



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
FACULTAT DE CIÈNCIAS

ESTUDIO DEL METABOLISMO ENERGÉTICO MUSCULAR
Y DE LA COMPOSICIÓN CORPORAL DE ATLETAS
POR MÉTODOS NO DESTRUCTIVOS

Maria Gisele dos Santos

Cerdanyola del Valles (Barcelona) – España

2001

ESTUDIO DEL METABOLISMO ENERGÉTICO MUSCULAR
Y DE LA COMPOSICIÓN CORPORAL DE ATLETAS
POR MÉTODOS NO DESTRUCTIVOS

Este trabajo se ha realizado en la Unitat de Ciències del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la UAB y el Centre Diagnòstic Pedralbes de Barcelona bajo la dirección de los Dres. Carles Arús Caraltó (UAB) y Àngel Moreno Torres (CDP).

Dr. Carles Arús Caraltó

Dr. Àngel Moreno Torres

Maria Gisele dos Santos

Cerdanyola del Valles (Barcelona) – España

2001

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	iii
ABREVIATURAS	ix
INDICE DE TABLAS	xi
INDICE DE FIGURAS.....	xv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Introducción a la RMN	1
1.2. El fenómeno de la resonancia y la relajación	3
1.3. Espectroscopia de resonancia magnética (MRS).....	6
1.4. Evolución histórica de los estudios por RMN.....	7
1.5. Metabolismo y fisiología muscular.....	9
1.6. Fisiología muscular por ¹ H-MRS	13
1.7. Bioenergética muscular	14
1.8. Bases metabólicas de la fatiga	15
1.9. Metabolismo muscular de los triglicéridos	21
1.10. Biosíntesis y metabolismo de la creatina	25
1.11. Metabolismo de la creatina: CK y sus isoformas	28
1.12. Lanzadera Cr/PCr	29
1.13. Suplementación dietaria con creatina	33
1.14. Efecto de la suplementación dietaria con creatina.....	34
2. OBJETIVOS.....	37
3. MATERIAL Y METODOS	39
3.1. Diseño experimental	39
3.2. Sujetos.....	39
3.2.1. Fondistas y medio-fondistas	39
3.2.2. Futbolistas	40

3.3.	Suplementación de la dieta.....	40
3.3.1.	Fondistas y medio-fondistas	40
3.3.2.	Futbolistas	40
3.4.	Determinación de la composición corporal.....	41
3.5.	Test de fatiga (JRS).....	47
3.6.	Test de capacidad aeróbica máxima	49
3.7.	Muestras sanguíneas	55
3.7.1.	Lactato	55
3.7.1.1.	Cálculo del umbral anaeróbico	55
3.7.2.	Amonio	56
3.8.	Descripción del ergómetro	56
3.9.	Protocolo de ejercicio de MRS en el CAR.....	61
3.10.	Protocolo de ejercicio de MRS realizado en el CDP.....	61
3.11.	Medición de la fuerza en el ergómetro.....	62
3.12.	Cálculo de la potencia realizada	64
3.13.	Escala del esfuerzo percibido (RPE)	64
3.14.	Experimental de resonancia magnética (RM)	66
3.14.1.	Espectroscopía e imagen de resonancia magnética.....	66
3.14.2.	Procedimientos de RM para ¹ H-MRS	66
3.14.3.	Ajuste de los parámetros espectrales para ¹ H-MRS.....	71
3.14.4.	Presaturación del agua.....	71
3.14.5.	Secuencias de localización y excitación del VOI	72
3.14.6.	Procesamiento de los espectros <i>in vivo</i> de ¹ H-MRS	74
3.14.6.1.	Conversión de la FID.....	75
3.14.6.2.	Corrección de la forma de las resonancias	75
3.14.6.3.	Filtrado de la señal de agua: <i>HLSVD</i>	76
3.14.6.4.	Selección de las resonancias a ajustar	77
3.14.6.5.	Ajuste en el dominio del tiempo: <i>AMARES</i>	77
3.14.7.	Análisis cuantitativo de datos de ¹ H-MRS	77
3.14.8.	Experimentos de ³¹ P-MRS.....	80
3.14.9.	Procesamiento mediante " <i>moving window average</i> "	83
3.14.10.	Preparación de la referencia externa para ³¹ P-MRS.....	88

3.14.11. Análisis de los espectros de ^{31}P -MRS	90
3.14.12. Corrección de los efectos de saturación diferencial	93
3.14.12.1. Espectros de ^{31}P -MRS con $TR = 2$ s.....	93
3.14.12.2. Espectros de ^{31}P -MRS con $TR = 30$ s.....	93
3.14.12.3. Análisis estadístico de los resultados	93

4. RESULTADOS

4.1. Protocolos experimentales con fondistas / medio-fondistas	95
4.1.1. Características físicas y atléticas de los sujetos	95
4.1.2. Protocolo de esfuerzo y consumo de O_2 en el CAR.....	96
4.1.3. Interacción RPE y niveles de lactato en sangre	107
4.1.4. Protocolo de MRS en el CDP	115
4.1.4.1. Potencia desarrollada en el protocolo CDP ...	115
4.1.4.2. Niveles de metabolitos por ^{31}P -MRS antes y después del protocolo CDP	119
4.1.4.3. Concentración intra- y extracelular de triglicéridos mediante ^1H -MRS	135
4.2. Protocolos experimentales con futbolistas	140
4.2.1. Características antropométricas de los jugadores	140
4.2.2. Composición corporal de los jugadores antes y después de la suplementación con creatina y polisacáridos.....	142
4.2.3. Concentración de triglicérido intra- y extramuscular mediante ^1H -MRS	143
4.2.4. Concentración de triglicérido intra- y extramuscular y de creatina total mediante ^1H -MRS después de la suplementación con creatina y polisacáridos	146
4.2.5. Niveles de metabolitos por ^{31}P -MRS	147
4.2.6. Test de fatiga JRS antes de la suplementación	154
4.3. Resultados comparados de los fondistas / medio-fondistas y futbolistas en cuanto a ^{31}P -MRS y ^1H -MRS	154

5. DISCUSION

5.1.	Protocolo realizado con los medio-fondistas y fondistas.....	159
5.1.1.	Características antropométricas	159
5.1.2.	Evaluación de los niveles de lactato y amonio sanguíneos durante el protocolo CDP	160
5.1.3.	Protocolo de ejercicio en el CAR y consumo de O ₂	162
5.1.4.	Análisis de la RPE en el protocolo del CAR	163
5.1.5.	Evaluación de la potencia desarrollada en el protocolo de ejercici CDP	166
5.1.6.	Niveles de metabolitos musculares por ³¹ P-MRS antes y después del protocolo de ejercicio CDP	166
5.1.7.	Evaluación de la concentración de triglicérido intra- y extracelular en fondistas / medio-fondistas y correlación con la capacidad aeróbica	169
5.1.7.1.	Cambios en triglicéridos intracelulares durante el protocolo de ejercicio CDP	169
5.1.7.2.	IT / ET y capacidad aeróbica	173
5.1.7.3.	Correlación entre concentraciones de triglicéridos IT y ET	174
5.2.	Protocolo experimental realizado con los futbolistas	175
5.2.1.	Medición de las concentraciones de triglicéridos intra- y extracelulares, grasa corporal y tiempo hasta la fatiga..	175
5.2.2.	Triglicérido intracelular	176
5.2.3.	Grasa corporal y triglicéridos extracelulares	179
5.2.4.	Variación de la composición corporal con la suplementación dietaria con creatina y polisacáridos	180
5.2.5.	Análisis del patrón de metabolitos musculares mediante ³¹ P y ¹ H-MRS antes y después de la suplementación.....	182
5.3.	Datos comparativos de los estudios realizados con fondistas / medio-fondistas y futbolistas	186
5.3.1.	Correlación IT /ET	186
5.3.2.	Correlación PCr / ATP con respecto Pi / ATP.....	186

6. CONCLUSIONES	189
7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	193

ABREVIATURAS

ADP	Adenosín difosfato
ATP	Adenosín trifosfato
AMARES	<i>Advanced Method for Accurate and Efficient Spectral Fitting</i>
AE	Antes del entrenamiento
BP	Bod Pod
CAR	Centre d' Alt Rendiment Esportiu
CC	Centrocampista
CDP	Centre Diagnòstic Pedralbes de Barcelona
CHESS	<i>Chemical Shift Selective Imaging Sequence</i>
CK	Creatina quinasa
Cr	Creatina
DE	Después del entrenamiento
DF	Defensores
DL	Delanteros
ET	Triglicérido extracelular
FID	<i>Free Induction Decay</i>
FT	Transformada de Fourier
GC	Grasa Corporal
GP	Polímeros de Glucosa
IMC	Índice de Masa Corporal
IT	Triglicérido Intracelular
JRS	Test de fatiga – Jesús Rico-Sanz
MG	Masa Grasa
mi-CK	Creatina-quinasa mitocondrial
MM	Masa Magra
MRI	Resonancia Magnética de Imágenes
MRS	Espectroscopia de Resonancia Magnética
¹ H-MRS	Espectroscopia de Resonancia Magnética de Proton
³¹ P-MRS	Espectroscopia de Resonancia Magnética de Fosforo
MVC	Contracción Máxima Voluntaria

PC	Peso Corporal
PCr	Fosfocreatina
PFK	Fosfructoquinasa
P _i	Fosfato Inorgánico
PO	Porteros
PROBE	<i>PROton Brain Exam</i>
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RPE	Escala del Esfuerzo Percibido (“Ratio of Perceived Exertion”)
SAF	Servicio de Actividad Física (de la Univ. Autònoma de Barcelona)
SD	Desviación Estándar
STEAM	<i>Stimulated Echo Acquisition Mode</i>
TE	Tiempo de Eco
TG	Triglicéridos
TGL	Lipasas de Triglicéridos
TM	Tiempo de Mezcla
TCr	Creatina Total
TR	Tiempo de Repetición
TTE	Tiempo hasta la Fatiga
VM	Vasto Medial
VO ₂ IndLT	Consumo de Oxígeno Medido en el Umbral Anaeróbico Individual
VO ₂ LT4mM	Consumo de Oxígeno Medido en el Umbral Anaeróbico a 4mM de lactato sanguíneo
VO ₂ máx	Consumo Máximo de Oxígeno

INDICE DE TABLAS

Tabla 1- Contenido en creatina de diferentes tipos de alimentos.....	28
Tabla 2 – Escala de Borg del esfuerzo percibido	65
Tabla 3 - Parámetros de los espectros de MRS adquiridos “in vivo”	74
Tabla 4 - Valores de concentración de acetilacetato de cromo y T ₁	89
Tabla 5 – Tipo de pruebas que los sujetos participaban	95
Tabla 6 – Características antropométricas de los fondistas/medio-fondistas	96
Tabla 7 - Valores del promedio y desviación estándar (SD) de las velocidades del test submáximo y máximo.....	97
Tabla 8 – Valores del promedio y SD de consumo de oxígeno durante el protocolo submáximo y máximo en el tapiz rodante.....	98
Tabla 9 - Valores del promedio y SD de consumo de oxígeno relacionado con el umbral anaeróbico y el tiempo de fatiga (TTE)	100
Tabla 10 - Valores del promedio y del SD de las frecuencias cardíacas durante el test submáximo y máximo	101
Tabla 11 - Valores del promedio y del SD del lactato y del amonio durante el test submáximo y máximo	105
Tabla 12 – Valores de media y SD de las variables lactato y percepción	109

Tabla 13 – Valores de media y desviación estándar de las variables lactato y percepción estandarizadas.....	109
Tabla 14 – Potencia promedio desarrollada en el protocolo de ejercicio de MRS en el CDP	117
Tabla 15 – Valores promedio de PCr durante el reposo y el protocolo de ejercicio de MRS	127
Tabla 16 - Valores promedio de Pi durante el reposo y el protocolo de ejercicio de MRS	131
Tabla 17 - Valores promedio de pH durante el reposo y el protocolo de ejercicio de MRS	135
Tabla 18 - Triglicérido intra (IT) y extracelular (ET) (mmol.kg peso seco) ⁻¹ medidos no invasivamente por ¹ H-MRS en el músculo vasto medial. Valores de media y SD para los fondistas / medio-fondistas.....	138
Tabla 19 - Características antropométricas de jugadores de la Liga Nacional de división 2B, clasificados de acuerdo con la posición. Valores de la media y SD para los porteros (PO), defensas (DF), centrocampistas (CC), delanteros (DC), y para el equipo completo, con relación al índice de masa corporal (IMC), porcentaje de grasa corporal (GC), masa grasa (MG) y masa libre de grasa (MM).....	141
Tabla 20 - Peso corporal (PC), masa grasa (MG), masa magra (MM) y porcentaje de grasa corporal (%GC) antes (PRE) y después (POST) de la suplementación conjunta de creatina y polímeros de glucosa, ingeridos antes (AE, n=10) o después del entrenamiento (DE, n=11).....	142

Tabla 21 - Triglicérido intra (IT) y extracelular (ET) (mmol.kg peso seco) ⁻¹ medidos no invasivamente por ¹ H-MRS en el músculo vasto medial. Valores de media y SD para los porteros (PO), defensas (DF), centrocampistas (CC), delanteros (DL) y todo el equipo.....	145
Tabla 22 - Concentraciones de IT y ET antes y después del período de suplementación con creatina y polímeros de glucosa en los dos grupos de jugadores de fútbol	146
Tabla 23 – Amplitudes de Pi, PCr, ATP, PCr/ATP y Pi/ATP medidos por ³¹ P-MRS antes (PRE) y después (POST) de la suplementación con creatina y polímeros de glucosa, cuando ingerida antes (AE, n=10) y después del entrenamiento (DE, n=11).....	152
Tabla 24 – Tiempo hasta la fatiga (TTE) de los jugadores de fútbol en el test de fatiga JRS. Valores de media y SD para los porteros (PO), defensas (DF), centrocampistas (CC), delanteros (DL) y todo el equipo	154
Tabla 25 – Cocientes PCr/ATP y Pi/ATP de los fondistas / medio-fondistas	155
Tabla 26 - Cocientes PCr/ATP y Pi/ATP de futbolistas.....	155
Tabla 27 - Cocientes PCr/ATP y Pi/ATP de futbolistas y fondistas antes y después del período de suplementación dietaria	156

INDICE DE FIGURAS

Figura 1- Inclinación del vector magnetización al entrar en resonancia los núcleos del elemento de volumen (vóxel) con las ondas de radiofrecuencia (RF) en presencia de un campo magnético externo.....	4
Figura 2 - Excitación selectiva de diferentes elementos de volumen en presencia de un gradiente de campo magnético	5
Figura 3 – Esquema de la vía de síntesis de la creatina (Devlin,1992, <i>apud</i> Balsom y colaboradores,1994).....	23
Figura 4 - Esquema del sistema de lanzadera energética Cr/PCr.....	4
Figura 5a – El BOD POD, es un pletismógrafo de dos cámaras, dotado además de una balanza electrónica, ordenador y programa informático.....	43
Figura 5b – El BOD POD, es un pletismógrafo de dos cámaras, dotado además de una balanza electrónica, ordenador y programa informático.....	45
Figura 6 – Test de fatiga (JRS).....	49
Figura 7 – Determinación del consumo máximo de oxígeno en el protocolo de tapiz rodante.....	53
Figura 8 – Esquema del protocolo de ejercicio realizado sobre un tapiz rodante en el CAR	55
Figura 9 - Vista general del ergómetro donde podemos distinguir los topes forrados de caucho, los pedales y el circuito hidráulico que está compuesto por dos cilindros con sus respectivos pistones y la válvula que permite el control de la resistencia al pedaleo.....	59

Figura 10 – Vista general del ergómetro entrando en el túnel del espectrómetro de resonancia magnética.....	59
Figura 11 – Representación esquemática del protocolo de ejercicio dentro del imán realizado en el CDP	62
Figura 12 – Registro de la fuerza medida en una pedalada	63
Figura 13 - Registro de la fuerza en los tres palieres del protocolo de ejercicio.....	63
Figura 14 – Vista general de la bobina de rodilla.....	67
Figura 15 – Vista general del imán superconductor.....	69
Figura 16 - Esquema de la secuencia CHESSE, utilizada para la presaturación de la señal del agua	72
Figura 17 – Esquema de la secuencia de adquisición de vóxel único STEAM	73
Figura 18 – Espectro típico de 1H-MRS del músculo vasto medial y ajuste con AMARES	78
Figura 19 – Bobina emisora / receptora superficial elíptica	83
Figura 20 A – Diagrama ilustrativo del método de suavizado " <i>moving window averaging</i> " o sumas solapadas	87
Figura 20 B - Diagrama ilustrativo del método de suavizado habitual " <i>box car</i> ".....	87
Figura 21 – Representación gráfica de la variación de T_1 del $P_3N_3Cl_6$ al variar la concentración de agente relajante.....	89

Figura 22 - Espectros típicos de ³¹ P-MRS del músculo vasto medial, resultado experimental (EXPE), calculado (CALC), componentes aislados (COMP) y residuales (RESI) de las resonancias para el estándar externo, fosfato inorgánico, fosfocreatina y ATP, mediante MRUI – AMARES	92
Figura 23 – Correlación significativa después del período de suplementación entre el VO ₂ máximo y el TTE en los fondistas / medio-fondistas	99
Figura 24 – Registros obtenidos de un sujeto en el protocolo de tapiz rodante realizado en el CAR.....	102
Figura 25 – Valores de media de la variable lactato en los grupos 1 y 2 antes y después de la suplementación.....	103
Figura 26 – Valores de la percepción subjetiva promedio de los fondistas / medio-fondistas en el protocolo de tapiz rodante	107
Figura 27 – Representación de la media de las variables estandarizadas para la percepción subjetiva y lactato sanguíneo	111
Figura 28 – Valores de la media del grupo 1 (derecha) y 2 (izquierda) de la variable percepción subjetiva estandarizada (ZPAB) y lactato sanguíneo estandarizado (ZLactato).....	113
Figura 29 – Diferencia de las medias estandarizadas de percepción subjetiva (ZPAB) y la acumulación de lactato sanguíneo (ZLactato).....	113
Figura 30 – Valores promedio de la potencia desarrollada en el protocolo de ejercicio en el CDP de los grupos creatina y placebo, antes y después del período de ejercicio en el CDP	117

Figura 31 – Cinética continua para la variación de los distintos parámetros medidos (PCr, Pi, ATP y pH) para un único sujeto	120
Figura 32 – Espectros de ³¹ P correspondientes al protocolo de ejercicio dinámico realizado en el CDP	121
Figura 33a – Ajuste mediante MRUI del espectro correspondiente al final del primer período de ejercicio (EXE-1).....	122
Figura 33b – Ajuste mediante MRUI del espectro correspondiente al final de la recuperación del primer período de ejercicio (REC-1)	123
Figura 34 – Valores promedios de PCr para los grupos 1 y 2, antes y después de la suplementación.....	125
Figura 35 - Valores promedios de Pi para los grupos 1 y 2, después de la suplementación.....	129
Figura 36 - Valores promedios de pH para los grupos 1 y 2, después de la suplementación.....	133
Figura 37 – Espectros e imágenes típicas de ¹ H-MRS / MRI, adquiridos antes del protocolo de ejercicio, y obtenidos del vóxel localizado en el músculo vasto medial (imágenes de la columna de la derecha), para tres sujetos con diferentes contenidos de IT (sujeto 1: IT bajo, hombre (línea de puntos); sujeto 2 IT intermedio, mujer (línea discontinua); sujeto 3: IT alto, hombre (línea continua). Los espectros muestran las resonancias de triglicérido extra (ET) e intracelular (IT): (a) (ET(-CH ₂ -)n; (c) ET(CH ₃); (b) IT(-CH ₂ -)n y (d) IT(CH ₃)	136

Figura 38 - Los espectros de $^1\text{H-MRS}$ presentan los componentes individuales y residuales de las resonancias triglicéridos extra (ET) e intracelulares (IT) para los sujetos 1 (A) y 3 (B) antes y después del protocolo del ejercicio	137
Figura 39 - Correlación positiva entre IT y ET muscular en los 14 sujetos examinados ($r=0,76$, $p<0,01$).....	138
Figura 40 A - Correlación negativa estadísticamente significativa ($r = - 0,57$, $p<0,05$) entre IT y el VO_2 max (A), y entre IT y el VO_2 medido en el umbral anaeróbico individual "lactate threshold" (LT) ($r = -0,73$, $p<0,01$) (B). Un sujeto no completó el test de tapiz rodante porque estaba lesionado ($n = 13$, A) y también hubo un problema técnico en el procesamiento de muestras sanguíneas para la cuantificación del lactato ($n=12$, B)	139
Figura 40 B - Correlación negativa estadísticamente significativa ($r = - 0,73$, $p<0,01$) entre IT y el VO_2 en el umbral anaeróbico individual. Un sujeto no completó el test de tapiz rodante porque estaba lesionado ($n = 13$, A) y también hubo un problema técnico en el procesamiento de muestras sanguíneas para la cuantificación del lactato ($n=12$, B).....	140
Figura 41 - Imágenes típicas de T_1 del vóxel localizado en el músculo vasto medial, del espectro de $^1\text{H-MRS}$, y la respuesta de la frecuencia cardiaca durante un test específico de fútbol de porteros (A), defensas (B), centrocampistas (C) y delanteros (D).....	144
Figura 42 - Correlación entre los niveles de triglicéridos extracelular (ET) en vasto medial de jugadores de fútbol medidos por $^1\text{H-MRS}$, y el porcentaje de grasa corporal (%BF) medidos por BODPOD	145
Figura 43 – Correlación positiva significativa entre las concentraciones de PCr y Pi ($r=0,631$, $p<0,0001$).....	147

Figura 44 – Medición del grosor de la capa de grasa subcutánea a partir de la imagen de MRI de la pierna de un jugador de fútbol	148
Figura 45 – Correlación entre la concentración calculada de ATP y el grueso promedio de panículo adiposo	149
Figura 46 - Correlación entre la concentración calculada de Pi y el grueso promedio de panículo adiposo	150
Figura 47 - Correlación entre la concentración calculada de PCr y el grueso promedio de panículo adiposo	150
Figura 48 – Correlación positiva significativa entre el grosor del panículo adiposo y el área del estándar en los espectros de ³¹ P-MRS de los futbolistas	151
Figura 49 A – Correlación entre los cocientes Pi/ATP y PCr/ATP antes del período de suplementación en los futbolistas	153
Figura 49 B – Correlación entre los cocientes Pi/ATP y PCr/ATP después del período de suplementación en los futbolistas	153
Figura 50 - Correlación entre los cocientes PCr/ATP y Pi/ATP en todos los atletas (fondistas / medio-fondistas y futbolistas)	156
Figura 51 - Correlación entre los cocientes PCr/ATP y Pi/ATP en todos los atletas (fondistas / medio-fondistas)	156
Figura 52 – Correlación entre triglicéridos intra- y extramusculares en todos los atletas (fondistas / medio-fondistas y futbolistas)	158

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Introducción a la resonancia magnética

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica espectroscópica de absorción en la cual el componente del átomo que absorbe la energía son los núcleos debido a la existencia de momento magnético en muchos de ellos. La naturaleza física de esta absorción magnética nuclear, las propiedades del fenómeno (desplazamiento químico, acoplamiento entre espines, etc.) y el desarrollo de toda una serie de refinamientos (espectroscopia bidimensional, supresión de la señal del solvente, etc.) hacen de esta metodología una herramienta potente para la identificación y determinación de estructuras moleculares. Esta capacidad, junto con la posibilidad de aplicarla al estudio del metabolismo de los sistemas vivos de manera no invasiva hacen que actualmente se haya convertido en una técnica de primer orden en el campo de la investigación biomédica.

Aunque los primeros datos sobre la resonancia magnética son de 1924, con las experiencias de Stern y Gerlach sobre el momento magnético del electrón, el fenómeno de la resonancia magnética nuclear fue observado experimentalmente por separado en 1946 por los grupos de Purcell (Harvard) y Bloch (Stanford), que recibieron el premio Nóbel de Física en 1952 por este descubrimiento. Inicialmente su uso se restringió al mundo de la Física para determinar cuidadosamente los momentos magnéticos de los núcleos. Esta situación cambió rápidamente cuando se descubrió que, para un mismo núcleo, la frecuencia de resonancia difería según el entorno electrónico, en compuestos químicos diferentes. Durante los siguientes 20 años se desarrolló la espectroscopia de RMN aplicada a la determinación de estructuras moleculares. Pero no fue hasta la década de los años 60 y 70, cuando la construcción de imanes más potentes, el desarrollo de los ordenadores y de los principios de obtención de imágenes por resonancia, la aplicación de la espectroscopia de pulsos y de la transformación de Fourier hicieron posible la construcción de máquinas con mayor sensibilidad, resolución y velocidad de procesamiento que posibilitaron para la RMN un papel relevante en los campos de la bioquímica, la biología y la medicina. Este papel se ha concretado en el desarrollo de las técnicas modernas de obtención de imágenes por RMN, utilizadas

rutinariamente en el diagnóstico médico, y de la espectroscopia “in vivo”. Ambas estrategias experimentales, que no han podido ser aplicadas en seres humanos hasta principios de la década de los 80, son complementarias y así, a la identificación anatómica que se puede hacer con las técnicas de obtención de imágenes por RMN se debe añadir la capacidad de la espectroscopia para el estudio del metabolismo celular “in vivo” y de forma no invasiva.

El desarrollo metodológico y técnico de la espectroscopia y su aplicación a los organismos vivos ha provocado la aparición de un gran número de trabajos en los que la RMN se ha utilizado para el estudio de todos los tipos de organismos, desde microorganismos hasta los mamíferos superiores, con todos los enfoques posibles (metabólicos, toxicológicos, fisiológicos, etc.). El nivel de sofisticación de estos trabajos evolucionó desde estudios “in vitro” hasta “in vivo” en seres humanos, que abrieron las puertas a las aplicaciones clínicas de la metodología. En resumen, el panorama de las aplicaciones en los organismos vivos se ha diversificado tanto que una recopilación de estas sería enciclopédica y poco clarificadora para introducir el tema de esta tesis.

Aparte de los trabajos pioneros realizados por MRS in vivo (Ackerman y col.,1980; Iles y col.,1982; Griffiths y col.,1983; Cady y col.,1983; Bottomley y col., 1985), las primeras aplicaciones significativas se realizaron sobre el músculo esquelético con ^{31}P , por lo que estuvieron restringidas al estudio del metabolismo energético (Chance y col., 1986). El desarrollo de la técnica permitió ampliar las investigaciones sobre el metabolismo tisular “in vivo” a otros núcleos, principalmente ^1H y ^{13}C , así como a otros tejidos: músculo cardíaco, cerebro, hígado, riñón, mama y próstata (Behar y col., 1983; Luyten y Hollander, 1986; Kurhanewicz y col., 1991; Kemp y Radda, 1994; Bottomley, 1994; Ross y Michaelis, 1994). En cuanto a sus aplicaciones en oncología, se concentraron inicialmente en el uso de la espectroscopia de ^{31}P (Griffiths y col.,1983; Evanochko y col., 1984; Daly y Cohen, 1989; Glickson, 1989) extendiéndose después al ^1H , al ^{19}F y más recientemente al ^{13}C , con abundancia natural o mediante compuestos enriquecidos (Negendank, 1992; Beckmann,1992), aunque se han realizado también estudios con otros núcleos (^{23}Na , ^{15}N , etc.) A la publicación de los primeros espectros de tumores cerebrales humanos a mediados de los ochenta (Oberhaensly, 1986; Bruhm y col., 1989), han seguido numerosísimos trabajos

que demuestran el gran interés de la comunidad científica en las aplicaciones de esta técnica no invasiva para el diagnóstico y seguimiento clínico del cáncer (Daly y Cohen, 1989; Howe y col., 1993; Ross y Michaelis, 1994; Semmler y col., 1996).

1.2. El fenómeno de la resonancia y la relajación

En esencia, la RMN se basa en el fenómeno de resonancia (absorción de energía) que se produce cuando sobre los núcleos de muchos elementos químicos (aquellos que tienen un número impar de protones o neutrones), como el ^1H , sometidos a un campo magnético, se aplica una radiación electromagnética (en realidad su componente magnético) de una frecuencia determinada (frecuencia de Larmor) que depende del núcleo considerado y del campo magnético externo. La frecuencia de la radiación aplicada cae dentro del rango de las radiofrecuencias (ondas de radio), por lo que se denomina pulso de radiofrecuencia.

Los núcleos de la muestra, que tienen sus momentos magnéticos orientados debido al campo magnético externo, producen una magnetización global macroscópica que, en ausencia de perturbación, está orientada en el mismo sentido que el campo magnético, desplazándose dicha magnetización en un ángulo determinado con respecto al campo magnético principal al aplicar el pulso de radiofrecuencia. Según la duración del pulso, el ángulo que se desplaza la magnetización de la muestra varía. Si este ángulo es de 90° (señal de RMN observable máxima) se habla de un pulso de 90° (figura 1).

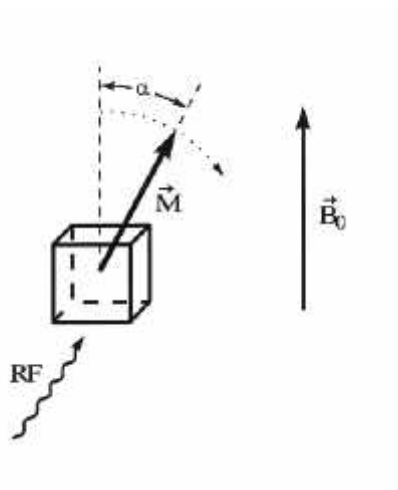


Figura 1 - Perturbación del vector magnetización al entrar en resonancia los núcleos de ^1H del elemento de volumen (vóxel) con las ondas de radiofrecuencia (RF) en presencia de un campo magnético externo. El ángulo α que se desplaza el vector magnetización depende de la duración del pulso de radiofrecuencia. Si $\alpha = 90^\circ$, se habla de un pulso de 90° (adaptado de Gili y Capdevila, 1992).

Generalmente no se emplea un único pulso para excitar la muestra, sino combinaciones de pulsos que permiten extraer información adicional sobre los núcleos excitados y su entorno o bien posibilitan la excitación selectiva de ciertos núcleos. En el caso de la MRI y MRS, las secuencias de pulsos se combinan con la aplicación de gradientes del campo magnético externo, con el fin de codificar la información o realizar la excitación selectiva de una porción determinada (vóxel) de las muestras. Una vez la radiofrecuencia deja de actuar tienen lugar procesos de relajación, caracterizados por dos constantes de tiempo, T1 y T2, durante los cuales la magnetización perturbada vuelve a la situación inicial produciendo simultáneamente una señal electromagnética que es recogida y amplificada y que constituye la llamada FID (Free Induction Decay), una senoide amortiguada formada por las frecuencias de resonancia de los núcleos de la muestra. La FID, mediante un artificio matemático, la transformada de Fourier, o mediante ajuste iterativo en el dominio del tiempo, produce el espectro de RMN clásico, absorción con respecto a la escala de frecuencia (normalmente en ppm, partes por millón del campo magnético principal con respecto a una referencia de posición, desplazamiento químico).

La RMN es un fenómeno muy versátil. No sólo podemos excitar selectivamente un tipo de núcleos del vóxel (o elemento del volumen), por ejemplo de ^1H o ^{31}P , aplicando la radiación de la frecuencia específica (63,86 MHz en el primer caso y 25,84 MHz en el segundo a 1,5 T), sino también y para un mismo núcleo, vóxeles distintos, gracias a la aplicación de gradientes magnéticos que hacen que la magnitud del campo magnético principal, y por lo tanto la frecuencia de resonancia, sea ligeramente diferente entre vóxeles (figura 2). En esta propiedad se basa la obtención de imágenes tomográficas y espectros de volúmenes localizados dentro de una muestra. Asimismo, núcleos idénticos pero que se encuentran en estructuras moleculares o entornos químicos diferentes presentarán ligeras desviaciones de su frecuencia de resonancia, del orden de partes por millón del campo magnético principal, debido a que el campo magnético efectivo al que se encuentran sometidos es ligeramente diferente del principal. Este fenómeno, denominado desplazamiento químico, posibilita su detección como señales separadas en el espectro.

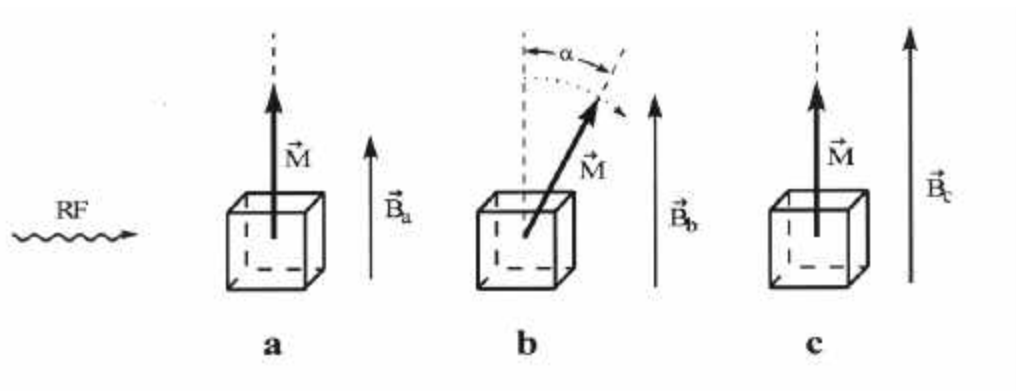


Figura 2 - Excitación selectiva de diferentes elementos de volumen en presencia de un gradiente de campo magnético. Los tres vóxeles a, b y c están sometidos a campos magnéticos ligeramente distintos, por lo que sus frecuencias de resonancia son ligeramente distintas. Al enviar el pulso selectivo de radiofrecuencia, tan sólo los núcleos del vóxel b entran en resonancia. M : vector magnetización, B_a , B_b y B_c : tres valores diferentes del campo magnético externo, RF: pulso de radiofrecuencia, α : ángulo que se desplaza el vector magnetización al aplicar RF (adaptado de Gili y Capdevila, 1992).

1.3. Espectroscopia de Resonancia Magnética (MRS)

La espectroscopia de RMN permite la detección e identificación, tanto in vitro como in vivo, de una amplia variedad de moléculas en diversos sistemas biológicos, desde fluidos corporales y extractos de tejidos hasta biopsias, cultivos celulares e incluso organismos vivos, al tratarse de una técnica no invasiva y no destructiva. Tiene, además, una gran versatilidad para el estudio de estos sistemas ya que, en función de las secuencias de pulsos aplicadas y los núcleos utilizados (^1H , ^{31}P , ^{13}C , ...) se puede obtener información cuantitativa acerca de un gran número de metabolitos así como información adicional referente a su entorno y movilidad (Gadian, 1995).

Según el núcleo observado se obtiene información diferente acerca de los metabolitos presentes. En resumen:

^{31}P : suministra información relacionada con el metabolismo energético de las células (Pi - fosfato inorgánico, PCr, ATP,ADP), el pH intracelular (a partir del desplazamiento químico del Pi) y el metabolismo de fosfolípidos (fosfomonoésteres, fosfodiésteres).

^1H : forma parte de prácticamente todas las moléculas de interés biológico, por lo que la información que puede suministrar se ve limitada tan sólo por la suficiente concentración y movilidad de éstas.

^{13}C : al igual que el ^1H , está ampliamente distribuido entre las moléculas de interés biológico, aunque su baja abundancia natural, de tan sólo el 1,1%, es un inconveniente para su detección. Sin embargo, posibilita el seguimiento de vías metabólicas mediante la administración de compuestos enriquecidos en este isótopo.

^{19}F : en su mayor parte se encuentra inmovilizado en estructuras sólidas por lo que es poco visible. En cambio, permite el seguimiento en el organismo de moléculas exógenas.

Otros : ^{23}Na (transporte de sodio), ^{15}N (metabolismo de compuestos nitrogenados), ^{17}O (perfusión), etc...

Metodológicamente, se pueden distinguir dos grandes variantes dentro del campo de la espectroscopia de RMN: la espectroscopia de alta resolución, realizada en imanes de alto campo (superior a 7 T) con disoluciones, muestras de tejido y incluso pequeños animales, y la MRS (ERM sería el correspondiente acrónimo en castellano, aunque en esta Tesis se ha preferido utilizar la versión inglesa para evitar confusiones),

término que se refiere a las aplicaciones de la RMN a sistemas vivos en imanes de bajo campo de 1,5 a 7 T, en particular a la espectroscopia localizada, mediante la cual se obtiene información espectral de una región definida del organismo examinado.

1.4. Evolución histórica de los estudios por RMN

Históricamente, el desarrollo del potencial de la espectroscopia de RMN para el estudio de los sistemas vivos estaba limitado por la tecnología disponible, de manera que se puede relacionar el tipo de experimentos biológicos realizado en cada momento mediante la espectroscopia de RMN con la consecución de logros tecnológicos concretos. De acuerdo con este criterio, se pueden definir las siguientes etapas con las cuales puede observarse la evolución de conocimientos y capacidades de la técnica hasta nuestros días:

1945-53 : esta etapa comprende el descubrimiento del fenómeno de la resonancia magnética nuclear y de sus propiedades en 1945. Desplazamiento químico en 1950 y acoplamiento escalar en 1951. Las aplicaciones a organismos vivos en esta etapa son mínimas (Shaw y Elksen estudiaron el contenido de agua de la patata con protón, citado en Gadian, 1995).

1953-64 : el desarrollo por Varian Inc. en 1953 del primer espectrómetro comercial abre las posibilidades a estudios de baja resolución con muestras biológicas sencillas. Cabe mencionar aquí los trabajos de Odeblad y Lindstrom en 1955, citado en Gadian, 1995, quienes obtuvieron espectros de protón de eritrocitos, músculo e hígado de rata y de fluidos humanos. El primer espectro de una proteína fue obtenido a partir de la Ribonucleasa A en 1957 por Saunders y col., citado en Gadian, 1995).

1964-80 : el desarrollo, por un lado, del primer espectrómetro con un imán superconductor por Varian Inc. en 1964, de campo más potente y estable que el de los imanes permanentes y electroimanes, mejor resolución espectral y un incremento de la sensibilidad de detección y de la espectroscopia de pulsos con transformación de Fourier en 1966 por Ernst y Anderson, supusieron un gran impacto en los estudios de la estructura de proteínas y de otras macromoléculas biológicas y del metabolismo de los sistemas vivos, aunque, en estos últimos, con menos fuerza. Algunos ejemplos de estudios con sistemas vivos los constituyen los primeros espectros de fósforo-31 de alta resolución de células intactas, obtenidos por Moon y Richards con eritrocitos en 1973, y de músculos diseccionados de mamífero (rata) y en anfibio (rana), que fueron descritos

respectivamente por Hoult y col., en 1974, y por Barany y col., en 1975 y 1976. A partir de estos trabajos se produjo una rápida expansión de estudios a otros tejidos y órganos de animales (corazón, riñón e hígado) utilizando ya sistemas de perfusión.

En 1971 Damadian sugirió la posible utilidad de la RMN en medicina mediante la medición de los valores del tiempo de relajación T1 y T2 de los protones del agua tisular. Paralelamente, en 1972 Lauterburg sentó las bases para el desarrollo de la obtención de imágenes, que en 1981 y sólo 9 años después, ya se utilizaban en aplicaciones clínicas en seres humanos. Por otro lado, en 1979 Ohsaka describió el primer espectro de alta resolución de fluidos biológicos humanos.

1980-84 : se produjo un importante salto cualitativo en este periodo: fue posible la aplicación realmente no invasiva de la espectroscopia de RMN. Ello fue debido a la construcción de imanes de campo elevado y diámetros amplios que permitieron introducir pequeños animales o seres humanos (la primera demostración de la obtención de imágenes y espectros a 1,5 T fue en 1982 por Bottomley y col. Trabajando en una máquina General Electric Inc., citado en Budinger, 1992), y también el desarrollo de la bobina de superficie en 1980 por Ackerman, que fue transferido rápidamente a estudios habituales “in vivo”, debido a su buena sensibilidad y facilidad de construcción. A pesar de ello, su utilización presenta importantes limitaciones como la dificultad para definir exactamente el volumen observado, hecho que puede dificultar el análisis cuantitativo, la observación tan sólo de regiones superficiales y la inevitable contaminación del volumen observado por otros tejidos (adiposo, muscular, piel, etc.) Debido a estas limitaciones, las aplicaciones clínicas de la MRS durante el periodo de 1980-84 se restringieron al estudio del metabolismo muscular y cerebral, siendo los casos más conocidos el diagnóstico de la enfermedad de McArdle (Ross y col., 1981). La mayoría de los estudios “in vivo” se aplicaron a modelos animales con enfoques fisiológicos y fisiopatológicos que afectaban a órganos superficiales, básicamente músculo, cerebro y tumores subcutáneos, utilizando el fósforo-31.

1984 - hasta la actualidad: además del perfeccionamiento de la obtención de imágenes mediante RMN, dos desarrollos metodológicos han ampliado aún más las posibilidades clínicas de la espectroscopia de resonancia. Por un lado, las secuencias de atenuación de la señal del agua permiten la obtención de espectros de protón de los metabolitos tisulares “in vivo” y, por otro, el desarrollo de las técnicas de localización

espacial que permiten seleccionar y obtener espectros de cualquier región de la muestra de interés dentro del imán, mediante el uso de gradientes pulsantes y excitación selectiva. Así, en este período ha sido posible la realización de gran cantidad de estudios con fósforo y protón en humanos utilizando esta técnica.

1.5. Estudio del metabolismo y fisiología muscular por ^{31}P -MRS

La mayor parte de las primeras aplicaciones de ^{31}P -MRS (espectroscopia de resonancia magnética de fósforo) se dedicaron al estudio de la bioenergética intracelular. Los metabolitos implicados en la producción ($\text{ADP} + \text{PCr} + \text{H}^+ \rightarrow \text{ATP} + \text{creatina}$) y utilización ($\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{P}_i + \text{energía}$) de energía, están relacionados en la reacción catalizada por la creatina quinasa. Asumiendo ciertas suposiciones, el equilibrio de esta reacción puede ser usado para estimar la concentración intracelular de ADP metabólicamente activo. Así, dicha concentración es directamente proporcional al cociente P_i/PCr (Chance y col., 1986). Por tanto, el grado de activación de la bioenergética muscular, anaeróbica y aeróbica, necesaria para realizar un trabajo dado se ha seguido históricamente por los cambios en el cociente P_i/PCr (o su inverso PCr/P_i). Debido a que la ^{31}P MRS proporciona una oportunidad para monitorizar esos metabolitos de manera continua y no destructiva, las teorías desarrolladas previamente mediante el análisis de biopsias “in vitro” se han podido validar mediante esta técnica.

El metabolismo oxidativo intramuscular ha sido estudiado utilizando un ejercicio progresivo durante el cual un estado metabólico constante (es decir, sustrato y oxígeno no son limitantes) es alcanzado en cada nivel de trabajo (Chance y col., 1981). Chance y col., (1986) determinaron que la relación entre nivel de trabajo y “coste energético” (expresado como P_i/PCr) podía ser analizada mediante una cinética hiperbólica de tipo Michaelis-Menten que representaría la función mitocondrial. La constante de equilibrio de la reacción catalizada por la creatina quinasa puede ser entonces usada para estimar la concentración citosólica de ADP metabólicamente activo mediante los cambios de la relación P_i/PCr a pH constante. Al principio, la porción lineal de la relación entre trabajo y P_i/PCr (o $[\text{ADP}]$) era similar a la observada en preparaciones de mitocondrias aisladas, proporcionando así evidencia “in vivo” de la regulación por parte de la concentración de ADP de la fosforilación oxidativa en el músculo esquelético mientras se realiza un trabajo de baja intensidad (Chance y col., 1981). En un estudio siguiente, se observó que la pendiente formada por el trabajo “versus” P_i/PCr se incrementaba en

los músculos entrenados con respecto a los no entrenados (Chance y col. 1986; Kent-Braun y col., 1990). En aquellos, la pendiente mayor reflejaba una mayor capacidad mitocondrial en el músculo para mantener el aumento progresivo de la demanda de ATP. La relación teórica entre trabajo y P_i/PCr fue también calculada en condiciones en las que el metabolito controlador no era únicamente ADP (oxígeno, P_i , NADH) (Chance y col., 1986; Kent-Braun y col., 1990).

Como resultado del trabajo inicial de Chance y col., (1986), este protocolo de ejercicio progresivo con estados metabólicos constantes ha sido ampliamente utilizado a continuación para evaluar la función del músculo y el metabolismo oxidativo en individuos sanos y poblaciones clínicamente alteradas. De hecho, comparando diferentes poblaciones o los mismos sujetos antes y después de una intervención, se necesitan ajustes para las diferencias en la fuerza muscular. Así, comparaciones de la cantidad de trabajo realizado requieren una normalización debida a las diferencias en la capacidad de desarrollar fuerza. Así, una persona con menor masa muscular que otra y que quiera trabajar a la misma potencia someterá a su músculo a una demanda metabólica relativamente mayor que el otro sujeto. Para poder comparar datos obtenidos de sujetos con distinta masa muscular, los cambios en la fuerza durante el ejercicio pueden ser expresados relativos a la fuerza (previa al ejercicio) de una contracción voluntaria máxima (MVC). Alternativamente, la fuerza realizada puede ser normalizada con respecto a un área muscular de una sección oblicua obtenida mediante MRI. Aunque esos ajustes no siempre se han hecho en el pasado, estudios futuros deberían contemplar enfoques parecidos para proporcionar una mejor interpretación de los resultados.

Otro estudio inicial importante llevó a cabo la comparación entre las concentraciones de metabolitos medidas a partir de biopsias y por ^{31}P -MRS (Wilkie y col., 1984). Se observó que, aunque la concentración total de $P_i + PCr$ medido en el músculo del antebrazo era similar con ambas técnicas, la concentración de P_i fue mayor y la de PCr menor en las biopsias que en las medidas realizadas por MRS. Los autores sugirieron que esta diferencia era debida a la hidrólisis de PCr durante el tiempo que se tardaba en congelar la muestra y/o durante el tiempo de extracción líquida antes de la desproteinización. Por lo tanto, la estimación de las concentraciones de metabolitos realizada por MRS puede ser más correcta por esta razón en muchos casos. Esos

investigadores también analizaron la influencia de la concentración de ADP como regulador principal del flujo glucolítico mediante estudios “in vivo” para medir los efectos independientes de la isquemia y de la contracción muscular en PCr, P_i y pH. Durante el ejercicio, había una disminución significativa en los niveles de PCr (y por ello un aumento de los de ADP) y pH intracelular. En cambio, bajo condiciones isquémicas sin ejercicio, se encontraba una disminución de PCr y un ligero aumento en el pH. La falta de disminución en el pH en condiciones de isquemia, indicaba que no se produjo activación glucolítica significativa. Así, los aumentos en la concentración de ADP y P_i durante la isquemia fueron insuficientes para activar el flujo glucolítico. Estos resultados han sido confirmados recientemente en el músculo tibialis (Quistorff y col., 1992). Después de un ejercicio de alta intensidad (70-90% MVC), la recuperación de PCr, P_i , pH, y de la concentración calculada de ADP se retrasó hasta que el puño fue relajado. Los autores concluyeron que, a pesar de la presencia de fuertes estimuladores metabólicos de la glucólisis (P_i , ADP), glucólisis y glucogenolisis no se activaron bajo condiciones isquémicas. Así, dichos estudios sugirieron que el proceso contráctil por sí mismo posiblemente el aumento de la concentración de calcio citosólico, mas que el estado metabólico del músculo, regulan el flujo glucolítico.

Otro aspecto estudiado ha sido el efecto que tiene la disminución del flujo sanguíneo en los cambios de los niveles de P_i , PCr y pH que ocurren durante un ejercicio de flexión de la muñeca (Wiener y col., 1986). Dicho estudio se realizó en voluntarios control con los que se llevó a cabo un protocolo de ejercicio continuo con o sin oclusión parcial del flujo de sangre. Una reducción (40-60%) del flujo sanguíneo provoca un aumento de la relación P_i /PCr y una disminución del pH para cada nivel de trabajo en esos individuos, lo que es compatible con una limitación del aporte de oxígeno en esas condiciones. Estos resultados demostraron que utilizando MRS se puede detectar hipoperfusión durante el ejercicio, lo que la convierte en una herramienta clínica útil para el estudio de enfermedades vasculares periféricas.

Por otro lado, se ha llevado también a cabo una estimación del coste metabólico de producción de fuerza (Boska, 1991). Se utilizó para ello el grupo de músculos gastrocnemius/soleus durante un ejercicio de flexión plantar isométrica máxima y con una alta resolución temporal (1-8 s). Se midió el área de una sección oblicua de músculo utilizando imágenes de resonancia magnética (MRI). La cantidad de ATP

producida en la reacción de la creatina quinasa fue estimada a partir de la disminución de PCr al comienzo del ejercicio; la producción de ATP mediante la fosforilación oxidativa fue estimada a partir de la cantidad inicial de PCr recuperada por unidad de tiempo después del ejercicio y la producción de ATP por la glucólisis anaerobia se estimó a partir de los cambios en el pH (asumiendo la capacidad tamponante; la citosólica más la debida a la hidrólisis de PCr; y la producción de H^+ por unidad de ATP transferida). A pesar de la falta de información en el estudio sobre la porción de masa muscular que contribuye a la producción de fuerza relativa al volumen muscular total, este trabajo refleja el potencial de ^{31}P -MRS para entender el rol relativo de las diferentes reacciones que producen ATP durante el trabajo muscular.

También se estimó la utilización de ATP en el músculo flexor de la muñeca en situación de isquemia y ejercicio mediante electroestimulación, condiciones durante las cuales el pH no sufrió disminución alguna (Blei y col., 1993). Tanto la degradación de PCr como su resíntesis mostraron una cinética mono-exponencial. Debido a que la resíntesis de PCr después del ejercicio se lleva a cabo principalmente mediante fosforilación oxidativa, las cantidades máximas de ATP obtenidas a partir de ésta fueron calculadas a partir de la recuperación de los valores de PCr después del cese de ejercicio. Estos resultados demostraron la viabilidad de la valoración cuantitativa no invasiva de la capacidad oxidativa muscular. La producción, salida y capacidad de tamponamiento de H^+ durante el ejercicio y durante la recuperación han sido estudiadas utilizando ^{31}P -MRS. Comparando la recuperación de PCr y del pH en individuos sanos y la concentración de ATP durante el ejercicio isquémico en individuos que padecen la enfermedad de McArdle, Kemp y col., (1993) fueron capaces de estimar una capacidad tamponante intramuscular efectiva de 20-30 mmol/litro. Los autores usaron más tarde esta estimación para calcular la producción de ATP y el flujo de salida de H^+ durante el ejercicio y durante la recuperación. Los resultados de este análisis sugirieron que la cantidad de ATP producida está asociada a la concentración de P_i y el flujo de salida de H^+ del músculo es pH-dependiente.

En resumen, la ^{31}P -MRS ha demostrado ser útil para la investigación no invasiva de la relación entre actividad muscular y el suministro de energía necesario para mantenerla. Cuantificando las alteraciones temporales de cada parámetro metabólico

medible por RMN puede deducirse la naturaleza de la relación entre trabajo realizado y rutas metabólicas activadas para suministrar la energía consumida.

1.6. Estudio de la fisiología muscular por ^1H -MRS

Los métodos de resonancia magnética (MR) se utilizan cada vez más para investigar la fisiología del músculo humano. Aunque la imagen de MR (MRI) revela la morfología de los músculos con gran detalle, como por ejemplo, para determinar el volumen del músculo y la orientación de sus fibras, la espectroscopia de MR (MRS) proporciona información acerca de la composición química del tejido. Dependiendo del núcleo observado, la MRS permite la observación de metabolitos fosforilados implicados en la bioenergética muscular (^{31}P -MRS), glucógeno (^{13}C -MRS), o lípidos intramiocelulares (^1H -MRS), por citar sólo algunos ejemplos. La ^1H -MRS de músculo esquelético requiere técnicas especiales porque los núcleos ^1H en agua o en tejido adiposo están más concentrados que cualquier otro metabolito del tejido humano. La fuerte señal procedente del agua puede suprimirse mediante prepulsos especiales, mientras que las grandes señales de la grasa en el tejido adiposo pueden evitarse seleccionando cuidadosamente la región de interés. Hasta hace poco, se presumía que sólo unos pocos metabolitos podrían ser visibles bajo las grandes resonancias del agua y la grasa subcutánea. Sin embargo, está claro que actualmente el espectro ^1H -MR del músculo humano proporciona información de interés estructural y metabólico. La determinación de lípidos intramiocelulares (IT) por ^1H -MRS se inició a través de la observación de dos compartimentos de triglicéridos (TG) con una variación de frecuencia de resonancia de aproximadamente 0.2 ppm (Schick y col., 1993; Boesch y col., 1997). Las dos resonancias pueden ser atribuidas a protones de ácidos grasos de TG en adipocitos, y a TG citosólicos de células musculares (IT). Los exámenes de ^1H -MRS no son invasivos y, por lo tanto, pueden repetirse muchas veces con una alta resolución temporal.

Una comparación de distintos métodos para establecer niveles de IT, incluyendo MRS, análisis químico y morfometría, reveló una correlación satisfactoria entre ellos y una mayor correlación de MRS con la media de los tres métodos. La observación de IT mediante ^1H -MRS es extremadamente prometedora, pero varias limitaciones metodológicas y otras dificultades deben ser consideradas (Boech y Kreis, 2000).

Los lípidos extramiocelulares (ET) se definen como porciones más o menos compactas de tejido adiposo en capas subcutáneas, mientras que los lípidos

intramiocelulares (IT) se almacenan en gotitas esferoides en el interior del citoplasma de células musculares en contacto con la mitocondria. La orientación de estos dos grupos de lípidos con respecto al campo magnético principal B_0 conduce a características distintas de MR, concretamente, de la susceptibilidad magnética de la muestra considerada, que pueden ser utilizadas para separar dichos grupos. Otros lípidos, tales como los fosfolípidos que forman parte de membranas, apenas son visibles por los métodos MR utilizados en este contexto.

Schick y col., (1993) observaron dos resonancias distintas de lípidos en músculo humano con una variación de frecuencia de resonancia de 0.2 ppm. Los autores asignaron, inicialmente, la resonancia de 1.5 ppm a lípidos de células grasas e hipotetizaron que la resonancia de 1.3 ppm podría ser atribuida a lípidos del interior (en el citoplasma) de células musculares. Esta asignación fue verificada por Boesch y col., (1997) basándose, (a) en la posición orientación-dependiente de la resonancia ET, y (b) en los cambios de intensidad de la señal de ET con la posición y el tamaño de la mínima porción tridimensional distinguible o vóxel. Los niveles de IT uniformemente distribuidos aumentaban linealmente con el tamaño del voxel, como lo hacen las señales de agua y creatina. Por otro lado, las señales de ET aumentaban drásticamente a medida que los voxeles aumentaban de tamaño y comenzaban a englobar partes del tejido adiposo, porque el nivel de ET en tejido adiposo es unas 200 veces más concentrado que el nivel de IT en tejido muscular (por kg de peso fresco).

$^1\text{H-MRS}$ tiene la capacidad de sustituir las biopsias para determinaciones consecutivos de IT; sin embargo, la biopsia todavía tiene la ventaja de que otros métodos, tales como los de biología molecular, puedan ser aplicados a la muestra. Se puede demostrar que los niveles de IT (expresados en mmol/kg peso húmedo y % volumen) son específicos del músculo y varían con la dieta y la actividad física.

1.7. Bioenergética muscular

La comprensión de la regulación en la transferencia de la energía química entre lugares de producción y consumo en las células musculares es uno de los campos de la bioenergética en que se trabaja intensamente en los últimos años, no solamente para facilitar la mejor comprensión de algunas patologías, sino también por su aplicación en la medicina deportiva.

La evolución y la diferenciación de los tejidos puede ejemplificarse en la especialización y organización celular del músculo de mamífero. Cada tipo de célula (fibra) muscular está genéticamente predeterminada para unas características morfológicas y bioquímicas que son las que mejor sustentan una determinada función celular. Sin embargo, siempre hay un margen para la adaptación fenotípica y estos parámetros pueden ser modificados de acuerdo con factores ambientales y también según las necesidades corporales (cambios hormonales, ejercicio, hipoquinesia).

La compartimentalización de las enzimas implicadas en la producción de energía, en el transporte de ésta y en su utilización parece ser características de esa alta organización en las células de los mamíferos. Las células musculares representan un modelo de células en que la demanda energética es muy variable, y por eso esas células disponen de diferentes vías metabólicas para obtener energía.

1.8. Bases metabólicas de la fatiga

La fatiga muscular puede definirse como la incapacidad del músculo para mantener una potencia determinada (Edwards, 1981). Es un hecho cotidiano que el ejercicio causa agotamiento y que algunos individuos quedan exhaustos antes que otros. Las bases moleculares de dicha fatiga han ocupado las mentes de muchos fisiólogos y bioquímicos del ejercicio durante gran número de años. Uno de los problemas que aparece al investigar la fatiga es su complejidad, debido a la implicación de factores tanto psicológicos como bioquímicos.

La fatiga periférica se debe a un fallo o limitación de uno o más procesos en la unidad motora, es decir, en las neuronas motoras, nervios periféricos, uniones neuromusculares o fibras musculares (Edwards, 1981). Aunque cada uno de estos procesos puede ser limitante en condiciones diferentes, el presente análisis se limita a la fatiga debida a procesos metabólicos en el músculo. La fatiga se puede demostrar en preparaciones de músculo aislado cuando no hay alteración de la función de la función de los nervios motores, uniones neuromusculares o propagación del potencial de acción a través del músculo, por lo que debe ser una consecuencia del metabolismo muscular. Edwards (1981) propone que la acumulación de protones y el descenso consiguiente del pH en el músculo durante un esfuerzo de alta intensidad es responsable de la fatiga. La cinética de aparición de la fatiga durante dicho tipo de ejercicio muestra un desarrollo temporal parecido al observado durante las contracciones isométricas, es decir cuando la

tensión se mantiene sin acortamiento del músculo; esto ocurre, por ejemplo cuando se carga con una maleta muy pesada. En estos dos tipos de actividad la energía se obtiene de modo anaerobio a través de degradación de fosfocreatina y conversión de glucógeno en lactato. La contracción isométrica depende del metabolismo anaerobio, porque una fuerza de contracción superior al 30% del máximo causa compresión de los vasos sanguíneos del músculo, haciendo que el flujo sanguíneo disminuya notablemente, lo que significa que el músculo se hace isquémico (Edwards y col., 1972A). La concentración de lactato en el músculo aumenta y puede llegar hasta 30 mM tanto en un ejercicio dinámico de alta intensidad como en la contracción isométrica severa. Además del lactato, se produce también una acumulación de protones durante tal tipo de ejercicios, ya que la glucólisis anaeróbica produce protones y lactato. El pH intramuscular puede disminuir desde un valor alrededor de 7,0 en reposo hasta 6,5 o 6,4, en el “sprint” experimental a la vez que el pH sanguíneo pasa de 7,4 a 6,8 o 6,9 (Sahlin, 1978). Estos cambios de pH ocurren a pesar de que parte de los protones producidos se neutralizan intra y extracelularmente por sistemas tampón como las proteínas intracelulares y el sistema ácido carbónico / bicarbonato. Se piensa a menudo que el ion lactato es responsable de la fatiga, pero no parece ser así; de hecho, el músculo puede seguir contrayéndose a alta potencia en presencia de una concentración alta de lactato siempre y cuando el pH se mantenga próximo a 7,0. La acumulación intracelular de protones podría ser la verdadera causa de la fatiga, puesto que se ha demostrado en preparaciones de músculo esquelético aislado que la potencia disminuye a pH inferior a 7,0 (Hermansen, 1979). Se ha observado que el descenso de pH citosólico provoca un aumento de la capacidad del retículo sarcoplasmático para retener Ca^{2+} , por lo que se liberaría menor cantidad del catión al sarcoplasma por estimulación eléctrica del músculo, reduciéndose en consecuencia la estimulación del proceso contráctil (Nakamura y Schwartz, 1972). Alternativamente, o adicionalmente, una caída de pH podría interferir en la interacción de la miosina y la actina (reduciendo, por ejemplo, la actividad de la miosina ATPasa, Strojnik y Komi, 2000). Parece que existe un efecto directo del pH sobre el aparato contráctil, puesto que se ha observado en miofibrillas aisladas y desprovistas de membranas plasmáticas (fibras desnudas) que la tensión máxima que podía alcanzarse tras la adición de Ca^{2+} era menor a pH 6,5 que a pH 7,0 (Donaldson y col., 1978).

Alteraciones del pH han sido reconocidas como mediadoras en la producción de la fatiga en ejercicios de alta intensidad, aunque existen situaciones de fatiga sin descenso del pH. Además el pH se recupera más despacio que el gradiente electroquímico para K^+ o Na^+ y está relacionado con la activación del cotransportador láctico/ H^+ (Terrados y Fernández, 1997).

Una explicación diferente se basa en las propiedades de la enzima glucolítica fosfofructoquinasa. Una propiedad crucial de su posible regulación “in vivo” es que la inhibición de la actividad de esta enzima por ATP “in vitro” aumenta notablemente a pH inferior a 7,0. Se ha propuesto, por tanto, que la caída del pH intracelular “in vivo” da lugar a una inhibición de la fosfofructoquinasa que determina una disminución severa del flujo glucolítico y de su velocidad de producción de ATP. En consecuencia, se ha sugerido que la fatiga podría deberse al agotamiento del ATP muscular, que impediría que la ATPasa miofibrilar actuara correctamente debido a la falta de sustrato. Esta explicación presenta dos problemas: en primer lugar, la concentración de ATP en el músculo fatigado baja sólo hasta cerca de 3mM (Sahlin y col.,1978; Hermansen, 1981), lo que es suficiente para saturar la ATPasa miofibrilar (la K_m de la ATPasa miofibrilar para el ATP es del orden de 0,1 mM); en segundo lugar, hay otros procesos dependientes de ATP que siguen funcionando en el músculo fatigado (transporte de iones, por ejemplo). Algunos autores especulan acerca de la existencia de un mecanismo de control alostérico de la ATPasa miofibrilar que dependa de la relación de concentraciones ATP/ADP de manera parecida a lo que ocurre en el control de la actividad fosfofructoquinasa. Pequeños cambios de la concentración de ATP podrían reducir de esta manera la actividad contráctil, apareciendo entonces la fatiga. Tal mecanismo podría servir como un sistema de seguridad para impedir un agotamiento total de ATP y, consiguientemente, la muerte celular.

No parece probable, sin embargo, que la fatiga metabólica sea un factor limitante en el “sprint” corto (100 m, por ejemplo). Las limitaciones mayores en esta situación son probablemente la masa de músculo, la coordinación del ciclo contracción / relajación entre las fibras en un músculo determinado y una velocidad suficiente de reciclaje de sustrato para proporcionar una sensibilidad adecuada al incremento masivo de la velocidad de glucólisis durante el período de aceleración. Sin embargo, en el “sprint” de 200 m, y en especial, en el de 400 m, la activación de la glucólisis tiene

lugar durante un tiempo suficiente como para causar un fuerte descenso del pH muscular. Esto lleva a suponer que la capacidad de tamponamiento de las variaciones del pH en los músculos de los corredores de “sprint” de 400 m en la categoría de elite debe ser especialmente alta.

Por otra parte, la fatiga en el ejercicio de fondo puede deberse también a una disminución notable de la velocidad de la glucólisis, aunque no haya acidificación celular. Teniendo en cuenta las consideraciones citadas, parece que el corredor de maratón (e incluso otros atletas de pista que dependen del metabolismo aeróbico) debe oxidar tanto carbohidratos como ácidos grasos para obtener energía a una velocidad suficiente a fin de satisfacer los requerimientos del músculo. La fatiga aparecerá cuando las reservas de carbohidratos se hayan agotado.

En el componente de la fatiga que afectaría al sarcolema existiría un fallo en el funcionamiento de la membrana producido por las alteraciones del gradiente electroquímico normal, perdiendo el interior de la célula la polarización fisiológica. Fundamentalmente, existe una salida de K^+ y entrada de Na^+ , ocasionando una disminución del K^+ intracelular (K_i^+) y por tanto causando una alteración del potencial de reposo de membrana. La recuperación de la actividad normal del sarcolema es concomitante al proceso de recuperación del K_i^+ . Además, se ha demostrado que la bomba Na^+/K^+ está inhibida durante el proceso de fatiga lo que magnifica los efectos de los flujos de Na^+ y K^+ causados por los potenciales de acción. El flujo de pérdida de K_i^+ es tres veces mayor que el de aumento de Na_i^+ , debido a un aumento de la conductancia del sarcolema para el K^+ (modulada por el aumento de Ca^{2+}_i y por la disminución de ATP citosólico).

En resumen, la modulación del gradiente electroquímico transmembrana en el sarcolema puede afectar a la transmisión del potencial de acción en el músculo y por tanto, a la frecuencia de la contracción.

En 1986, Taylor y col. publicaron uno de los primeros estudios sobre fatiga muscular usando ^{31}P MRS. El objetivo de este estudio fue determinar el posible efecto de la disminución de ATP durante la fatiga, producido por un ejercicio de intensidad entre media y alta en el antebrazo. El ejercicio de alta intensidad produjo un gran cambio en el metabolismo intramuscular; el nivel de PCr disminuía más del 80% con respecto al valor de reposo y el pH disminuía por debajo de 6,2. Además, en esas

condiciones extremas, también se observó una reducción en los niveles de ATP. La recuperación de los niveles de PCr, P_i y pH fue más lenta después del ejercicio de alta intensidad que en el de moderada y la recuperación de ATP fue más lenta que el resto de metabolitos. Esos resultados fueron interpretados como indicativos de que un ejercicio intenso tenía efectos metabólicos asociados a una recuperación lenta.

La relación entre fatiga muscular y metabolismo ha sido estudiada mediante ^{31}P -MRS en varios protocolos de ejercicio. Wilson y col., (1988) observaron una clara relación lineal entre fatiga y el incremento de fosfato monovalente (H_2PO_4^-) durante la realización de contracciones máximas en el músculo flexor de la muñeca de voluntarios sanos. La realización de diferentes protocolos de ejercicio evidenció que la relación entre H_2PO_4^- y fatiga fue más clara y consistente que la relación entre pH y fatiga. En un estudio diferente, el ejercicio isométrico intermitente del músculo abductor polliaris produjo más cambios graduales en los metabolitos y en la fuerza que el ejercicio continuo (Miller y col., 1988). Sin embargo, durante la realización de ambos tipos de ejercicio, la fuerza desarrollada correlacionaba mejor con la concentración de H^+ y H_2PO_4^- que con la concentración de PCr o P_i . Por tanto, los autores concluyeron que H^+ (pH_i) y H_2PO_4^- podrían tener un papel importante en el desarrollo de la fatiga muscular. Estudios posteriores demostraron un resultado similar en un paquete muscular menos fatigable, el tibialis anterior (Wiener y col., 1990). Cady y col. (1989 a y b) publicaron una relación lineal entre H_2PO_4^- y fatiga, en este caso en el primer músculo dorsal ínter-óseo de sujetos sanos. En cambio, no encontraron ninguna relación entre los mismos parámetros en individuos que padecían de una deficiencia en la glicógeno fosforilasa, no pudiendo así utilizar el glucógeno muscular. Esos investigadores notaron una disociación entre fatiga y pH, particularmente durante el período de recuperación, en los sujetos deficientes. En un estudio paralelo, aportaron evidencias que este componente pH-independiente de la fatiga puede estar relacionado con el retardo de la recuperación de la fuerza observada durante la fatiga, como se sugirió por un 50% de retraso en la recuperación del músculo fatigado a la vez que el pH no fue modificado.

En resumen, todos esos estudios sugieren que la fatiga muscular desarrollada durante el ejercicio intenso podría ser debida en parte a una acumulación de subproductos metabólicos.

Sin embargo, en un estudio de ejercicio fatigante a diferentes niveles de fuerza sub-máxima no se encontró una fuerte relación entre la fatiga del abductor pollias y alteraciones en la concentración de metabolitos intracelulares medibles por ^{31}P -MRS (Newham y Cady, 1990). Una observación similar a ésta fue hecha en el músculo gastrocnemius utilizando un protocolo de ejercicio progresivo hasta llegar a la fatiga (Wong y col., 1990). En cambio otro grupo de investigadores fue capaz de detectar mediante ^{31}P -MRS una relación no lineal entre la fatiga del flexor plantar y la concentración de H^+ , P_i y H_2PO_4^- al comienzo del ejercicio (DeGroot y col., 1993) Así, cabe resumir que los estudios realizados a niveles de fuerza submáxima no permiten registrar una asociación entre fatiga y metabolismo intramuscular en todos los casos investigados.

Baker y col., (1993) investigaron el rol de factores metabólicos y no metabólicos en la fatiga inducida por dos tipos distintos de ejercicio. Así, los sujetos realizaron bien contracción voluntaria máxima (MVC) constante o bien contracción voluntaria máxima de los dorsi flexores del tobillo durante dos minutos seguidos y MVC intermitentes durante 15-20 min., observándose que llegaban a niveles similares de fatiga. El protocolo MVC constante estaba asociado a un incremento significativo de P_i , mientras que durante el protocolo intermitente el incremento de P_i fue mucho menor, así como en la velocidad de recuperación de la fuerza máxima después del protocolo fatigante .

Esos resultados permitieron deducir que si se puede llegar a la fatiga por los dos protocolos, y en uno el P_i aumenta y en el otro no, entonces, el aumento de P_i (efecto metabólico) no parece correlacionar con la aparición de la fatiga.

En un estudio siguiente, Baker y col., 1992, de los efectos de la longitud del músculo en el uso de la energía en un ejercicio de dorsoflexión, los mismos investigadores observaron una mejor relación entre fatiga y ambos, P_i y H_2PO_4^- , que entre fatiga y longitud del músculo. Finalmente, esos investigadores observaron un importante componente metabólico en la fatiga durante un ejercicio submáximo pero muy rápido, contracciones isométricas de los dorsiflexores, durante el tiempo en el que se daba un retardo en el fuerza desarrollada voluntariamente (Miller y col., 1993).

En resumen, una serie de estudios de ^{31}P -MRS sobre la fatiga muscular sugieren un rol de la inhibición metabólica del proceso contráctil en el desarrollo de la fatiga durante algunos tipos de ejercicio. En general, parece que la fatiga durante un ejercicio

de alta intensidad es más probable que esté asociado a cambios en algunos metabolitos, mientras que la fatiga durante un ejercicio de intensidad submáxima podría tener una procedencia no directamente metabólica tal como un deterioro de la activación muscular (acoplamiento excitación-contracción).

De eso podríamos deducir que un protocolo de ejercicio dinámico casi fatigante debería producir cambios en metabolitos detectables por ^{31}P -MRS en relación al acercamiento a la fatiga.

1.9. Metabolismo muscular de los triglicéridos

Aunque el metabolismo de los triglicéridos en tejido adiposo y su regulación se ha estudiado en detalle a lo largo de los años, el conocimiento de la regulación del metabolismo de triglicéridos (TG) en músculo es muy limitado. Sorprendentemente, ni siquiera se ha identificado con seguridad la enzima responsable de la hidrólisis de TG. Así, en músculo esquelético de rata se han encontrado tres lipasas de triglicéridos (TGL), cada una de ellas con actividad óptima a un pH determinado: 5.0, 7.0 y 8.5. Dichas lipasas se conocen como lipasa ácida, neutra y alcalina, respectivamente. La lipasa alcalina se identificó como lipoproteinlipasa (Strohfeltd y Heugel, 1984). Se ha sugerido que, en el músculo, esta TGL alcalina sirve, principalmente, para catalizar la liberación de ácidos grasos de TG circulantes. La TGL neutra, probablemente bajo control hormonal e influenciada por el sistema adrenérgico, podría ser la enzima responsable de la lipólisis intramuscular (Gorski, 1990). Sin embargo, la información acerca del papel de esta lipasa en el músculo es muy escasa.

La regulación de las lipasas intramusculares se ha estudiado de modo indirecto. Así, en humanos, al infundir norepinefrina, se observó una reducción significativa en el contenido de triglicéridos intramusculares (IT) (Froberg y col., 1975). Además, la estimulación de receptores β -adrenérgicos con isoproterenol en diafragma de rata aumentó la lipólisis “in vitro” y este aumento se evitaba parcialmente con la adición de insulina al medio de incubación (Abumrad y col., 1978). Se descubrió, también, que la administración de propanolol a ratas antes de un ejercicio de natación evitaba la disminución de triglicéridos, indicando que el bloqueo del receptor β -adrenérgico efectivamente inhibe la degradación de IT durante el ejercicio (Stankiewicz-Choroszucha y Gorski, 1978). En corazón aislado y perfundido, al tratar con epinefrina, la liberación de glicerol aumentaba (Williamson, 1964). Esto puede indicar que, al igual

que en el tejido adiposo, la lipólisis cardiaca es mediada, al menos parcialmente, por la clásica cascada regulada por el cAMP. Cleroux y col. 1989 mostraron que la lipólisis de triacilglicerol en músculo está mediada por receptores adrenérgicos de tipo β_2 . Así, en individuos que realizaban ejercicio prolongado hasta el agotamiento, el consumo de triacilglicerol por parte del músculo era completamente inhibido por nadolol, un β -bloqueante no selectivo, mientras que permanecía invariable con atenolol, un β_1 -bloqueante selectivo. Estas observaciones en músculo esquelético tienen, indirectamente, un soporte en estudios que muestran que la lipólisis muscular de triacilglicerol se produce, principalmente, en fibras de contracción lenta (Stankiewicz-Choroszucha y Gorski, 1978; Spriet y col. 1986), las cuales tienen una mayor densidad de β_2 -adrenoceptores (Williams y col. 1984). Debido a que los resultados indicaban que la lipólisis extramuscular disminuía al mismo nivel con el bloqueo de β_1 -adrenoceptores que $\beta_1+\beta_2$ adrenoceptores, se concluyó que la lipólisis del tejido adiposo sólo está parcialmente controlada por el sistema adrenérgico y principalmente a través de β_1 -adrenoceptores, mientras que el consumo de triglicéridos por parte del músculo esquelético parecer estar controlada por el sistema adrenérgico a través de β_2 -adrenoceptores (Cleroux y col., 1989). Sin embargo, todavía no está claro cuánto contribuyen los β_1 , β_2 y β_3 -adrenoceptores a la lipólisis en el músculo esquelético. También hay evidencias de que la lipólisis muscular y la degradación de IT pueden estar influenciadas por la estimulación directa del nervio ciático (Spriet y col., 1986) o tras la estimulación directa de un músculo con electrodos (Hopp y Palmer, 1990 a y b), indicando que otros factores además de la estimulación adrenérgica (por ejemplo mecanismos locales) pueden jugar un papel en la regulación de la lipólisis intramuscular. Gorski y col., (1990) hipotetizaron que el Ca^{2+} puede ser un candidato para ejercer un efecto estimulante local sobre las lipasas de TG a nivel endógeno.

Estudios con ácidos grasos marcados con ^{14}C , para cuantificar la síntesis y degradación de los mismos, indicaron que los TG del músculo se utilizaban durante el ejercicio (Havel, 1967 y Hagenfeldt y Wahren, 1968). Estos estudios revelaron que, durante el ejercicio submáximo (60-120 min), los ácidos grasos del plasma contribuían solamente el 50% de la oxidación total de ácidos grasos, por lo que el resto debía proceder de otras fuentes de grasa, probablemente de triacilgliceroles intramusculares. Se estudiaron, mediante microscopía electrónica, las gotículas de triglicéridos en el

músculo antes y después del ejercicio (Oberholzer y col., 1976). El tamaño de las gotículas era más pequeño después del ejercicio sugiriendo que había existido liberación de ácidos grasos de los TG contenidos en dichas gotículas para su oxidación mitocondrial (Oberholzer y col., 1976). Estudios realizados con biopsias musculares indicaron que el contenido de TG en el músculo disminuía durante el ejercicio (Froberg, 1971; Reitman y col. 1973; Brouns y col. 1989; Essen-Gustavsson y Tesh, 1990). Sin embargo, otros estudios del mismo tipo no llegaron a encontrar diferencias en el contenido en TG de biopsias musculares pre- y post-ejercicio (Gollnick y col. 1969; Jansson y Kaijser, 1987). Parte de la inconsistencia de estos resultados puede explicarse por la técnica de biopsia muscular aplicada. La biopsia muscular, normalmente 50-150 mg de peso fresco, representa sólo una pequeña parte del músculo estudiado, por lo que podría no ser representativa del almacenamiento promedio de TG del músculo. Los TG no se almacenan de modo homogéneo en los compartimentos musculares y, como se mencionaba anteriormente, los diferentes tipos de fibras musculares poseen distinto contenido en TG (Saltin y Gollnick, 1983). Las biopsias musculares pueden constituir un problema, especialmente en el caso de humanos, dado que las biopsias pre y post ejercicio normalmente tienen una composición ligeramente distinta en el tipo de fibras. Wendling y col., (1996) mostraron, recientemente, que medidas repetidas de TG en biopsias musculares daban lugar a una gran variabilidad, con coeficientes de variación entre 20-26%. Esto sugiere que sólo se pueden detectar los cambios en IT superiores al 24%. Además, para cuantificar exactamente la utilización de triacilglicerol intramuscular, es muy importante que la grasa circundante se diseccione cuidadosamente antes del análisis del contenido de triacilglicerol. Si no se lleva a cabo esta disección completamente, el contenido de triacilglicerol medido será la suma de triacilgliceroles intramusculares y de adipocitos localizados entre las fibras musculares.

Se había estimado que la contribución de los TG musculares a la producción total de energía durante el ejercicio (65% $\text{VO}_2\text{máx}$) era del 15-35% (Hurley y col. 1986; Jansson y Kaijer, 1987). Se debe tener en cuenta, sin embargo, que esta contribución se calculó restando la entrada de ácidos grasos plasmáticos de la oxidación total de grasa, reflejando teóricamente esta diferencia los TG en el músculo, los TG localizados entre las fibras musculares y los que forman parte de las VLDL. Además, en ese estudio se asumió que la contribución de VLDL-TG a la producción de energía era despreciable.

Romjin y col. (1993) investigaron la contribución energética de distintos sustratos durante el ejercicio a tres intensidades distintas. La contribución de TG intramuscular fue del 7%, 26% y 8% durante el ejercicio al 25%, 65% y 85% de VO_2 máx., respectivamente. Esto sugiere que existe un punto óptimo en la utilización de TG intramuscular entre el 25% y el 85% de VO_2 máx. Además, los atletas fuertemente entrenados parecen utilizar más sus reservas de IT. Así, Martin y col. (1993) mostraron que el entrenamiento aumenta la contribución del consumo de IT al gasto energético total.

En general puede concluirse que los TG musculares se consumen durante el ejercicio submáximo, siendo un sustrato importante para el músculo en contracción. Desafortunadamente, y como se ha comentado con anterioridad, los problemas metodológicos hacen muy difícil la cuantificación precisa de la utilización de triglicérido intramuscular ya que la evaluación de los cambios en la concentración de triglicérido intracelular (IT) en músculo humano debido al ejercicio, se llevaba a cabo inicialmente mediante análisis directo de biopsias (Essen y col., 1977; Standl y col., 1980; Cleroux y col., 1989; Romjin y col., 1993; Sidossis y col., 1995; Starling y col., 1997; Wendling y col., 1996). Sin embargo, se ha descrito también recientemente, que los triglicéridos intra y extramusculares pueden ser cuantificados de manera no invasiva y no destructiva por espectroscopia de resonancia magnética de protón (1H -MRS) (Schick y col., 1993; Boesch y col., 1997; Rico-Sanz y col., 1998; Szczepaniack y col., 1999). En el futuro, estas técnicas pueden llegar a proporcionar medidas más precisas de concentraciones de triglicéridos intramusculares. Boesch y col., (1997) demostraron un coeficiente de variación del 6% en su método. Sin embargo, también encontraron diferencias considerables de IT entre individuos cuando investigaban el mismo músculo. Se puede observar algunas ventajas en la utilización del método no destructivo sobre la biopsia, por presentar mayor volumen de muestra accesible, utilizar la misma zona investigada antes y después del tratamiento, permitir la discriminación entre IT y ET y, finalmente, por posibilitaren mayor acceso a los atletas de elite, que no aceptan fácilmente los exámenes mediante biopsias.

A pesar del elevado número de estudios realizados para evaluar el posible papel de los IT en el metabolismo energético muscular durante el ejercicio, existen aún discrepancias entre los distintos laboratorios tanto utilizando biopsias como 1H -MRS

para cuantificar los cambios. Así, algunos estudios muestran que los IT disminuyen después de ejercicios continuos (Essen y col., 1977; Hurley y col., 1986; Cleroux y col., 1989; Romjin y col., 1993; Sidossis y col., 1995; Boesch y col., 1997) mientras que otros investigadores no encuentran alteraciones significativas (Standl y col., 1980; Jansson y col., 1982; Kiens y col., 1993; Wendling y col., 1996; Starling y col., 1997) a pesar de la similitud de los protocolos de ejercicio utilizados.

Por otra parte, cuando utilizaron ejercicios intermitentes de intensidad máxima (15 s de ejercicio - 15 s de reposo) en los últimos 60 min., Essen y col., (1977) pudieron demostrar una disminución en los IT del músculo cuádriceps femoral. Essen-Gustavsson y Tesch (1990) también demostraron un consumo de IT después de 20 periodos de 30 s de ejercicio de intensidad máxima intercalados entre periodos de 60 s de recuperación pasiva. Entretanto, Rico-Sanz y col., (1998) no detectaron consumo de IT y ET durante dos protocolos prolongados de carrera con velocidades alternadas. En uno de ellos se analizaron los últimos 90 minutos del protocolo de ejercicio y en el otro el momento de aparición de la fatiga. Por tanto, el protocolo de ejercicio idóneo para la detección de un posible consumo de IT no está aún claro .

1.10. Biosíntesis y metabolismo de la creatina

La creatina es un compuesto que se sintetiza de forma endógena en humanos en el hígado, el páncreas y los riñones, a partir de 2 aminoácidos precursores: arginina y glicina. Según Devlin (1992) citado en Balsom y col., (1994) la síntesis comienza con la transferencia de un grupo amino de la arginina a la glicina, en una reacción de transaminación, para formar guanidinoacetato y ornitina. El enzima que cataliza esta reacción reversible es una transaminasa. La creatina se forma por la cesión de un grupo metilo de la S-adenosilmetionina al guanidinoacetato mediante una metiltransferasa (figura 3). Una vez la creatina sintetizada endógenamente o ingerida en la dieta, ha sido captada por el tejido muscular, es fosforilada mediante la reacción catalizada por la creatina quinasa a fosfocreatina. El músculo no tiene la capacidad de sintetizar creatina, y por tanto la creatina transportada por la sangre debe captarse contra un gradiente de concentración por parte de un transportador de creatina/sodio. Dicha fosfocreatina puede transformarse de manera espontánea en un producto cíclico, la creatinina, que se acaba excretando en la orina como se esquematiza en la figura 3. Existen pocas investigaciones referentes a la salida de creatina de las células musculares. En cambio,

en el hígado el órgano principal de la biosíntesis de la creatina, la membrana plasmática de los hepatocitos parece ser mucho más permeable para la creatina comparada con las células musculares, aunque hay pocos datos acerca del mecanismo de salida de la creatina de hepatocitos (Grazi y col.,1975).

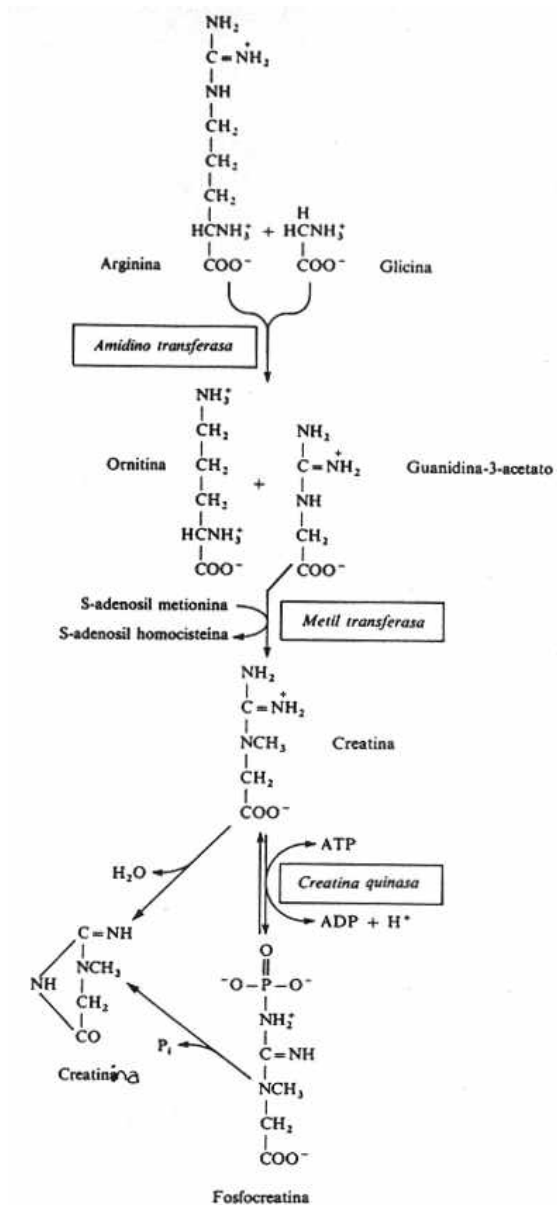


Figura 3 – Esquema de la vía de síntesis y metabolismo de la creatina (Devlin,1992 citado por Balsom y col,1994).

Balsom y col., (1994) definen la creatina total en humanos como la suma de la creatina en forma libre y fosforilada. Las mayores concentraciones de creatina total en el cuerpo se encuentran en el músculo esquelético, con aproximadamente el 95% del contenido de creatina total. Mediante biopsia de músculo se ha podido determinar que la cantidad media de creatina total es de 124,4 mmol/kg de peso seco de músculo, siendo de esta 49,0 mmol/kg creatina libre (39%) y 75,4 mmol/kg fosfocreatina (61%). El 5% restante del contenido corporal de creatina está localizado principalmente en el cerebro y el corazón. Esta distribución de la creatina en el cuerpo indica que ésta es transportada por el torrente sanguíneo desde los lugares de síntesis hasta los lugares de utilización.

En ausencia de creatina exógena, el porcentaje de transformación de creatina total a creatinina está alrededor de 1,6 % de dicha creatina total por día en humanos. Entonces, para un individuo con un peso corporal de 70 kg y un contenido total de creatina de 120 g, ello representa una pérdida de aproximadamente 2 g por día. Dicha creatina se repone por vía endógena y exógena. La creatina exógena se encuentra en la carne, el pescado y otros productos de origen animal, con lo que la media de ingesta diaria de creatina en una dieta mixta es de aproximadamente 1g por día (tabla 1). Así, parte de los requerimientos diarios se pueden conseguir a partir de la ingesta de alimentos, aunque dicha ingesta necesita ser complementada mediante la síntesis endógena.

Tabla 1 - Contenido aproximado en creatina de diferentes tipos de alimentos (Balsom y col., 1994)

	Alimento	Creatina (g/kg peso seco)
Pescados	Gamba	Traza
	Bacalao	3
	Atún	4
	Salmón	4,5
	Arenque	6,5 – 10
Carnes	Tenera	4,5
	Cerdo	5
Otros	Leche	0,1

1.11. Metabolismo de la creatina: creatina-quinasa y sus isoformas

El metabolismo de la creatina fue estudiado desde el principio del siglo XX mediante experimentos que trataban de definir su función metabólica. Lohmar, ya en 1934 identificó un enzima que la utilizaba como sustrato, la creatina quinasa (CK), y la reacción que catalizaba. Existen varios isoenzimas de la CK que catalizan la transferencia reversible de un grupo fosfato entre la creatina y el ATP. Esta reacción es una reacción exclusiva de la CK, en el sentido que es la única enzima conocida que puede utilizar como sustrato la creatina y su forma fosforilada, la fosfocreatina (PCr). Tanto la creatina como las isoformas de CK se encuentran en cantidades variables en diferentes tipos de músculo, formando un sistema muy importante en el metabolismo energético de esos tejidos. La mayor parte de CK se encuentran en forma dimérica, compuesta por dos tipos de subunidades, M (músculo) y B (cerebro) resultando en 3 isoenzimas: MM, BB y MB. A parte de estas hay otra isoforma localizada en la mitocondria la creatina-quinasa mitocondrial (mi-CK), que es diferente bioquímica e

inmunológicamente con respecto a las formas citosólicas y que puede formar estructuras octaméricas o diméricas. La creatina-quinasa mitocondrial está codificada por dos genes diferentes que se expresan de forma específica en cada tejido. La mi-CKs se expresa juntamente con la M-CK en tejidos que presentan estructuras sarcoméricas. Las diferentes isoformas no mitocondriales de la CK están presentes libres en el citosol o asociadas a estructuras subcelulares. Así, la M-CK está asociada a miofibrillas y fue descrita como una proteína estructural del disco M de los filamentos gruesos del sarcómero. En esta estructura está funcionalmente acoplada a la cabeza globular de la miosina. La CK miofibrilar puede utilizar PCr para refosforilar el ADP producido por el ciclo catalítico de la miosina y puede por tanto suministrar energía química al músculo en momentos de demanda máxima. De modo similar, la M-CK también está fuertemente asociada a las membranas del retículo sarcoplasmático, donde está funcionalmente acoplada a la bomba de Ca^{2+} y por lo tanto, asegura la provisión de la energía suficiente para las necesidades de esta ATPasa.

Estudios recientes de Roman y col., (1997) demostraron mediante la utilización de ratones transgénicos que las dos isoformas citoplasmáticas, la MM y la BB son funcionalmente equivalentes: los ratones en los cuales se había substituido la MM-CK por la BB-CK en las células musculares no presentaron un patrón contráctil diferente del normal. Un hecho interesante a tener en cuenta es que existe una divergencia en la secuencia primaria entre la MM-CK y la BB-CK, en el extremo C-terminal de la enzima: este extremo en la MM-CK parece contener la información necesaria para asociar a la MM-CK con las miofibrillas. La gran homología entre la MM-CK y la BB-CK podría hacer pensar que estas dos isoformas tienen un papel redundante en la bioenergética celular.

1.12. Lanzadera Cr/PCr

Según Bessman y col., (1990) la CK facilita el transporte de energía a través de una serie de equilibrios secuenciales en el citoplasma. existiría además un acoplamiento directo entre la Mi-CK que alimenta la reacción gracias a la fosforilación oxidativa y la MM-CK que proporciona ATP a la miosina y otras ATPasas celulares. Este es el concepto de lanzadera o circuito que está basado en la compartimentalización de las diferentes isoformas de la CK. Probablemente, las diferentes isoformas de la CK (genéricamente, mitocondrial y la citoplasmática) se mantuvieron evolutivamente,

porque permiten una mejor regulación de la producción energética y también una transferencia intracelular efectiva entre lugares de producción y consumo de energía (figura 4).

La mi-CK está situada en la superficie exterior de la membrana interna mitocondrial, y se encuentra asociada al dominio cardiolipina que rodea la translocasa de nucleótidos de adenina. Estos complejos estructurales se encuentran localizados en el espacio intermembrana, entre el citoplasma y la membrana interna mitocondrial, que es en donde se produce la fosforilación oxidativa. Por tanto, están en una posición en la que pueden controlar las concentraciones de ADP y ATP en el espacio intermembrana, de acuerdo con el mecanismo de acoplamiento funcional.

Dicho proceso de acoplamiento funcional implica una canalización metabólica sustrato-producto entre la translocasa y la Mi-CK debido a su proximidad espacial: la translocasa proporciona ATP de la matriz mitocondrial al microentorno de la Mi-CK, que por su parte proporciona ADP producido a partir de ATP consumido para sintetizar fosfocreatina a partir de creatina a dicha translocasa. Esta translocasa transporta el ADP a la matriz mitocondrial para ser sustrato de la fosforilación oxidativa y comenzar así un nuevo ciclo. En este sistema tan preciso y organizado, la actividad máxima de la creatina quinasa mitocondrial es igual a la tasa de producción y translocación de ATP y, por lo tanto, igual al flujo total de energía que la fosforilación oxidativa puede suministrar a la célula.

La reacción simétrica en dirección contraria se da en el otro lado, funcionalmente hablando, de la célula, en el sistema de consumo de energía acoplada a la MM-CK. En el ciclo de la contracción, la velocidad de difusión del ADP generado es esencial, ya que se trata de un componente activo con capacidad inhibitoria del ciclo contráctil: su disociación del dominio S1 de la miosina está directamente relacionada con el cambio conformacional que hace posible el inicio del ciclo de la contracción. Por tanto, si el ADP se acumulara en el microentorno de la miosina habría una disminución en la potencia de la contracción. El aumento de la velocidad de difusión del ADP sería la tarea principal que realiza la MM-CK que, como se ha explicado, se encuentra asociada al disco M del sarcómero. Este es un proceso en estado estacionario debido a las propiedades cinéticas favorables de la MM-CK y que se lleva a cabo en el compartimento miofibrilar debido a algún tipo de canalización metabólica. Sin embargo

Roman y col., (1997), indican que la compartimentalización de la CK en las miofibrillas no es esencial para obtener un patrón contráctil normal: cuando la MM-CK es substituida por la BB-CK (que no se asocia a miofibrillas) los fenotipos contráctiles aberrantes de los ratones “knock-out” para MM-CK desaparecen y se obtiene un patrón contráctil normal.

Se ha observado también por Saks y col., (1996), que la entrada incluso de una pequeña cantidad de ADP en la mitocondria es suficiente para producir la aceleración de la respiración. El sistema de acoplamiento funcional de la CK seria por tanto un potente amplificador de la actividad reguladora del ADP. Estudios recientes de Ventura-Clapier y col. (1998) muestran que ésta podría ser la propiedad más importante del acoplamiento de la Mi-CK, ya que las porinas de la membrana mitocondrial externa parecen tener una baja permeabilidad para ADP: así, incluso una baja concentración de ADP provoca una elevada tasa de respiración mediante una amplificación del acoplamiento funcional y del recambio de nucleótidos.

Un hecho a destacar es que la separación de la Mi-CK de la membrana interna tiene como consecuencia la pérdida total de este control y, a pesar que la enzima quede en el espacio intermembrana, el efecto de acoplamiento funcional desaparece completamente (Ventura-Clapier y col., 1998). Dichos autores sugirieron que dicho acoplamiento funcional requiere una interacción física entre la translocasa y la Mi-CK y esta basada por tanto en una canalización del ADP y del ATP entre sus centros activos y no en la acumulación de esos substratos en el espacio intermembrana.

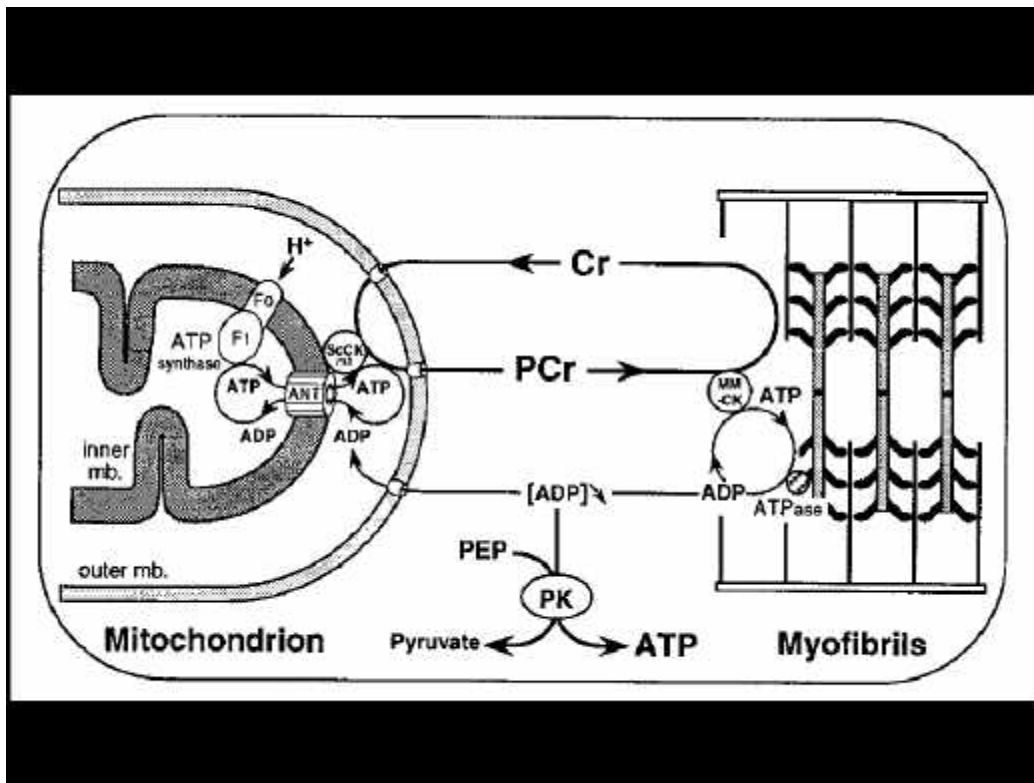


Figura 4 – Esquema de la lanzadera Cr/PCr tomada del trabajo de Kay y col., 2000.

Además, el reciente trabajo de Hochachka y col., (1998) indica que la creencia generalizada de que el “pool” total de PCr+Cr está repartido homogéneamente por todo el volumen celular puede ser errónea. Es decir, según este estudio las diferentes isoformas de CK no tienen acceso a todo el pool de Cr total. Estos datos refuerzan la teoría de la lanzadera que permite explicar este hecho como consecuencia de la compartimentalización de la propia enzima y de sus substratos: PCr, Cr, ATP y ADP.

Los estudios de Saks y col., (1996) que comparan la actividad de la CK en diferentes músculos evidencian que la mayor actividad de esta enzima se da en el músculo en que predominan las fibras de tipo rápido (glucolítico, tipo II) dependiente de la glucólisis. Al mismo tiempo la mayor parte de la actividad de esta enzima es citosólica, con solamente un 5-10% asociada al retículo sarcoplasmático o a miofibrillas. La actividad total de la CK en este caso es aproximadamente 10 veces superior a la máxima capacidad de consumo de ATP. Este tipo de músculos realizan un

trabajo intenso y explosivo a expensas de reservas energéticas de uso inmediato y se fatigan rápidamente. El mantenimiento de este patrón de contracción depende de forma importantísima de la capacidad de producción de ATP por unidad de tiempo así como de una eficiente eliminación del ADP producido.

Por el contrario, las fibras de contracción lenta tipo I, oxidativas, mantienen una actividad prolongada y sostenida, asociada al metabolismo oxidativo, y contienen menos cantidad de CK y PCr. En general, también en los músculos de contracción lenta la actividad de la CK es menor que en los de contracción rápida. Entre los músculos de este tipo encontramos el cardíaco, donde la actividad máxima ATPásica es solo un poco menor que la de CK. Este tipo de músculo confía más en la producción simultánea de energía en las mitocondrias que en las reservas de energía de producción rápida de ATP (PCr, glucógeno). Como consecuencia cuentan con un elevado volumen mitocondrial y una alta actividad específica de la mi-CK.

1.13. Suplementación dietaria con creatina

La suplementación con creatina se ha convertido durante estos últimos años en una práctica habitual entre deportistas de competición que practican diferentes especialidades deportivas. El mecanismo por el cual la suplementación con creatina podría tener efectos ergogénicos potenciales consistiría en un aumento del contenido muscular de creatina y fosfocreatina, lo cual permitiría un aumento en la velocidad de resíntesis de ATP, un retraso en el inicio de la fatiga muscular y una recuperación facilitada durante ejercicios repetidos de alta intensidad. Se han estudiado de forma bastante completa los efectos de la suplementación con creatina en sujetos sedentarios o moderadamente entrenados bajo condiciones de laboratorio. Sin embargo, se sabe muy poco sobre su posible influencia en deportistas muy entrenados participando en competiciones o acometiendo ejercicios similares a los practicados durante la competición.

Diversos investigadores han estudiado los efectos de la suplementación oral de corta duración con creatina sobre el contenido de creatina total (creatina más fosfocreatina) o de fosfocreatina, analizando muestras de músculo obtenidas tanto por medio de biopsia de punción como por estudios por espectroscopia de resonancia magnética nuclear.

En estudios realizados con extractos de biopsias del vasto externo, Harris y col., (1992) demostraron que la suplementación dietaria con 5 g por toma de monohidrato de creatina, tras dos días con cuatro tomas por día, resultaron en un aumento de entre 20 y 50% en el contenido de creatina total. Aproximadamente, entre un 20 y un 30 % de dicho aumento se almacenaba en forma de fosfocreatina (PCr).

En este sentido Greenhaff y col., (1996) y Casey y col., (1996) observaron también en estudios por biopsias un aumento intramuscular en la creatina total, con una suplementación de 20 g de monohidrato de creatina diarios tras 5 días consecutivos, y observaron un aumento de 15% de PCr y 20 % en la creatina total (TCr). Hultman y col., (1996) también verificaron un aumento de 20 % en la concentración de creatina total en el músculo, después de 6 días de suplementación de 20 g/día de creatina.

Estudios recientes de Green y col., (1996 a y b) han demostrado un mayor aumento en la retención de creatina cuando ésta es ingerida junto con cantidades elevadas de carbohidrato (370 g/día) en disolución. Este efecto sinérgico se relaciona con un aumento de la liberación de insulina a sangre, que podría estimular el cotransporte de creatina y sodio hacia al interior del músculo.

Asimismo, mediante estudios por espectroscopia de resonancia magnética nuclear de fósforo González de Suso y col., (1995), también comprobaron de manera no invasiva un aumento de 26,4% en el contenido de fosfocreatina muscular después de la suplementación durante 14 días con 21 g de creatina diarios.

Sin embargo, parece aceptado que el músculo esquelético humano tiene un límite superior con relación a su contenido de creatina, que estaría en torno a los 150-160 mmol/kg de peso seco de músculo. A ese respecto Greenhaff y col., (1994) sugieren que la suplementación dietaria con creatina no aportaría beneficios adicionales para sujetos con una alta concentración inicial de ella o para sujetos que ya han alcanzado el límite superior como consecuencia de un periodo previo de ingesta de creatina.

1.14. Efecto de la suplementación dietaria con creatina

Diversos estudios han demostrado que la ingesta de creatina produce un aumento de masa corporal (Balsom y col., 1993b; Balsom y col., 1994; Greenhaff y col., 1994 ; Mujika y col., 1996 y Volek y col., 1997). Este aumento de peso podría explicarse por una retención hídrica intratisular, aunque también existe la posibilidad de que la ingestión de creatina estimule la síntesis proteica muscular (Balsom y col., 1994).

Referente a ese tema, Earnest y col., (1995) sugieren que el aumento de peso después de la administración de creatina es debido a un aumento de masa muscular.

Además, según Sipila y col., (1981) citado por Mujika y col., (1996), la suplementación oral con creatina provoca aumentos en el diámetro de las fibras musculares de tipo II.

Varios estudios han demostrado que tanto en sujetos sedentarios como en aquellos que practican actividad física regularmente, la suplementación con creatina puede aumentar el rendimiento físico durante la realización de ejercicios de corta duración y alta intensidad. Greenhaff y col., (1993) han observado aumentos significativos en la potencia después de la suplementación con 20 g de creatina durante 5 días, en la realización de 5 series de 30 extensiones isocinéticas máximas de rodilla alternadas con periodos de recuperación de 1 minuto. Casey y col., (1996) también encontraron un aumento significativo en la potencia después de la suplementación con 20 g diarios de creatina durante 5 días, durante la ejecución de dos repeticiones de pedaleo máximo de 30 segundos separadas por 4 minutos de recuperación pasiva. A este respecto, Volek y col., (1997) encontraron resultados significativos de aumento en la potencia durante 5 series de saltos.

También demostramos resultados significativos en la velocidad máxima (11,5%), potencia máxima (12,7%) y en la potencia media (15,8), después de la suplementación de 20 g de creatina tras 12 días, en el test de potencia de 10 segundos (Santos, 1999).

Harris y col., (1992) y Greenhaff y col., (1994) explican este efecto ergogénico como resultado del aumento del contenido muscular de creatina total inicial, así como debido al aumento de la velocidad de resíntesis de PCr en los periodos de recuperación.

Rico-Sanz (1995 y 1997) propone la hipótesis de que si la creatina tiene un efecto en el control del metabolismo oxidativo “in vivo” en el músculo humano, dicho efecto debe estar ya presente al comienzo del ejercicio cuando hay una elevación del consumo de oxígeno después de la suplementación con creatina. Este mismo autor detalla que en condiciones en las cuales el flujo sanguíneo y por tanto el transporte de oxígeno al músculo no esté limitado, la creatina reduce la disminución de pH intracelular y el consumo de PCr durante el periodo de ejercicio, indicando que la contribución anaerobia a la producción de ATP disminuyó después de la suplementación,

debido a un aumento de la contribución aeróbica durante el protocolo de ejercicio, manteniendo una tensión muscular constante.

2. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta los resultados existentes en el campo al inicio de la Tesis, nos planteamos contribuir con este trabajo a la clarificación del efecto de la suplementación oral con monohidrato de creatina y con polímeros de glucosa en el metabolismo energético muscular. Para ello pretendíamos utilizar metodologías esencialmente no invasivas, como la espectroscopia de resonancia magnética de fósforo ^{31}P -MRS y protón ^1H -MRS, pruebas de rendimiento en laboratorio, así como determinación densitométrica de la composición corporal de atletas de alto nivel.

Podemos desglosar dicho objetivo general en los siguientes objetivos específicos:

Caracterizar las reservas energéticas de metabolitos fosforilados en el músculo esquelético de atletas mediante espectroscopia de ^{31}P -MRS.

Poner a punto metodologías de medición de la variación de la concentración de metabolitos fosforilados y pH intracelular en músculo esquelético durante el ejercicio mediante ^{31}P -MRS.

Caracterizar las reservas energéticas de triacilgliceroles intra y extra miocelulares en el músculo esquelético de atletas mediante espectroscopia de ^1H -MRS.

Caracterizar el efecto de la suplementación dietaria con creatina en el patrón bioenergético muscular en reposo y en dinámico, y en la composición corporal de atletas.

Observar en que instantes de una prueba progresiva de potencia aeróbica el deportista experimenta cambios cualitativos en su percepción del esfuerzo y cual es el ajuste existente en diferentes momentos entre esta percepción y la progresión real de dicho esfuerzo.

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. Diseño experimental

Los atletas de fondo se distribuyeron por sus características físicas (peso, altura, índice de masa corporal (IMC) y consumo máximo de oxígeno) en dos grupos equivalentes; un grupo control y un grupo de suplementación con creatina. Ese experimento fue un “doble ciego” en cuanto a la suplementación administrada (ni nosotros, ni el CAR, ni los sujetos supieron hasta el final que grupo era placebo y cual era suplementación con creatina).

Los futbolistas se distribuyeron en dos grupos equivalentes por sus posiciones de juego en el equipo, uno de suplementación con creatina y polímeros de glucosa antes del entrenamiento y uno de suplementación después del entrenamiento.

3.2. Sujetos

Todos los atletas fueron previamente informados del tipo de estudio en que iban participar y formalizaron por escrito su consentimiento al respecto. El protocolo y los formularios tipo de consentimiento fueron previamente aprobados por la Comisión de Ética en Experimentación Animal y Humana de la Universitat Autònoma de Barcelona.

3.2.1. Fondistas y medio-fondistas.

La muestra de este estudio estuvo formada por 14 atletas de alto nivel del Centre d' Alt Rendiment Esportiu (CAR, Sant Cugat del Vallés). Los sujetos competían en competiciones de nivel regional, nacional y internacional, y uno de ellos participó en Campeonatos Mundiales. Durante el periodo del protocolo de análisis entrenaban aproximadamente entre 1–2 horas por día, y completaban una distancia total de carrera de 70 –150 km por semana.

Procedimientos: los sujetos visitaron el laboratorio de fisiología del CAR en dos ocasiones, una antes de la suplementación con creatina y la otra después del período de 14 días de suplementación. El primer día los sujetos realizaron un test submáximo seguido de un test máximo hasta llegar a la fatiga para determinar el consumo máximo de oxígeno. Uno de los sujetos no pudo realizar el test máximo por estar lesionado.

Después de 3-4 días de ejecutar el test de capacidad aeróbica máxima, los sujetos fueron al Centre Diagnòstic Pedralbes (2 –3 horas después de la última comida) para llevar a cabo las medidas por MR. El patrón de metabolitos fosforilados se midió en el músculo vasto medial por ^{31}P -MRS, mientras que los triglicéridos intra (IT) y extramusculares (ET) se determinaron mediante ^1H -MRS.

3.2.2. Futbolistas.

La muestra estuvo formada por 22 atletas de un único equipo de la segunda división de la liga de fútbol de España, Palamós (FC). Los sujetos entrenaban 2 h/día, durante 5 días por semana, y tenían además partido de competición los fines de semana. Uno de los jugadores no pudo realizar las medidas de MRS por problemas de claustrofobia en el tunel del imán para MR, mientras que otro sufrió una lesión de rodilla durante la realización del estudio, y tuvo que ser excluido.

Procedimientos: los sujetos visitaron el laboratorio del Centre Diagnòstic Pedralbes en dos ocasiones, una antes de la suplementación con creatina y polímeros de glucosa y la otra después del periodo de 17 días de suplementación. En el primer día se realizaron las mediciones de ^{31}P -MRS y de ^1H -MRS. 3 días después se desplazaron por segunda vez a la Universitat Autònoma (Servei d' Activitat Física, SAF) para realizar las medidas de composición corporal por densitometría.

3.3. Suplementación de la dieta

3.3.1. Fondistas y medio-fondistas

La suplementación oral se realizó durante 14 días en la forma de 20 g de monohidrato de creatina. Se asignaron los sujetos conforme a sus características físicas (peso, altura, índice de masa corporal (IMC), VO_2 max.) en dos grupos: placebo (maltodextrina) y suplementación con creatina. En los dos grupos la dosis diaria se dividió en cuatro tomas iguales, repartidas a lo largo del día, para ser ingeridas después de ser disueltas en un vaso de agua (aproximadamente 250 ml).

3.3.2. Futbolistas

La suplementación oral se realizó a lo largo de 17 días durante la temporada de competición en la forma de $0,1 \text{ g por kg de masa magra (kg} \cdot \text{MM)}^{-1}$ de monohidrato de creatina y $1,1 \text{ g (kg} \cdot \text{MM)}^{-1}$ de polímeros de glucosa (maltodextrina) (Laboratorios

Rubió, Barcelona) disueltas en 750 ml de agua, 10-15 min. antes del entrenamiento diario en un de los grupos (AE) y 10-15 min. después del entrenamiento en el otro grupo (DE).

3.4. Determinación de la composición corporal mediante densitometria.

El Sistema de Composición Corporal, BOD POD (BP) (Life Measurement Instruments, CA, USA) fue utilizado para el análisis de la composición corporal. El BP consiste en un pletismógrafo de dos cámaras (figura 5a,b), balanza electrónica, ordenador tipo PC 486, y programa informático (BPSoft versión 1.0). Este sistema utiliza una metodología densitométrica para determinar la composición corporal. Así, el peso corporal se mide mediante la balanza electrónica asociada (con una precisión de 0,01 kg) mientras que el volumen corporal se calcula mediante la aplicación de las leyes de los gases en cámaras. El pletismógrafo está construido con fibra de vidrio con una gran ventana transparente acrílica, y un asiento moldeado que esta unido al septo que separa la cámara frontal de la trasera. El sujeto es estudiado en la cámara frontal mientras que la instrumentación está ubicada en la cámara trasera. El sujeto entra y sale a través de una puerta en la cámara frontal. El volumen interior de dicha cámara es de aproximadamente, 450 l, lo que permite un entorno holgado para el sujeto.

Este sistema determina el volumen corporal (V_c) a través de un método de desplazamiento de aire. El elemento perturbador de volumen (diafragma móvil) está montado en la pared común que separa las cámaras frontal y trasera. Cuando se induce la oscilación de este diafragma, bajo control del ordenador, produce perturbaciones del volumen complementarias en las dos cámaras (iguales en magnitud pero distintas en signo). Estas perturbaciones del volumen producen fluctuaciones de la presión muy pequeñas que son analizadas para calcular el valor del volumen del aire de la cámara. A continuación, el sujeto entra en la cámara delantera, y se repite el proceso. Dado que el sujeto reduce el volumen de la cámara delantera en V_c , es posible determinar el V_c por sustracción, p.e.:

$$V_c = \text{Volumen de la cámara}_{\text{vacía}} - \text{Volumen de la cámara}_{\text{con el sujeto dentro}}$$

Es importante reconocer que el aire en condiciones isotérmicas (temperatura constante) se comporta de manera diferente que el aire en condiciones adiabáticas (sin

ganancia ni pérdida de calor). Dado que el aire en condiciones isotérmicas es más compresible que el aire en condiciones adiabáticas, estas cantidades de aire isotérmico deben ser tenidas en cuenta. Los contribuyentes importantes a las condiciones no adiabáticas son el volumen de aire pulmonar (volumen de gas torácico, V_{TG}) y la superficie de la piel. El V_{TG} es medido directamente como parte del proceso de estudio usando una técnica similar a la usada en pletismografía pulmonar. Después de una medida inicial del volumen corporal, el sujeto es conectado a un circuito respiratorio de modo que puede ser medida la presión de las vías respiratorias del sujeto. Se le pide entonces al sujeto que realice una respiración normal completa, que aparece representada en la pantalla del ordenador. En el punto medio de una exhalación, la vía respiratoria es obstruida momentáneamente por un obturador controlado por un solenoide, mientras que el sujeto alternativamente comprime y relaja el músculo del diafragma. Este esfuerzo produce una pequeña fluctuación de la presión en las vías respiratorias y en la cámara que se puede usar para calcular V_{TG} . Así, se calcula automáticamente una medida de la conformidad del sujeto con esta técnica (denominada Valor de Merit), la cual establece la base para el test de aceptación. Finalmente, se usa una medida de la superficie del cuerpo utilizando la fórmula de Dubois y Dubois (1916) para producir una corrección del efecto del área de la superficie de la piel (Dempster y Aitkens, 1995).

Procedimiento: primero, el sujeto evacuó y se midió su altura precisando al centímetro. Entonces, vestido únicamente en traje de natación, se midió la masa corporal precisando al 0,01 kg en una báscula electrónica calibrada. Se realizó una calibración estándar de dos puntos a 0 y 50 l en la cámara de BP. Seguidamente, se pidió al sujeto que se sentara en la cámara para la medida del volumen corporal. Durante esta parte del estudio los sujetos llevaban puesto un gorro de natación. Se pidió al sujeto que se relajara y que respirara normalmente durante los 20 s de la medida. Después de esto, se conectaba al sujeto a un circuito respiratorio interno del sistema para medir V_{TG} . Se le dieron instrucciones al sujeto de seguir respirando normalmente durante dos o tres respiraciones completas; durante este tiempo, aparecía en la pantalla el registro a tiempo real de la respiración. El experimentador observaba la visualización de la respiración y avisaba verbalmente al sujeto justo antes de la oclusión de las vías respiratorias. En este momento, el sujeto contraía y relajaba alternativamente el músculo

del diafragma mientras se medía simultáneamente la presión de las vías respiratorias y la de la cámara. El proceso de medida de V_{TG} fue repetido si la conformidad del sujeto era baja (Valor de Merit $> 1,0$). Como regla general, los procedimientos de V_{TG} solo tenían que ser realizados una vez; sin embargo, en algunos sujetos se tuvieron que realizar dos o tres medidas para obtener resultados satisfactorios. Una vez que se realizó el test completo (alrededor de 3-5 min. por sujeto) se pasó a realizar los cálculos de la composición corporal. La densidad corporal ($D_{d(BP)}$) se calculó como $D_{d(BP)} = Masa/V_{b(BP)}$ donde $V_{b(BP)}$ es el volumen corporal determinado por BP, y el porcentaje de grasa corporal ($\%GC_{BP}$) se derivó usando la fórmula de Siri (1961):

$$\%GC = (4,95 / D) - 4,5 \quad [1]$$

donde: $\%GC$ es la porcentaje de grasa corporal y D la densidad.



Figura 5a – El BOD POD, es un pletismógrafo de dos cámaras, dotado además de balanza electrónica, ordenador y programa informático de procesamiento.



Figura 5b – El BOD POD, es un pletismógrafo de dos cámaras, dotado además de balanza electrónica, ordenador y programa informático de procesamiento.

3.5. Test de fatiga (JRS)

Todos los sujetos llevaban un equipamiento ligero (calcetines de deporte, pantalón corto y camiseta) y zapatillas de deporte. Antes del protocolo de ejercicio los sujetos calentaron durante 15 minutos. Tanto el protocolo de calentamiento como el de ejercicio fueron llevados a cabo a modo de lanzadera entre dos líneas separadas 15 m sobre un suelo de gimnasio de madera en el SAF en la Universitat Autònoma de Barcelona. Se utilizó un programa informático para generar un sonido que era amplificado por un micrófono para marcar el ritmo a los sujetos a lo largo del test. El sonido fue emitido por medio de dos altavoces que habían sido situados en una zona de asientos elevada del gimnasio. El sonido marcaba el momento en el que se suponía que los jugadores tenían que tocar la línea antes de cambiar de dirección. Durante los primeros 5 minutos de calentamiento los sujetos se habituaron a las tres velocidades de locomoción de trote ($1,7 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$), carrera ($2,5 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$) y sprint ($5,0 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$) los cuales fueron realizados en el siguiente orden: 36 s de carrera, 18 s de trote y 6 s de sprint. Inmediatamente después de este período de 5 min, los sujetos realizaron ejercicios de estiramiento durante 10 min. Entonces, los sujetos realizaron un protocolo establecido (JRS, **Jesus Rico-Sanz**, Rico-Sanz y col, 1999c) que consistió en dos períodos de 45 min separados por 15 min de descanso pasivo simulando las condiciones de un partido de fútbol intenso. Los sujetos que completaron el primer período de 45 min ingirieron 500 ml de agua mineral proporcionada en una botella de plástico durante los 15 min del descanso. Si los jugadores eran capaces de completar dos períodos de 45 min, se les permitía de nuevo una pausa de 5 min mientras ingerían 500 ml de agua mineral. El test se reanudaba hasta el agotamiento. El protocolo consistía en movimiento ininterrumpido cambiando las velocidades de locomoción en el siguiente orden: carrera, trote y esprint como se indicó anteriormente para el calentamiento. Cada minuto los sujetos cubrían 90 m corriendo, 30 m trotando y 30 m esprintando. Tras el final de cada esprint, se emitió otro sonido generado por ordenador un segundo después del pitido que indicaba el final del sprint. Se daban dos llamadas de advertencia cuando los jugadores llegaron a la línea justo después de este segundo pitido. Cada vez que ocurría esto se marcaba en una hoja con un código de colores por parte de uno de los experimentadores (ver figura 6). Cuando un jugador llegaba a la línea al final del sprint después del segundo sonido por tercera

vez, se daba la prueba por acabada y el tiempo registrado fue usado para indicar el tiempo de agotamiento (TTE). Los jugadores cumplieron bien con el ritmo de locomoción dentro del criterio impuesto. Durante el protocolo de ejercicio, los sujetos llevaban un monitor de ritmo cardíaco (Polar Accurex Plus, Polar Electro Oy, Kempele, Finlandia) que registraba el ritmo cardíaco medio (HR) en intervalos de 5s. El HR fue descargado más tarde en una hoja de cálculo en un ordenador personal utilizando una interfaz (Polar Interface Plus, Polar Electro Oy, Kempele, Finlandia).



Figura 6 – Perspectiva del test de fatiga (JRS) en la fase de calentamiento realizado por los futbolistas del Palamós en el SAF de la UAB.

3.6. Test de capacidad aeróbica máxima en tapiz rodante realizado en el CAR

El protocolo de medición del consumo máximo de oxígeno (VO_2) que se utilizó para estudiar a los fondistas se basó en el protocolo de tapiz rodante descrito por Daniels y Daniels (1992). Los atletas llevaron a cabo en cada test 5 niveles de carrera submáxima en un sistema de tapiz rodante (Laufergotest LE/6, Jaeger, Germany) (figura 7), seguido por un aumento de la velocidad hasta la fatiga con el objetivo de determinar el consumo máximo de oxígeno (VO_2 max.). La velocidad inicial para el test submáximo fue adaptada conforme el sexo y según las marcas individuales de los corredores de media o larga distancia. Las mujeres empezaron entre 12,8 y 14,0 km/h, y para los hombres entre 14,2 y 16,0 km/h. El objetivo fue comenzar a una velocidad del 75%, aproximadamente, del consumo máximo esperado de oxígeno.

El test consistía en 6 minutos de ejercicio submáximo y tres minutos de recuperación pasiva entre los 5 niveles de ejercicio. El último nivel fue iniciado con la última velocidad a un 1% de grado de inclinación del tapiz rodante; cada subsiguiente minuto se adicionaba un 1% en la inclinación del tapiz rodante hasta que los sujetos no podían mantener la velocidad (agotamiento) y entonces fue calculado el TTE (figura 8) . El lactato sanguíneo se medía antes de iniciar el protocolo de ejercicio y al final de cada nivel y el amonio sanguíneo únicamente al final del test máximo. El consumo de oxígeno fue determinado mediante un espirómetro de circuito abierto. Las medidas se realizaron en tiempo real debido a un sistema de máscara con válvulas, de espacio muerto reducido, que separa el aire inspirado del expirado. El circuito respiratorio está conectado a un sistema automatizado de medición de intercambio de gases modelo EOS SPRINT (Jaeger, Alemania), que tiene un neumatómetro, un analizador rápido de O₂ (sensor paramagnético) y un analizador de CO₂ (sensor infrarrojos). Existe un sistema de calibración del neumatómetro y de los analizadores de O₂ y CO₂ que consiste en una jeringa calibrada a 2 litros y una botella que contiene una mezcla de gases conocida. Antes de cada prueba siempre se realiza una calibración de todo el sistema. Este sistema permite el cálculo de la frecuencia ventilatoria, el volumen corriente, la fracción espirada de O₂, la fracción espirada de CO₂, la ventilación, el cociente respiratorio y el consumo de oxígeno. Con relación a la frecuencia cardíaca se registró mediante tres electrodos autoadhesivos colocados en posición medioesternal, laterotorácica derecha y laterotorácica izquierda. Los electrodos se conectaron a un monitor HELLIGE Servocard Monitor Compacto SMS 181, que permite un seguimiento continuo de la actividad eléctrica cardíaca. Además, los sujetos se hallaban provistos de un cardiofrecuenciómetro memorizador SPORT TESTER PE3000 que recoge la frecuencia cardíaca continuamente y guarda en memoria un valor medio cada 5 segundos.



Figura 7 – Perspectiva de un atleta realizando el test de capacidad máxima aeróbica en el tapiz rodante del laboratorio de Fisiología del Ejercicio del CAR de Sat Cugat.

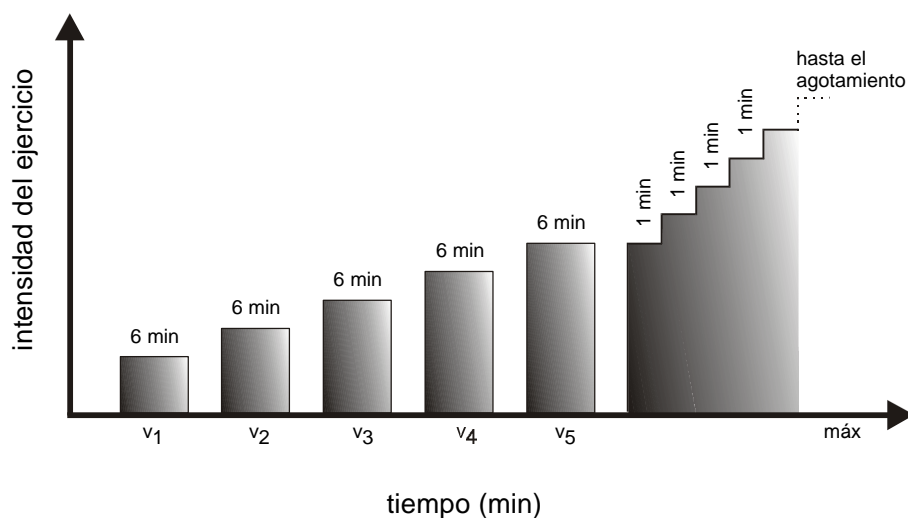


Figura 8 – Esquema del protocolo de ejercicio realizado en tapiz rodante en el CAR.

3.7. Muestras sanguíneas

3.7.1. Lactato

Las mediciones de lactato se tomaron en reposo y al final de cada nivel del test submáximo, al final del test máximo, y también 3 minutos después del final del test máximo en el protocolo de tapiz rodante, realizado en el CAR.

La concentración de lactato sanguíneo se analizó mediante la toma de muestra sanguíneas a nivel del lóbulo de la oreja. Cada muestra sanguínea, 20 μ l de sangre, fue adicionada a 200 μ l de ácido perclórico 0,33 M, se mezcló y centrifugó. El sobrenadante se conservó congelado hasta su análisis. La concentración de lactato se midió enzimáticamente utilizando un espectrofotómetro HITACHI 4020 mediante un test micrométodo (Boheringer Mannheim, Germany) (Rodríguez y col., 1992) .

3.7.1.1. Cálculo del umbral anaeróbico

El umbral anaeróbico fue identificado en cada sujeto por la curva de la velocidad-lactato sanguíneo mediante una ecuación polinomial, como la velocidad (o consumo de

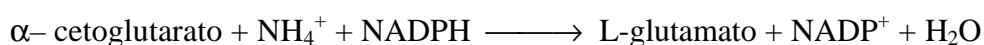
oxígeno) a la que se ha producido un aumento de 1 mM en la concentración de lactato sanguíneo sobre el valor basal observado durante la parte inicial del test (Hagberg y Coyle, 1983).

El OBLA se calculó en la misma curva de velocidad - lactato sanguíneo como la velocidad (o consumo de oxígeno) que ha producido un acúmulo de lactato sanguíneo de 4mM (Sjodin y Jacobs, 1981).

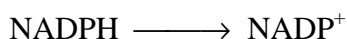
3.7.2. Amonio

Al final del test máximo de tapiz rodante realizado en el CAR, se tomó una muestra de 3 ml de sangre venosa en tubos con anticoagulantes, en la vena antecubital a nivel del antebrazo, y esta muestra fue inmediatamente centrifugada a 4000 rpm durante 10 minutos, separándose el sobrenadante y manteniéndose congelado hasta su uso.

Para la determinación del amonio en dicho sobrenadante se utilizó un método espectrofotométrico basado en la siguiente reacción enzimática catalizada por la glutamato deshidrogenasa (GLDH):



La formación de NADP^+ durante la reacción es equivalente a la cantidad de amonio (NH_4^+) presente en la muestra y la determinación se realiza midiendo espectrofotométricamente la disminución de absorbancia que se produce a 340 nm en el paso de :



Se utilizó para ello un analizador: HITACHI 911 (Boheringuer Mannheim, Germany).

3.8. Descripción del ergómetro utilizado para realizar el protocolo de ejercicio en el interior del imán.

Teniendo en cuenta las limitaciones de espacio (160 x 52 cm) y el alto campo magnético (1,5 Teslas) que encontramos en el interior del túnel de resonancia, hubo que

utilizar un ergómetro apropiado para realizar ejercicio en dichas condiciones (figuras 9 y 10). El aparato permite la realización de un ejercicio de pedaleo alternativo sobre un plano horizontal cuando el deportista se encuentra en posición supina. Teniendo en cuenta que dicho ergómetro debe introducirse dentro de un imán, los materiales utilizados para su fabricación fueron el policarbonato y el polietileno, que son totalmente amagnéticos. El ergómetro está constituido por un conjunto de dos cilindros que se encuentran empalmados en sus extremos mediante un circuito hidráulico. Este circuito presenta una válvula que regula el paso del agua de un cilindro al otro. Cada cilindro tiene un pistón provisto de unos aros de caucho-neopreno para evitar fugas de agua. Las bielas de los pistones terminan en dos pedales con guía que pueden desplazarse unos 13 cm. En el interior del pedal derecho se ha colocado un transductor de fuerza piezoeléctrico (KISTLER Instrumente AG, Winterthur, Switzerland) que permite recoger los datos mecánicos. Es la única parte metálica del sistema, pero que al hallarse bien sujeta, lejos de la bobina de superficie y de la zona de máxima homogeneidad del campo magnético, no interfiere en la detección del espectro de RMN. El conjunto descrito hasta ahora se halla fijado sobre una plancha de mayores dimensiones que sirve de camilla. En su extremo superior se han colocado dos tacos de plástico, forrados de caucho, que sirven de topes para los hombros con lo que evita que el deportista se deslice hacia arriba (Gonzalez de Suso y col., 1993a).



Figura 9 – Vista del ergómetro donde podemos distinguir los pedales y el circuito hidráulico, que está compuesto por dos cilindros con sus respectivos pistones y la válvula que permite el control de la resistencia al pedaleo.



Figura 10 - Vista del ergómetro entrando en el túnel del espectrómetro.

3.9. Protocolo de ejercicio de MRS en el CAR

Para familiarizarse con el experimento de ejercicio para MRS, todos los sujetos realizaron un test en un ergómetro que permite la flexión y la extensión de ambas las piernas alternativamente, mientras están en una posición supina. El ergómetro consiste de dos pedales conectados a un sistema hidráulico. Este sistema es el descrito por González de Suso y col., (1993a). El protocolo de ejercicio fue realizado dentro de un túnel de madera con las mismas dimensiones del imán usado en el experimento de MRS. El ejercicio fue realizado a 60 ciclos por minuto para ambas piernas, durante “n” períodos de 180 segundos hasta la fatiga. Se empezó con una resistencia al pedaleo que provocaba un desarrollo de potencia de 15 W variándose el cierre de la válvula de manera que la potencia desarrollada aumentaba 5 W cada minuto. El último valor de cierre de la válvula usado fue el equivalente al cierre utilizado para el protocolo de ejercicio realizado con posterioridad durante el experimento de MRS en el CDP.

3.10. Protocolo de ejercicio de MRS realizado en el CDP

El ergómetro utilizado en el Centre Diagnòstic Pedralbes (CDP) fue descrito por González de Suso y col., (1993a). El protocolo de ejercicio fue realizado en el interior del túnel de resonancia (160 x 52 cm). El ejercicio fue realizado a 60 ciclos por minuto para ambas piernas durante tres niveles de 2 minutos de ejercicio, a una intensidad de aproximadamente 93% de la potencia máxima de cada sujeto obtenida en protocolo de MRS en el CAR, separados por 1 minuto de reposo pasivo (figura 11). El nivel de cierre de la válvula se escogió, en el ergómetro del CAR para cada sujeto, para generar fatiga si se intentaba realizar un cuarto palier.

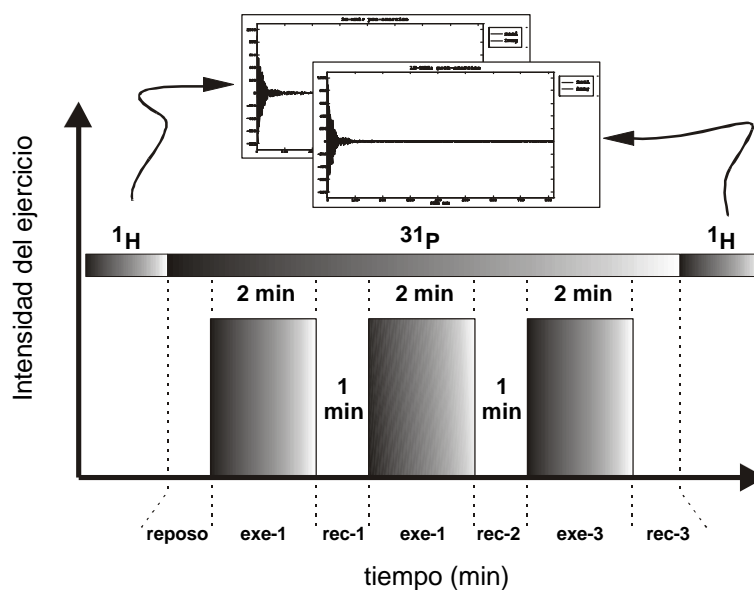


Figura 11 – Representación esquemática del protocolo de ejercicio de MRS realizado en el CDP.

3.11. Medición de la fuerza en el ergómetro

Los datos mecánicos son recogidos por un transductor de fuerza piezoeléctrico (KISTLER Instrumente AG, Winterthur, Switzerland) localizado en el interior del pedal derecho del ergómetro. Después de ser recogidos, estos datos son grabados en un ordenador PC compatible, y a través de un software Global Lab versión 2.1, se calcula la fuerza desarrollada. La valoración de la fuerza se realizó sobre la representación del registro de fuerza efectuada en cada pedalada (figura 12). La figura 13 representa los registros de fuerza en todos los palieres conforme el análisis del software Global Lab.

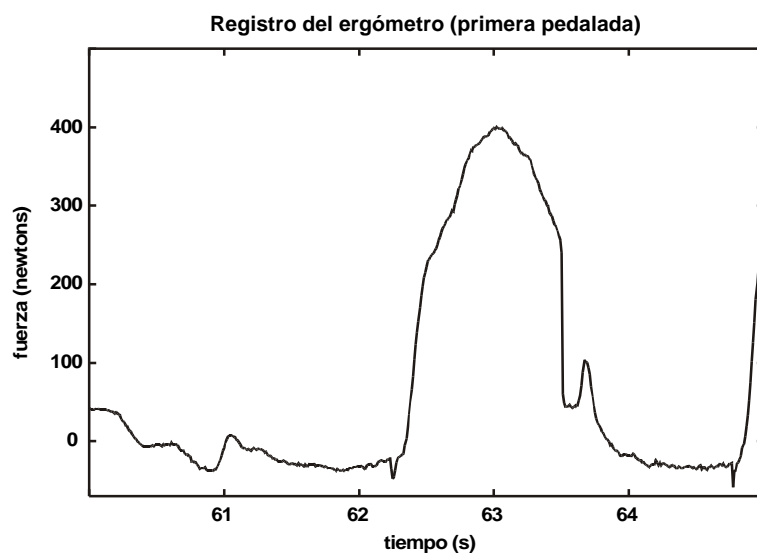


Figura 12 – Registro de la fuerza medida en una pedalada

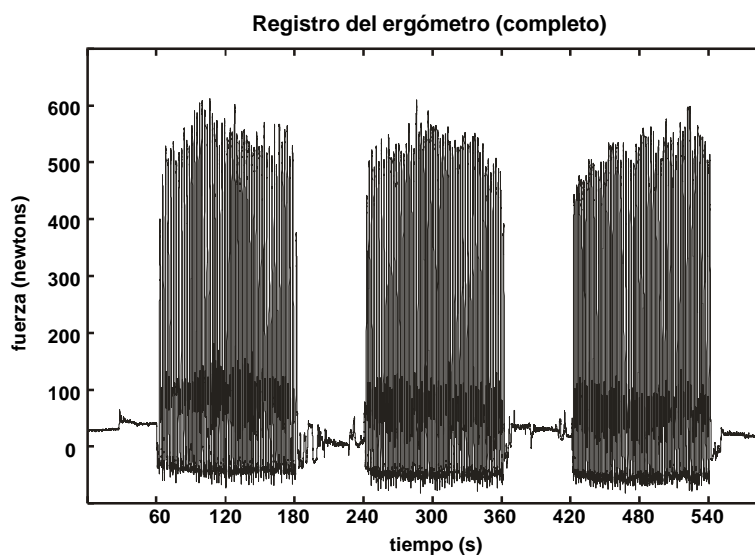


Figura 13 - Registro de la fuerza medida en los tres palieres del protocolo ejercicio de MRS realizado en el CDP por parte de un fondista (JG).

3.12. Cálculo de la potencia realizada

Con la obtención de los registros de fuerza a través del software Global Lab, se calculó la potencia, en vatios, desarrollada teniendo en cuenta la frecuencia de pedaleo real (aproximadamente 55-60 pedaladas por minuto) y el desplazamiento del pedal (D) de aproximadamente 0,125 m. El cálculo de la potencia (P) se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$P = (F \times D) / t \quad [2]$$

donde : la P es la potencia (w), la F la fuerza (N), la D es el desplazamiento del pedal (m), y la t es el tiempo (s).

3.13. Escala del esfuerzo percibido (RPE)

La escala del esfuerzo percibido (RPE) ha sido propuesta para su uso en la programación de la intensidad de ejercicio. Con este método, los individuos clasifican subjetivamente la intensidad que creen que están haciendo ejercicio. Una clasificación numérica determinada se asocia a la intensidad relativa percibida por el sujeto. Cuando se usa la escala RPE correctamente, este sistema para controlar la intensidad del ejercicio ha demostrado ser muy preciso. Usando la escala de Borg original (Borg, 1962), que es una escala que abarca desde 6 hasta 20 (tabla 2). La valoración del esfuerzo percibido (Ratio of Perceived Exertion, RPE) en el transcurso de una prueba de potencia aeróbica permite conocer cual es la evaluación cognitiva de los individuos respecto a su estado, en el transcurso del protocolo de ejercicio. La evaluación situacional sobre el propio esfuerzo es un proceso cognitivo que, en el entorno natural de competición, puede depender en parte de aspectos perceptivos de adaptación psico-física (niveles de tensión muscular, sensaciones dolorosas, percepción del movimiento, etc...) y en parte de aspectos de adaptación psicosocial (importancia de la competición, comparación con el nivel de los rivales, expectativas sobre el propio rendimiento, etc...).

Es obvio que en pruebas de laboratorio estas condiciones varían respecto al entorno natural, no obstante la investigación realizada sobre la valoración de la RPE considera esta medida como un buen indicador para determinar la variación psicofísica global experimentada por el sujeto, más aún que una sola variable fisiológica tomada de forma aislada (Borg, 1962).

Tabla 2 – Escala de Borg del esfuerzo percibido	
Clasificación	Escala de 15 niveles de esfuerzo percibido
<i>6</i>	
<i>7</i>	Muy, muy leve
<i>8</i>	
<i>9</i>	Muy leve
<i>10</i>	
<i>11</i>	Bastante leve
<i>12</i>	
<i>13</i>	Un poco duro
<i>14</i>	
<i>15</i>	Duro
<i>16</i>	
<i>17</i>	Muy duro
<i>18</i>	
<i>19</i>	Muy, muy duro
<i>20</i>	

El método propuesto por Borg (1962) consiste en una escala de valoración que permite un aumento lineal (no exponencial) del esfuerzo percibido respecto a la variación de parámetros como la carga de trabajo y la frecuencia cardíaca. El objetivo era crear una escala para lograr puntuaciones de RPE que permitieran las comparaciones interindividuales. Borg (1962) asume que el rango total entre la percepción de lo que podríamos llamar ruido de base y la percepción del máximo esfuerzo posible, es aproximadamente igual en todos los individuos, a pesar del hecho de que el rango real de estímulos entre cero y la intensidad máxima puede ser diferente dependiendo de la intensidad máxima de estímulo que el sujeto sea capaz de lograr.

Aunque Borg (1962) probó cuatro métodos para evaluar la RPE, mediante pruebas de cargas constante y mediante pruebas de carga variable, estableció que el sistema finalmente presentado proporcionaba las mejores correlaciones con la frecuencia cardíaca y la carga de trabajo entre otros parámetros objetivos del esfuerzo. La escala presenta un rango de intervalos distribuidos entre el esfuerzo percibido cero y el esfuerzo percibido máximo. Este rango está consensuado por todos los individuos, los cuales deben expresar en que intervalo creen hallarse, no el nivel preciso de la magnitud de su esfuerzo. En la escala de categorías está establecido el orden de los intervalos pero no así las distancias proporcionales entre los mismos.

3.14. Experimental de Resonancia Magnética (MR)

3.14.1. Espectroscopía e imagen de resonancia magnética

Las medidas de MR fueron hechas transcurridas como mínimo 3 horas desde la última comida de los sujetos. Se utilizó un espectrómetro Signa Advantage de 1,5 T (General Electric Medical Systems) equipado con la versión del software 4,8 . Los sujetos fueron examinados en posición supina.

3.14.2. Procedimientos de Resonancia Magnética (RM) para ¹H-MRS

Los sujetos se presentaron en la unidad de RMN del Centre Diagnòstic Pedralbes, como mínimo tres horas después de su última comida, para los protocolos experimentales de ¹H y ³¹P. Los estudios de RM fueron llevados a cabo en un aparato de resonancia magnética con una bobina de rodilla estándar (figuras 14 y 15). En cada protocolo experimental los sujetos permanecieron tumbados en posición supina con la pierna

derecha alineada con el eje longitudinal del imán e inmovilizada con un vendaje firme. La pierna izquierda fue sujeta por fuera de la bobina con almohadillas. Se realizó una marca en la piel, y fue medida con una cinta la distancia de la marca hasta la rodilla, para saber la distancia correcta en la porción media del vasto medial (VM) para tener como referencia la misma región para la realización del protocolo experimental antes y después del período de suplementación, y se situó dicha marcación en el isocentro del imán. Tras ser posicionados, se recordó a los sujetos que se abstuvieran de moverse mientras se llevaba a cabo el protocolo estático de $^1\text{H-MRS}$.



Figura 14 – Vista general de la bobina de rodilla



Figura 15 – Vista general del imán superconductor que genera un campo magnético de 1,5 T. Para realizar la exploración la persona se introduce dentro del túnel, que tiene una dimensión de 160x52 cm, de manera que la región que se desea estudiar se encuentre centrada en su interior en la zona máxima homogeneidad del campo magnético.

3.14.3. Ajuste de los parámetros espectrales para ^1H -MRS

Antes de iniciar la adquisición de los espectros de MR es necesario el ajuste de diferentes parámetros:

Amplificación del transmisor y del receptor de la señal.

Frecuencia central del espectro.

Mejora de la homogeneidad del campo magnético en el vóxel de interés.

Duración del pulso de supresión de la señal del agua.

Inicialmente estos parámetros eran automáticamente ajustados utilizando la opción APS (Auto PreScan), que tardaba unos cuatro minutos en calcular y almacenar los valores optimizados. En algunos casos este sistema no pudo ajustar uno o varios de los parámetros y entonces se procedía a un ajuste manual, proceso más largo que podía ocupar entre diez y veinte minutos.

Posteriormente, los espectros fueron obtenidos con el protocolo PROBE/SVTM (Single Voxel Protón Brain Exam) para el ^1H (Kohler, 1993) del cual está provisto el espectrómetro Signa utilizado. Este protocolo incluye el ajuste de todos los parámetros anteriores así como la adquisición del espectro localizado con la secuencia de pulsos predefinido, de manera que la adquisición es más automatizada. Los espectros PROBE resultan también más fáciles de procesar, ya que se puede utilizar la FID del agua para realizar una corrección automática de la fase, lo cual facilita el procesamiento posterior del FID.

3.14.4. Presaturación del agua

La supresión de la señal del agua en los espectros de ^1H se conseguía mediante la aplicación de pulsos de radiofrecuencia diseñados para excitar una banda de frecuencias de 50 Hz centrada en la posición de esta señal. El pulso se ajusta de manera que la magnetización del agua caiga sobre el plano transversal y seguidamente es desfasada mediante la aplicación de un pulso de gradiente dispersivo; en este momento no hay magnetización neta del agua y la señal está completamente suprimida. Sin embargo, debido a fenómenos de relajación T_1 , entre el final de la aplicación del gradiente dispersivo y el inicio de la adquisición de la FID puede producirse recuperación de la señal del agua, por lo que el pulso de presaturación se ajusta para desplazar la

magnetización del agua algo más de 90° , en general sobre unos 120° , con el objetivo de compensar esta relajación T_1 . En la práctica se aplicaba una secuencia llamada CHES (Chemical Shift Selective Imaging Sequence) de tres pulsos de radiofrecuencia seguidos por gradientes dispersivos según se esquematiza en la figura 16.

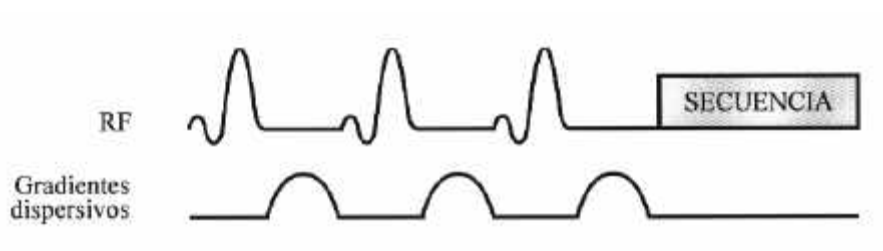


Figura 16 – Esquema de la secuencia CHES, utilizada para la presaturación de la señal del agua en los espectros de ^1H .

3.14.5. Secuencias de localización y excitación del voxel de interés

Se utilizó una secuencia, STEAM (Stimulated Echo Acquisition Mode), para la obtención de espectros de ^1H del volumen seleccionado. Esta secuencia es la más ampliamente utilizada para la exploración “in vivo” del músculo, ya que permite una localización fácil y precisa del volumen a observar, no presenta artefactos, es bastante robusta respecto a la degradación de la señal con el movimiento y es fácil de utilizar en el contexto clínico. La selección del volumen de interés se lleva a cabo mediante la aplicación de gradientes magnéticos en coordinación con los pulsos de radiofrecuencia, de manera que en cada pulso tan sólo los núcleos sometidos al campo magnético apropiado sean excitados. En este sentido, se hace necesaria la aplicación de al menos tres pulsos selectivos de radiofrecuencia en presencia de gradientes mutuamente ortogonales de campo magnético (gradientes selectivos) para la localización espacial en una sola adquisición. La explicación de los fundamentos teóricos de dicha secuencia queda fuera de los objetivos de esta tesis. Así, STEAM (Stimulated Echo Acquisition Mode) (Frahm y col., 1987), para la localización tridimensional del volumen a observar utiliza tres pulsos de excitación de 90° , en combinación con gradientes selectivos. Estos tres pulsos seleccionan tres planos ortogonales y en el volumen cuboidal de intersección

de los tres planos generan un “eco estimulado”, cuya señal es recogida y procesada. Además de este eco estimulado se generan otras señales (de los planos excitados y de sus intersecciones) que son eliminadas por la aplicación de gradientes de dispersión. La adquisición comienza pasado un tiempo $TE + TM$, donde TE es el tiempo de eco y TM el tiempo de mezcla. Los primeros pulsos de excitación están separados un tiempo $TE/2$; tras un tiempo TM se aplica el tercer pulso y la FID es recogida pasado un tiempo $TE/2$. La secuencia aparece esquematizada en la figura 17.

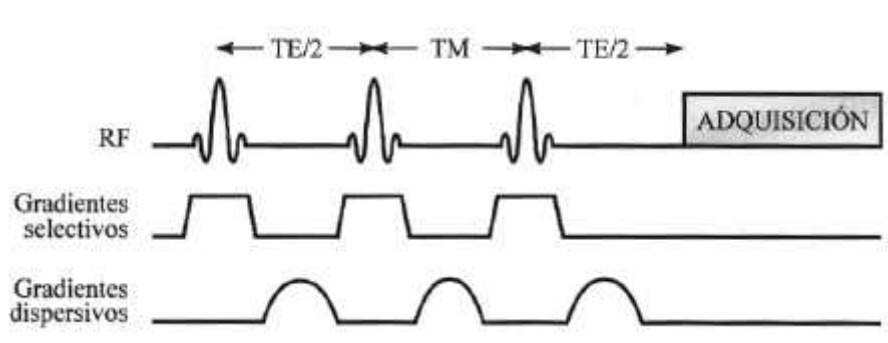


Figura 17 - Esquema de la secuencia de adquisición de voxel único STEAM para MRS de 1H . Los tres pulsos de radiofrecuencia (RF) son de 90° ,

La principal limitación de esta secuencia es que, debido a la naturaleza del eco estimulado, la señal recogida representa tan sólo la mitad de la que se podría obtener generando un eco de espín. Su principal ventaja frente a otra secuencia existente (PRESS), es la posibilidad de utilizar TE mas cortos, lo que permite observar sistemas de espín complejos tales como glutamato, glutamina, taurina o mio-inositol.

Los principales parámetros utilizados para la adquisición de los espectros, que se centran en la frecuencia del agua, se hallan recogidos en la tabla 3. Este protocolo agrupa las adquisiciones en grupos de 8, constituyendo cada grupo una FID suma (Free Induction Decay), donde las 4 primeras (32 adquisiciones en total) son FID sin presaturación del agua y el resto han sido adquiridas con presaturación. Estas últimas constituyen las FID llamadas de “metabolito”, frente a las 4 primeras que son las FID del “agua”. El número de adquisiciones para la FID de metabolito se fijó en 256, con lo

que se obtenían 32 FID suma de metabolito, además de las 4 FID suma de agua. Como referencia de desplazamiento químico se utilizó la resonancia del agua en el espectro no suprimido a 4,7 ppm.

Tabla 3 - Parámetros de los espectros de MRS adquiridos “in vivo”

Parámetro	Valor
Número de puntos para la digitalización de la FID	2.048
SW (a)	2.500 Hz
Número de adquisiciones	256
TM (b) STEAM	13,7 ms
TE (c) STEAM	20 ms

(a) Anchura de la ventana espectral

(b) Tiempo de mezcla

(c) Tiempo de eco

3.14.6. Procesamiento de los espectros “in vivo” de ^1H -MRS

Los espectros “in vivo” fueron procesados utilizando el paquete de software MRUI (Magnetic Resonance User Interface), desarrollado y cedido por el Dr. Aad van den Boogart y col. (van den Boogart, 1997). MRUI es un entorno gráfico que posibilita al espectroscopista no especializado en matemática e informática la aplicación de algoritmos de procesamiento de las señales en el dominio del tiempo para la extracción de parámetros de los espectros que puedan traducirse en información bioquímica (van den Boogaart, 1997). Se utilizó la versión 96.1 con el programa MATLAB como soporte en una estación de trabajo Sun SPARC-4.

El procesamiento incluyó los pasos, explicados en los apartados siguientes:

Conversión de la FID del formato General Electric al formato MATLAB.

Corrección de la forma de las resonancias, posible tan sólo en las FID adquiridas mediante el protocolo PROBE/SVTM de General Electric.

Filtrado de la señal residual del agua mediante HLSVD (Hankel Lanczos Singular Value Decomposition).

Selección de las resonancias de interés

Estimación de áreas y anchuras de banda de las resonancias seleccionadas mediante AMARES (Advanced Method for Accurate and Efficient Spectral fitting).

La FID obtenida tras un experimento de RMN está formada por una serie de valores de amplitud en el dominio del tiempo, que pueden convertirse mediante una transformada de Fourier (FT) en un espectro en el dominio de las frecuencias. Sin embargo todas las etapas del procesamiento, así como los algoritmos utilizados por MRUI para la estimación de parámetros espectrales, actúan en el dominio del tiempo, aunque el entorno MRUI permite la visualización del espectro en el dominio de las frecuencias.

3.14.6.1. Conversión de las FID

Las FIDs se adquirieron bien directamente, bien utilizando el protocolo PROBE/SVTM a partir del momento en que éste estuvo disponible. En el primer caso se obtenían FID sencillas, formadas por la adición secuencial de 256 adquisiciones, mientras que los espectros PROBE contenían 4 FID de agua y 32 FID suma de metabolito (cada una de ellas formada por la adición de 8 FID individuales), que eran sumadas para dar lugar a dos FID finales, una de agua y otra de metabolito. Para realizar esta suma se utilizaba el programa SAGE de General Electric, en una estación Sun SPARC-10 conectada directamente al escáner Signa. Se obtenían así FID con el mismo formato que las FID sencillas, que podían ser directamente convertidas a formato MATLAB en MRUI.

3.14.6.2. Corrección de la forma de las resonancias

Las distorsiones de frecuencia y fase en la señal pueden ser corregidas utilizando una FID sin presaturación del agua como referencia. Este método fue propuesto por Klose (1990) y precisa de dos FID adquiridas sobre el mismo vóxel, una con y otra sin presaturación de la señal del agua. Esta opción es tan sólo posible en el caso de los ficheros PROBE, ya que disponen de una FID sin presaturación del agua ($x_w(t)$), además de la FID de metabolito ($x_M(t)$). Cada FID es una entidad compleja, con magnitud ($|x(t)|$) y fase (f). El término de fase incluye, entre otros parámetros, las modulaciones

de fase y frecuencia causadas por inhomogeneidades del campo magnético y por las “corrientes de Foucolt” que se generan al producirse variaciones en el campo magnético con la aplicación de los gradientes. Así, podemos describir, para la FID del agua:

$$x_M(t) = //x_w(t)// f(t) \quad [4]$$

A partir la señal del agua se calcula un factor de corrección, $C(t)$, suponiendo que $x_w(t)$ contiene una sola resonancia lorentziana en la frecuencia central, la resonancia del agua, que está sometida a las mismas modulaciones de frecuencia y fase que la señal de los metabolitos. $C(t)$ está relacionada con $f(t)$ y al ser aplicado a la FID de metabolito ($x_M(t)$) se obtiene una FID corregida ($x_Z(t)$), cuyas resonancias se acercan más a lorentzianas teóricas y presentan fase cero:

$$X_Z(t) = x_M(t) C(t) \quad [5]$$

Como el factor de corrección es un término de fase y no de magnitud, el algoritmo de corrección de la forma de las resonancias conserva en $x_Z(t)$ la amplitud original de las señales

3.14.6.3. Filtrado de la señal del agua: HLSVD

Las FID PROBE corregidas ($x_Z(t)$) están dominadas aún por una resonancia residual de agua. Para poder realizar un análisis adecuado de las resonancias cercanas a esta señal es necesario eliminarla, y eliminar también sus “colas”, que pueden extenderse a lo largo de una gran parte del espectro. La resonancia residual del agua, parcialmente suprimida, que presentan los espectros resulta distorsionada y no se ajusta a ninguna curva teórica. Para eliminarla se utiliza el método no iterativo de ajuste en el dominio del tiempo HLSVD (de Beer y col., 1992). En esencia, este método ajusta la señal no lorentziana residual a un conjunto de lorentzianas (valores singulares) cuya frecuencia central cae dentro de la región seleccionada para ser filtrada. Se reconstruye a partir de éstas la señal de agua, que es sustraída de la FID original. De esta manera se elimina dicha señal residual, incluidas las colas, sin afectar a las resonancias cercanas, que tienen su frecuencia central fuera de la región del agua.

3.14.6.4. Selección de las resonancias para su posterior ajuste

La asignación de las resonancias presentes en los espectros “in vivo” se realizó principalmente a partir de estudios previos del grupo o de datos de la literatura.

Sobre la FID $x_Z(t)$ transformada mediante FT se seleccionaban las resonancias de interés, marcando su posición central y anchura (que podía ser también estimada a partir de la resonancia del agua). Estos parámetros eran después utilizados como valores iniciales para el cálculo de los parámetros de las resonancias que se realizaba con el programa AMARES.

3.14.6.5. Ajuste en el dominio del tiempo: AMARES

Una vez seleccionadas las resonancias de interés, se procedía a su ajuste a lorentzianas mediante el algoritmo AMARES, que realiza un ajuste en el dominio del tiempo de los parámetros de estas lorentzianas (frecuencia, anchura, área y fase) a partir de los valores estimados iniciales proporcionados. Los valores de área de las lorentzianas teóricas calculadas fueron utilizados para calcular los cocientes de metabolitos con el fin de caracterizar los espectros.

3.14.7. Análisis de datos de 1H - MRS y cuantificación de los metabolitos de interés.

Los FIDs de metabolitos resultantes, una vez filtrada el agua remanente, fueron entonces analizados con AMARES, un algoritmo de ajuste no lineal de mínimos cuadrados que opera también en el dominio del tiempo (Vanhamme y col., 1997). La función modelo en el dominio del tiempo estaba compuesta por cuatro sinusoides correspondientes a cuatro picos gaussianos en el dominio de la frecuencia asignados a las resonancias de interés (p.e.: picos - $(CH_2)_n$ - y $-CH_3$ de ET e IT) más cuatro sinusoides gaussianas y ocho sinusoides amortiguados exponencialmente (correspondientes a picos Lorentzianas en el dominio de la frecuencia) que representaban la mayor parte las otras resonancias presentes en el espectro, para optimizar el ajuste de las resonancias de interés (figura 18).

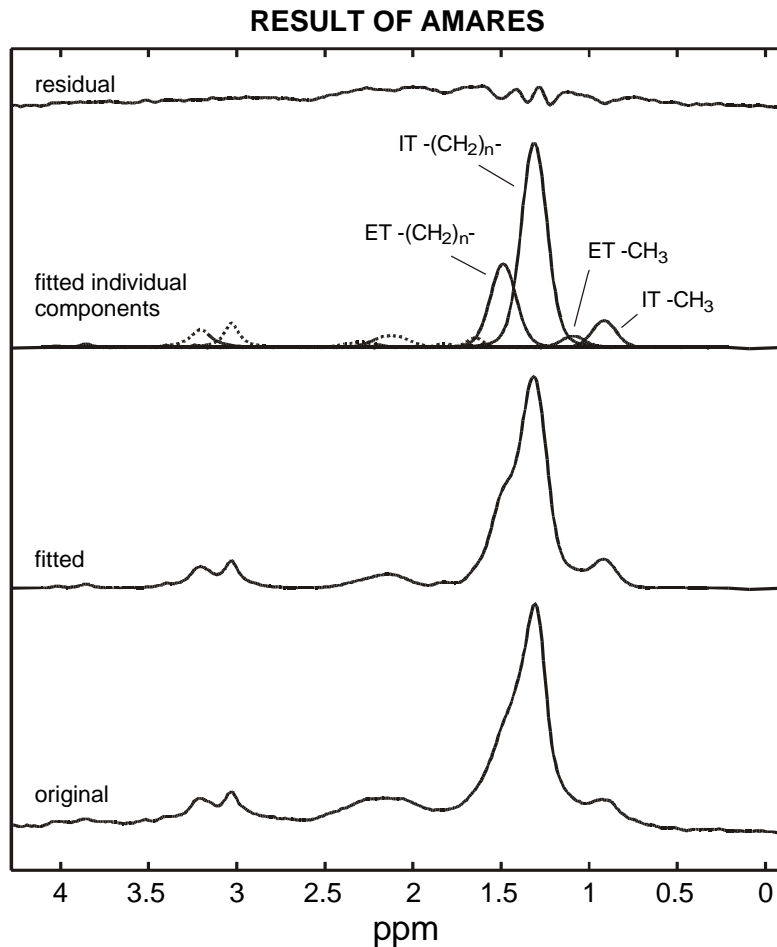


Figura 18 – Espectro típico de ^1H -MRS del músculo vasto medial de un jugador de fútbol . Se muestran, de abajo a arriba, el espectro original, el ajustado mediante AMARES, las resonancias individuales ajustadas, y el residual del ajuste.

Los parámetros espectrales impuestos para el ajuste en el dominio del tiempo fueron: la distancia frecuencial entre las señales IT y ET de origen químico similar, p.e.: provenientes de protones $(-\text{CH}_2)_n$ o $-\text{CH}_3$, se asumió como causado por efectos de susceptibilidad magnética (Schick y col., 1993; Boesch y col., 1997; Szczepaniak y col., 1999) y se consideró equivalente para las dos resonancias ($\delta_{\text{ET},\text{CH}_2} - \delta_{\text{IT},\text{CH}_2} = \delta_{\text{ET},\text{CH}_3} - \delta_{\text{IT},\text{CH}_3}$). Además, el rango de los desplazamientos químicos para los grupos $-\text{CH}_3^-$, $(-\text{CH}_2)_n^-$ de ET, $=\text{C}-\text{CH}_2^-$, y $\text{HOOC}-\text{CH}_2^-$ fueron restringidas a los intervalos entre 1,0-

1,2, 1,4 -1,7, 1,7-1,9 y 2,3-2,5 ppm, respectivamente. Los factores amortiguadores (R) y las amplitudes (a) fueron fijados como $R_{ET,CH_3} = 0.842 R_{ET,CH_2}$ y $R_{IT,CH_3} = 0.842 R_{IT,CH_2}$, y $a_{ET,CH_3} = 0,130 a_{ET,CH_2}$ y $a_{IT,CH_3} = 0,124 a_{IT,CH_2}$, respectivamente, tal como se calculó basándose en la composición típica en ácidos grasos, triglicérido muscular ($C_{55}H_{104}O_6$, que representa palmitoil-estearoil-oleoil) utilizado por Kiens y col., (1993).

La corrección de fase de orden cero y uno fueron estimadas por AMARES. Asimismo la fase relativa de las resonancias entre si se mantuvo a cero. La resonancia del agua fue asimismo cuantificada por AMARES en el FID del agua sin suprimir adquirido del mismo voxel, utilizando una senoide amortiguada exponencialmente (correspondiente a una señal Lorentziana en el dominio de la frecuencia) para modelarla. En este último caso, se dejaron sin restricción todos los parámetros de ajuste. Además, en el caso de los espectros de futbolistas, se extendió el ajuste del espectro de 1H -MRS a las resonancias de creatina total, compuestos conteniendo el grupo trimetilamina (TMA) y taurina. Para ello se tuvo en cuenta el efecto del acoplamiento dipolar descrito para músculo humano (Kreis y col., 1997) sobre dichas resonancias. Concretamente, dicho efecto resulta en que la resonancia de creatina a 3,03 ppm esta constituida por un singlete superpuesto a un doblete, mientras que la resonancia de creatina a 3,91 ppm aparece como un doblete. En nuestro caso, se adoptó un tratamiento simplificado del patrón espectral, y unicamente se intentaron ajustar de manera óptima las resonancias de creatina, mientras que las de taurina se ajustaron a un doblete de picos anchos y el TMA se ajustó a un único pico. Los valores iniciales para el ajuste se detallan a continuación. En el caso de las resonancias $-N-CH_3$ de la creatina, se restringió la posición del pico central entre 3,00 y 3,07 ppm con los picos debidos al acoplamiento dipolar a ± 8 Hz, y con intensidad y anchura de banda equivalentes entre ellos. Las resonancias de creatina ($-N-CH_2-$) y taurina $-CH_2-$ se ajustaron a dobletes con el mismo acoplamiento dipolar y frecuencias de resonancia en el rango 3,80 – 3,88 y 3,40 – 3,45 , respectivamente. La resonancia de TMA ($-N-CH_3$)₃ se limitó el rango 3,13 – 3,27 ppm. El resto de parámetros del ajuste no detallados se dejaron libres para su optimización por el programa de ajuste.

Las áreas calculadas fueron corregidas a continuación por los efectos de la saturación diferencial usando los tiempos de relajación longitudinal (T_1) y transversal (T_2) de las resonancias de interés en lípidos y agua, aplicando las siguientes fórmulas:

$$A = A_{T1} \times (1 - e^{-TR/T1}) \quad (\text{efecto T1}) \quad [5]$$

$$A = A_{T2} \times e^{-TE/T2} \quad (\text{efecto T2}) \quad [6]$$

Sendo A el area obtenida experimentalmente para cada resonancia en las condiciones de adquisición empleadas, A_{T1} y A_{T2} las áreas esperadas una vez corregidas por el efecto del tiempo de eco usado (20 ms), A_{T2} y por el tiempo de reciclaje corto (2s) A_{T1} . El valor de la área final corregida Af se obtenia combinando las dos expresiones :

$$Af = A / (1 - e^{-TR/T1}) e^{-TE/T2} \quad [7]$$

Sendo el TR 2s, el TE 20 ms , T_1 el tiempo de relajación longitudinal y T_2 el tiempo de relajación transversal de las resonancias consideradas.

El T_1 utilizado para las resonancias de protones de $(-CH_2-)_n$ y $-CH_3$ de IT y ET fue como había sido determinado por Schick y col., (1993) a TE de 50 ms (280ms y 600ms respectivamente) y, para protones del agua se utilizó la media de los valores descritos en Bruhn y col., (1991) y Schick y col., (1993). El T_2 empleado para protones de IT y ET fue como había sido determinado por Schick y col., (1993) a TE de 50 ms (85ms y 200ms respectivamente) y, para protones del agua se utilizó la media de los valores descritos en Bruhn y col.,(1991), Schick y col.,(1993) y Bottomley y col.,(1997). Se calcularon las concentraciones de IT y ET para cada atleta asumiendo un contenido de agua en el músculo humano del 77% (Bergstrom y col., 1971), una densidad de $1,1 \text{ kg} \cdot \text{l}^{-1}$ de músculo (Mendez y Keys, 1960) y una concentración de agua de $55 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. La molécula media de triglicérido ($C_{55}H_{104}O_6$, que representa palmitoil-estearoil-oleoil-glicerol) usada por Kiens y col., (1993) para calcular el contenido de triglicérido en el músculo fue escogida en este estudio para los cálculos de las concentraciones de IT y ET después de corregir por el número de grupos $-CH_2-$ por molécula de triglicérido.

3.14.8. Experimentos de ^{31}P -MRS

Los espectros de ^{31}P -RMN de reposo se obtuvieron utilizando una bobina emisora/receptora superficial elíptica (6,5 x 14,5 cm) desarrollada previamente por el grupo (González de Suso y col., 1993a) presintonizada a la frecuencia de resonancia del

fósforo. La bobina fue situada y fijada sobre la pierna con una faja elástica encima del músculo vasto medial (figura 19). Se comprobó que el emplazamiento de la bobina era correcto mediante la obtención de 17 imágenes axiales de la pierna. Se utilizó para ello una secuencia de pulsos de eco de spin con un campo de visión de 240 mm de diámetro, un tiempo de repetición (TR) de 600 ms, un tiempo de eco (TE) de 20 ms, y un grosor de sección de 20 mm. Se adquirió una matriz de 256 x 128 con un tiempo total de adquisición de las imágenes de 95 s. Previamente a la adquisición de los espectros de fósforo, se optimizó la homogeneidad del campo magnético sobre el músculo observando la señal del agua en el espectro de protón del músculo mediante el uso de la bobina de cuerpo como emisora y la bobina superficial como receptora. El espectro de ^{31}P -RMN se adquirió utilizando un pulso de 180° en el centro de la bobina. Se recogieron un total de 1024 puntos sobre una amplitud espectral de 2500 Hz. Se acumularon cuatro FIDs a descartar para permitir a la magnetización transversal llegar a un estado de equilibrio seguido de otros 128 que se utilizaron para cada espectro con un tiempo de reciclaje de 2 s. Esto daba un tiempo experimental total de 4,5 minutos por espectro.

En el caso del protocolo dinámico, se utilizaron los mismos parámetros de adquisición. Sin embargo, para permitir una sumación de FID's a posteriori como la descrita en la sección 3.14.9, dichos FID's se adquirieron de una manera continua durante todo el periodo del protocolo de ejercicio descrito en la sección 3.10 con una periodicidad de, aproximadamente, 2 segundos. El disparo de la adquisición de cada FID durante los periodos de ejercicio se realizó tal como se describió previamente al caracterizar el ergómetro (González de Suso y col., 1993a). En esencia, se utilizó una señal acústica para dictar el ritmo de pedaleo de los sujetos (60 ciclos/min.). Cada FID se adquirió de la pierna derecha del sujeto cada 2 s (2 pedaladas). La sincronización entre el pulso de excitación y el final del desplazamiento del pedal se consiguió mediante el sincronizador cardíaco estándar del espectrómetro Signa. Para ello se instaló un interruptor al final del recorrido del pedal derecho del ergómetro de manera que cada vez que el pedal llegaba a este punto y la pierna quedaba completamente extendida y en reposo, dicho interruptor producía una señal que, a través de una interfaz desarrollada por personal técnico de General Electric, producía una señal equivalente a la onda Q del electrocardiograma. Dicha señal actuaba entonces a través del circuito de

sincronización con el ritmo cardíaco disparando la adquisición. Se utilizó un sistema electrocardiográfico Hewlett-Packard 78352 A, acoplado al espectrómetro Signa, para seguir y mostrar digitalmente el correcto seguimiento por parte del sujeto de la frecuencia preestablecida de ejercicio.

Durante los periodos de reposo la periodicidad en la adquisición de las FID's se mantuvo mediante otra interfaz desarrollada también por personal de General Electric que generaba una señal eléctrica de un milivolt de manera continua a la frecuencia predeterminada, en nuestro caso, cada 2 segundos. El paso de una interfaz a otra lo realizaba manualmente uno de los experimentadores. La sumación de las FID's de interés se realizó de la manera detallada en la sección 3.14.9.



Figura 19 – Perspectiva de la bobina emisora/receptora superficial elíptica (6,5 x 14,5 cm) desarrollada previamente por el grupo (González de Suso y col., 1993a) presintonizada a la frecuencia de resonancia del fósforo.

3.14.9. Procesamiento mediante "moving window average" (sumas solapadas) de las FID de ³¹P-MRS obtenidas en los protocolos de ejercicio realizados en el CDP.

Al ser la espectroscopia de RMN una técnica poco sensible, de forma habitual se recurre a la acumulación de varios barridos individuales (scans, FID_i) para obtener una FID con una relación señal-ruido que permita la extracción de la información que contiene,

$$\text{nueva FID} = \sum_i \text{FID}_i$$

Este proceso de acumulación de señales coherentes para mejorar la calidad de la señal resultante no presenta ningún problema cuando la muestra se encuentra en un estado estacionario, por ejemplo, un compuesto químico o un sujeto en reposo. Sin embargo, cuando las señales individuales cambian a lo largo del tiempo, la señal final que se obtiene es un promedio de las señales cambiantes que tiende a preservar los grandes cambios o tendencias a la vez que atenúa las pequeñas variaciones. En otras palabras, causamos un "smoothing" o suavizado de los datos. En todo caso, conviene tener presente que los datos suavizados no contienen ninguna información adicional.

De forma habitual, tal vez por limitaciones instrumentales o por ser la forma tradicional de mejorar la relación señal-ruido en la espectroscopia de RMN, en la RMN dinámica (dynamic spectroscopy) se ha aplicado el método de suavizado conocido como "boxcar averaging" o promedio de "furgones". En este método de suavizado, los datos (FID_i) se dividen en grupos, y cada grupo de datos es remplazado por su centroide (nueva FID). Un mayor tamaño de grupo, que en espectroscopía de RMN se denomina "número de scans", se traduce en un menor nivel de ruido y una pérdida de resolución temporal (Sharaf y col., 1986).

Una forma alternativa de mejorar la relación señal-ruido sin perjudicar la resolución consiste en aplicar el método de suavizado conocido como "moving window averaging", que es una variación del procedimiento anterior. Tal como se muestra en la figura 20 los diferentes grupos se solapan. Asumiendo que el registro de datos esté formado por p FID individuales (FID_i) tendremos que sustituir el centroide de cada grupo por la suma (o promedio aritmético) de los componentes del grupo (Sharaf y col., 1986), así pues,

$$\text{nueva FID}_1 = FID_1 + FID_2 + \dots + FID_{1+m}$$

$$\text{nueva FID}_2 = FID_2 + FID_3 + \dots + FID_{2+m}$$

...

$$\text{nueva FID}_n = FID_n + FID_{n+1} + \dots + FID_{n+m}$$

donde m es el tamaño del grupo (o número de scans), y n es el número de grupos resultantes, que dependerá del número de datos iniciales (p , FID individuales) y del tamaño del grupo (m) según la relación,

$$n = p - m + 1$$

Las principales ventajas y características de este método son,

La relación señal-ruido de los datos promediados es igual a la de los datos individuales (FID_i) multiplicada por la raíz cuadrada del tamaño del grupo (m).

Se mantiene la resolución temporal de los datos originales (FID_i) en el registro reconstruido, por ejemplo, suponiendo que tengamos un $TR = 2$ s, nuestra resolución temporal será de 2 s en vez de los habituales $m \cdot TR$ segundos del método "boxcar averaging".

En la escala de tiempo, se considera que el instante de la adquisición de los datos promediados es el de la adquisición del centroide del grupo.

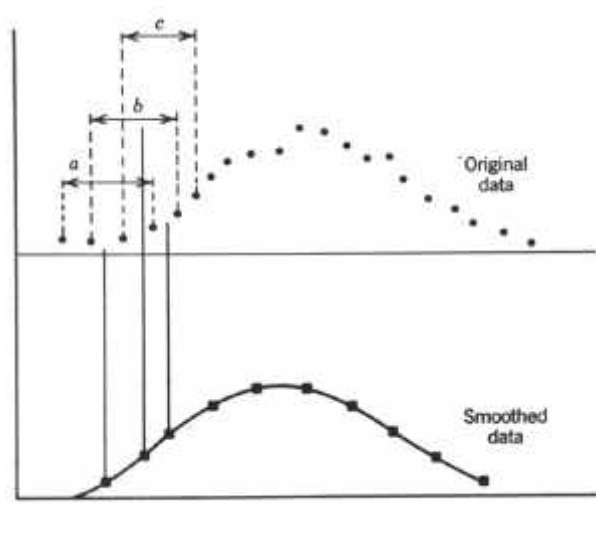


Figura 20 A- Diagrama comparativo de los métodos de suavizado "moving window averaging". Como puede observarse, los datos suavizados usando el método del "moving window averaging" retienen la resolución temporal de los datos originales. (Reproducida de M.A. Sharaf y col. Chemometrics, John Wiley & Sons, New York, 1986, pp. 103 y 104).

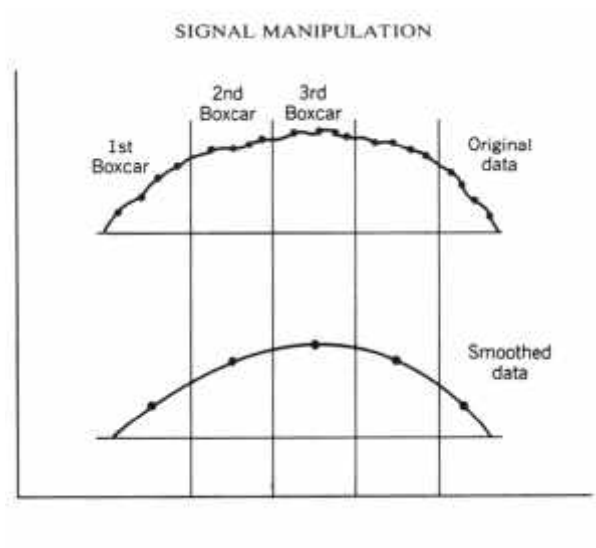


Figura 20 B - Diagrama comparativo de los métodos de suavizado "moving window averaging". Como puede observarse, los datos suavizados usando el método del "moving window averaging" retienen la resolución temporal de los datos originales. (Reproducida de M.A. Sharaf y col. Chemometrics, John Wiley & Sons, New York, 1986, pp. 103 y 104).

3.14.10. Preparación de la referencia externa para ^{31}P -MRS

Como referencia externa de desplazamiento químico y de concentración se utilizó una botella que contenía 5 ml de una disolución 0,5 M de trímero fosfonitrílico clorado ($\text{P}_3\text{N}_3\text{Cl}_6$) en xileno dopado con acetilacetato de cromo ($\text{Cr}(\text{acac})_3$) básicamente como fue descrito por Bottomley y col., (1989 y 1991). El acetilacetato de cromo es soluble, estable y cinéticamente inerte en disolventes orgánicos y produce una única resonancia a 26,8 ppm con respecto a PCr del espectro “in vivo” en reposo a 0 ppm. Con el fin de encontrar la cantidad óptima de agente relajante a usar, calculamos el valor de T_1 de una solución de $\text{P}_3\text{N}_3\text{Cl}_6$ (concentración 0,5 M en xileno) para diferentes concentraciones del agente relajante $\text{Cr}(\text{acac})_3$: 0, 0,25, 0,5, 2,2, 5 y 10 mM (figura 21, tabla 4). Se obtuvieron espectros de RMN de alta resolución utilizando un espectrómetro Bruker AM-400-WB (9,4 Teslas) (Bruker Española, S.A. Madrid, España) del Servicio de RMN de la UAB usando una sonda selectiva de ^{31}P de 10 mm. Las medidas de T_1 se realizaron usando una secuencia de pulsos inversión-recuperación, 90° - τ - 180° , donde τ varió entre 0,05 y 60 s. Se utilizó un tiempo de reciclaje de 62,5 s entre los registros para permitir la relajación completa del núcleo de fósforo en el compuesto de referencia, y se recogieron 8 registros para cada valor de τ . Los valores de T_1 se calcularon mediante el ajuste del área de la resonancia a una función monoexponencial usando el programa de ajuste del espectrómetro Bruker. Dichos valores de T_1 disminuyen al aumentar las concentraciones del agente paramagnético, desde $T_1 = 12,51$ s para $\text{Cr}(\text{acac})_3$ 0 mM a $T_1 = 1,03$ s para $\text{Cr}(\text{acac})_3$ 10 mM. Por tanto, la concentración de agente relajante finalmente utilizada en el estándar fue de 10 mM.

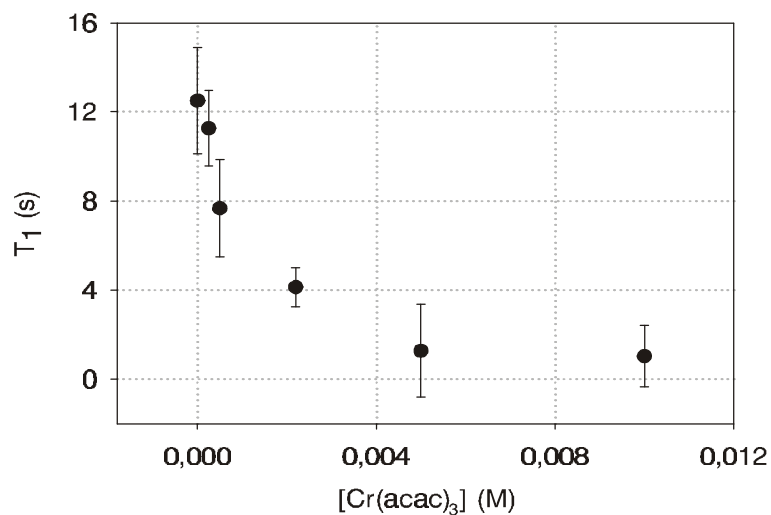


Figura 21 – Representación gráfica de la variación de T_1 del $P_3N_3Cl_6$ al variar la concentración de agente relajante.

Tabla 4 – Valores de T_1 para el fosforo del estándar $P_3N_3Cl_6$ al variar la concentración de agente relajante.

[Cr(acac) ₃] (mM)	T ₁ (s)	SD (s)
0	12,51	2,39
0,25	11,27	1,70
0,50	7,68	2,20
2,20	4,13	0,87
5	1,27	2,08
10	1,03	1,38

3.14.11. Análisis de los espectros de ^{31}P -MRS

Los FIDs de fósforo fueron analizados con AMARES, un algoritmo de ajuste no-lineal de mínimos cuadrados en el dominio de tiempo (Vanhamme y col., 1997). La función modelo en el dominio del tiempo estaba compuesta por 13 sinusoides que se atenúan de manera exponencial y que correspondían a los 13 picos en el dominio de la frecuencia asignados a las resonancias de interés. En concreto: fosfomonoésteres (PME), fosfato inorgánico (Pi), fosfodiésteres (PDE), fosfocreatina (PCr), γ -ATP (2 picos), α -ATP (2 picos), NAD, β -ATP (3 picos). A continuación se detallan las restricciones a la libertad en el ajuste impuestas “a priori” en la función modelo. Las frecuencias de los picos (δ) fueron restringidas de manera laxa para estar dentro del rango de $\delta \pm 14$ Hz, pero no se impuso ninguna restricción derivada de las constantes de acoplamiento escalar (J). Las fases relativas de los picos entre sí (ϕ) se fijaron a cero. La corrección de fase de orden cero y uno se optimizaron mediante AMARES. La fase del espectro se ajustó manualmente, y las correcciones de fase resultantes se usaron como valores iniciales para AMARES. Así, en el procesamiento por lotes “batch” de grupos de espectros de un mismo protocolo experimental (p.e. protocolos de ejercicio para ^{31}P -MRS dentro del imán), se hacía un ajuste manual del primer espectro y este valor de fase se utilizaba para el ajuste final por AMARES de éste y de todos los demás. Las amplitudes de los picos (α) se dejaron sin restricciones para singletes, mientras que se fijaron a las proporciones 1:1 o 1:2:1 para los dobletes (γ -ATP y α -ATP), y los tripletes (β -ATP), respectivamente (figura 22). A los factores amortiguadores de los picos (R) se les dejó sin restricciones para los singletes, y se fijó el mismo valor para los picos pertenecientes a dobletes o tripletes. La anchura de resonancia a media altura del NAD y del Pi se permitió variar en el rango de 0-10 Hz.

Las áreas de las resonancias de interés se han utilizado directamente (unidades arbitrarias) o se han intentado transformar en concentraciones. Para ello se ha corregido cada área por el factor de saturación diferencial calculado a partir de un sujeto con TR de 2 y 30 s (sección 3.14.12). A continuación se ha transformado el área corregida en concentración comparándola con el área del estándar $\text{P}_3\text{N}_3\text{Cl}_6$, también corregida por la saturación diferencial, y con el área del estándar de Pi en una muestra modelo. Dicha muestra consistió en una botella cilíndrica que contenía 2 litros de una disolución 50

mM de KH_2PO_4 a pH 7. La conductividad eléctrica de la disolución se ajustó a la conductividad media del tejido muscular ($0,58 \text{ Siemen} \cdot \text{m}^{-1}$) mediante la adición de NaCl (Rico-Sanz y col., 1999c)

Con el fin de poder comparar con los resultados publicados en otros estudios, las concentraciones de los metabolitos musculares en $\text{mmol}(\text{kg de peso fresco})^{-1}$ fueron convertidas a $\text{mmol}(\text{kg de peso seco})^{-1}$ asumiendo que el 77% de la masa muscular es agua (Bergstrom y col., 1971). El pH intracelular se calculó mediante la fórmula:

$$pH=6,75 + \log \left[\frac{d - 3,27}{5,69 - d} \right] \quad [8]$$

donde d es la distancia del desplazamiento químico en ppm existente entre las resonancias del Pi y de la PCr (Arnold y col., 1984).

RESULT OF AMARES

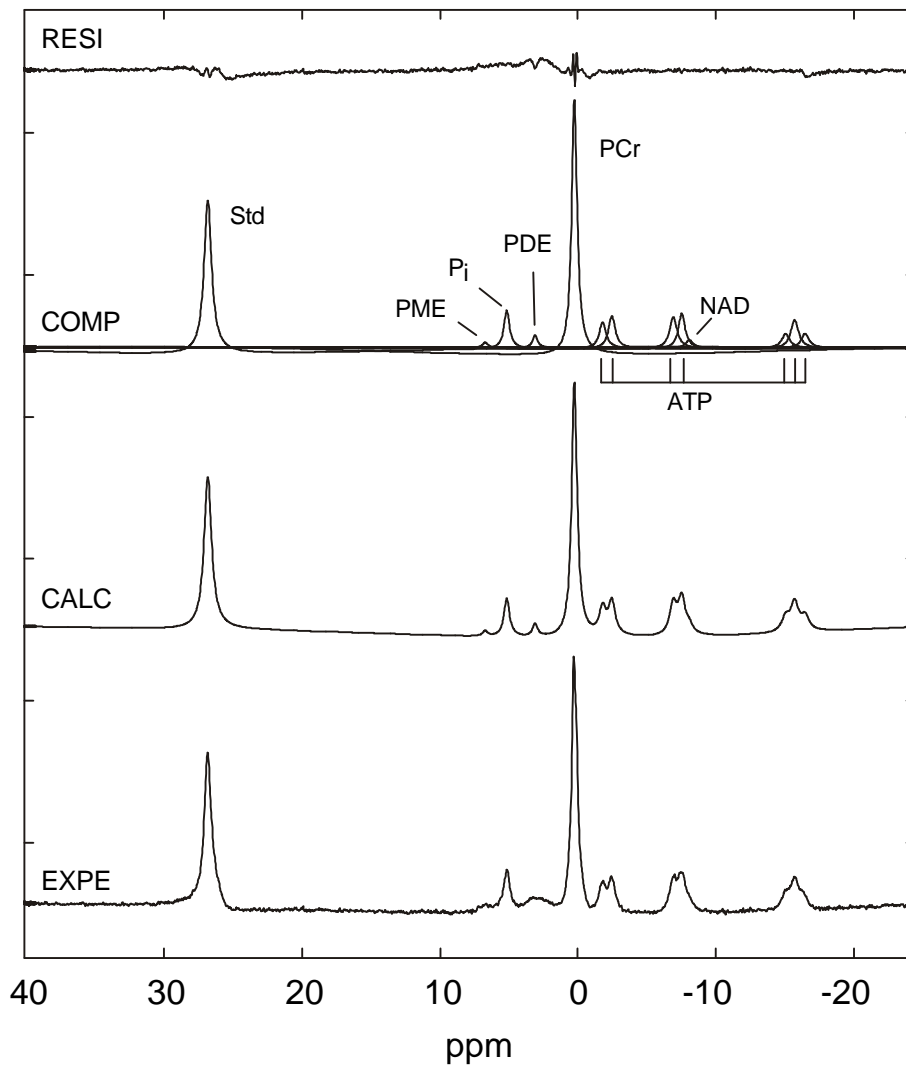


Figura 22 - Espectros típicos de ^{31}P -MRS del músculo vasto medial de un futbolista: espectro experimental (EXPE), calculado (CALC), componentes aislados (COMP) y residuales (RESI) de las resonancias para el estándar externo ($\text{P}_3\text{N}_3\text{Cl}_6$), fosfomonoésteres (PME), fosfato inorgánico (P_i), fosfodiésteres (PDE), fosfocreatina (PCr), NAD y ATP.

3.14.12. Corrección de los espectros de ³¹P-MRS por los efectos de la saturación diferencial.

El tiempo de repetición entre pulsos de 2s escogido para este estudio de ³¹P-MRS requirió correcciones de las áreas de las señales, ya que estas se veían afectadas de manera diferencial en cuanto a su área por tener distintos valores de T₁.

3.14.12.1. Espectros de ³¹P-MRS con tiempo de reciclaje (TR) de 2 segundos.

Cada espectro es el resultado de la suma de las diez FIDs individuales guardadas como FIDs no sumadas en el fichero SV/PROBE correspondiente.

3.14.12.2. Espectros de ³¹P-MRS con tiempo de reciclaje (TR) de 30 segundos.

Se adquirieron treinta FIDs individuales con tiempo de reciclaje (TR) de 30 segundos, con la idea de sumar los espectros resultantes en grupos de 10, de forma que el número total de acumulaciones fuera equivalente al de los espectros con TR de 2 s. Desafortunadamente, debido a un problema relacionado con la configuración del espectrómetro, cada uno de los ficheros SV/PROBE contiene dos FIDs, de las cuales tan sólo la primera corresponde realmente al tiempo de reciclaje (TR) deseado. Por tanto, durante la conversión de los ficheros SV/PROBE se ha descartado sistemáticamente la segunda FID, procediéndose a continuación a sumar los espectros con una sola FID en grupos de diez.

3.14.13. Análisis estadístico de los resultados

Todos los valores se tabularon en forma de promedios y desviación estándar. Para evaluar las alteraciones en las variables de características físicas se utilizó el test-t de student. Para evaluar las posibles alteraciones de las concentraciones de IT y ET se utilizó un test de variancia de análisis de medidas repetidas, verificándose la existencia o no de diferencias significativas mediante el posthoc Scheffe F-test. Por otra parte, para el análisis de la correlación existente entre los distintos parámetros de interés se utilizó el cálculo de correlación de Pearson.

Para el análisis de las variables PCr, Pi y pH en el protocolo experimental de ³¹P-MRS dinámico realizado con los fondistas, se utilizaron modelos lineales mixtos (en colaboración con el Dr. Pere Pujol y el señor Joan Valls del Servei d' Estadística de la

UAB). Dado que las variables se observan bajo diferentes condiciones experimentales, hemos considerado el modelo de medidas repetidas (Littell y col., 1998), siendo el individuo el factor bloque. Las medidas repetidas se definen a partir de la variable ejercicio/recuperación (7 niveles) habiendo considerado diferentes modelos para estimar las correlaciones: “Compound Symmetry”; “Unstructured”; estructura autoregresiva de primer orden (AR(1)); y estructura Toeplitz. El método de estimación utilizado es el Restricted Maximum Likelihood (REML), mediante el paquete estadístico SAS. Para escoger el mejor modelo y validarlo hemos utilizado el método “Akaike Information Criterion” (AIC), basado en la función de verosimilitud con una penalización por el número de parámetros de la matriz de covarianzas. Hemos ajustados modelos tanto a las variables originales como a variables transformadas de las variables originales. Tanto para PCr como Pi hemos considerados las variables:

- PCRABS y PIABS valores absolutos (en unidades arbitrarias) de las áreas de las resonancias de PCr y Pi sin corregir por factores de saturación.
- PCRPREC y PIPREC valor porcentual del incremento (positivo/negativo) respecto del punto anterior temporal considerado en el protocolo dinámico realizado.
- PCRIR y PIIR valor porcentual del incremento (positivo/negativo) de PCR y PI respecto del primer valor de reposo antes de iniciar el protocolo dinámico.
- Para el pH se han considerado únicamente los valores absolutos.

Para el análisis de las variaciones de PCr y Pi el mejor modelo para el ajuste fue el de “Compound Symmetry”, mientras que para el caso del pH y el análisis de la potencia desarrollada el mejor fue el de la “estructura de Toeplitz”. Por otra parte, para el análisis de las variables lactato sanguíneo y percepción subjetiva obtenidos en el protocolo de ejercicio en el test de capacidad aeróbica máxima realizado en el CAR (sección 3.6), el mejor modelo para el ajuste fue el AR1 para la percepción subjetiva y la estructura de Toeplitz para el lactato sanguíneo.

El nivel mínimo aceptado para establecer significación estadística en todos los casos fue de $p < 0,05$, aunque en casos con $0,05 < p < 0,1$ se comenta de manera razonada la existencia de una tendencia de significación.