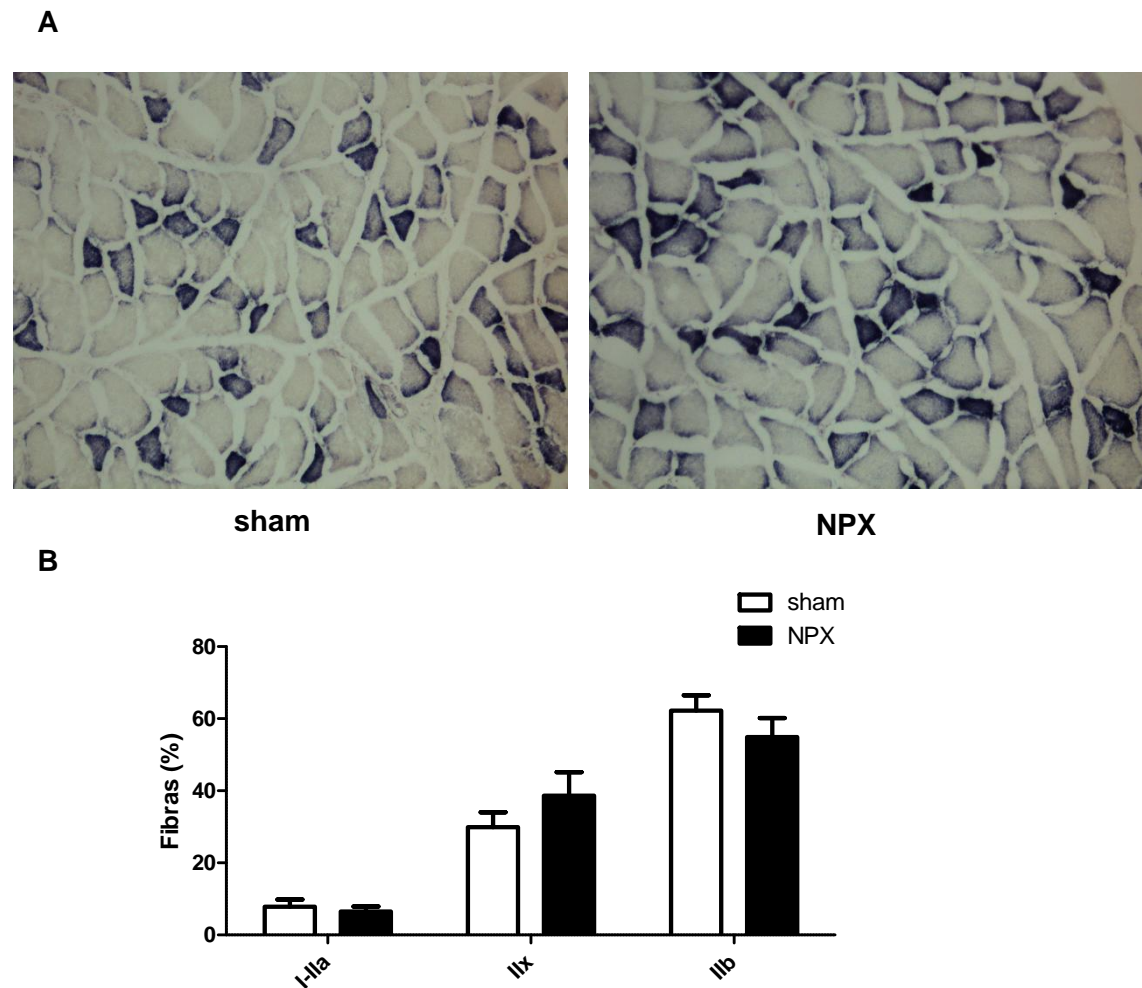


Figura 13. Tipaje del músculo EDL en ratas sham y NPX.

(A) Imagen representativa de la tinción histoquímica SDH en el EDL de ratas sham y NPX. Las fibras azules corresponden a fibras I-IIa (metabolismo oxidativo alto), las celestes a fibras IIX (metabolismo oxidativo intermedio) y las fibras blancas (metabolismo oxidativo bajo). (B) Porcentaje de cada tipo de fibra. Prom \pm EE, n = 4

11.6 Alteración de la inducción del mRNA de IL-6 estimulada por su retroalimentación positiva.

Para determinar si la disminución en la inducción del mRNA de IL-6 estimulada por el ejercicio se debe a una alteración en la propia vía de IL-6, se midió tanto la abundancia del mRNA de SOCS3 y de los receptores IL-6R y gp130, como la fosforilación de JAK2, STAT3 y AMPK.

No se observaron diferencias en la abundancia del mRNA basal de IL-6R entre ratas sham y NPX tanto en EDL como en soleo (Figura 14). Por otro lado, la natación indujo un aumento de este mRNA en ambos grupos de ratas, pero no hubo ningún efecto producido por la nefrectomía.

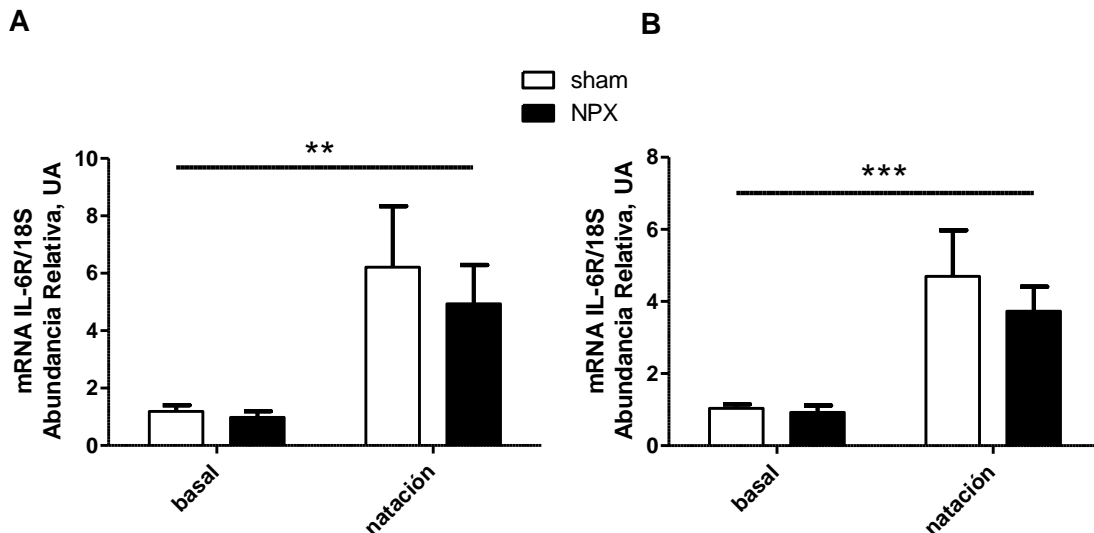


Figura 14. Efecto de la nefrectomía y la natación sobre la abundancia del mRNA de IL-6R en ratas sham y NPX.

Abundancia relativa del mRNA de IL-6R fue determinada mediante RT-PCR en tiempo real y normalizada por la abundancia del mRNA 18S. Prom \pm EE. (A) En el músculo EDL, $n = 6$, $**P < 0,01$ efecto general del ejercicio. (B) En el músculo soleo, $n = 6$, $***P < 0,001$ efecto general del ejercicio.

Al estudiar la cantidad del mRNA de gp130 en ambos músculos, tampoco se observaron diferencias basales ni después de la natación entre ratas sham y NPX

(Figura 15), sólo se produjo una leve inducción del mRNA producto de la natación similar en ambos animales.

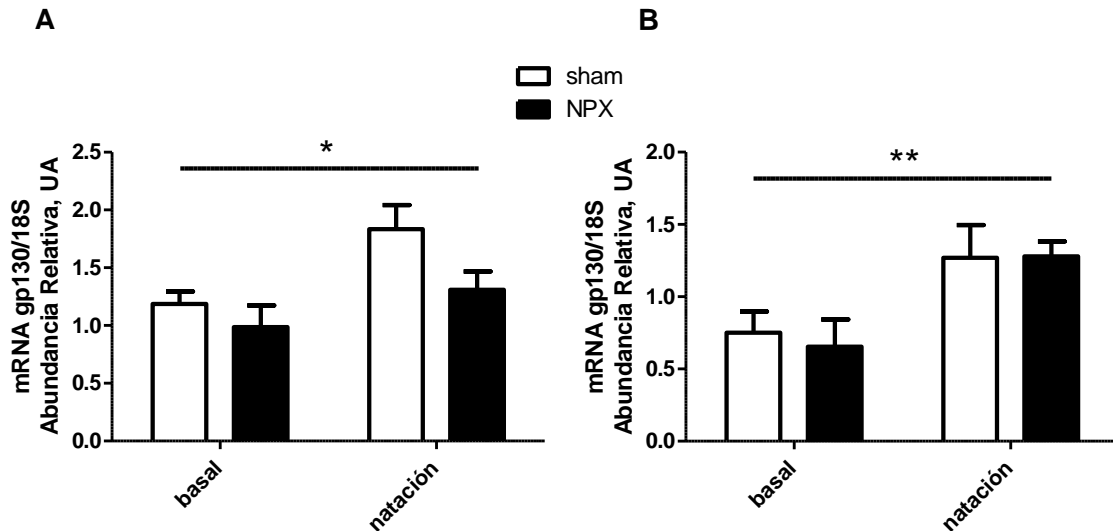


Figura 15. Efecto de la nefrectomía y la natación sobre la abundancia del mRNA de gp130 en ratas sham y NPX.

Abundancia relativa del mRNA de gp130 fue determinada mediante RT-PCR en tiempo real y normalizada por la abundancia del mRNA 18S. Prom \pm EE. (A) En el músculo EDL, $n = 3$, $*P < 0,05$ efecto general del ejercicio. (B) En el músculo soleo, $n = 5$, $**P < 0,01$ efecto general del ejercicio.

Una proteína crucial en la vía de IL-6 es JAK2. Una vez que gp130 dimeriza producto de la unión de IL-6 a IL-6R, JAK2 se transautofosforila activándose para después fosforilar a gp130 en distintos residuos tirosina, los cuales sirven de sitios de acoplamiento para activar todas las cascadas de transducción dependientes de IL-6.

Al analizar la razón p-JAK2/JAK2 por *western blot*, no se observaron diferencias significativas entre animales sham y NPX, y después del protocolo de natación se produjo una reducción similar en ambos animales (Figura 16B). Sin embargo, en todos los *western blot* siempre se encontró una menor cantidad de p-JAK2 y JAK2 en las ratas NPX (Figura 16A), por lo que se decidió corregir las cargas utilizando α -tubulina como referencia, una proteína que no varía su abundancia en este modelo experimental.

Basalmente, se encontró que la abundancia de JAK2 se encuentra disminuida en las ratas urémicas un 37,08% con respecto a los controles (Figura 16C *panel superior*).

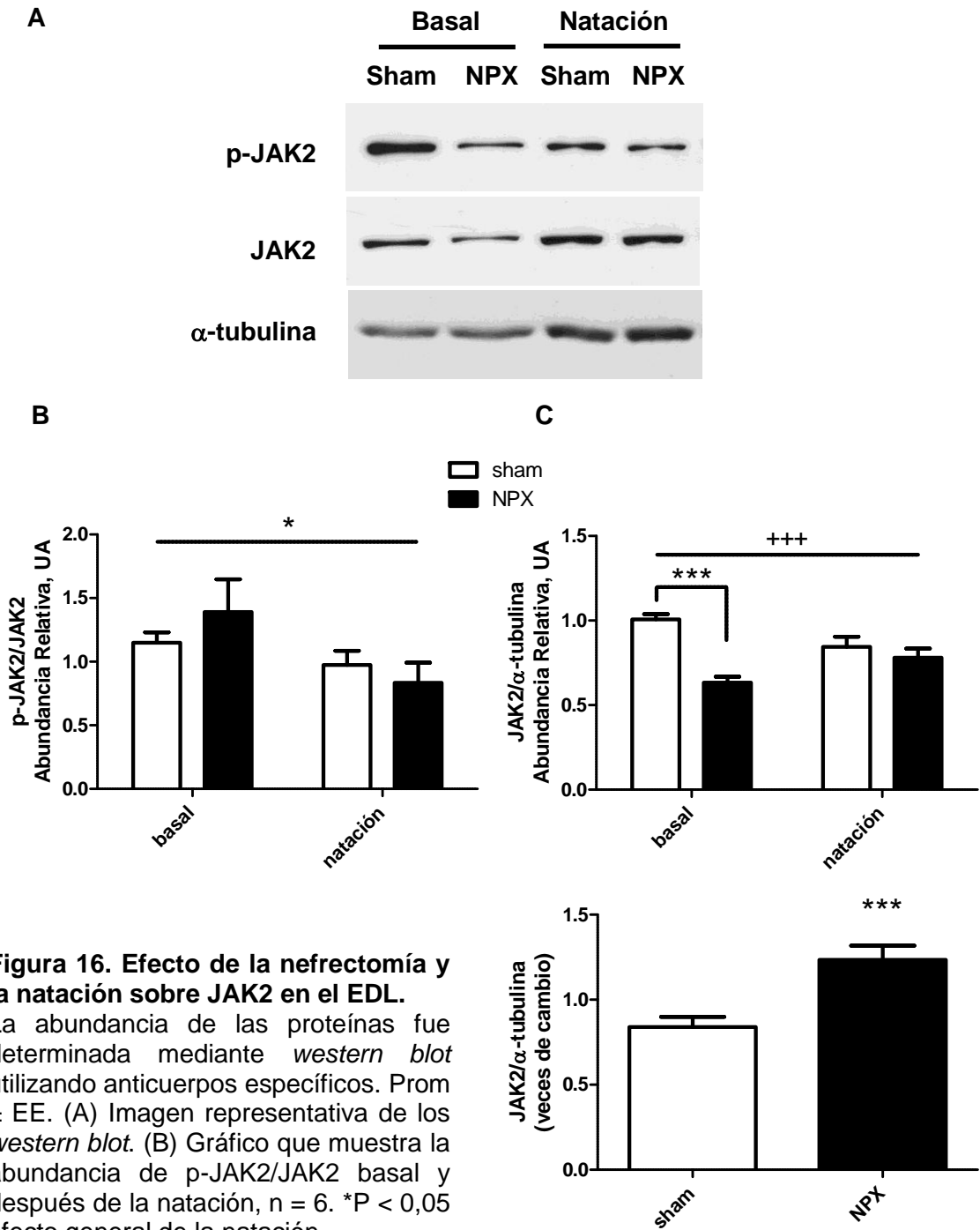


Figura 16. Efecto de la nefrectomía y la natación sobre JAK2 en el EDL.

La abundancia de las proteínas fue determinada mediante *western blot* utilizando anticuerpos específicos. Prom \pm EE. (A) Imagen representativa de los *western blot*. (B) Gráfico que muestra la abundancia de p-JAK2/JAK2 basal y después de la natación, $n = 6$. * $P < 0,05$ efecto general de la natación.

(C) *Panel superior*: abundancia relativa de JAK2/ α -tubulina basal y después de la natación *** $P < 0,001$, +++ $P < 0,001$ efecto general de la nefrectomía. *Panel inferior*: veces de cambio de JAK2/ α -tubulina entre el EDL ejercitado y su basal. *** $P < 0,001$.

Por otro lado, JAK2 también se vio afectado por la natación, la cual generó una disminución de JAK2 en las ratas sham pero un aumento en las ratas NPX (sham = $0,84 \pm 0,06$ y NPX = $1,23 \pm 0,08$ veces de cambio con respecto a su basal), diferencia que fue significativa (Figura 16C *panel inferior*).

Una de las vías activadas directamente por JAK2, es la de STAT3. Mediante *western blot* se analizó la fosforilación de Stat3 basal e inducida por la natación (Figura 17). No se observaron diferencias en la fosforilación basal de STAT3 entre animales sham y NPX. La natación indujo un aumento de p-STAT3; no obstante, éste fue significativamente menor en las ratas enfermas ($37,18 \pm 16,42$ veces de cambio en las ratas sham y $7,72 \pm 4,75$ en las NPX).

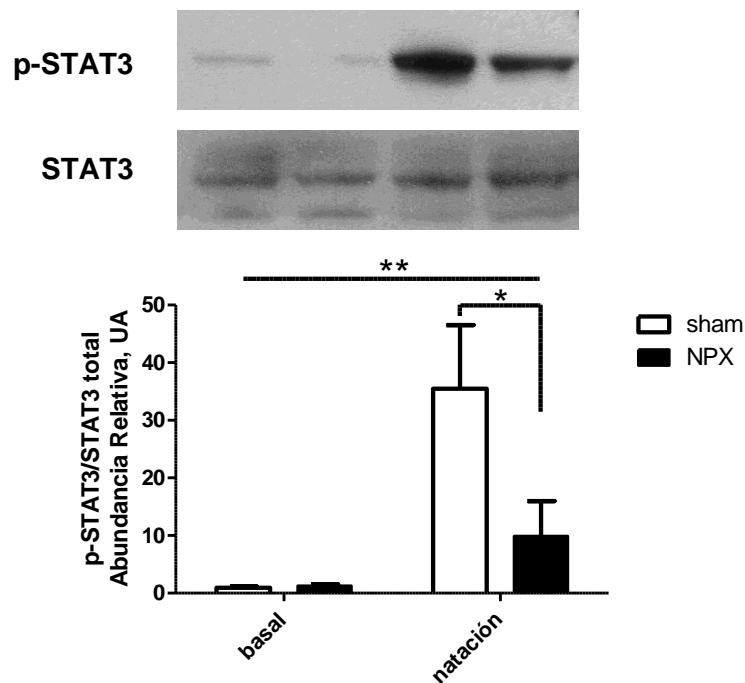


Figura 17. Inhibición de la fosforilación de STAT3 en el EDL de ratas urémicas.

La abundancia de p-STAT3 y STAT3 fue determinada mediante *western blot* utilizando anticuerpos específicos. Prom \pm EE, n = 4. *P < 0,05, **P < 0,01 efecto general del ejercicio.

STAT3 fosforilado, dimeriza y viaja al núcleo donde activa la transcripción de SOCS3; éste a su vez inhibe la vía de IL-6. La abundancia basal del mRNA de SOCS3 en EDL y soleo es similar en ratas sham y NPX; sin embargo, la natación induce un aumento de este mRNA que es significativamente menor en las ratas NPX (EDL: sham = $5,20 \pm 1,04$ veces de aumento con respecto a su basal y NPX = $2,14 \pm 0,59$ veces; Soleo: sham = $5,28 \pm 1,38$ veces y NPX = $2,98 \pm 0,23$ veces) (Figura 18).

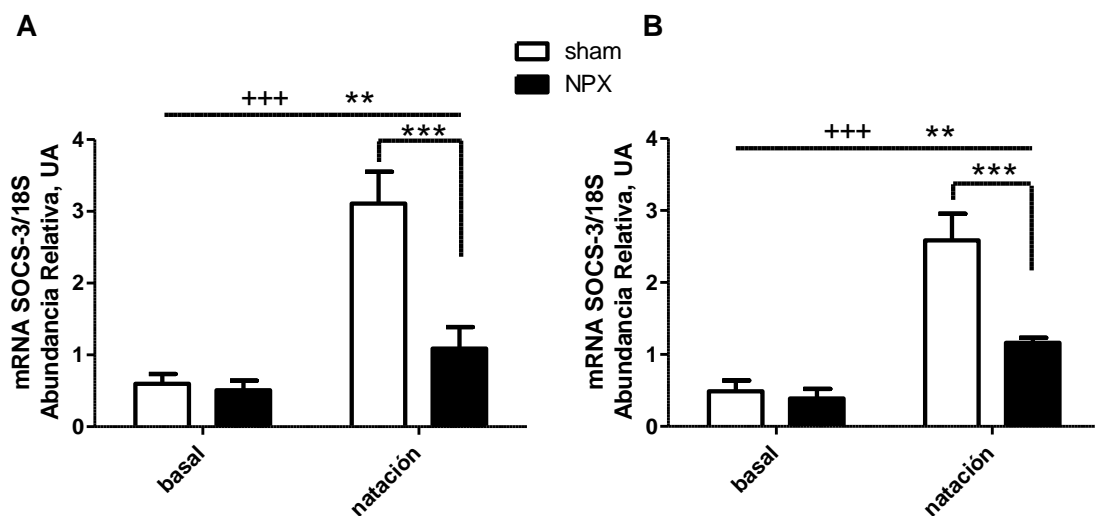


Figura 18. Inhibición de la abundancia del mRNA de SOCS3 estimulada por la natación en ratas NPX.

Abundancia relativa del mRNA de SOCS3 fue determinada mediante RT-PCR en tiempo real y normalizada por la abundancia del mRNA 18S. Prom \pm EE. (A) En el músculo EDL, n = 4. (B) En el músculo soleo, n = 5. Para (A) y (B) ***P < 0,001, +++P < 0,001 efecto general del ejercicio, **P < 0,01 efecto general de la nefrectomía.

Uno de los blancos metabólicos más importantes de IL-6, es la activación de AMPK, enzima crítica para la regulación del metabolismo energético. Mediante *western blot* se determinó el nivel de fosforilación de la subunidad catalítica AMPK α .

Como se aprecia en el gráfico de la Figura 19, en el EDL la nefrectomía tuvo un efecto inhibitorio sobre la fosforilación de AMPK, estando disminuida antes de la natación en un 45,48% y después de este ejercicio en un 39,01%. A pesar de esto, este protocolo de natación no indujo una activación significativa de AMPK α .

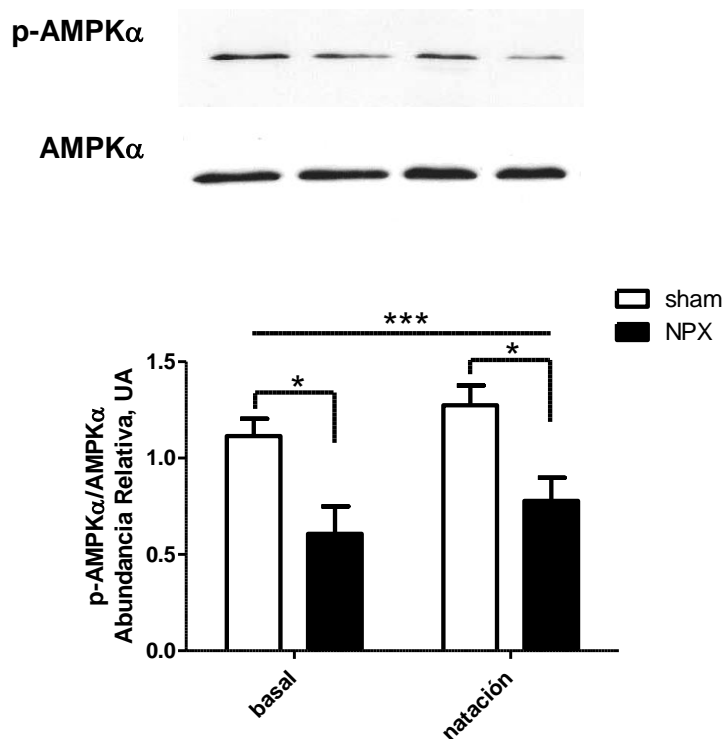


Figura 19. Disminución de la fosforilación de AMPK α en el EDL de ratas NPX.

La abundancia de p-AMPK α y AMPK α fue determinada mediante *western blot* utilizando anticuerpos específicos. Prom \pm EE, n = 4. *P < 0,05, ***P < 0,001 efecto general de la nefrectomía.

11.7 Análisis de la abundancia del mRNA de atrogina-1.

Para analizar la posibilidad de que otras vías dependientes de la contracción muscular pudieran estar alteradas, se determinó la abundancia del mRNA de atrogina-1. Por otro lado, esta medición también permitió determinar si la atrofia muscular observada en las ratas NPX era mediada por el aumento de la expresión de este gen. No se observaron diferencias en la abundancia del mRNA de atrogina-1 basal entre ratas sham y NPX tanto en EDL (Figura 14A y 14B) como en el soleo (Figura 14C y 14D).

Atrogina-1 no varió su abundancia en los músculos EDL y soleo luego del protocolo de estimulación *in situ* (Figura 14), probablemente debido a la corta duración de este

protocolo. Sin embargo, si se observó un aumento significativo luego de la natación en el músculo EDL, pero éste no se vio afectado por la nefrectomía. Este aumento no se observó en el soleo.

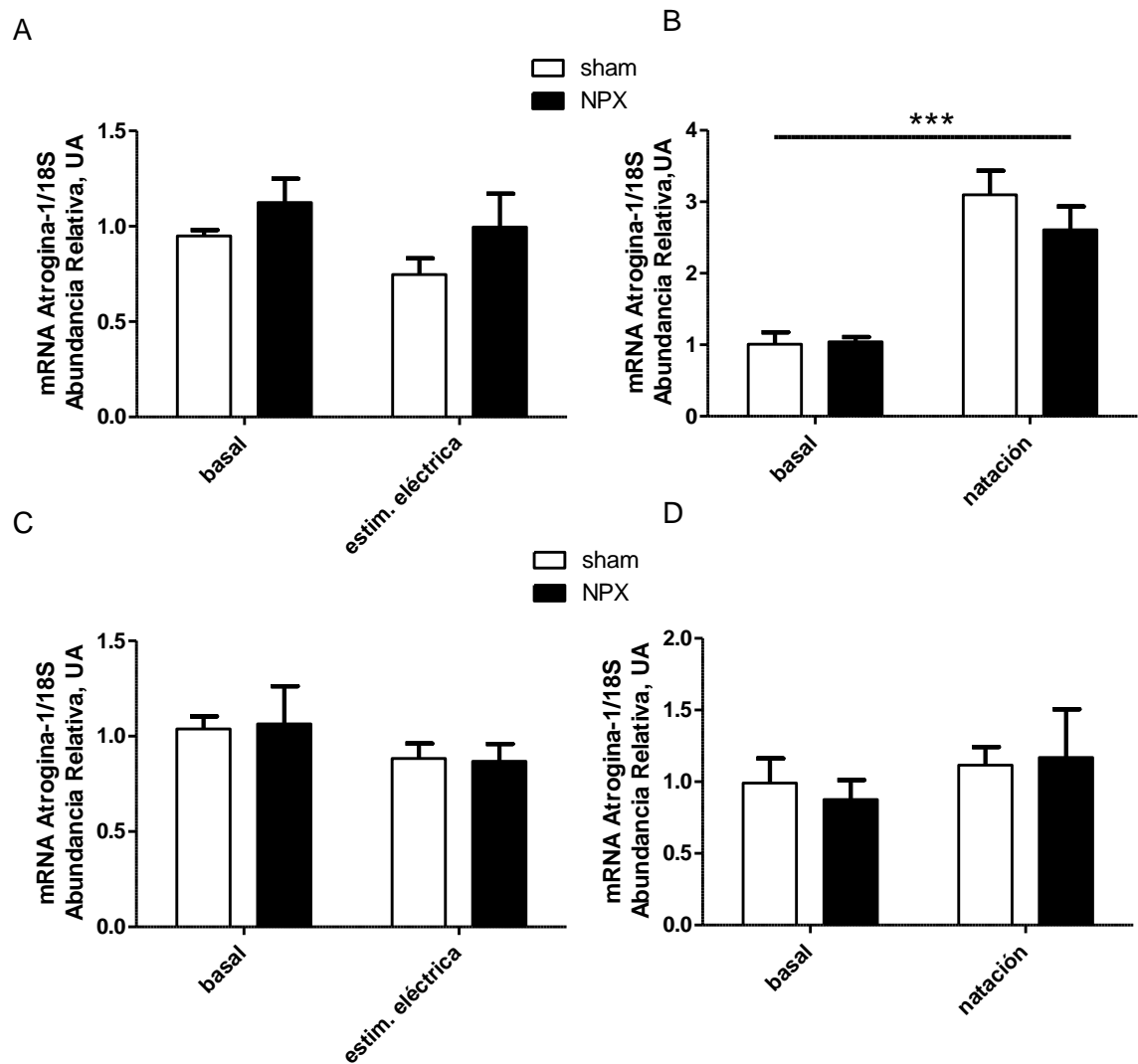


Figura 20. Abundancia del mRNA de Atrogin-1 en ratas NPX en condiciones basales y luego del ejercicio.

(A) Protocolo de estimulación *in situ* en EDL, n=5. (B) Protocolo de natación en EDL, n=6, ***P<0,0001 efecto general del ejercicio. (C) Protocolo de estimulación *in situ* en soleo, n=7. (D) Protocolo natación en soleo, n=6

12 DISCUSION

En este trabajo se demuestra por primera vez que la expresión de IL-6 muscular estimulada por el ejercicio se encuentra disminuida en IRC experimental. En este estudio se analizaron 2 vías que regulan la expresión de IL-6 estimulada por el ejercicio: una vía de retroalimentación positiva y una vía activada por la despolarización del músculo esquelético. Se propone que la alteración se debe a una disminución de la cantidad total de JAK2, afectando tanto la vía estimulada por IL-6 como a su propia expresión.

12.1 Vía de retroalimentación positiva de IL-6

La expresión basal de IL-6 muscular es baja, pero aumenta de manera casi exponencial con el ejercicio gracias al mecanismo de retroalimentación positiva que opera para esta citoquina (67, 69). Esta vía comienza con la unión de IL-6 a sus receptores. El análisis de la abundancia del mRNA de los receptores de IL-6 en el presente estudio, demostró que no existen alteraciones en la expresión basal de IL-6R y gp130 en la uremia. Como ha sido descrito numerosas veces en la literatura (57, 71), el ejercicio indujo un aumento del mRNA de IL-6R, pero esta vía de inducción no se encontró alterada por la IRC. Por otro lado, también se observó un aumento del mRNA de gp130 con la natación que tampoco se vio alterado con la uremia. Este aumento fue inesperado ya que Keller *et al* (57) no encontraron diferencias en la expresión de gp130 en el músculo esquelético humano luego de 3 horas de ejercicio en bicicleta.

A pesar de que en este trabajo no se encontraron anomalías en la expresión de los receptores de IL-6, en otros estudios si se ha observado una alteración de la concentración circulante de los receptores solubles de IL-6 (102, 103). El aumento de sIL-6R podría potenciar la actividad biológica de IL-6, pero ésta se encontraría mitigada por las altas concentraciones de sgp130. El efecto neto resultante real es desconocido (102). Sin embargo, en otras enfermedades inflamatorias crónicas como artritis reumatoide, asma y cáncer de colon, los niveles plasmáticos de estos receptores

también se encuentran elevados, los cuales han sido asociados a la mantención de estas patologías (59).

Río abajo de los receptores de IL-6 se encuentra la proteína JAK2. En el EDL de las ratas NPX se observó una disminución significativa de esta proteína, siendo probablemente esta alteración la causa más importante de la reducida activación de esta vía. Consistentemente, río abajo de JAK2, la estimulación de la actividad de STAT3 inducida por la natación, la transcripción de SOCS3 y de IL-6 estaban significativamente disminuidos en el músculo urémico.

JAK2 en el músculo esquelético también forma parte de la vía de transducción de la hormona de crecimiento (GH). La unión de GH a su receptor de membrana (GHR), induce la dimerización de este receptor, resultando en la fosforilación en tirosina de JAK2, que se encuentra asociada al dominio intracelular de GHR. Posteriormente, JAK2 fosforila principalmente a STAT5 y en menor grado a STAT3 (104).

En la IRC existe una resistencia a GH. Se ha propuesto que los defectos en la señalización de GH se deberían principalmente a una disminución en la fosforilación de JAK2, debido a un aumento de la expresión de SOCS2 y SOCS3, pero sin cambios en la cantidad total de JAK2 (104, 105, Mahesh, 2008 #131, 106, 107) En el presente trabajo también se observó una reducción de la abundancia de JAK2 fosforilada; sin embargo, esta fue proporcional a la disminución de la cantidad total de JAK2. Poco se conoce de la regulación de la expresión de JAK2, ya que la mayoría de las investigaciones se han centrado en la regulación de su fosforilación. Sin embargo, se ha demostrado que la infusión crónica y pulsátil de GH por 8 semanas en pollos, induce un aumento de la fosforilación y de la abundancia de JAK2 en músculo esquelético (108). Los estudios que observaron sólo una disminución de la fosforilación de JAK2 trabajaron con ratas sometidas a nefrectomía 5/6 con 2 a 3 semanas de evolución; en cambio, nosotros trabajamos con ratas NPX de 6 a 7 semanas. Esta diferencia de tiempo podría haber permitido que la resistencia a GH afecte los niveles totales de JAK2. Por otro lado, no se observaron diferencias en la expresión basal de SOCS3, inducidas por la uremia, que pudiesen estar inhibiendo la vía JAK2/STAT3, sólo la disminución de la inducción del mRNA de SOCS3 en el ejercicio, atribuible a la reducción de la activación JAK2/STAT3.

El protocolo de natación utilizado no permitió evaluar la activación de JAK2 en las ratas del grupo control. Actualmente se están desarrollando nuevos estudios en el laboratorio, que han demostrado, de manera preliminar, que el *peak* de fosforilación de JAK2 en respuesta a natación se observa a la hora de ejercicio y a las dos horas comienza a disminuir.

12.2 Vía activada por la despolarización muscular

En el laboratorio se ha demostrado que la señal lenta de calcio, activada por la despolarización y mediada por IP_3/IP_3R , se encuentra involucrada con los cambios de expresión génica que modifican algunas características de las fibras musculares. Esta señal activa diferentes factores transcripcionales como AP-1 y NF- κ B, que aumentan la expresión génica de c-jun, IL-6 y Tnfs, entre otros.

Los protocolos de ejercicio utilizados, estimulación *in situ* y natación, no permitieron ver la activación de NF- κ B. Tampoco se observó una alteración de la actividad basal de NF- κ B en el EDL urémico. Sin embargo, nuestros estudios evaluaron la activación de NF- κ B a tiempos relativamente largos; sería necesario realizar una curva temporal para encontrar la ocurrencia del *peak* de activación y poder comparar animales sham y NPX.

El análisis de c-jun en la estimulación *in situ*, mostró que existe un efecto general de la nefrectomía, debido a la disminución de la abundancia de la proteína y el mRNA en el EDL y el mRNA en soleo urémicos; sin embargo, en la natación no se observaron esas diferencias. Esto podría deberse a un aumento de la transcripción de c-jun producida por un artefacto del protocolo de estimulación eléctrica. En este protocolo la pata posterior contralateral es el basal; sin embargo, los músculos podrían estar siendo afectados por factores de inflamación liberados a la sangre, debido a las disecciones realizadas en la pata estimulada. La enzima *c-Jun NH₂-terminal kinase* (JNK) y su factor transcripcional río abajo c-Jun, han sido asociados a múltiples tipos de inflamación como colitis, asma, artritis, cáncer y glomerulonefritis (109, 110).

Tanto en EDL con en soleo estimulados por la natación, se observó una disminución del mRNA de c-jun y en EDL la proteína no presentó una variación significativa,

probablemente debido a que es un gen de respuesta temprana, y el protocolo de natación toma 4 horas y media.

Al igual que c-Jun, NF- κ B es un factor de transcripción involucrado en la inflamación, por lo que las curvas temporales para ambas, de aumento de la transcripción y de activación respectivamente, deben evaluarse sólo en el protocolo de natación.

TnIs es una proteína estructural que se expresa en las fibras lentas (metabolismo aeróbico). La abundancia basal de su mRNA en el EDL urémico presentó un aumento significativo y esta tendencia se mantuvo en la proteína. Alteraciones en la proporción de las troponinas TnI, TnT y TnC ya habían sido observadas en modelos experimentales de uremia en ratas (31). Para corroborar que el aumento basal de TnIs se debía a un aumento de fibras lentas o rápidas aeróbicas se realizó la tinción SDH. Esta tinción demostró que en este modelo de uremia, el EDL no presentaba cambios de tipaje, que sí suelen observarse en biopsias de pacientes urémicos (28). Estas diferencias pueden explicarse porque son dos especies distintas o por las limitaciones del modelo usado, ya que las ratas NPX sólo viven aproximadamente hasta 8 semanas después de la operación, a diferencia de un paciente que gracias a la diálisis puede vivir más años y desarrollar estos cambios musculares.

En el EDL, no se encontraron cambios en la expresión del mRNA de TnIs inducidos por la estimulación *in situ*, probablemente debido a la corta duración del protocolo para un gen estructural. No obstante, luego de la natación se observó una inhibición de la expresión de TnIs inducida por la uremia, sin presentarse cambios en el EDL control ejercitado con respecto a su basal. Esta inhibición es un indicio de que existe una alteración en la vía inducida por la despolarización muscular, sin embargo, considerando los resultados parciales de c-jun y NF- κ B no es posible asegurar si esta vía se encuentra o no afectada.

12.3 Alteración de la expresión de IL-6

El análisis de qRT-PCR en tiempo real mostró que en este modelo de IRC no existe una alteración de la abundancia basal del mRNA de IL-6, un resultado concordante con

observaciones en ratones NPX (33). Sin embargo, en pacientes predializados y dializados se ha observado que la abundancia del mRNA IL-6 o la proteína muscular (determinada por inmunohistoquímica) se encuentran aumentadas (91, 92). La expresión de IL-6 también es regulada por otras vías que son independientes del ejercicio, que pudiesen estar alteradas en la IRC en humanos. La estimulación con insulina incrementa la expresión génica de IL-6 muscular cuando hay resistencia a la insulina, pero no en el músculo sano (111). La resistencia a la insulina, es una anomalía prevalente en la IRC y que también se ha observado en pacientes con ERC leve a moderada (21).

Aunque IL-6 se encuentre basalmente aumentada en pacientes con IRC, nunca se ha estudiado la expresión de esta citoquina estimulada por el ejercicio, ni tampoco sus vías de regulación. En el modelo de IRC utilizado en este trabajo, existe una disminución de la expresión de IL-6 estimulada por el ejercicio, probablemente debido a menor expresión de JAK2. Esto explicaría, no sólo la menor respuesta al ejercicio de IL-6, sino que además afectaría a todos los blancos de esta vía, como por ejemplo SOCS3. En este contexto, proponemos que en la IRC experimental se produce resistencia a IL-6 en el músculo esquelético (Figura 21).

12.4 Efectos fisiopatológicos de IL-6

Debido a efectos autocrinos y endocrinos de IL-6 muscular sobre el metabolismo, se ha postulado que IL-6 es un sensor de energía (112).

A nivel sistémico, IL-6 estimula la glicogenólisis en el hígado por medio de la inhibición de la enzima glucógeno sintasa y acelerando la actividad de la glucógeno fosforilasa (113). También se ha observado que IL-6 es capaz de interferir con la señalización de insulina en los hepatocitos, aumentando la liberación de glucosa desde el hígado (114, 115). Sin embargo, la infusión elevada de IL-6 no tiene efectos en la glicemia o en la velocidad de aparición (R_a) y desaparición (R_d) de la glucosa (116). Durante el ejercicio, incrementos menores de IL-6 aumentan la R_a y R_d de la glucosa (117), lo que ha sugerido la presencia de cofactores adicionales que modularían el efecto de IL-6 durante el ejercicio (68). Estudios en biopsias de músculo esquelético,

demonstraron que IL-6 aumenta la incorporación de glucosa a glicógeno y la captación de glucosa (81). No obstante, otras investigaciones han encontrado que IL-6 genera resistencia a la insulina en el músculo esquelético (118). Estas discrepancias pueden tener su origen en los tiempos de exposición empleados en los diferentes protocolos. Nieto-Vázquez *et al* (119) demostró que, en miotubos, la exposición corta a IL-6 incrementa la captación de glucosa y la sensibilidad a la insulina, por el contrario, la exposición crónica induce resistencia a la insulina.

IL-6 también tiene efectos sobre el metabolismo de los lípidos. La infusión de IL-6 incrementa la lipólisis y la oxidación de grasas en individuos (116, 120). Este efecto lipolítico se observa de manera directa en cultivos de adipocitos y miotubos (121), y músculo esquelético (81). No obstante, un estudio reciente en humanos demostró que el aumento de la lipólisis sistémica provocada por la infusión de IL-6, provendría del músculo esquelético y no del tejido adiposo como se pensó en un primer momento (116).

Los efectos metabólicos de IL-6 serían mediados por AMPK. Basalmente las ratas NPX presentaban una disminución de la fosforilación de AMPK de casi la mitad, lo que podría ser la causa de la reducida β -oxidación que se observa en la uremia (32). Ratones *knockout* de IL-6 demostraron que el nivel de fosforilación de AMPK en reposo es dependiente de IL-6. El músculo esquelético de estos animales presenta una disminución de p-AMPK de un 75% (79).

Los tiempos utilizados en la natación no permitieron ver la inducción de la actividad de AMPK, pero es factible que ésta sea significativamente menor, debido a la resistencia a IL-6.

Se ha observado una correspondencia entre una disminución de la función renal y la merma del desempeño en el ejercicio (122). La suma de todas las anormalidades en el metabolismo y función muscular en la uremia pueden dar cuenta del disminuido desempeño en el ejercicio; sin embargo, IL-6 es un sensor de energía que podría tener un importante rol en la baja resistencia al ejercicio. Este rol ha sido demostrado en los ratones *knockout* de IL-6, los cuales durante el ejercicio presentan una resistencia reducida, con una progresiva disminución del consumo de oxígeno y elevada razón de

intercambio respiratorio, que indica una preferencia de la oxidación de carbohidratos por sobre las grasas en la utilización de energía (76).

12.5 EDL vs Soleo

Los análisis de peso de EDL y la medición del área de la sección transversal mostraron que este músculo presentaba atrofia. A pesar de que en el soleo se observó disminución del peso, no hubo una disminución significativa del diámetro de las fibras.

Estudios en cortes histológicos de músculos urémicos, muestran que las alteraciones se concentran en las fibras rápidas IIb, teniendo el EDL de ratas un 70,4 a 81,6% de este tipo de fibras, y por el contrario, no encontrándose en el soleo (123).

En el TA, otro músculo rápido, se produjo una disminución de la tensión tetánica máxima producto de la uremia, probablemente debido a la atrofia muscular y a las alteraciones en las fibras IIb.

La caracterización de la señal lenta de calcio fue realizada en miotubos de ratas (42). En estudios más recientes se ha demostrado que esta señal se encuentra presente en fibras adultas del flexor corto de los dedos, el cual es un músculo rápido. Sin embargo, en el soleo no se encontró esta señal inducida por un estímulo eléctrico (44). Esto apoya la idea de que la señal lenta de calcio puede ser característica de diferentes tipos de músculo, lo que explicaría la diferencia de respuesta entre el EDL y soleo, en la expresión de los mRNA blancos de la señal lenta de calcio acá estudiados.

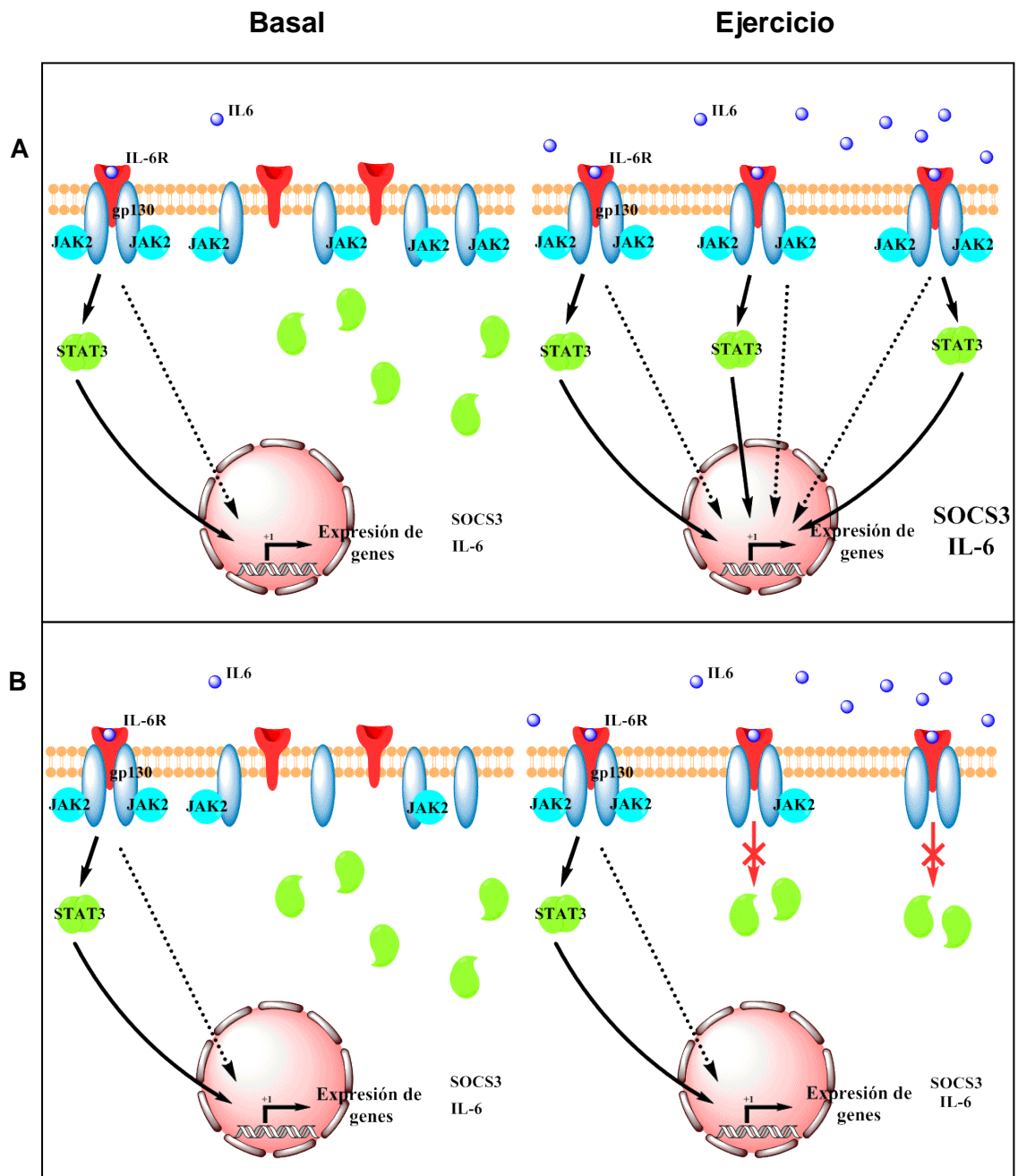


Figura 21. Modelo propuesto para la alteración de la vía de retroalimentación positiva de IL-6 en el músculo urémico.

(A) Vía IL-6/IL-6R en el músculo sano. Basal: Los niveles circulantes de IL-6 mantienen una actividad basal de esta vía, con una baja fosforilación y dimerización de STAT3, y una baja expresión de IL-6 y SOCS3. **Ejercicio:** Durante el ejercicio la concentración plasmática de IL-6 aumenta. Su unión a IL-6R induce la

homodimerización de gp130, permitiendo la transautofosforilación de JAK2. Luego JAK2 fosforila a gp130, activando diferentes cascadas de señalización intracelular, que llevan a un aumento de la expresión génica de SOCS3 e IL-6, ya sea por la vía canónica JAK2/STAT3 o por otra vía. **(B) Vía IL-6/IL-6R alterada en el músculo urémico.** *Basal:* Existe una gran cantidad de proteínas gp130 que no poseen a JAK2 asociada. Sin embargo, no se observan diferencias de fosforilación de STAT3 y de expresión de SOCS3 e IL-6, debido a la baja actividad de esta vía durante el reposo. *Ejercicio:* La concentración de IL-6 aumenta con el ejercicio, y su unión a IL-6R provoca la homodimerización de gp130; sin embargo, sólo aquellos receptores que tengan ambas JAK2 asociadas activan la vía, por lo que la dimerización y fosforilación de STAT3 se encuentra reducida, así como la expresión de SOCS3 e IL-6.

13 CONCLUSIONES

Los animales NPX producto de la nefrectomía presentaron basalmente:

- Niveles de abundancia del mRNA de IL-6 similares a las ratas sham tanto en EDL como en soleo.
- Niveles de abundancia del mRNA de IL-6R y gp130 en el EDL y soleo, similares a las ratas sham.
- Disminución significativa de la abundancia de la proteína JAK2 en el EDL.
- Una fosforilación y una abundancia de la proteína STAT3 en el EDL similar a ratas control.
- Niveles de abundancia de SOCS3 similar a ratas sham tanto en el EDL como en soleo.
- Disminución significativa de la fosforilación de AMPK en el EDL.

Los animales NPX luego del ejercicio presentaron:

- Una reducción de la inducción del mRNA de IL-6 en el EDL en ambos protocolos de ejercicio en comparación a ratas sham. En el soleo sólo fue posible observar una tendencia a esa reducción.
- Un aumento significativo de la abundancia del mRNA de IL-6R y gp130 en EDL y soleo con ambos protocolos de ejercicio que fue similar a las ratas sham.
- Una abundancia de la proteína JAK2 aumentó y se niveló con la observada en ratas sham.
- Una reducción de la inducción de la fosforilación de la proteína STAT3 en el EDL en comparación a ratas sham, luego del protocolo de ejercicio.
- Una reducción de la inducción del mRNA de SOCS3 en el EDL y soleo en comparación a ratas sham, luego de la natación.
- Una disminuida fosforilación de AMPK en el EDL al compararlas con ratas sham; sin embargo no se observó un aumento de la fosforilación con el ejercicio en ratas sham ni NPX.

La suma de todos estos resultados acá presentados permite concluir que en la IRC existe una disminución de la inducción de la expresión de IL-6 en respuesta al ejercicio, asociada a una reducción de la expresión de JAK2. Esta anomalía generaría una resistencia a IL-6. IL-6 es un sensor de energía con importantes efectos metabólicos vía AMPK, la cual se encuentra basalmente menos activa en la uremia y probablemente la inducción de su activación por IL-6 también estaría disminuida. Estas alteraciones podrían explicar, en parte, la reducida resistencia al ejercicio que se observa en la IRC.

14 REFERENCIAS

- 1. Minsal 2010 Guía Clínica: Prevención de Enfermedad Renal Crónica. Series Guías Clínicas Minsal**
- 2. Wills MR 1985 Uremic toxins, and their effect on intermediary metabolism. Clin Chem 31:5-13**
- 3. Poblete H 2010 XXX CUENTA DE HEMODIÁLISIS CRÓNICA (HDC) EN CHILE. Sociedad Chilena de Nefrología Registro de Diálisis**
- 4. Zuniga San Martin C 2006 [Palliative Care for renal patients]. Rev Med Chil 134:1592-1593**
- 5. Campistol JM 2002 Uremic myopathy. Kidney Int 62:1901-1913**
- 6. Fahal IH, Bell GM, Bone JM, Edwards RH 1997 Physiological abnormalities of skeletal muscle in dialysis patients. Nephrol Dial Transplant 12:119-127**
- 7. Clyne N 1996 Physical working capacity in uremic patients. Scand J Urol Nephrol 30:247-252**
- 8. Flisinski M, Brymora A, Elminowska-Wenda G, Bogucka J, Walasik K, Stefanska A, Odrowaz-Sypniewska G, Manitius J 2008 Influence of different stages of experimental chronic kidney disease on rats locomotor and postural skeletal muscles microcirculation. Ren Fail 30:443-451**
- 9. Johansen KL 2007 Exercise in the end-stage renal disease population. J Am Soc Nephrol 18:1845-1854**
- 10. Johansen KL 2008 Exercise and dialysis. Hemodial Int 12:290-300**
- 11. Moinuddin I, Leehey DJ 2008 A comparison of aerobic exercise and resistance training in patients with and without chronic kidney disease. Adv Chronic Kidney Dis 15:83-96**

12. **Goldberg AP, Hagberg J, Delmez JA, Carney RM, McKeivitt PM, Ehsani AA, Harter HR 1980 The metabolic and psychological effects of exercise training in hemodialysis patients. Am J Clin Nutr 33:1620-1628**
13. **Macdonald JH, Marcora SM, Jibani M, Phanish MK, Holly J, Lemmey AB 2005 Intradialytic exercise as anabolic therapy in haemodialysis patients -- a pilot study. Clin Physiol Funct Imaging 25:113-118**
14. **Johansen KL, Painter PL, Sakkas GK, Gordon P, Doyle J, Shubert T 2006 Effects of resistance exercise training and nandrolone decanoate on body composition and muscle function among patients who receive hemodialysis: A randomized, controlled trial. J Am Soc Nephrol 17:2307-2314**
15. **Lundin AP, Stein RA, Brown CD, LaBelle P, Kalman FS, Delano BG, Heneghan WF, Lazarus NA, Krasnow N, Friedman EA 1987 Fatigue, acid-base and electrolyte changes with exhaustive treadmill exercise in hemodialysis patients. Nephron 46:57-62**
16. **Wang XH, Du J, Klein JD, Bailey JL, Mitch WE 2009 Exercise ameliorates chronic kidney disease-induced defects in muscle protein metabolism and progenitor cell function. Kidney Int 76:751-759**
17. **May RC, Kelly RA, Mitch WE 1987 Mechanisms for defects in muscle protein metabolism in rats with chronic uremia. Influence of metabolic acidosis. J Clin Invest 79:1099-1103**
18. **Castaneda-Sceppa C, Sarnak MJ, Wang X, Greene T, Madero M, Kusek JW, Beck G, Kopple JD, Levey AS, Menon V 2007 Role of adipose tissue in determining muscle mass in patients with chronic kidney disease. J Ren Nutr 17:314-322**
19. **Pupim LB, Flakoll PJ, Ikizler TA 2004 Protein homeostasis in chronic hemodialysis patients. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 7:89-95**
20. **Lee SW, Park GH, Song JH, Hong KC, Kim MJ 2007 Insulin resistance and muscle wasting in non-diabetic end-stage renal disease patients. Nephrol Dial Transplant 22:2554-2562**

21. O'Sullivan AJ, Kelly JJ 2007 Insulin resistance and protein catabolism in non-diabetic hemodialysis patients. *Kidney Int* 71:98-100
22. Mak RH, Cheung W 2007 Cachexia in chronic kidney disease: role of inflammation and neuropeptide signaling. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 16:27-31
23. Bailey JL, Wang X, England BK, Price SR, Ding X, Mitch WE 1996 The acidosis of chronic renal failure activates muscle proteolysis in rats by augmenting transcription of genes encoding proteins of the ATP-dependent ubiquitin-proteasome pathway. *J Clin Invest* 97:1447-1453
24. Du J, Wang X, Miereles C, Bailey JL, Debigare R, Zheng B, Price SR, Mitch WE 2004 Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *J Clin Invest* 113:115-123
25. Rajan VR, Mitch WE 2008 Muscle wasting in chronic kidney disease: the role of the ubiquitin proteasome system and its clinical impact. *Pediatr Nephrol* 23:527-535
26. Verzola D, Procopio V, Sofia A, Villaggio B, Tarroni A, Bonanni A, Mannucci I, De Cian F, Gianetta E, Saffioti S, Garibotto G 2011 Apoptosis and myostatin mRNA are upregulated in the skeletal muscle of patients with chronic kidney disease. *Kidney Int* 79:773-782
27. Sun DF, Chen Y, Rabkin R 2006 Work-induced changes in skeletal muscle IGF-1 and myostatin gene expression in uremia. *Kidney Int* 70:453-459
28. Clyne N, Esbjornsson M, Jansson E, Jogestrand T, Lins LE, Pehrsson SK 1993 Effects of renal failure on skeletal muscle. *Nephron* 63:395-399
29. Johansen KL, Doyle J, Sakkas GK, Kent-Braun JA 2005 Neural and metabolic mechanisms of excessive muscle fatigue in maintenance hemodialysis patients. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289:R805-813

30. Adey D, Kumar R, McCarthy JT, Nair KS 2000 Reduced synthesis of muscle proteins in chronic renal failure. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278:E219-225
31. Horl WH, Sperling J, Heidland A 1978 Enhanced glycogen turnover in skeletal muscle of uremic rats--cause of uncontrolled actomyosin ATPase? *Am J Clin Nutr* 31:1861-1864
32. Smogorzewski M, Piskorska G, Borum PR, Massry SG 1988 Chronic renal failure, parathyroid hormone and fatty acids oxidation in skeletal muscle. *Kidney Int* 33:555-560
33. Zhang L, Wang XH, Wang H, Du J, Mitch WE 2010 Satellite cell dysfunction and impaired IGF-1 signaling cause CKD-induced muscle atrophy. *J Am Soc Nephrol* 21:419-427
34. Klin M, Smogorzewski M, Massry SG 1995 Chronic renal failure increases cytosolic Ca²⁺ of hepatocytes. *Am J Physiol* 269:G103-109
35. Zhang YB, Smogorzewski M, Ni Z, Massry SG 1994 Altered cytosolic calcium homeostasis in rat cardiac myocytes in CRF. *Kidney Int* 45:1113-1119
36. Lopez JR, Mijares A, Rojas B, Linares N, Allen PD, Shtifman A 2005 Altered Ca²⁺ homeostasis in human uremic skeletal muscle: possible involvement of cADPR in elevation of intracellular resting [Ca²⁺]. *Nephron Physiol* 100:p51-60
37. Lopez JR, Rojas B, Parthe V, Gonzalez-Gay MA 1995 Dysfunction of myoplasmic Ca²⁺ regulation in skeletal muscle from predialytic uremic patients. *Nephron* 70:270
38. Bonilla S, Goecke IA, Bozzo S, Alvo M, Michea L, Marusic ET 1991 Effect of chronic renal failure on Na,K-ATPase alpha 1 and alpha 2 mRNA transcription in rat skeletal muscle. *J Clin Invest* 88:2137-2141

39. Cotton JR, Woodard T, Carter NW, Knochel JP 1979 Resting skeletal muscle membrane potential as an index of uremic toxicity. A proposed new method to assess adequacy of hemodialysis. *J Clin Invest* 63:501-506
40. Z'Graggen WJ, Aregger F, Farese S, Humm AM, Baumann C, Uehlinger DE, Bostock H 2010 Velocity recovery cycles of human muscle action potentials in chronic renal failure. *Clin Neurophysiol* 121:874-881
41. Jaimovich E, Carrasco MA 2002 IP₃ dependent Ca²⁺ signals in muscle cells are involved in regulation of gene expression. *Biol Res* 35:195-202
42. Powell JA, Carrasco MA, Adams DS, Drouet B, Rios J, Muller M, Estrada M, Jaimovich E 2001 IP₃ receptor function and localization in myotubes: an unexplored Ca²⁺ signaling pathway in skeletal muscle. *J Cell Sci* 114:3673-3683
43. Juretic N, Urzua U, Munroe DJ, Jaimovich E, Riveros N 2007 Differential gene expression in skeletal muscle cells after membrane depolarization. *J Cell Physiol* 210:819-830
44. Casas M, Figueroa R, Jorquera G, Escobar M, Molgo J, Jaimovich E 2010 IP₃-dependent, post-tetanic calcium transients induced by electrostimulation of adult skeletal muscle fibers. *J Gen Physiol* 136:455-467
45. Juretic N, Garcia-Huidobro P, Iturrieta JA, Jaimovich E, Riveros N 2006 Depolarization-induced slow Ca²⁺ transients stimulate transcription of IL-6 gene in skeletal muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 290:C1428-1436
46. Pette D, Staron RS 2001 Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. *Histochem Cell Biol* 115:359-372
47. Kurdi M, Booz GW 2009 JAK redux: a second look at the regulation and role of JAKs in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297:H1545-1556
48. Pedersen BK, Steensberg A, Keller P, Keller C, Fischer C, Hiscock N, van Hall G, Plomgaard P, Febbraio MA 2003 Muscle-derived interleukin-6:

lipolytic, anti-inflammatory and immune regulatory effects. *Pflugers Arch* 446:9-16

49. Heinrich PC, Castell JV, Andus T 1990 Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 265:621-636
50. Pedersen BK, Febbraio MA 2008 Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev* 88:1379-1406
51. Haan C, Kreis S, Margue C, Behrmann I 2006 Jaks and cytokine receptors--an intimate relationship. *Biochem Pharmacol* 72:1538-1546
52. Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T 1995 Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* 86:1243-1254
53. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F 2003 Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 374:1-20
54. Spangenburg EE, Brown DA, Johnson MS, Moore RL 2006 Exercise increases SOCS-3 expression in rat skeletal muscle: potential relationship to IL-6 expression. *J Physiol* 572:839-848
55. Bodell PW, Kodesh E, Haddad F, Zaldivar FP, Cooper DM, Adams GR 2009 Skeletal muscle growth in young rats is inhibited by chronic exposure to IL-6 but preserved by concurrent voluntary endurance exercise. *J Appl Physiol* 106:443-453
56. Jones SA, Horiuchi S, Topley N, Yamamoto N, Fuller GM 2001 The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease. *FASEB J* 15:43-58
57. Keller P, Penkowa M, Keller C, Steensberg A, Fischer CP, Giralt M, Hidalgo J, Pedersen BK 2005 Interleukin-6 receptor expression in contracting human skeletal muscle: regulating role of IL-6. *FASEB J* 19:1181-1183

58. Bermudez EA, Rifai N, Buring J, Manson JE, Ridker PM 2002 Interrelationships among circulating interleukin-6, C-reactive protein, and traditional cardiovascular risk factors in women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:1668-1673
59. Scheller J, Ohnesorge N, Rose-John S 2006 Interleukin-6 trans-signalling in chronic inflammation and cancer. *Scand J Immunol* 63:321-329
60. Fisman EZ, Tenenbaum A 2010 The ubiquitous interleukin-6: a time for reappraisal. *Cardiovasc Diabetol* 9:62
61. Pedersen BK 2007 IL-6 signalling in exercise and disease. *Biochem Soc Trans* 35:1295-1297
62. Pedersen BK, Steensberg A, Schjerling P 2001 Muscle-derived interleukin-6: possible biological effects. *J Physiol* 536:329-337
63. Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, Klein S, Coppel SW 1997 Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 82:4196-4200
64. Ostrowski K, Rohde T, Asp S, Schjerling P, Pedersen BK 1999 Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *J Physiol* 515 (Pt 1):287-291
65. Jonsdottir IH, Schjerling P, Ostrowski K, Asp S, Richter EA, Pedersen BK 2000 Muscle contractions induce interleukin-6 mRNA production in rat skeletal muscles. *J Physiol* 528 Pt 1:157-163
66. Steensberg A, Keller C, Starkie RL, Osada T, Febbraio MA, Pedersen BK 2002 IL-6 and TNF-alpha expression in, and release from, contracting human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283:E1272-1278
67. Keller P, Keller C, Carey AL, Jauffred S, Fischer CP, Steensberg A, Pedersen BK 2003 Interleukin-6 production by contracting human skeletal

muscle: autocrine regulation by IL-6. *Biochem Biophys Res Commun* 310:550-554

- 68. Fischer CP 2006 Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? *Exerc Immunol Rev* 12:6-33**
- 69. Weigert C, Dufer M, Simon P, Debre E, Runge H, Brodbeck K, Haring HU, Schleicher ED 2007 Upregulation of IL-6 mRNA by IL-6 in skeletal muscle cells: role of IL-6 mRNA stabilization and Ca²⁺-dependent mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* 293:C1139-1147**
- 70. Febbraio MA, Pedersen BK 2002 Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. *FASEB J* 16:1335-1347**
- 71. Keller C, Steensberg A, Hansen AK, Fischer CP, Plomgaard P, Pedersen BK 2005 Effect of exercise, training, and glycogen availability on IL-6 receptor expression in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 99:2075-2079**
- 72. Steensberg A, Febbraio MA, Osada T, Schjerling P, van Hall G, Saltin B, Pedersen BK 2001 Interleukin-6 production in contracting human skeletal muscle is influenced by pre-exercise muscle glycogen content. *J Physiol* 537:633-639**
- 73. Febbraio MA, Steensberg A, Keller C, Starkie RL, Nielsen HB, Krstrup P, Ott P, Secher NH, Pedersen BK 2003 Glucose ingestion attenuates interleukin-6 release from contracting skeletal muscle in humans. *J Physiol* 549:607-612**
- 74. Starkie RL, Arkinstall MJ, Koukoulas I, Hawley JA, Febbraio MA 2001 Carbohydrate ingestion attenuates the increase in plasma interleukin-6, but not skeletal muscle interleukin-6 mRNA, during exercise in humans. *J Physiol* 533:585-591**
- 75. Wallenius V, Wallenius K, Ahren B, Rudling M, Carlsten H, Dickson SL, Ohlsson C, Jansson JO 2002 Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nat Med* 8:75-79**

76. **Faldt J, Wernstedt I, Fitzgerald SM, Wallenius K, Bergstrom G, Jansson JO 2004 Reduced exercise endurance in interleukin-6-deficient mice. *Endocrinology* 145:2680-2686**
77. **Franckhauser S, Elias I, Rotter Sopasakis V, Ferre T, Nagaev I, Andersson CX, Agudo J, Ruberte J, Bosch F, Smith U 2008 Overexpression of Il6 leads to hyperinsulinaemia, liver inflammation and reduced body weight in mice. *Diabetologia* 51:1306-1316**
78. **MacDonald C, Wojtaszewski JF, Pedersen BK, Kiens B, Richter EA 2003 Interleukin-6 release from human skeletal muscle during exercise: relation to AMPK activity. *J Appl Physiol* 95:2273-2277**
79. **Kelly M, Keller C, Avilucea PR, Keller P, Luo Z, Xiang X, Giralt M, Hidalgo J, Saha AK, Pedersen BK, Ruderman NB 2004 AMPK activity is diminished in tissues of IL-6 knockout mice: the effect of exercise. *Biochem Biophys Res Commun* 320:449-454**
80. **Carey AL, Steinberg GR, Macaulay SL, Thomas WG, Holmes AG, Ramm G, Prelovsek O, Hohnen-Behrens C, Watt MJ, James DE, Kemp BE, Pedersen BK, Febbraio MA 2006 Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase. *Diabetes* 55:2688-2697**
81. **Al-Khalili L, Bouzakri K, Glund S, Lonnqvist F, Koistinen HA, Krook A 2006 Signaling specificity of interleukin-6 action on glucose and lipid metabolism in skeletal muscle. *Mol Endocrinol* 20:3364-3375**
82. **Richter EA, Ruderman NB 2009 AMPK and the biochemistry of exercise: implications for human health and disease. *Biochem J* 418:261-275**
83. **McGee SL, Hargreaves M 2010 AMPK-mediated regulation of transcription in skeletal muscle. *Clin Sci (Lond)* 118:507-518**
84. **Kelly M, Gauthier MS, Saha AK, Ruderman NB 2009 Activation of AMP-activated protein kinase by interleukin-6 in rat skeletal muscle: association with changes in cAMP, energy state, and endogenous fuel mobilization. *Diabetes* 58:1953-1960**

85. Thomson DM, Winder WW 2009 AMP-activated protein kinase control of fat metabolism in skeletal muscle. *Acta Physiol (Oxf)* 196:147-154
86. Baeza-Raja B, Munoz-Canoves P 2004 p38 MAPK-induced nuclear factor-kappaB activity is required for skeletal muscle differentiation: role of interleukin-6. *Mol Biol Cell* 15:2013-2026
87. Cantini M, Massimino ML, Rapizzi E, Rossini K, Catani C, Dalla Libera L, Carraro U 1995 Human satellite cell proliferation in vitro is regulated by autocrine secretion of IL-6 stimulated by a soluble factor(s) released by activated monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 216:49-53
88. Serrano AL, Baeza-Raja B, Perdiguero E, Jardi M, Munoz-Canoves P 2008 Interleukin-6 is an essential regulator of satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy. *Cell Metab* 7:33-44
89. Eustace JA, Astor B, Muntner PM, Ikizler TA, Coresh J 2004 Prevalence of acidosis and inflammation and their association with low serum albumin in chronic kidney disease. *Kidney Int* 65:1031-1040
90. Mege JL, Olmer M, Purgus R, Bertocchio P, Farnarier C, Kaplanski S, Capo C, Bongrand P 1991 Haemodialysis membranes modulate chronically the production of TNF alpha, IL1 beta and IL6. *Nephrol Dial Transplant* 6:868-875
91. Raj DS, Dominic EA, Pai A, Osman F, Morgan M, Pickett G, Shah VO, Ferrando A, Moseley P 2005 Skeletal muscle, cytokines, and oxidative stress in end-stage renal disease. *Kidney Int* 68:2338-2344
92. Garibotto G, Sofia A, Procopio V, Villaggio B, Tarroni A, Di Martino M, Cappelli V, Gandolfo MT, Aloisi F, De Cian F, Sala MR, Verzola D 2006 Peripheral tissue release of interleukin-6 in patients with chronic kidney diseases: effects of end-stage renal disease and microinflammatory state. *Kidney Int* 70:384-390
93. Zhang L, Du J, Hu Z, Han G, Delafontaine P, Garcia G, Mitch WE 2009 IL-6 and serum amyloid A synergy mediates angiotensin II-induced muscle wasting. *J Am Soc Nephrol* 20:604-612

94. Nassberger L 1992 Serum levels of interleukin-6 are not dependent on the kidney function. *Mediators Inflamm* 1:197-199
95. Castell JV, Geiger T, Gross V, Andus T, Walter E, Hirano T, Kishimoto T, Heinrich PC 1988 Plasma clearance, organ distribution and target cells of interleukin-6/hepatocyte-stimulating factor in the rat. *Eur J Biochem* 177:357-361
96. Kitamura H, Shimizu A, Masuda Y, Ishizaki M, Sugisaki Y, Yamanaka N 1998 Apoptosis in glomerular endothelial cells during the development of glomerulosclerosis in the remnant-kidney model. *Exp Nephrol* 6:328-336
97. Griffin KA, Picken M, Bidani AK 1994 Method of renal mass reduction is a critical modulator of subsequent hypertension and glomerular injury. *J Am Soc Nephrol* 4:2023-2031
98. Aunapuu M, Pechter U, Arend A, Suuroja T, Ots M 2003 Ultrastructural changes in the remnant kidney (after 5/6 nephrectomy) glomerulus after losartan and atenolol treatment. *Medicina (Kaunas)* 39:975-979
99. Brau L, Ferreira LD, Nikolovski S, Raja G, Palmer TN, Fournier PA 1997 Regulation of glycogen synthase and phosphorylase during recovery from high-intensity exercise in the rat. *Biochem J* 322 (Pt 1):303-308
100. Ravi Kiran T, Subramanyam MV, Asha Devi S 2004 Swim exercise training and adaptations in the antioxidant defense system of myocardium of old rats: relationship to swim intensity and duration. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 137:187-196
101. Ropelle ER, Fernandes MF, Flores MB, Ueno M, Rocco S, Marin R, Cintra DE, Velloso LA, Franchini KG, Saad MJ, Carnevalheira JB 2008 Central exercise action increases the AMPK and mTOR response to leptin. *PLoS One* 3:e3856
102. Frieling JT, van Hamersvelt HW, Wijdenes J, Hendriks T, Sauerwein RW, van Der Linden CJ 1999 Circulating concentrations of soluble interleukin 6 receptors gp80 and gp130 in chronic renal failure and effects of renal replacement therapy. *Am J Nephrol* 19:571-575

103. Memoli B, Grandaliano G, Soccio M, Postiglione L, Guida B, Bisesti V, Esposito P, Procino A, Marrone D, Michael A, Andreucci M, Schena FP, Pertosa G 2005 In vivo modulation of soluble "antagonistic" IL-6 receptor synthesis and release in ESRD. *J Am Soc Nephrol* 16:1099-1107
104. Schaefer F, Chen Y, Tsao T, Nouri P, Rabkin R 2001 Impaired JAK-STAT signal transduction contributes to growth hormone resistance in chronic uremia. *J Clin Invest* 108:467-475
105. Sun DF, Zheng Z, Tummala P, Oh J, Schaefer F, Rabkin R 2004 Chronic uremia attenuates growth hormone-induced signal transduction in skeletal muscle. *J Am Soc Nephrol* 15:2630-2636
106. Mak RH, Cheung WW, Roberts CT, Jr. 2008 The growth hormone-insulin-like growth factor-I axis in chronic kidney disease. *Growth Horm IGF Res* 18:17-25
107. Mahesh S, Kaskel F 2008 Growth hormone axis in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol* 23:41-48
108. Zhou Y, Wang X, Hadley J, Corey SJ, Vasilatos-Younken R 2005 Regulation of JAK2 protein expression by chronic, pulsatile GH administration in vivo: a possible mechanism for ligand enhancement of signal transduction. *Gen Comp Endocrinol* 144:128-139
109. de Borst MH, Prakash J, Sandovici M, Klok PA, Hamming I, Kok RJ, Navis G, van Goor H 2009 c-Jun NH2-terminal kinase is crucially involved in renal tubulo-interstitial inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 331:896-905
110. Shaulian E 2010 AP-1--The Jun proteins: Oncogenes or tumor suppressors in disguise? *Cell Signal* 22:894-899
111. Carey AL, Lamont B, Andrikopoulos S, Koukoulas I, Proietto J, Febbraio MA 2003 Interleukin-6 gene expression is increased in insulin-resistant rat skeletal muscle following insulin stimulation. *Biochem Biophys Res Commun* 302:837-840

112. Pedersen BK 2011 Muscular IL-6 and Its Role as an Energy Sensor. *Med Sci Sports Exerc*
113. Kanemaki T, Kitade H, Kaibori M, Sakitani K, Hiramatsu Y, Kamiyama Y, Ito S, Okumura T 1998 Interleukin 1beta and interleukin 6, but not tumor necrosis factor alpha, inhibit insulin-stimulated glycogen synthesis in rat hepatocytes. *Hepatology* 27:1296-1303
114. Klover PJ, Clementi AH, Mooney RA 2005 Interleukin-6 depletion selectively improves hepatic insulin action in obesity. *Endocrinology* 146:3417-3427
115. Stith RD, Luo J 1994 Endocrine and carbohydrate responses to interleukin-6 in vivo. *Circ Shock* 44:210-215
116. Wolsk E, Mygind H, Grondahl TS, Pedersen BK, van Hall G 2010 IL-6 selectively stimulates fat metabolism in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299:E832-840
117. Febbraio MA, Hiscock N, Sacchetti M, Fischer CP, Pedersen BK 2004 Interleukin-6 is a novel factor mediating glucose homeostasis during skeletal muscle contraction. *Diabetes* 53:1643-1648
118. Kim HJ, Higashimori T, Park SY, Choi H, Dong J, Kim YJ, Noh HL, Cho YR, Cline G, Kim YB, Kim JK 2004 Differential effects of interleukin-6 and -10 on skeletal muscle and liver insulin action in vivo. *Diabetes* 53:1060-1067
119. Nieto-Vazquez I, Fernandez-Veledo S, de Alvaro C, Lorenzo M 2008 Dual role of interleukin-6 in regulating insulin sensitivity in murine skeletal muscle. *Diabetes* 57:3211-3221
120. van Hall G, Steensberg A, Sacchetti M, Fischer C, Keller C, Schjerling P, Hiscock N, Moller K, Saltin B, Febbraio MA, Pedersen BK 2003 Interleukin-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 88:3005-3010

- 121. Petersen EW, Carey AL, Sacchetti M, Steinberg GR, Macaulay SL, Febbraio MA, Pedersen BK 2005 Acute IL-6 treatment increases fatty acid turnover in elderly humans in vivo and in tissue culture in vitro. Am J Physiol Endocrinol Metab 288:E155-162**
- 122. Leikis MJ, McKenna MJ, Petersen AC, Kent AB, Murphy KT, Leppik JA, Gong X, McMahon LP 2006 Exercise performance falls over time in patients with chronic kidney disease despite maintenance of hemoglobin concentration. Clin J Am Soc Nephrol 1:488-495**
- 123. Novak P, Zacharova G, Soukup T 2010 Individual, age and sex differences in fiber type composition of slow and fast muscles of adult Lewis rats: comparison with other rat strains. Physiol Res 59:783-801**