

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 805**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00

(2006.01)

A61K 38/05

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04781267 .2**

96 Fecha de presentación: **16.08.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1663283**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.06.2006**

54 Título: **Glutamina para su uso en el tratamiento de una lesión**

30 Prioridad:
12.09.2003 US 502574 P
28.01.2004 US 539646 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
31.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
31.10.2012

73 Titular/es:
UNIVERSITY OF COLORADO (100.0%)
4001 DISCOVERY DRIVE, SUITE 390, 588 SYS.
BOULDER, CO 80309, US

72 Inventor/es:
WISCHMEYER, PAUL y
SINGLETON, KRISTEN

74 Agente/Representante:
ZUAZO ARALUZE, Alexander

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ES 2 389 805 T3

DESCRIPCIÓN

Glutamina para su uso en el tratamiento de una lesión.

Antecedentes de la invención

1. Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere al tratamiento de una lesión. Más específicamente, la presente invención se refiere al uso de glutamina para tratar una lesión.

2. Descripción de la técnica relacionada

- 10 Comúnmente, se aplican terapias nutricionales en personas enfermas con el fin de potenciar la capacidad física y la recuperación de estreses debidos a estados médicos. Muchas veces, las recomendaciones incluyen simplemente consejos dietéticos referentes a la distribución de hidratos de carbono, proteínas y grasas en la dieta global. Un enfoque más avanzado es recomendar el aporte complementario de nutrientes clave que ayudarán a la cicatrización y potenciarán el estado físico del individuo. Tales formulaciones nutricionales pueden denominarse "complementos dietéticos", "alimentos funcionales" o "alimentos médicos". Con el fin de formular un alimento médico o funcional o complemento dietético eficaz, es esencial una comprensión de las bases científicas detrás de los ingredientes clave.
- 15 Una vez que se hace una recomendación bien fundada de una modificación de la dieta, puede tener una poderosa influencia sobre la velocidad de recuperación del individuo que tiene mala salud.

- A menudo, personas que se consideran ellas mismas que tienen buena salud con un buen estado nutricional, tienen realmente grados algo subóptimos en ambos parámetros, lo que los pone en riesgo de desarrollar tales estados médicos. Complementos dietéticos, alimentos médicos o funcionales desarrollados para mejorar la función cardiovascular también pueden beneficiar a tales personas como cardioprotectores.
- 20

- En el área de la complementación médicamente recomendada, las dietas artificiales han desempeñado un papel clave durante muchos años. Tras la cirugía, el tubo digestivo de un paciente normalmente no puede digerir alimentos apropiadamente durante varios días. En tales casos, es esencial la nutrición parenteral, en la que se administra al paciente glucosa o una mezcla cuidadosamente formulada de sales, hidratos de carbono, aminoácidos, ácidos grasos y vitaminas. Incluso después de que se le haya retirado al paciente la nutrición parenteral, puede establecerse nutrición enteral con una composición similar por vía oral o mediante un tubo de alimentación, o puede añadirse a su dieta un complemento enteral de alimento médico con el fin de optimizar los tipos y las cantidades de nutrientes que el paciente requiere y recibe.
- 25

- La necesidad más apremiante de regímenes de mantenimiento, rehabilitación y prevención mejorados está en el área de la enfermedad cardiovascular, que es la principal causa de muerte en todo el mundo. Se ha pronosticado que una de cada cinco personas en los Estados Unidos tiene enfermedad cardiovascular. Dentro de este escenario, el infarto de miocardio representa más de medio millón de muertes al año. Además, los supervivientes se enfrentan a un nivel de morbilidad y posterior discapacidad que afecta su estado médico, social y, de igual importancia, económico. Por tanto, sobrevivir al acontecimiento agudo inicial de un infarto de miocardio supone para los pacientes una variedad de desafíos. Tales pacientes pueden quedar en un estado de función cardiovascular comprometida tal como enfermedad isquémica crónica, insuficiencia cardíaca congestiva o flujo sanguíneo periférico reducido.
- 30
- 35

- La insuficiencia cardíaca congestiva puede tener una aparición más insidiosa que la que sigue al infarto de miocardio. La aterosclerosis puede disminuir gradualmente la circulación al corazón o la hipertensión no controlada puede debilitar el músculo cardíaco. Otro estado, cardiomiopatía, puede producirse a partir de una variedad de causas incluyendo isquemia, hipertensión o infección crónica. Cualquiera que sea la causa, estos tipos de enfermedad cardiovascular pueden presentar un cuadro clínico similar y plantean los mismos problemas de tratamiento y mantenimiento que el infarto de miocardio.
- 40

- La enfermedad vascular periférica está estrechamente relacionada con la enfermedad cardiovascular, porque la misma causa subyacente, aterosclerosis, puede alterar la circulación a los músculos esqueléticos, cerebro o riñones, interfiriendo con su función. Un complemento nutricional que beneficie a los sujetos con enfermedad cardiovascular también beneficiará a estos sujetos.
- 45

- A lo largo de los últimos veinte años, la rehabilitación cardíaca ha proporcionado a los supervivientes un aumento de la calidad de vida. Los programas de rehabilitación cardíaca han seguido cambiando para cumplir las necesidades y expectativas de estos individuos aquejados. Un aspecto importante de la rehabilitación satisfactoria es un aumento programado gradual del entrenamiento de ejercicio con una atención a la modificación de factores de riesgo cardíaco existentes. El objetivo final de cualquier programa de rehabilitación cardíaca es la mejora de la capacidad funcional, la disminución de la conciencia de síntomas producidos por la actividad, la reducción de la discapacidad y la modificación de factores de riesgo coronario conocidos para la prevención de acontecimientos cardiovasculares posteriores, es decir, proporcionar cardioprotección. Muchos pacientes sienten plenamente que una buena calidad de vida incluye la capacidad de reanudar su actividad previa a la enfermedad, si es posible.
- 50
- 55

Aunque el aporte complementario nutricional general es el modo convencional de terapia como parte de un programa de manejo de la enfermedad, un programa nutricional más centrado puede tener beneficios más específicos y poderosos. Por ejemplo, la glutamina es útil en el tratamiento de enfermedades del hígado debido a su capacidad de aumentar el flujo sanguíneo al hígado (patente estadounidense n.º 6.001.878). La glutamina también es eficaz en el mantenimiento del sistema inmunitario. Esto se demostró en un estudio en el que hubo un nivel inferior de infección en pacientes tras trasplante de medula ósea cuando su programa nutricional parenteral se complementó con glutamina (Calder y Yapoob 1999). Otro ejemplo es la taurina, que tiene un efecto inotrópico positivo sobre el corazón y puede usarse como tratamiento en insuficiencia cardíaca congestiva. En un ensayo clínico, 4 semanas de aporte complementario de taurina condujeron a una mejora altamente significativa en disnea, palpitación, crepitaciones, edema y clase funcional de la New York Heart Association (Azuma *et al* 1983). Sin embargo, no ha habido descripción de cómo usar la glutamina para prevenir el daño cardíaco o posibles usos de la glutamina para prevenir o tratar otros problemas.

La lesión por reperusión/isquemia miocárdica (R/I) es uno de los factores de estrés potencialmente reversibles más importantes durante el periodo perioperatorio. Debido a la falta de un régimen terapéutico satisfactorio, la profilaxis preoperatoria frente a la lesión R/I miocárdica no es un procedimiento clínicamente rutinario. Esto es particularmente relevante en procedimientos que requieren circulación extracorpórea, tales como injerto de derivación de arterias coronarias (CABG) en el que la lesión R/I miocárdica es una consecuencia inevitable. Dos de los mecanismos principales mediante los cuales puede lograrse la protección del miocardio frente a la lesión R/I incluyen: 1) estimulación de síntesis de proteína de estrés (es decir, proteínas de choque térmico) y 2) prevención de la reducción del adenosín trifosfato (ATP) y una limitación de la acidosis durante la isquemia prolongada.

La glutamina (GLN), considerada tradicionalmente un aminoácido no esencial, ahora parece ser un nutriente condicionalmente esencial durante dolencia o lesión grave. La lesión y dolencia grave ha mostrado un aumento de la utilización de GLN por el intestino, células inflamatorias y el riñón. Estas células que se replican rápidamente consumen selectivamente glutamina por su papel esencial en la síntesis de ácido nucleico y como combustible preferente durante el estrés. En buena salud, la GLN es el aminoácido más abundante en el plasma y el músculo esquelético, pero las concentraciones circulantes y tisulares caen vertiginosamente tras la lesión, cirugía o infección. Específico para procedimientos de CABG en pacientes humanos, la investigación previa demostró que los niveles de GLN plasmáticos circulantes caen en al menos el 30% tras CABG. Datos adicionales indican que la GLN del tejido de miocardio también cae significativamente tras la circulación extracorpórea en pacientes que se someten a CABG.

Una extensa investigación indica que el aporte complementario de GLN puede ser protector contra lesión orgánica o celular *in vitro* e *in vivo*. Adicionalmente, es probable que la caída de GLN plasmática tras lesión o dolencia grave sea perjudicial probablemente para la función de múltiples órganos incluyendo el corazón. Estudios preliminares en sujetos humanos han demostrado que la GLN puede mejorar los desenlaces en varias poblaciones de pacientes. Mecanismos importantes de los efectos protectores de la GLN en el miocardio pueden referirse a la mejora de la síntesis de proteínas de choque térmico tisulares, soporte del metabolismo tisular y la conservación del estado redox tisular.

Las proteínas de choque térmico (HSP) son una familia de proteínas altamente conservadas implicadas en los mecanismos más básicos de protección celular. La expresión de estas proteínas tras un ataque subletal puede inducir "tolerancia al estrés" y proporcionar protección frente a un estrés posterior que de lo contrario sería letal. Datos experimentales han demostrado que la inducción previa de la respuesta de estrés térmico puede proporcionar una protección marcada contra muchas formas de lesión celular, incluyendo lesión por reperusión/isquemia. El papel de las HSP, específicamente HSP 72 (72 se refiere al peso molecular de la proteína), se ha descrito de manera extensa en la protección del miocardio frente a la lesión por reperusión/isquemia (R/I). Específicamente, se ha demostrado que la manipulación genética, que conduce a la sobreexpresión de la HSP 72, limita los efectos perjudiciales de la lesión (R/I) en ratones. Estos hallazgos indican que la expresión de HSP 72 potenciada puede conferir protección significativa contra la lesión R/I. La inducción de HSP para mejorar el desenlace en enfermedad humana no se ha aprovechado porque los agentes de inducción utilizados en el laboratorio son por sí mismos tóxicos y no son relevantes clínicamente. Los agentes usados actualmente para potenciar la expresión de HSP en el laboratorio incluyen hipertermia aguda y metales pesados, tales como arsenito sódico. Estos métodos de potenciación de HSP 72 tienen toxicidad significativa asociada con su uso y por tanto sería deseable un método clínicamente relevante de potenciación de la expresión de HSP 72 para proteger el tejido de miocardio frente a la lesión R/I.

Por tanto, sería útil desarrollar un agente terapéutico para el tratamiento y la prevención del daño cardíaco y otro daño celular que no tenga los efectos secundarios perjudiciales descritos anteriormente. También sería beneficioso desarrollar una manera de aumentar la producción de HSP *in vivo* sin tener que administrar HSP a un paciente.

El documento JP8295633 se refiere a un agente de prevención de complicaciones para pacientes en estado catabólico de proteínas alto. El documento disponible como DATABASE EPODOC EUROPEAN PATENT OFFICE, THE HAGUE, NL, XP002485398 da a conocer un tratamiento de estados de septicemia, politraumatismos y posoperatorios en los que existe una degradación metabólica mediante infusiones que contienen el dipéptido alanil-L-glutamina y diversos aminoácidos. El documento disponible como BASE DE DATOS MEDLINE [en línea] US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, EE.UU.; julio de 1999 (1999-07), WILMORE D W *ET*

AL: "Glutamine in the support of patients following bone marrow transplatation". XP002484419 n.º de registro de la base de datos NLM10453314 da a conocer el uso de dipéptido de glutamina parenteral/intravenoso (o enteral) para pacientes que se someten a quimioterapia citotóxica e irradiación que da como resultado catabolismo grave y alteración de la mucosa intestinal tras el trasplante de médula ósea. El documento disponible como BASE DE DATOS BIOSIS [en línea] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, FILADELFIA, P.A, EE.UU.; 2 de abril de 1998 (02-04-1998), GORINGE A P ET AL: "Glutamine and vitamin E in the treatment of hepatic veno-occlusive disease following high-dose chemotherapy" da a conocer el uso de infusiones de glutamina (como dipéptido) para el tratamiento de enfermedad veno-oclusiva hepática del hígado que es una complicación común tras el trasplante de médula ósea. El documento disponible como BASE DE DATOS BIOSIS [en línea] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, FILADELFIA, PA, EE.UU.; 2002, HOLECEK M ET AL: "Effect of alanyl-glutamine on leucine and protein metabolism in irradiated rats" XP002484421 n.º de registro de la base de datos PREV200200304391 da a conocer el uso en ratas de alanil-glutamina alimentada de manera intragástrica para mejorar las alteraciones causadas por la irradiación. El documento EP0087750 se refiere a preparaciones de aminoácidos que contienen residuos glutamínicos. La publicación por OEHLER ET AL. ("Glutamine depletion impairs cellular stress response in human leucocytes" BRITISH JOURNAL OF NUTRITION vol. 87, n.º SUP.1, 2002, páginas S17 - S21) describe que la proteína de choque térmico HSP70 inducible principal se mejora mediante concentraciones de glutamina altas. El documento US5849335 da a conocer que en episodios de estrés tales como septicemia, lesión, quemaduras, inflamación, diarrea y cirugía, existe un marcado aumento en el consumo de glutamina que conduce a una deficiencia de glutamina.

Sumario de la invención

La invención se refiere a un dipéptido, seleccionándose dicho dipéptido del grupo que consiste en alanil-glutamina, glicil-glutamina, leucil-glutamina, valil-glutamina, isoleucil-glutamina y cisteinil-glutamina para su uso en el tratamiento o la prevención de una lesión, enfermedad o dolencia aguda o crónica; la prevención de lesión por reperusión o isquemia; la protección de órganos para trasplante; atenuación de la inflamación o expresión de citocinas pro-inflamatorias en estados de salud o enfermedad; la prevención o el tratamiento de estrés térmico, termoplejía o cualquier otra lesión o estrés relacionado con la temperatura; mejora del metabolismo tisular; y tratamiento de septicemia; en el que la lesión, enfermedad o dolencia es una de lesión pulmonar, síndrome de dificultad respiratoria aguda, una dolencia autoinmunitaria; artritis, artrosis, artritis reumatoide, lupus, esclerosis múltiple, fibromialgia, enfermedad de Chron, colitis ulcerosa, síndrome del intestino irritable, un ataque al corazón, cirugía cardíaca, angina crónica, arteriopatía coronaria, peritonitis y síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, en el que el medicamento está dispuesto para administrarse en una dosis en bolo intravenoso.

Además, la invención se refiere a un dipéptido, seleccionándose dicho dipéptido del grupo que consiste en alanil-glutamina, glicil-glutamina, leucil-glutamina, valil-glutamina, isoleucil-glutamina y cisteinil-glutamina para su uso en el tratamiento de estados autoinmunitarios y enfermedades inflamatorias sistémicas y locales, con el fin de proteger órganos para trasplante, en el que el medicamento aumenta la expresión de cualquier proteína de choque térmico o factor 1 de choque térmico y en el que el medicamento está dispuesto para administrarse en una dosis en bolo intravenoso.

La invención también se dirige a un dipéptido, seleccionándose dicho dipéptido del grupo que consiste en alanil-glutamina, glicil-glutamina, leucil-glutamina, valil-glutamina, isoleucil-glutamina y cisteinil-glutamina para su uso en la inhibición del daño cutáneo/epitelial debido a radiación UV, lesión por quemadura, envejecimiento o cualquier otro tipo de lesión por radiación, en el que el medicamento aumenta la expresión de cualquier proteína de choque térmico o factor 1 de choque térmico y en el que el medicamento está dispuesto para administrarse en una única dosis en bolo intravenoso. La invención también se refiere a un dipéptido, seleccionándose dicho dipéptido del grupo que consiste en alanil-glutamina, glicil-glutamina, leucil-glutamina, valil-glutamina, isoleucil-glutamina y cisteinil-glutamina para su uso en la inhibición de una lesión cutánea o de la mucosa proveniente de radiación terapéutica o quimioterapia, en el que el medicamento aumenta la expresión de cualquier proteína de choque térmico o factor 1 de choque térmico y en el que el medicamento está dispuesto para administrarse como una dosis en bolo intravenoso, tópica u oral.

Descripción de los dibujos

Otras ventajas de la presente invención se aprecian fácilmente ya que la misma se entiende mejor mediante la referencia a la siguiente descripción detallada, cuando se considera en conexión con los dibujos adjuntos en los que:

La figura 1 es un diagrama de flujo que muestra los mecanismos de los beneficios de la glutamina sobre la lesión por reperusión/miocárdica en pacientes con derivación de arterias coronarias;

Las figuras 2A y B muestran el efecto de respuesta a la dosis de GLN sobre la expresión de HSP 72 en tejido pulmonar y cardíaco en ratas no estresadas;

Las figuras 3A y B muestran el efecto de la GLN sobre la expresión de HSP 72 en corazones de ratas lesionadas por LPS;

La figura 4 es un gráfico que muestra el efecto de la glutamina (GLN) sobre la muerte celular por

isquemia/reperfusión;

Las figuras 5A y B son gráficos que muestran el efecto del tratamiento previo con glutamina (GLN) sobre los índices cardíacos tras: lesión por reperfusión/isquemia en modelo de corazón de rata en funcionamiento;

5 La figura 6 es un gráfico que muestra el efecto de la lesión por reperfusión/isquemia miocárdica sobre la razón ATP/ADP de tejido de miocardio en el modelo de corazón de rata en funcionamiento;

La figura 7 es un gráfico que muestra el efecto de la lesión por reperfusión/isquemia miocárdica sobre el lactato del tejido de miocardio en el modelo de corazón de rata en funcionamiento;

La figura 8 es un gráfico que muestra el efecto de la lesión por reperfusión/isquemia miocárdica sobre el sustrato del tejido de miocardio (glutamato, glutamina y glucosa) en el modelo de corazón de rata en funcionamiento;

10 La figura 9 es un gráfico que muestra el efecto de la lesión por reperfusión/isquemia miocárdica sobre el contenido en glutatión reducido en tejido de miocardio en el modelo de corazón de rata en funcionamiento;

La figura 10 es un gráfico que muestra el efecto de la lesión por reperfusión/isquemia miocárdica sobre el contenido en NAD(+)/ NADH en tejido de miocardio en el modelo de corazón de rata en funcionamiento;

15 La figura 11 son espectros de ¹H-MRS de tejido de miocardio de rata expuesto a isquemia y lesión por reperfusión en el modelo de corazón de rata en funcionamiento;

La figura 12 muestra la ruta mediante la que la glutamina protege a las células epiteliales intestinales por medio de inducciones de HSP 72;

Las figuras 13A y B muestran que la glutamina induce HSP 70 en tejido pulmonar y cardíaco;

La figura 14 es un gráfico que muestra que la glutamina potencia la supervivencia de una lesión por LPS;

20 La figura 15 es una fotografía que muestra que la glutamina potencia la expresión de HSP 70 en tejidos de ratas lesionadas por LPS;

Las figuras 16A y B son gráficos que muestran el efecto de la GLN sobre la liberación de TNF-α e IL-1β a partir de la inyección de LPS;

La figura 17 es un gráfico que muestra que la GLN potencia la expresión de HSP 70 pulmonar;

25 La figura 18 es un gráfico que muestra que la GLN potencia la activación de HSF-1 pulmonar;

La figura 19 es un gráfico que muestra que la glutamina mejora el contenido en fosfato de alta energía tras CLP;

La figura 20 es un gráfico que muestra que la glutamina mejora el contenido en fosfato de alta energía tras CLP;

La figura 21 es un gráfico que muestra que la glutamina mejora la supervivencia tras ligación y punción cecal;

La figura 22 es un gráfico que muestra el gasto cardíaco frente a la reperfusión;

30 La figura 23 es un gráfico que muestra que la glutamina potencia contenido en glutatión miocárdico tras lesión por R/I;

La figura 24 es un gráfico que muestra que la glutamina oral mejora la supervivencia en el modelo de rata de termoplejía experimental;

35 La figura 25 es un gráfico que muestra la expresión de HSP 70 sérica en pacientes gravemente enfermos tras el tratamiento con GLN;

La figura 26 es un gráfico que muestra los niveles de HSP-70 a 1 semana en pacientes que recibieron glutamina en comparación con pacientes control;

La figura 27 es un gráfico que muestra los niveles de HSP-70 a 1 semana en pacientes que recibieron glutamina en comparación con pacientes control;

40 La figura 28 es un gráfico que muestra los niveles de HSP-70 a 1 semana en pacientes que recibieron glutamina en comparación con pacientes control; y

La figura 29 es un gráfico que muestra los niveles de HSP-70 a 1 semana en pacientes que recibieron glutamina en comparación con pacientes control.

Descripción de la invención

De manera general, se da a conocer un tratamiento de una lesión o enfermedad utilizando grandes dosis de glutamina (GLN), un aminoácido condicionalmente esencial. Más específicamente, se da a conocer un tratamiento de única dosis en bolo de GLN en un portador farmacéuticamente aceptable para o bien prevenir o bien tratar una lesión o enfermedad mediante administración a un paciente que lo necesita.

Puede usarse un agente terapéutico que incluye una única dosis en bolo de glutamina para tratar una dolencia aguda, una dolencia crónica, una enfermedad y una lesión. Ejemplos de dolencias, enfermedades y lesiones agudas incluyen, pero no se limitan a, isquemia (tanto cardíaca como renal), trasplante, septicemia, hipotermia, lesión pulmonar, enfermedades inflamatorias sistémicas y locales, estados autoinmunitarios, choque térmico, termoplejía y lesión por reperfusión. Las funciones terapéuticas se basan en la capacidad de la glutamina para prevenir la disfunción metabólica tras la isquemia y reperfusión y que la GLN es un inhibidor de INOS y eNOS. Este tipo de dosificación de glutamina puede mejorar los desenlaces de enfermedades cardíacas tales como arteriopatía coronaria, ataques al corazón y procedimientos de circulación extracorpórea. Adicionalmente, el agente terapéutico puede ser útil en el tratamiento de otros problemas incluyendo, pero sin limitarse a, enfermedades y lesiones asociadas con metabolismo tisular y para aumentar la expresión de proteína de choque térmico o factor-1 de choque térmico *in vivo*.

La glutamina también puede utilizarse en la inhibición o el tratamiento del daño cutáneo/epitelial/de la mucosa. Tal daño puede producirse como resultado de radiación UV, lesión por quemadura, envejecimiento, quimioterapia, radiación terapéutica u otra forma de lesión por radiación.

La glutamina puede administrarse para aumentar sustancialmente la producción de proteína de choque térmico (HSP). La GLN puede usarse para tratar y prevenir dolencias relacionadas con calor tales como, pero sin limitarse a, estrés térmico y termoplejía.

Adicionalmente, la GLN administrada o bien por vía oral o bien en otra forma puede tener un efecto antiinflamatorio/anticitocinas y por tanto puede ser útil en el tratamiento de dolencias inflamatorias tales como, pero sin limitarse a, trastornos autoinmunitarios tales como artritis (incluyendo artrosis y artritis reumatoide), lupus, fibromialgia y otras enfermedades autoinmunitarias relacionadas, enfermedad de Crohn, síndrome del intestino irritable y otras enfermedades que dan como resultado inflamación o aumento de la producción de citocinas.

Adicionalmente, la GLN administrada o bien por vía oral o bien en otra forma puede ser protectora de órganos. En otras palabras, la GLN puede administrarse a un individuo y si se extirpan órganos del individuo, los órganos pueden permanecer viables durante un periodo de tiempo prolongado fuera del cuerpo del individuo. Adicionalmente, la GLN puede administrarse a un órgano, tejido o célula para proporcionar al órgano, tejido o célula protección. El beneficio de una propiedad de este tipo es que si los órganos pueden sobrevivir un periodo de tiempo más largo tras extraerse, entonces hay una mayor probabilidad de que los órganos puedan donarse a otro individuo que los necesite. Los ejemplos de tales órganos que pueden protegerse incluyen, pero no se limitan a, hígado, corazón, pulmones, riñón y otros órganos que pueden extraerse. De manera similar, la GLN puede usarse como parte de un fluido de reanimación o una disolución de conservación de trasplante de órgano en combinación con otros electrolitos. Los ejemplos de tales fluidos/disoluciones incluyen, pero no se limitan a, disolución de lactato de Ringer y otras disoluciones similares conocidas por los expertos en la técnica.

La glutamina se administra como alanil-glutamina, glicil-glutamina, leucil-glutamina, valil-glutamina, isoleucil-glutamina y cisteinil-glutamina. El dipéptido puede solubilizarse fácilmente y aclararse a través del cuerpo en el plazo de unas pocas horas, eliminando por tanto un problema con respecto a la toxicidad. El péptido también puede incluir un nitrógeno terminal acilado. Preferiblemente, el resto acilante para el nitrógeno terminal acilado es acetilo.

La dosificación de glutamina se basa en dosificaciones normales conocidas por los expertos en la técnica usando un portador farmacéuticamente aceptable, que los conocen bien los expertos en la técnica. Más específicamente, la dosificación depende del uso específico de la glutamina, y la forma de administración. Preferiblemente, se altera el portador farmacéutico basándose en el uso previsto de la composición. Adicionalmente, el portador puede alterar/controlar la velocidad de absorción o liberación *in vivo* de la composición al paciente, órgano, tejido o célula. En otras palabras, el portador puede modificarse para permitir la liberación prolongada de glutamina en el sitio de tratamiento. El beneficio de tal liberación es que permite un tratamiento a más largo plazo en el sitio. Adicionalmente, la liberación puede alterarse para conseguir una farmacocinética y farmacodinámica óptimas con el fin de optimizar los resultados del tratamiento.

La GLN puede mejorar los desenlaces de los problemas indicados anteriormente incluyendo, pero sin limitarse a, lesión por reperfusión e isquemia en el corazón cuando se administra como una única dosis. Por ejemplo, una única dosis de dipéptido de glutamina (alanil-glutamina) administrada a una rata 18 horas antes de la lesión del miocardio puede mejorar la función del miocardio tras la lesión por reperfusión e isquemia. Esta protección se debe a la conservación del metabolismo y los niveles de glutatión. Una única dosis de alanil-glutamina funciona por medio de la conservación del metabolismo tisular (contenido en ATP, etc.) y la conservación de los niveles de glutatión tisular. Por ejemplo, la GLN puede administrarse como un gran bolo i.v. antes de la cirugía. El intervalo de dosificación es

preferiblemente de desde 0,1 gramos/kg hasta 2 gramos/kg de glutamina por dosis. De ser necesario, pueden administrarse cantidades adicionales de GLN tras la operación para proporcionar protección sostenida.

La composición de la presente invención puede usarse para administrar alanil-glutamina u otro dipéptido de glutamina a pacientes que llegan a los SU con ataques al corazón, pacientes que llegan para cirugía cardíaca, pacientes con angina crónica o pacientes que presentan síntomas de otros problemas tal como se dio a conocer anteriormente. El beneficio del tratamiento es enorme ya que éste es un aminoácido benigno y relativamente barato. Un beneficio adicional es que, tal como se estableció anteriormente, la GLN se aclara del cuerpo en el plazo de unas pocas horas, por tanto no existe ningún problema con respecto a la toxicidad.

En una descripción más específica del tratamiento dado a conocer anteriormente, la glutamina es protectora contra lesión orgánica o celular *in vitro* e *in vivo*. Los datos proporcionados en el presente documento establecieron que el tratamiento previo con glutamina puede proteger directamente a los cardiomiocitos frente a la muerte celular miocárdica inducida por R/I mientras que se potencia el retorno de la función contráctil. Adicionalmente, la glutamina puede potenciar la expresión de proteínas de choque térmico 72 y 27, que son factores citoprotectores endógenos, en los corazones de animales tanto estresados como no estresados. El tratamiento previo con GLN puede conservar la función del miocardio tras la lesión por R/I. La conservación mediada por GLN de la función del miocardio se encontró que estaba asociada con marcadores mejorados del metabolismo del tejido de miocardio incluyendo una razón ATP/ADP, contenido en ATP total y contenido en creatina/fosfocreatina total mejorados tras la lesión por R/I. Adicionalmente, el tratamiento previo con GLN condujo a niveles de sustrato potenciados de glutamato (un sustrato clave en el miocardio isquémico) antes de la lesión por R/I y niveles tisulares potenciados de glutamato, glutamina y glucosa tras la lesión por R/I. Estos tejidos también demostraron un contenido en NAD (+)/NADH total y glutatión reducido potenciado que indica una reducción de la generación de oxidantes tisulares tras la lesión por R/I (estado redox mejorado) y conservación de la fosforilación oxidativa mitocondrial. Este estudio implicaba la conservación de metabolitos celulares en la prevención de la lesión por R/I miocárdica. Finalmente, datos recientes indican que GLN oral a baja dosis puede retrasar el comienzo de la isquemia en pacientes con angina crónica estable conocida.

Adicionalmente, la glutamina (GLN) protege contra la mortalidad inducida por endotoxinas. Sin embargo, se desconoce el efecto de la GLN tras la ligación cecal y punción doble (2CLP), un modelo clínicamente más relevante de septicemia en seres humanos. Adicionalmente, niveles de interleucina-18 (IL-18) aumentados parecen desempeñar un papel crítico en la insuficiencia orgánica inducida por citocinas y pueden ser predictivos de la mortalidad en pacientes con septicemia. El tratamiento posterior con GLN atenúa la expresión de citocinas proinflamatorias (IL-18, IL-6 y TNF- α), potencia la expresión de proteína de choque térmico 72 (HSP 72) pulmonar y mejora la supervivencia tras 2CLP. Se sometieron ratas Sprague-Dawley (250-300 g) a 2CLP y una hora tras la cirugía se les administró una única dosis de GLN (0,75 g/kg) (n=18) o una disolución salina equilibrada (control) (n=17). Se monitorizó la supervivencia durante cinco días. En un grupo separado de animales, se extrajo sangre a múltiples puntos de tiempo para el análisis de la expresión de citocinas (IL-18, IL-6 TNF- α e IL-10). Se extrajo tejido pulmonar para el análisis de HSP 72. La administración de GLN una hora tras 2CLP atenuó significativamente la expresión de IL-18 a las 12, 18 y 24 horas tras 2CLP (p < 0,05). La expresión de IL-6 y TNF- α se atenuó a las 6 horas tras 2CLP (p < 0,05). La GLN potenció la expresión de HSP 72 pulmonar frente al control (p < 0,05) tras 2CLP. Finalmente, la GLN disminuyó la tasa de mortalidad a los 5 días desde el 42% hasta el 78% (p < 0,04) tras 2CLP. Los datos indican que la GLN puede mejorar notablemente la supervivencia de 2CLP. Los posibles mecanismos para esta protección incluyen la atenuación de la expresión de citocinas proinflamatorias y la expresión de HSP 72 pulmonar potenciada. Adicionalmente, esta es la primera descripción de la expresión de IL-18 en el modelo de 2CLP. Estos datos indican que una única dosis de GLN administrada como tratamiento posterior puede atenuar el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) y prevenir la mortalidad de la septicemia polimicrobiana.

La invención se describe adicionalmente en detalle mediante referencia a los siguientes ejemplos experimentales. Estos ejemplos sólo se proporcionan para el fin de ilustración, y no se pretende que sean limitativos a menos que se especifique lo contrario. Por tanto, la invención en ningún modo debe considerarse que se limita a los siguientes ejemplos, sino más bien, debe considerarse que abarca todas y cada una de las variaciones que resultan evidentes como resultado de la enseñanza proporcionada en el presente documento.

Ejemplos

Administración de agentes terapéuticos (compuestos):

El compuesto de la presente invención se administra y dosifica según la buena práctica médica, teniendo en cuenta el estado clínico del paciente individual, el sitio y método de administración, la programación de la administración, edad del paciente, sexo, peso corporal y otros factores conocidos por los médicos. La "cantidad farmacéuticamente eficaz" para los fines en el presente documento se determina por tanto mediante tales consideraciones que se conocen en la técnica. La cantidad debe ser eficaz para lograr la mejora incluyendo pero sin limitarse a una tasa de supervivencia mejorada o recuperación más rápida, o mejora o eliminación de síntomas y otros indicadores que se seleccionan como medidas apropiadas por los expertos en la técnica.

El compuesto de la presente invención puede administrarse de diversas maneras. Debe indicarse que puede administrarse como el compuesto o como una sal farmacéutica aceptable y puede administrarse solo o como un

principio activo en combinación con vehículos, adyuvantes, diluyentes y portadores farmacéuticamente aceptables. Los compuestos pueden administrarse por vía oral, por vía subcutánea o por vía parenteral incluyendo intravenosa, intraarterial, intramuscular, por vía intraperitoneal e intranasal así como técnicas intratecales y de infusión. También son útiles implantes de los compuestos. El paciente que está tratándose es un animal de sangre caliente y, en particular, mamíferos incluyendo un ser humano. Los vehículos, adyuvantes, diluyentes y portadores farmacéuticamente aceptables así como portadores de implantes generalmente se refieren a cargas líquidas o sólidas no tóxicas, inertes, diluyentes o material de encapsulación que no reaccionan con los principios activos de la invención.

Se indica que los seres humanos se tratan de generalmente durante más tiempo que los ratones u otros animales experimentales mostrados a modo de ejemplo en el presente documento, tratamiento que tiene una duración proporcional a la duración del proceso patológico y la eficacia del fármaco. Las dosis pueden ser dosis únicas o dosis múltiples a lo largo de un periodo de varios días, aunque se prefieren dosis únicas.

Las dosis pueden ser dosis únicas o dosis múltiples a lo largo de un periodo de varios días. El tratamiento tiene generalmente una duración proporcional a la duración del proceso patológico y la eficacia del fármaco y la especie del paciente que está tratándose.

Cuando se administra el compuesto de la presente invención por vía parenteral, se formulará generalmente en una forma inyectable de dosificación unitaria (disolución, suspensión, emulsión). Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para inyección incluyen dispersiones o disoluciones acuosas estériles y polvos estériles para su reconstitución para dar dispersiones o disoluciones inyectables estériles. El portador puede ser un medio dispersante o disolvente que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales.

Puede mantenerse una fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. También pueden usarse vehículos no acuosos tales como aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de soja, aceite de maíz, aceite de girasol o aceite de cacahuate y ésteres, tales como miristato de isopropilo, como sistemas de disolventes para composiciones de compuestos. Adicionalmente, pueden añadirse diversos aditivos que potencian la estabilidad, esterilidad e isotonicidad de las composiciones, incluyendo conservantes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y tampones. Puede garantizarse la prevención de la acción de microorganismos mediante diversos agentes antifúngicos y antibacterianos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. En muchos casos, será deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro de sodio y similares. Puede provocarse una absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable mediante el uso de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina. Según la presente invención, sin embargo, cualquier vehículo, diluyente o aditivo usado tendría que ser compatible con los compuestos.

Pueden prepararse disoluciones inyectables estériles incorporando los compuestos utilizados en la puesta en práctica de la presente invención en la cantidad requerida del disolvente apropiado con diversos de los otros componentes, según se desee.

Una formulación farmacológica de la presente invención puede administrarse al paciente en una formulación inyectable que contiene cualquier portador compatible, tal como diversos vehículos, adyuvantes, aditivos y diluyentes; o los compuestos utilizados en la presente invención pueden administrarse por vía parenteral al paciente en forma de sistemas de administración dirigida o implantes subcutáneos de liberación lenta tales como anticuerpos monoclonales, administración vectorizada, iontoforética, matrices de polímero, liposomas y microesferas. Los ejemplos de patentes que dan a conocer sistemas de administración útiles en la presente invención incluyen: 5.225.182; 5.169.383; 5.167.616; 4.959.217; 4.925.678; 4.487.603; 4.486.194; 4.447.233; 4.447.224; 4.439.196; y 4.475.196. Muchos otros tales implantes, sistemas de administración y módulos los conocen bien los expertos en la técnica.

Se prefieren técnicas conocidas que administran la formulación farmacológica del compuesto utilizado en la presente invención por vía intravenosa y que conservan la actividad biológica.

El compuesto de la presente invención puede administrarse inicialmente mediante inyección intravenosa para llevar los niveles sanguíneos hasta un nivel adecuado. Los niveles del paciente se mantienen entonces mediante una forma de dosificación oral, aunque pueden usarse otras formas de administración, dependiendo del estado del paciente y tal como se indicó anteriormente. La cantidad que va a administrarse variará para el paciente que está tratándose y variará desde aproximadamente 100 ng/kg de peso corporal hasta 100 mg/kg de peso corporal al día y preferiblemente será de desde 10 mg/kg hasta 10 mg/kg al día.

Ejemplo 1:

La lesión por reperusión/isquemia (R/I) miocárdica es una consecuencia inevitable de procedimientos quirúrgicos que requieren circulación extracorpórea. Debido a la falta de un régimen terapéutico satisfactorio, la profilaxis preoperatoria contra la lesión por R/I miocárdica durante procedimientos que requieren circulación extracorpórea no

es un procedimiento clínicamente rutinario. Datos preliminares de la investigación y otros laboratorios indican que la glutamina (GLN), un aminoácido condicionalmente esencial, es protectora contra la lesión orgánica y celular *in vitro* e *in vivo*. Los datos muestran que el tratamiento previo con glutamina puede proteger directamente a los cardiomiocitos frente a la muerte celular miocárdica inducida por R/I mientras que se potencia el retorno de la función contráctil.

Adicionalmente, la glutamina puede potenciar la expresión de la proteína de choque térmico 72 y 27, que son factores citoprotectores endógenos, en los corazones de animales tanto estresados como no estresados. Datos posteriores del laboratorio indican que el tratamiento previo con GLN en la rata intacta puede conservar la función del miocardio tras la lesión por R/I en un modelo de corazón en funcionamiento. Esta conservación mediada por GLN de la función del miocardio se encontró que estaba asociada con marcadores mejorados del metabolismo del tejido de miocardio incluyendo razón ATP/ADP, contenido en ATP total y contenido en creatina/fosfocreatina total mejorados tras la lesión por R/I. Además, el tratamiento previo con GLN condujo a niveles de sustrato potenciados de glutamato (un sustrato clave en el miocardio isquémico) antes de la lesión por R/I y niveles tisulares potenciados de glutamato, glutamina y glucosa tras la lesión por R/I. Los tejidos también demostraron un contenido en NAD (+)/NADH total y glutatión reducido potenciado que indica una reducción en la generación de oxidantes tisulares tras la lesión por R/I (estado redox mejorado) y conservación de la fosforilación oxidativa mitocondrial. Datos de otro laboratorio han corroborado estos hallazgos y han demostrado que la administración de GLN por medio del perfundido en un corazón de rata en funcionamiento puede mejorar el desenlace de la lesión por R/I. El estudio implicaba la conservación de metabolitos celulares en la prevención de la lesión por R/I miocárdica. Finalmente, datos recientes indican que GLN oral a baja dosis puede retrasar el comienzo de la isquemia en pacientes con angina crónica estable conocida. Por tanto, la terapia con GLN preoperatoria puede atenuar la lesión del miocardio tal como se midió mediante el efluente coronario y la liberación de creatina fosfocinasa y troponina plasmática.

Efecto de GLN sobre la lesión del tejido de miocardio. La administración preoperatoria de GLN a pacientes que se someten a cirugía de CABG disminuye la lesión de células del miocardio tras la circulación extracorpórea. Puede extraerse plasma previamente a la operación, al inicio de la circulación extracorpórea y posteriormente a la operación y analizarse para determinar la troponina y CK-MB. Adicionalmente, puede recogerse el efluente coronario a diversos puntos durante la circulación extracorpórea y analizarse para determinar la troponina.

Efecto de GLN sobre el contenido en proteína de choque térmico de tejido auricular humano. La administración preoperatoria de GLN a pacientes que se someten a cirugía de CABG potencia el contenido en proteínas de choque térmico 72 y 27 del miocardio al inicio y al final de la circulación extracorpórea. Puede extraerse tejido de orejuela auricular derecha de pacientes que se someten a cirugía de CABG antes y tras la circulación extracorpórea y analizarse para determinar el contenido en proteína de choque térmico 72 y 27 (análisis de inmunotransferencia de tipo Western).

Efecto de GLN sobre la potenciación de medidas del metabolismo tisular y estado redox en tejido auricular humano. La administración preoperatoria de GLN a pacientes que se someten a cirugía de CABG mejora las mediciones del metabolismo del tejido de miocardio al inicio e interrupción de la circulación extracorpórea. Puede extraerse tejido de orejuela auricular derecha de pacientes antes del inicio de la derivación de arterias coronarias y analizarse para determinar el metabolismo tisular (espectroscopía de resonancia magnética (MRS)). Estas mediciones incluyen ATP, razón ATP/ADP, lactato, glutamina, glutamato y glucosa tisulares. Puede analizarse el estado redox tisular y la conservación de la fosforilación oxidativa por medio del contenido en el tejido de miocardio del contenido en NAD/NADH total y glutatión reducido (MRS).

Efecto de GLN sobre la función cardíaca posoperatoria y desenlaces globales de pacientes. La administración preoperatoria de GLN a pacientes que se someten a cirugía de CABG puede (i) mejorar la función cardíaca posoperatoria, (ii) disminuir la necesidad de soporte vasopresor posoperatorio y (iii) acortar la duración de la ventilación mecánica posoperatoria, y la duración de la estancia en la UCI y el hospital. Pueden recogerse datos sobre la función cardíaca de manera preoperatoria, al inicio y terminación de la circulación extracorpórea, y de manera posoperatoria (por medio del índice cardíaco). Puede evaluarse el requisito de terapia vasopresora de manera posoperatoria tanto para la dosis como la duración de tiempo que el paciente requiere de tratamiento vasopresor. Adicionalmente, puede registrarse la duración de la ventilación posoperatoria, duración de la admisión en la UCI y duración total de la estancia en el hospital.

La comprensión lograda a partir de lo anterior arroja luz sobre el potencial del tratamiento previo con GLN para proteger frente a la lesión por R/I miocárdica tras la circulación extracorpórea en CABG. Adicionalmente, los estudios proporcionan comprensión adicional de los mecanismos bioquímicos mediante los que la GLN puede proteger frente a la lesión por R/I en el miocardio humano.

Datos preliminares en pacientes humanos indican que la administración de GLN oral a baja dosis (80 mg/kg) puede retrasar significativamente el tiempo hasta el comienzo de la isquemia en pacientes con angina estable crónica. Específicamente, el ensayo cruzado controlado por placebo, ciego, aleatorizado examinó el efecto de GLN administrada a 17 pacientes con angina estable crónica conocida. Se administró GLN o placebo a pacientes 40 minutos antes de una prueba de esfuerzo con ejercicio y se registró el tiempo hasta el comienzo de 1 mm de depresión de ST. Entonces, se cruzaron los pacientes tras un intervalo de una semana. La administración de GLN

condujo a un retraso significativo en el comienzo de la depresión de ST ($p < 0,05$).

Se ha administrado previamente GLN a seres humanos gravemente enfermos en una variedad de prácticas clínicas sin ninguna prueba de toxicidad. La única excepción a este hallazgo ha sido en pacientes con insuficiencia hepática y/o renal significativa. Se observó que los pacientes tenían una elevación en sus niveles de amoníaco y nitrógeno de urea sanguíneos que no se notificó que tuviesen consecuencias fisiológicas graves y eran reversibles con la interrupción de la terapia.

Además de los pacientes que se someten a procedimientos de CABG, otros grupos de pacientes pueden beneficiarse de la posible protección mediada por GLN frente a la lesión por R/I miocárdica. En pacientes en riesgo de isquemia cardíaca (tal como en pacientes con arteriopatía coronaria y/o angina inestable crónica), la administración de GLN puede reducir lesión del miocardio y mejorar el rendimiento cardíaco tras infarto o isquemia miocárdica. Adicionalmente, también puede usarse GLN para proteger frente a la lesión isquémica en corazones y otros órganos extraídos para trasplante de órganos.

La glutamina puede mejorar los desenlaces clínicos de enfermedades críticas; se desconoce el mecanismo de esto. Actualmente, se administra glutamina como complemento nutricional para nutrición parenteral o alimentación enteral. Una única dosis grande de glutamina administrada como un "fármaco" puede mejorar notablemente los desenlaces de septicemia, síndrome de dificultad respiratoria aguda y estados proinflamatorios corrigiendo la expresión defectuosa de proteína de choque térmico 70, atenuando la liberación de citocinas proinflamatorias y corrigiendo defectos inducidos por septicemia en el metabolismo.

La administración de glutamina a 0,75 g/kg como una única dosis (de alanil-glutamina) puede potenciar expresión de proteína de choque térmico 70, atenuar la expresión de citocinas proinflamatorias (TNF-alfa, IL-6, IL-18 exc.) y mejorar el metabolismo tisular (niveles de ATP tisular mejorados, lactato disminuido y niveles de NAD⁺ conservados) conduciendo a una morbilidad disminuida tras septicemia y síndrome de dificultad respiratoria aguda. Esto puede tener implicaciones clínicas significativas para mejorar los desenlaces de septicemia, lesión pulmonar, traumatismo y otros trastornos inflamatorios (tales como artritis, enfermedad inflamatoria del intestino y esclerosis múltiple).

Se administró alanil-glutamina y se determinó que la administración, tras el comienzo de la septicemia en el modelo de ligación y punción cecal clínicamente relevante de septicemia en la rata, de la alanil-glutamina, administrada como una única dosis grande, puede restaurar la expresión de proteína de choque térmico normal en el pulmón, atenuar la liberación de citocinas inflamatorias y mejorar por lo demás el metabolismo celular defectuoso en el pulmón.

Pueden usarse dosis únicas o múltiples grande de dipéptido del aminoácido para mejorar significativamente los desenlaces de infecciones graves, síndrome de dificultad respiratoria aguda y otras lesiones graves como traumatismo y quemaduras graves. La dosis puede administrarse tras la admisión en la sala de urgencias o la UCI para prevenir la morbilidad. Además, el aminoácido puede mejorar los desenlaces de otras enfermedades inflamatorias tales como enfermedad inflamatoria del intestino (enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa), artritis, esclerosis múltiple y/o lupus.

GLN potencia la expresión de proteína de choque térmico en el miocardio y estresado no estresado. En los estudios iniciales, se examinó el efecto de la GLN sobre la expresión de proteína de choque térmico en el miocardio en la rata intacta estresada y no estresada. El primer conjunto de experimentos examinó el efecto de un intervalo de dosis de GLN sobre la expresión de proteína de choque térmico en el corazón de rata no estresada. Tal como se muestra a continuación en la figura 1, la GLN potenció significativamente la expresión de HSP 72 a todas las dosis protectoras a prueba: también se observó el aumento para HSP 27 (otra de las proteínas de choque térmico sometidas) en la que la inducción se produjo tan pronto como a las 4-6 horas y persistió durante hasta 48-72 horas. En un conjunto separado de experimentos, un grupo de ratas se trató con 0,75 g/kg de GLN o una disolución control de LR y entonces se administraron simultáneamente 5 mg/kg de endotoxina de *Escherichia Coli* (LPS). Se sacrificaron los animales seis horas tras la administración de GLN/LPS y se extrajo tejido del corazón para el análisis de la expresión de HSP. La GLN potenció notablemente la expresión de tanto HSP 27 como 72 tal como se midió mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western (figura 2).

Más específicamente, la figura 2 muestra el efecto de la respuesta a la dosis de GLN sobre la expresión de HSP 72 en tejido pulmonar y cardíaco en ratas no estresadas. Se trataron las ratas con concentraciones variables de GLN administrada a lo largo de 12-15 minutos. Entonces se extrajeron tejidos cuatro horas tras la administración de GLN y se analizaron las expresiones de HSP 72 mediante inmunotransferencia de tipo Western. La imagen mostrada es representativa de las obtenidas en cuatro experimentos diferentes. El gráfico representa un aumento en porcentaje de HSP 72 con respecto al control. Todas las dosis de GLN (0,15 g/kg (barras blancas), 0,45 g/kg (barras grises) 0,75 g/kg (barras negras)) aumentaron significativamente las concentraciones de HSP 72 (medidas mediante densitometría) con respecto al control. (* $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,05$ en comparación con el control mediante ANOVA).

La figura 3 muestra el efecto de GLN sobre la expresión de HSP 72 en corazones de ratas lesionadas por LPS. Se

administró a las ratas LPS (5 mg/kg) simultáneamente con GLN (n = 5) + reanimación con líquidos o reanimación con LR sola (n = 4) por medio de la vena de la cola. Se extrajeron tejidos seis horas tras la lesión por LPS y se analizaron para determinar la expresión de HSP 72 por medio de inmunotransferencia de tipo Western. Cada carril representa extractos de proteína de un animal separado. La densitometría relativa se expresa como medias $\pm$ DE. * - $p < 0,0005$, en comparación con reanimación con LR sola evaluada mediante la prueba de la t de Student.

GLN protege a los cardiomiocitos frente a la lesión por R/I y potencia la expresión de la proteína de choque térmico 72. En estudios preliminares adicionales, se sometió a prueba si la GLN puede proteger a cardiomiocitos aislados frente a la lesión por R/I. Se estudiaron cardiomiocitos que se contraían espontáneamente. Se logró el tratamiento previo con glutamina dejando que los cardiomiocitos se equilibrasen en BSS con GLN 10 mM o 0 mM añadida durante una hora antes de la isquemia/reperfusión posterior. GLN también estuvo presente en todo el periodo de isquemia y reperfusión en las células tratadas con GLN. Se observaron disminuciones significativas en la muerte celular en las células tratadas con glutamina (22%) frente a las células control (48%) ($p < 0,0005$) (figura 4). La GLN también potenció significativamente el retorno de la función contráctil tras lesión por R/I ($p < 0,05$). Células tratadas con GLN demostraron adicionalmente un aumento significativo en el contenido en HSP 72 tal como se midió mediante inmunotransferencia de tipo Western frente células no preacondicionadas (células que no recibieron GLN).

La figura 4 muestra el efecto de la glutamina (GLN) sobre la muerte celular por reperfusión/isquemia. Se dejó que los cardiomiocitos se equilibrasen en condiciones normóxicas iniciales durante 60 minutos. Durante este periodo, se expusieron las células a una disolución salina equilibrada que contenía 10 mM de GLN o disolución salina balanceada sola (control). (** - $p < 0,0005$ en relación al control).

El tratamiento previo con glutamina potencia recuperación del flujo coronario y cardiaco en corazón de rata en funcionamiento tras lesión por R/I. Para examinar el efecto del acondicionamiento previo con GLN remoto sobre la recuperación de la función cardiaca en un animal intacto, se utilizó un modelo de corazón de rata en funcionamiento. Se inyectaron a ratas 0,75 g/kg de una disolución de alanina-glutamina (equivalente a 0,52 g/kg de glutamina) (n=10) o una disolución de Ringer con lactato (LR) control (n=10) 18 horas antes de la extracción del corazón y la exposición a una lesión por R/I por medio de un aparato de corazón en funcionamiento. Se examinaron los valores de precarga para ambos (8 y 12 mmHg), el acondicionamiento previo con GLN mejoró significativamente la recuperación de flujo cardiaco tras la reperfusión (figura 5). El acondicionamiento previo con GLN también potenció significativamente el porcentaje de recuperación del flujo coronario a los 60 minutos tras la reperfusión ($p < 0,01$). No se observó toxicidad visible (comportamiento anómalo, cambio en el estado mental, disminución de la alimentación) de inyecciones de GLN o control.

La figura 5 muestra el efecto del tratamiento previo con glutamina (GLN) sobre los índices cardiacos tras la lesión por reperfusión/isquemia en el modelo de corazón de rata en funcionamiento. Se inyectaron i.p. a ratas 0,52 g/kg de GLN (como alanina-glutamina) o una disolución control de LR 18 horas antes de la extracción del corazón y la lesión por reperfusión/isquemia experimental. La figura 5A muestra el porcentaje de recuperación del flujo cardiaco a una presión auricular izquierda de 8 mm Hg. La figura 5B muestra el porcentaje recuperación del flujo cardiaco a una presión auricular izquierda de 12 mm Hg. * - $\leq 0,05$, ** - $p \leq 0,01$ en relación al control.

El tratamiento previo con glutamina conserva la razón ATP/ADP del miocardio y el contenido en ATP/creatina/fosfocreatina total tras la lesión por R/I miocárdica en la rata. Se extrajo tejido de miocardio del modelo de corazón de rata en funcionamiento de las ratas descritas en la figura 5 anteriormente tras el tiempo de reperfusión de 60 minutos. En animales control tratados con GLN o LR, también se había extraído tejido de miocardio a las 18 horas, pero este tejido no se expuso a la lesión por R/I (tejido preisquémico) y se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido para su análisis. El tejido se analizó para determinar el ATP, ADP y la razón ATP/ADP por medio de espectroscopía de resonancia magnética (MRS) de ^{31}P y para determinar el contenido en creatina/fosfocreatina por medio de espectroscopía de resonancia magnética (MRS) de ^1H . Ambos grupos de animales tuvieron una disminución significativa en la razón ATP/ADP y ATP total tras la lesión por R/I. Sin embargo, el tratamiento previo con GLN 18 horas antes de lesión por R/I miocárdica condujo a un aumento de la conservación de la razón ATP/ADP tras la lesión por R/I (figura 6). También se mejoró el contenido en ATP total ($p < 0,001$ frente al control por medio de la prueba de la T de Student).

La reducción de ATP es un contribuyente principal a la disfunción del miocardio y muerte celular miocárdica tras la lesión por R/I. El tratamiento previo con GLN 18 horas antes de la lesión por R/I miocárdica conserva notablemente el contenido en ATP del miocardio, lo que puede ser un mecanismo vital mediante el que la GLN potencia la función del miocardio tras la lesión por R/I. No se observaron disminuciones estadísticamente significativas en el contenido en creatina/fosfocreatina en los animales que se sometieron a la lesión por R/I. Sin embargo, el tratamiento previo con GLN 18 horas antes de la lesión por R/I miocárdica condujo a un contenido en creatina/fosfocreatina del tejido de miocardio potenciado tras la lesión por R/I. Se caracterizó el miocardio con insuficiencia mediante la reducción del contenido en fosfocreatina (PCr) y creatina libre. Ratitas con una disminución significativa en la fosfocreatina del miocardio no pueden sobrevivir a una lesión por R/I miocárdica significativa. La GLN puede conservar el contenido en creatina/fosfocreatina del corazón isquémico, lo que es vital para el mantenimiento de la homeostasis del ATP y ayuda a explicar la función del miocardio mejorada atrás la reperfusión en esos corazones de ratas.

La figura 6 muestra el efecto de la lesión por reperfusión/isquemia miocárdica sobre la razón ATP/ADP de tejido de miocardio en el modelo de corazón de rata en funcionamiento. Se inyectó i.p. a ratas una disolución control de LR (n = 10) (barras blancas) o 0,52 g/kg de GLN (como alanina-glutamina) (n = 10) (barras negras) 18 horas antes de la extracción del corazón y de la lesión por reperfusión/isquemia experimental. Se recogió tejido posisquémico 60 minutos tras la reperfusión. Se analizó la razón ATP/ADP por medio de ^{31}P -MRS. (***- p < 0,001, ** p < 0,01 frente a valores preisquémicos, ####- p < 0,001 frente a tejido control con LR posisquémico por medio de ANOVA).

El tratamiento previo con glutamina disminuye la acumulación de lactato del miocardio tras la lesión por R/I miocárdica en la rata. Utilizando el modelo mencionado anteriormente de corazón de rata en funcionamiento, se extrajo tejido de miocardio de las ratas descritas en la figura 5 anteriormente tras el tiempo de reperfusión de 60 minutos. También se había extraído de animales control tratados con GLN o LR tejido de miocardio a las 18 horas, pero el tejido no se expuso a lesión por R/I (preisquémico) y se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido para su análisis. El tejido se analizó para determinar el contenido en lactato por medio de ^1H -MRS. Ambos grupos de animales expuestos a lesión por R/I tuvieron un aumento significativo en el lactato del tejido de miocardio con respecto a los animales control. Sin embargo, el tratamiento previo con GLN 18 horas antes de la lesión por R/I miocárdica condujo a una disminución significativa en la acumulación de lactato del miocardio tras la lesión por R/I (figura 7). Específicamente, el tratamiento previo con GLN redujo el aumento en el lactato tisular en > 55% frente a animales control. Esto indica que la GLN puede disminuir acidosis del tejido de miocardio tras la lesión por R/I. La disminución se debe a la conservación inducida por GLN del metabolismo del tejido de miocardio, particularmente la conservación de una función del ciclo de TCA apropiada. La disminución puede producirse por medio de GLN que proporciona un sustrato para el metabolismo en el ciclo de TCA (por medio de su conversión a glutamato) o por medio de la conservación inducida por GLN de la función de las enzimas del ciclo de TCA (por medio de la inducción de HSP).

La figura 7 muestra el efecto de la lesión por reperfusión/isquemia miocárdica sobre el lactato del tejido de miocardio en el modelo de corazón de rata en funcionamiento. Se inyectó i.p. a ratas una disolución control de LR (n =10) (barras blancas) o 0,52 g/kg de GLN (como alanina-glutamina) (n=10) (barras negras) 18 horas antes de la extracción del corazón y la lesión por reperfusión/isquemia experimental. Se extrajo tejido posisquémico 60 minutos tras la reperfusión. Se analizó el lactato por medio de ^1H -MRS. (***- p < 0,001, * p < 0,05 frente a valores preisquémicos, ####- p < 0,001 frente a tejido control con LR posisquémico por medio de ANOVA).

El tratamiento previo con glutamina potencia el contenido del tejido de miocardio (glutamina, glutamato y glucosa) tras la lesión por R/I miocárdica en la rata. Utilizando el modelo mencionado anteriormente de corazón de rata en funcionamiento, se extrajo tejido de miocardio de las ratas descritas en la figura 5 anteriormente tras el tiempo de reperfusión de 60 minutos. También se había extraído de animales control tratados con GLN o LR (LR) tejido de miocardio a las 18 horas (preisquémico), pero el tejido no se expuso a lesión por R/I y se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido para su análisis. El tejido se analizó para determinar el contenido en glutamina, glutamato y glucosa por medio de espectroscopía de resonancia magnética (MRS) de ^1H . Ambos animales control con GLN y LR expuestos a lesión por R/I tuvieron disminuciones en el contenido en GLN y glucosa tras la lesión por R/I. Sin embargo, animales tratados con GLN no mostraron disminución en los niveles de glutamato posisquémicos a partir de los niveles preisquémicos. El glutamato es un sustrato tisular vital tras la lesión del miocardio y es beneficioso que una única dosis de GLN 18 horas antes de la lesión por R/I pueda conservar los niveles tisulares de este sustrato clave tras la lesión. Además, el tratamiento previo con GLN 18 horas antes de la lesión por R/I miocárdica condujo a contenido potenciado del tejido de miocardio de glutamina y glucosa tras la lesión por R/I frente a animales control con LR (figura 8). Los datos indican que el tratamiento previo con GLN puede potenciar el contenido del tejido de miocardio de varios de los sustratos clave utilizados tras la lesión por R/I. Este hallazgo clave confirma que es posible potenciar el contenido del sustrato del tejido de miocardio (particularmente glutamato) con una dosis de pretratamiento de GLN remota (preoperatoria).

Más específicamente, la figura 8 muestra el efecto de la lesión por reperfusión/isquemia miocárdica sobre el sustrato del tejido de miocardio (glutamato, glutamina y glucosa) en el modelo de corazón de rata en funcionamiento. Se inyectó i.p. a ratas una disolución control de LR (n =10) (barras blancas) o 0,52 g/kg de GLN (como alanina-glutamina) (n=10) (barras negras) 18 horas antes de la extracción del corazón y la lesión por reperfusión/isquemia experimental. Se recogió tejido posisquémico 60 minutos tras reperfusión. Se analizaron los sustratos por medio de ^1H -MRS. (++) - p < 0,01 frente al control de LR preisquémico, ***- p < 0,001, * p < 0,05 frente a valores preisquémicos, ###- p < 0,01, ####- p < 0,001 frente a tejido control con LR posisquémico por medio de ANOVA).

El tratamiento previo con glutamina potencia el contenido en glutatión reducido del tejido de miocardio tras la lesión por R/I miocárdica en la rata. Utilizando el modelo de corazón de rata en funcionamiento mencionado anteriormente, se extrajo tejido de miocardio de las ratas descritas en la figura 5 anteriormente tras el tiempo de reperfusión de 60 minutos. También se había extraído de animales control tratados con GLN o LR (LR) tejido de miocardio a las 18 horas (preisquémico), pero el tejido no se expuso a lesión por R/I y se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido para su análisis. El tejido se analizó para determinar el contenido en glutatión reducido del tejido de miocardio por medio de espectroscopía de resonancia magnética (MRS) de ^1H . Ambos animales control con GLN y LR que se someten a lesión por R/I mostraron reducciones en el contenido en GSH reducido, sin embargo, los animales tratados con GLN mostraron una disminución mínima frente a la observada en los animales control con LR. Específicamente, el tratamiento previo con GLN 18 horas antes de la lesión por R/I miocárdica condujo a una

potenciación marcada del contenido en glutatión reducido del tejido de miocardio tras la lesión por R/I (figura 9).

La reducción de GSH puede exacerbar la disfunción cardíaca causada por la lesión por R/I miocárdica. Parte de la etiología puede implicar defensas antioxidantes del miocardio alteradas. Adicionalmente, se ha mostrado que la GLN conserva el contenido en GSH y disminuye la lesión en el miocardio tras lesión con doxorubicina. Finalmente, se sabe que la GLN es un precursor limitante de la velocidad para la síntesis de glutatión y por tanto el contenido en glutatión potenciado observado tras la lesión por R/I miocárdica puede reflejar la disponibilidad potenciada de precursor para la producción de glutatión.

La figura 9 muestra el efecto de la lesión por reperfusión/isquemia miocárdica sobre el contenido en glutatión reducido del tejido de miocardio en el modelo de corazón de rata en funcionamiento. Se inyectó i.p. a ratas una disolución control de LR (n =10) (barras blancas) o 0,52 g/kg de GLN (como alanina-glutamina) (n=10) (barras negras) 18 horas antes de la extracción del corazón y la lesión por reperfusión/isquemia experimental. Se extrajo tejido posisquémico 60 minutos tras la reperfusión. Se analizó el lactato por medio de ¹H-MRS. (***- p < 0,001, * p < 0,05 frente a valores preisquémicos, #- p < 0,05 frente a tejido control con LR posisquémico por medio de ANOVA).

El tratamiento previo con glutamina conserva el contenido en NAD (+)/NADH del miocardio tras la lesión UR del miocardio en la rata. Utilizando el modelo de corazón de rata en funcionamiento mencionado anteriormente, se extrajo tejido del miocardio de las ratas descritas en la figura 5 anteriormente tras el tiempo de reperfusión de 60 minutos. También se había extraído de animales control tratados con GLN o LR (LR) tejido de miocardio a las 18 horas, pero el tejido no se expuso a lesión por R/I (preisquémico) y se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido para su análisis. El tejido se analizó para determinar el contenido en NAD (+)/NADH por medio de espectroscopía de resonancia magnética (MRS) de ³¹P. Sólo los animales en el grupo control con LR expuestos a lesión por R/I demostraron una disminución en el contenido en NAD (+)/NADH total frente a condiciones preisquémicas. No se observó ningún cambio en el contenido en NAD (+)/NADH posisquémico (frente al contenido preisquémico) en animales tratados con GLN. Específicamente, el tratamiento con GLN 18 horas antes de la lesión por R/I miocárdica condujo a una conservación significativa del contenido en NAD (+)/NADH tras la lesión por R/I (figura 10).

La conservación del contenido en NADH es vital para la capacidad del miocardio de soportar la producción inevitable de especies reactivas de oxígeno tras la lesión por R/I. Previamente, se ha mostrado que la potenciación de sustratos con piruvato y otros aminoácidos conserva el contenido en NAD (+)/NADH y protege frente a la disfunción contráctil del miocardio y la lesión del tejido de miocardio. La GLN está actuando de una manera similar (por medio de potenciación de sustratos) para conservar el contenido en NADH y disminuir la lesión del tejido de miocardio y mejorar la contractilidad del miocardio. Adicionalmente, un contenido en NAD (+)/NADH aumentado es un marcador para una fosforilación oxidativa mitocondrial potenciada. El aumento del contenido explica la mejora anteriormente descrita en la razón ATP/ADP tras el tratamiento previo con GLN.

La figura 10 muestra el efecto de la lesión por reperfusión/isquemia miocárdica sobre el contenido en NAD(+)/NADH del tejido de miocardio en el modelo de corazón de rata en funcionamiento. Se inyectó i.p. a ratas una disolución control de LR (n =10) (barras blancas) o 0,52 g/kg de GLN (como alanina-glutamina) (n=10) (barras negras) 18 horas antes de la extracción del corazón y la lesión por reperfusión/isquemia experimental. Se recogió tejido posisquémico 60 minutos tras la reperfusión. Se analizó NAD(+)/NADH por medio de ¹H-MRS. (**- p < 0,01 frente a valores preisquémicos, ###- p < 0,01 frente a tejido control con LR posisquémico por medio de ANOVA).

Espectros de NMRIMRS de corazones de rata expuestos a lesión por R/I miocárdica. Para ejemplos específicos de ¹H-MRS véase la figura 11 a continuación. La figura 11 muestra espectros de ¹H-MRS de tejido de miocardio de rata expuesto a lesión por reperfusión e isquemia en el modelo de corazón de rata en funcionamiento. Se inyectó i.p. a ratas una disolución control de LR o 0,52 g/kg de GLN 18 horas antes de la extracción del corazón y la lesión por reperfusión/isquemia experimental. Se extrajo tejido posisquémico 60 minutos tras la reperfusión. (GLN=glutamina, GLU=glutamato, Tau=taurina, CR+PCr=creatina+fosfocreatina, Suc=succinato, Ala=alanina, Lac=lactato).

Procedimiento de tratamiento y aleatorización. Los pacientes aleatorizados al grupo de GLN (grupo de tratamiento) recibieron 50 gramos de L-GLN oral (25 gramos por vía oral, 2 veces al día) durante dos días antes de su procedimiento de operación y también pueden tomar 25 gramos de GLN la mañana de la cirugía. Los pacientes aleatorizados al placebo recibieron una mezcla de placebo oral (2 veces al día) durante dos días antes de su procedimiento de operación y también recibieron la mezcla la mañana de la cirugía. El placebo consistía en un polvo de maltodextrano (25 gramos por dosis). Los pacientes aleatorizados al grupo control isonitrogenado recibieron una mezcla control administrada por vía oral (2 veces al día) durante dos días antes de su procedimiento de operación y también recibieron la mezcla la mañana de la cirugía. El tratamiento control isonitrogenado consistía en una mezcla de aminoácidos (que no contenía glutamina o glutamato) isonitrogenados a 25 gramos de GLN.

Durante la admisión, los pacientes también recibieron una dieta normalizada que puede controlarse para determinar el contenido en proteínas por los dietistas de la GCRC para administrar aproximadamente el 20% del requisito calórico diario de los pacientes como proteína y el 20% como grasa, administrándose el 60% restante como calorías de hidratos de carbono. Se hizo así la dieta para controlar la ingesta dietética preoperatoria.

La dosis seleccionada de GLN se basa en la dosis máxima que se ha administrado previamente de manera segura en seres humanos. La dosis se ha tolerado bien sin efectos secundarios adversos, incluso en pacientes gravemente enfermos (26-30). También se extrajo sangre para evaluar los niveles de GLN durante todo el estudio. La primera extracción de sangre se produjo en la admisión (< entonces 3 cc de sangre). Se obtuvo un nivel de GLN adicional una hora tras la primera dosis de GLN/placebo/control isonitrogenado, se obtuvo un nivel de GLN antes de la inducción de anestesia y un nivel de GLN final a las 24 horas tras el procedimiento de CABG.

Métodos:

Determinación del efecto de GLN sobre la lesión del tejido de miocardio

Evaluación de la lesión del tejido de miocardio. La siguiente prueba de laboratorio puede realizarse dos días antes del procedimiento de CABG; análisis de troponina y creatina fosfoquinasa (CPK) (con isoformas MB).

De manera preoperatoria, tras la inducción de anestesia, pero antes de la apertura esternal, se extrajeron aproximadamente 5 cc de sangre de pacientes para lo siguiente: análisis de troponina y CPK-MB. Al inicio del procedimiento de derivación y dos minutos tras la liberación del efuente coronario del pinzamiento cruzado de la aorta, se evaluaron los niveles de troponina y CPK-MB. De manera posoperatoria, antes de transferirse a la UCI, se extrajeron aproximadamente 5 cc de sangre para determinar CPK-MB y troponina. A las 6 y 24 horas posoperatorias, se extrajo de nuevo una muestra de sangre para determinar CPK-MB y troponina (aproximadamente 5 cc de sangre).

El tratamiento previo con GLN preoperatorio puede atenuar significativamente la lesión del miocardio tal como se midió mediante la medición de troponina y CPK-MB en efuente coronario y plasma. Datos preclínicos tanto en modelos celulares como de animales completos muestran que el tratamiento previo con GLN parece proteger frente a la lesión por R/I miocárdica y esta protección también se observó en sujetos humanos que se someten a cirugía de CABG.

Análisis estadístico. Se comprobó la normalidad de la distribución de los datos mediante inspección visual de gráficos Q-Q. Se aplicó una transformación logarítmica cuando era necesario y se comprobó de nuevo la normalidad. Se analizaron las diferencias en marcadores de lesión cardíaca por medio de ANOVA para medidas repetidas; si se observa que se encuentra una diferencia global significativa entre los grupos, se analizaron las diferencias a puntos de tiempo individuales por medio de la prueba de la t de Student. Se consideró significativo un valor de $p < 0,05$. Se usó el paquete de software SPSS (versión 10.07, SPSS Inc., Chicago IL) para todos los análisis estadísticos.

Determinación del efecto de GLN sobre el contenido en proteína de choque térmico de tejido auricular humano.

Extracción de tejido auricular derecho: Durante el procedimiento de derivación de arterias coronarias, en el momento de la canulación arterial, los investigadores extirparon una parte de la orejuela auricular derecha e inmediatamente la congelaron en nitrógeno líquido. Adicionalmente, al final de la circulación extracorpórea, se extirpó tejido de orejuela auricular derecha adicional de alrededor del sitio de canulación e inmediatamente se congeló en nitrógeno líquido. Este tejido puede evaluarse para determinar la proteína de choque térmico.

Análisis de inmunotransferencia de tipo Western: Los tejidos auriculares extraídos pueden analizarse para determinar el contenido en proteína de choque térmico 72 y 27 por medio de inmunotransferencia de tipo Western, por medio de la técnica descrita anteriormente. Se analizó el contenido en HSP 72 por medio de densitometría.

La terapia con GLN potencia los niveles de HSP 72 y 27 en el tejido auricular derecho si los pacientes se someten a CABG. Se han observado cambios previos al estrés en los niveles de HSP tras la administración de GLN en varios modelos celulares y animales previos. Sin embargo, la GLN tiene su efecto más profundo sobre la expresión de HSP tisular tras la lesión. Sin embargo, dado que los pacientes en el presente estudio tienen todos algún grado de isquemia coronaria, la lesión por R/I crónica que se produce en muchos de estos pacientes puede conducir a la potenciación por GLN de los niveles de HSP en tejido auricular recogido antes de la circulación extracorpórea también.

Análisis estadístico: Se comprobó la normalidad de la distribución de los datos mediante inspección visual de gráficos Q-Q. Se aplicó una transformación logarítmica cuando era necesario y se comprobó de nuevo la normalidad. Se analizaron las diferencias en la expresión de proteína de choque térmico de tejido auricular derecho por medio de ANOVA para medidas repetidas; si se observaba que se encuentra una diferencia global significativa entre los grupos, se analizaron las diferencias a puntos de tiempo individuales mediante la prueba de la t de Student. Se consideró significativo un valor de $p < 0,05$. Se usó el paquete de software SPSS (versión 10.07, SPSS Inc., Chicago IL) para todos los análisis estadísticos.

Determinación del efecto de GLN sobre el metabolismo celular en tejido auricular humano. Se extrajo tejido de orejuela auricular derecha de pacientes antes del inicio de la derivación de arterias coronarias e inmediatamente tras la interrupción de la circulación extracorpórea para analizar el metabolismo celular mediante espectroscopía de

resonancia magnética (MRS) de ^1H y ^{31}P . La ^{31}P -MRS proporcionó información acerca de las concentraciones en tejido auricular de fosfatos de alta energía (ATP, ADP, fosfocreatina, NAD(+), razón ATP/ADP). Se cuantificaron los siguientes metabolitos solubles en agua a partir de ^1H -MRS de extractos de tejido auricular: alanina, aspartato, creatina+fosfocreatina, glucosa, glutamato, glutamina, glutatión, glicerofosfocolina, lactato, fosfocolina, succinato, taurina y valina+leucina+isoleucina. Se cuantificaron los siguientes metabolitos lipídicos a partir de los espectros de ^1H -MRS de extractos lipídicos: colesterol, colinas, glicerofosfato, ácidos grasos mono-insaturados (MUFA), fosfatidilcolina, ácidos grasos poliinsaturados de fosfatidiletanolamina (PUFA), ácidos grasos totales y triacilgliceridos.

Extracción de tejido auricular derecho: Durante el procedimiento de derivación de arterias coronarias, al inicio de la circulación extracorpórea, los investigadores extrajeron a los pacientes una parte de la orejuela auricular derecha e inmediatamente la congelaron en nitrógeno líquido. También se extrajo tejido auricular derecho de alrededor del sitio de canulación tras la interrupción de la circulación extracorpórea e inmediatamente se congeló en nitrógeno líquido. Se dividió posteriormente el tejido para el análisis del metabolismo celular y de la proteína de choque térmico.

Extracción de lípidos/PCA doble. Para realizar la espectroscopía de resonancia magnética (MRS) de alta resolución sobre tejidos auriculares, se extrajeron las muestras congeladas recogidas usando un procedimiento de extracción de lípidos/ácido perclórico (PCA) doble tal como se describe en detalle por Serkova *et al.* Se pesó tejido cardíaco congelado inmediatamente, se homogeneizó en un molino de mortero en presencia de nitrógeno líquido y se extrajo con 4 ml de PCA enfriado con hielo (12%). Para cada extracto, se necesitaron de 0,3 a 0,5 g de tejido auricular. Se centrifugaron las muestras, se eliminó la fase acuosa, se neutralizaron usando KOH y se centrifugaron un vez más. Se extrajo la fracción lipídica de los sedimentos que quedaban tras la etapa de extracción acuosa. Se disolvieron los sedimentos en 4 ml de agua enfriada con hielo y se neutralizó la disolución. Ambos, el extracto acuoso y el sedimento redisoluto, se liofilizaron durante la noche. Se redisoluvieron los liofilizados de los extractos acuosos en 0,45 ml de óxido de deuterio (D_2O) y se ajustaron a pH 7 usando cloruro de deuterio (DCI) y deuteróxido (NaOD). Se extrajo la fracción lipídica de los liofilizados del sedimento redisoluto mediante adición de 1 ml de mezcla de cloroformo deuterado/metanol ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$; 2:1 v/v). Tras la centrifugación, se analizaron por MRS los sobrenadantes.

Evaluación por MRS sobre los extractos de tejido auricular derecho. Se llevaron a cabo experimentos de MRS basándose en espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{31}P tal como se describió previamente (Serkova *et al.*, (44)). Se registraron todos los espectros de MR unidimensionales de extractos lipídicos y acuosos de PCA tisulares en un espectrómetro Avance Bruker de 500 MHz y se procesaron usando el software WINNMR (Bruker Biospec Inc., Fremont, CA). Se usó para todos los experimentos una sonda TXI de 5 mm (resonancia triple inversa). Para MRS de protones, la frecuencia de funcionamiento puede ser de 500 MHz y se usó un programa de pulsos de presaturación convencional para la supresión de agua. Los demás parámetros fueron los siguientes: 40 acumulaciones; ángulo de pulso de 90° ; nivel de potencia de 0 dB; anchura de pulso de 7,35 μs ; anchura espectral de 10 ppm; y tiempo de repetición de 12,85 segundos. Se usaron ácido trimetilsililpropiónico-2,2,3,3,- d_4 (TSP, 0,6 mmol/l para extractos de PCA y 1,2 mmol/l para lípidos) como patrones externos para la cuantificación de metabolitos basándose en espectros de ^1H -MR. Los desplazamientos químicos de ^1H de espectros eran en referencia a TSP a 0 ppm. Para el análisis de ^{31}P -MRS de extractos de PCA, se añadió EDTA 100 mmol/l para la complejación de iones divalentes dando como resultado una anchura de línea significativamente más estrecha de los picos de ^{31}P . Se ajustó a 7 el pH usando KOH y HCl. Se usaron los siguientes parámetros de RMN con un programa de desacoplamiento de pulsos compuestos (CPD): frecuencia de ^{31}P de funcionamiento de 202,3 MHz; 800 acumulaciones; ángulo de pulso de 90° ; nivel de potencia para el canal de ^{31}P de 12 dB; anchura de pulso de 9 μs ; anchura espectral de 35 ppm; y tiempo de repetición de 2,0 segundos. Se usó el desplazamiento químico de fosfocreatina a -2,33 ppm como referencia de desplazamiento. Se usaron las concentraciones absolutas de fosfocreatina calculadas a partir de ^1H -MRS para la cuantificación de metabolitos de los espectros de ^{31}P -MR.

Resultados anticipados: La GLN puede potenciar el contenido celular de ATP, mejora la razón de ATP/ADP y potencia el contenido de NAD(+)/NADH y creatina/fosfocreatina. Adicionalmente, la GLN disminuyó el lactato del tejido de miocardio y mejoró los niveles del tejido de miocardio de glutamato, glutamina y glucosa. Finalmente, potencia los niveles de glutatión del tejido de miocardio.

Análisis estadístico: Se comprobó la normalidad de la distribución de los datos mediante inspección visual de los gráficos Q-Q. Se aplicó una transformación logarítmica cuando era necesario y se comprobó de nuevo la normalidad. Se analizaron las diferencias en marcadores del metabolismo de tejido auricular derecho por medio de ANOVA para medidas repetidas; si se observa que se encuentra una diferencia global significativa entre los grupos, se analizaron las diferencias a puntos de tiempo individuales por medio de la prueba de la t de Student. Se consideró significativo un valor de $p < 0,05$. Se usó el paquete de software SPSS (versión 10.07, SPSS Inc., Chicago IL) para todos los análisis estadísticos.

Determinación del efecto de GLN sobre la función cardíaca posoperatoria y desenlaces globales de pacientes.

Evaluación de la función cardíaca pre y posoperatoria. Con el fin de evaluar la función cardíaca preoperatoria, se colocó un catéter Swan Ganz de índice/gasto cardíaco continuo en la inducción de la anestesia. Se registraron el

gasto cardiaco (CO), índice cardiaco (CI) y resistencia vascular sistémica (SVR). Tras la interrupción de la circulación extracorpórea, inmediatamente antes del cierre esternal, se registraron los parámetros cardíacos (CO, CI y SVR). Se evaluaron a las 6 y 24 horas tras el procedimiento de CABG los parámetros cardíacos (CO, CI, SVR). Otros datos registrados pueden incluir el número de vasos coronarios injertados y la ubicación particular de los injertos (es decir, principal izquierda, coronaria derecha, exedra.), la duración de la circulación extracorpórea, la longitud de pinzamiento cruzado de la aorta y la transfusión de glóbulos rojos.

Adicionalmente, se analizó la incidencia de arritmias cardíacas preoperatorias (específicamente: fibrilación auricular, aleteo auricular, complejos ventriculares prematuros, fibrilación/taquicardia ventricular y necesidad de marcapasos/desfibrilador, necesidad de terapia antiarrítmica). Se registraron la aparición de arritmias posoperatorias, así como la necesidad de marcapasos y o terapia antiarrítmica.

Evaluación de la necesidad de terapia vasopresora. Se registró al inicio de la anestesia cualquier requisito de terapia vasopresora y su dosis. (La terapia vasopresora incluye el uso de cualquiera de los siguientes medicamentos: epinefrina, norepinefrina, vasopresina, dopamina, dobutamina, neosinefrina o milrinona). Tras la interrupción de la circulación extracorpórea, inmediatamente antes del cierre esternal, se registraron la utilización y las dosis de cualquiera de los vasopresores anteriores. Finalmente, a las veinticuatro horas tras el procedimiento de CABG, se registraron los datos de la utilización y dosis de terapia vasopresora.

Evaluación de desenlaces clínicos posoperatorios. Tras el procedimiento de CABG, se registraron estos parámetros clínicos adicionales:

1. Evaluación de la aparición de arritmias cardíacas posoperatorias
2. Duración de la intubación posoperatoria
3. Necesidad de reintubación
4. Duración de la estancia en la UCI
5. Duración de la estancia en el hospital
6. Tendencias de supervivencia (incluyendo supervivencia a los 6 meses)

Crítica y resultados esperados: Se usó terapia con GLN para mejorar los índices de la función cardíaca (particularmente el índice cardiaco) tras la interrupción de la circulación extracorpórea y a las 24 horas, tras CABG. Con respecto al uso de terapia vasopresora, la terapia con GLN reduce la necesidad del uso de fármacos vasoactivos. Finalmente, la terapia con GLN disminuye el tiempo de intubación y la estancia en la UCI tras CABG.

Análisis estadístico: Se comprobó la normalidad de la distribución de los datos mediante inspección visual de los gráficos Q-Q. Se aplicó una transformación logarítmica cuando era necesario y se comprobó de nuevo la normalidad. Se realizó la comparación de los dos grupos con ANOVA de medidas repetidas o unidireccional. Se compararon la duración de la estancia en el hospital y la UCI y la duración de la intubación por medio de la prueba de la U de Mann-Whitney. Se compararon razones y datos ordinales con la prueba exacta de Fisher bilateral. Se consideró significativo un valor de $p < 0,05$. Se usó el paquete de software SPSS (versión 10.07, SPSS Inc., Chicago IL) para todos los análisis estadísticos.

Análisis de datos tras el estudio: Todos los datos recogidos se sometieron a prueba para determinar la significación tal como se describió anteriormente. Se usó el paquete de software SPSS (versión 10.07, SPSS Inc., Chicago IL) para calcular la estadística de distribución y para todos los análisis estadísticos. Se consideró significativo un valor de $p < 0,05$.

Ejemplo 2:

La glutamina (GLN) protege frente a la mortalidad inducida por endotoxinas. El aumento de los niveles de interleucina-18 (IL-18) parece desempeñar un papel crítico en la insuficiencia orgánica inducida por citocinas y puede ser predictivo de mortalidad en pacientes con septicemia. El tratamiento posterior con GLN atenúa la expresión de citocinas proinflamatorias (IL-18, IL-6 y TNF- α), potencia la expresión de proteína de choque térmico pulmonar 72 (HSP 72) y mejora la supervivencia tras 2CLP. Se sometieron ratas Sprague-Dawley (250-300 g) a 2CLP y una hora tras la cirugía se les administró una única dosis de GLN (0,75 g/kg) (n=18) o una disolución salina equilibrada (control) (n=17). Se monitorizó la supervivencia durante cinco días. En un grupo separado de animales, se extrajo sangre a múltiples puntos de tiempo para el análisis de la expresión de citocinas (IL-18, IL-6 TNF- α e IL-10). Se extrajo tejido pulmonar para el análisis de HSP 72. La administración de GLN una hora tras 2CLP atenuó significativamente la expresión de IL-18 a las 12, 18 y 24 horas tras 2CLP ($p < 0,05$). Se atenuó la expresión de IL-6 y TNF- α a las seis horas tras 2CLP ($p < 0,05$). La GLN potenció la expresión de HSP 72 pulmonar frente al control ($p < 0,05$) tras 2CLP. Finalmente, la GLN disminuyó la tasa de mortalidad a los cinco días desde el 78% hasta el 42% ($p < 0,04$) tras 2CLP. Los datos indican que la GLN puede mejorar notablemente la supervivencia de 2CLP. Los posibles mecanismos para la protección incluyen la atenuación de la expresión de citocinas proinflamatorias y la

expresión de HSP 72 pulmonar potenciada. Además, esta es la primera descripción de la expresión de IL-18 en el modelo de 2CLP. Estos datos indican que una única dosis de GLN administrada como tratamiento posterior puede atenuar el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) y prevenir la mortalidad de la septicemia polimicrobiana.

5 Ejemplo 2:

Se sabe que la septicemia está asociada con una alteración intrínseca del metabolismo tisular. Datos recientes indican un determinante principal de la utilización de oxígeno y la función metabólica tisular son los niveles celulares de NAD⁺. La GLN puede conservar el contenido en ATP y atenuar la acumulación de lactato tras el choque endotoxémico. El presente estudio somete a prueba la hipótesis de que la GLN, administrada como tratamiento posterior, conserva los niveles de NAD⁺ y atenúa la disfunción metabólica en tejido cardíaco y pulmonar tras septicemia polimicrobiana.

Métodos: Se sometieron ratas Sprague-Dawley macho (300-350 g) a ligación y punción cecal (CLP) y una hora tras la cirugía se les administró una única dosis de GLN (0,75 g/kg) (n=18) o una disolución salina equilibrada (CONT) (n=17). Se monitorizó la supervivencia durante cinco días. En un grupo separado de animales (n=4/grupo), se extrajo tejido cardíaco y pulmonar 24 horas tras CLP y se analizó el metabolismo tisular mediante ¹H-MRS y ³¹P-MRS.

Resultados: La administración de GLN condujo a una mejora significativa en el contenido en NAD⁺ tanto en tejido cardíaco como pulmonar tras CLP (p < 0,005). Adicionalmente, la GLN atenuó significativamente la caída de la razón ATP/ADP del tejido pulmonar (p < 0,005), creatina/fosfocreatina (p < 0,01), glucosa (p < 0,01) y glutamina (p < 0,005). La administración de GLN condujo a una tendencia hacia una disminución en la acumulación de lactato pulmonar (p < 0,06). La atenuación mediada por GLN de la disfunción metabólica tisular estaba asociada con una disminución significativa de la tasa de mortalidad a los cinco días tras CLP [el 78% (GLN) frente al 42% (CONT) (p < 0,04)].

Conclusiones: La administración de GLN puede atenuar la disfunción metabólica y la caída de NAD⁺ observada en tejido cardíaco y pulmonar tras septicemia inducida por medio de ligación y punción cecal. El efecto más significativo se observó en tejido pulmonar. El metabolismo tisular mejorado está asociado con aumento de la supervivencia. Posibles explicaciones del efecto pueden incluir manipulación por la GLN de la proteína de choque térmico, activación de PPAR atenuada, contenido en glutatión tisular conservado o por medio de la disponibilidad potenciada del sustrato metabólico.

30 Ejemplo 3:

Una única dosis de glutamina puede mejorar disfunción cardíaca tras lesión por reperfusión e isquemia. Esto está relacionado con la capacidad de la glutamina de prevenir la disfunción metabólica tras la isquemia y reperfusión. Este tipo de dosificación de glutamina puede mejorar los desenlaces de enfermedades cardíacas tales como arteriopatía coronaria, ataques al corazón y procedimientos de circulación extracorpórea.

La glutamina (administrada como dipéptido de alanil-glutamina) puede mejorar los desenlaces de lesión por reperfusión e isquemia en el corazón cuando se administra como una única dosis. Esto se demostró en un modelo de rata de lesión por reperfusión e isquemia. Es probable que esto se deba a la conservación de la función metabólica y los niveles de glutatión. También desempeña un papel la expresión de proteína de choque térmico potenciada.

Una única dosis de dipéptido de glutamina (alanil-glutamina) administrada a una rata 18 horas antes de la lesión del miocardio puede mejorar la función del miocardio tras la lesión por reperfusión e isquemia. Esta protección se debe a la conservación del metabolismo y los niveles de glutatión. Una única dosis de alanil-glutamina funciona por medio de la conservación del metabolismo tisular (contenido en ATP exc.) y la conservación de los niveles de glutatión tisular.

El concepto de un dipéptido de aminoácido que se produce comúnmente, como alanil-glutamina, nunca se ha examinado como fármaco de dosis única para mejorar los desenlaces de la reperfusión e isquemia cardíaca por ningún otro investigador.

La tecnología puede usarse para administrar alanil-glutamina u otro dipéptido de glutamina a pacientes que llegan al SU con ataques al corazón, pacientes que llegan para cirugía cardíaca o pacientes con angina crónica. El beneficio es enorme ya que este es un aminoácido benigno y relativamente barato.

Ejemplo 4:

No se ha encontrado ningún agente farmacológico que sea beneficioso en el tratamiento de termoplejía. La investigación previa ha indicado que la expresión de proteína de choque térmico 70 (HSP 70) potenciada puede mejorar la supervivencia tras termoplejía experimental. Sin embargo, no se ha utilizado ningún potenciador clínicamente relevante de HSP 70 en ensayos con seres humanos. La glutamina (GLN) administrada por vía

intravenosa puede potenciar la expresión de HSP 70 tisular en modelos de roedor de septicemia y lesión por reperusión/isquemia. El presente documento sometió a prueba si la GLN administrada podía potenciar la expresión de HSP 70 tisular y mejorar la supervivencia tras termoplejía en la rata.

Métodos: Se administró GLN (0,65 g/kg) (n=8) o una disolución salina equilibrada (BSS) (n=8) (control, se disolvió GLN en vehículo) a ratas Sprague-Dawley (250-300 g) por medio de sonda nasogástrica dos veces al día durante cinco días antes de la termoplejía experimental. Se realizó la termoplejía en ratas anestesiadas (ketamina/xilazina) calentando los animales hasta 42°C (temperatura rectal) durante 30 minutos. Se analizó la supervivencia durante cinco días tras la termoplejía. En un conjunto separado de animales, se analizaron HSP 70 y la activación de factor-1 de choque térmico (HSF-1) a 1 hora y 24 horas tras la termoplejía en tejido pulmonar y cardíaco por medio de inmunotransferencia de tipo Western (n= 10/grupo). Se realizó el análisis estadístico por medio de la prueba exacta de Fischer para la supervivencia y ANOVA con agrupamiento de Duncan como prueba a posteriori para la expresión de HSP-70 y HSF-1.

Resultados: En animales control, la termoplejía condujo a mortalidad significativa ((5/8), 62,5%), mientras que la terapia con GLN oral redujo significativamente la mortalidad ((1/8), 12,5%) ($p < 0,003$). Todas las mortalidades se produjeron en las primeras 48 horas tras la termoplejía. La administración de GLN también potenció significativamente la expresión de HSP 70 1 hora tras la termoplejía tanto en tejido pulmonar como cardíaco ($p < 0,01$ para ambos tejidos frente a animales no calentados y controles calentados). Se observó un aumento significativo en la expresión de HSP 70 en tejido pulmonar y cardíaco a las 24 horas tanto en animales tratados con GLN como animales control frente a animales no calentados. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en HSP 70 entre animales tratados con GLN y control a las 24 horas tras la termoplejía. No se observó ningún cambio en la activación de HSF-1 (el factor de transcripción para HSP 70) a ningún punto de tiempo sometido a prueba tras la termoplejía.

Conclusiones: Los resultados demostraron que la administración oral, *in vivo* de GLN puede mejorar la supervivencia tras lesión por termoplejía mortal. Los resultados también indicaron por primera vez que la GLN oral puede potenciar la expresión de HSP 70 tisular inmediatamente tras la lesión por termoplejía. El hecho de que existiera una disminución similar de HSP 70 a las 24 horas tras la termoplejía en ambos grupos calentados establece que la GLN puede acelerar la expresión de HSP 70 y que este es un mecanismo de supervivencia a termoplejía potenciada por medio de GLN. El hecho de que no se observara ningún cambio en la activación de HSF-1 muestra que la GLN provoca una traducción más rápida del ARNm de HSP 70 existente, en lugar de la activación del gen de HSP 70 nuevo. Los datos indicaron que la GLN oral es útil en la prevención de la mortalidad de termoplejía en poblaciones en riesgo, tales como atletas y soldados.

Ejemplo 5:

Las rutas de la lesión inducida por septicemia incluyen liberación de citocinas inflamatorias, actividad de iNOS potenciada y disfunción metabólica tisular. Se sabe que la ruta de proteína de estrés térmico (HSP) desempeña un papel significativo en la fisiopatología de la septicemia y la activación de HSP potenciada puede mejorar la supervivencia tras la septicemia.

En ligación y punción cecal (CLP) en la rata, una única dosis de glutamina (GLN) tras el inicio de CLP puede potenciar la expresión de HSP pulmonar, atenuar rutas de lesión tisular y mejorar la supervivencia.

Métodos: Se dividieron ratas Sprague-Dawley macho en 5 grupos. Se trataron dos grupos con 400 mg/kg de quercetina (Q) i.p. (inhibidor de HSP 70) 6 horas antes de CLP. Se realizó CLP y se administró GLN (0,75 g/kg, i.v.) o disolución salina equilibrada (BSS) una hora tras CLP (n=10 por grupo). Los siguientes dos grupos recibieron el mismo tratamiento de GLN + CLP (n=18) o BSS + CLP (n=17) menos quercetina. El grupo final (CONT, n=6) no recibió tratamiento. Se monitorizó la supervivencia a los cinco días. En estudios separados, se extrajo el pulmón 24 horas tras CLP y se analizó el metabolismo tisular mediante ^{31}P - y ^1H -MRS. Un estudio final analizó sangre para determinar TNF- α a las 6 horas tras CLP y tejido pulmonar 6 horas tras CLP para determinar HSP-70, iNOS, eNOS y factor-1 de choque térmico (HSF-1) activado.

Resultados: Una única dosis de GLN tras la septicemia potenció la activación de HSF-1 pulmonar y la expresión de HSP 70. La GLN condujo a una mejora significativa en la supervivencia a los 5 días, atenuó iNOS pulmonar y la expresión de TNF- α plasmática. La GLN potenció eNOS pulmonar y mejoró la razón ATP/ADP pulmonar, NAD $^{+}$ y atenuó la acumulación de lactato. La inhibición de la activación de HSF-1 y la posterior expresión de HSP70 mediante Q suprimió el beneficio de supervivencia de GLN y bloqueó la mejora en la disfunción metabólica del tejido pulmonar. No se indicó ningún efecto de Q sobre la expresión de TNF- α ni NOS.

Conclusiones: La capacidad de GLN para potenciar la activación de HSP y atenuar la disfunción metabólica tisular es un mecanismo clave en la atenuación por GLN de la mortalidad por septicemia. Debido a los efectos de Q, la atenuación por GLN de la actividad de iNOS y TNF- α no parecían ser mecanismos clave de los efectos beneficiosos de GLN.

Ejemplo 6:

Se ha asociado la proteína de choque térmico sérica 72 (sHSP72) elevada con el aumento de la supervivencia tras traumatismo grave. Sin embargo, no se ha encontrado ningún potenciador clínicamente relevante de HSP72 en seres humanos. Se ha mostrado que la glutamina (GLN) potencia los niveles de HSP 72 tisular y mejora la supervivencia tras la septicemia y la respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) en roedores. El presente estudio se realizó para determinar si la GLN podía potenciar los niveles de sHSP72 y mejorar la supervivencia en SIRS experimental en la rata y para evaluar si la GLN podía potenciar niveles de sHSP72 en pacientes con pancreatitis e indicaciones de inflamación sistémica.

Métodos: Se midió sHSP72 en ratas Sprague-Dawley que se sometieron a ligación y punción cecal y 1 hora tras CLP se les administró una única dosis de GLN (administrada como ALA-GLN) (0,75 g/kg) (n=4) o una disolución salina equilibrada (BSS) (n=4). Un tercer grupo (CONT, n=4) no recibió tratamiento. Se monitorizó la supervivencia en un conjunto separado de ratas durante 5 días. Se midió sHSP72 en ratas CONT y ratas GLN/BSS 6 horas tras CLP. Se midió sHSP72 por medio de ELISA. Se evaluó sHSP72 en pacientes con pancreatitis tras desbridamiento quirúrgico. Los pacientes elegibles estaban en la UCI en el momento de la inclusión con signos de inflamación sistémica tal como se midió mediante proteína C-reactiva > 10. Los pacientes elegibles requirieron TPN > 7 días. Los pacientes tenían una sHSP72 inicial determinada y se aleatorizaron a GLN i.v. (0,3 g/kg) (n=3) (administrada como ALA-GLN) o TPN convencional (n=3). Se determinó sHSP72 7 días tras la inclusión.

Resultados: La GLN potenció significativamente sHSP72 ($p < 0,05$ frente a BSS) y la supervivencia (el 61% (GLN) frente al 18% (BSS); $p < 0,01$) tras SIRS experimental.

Ejemplo 7:

Los datos *in vivo* e *in vitro* anteriores han mostrado que la inducción de la respuesta de choque térmico puede atenuar la liberación de citocinas proinflamatorias. Respuestas inmunitarias y proinflamatorias abrumadoras son características clave del choque septicémico y desempeñan un papel esencial en la patogénesis del daño tisular, disfunción sistémica orgánica múltiple y por último la muerte. Se ha mostrado previamente que la glutamina (administrada como un complemento farmacológico) mejora la supervivencia, aumenta la expresión de proteína de choque térmico y atenúa la liberación de citocinas proinflamatorias en animales tratados con LPS, un efecto que se produce sin la inhibición completa del bloqueo o la liberación de citocinas de efectos posteriores. También se ha mostrado que la deficiencia de glutamina modula la producción de citocinas *in vitro* en células mononucleares sanguíneas cultivadas (PMBC) y el aporte complementario reduce la interleucina (IL)-6 e IL-8 en tejido duodenal humano cultivado.

Hasta la fecha, no se ha encontrado ningún agente farmacológico que sea beneficioso en el tratamiento de termoplejía en seres humanos. Se ha mostrado previamente que el estrés térmico y la termoplejía tienen un efecto profundo sobre la liberación de citocinas circulantes y la proteína de choque térmico 70 (HSP 70) potenciada puede mejorar la supervivencia tras termoplejía experimental.

El beneficio del tratamiento previo con glutamina es enorme, ya que este es un aminoácido benigno y relativamente barato. Un uso para el tratamiento previo de glutamina oral es la prevención de la mortalidad de termoplejía en poblaciones de riesgo tales como soldados y atletas en los que el estrés térmico para el cuerpo es inevitable.

Los datos anteriores muestran que el aporte complementario farmacológico de glutamina es un potenciador potente de la expresión de proteína de choque térmico 72 (HSP 72) en experimentos *in vitro* e *in vivo*. Adicionalmente, células mononucleares de sangre periférica tratadas con glutamina presentaban un aumento en la expresión de proteína de choque térmico y tuvieron una atenuación significativa de la liberación de factor de necrosis tumoral alfa. Específicamente, ratas tratadas previamente por vía oral con glutamina durante cinco días consecutivos y expuestas posteriormente a termoplejía experimental tuvieron una supervivencia mejorada y una expresión de proteína de choque térmico aumentada.

Métodos: Los pacientes elegibles aleatorizados al grupo de glutamina (tratamiento) como su tratamiento inicial reciben L-glutamina oral a una dosis de 0,65 g/kg dos veces al día durante cinco días antes del estrés térmico posterior en una bañera caliente en la GCRC. Los pacientes también tomaron la L-glutamina la mañana antes del estrés térmico posterior. Entonces se colocaron los pacientes en la bañera caliente a una temperatura de 40 grados Celsius (+/-2 grados C) durante 30 minutos o hasta que su temperatura oral alcanza 99,6 grados F o superior. Se basó la dosis seleccionada de L-glutamina en la dosis máxima que se ha administrado de manera segura previamente en seres humanos. La dosis se ha tolerado bien sin efectos secundarios adversos incluso en pacientes gravemente enfermos.

Tras un periodo de 4 semanas para su lavado tras el estudio inicial (la semivida de la glutamina es de 6 horas), el paciente regresó y continuó el mismo procedimiento con el placebo que consistía en un polvo de maltodextrano. Pacientes que se aleatorizaron a tomar el placebo inicialmente lo hicieron así, entonces tras un periodo de lavado de 2 semanas regresaron para finalizar el brazo de tratamiento con L-glutamina del estudio.

Se extrajo sangre de todos los pacientes (10 cc/punto de tiempo) con el fin de evaluar la respuesta de citocinas, la

expresión de proteínas de choque térmico y los niveles de glutamina durante todo el transcurso del estudio. Se tomó sangre de nivel inicial tras obtenerse el consentimiento y se dieron las instrucciones de uso de L-glutamina/placebo oral. Se extrajo una muestra de sangre la mañana antes del estrés térmico en la bañera caliente; después de que se administrase la última dosis de L-glutamina/placebo. Los puntos de tiempo adicionales para extracciones de sangre incluyeron 1 hora, 6 horas y 24 horas después de que el paciente se sometiese al estrés térmico. Cada punto de tiempo depende de cuando se expresan citocinas particulares (TNF-alfa, IL-1, IL-6 e IL-18) en la sangre durante la cascada proinflamatoria, sin embargo se midieron todas las citocinas a cada punto de tiempo.

Se extrajeron muestras de sangre de diez ml en tubos EDTA en el nivel inicial, tras la última dosis de L-glutamina/placebo, 1, 6 y 24 horas. Se centrifugaron los tubos y se separó plasma para el análisis de glutamina y citocinas. Se congelaron las muestras y se almacenaron a 80°C. Adicionalmente, se tomaron cinco ml de sangre en tubos con tapón rojo en el nivel inicial, tras la última dosis de L-glutamina/placebo, 1, 6 y 24 horas para la estimulación con LPS posterior de la sangre.

Se extrajeron aproximadamente 75 ml de sangre de cada sujeto durante cada brazo del estudio en total. Hubo un periodo de lavado de un mes y entonces los pacientes tuvieron otra extracción de sangre de 75 ml.

Análisis de la expresión de proteínas de choque térmico: Se analizó la expresión proteína de choque térmico 70 sérica (HSP 70) usando un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) específico para HSP 70 sérica humana (Stressgen, Victoria BC, Canadá). Se realizó el ensayo según las instrucciones del fabricante. También se analizaron HSP 70, HO-1 y HSP 27 usando inmunotransferencia de tipo Western. Se extrajo sangre a las 6 horas tras el estrés térmico y se colocó en tubos de recogida de sangre que contenían cóctel inhibidor de proteasas (Roche Molecular, Indianapolis, Indiana). Entonces se centrifugó la sangre durante 3 minutos a 5000 revoluciones/min. y se separó el sobrenadante que contenía plasma y se congeló a -80 grados Celsius. Se determinaron las concentraciones de proteína de las muestras utilizando el método de Lowry. Se realizó la inmunotransferencia de tipo Western usando geles de SDS PAGE al 10% de una manera convencional usando tampón de tratamiento 1X. Se bloquearon membranas Millipore con Blotto al 5% (5% en peso:volumen de leche desnatada en polvo en solución salina tamponada con fosfato con Tween al 0,1%). Para la detección de HSP72, se incubaron entonces las transferencias con anticuerpo monoclonal de ratón específico, C92 (StressGen, Victoria, BC, Canadá). Entonces se lavaron las transferencias y se incubaron con un anticuerpo de cabra secundario anti-HRPO de ratón (Santa Cruz, CA) y se reveló usando un sistema de quimioluminiscencia potenciada. Para el control de proteína HSC73, se utilizó un anticuerpo monoclonal de rata específico frente a HSC73 constitutiva (Stress-Gen). Para la detección de HO-1, se aplicó la técnica de inmunotransferencia de tipo Western mencionada anteriormente y se incubó la membrana con un anticuerpo policlonal de conejo frente a HO-1 (StressGen).

Análisis de la liberación de citocinas proinflamatorias:

Detección de TNF-alfa: Se midieron las concentraciones de TNF-alfa usando un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Se extrajo sangre a las 6 horas atrás el estrés térmico y se estimuló con LPS. Se determinaron las concentraciones de TNF-alfa utilizando un kit de ELISA para TNF-alfa de Endogen (Woburn, Massachusetts). Entonces se determinaron los resultados de manera espectrofotométrica usando un lector de microplacas (Thermo Lab Systems Opsys MR, Chantilly, Virginia).

Detección de IL-6 e IL-1: Se midieron las concentraciones de interleucina-6 e interleucina-1 usando un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Se extrajo sangre a las 6 horas atrás el estrés térmico y se estimuló con LPS. Entonces se analizó la sangre utilizando kits de ELISA para IL-6 e IL-1 de rata respectivamente de Research Diagnostics Inc. (Flanders, New Jersey). Entonces se obtuvieron resultados de manera espectrofotométrica usando un lector de microplacas (Thermo Lab Systems Opsys MR, Chantilly, Virginia).

Detección de IL-18: Se extrajo sangre a las 24 horas atrás el estrés térmico y se estimuló con LPS. Se detectaron las concentraciones de interleucina-18 usando un kit de ELISA tal como se describió previamente de Biosource International (Camarillo, California).

Ejemplo 8:

Los efectos protectores de la GLN pueden deberse a la expresión de proteínas de choque térmico (HSP) potenciada, específicamente HSP 70. Se ha sabido desde hace mucho que la inducción de HSP 70 en animales experimentales por medio de calentamiento subletal y/o arsénico es notablemente protector contra muchas formas de lesión. Sin embargo, se ha carecido de un potenciador clínicamente relevante de HSP 70 que pueda administrarse de manera fácil y segura a sujetos humanos. La GLN puede potenciar HSP 70 y otras HSP en células, tejidos, animales completos y pacientes graves. La potenciación de HSP 70 por medio de la activación potenciada del factor de transcripción responsable de la expresión de HSP 70 (factor-1 de choque térmico (HSF-1)) puede proteger a células y animales experimentales de una amplia variedad de lesiones y estreses. Finalmente, la administración de este aminoácido seguro y no tóxico a seres humanos gravemente enfermos puede potenciar HSP-70 en el suero de estos pacientes.

La protección con glutamina de células frente a lesión y estrés está mediada por la expresión de HSP 70 potenciada. Experimentos iniciales indicaron que la protección con GLN de células contra el estrés térmico y

oxidante se debía a la expresión potenciada de HSP 70. Esto se comprobó cuando se bloqueó la expresión de HSP 70 por medio de quercetina (inhibe la unión de HSF-1) y por medio de inhibición antisentido directa del gen de HSP 70 (figura 12).

La glutamina protege contra la septicemia inducida por endotoxinas y potencia HSP 70 y HSP 25 en múltiples tejidos en animales experimentales. El siguiente conjunto de experimentos evaluó si la GLN podía inducir HSP en animales complejos. Se evaluaron los efectos de la GLN tanto en animales estresados como no estresados. La GLN puede potenciar HSP 70 y HSP 25 en el tejido pulmonar y cardíaco de ratas no estresadas (figura 13).

Entonces se evaluó el efecto de la GLN sobre la supervivencia y la expresión de HSP tras endotoxemia. Se administró GLN simultáneamente con dosis letales de endotoxina. La GLN redujo la mortalidad y potenció HSP 70 y 23 tras endotoxemia letal (figuras 14 y 15).

También se realizó la evaluación de la liberación de citocinas proinflamatorias tras endotoxemia. LA GLN atenuó TNF-alfa e IL-1 beta tras endotoxemia (figura 16).

La GLN potencia la supervivencia tras septicemia polimicrobiana por medio de inducción de HSP 70 y activación potenciada del factor-1 de choque térmico (HSF-1). Puesto que la endotoxemia mortal no es un modelo clínicamente relevante de septicemia, se evaluó el efecto del tratamiento posterior con GLN sobre la expresión de HSP 70 pulmonar, la activación de HSF-1 y la supervivencia tras peritonitis y septicemia polimicrobiana en un modelo clínicamente relevante. Se eligió ligación y punción cecal (CLP) en la rata como modelo apropiado. La expresión pulmonar de HSP se centró, como los datos previos han indicado, en que la transfección adenoviral de HSP 70 en los pulmones de animales que se someten a este mismo ataque podía potenciar la expresión de HSP 70 deficiente y duplicar la supervivencia. Los animales se sometieron a inducción de peritonitis y septicemia y se trataron 30 minutos después con GLN. El tratamiento con GLN potenció notablemente la expresión de HSP 70 pulmonar deficiente y la activación de HSF-1. La GLN también potenció notablemente la expresión de HSP 70 sérica. Se bloqueó el efecto mediante la administración de quercetina, un inhibidor de la expresión de HSP 70 (expresado como Q en las figuras) (figura 17 y 18).

La GLN también pudo atenuar la disfunción metabólica tisular tras septicemia y peritonitis casi doblando la razón ATP/ADP y los niveles de NAD⁺/NADH en tejidos pulmonares (figuras 19 y 20). Se inhibió el efecto mediante el inhibidor de HSP 70 quercetina (expresada como Q a continuación).

Finalmente, la GLN pudo mejorar significativamente la supervivencia tras peritonitis y septicemia polimicrobiana (figura 21). Se inhibió el efecto mediante la administración de quercetina. Los datos indican que la GLN puede proteger contra peritonitis, septicemia e infección tras una lesión.

Una dosis única de GLN potencia el metabolismo del tejido de miocardio, el contenido en glutatión y mejora la función del miocardio tras lesión por reperfusión-isquemia. Se evaluó el efecto de la GLN sobre la función cardíaca tras lesión por reperfusión e isquemia miocárdica (R/I), una lesión que imita una lesión similar a infarto de miocardio. Para evaluar el efecto de la GLN, se administró una dosis única de glutamina 18 horas antes de los 15 minutos de isquemia sin flujo utilizando un modelo de corazón de rata en funcionamiento. Los animales tratados con GLN tuvieron una mejora significativa del gasto cardíaco tras R/I (figura 22). Se observó una mejora significativa de los parámetros del metabolismo del tejido de miocardio. Los resultados incluyeron razón ATP/ADP, contenido en NAD⁺/NADH mejorados y acumulación de lactato del tejido de miocardio disminuida. Adicionalmente, la GLN mejoró el contenido en glutatión del miocardio (figura 23) tras R/I. Los datos indican que la GLN podría proteger a pacientes de la lesión por R/I orgánica y/o lesión por R/I miocárdica, tal como infarto de miocardio.

La GLN potencia la supervivencia y la expresión de HSP 70 tras lesión por termoplejía experimental. A continuación se determinó si la GLN administrada por vía oral era protectora contra la mortalidad por termoplejía mortal. También se evaluó el efecto de la GLN sobre la expresión de HSP 70 en este modelo de rata. Cinco días de GLN oral antes de la lesión mortal por termoplejía redujo significativamente la mortalidad (figura 24) y potenció la expresión de HSP 70 en tejido cardíaco, pulmonar y de colon. La GLN administrada por vía oral puede atenuar la morbilidad en soldados y otros pacientes con riesgo de termoplejía.

La GLN potencia los niveles de HSP 70 sérica en suero de pacientes gravemente enfermos. A continuación, se determinó si la GLN podía potenciar HSP 70 en pacientes gravemente enfermos. Para determinar esto, se administró GLN o una disolución control isonitrogenada por vía intravenosa a un grupo mixto de pacientes gravemente enfermos en un entorno de UCI quirúrgica. La GLN condujo a una potenciación de cuatro veces de los niveles de HSP sérica frente a disolución control isonitrogenada en estos pacientes (figura 25). Se examinaron los niveles de HSP 70 sérica en el modelo de peritonitis/septicemia polimicrobiana previamente descrito en la rata (modelo CLP). Se encontró un aumento de aproximadamente cuatro veces de los niveles de HSP 70 sérica, que se correlacionó con una duplicación de la supervivencia. Los datos son particularmente importantes, ya que la investigación previa en pacientes con traumatismos ha mostrado que niveles de HSP 70 sérica potenciados se correlacionan con aumento de la supervivencia en pacientes gravemente traumatizados.

Además, tal como se muestra en la figuras 26-29 y las tablas 1-10, los niveles de HSP-70 a 1 semana fueron 2,82

unidades superiores en pacientes que recibieron glutamina en comparación con los pacientes control (IC del 95%: de -0,01 a 5,64, $p = 0,050$). El cambio en los niveles de HSP-70 desde el nivel inicial hasta 1 semana fue 2,60 unidades superior en pacientes que recibieron glutamina en comparación con los pacientes control (IC del 95%: de -0,09 a 5,29, $p = 0,057$). Los niveles de HSP-70 a 1 semana fueron 3,71 veces superiores en pacientes que recibieron glutamina en comparación con los controles (IC del 95%: de 1,15 a 11,85, $p = 0,029$). En otras palabras, la tasa de aumento de los niveles de HSP-70 a lo largo de 1 semana fue 3,40 veces mayor en pacientes que recibieron glutamina en comparación con los controles (IC del 95%: de 1,50 a 7,70, $p = 0,005$).

A lo largo de toda esta solicitud, se hace referencia a diversas publicaciones, incluyendo patentes estadounidenses, por autor y año, y a patentes, por número. Se enumeran a continuación menciones completas para las publicaciones. Las descripciones de estas publicaciones y patentes se incorporan en su totalidad en el presente documento como referencia en esta solicitud con el fin de describir de manera más completa el estado de la técnica a la que esta invención pertenece.

La invención se ha descrito de una manera ilustrativa, y debe entenderse que la terminología que se ha usado pretende ser de naturaleza descriptiva en vez de limitativa.

Obviamente, son posibles muchas modificaciones y variaciones de la presente invención a la luz de las enseñanzas anteriores. Por tanto, debe entenderse que dentro del alcance de la invención descrita la invención puede ponerse en práctica de otra manera que la específicamente descrita.

Tabla 1

Características de nivel inicial para sujetos control y con glutamina, todos los diagnósticos.

	<i>Glutamina (n=15)</i>	<i>Control (n=14)</i>
Edad	53,2 ± 15,0	52,4 ± 14,1
Sexo (%)		
1	53,3	78,6
2	46,7	21,4
Diagnóstico (%)		
1	53,3	71,4
2	13,3	14,3
3	20,0	7,1
4	13,3	7,1
CRP de nivel inicial	19,8 ± 11,0	17,6 ± 7,8
BMI	31,4 ± 7,3	28,8 ± 7,6
Día de entrada en el hospital		
HSP-70 de nivel inicial	0,61 ± 1,05	0,39 ± 0,37

Tabla 2

Características de nivel inicial sujetos control y con glutamina, diagnósticos no pancreáticos.

	<i>Glutamina (n=15)</i>	<i>Control (n=14)</i>
Edad	59,9 ± 14,4	58,3 ± 15,3
Sexo (%)		

Diagnóstico (%)	1	57,1	75,0
	2	42,9	25,0
	2	28,6	50,0
	3	42,9	25,0
	4	28,6	25,0
CRP de nivel inicial		23,6 ± 13,0	20,2 ± 10,9
BMI		32,1 ± 6,8	29,6 ± 11,6
Día de entrada en el hospital			
HSP-70 de nivel inicial		0,83 ± 1,48	0,25 ± 0,35

Tabla 3

Comparación de los niveles de HSP-70 para sujetos control y con glutamina, diagnósticos no pancreáticos.

	Glutamina (n = 7)	Control (n = 4)	Valor de p [†]	Valor de p [†] NP
HSP-70 de nivel inicial	0,83 ± 1,48	0,25 ± 0,35	0,355	0,230
HSP-70 a 1 semana	3,43 ± 5,17	0,65 ± 0,53	0,206	0,230
Cambio de HSP-70 desde el nivel inicial	2,60 ± 4,77	0,40 ± 0,56	0,271	0,315
LN (HSP-70 de nivel inicial)	-1,43 ± 1,58	-2,01 ± 1,18	0,504	0,230
LN (HSP-70 a 1 semana)	0,20 ± 1,70	-0,90 ± 1,32	0,269	0,230
LN (HSP a 1 sem. / HSP de nivel inicial)	1,63 ± 1,21	1,12 ± 1,32	0,550	0,412

[†] Prueba de la t de varianzas desiguales en muestras independientes

[†] Prueba no paramétrica: prueba de la U de Mann-Whitney

5

Tabla 4

Comparación de niveles de HSP-70 en sujetos control y con glutamina, todos los diagnósticos.

	Glutamina (n = 15)	Control (n = 14)	Valor de p [†]	Valor de p [†] NP
HSP-70 de nivel inicial	0,61 ± 1,05	0,39 ± 0,37	0,457	0,983
HSP-70 a 1 semana	4,09 ± 4,70	1,27 ± 2,24	0,050	0,026
Cambio de HSP-70 desde el nivel inicial	3,48 ± 4,53	0,88 ± 2,01	0,057	0,010
LN (HSP-70 de nivel inicial)	-1,37 ± 1,26	-1,46 ± 1,11	0,849	0,983
LN (HSP-70 a 1 semana)	0,56 ± 1,63	-0,75 ± 1,42	0,029	0,026

LN (HSP a 1 sem. / HSP de nivel inicial)	1,93 ± 1,23	0,71 ± 0,89	0,005	0,006
--	-------------	-------------	-------	-------

[†] Prueba de la t de varianzas desiguales en muestras independientes

[‡] Prueba no paramétrica: prueba de la U de Mann-Whitney

Tabla 5

Comparación de desenlaces para sujetos control y con glutamina, todos los diagnósticos.

	Glutamina (n = 15)	Control (n = 14 [¶])	Valor de p [†]	Valor de p [‡] NP
Número de infecciones	1,87 ± 2,59	3,00 ± 3,19	0,305	0,331
Una o más infecciones (%)	60,0 %	71,4%	0,518	0,700
Número	0,20 ± 0,41,	0,57 ± 0,94	0,190	0,400
Una o más infecciones bacterianas (%)	20,0%	35,7%	0,344	0,427
Duración de la estancia (días)	29,73 ± 14,46	33,29 ± 22,18	0,617	0,880
Días en la UCI	15,73 ± 16,18	17,38 ± 22,49	0,828	0,650
Días con respirador	12,07 ± 15,25	15,77 ± 21,57	0,611	0,751
Bilirrubina total máxima (unidades??)	1,23 ± 0,67	2,01 ± 1,95	0,174	0,847
Creatinina total máxima (unidades??)	1,26 ± 0,89	1,47 ± 1,51	0,653	0,949

[†] Prueba de la t de varianzas desiguales en muestras independientes o prueba de chi-cuadrado de Pearson

[‡] Prueba no paramétrica: prueba de la U de Mann-Whitney o prueba exacta de Fisher

[¶] El tamaño de muestra es de 13 pacientes por días en la UCI y días con respirador.

5

Tabla 6

Comparación de desenlaces para sujetos control y con glutamina, diagnósticos no pancreáticos.

	Glutamina (n = 7)	Control (n = 4 [¶])	Valor p [†]	Valor p [‡] NP
Número de infecciones	1,43 ± 1,40	4,25 ± 2,36	0,091	0,073
Una o más infecciones (%)	57,1 %	100%	0,125	0,212
Número de infecciones bacterianas	0,0 ± 0,0	1,0 ± 1,41	0,252	0,230
Una o más infecciones bacterianas (%)	0 %	50 %	0,039	0,109
Duración de la estancia (días)	25,29 ± 6,18	31,25 ± 17,59	0,554	0,412

Días en la UCI	16,71 ± 7,65	26,00 ± 24,52	0,582	0,517
Días con respirador	12,86 ± 9,03	25,33 ± 25,50	0,488	0,517
Bilirrubina total máxima (unidades??)	1,70 ± 0,70	4,23 ± 2,19	0,102	0,164
Creatinina total máxima (unidades??)	1,80 ± 1,07	2,78 ± 2,48	0,499	0,648

[†] Prueba de la t de varianzas desiguales en muestras independientes o prueba de chi-cuadrado de Pearson

[‡] Prueba no paramétrica: prueba de la U de Mann-Whitney o prueba exacta de Fisher

[¶] E tamaño de muestra es de 3 pacientes por días en la UCI y días con respirador.

Tabla 7

Correlaciones de rangos de Spearman entre HSP-70 y desenlaces clínicos entre pacientes tratados con glutamina, todos los diagnósticos (n=15).

5

<i>Desenlace</i>	<i>HSP-70 a 1 semana</i>	<i>Cambio en HSP-70</i>	<i>Razón de HSP-70</i>
Número de infecciones	-0,401 p=0,139	-0,466 p=0,080	-0,384 p=0,158
Número de infecciones bacterianas	-0,309 p=0,263	-0,309 p=0,263	-0,424 p=0,115
Duración de la estancia	-0,082 p=0,771	-0,123 p=0,661	-0,206 p=0,462
Días en la UCI	-0,438 p=0,103	-0,615 p=0,015	-0,649 p=0,009
Días con respirador	-0,327 p=0,235	-0,483 p=0,068	-0,551, p=0,033
Bilirrubina total máxima	-0,213 p=0,445	-0,371 p=0,173	-0,025 p=0,929
Creatinina total máxima	-0,327 p=0,235	-0,476 p=0,073	-0,230 p=0,410

Tabla 8

Correlaciones de rangos de Spearman entre HSP-70 y desenlaces clínicos entre pacientes con diagnósticos no pancreáticos (n =11).

<i>Desenlace</i>	<i>HSP-70 a 1 semana</i>	<i>Cambio en HSP-70</i>	<i>Razón de HSP-70</i>
Número de infecciones	-0,443 p=0,172	-0,485 p=0,130	-0,333 p=0,318
Número de infecciones bacterianas	-0,418 p=0,201	-0,580 p=0,062	-0,666 p=0,027
Duración de la estancia	-0,245 p=0,467	-0,418 p=0,201	-0,518 p=0,102
Días en la UCI	-0,438 p=0,206	-0,693 p=0,026	-0,669 p=0,035
Días con respirador	-0,280 p=0,434	-0,511 p=0,132	-0,498 p=0,143
Bilirrubina total máxima	-0,351 p=0,290	-0,437 p=0,179	-0,428 p=0,189
Creatinina total máxima	-0,218 p=0,519	-0,236 p=0,484	-0,200 p=0,555

NOTAS: No hubo relaciones entre los niveles de HSP-70 y los desenlaces en la muestra total de 29 pacientes.

5

Tabla 9

Correlaciones de rangos de Spearman y Pearson entre HSP-70 y desenlaces clínicos entre pacientes tratados con glutamina, todos los diagnósticos (n=15).

<i>Desenlace</i>	<i>HSP-70 a 1 semana.</i>		<i>Cambio en HSP-70</i>	
	<i>Pearson</i>	<i>Spearman</i>	<i>Pearson</i>	<i>Spearman</i>
Número de infecciones	-0,359 p=0,189	-0,401 p=0,139	-0,387 p=0,154	-0,466 p=0,080

Número de infecciones bacterianas	-0,253 p=0,263	-0,309 p=0,263	-0,264 p=0,341	-0,309 p=0,263
Duración de la estancia	-0,127 p=0,652	-0,082 p=0,771	-0,162 p=0,563	-0,123 p=0,661
Días en la UCI	-0,373 p=0,171	-0,438 p=0,103	-0,447 p=0,094,	-0,615 p=0,015
Días con respirador	-0,306 p=0,267	-0,327 p=0,235	-0,394 p=0,146	-0,483 p=0,068
Bilirrubina total máxima	-0,292 p=0,290	-0,213 p=0,445	-0,349 p=0,202	-0,371 p=0,173
Creatinina total máxima	-0,283 p=0,307	-0,327 p=0,235	-0,271 p=0,329	-0,476 p=0,073

Tabla 10

Correlaciones de rangos de Spearman y Pearson entre HSP-70 y desenlaces clínicos entre pacientes con diagnósticos no pancreáticos (n =11).

5

<i>Desenlace</i>	<i>HSP-70 a 1 semana</i>		<i>Cambio en HSP-70</i>	
	<i>Pearson</i>	<i>Spearman</i>	<i>Pearson</i>	<i>Spearman</i>
Número de infecciones	-0,416 p=0,203	-0,443 p=0,172	-0,412 p=0,208	-0,485 p=0,130
Número de infecciones bacterianas	-0,182 p=0,593	-0,418 p=0,201	-0,197 p=0,561	-0,580 p=0,062
Duración de la estancia	0,092 p=0,788	-0,245 p=0,467	0,087 p=0,799	-0,418 p=0,201
Días en la UCI	-0,381 p=0,278	-0,438 p=0,206	-0,247 p=0,219	-0,693 p=0,026

Días con respirador	-0,319 p=0,369	-0,280 p=0,434	-0,378 p=0,282	-0,511 p=0,132
Bilirrubina total máxima	-0,349 p=0,292	-0,351 p=0,290	-0,352 p=0,289	-0,437 p=0,179
Creatinina total máxima	-0,271 p=0,420	-0,218 p=0,519	-0,224 p=0,508	-0,236 p=0,484
NOTAS: No hubo relaciones entre los niveles de HSP-70 y los desenlaces en la muestra total de 29 pacientes.				

REIVINDICACIONES

1. Dipéptido

seleccionándose dicho dipéptido del grupo que consiste en alanil-glutamina, glicil-glutamina, leucil-glutamina, valil-glutamina, isoleucil-glutamina y cisteinil-glutamina

5 para su uso en el tratamiento o la prevención de una lesión, enfermedad o dolencia aguda o crónica; la prevención de lesión por reperfusión o isquemia; la protección de órganos para trasplante; atenuación de la inflamación o expresión de citocinas pro-inflamatorias en estados de salud o enfermedad; la prevención o el tratamiento de estrés térmico, termoplejía o cualquier otra lesión o estrés relacionado con la temperatura; mejora del metabolismo tisular; y tratamiento de septicemia;

10 en el que la lesión, enfermedad o dolencia es una de lesión pulmonar, síndrome de dificultad respiratoria aguda, una enfermedad autoinmunitaria, artritis, artrosis, artritis reumatoide, lupus, esclerosis múltiple, fibromialgia, enfermedad de Chron, colitis ulcerosa, síndrome del intestino irritable, un ataque al corazón, cirugía cardíaca, angina crónica, arteriopatía coronaria, peritonitis y síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, en el que el medicamento está dispuesto para administrarse en una dosis en bolo intravenoso.

15 2. Dipéptido

seleccionándose dicho dipéptido del grupo que consiste en alanil-glutamina, glicil-glutamina, leucil-glutamina, valil-glutamina, isoleucil-glutamina y cisteinil-glutamina para su uso en el tratamiento de estados autoinmunitarios y enfermedades inflamatorias sistémicas y locales, con el fin de proteger órganos para trasplante, en el que el medicamento aumenta la expresión de cualquier proteína de choque térmico o factor 1 de choque térmico y en el que el medicamento está dispuesto para administrarse en una dosis en bolo intravenoso.

3. Dipéptido

seleccionándose dicho dipéptido del grupo que consiste en alanil-glutamina, glicil-glutamina, leucil-glutamina, valil-glutamina, isoleucil-glutamina y cisteinil-glutamina para su uso en la inhibición del daño cutáneo/epitelial debido a radiación UV, lesión por quemadura, envejecimiento o cualquier otro tipo de lesión por radiación, en el que el medicamento aumenta la expresión de cualquier proteína de choque térmico o factor 1 de choque térmico y en el que el medicamento está dispuesto para administrarse en una única dosis en bolo intravenoso.

4. Dipéptido

seleccionándose dicho dipéptido del grupo que consiste en alanil-glutamina, glicil-glutamina, leucil-glutamina, valil-glutamina, isoleucil-glutamina y cisteinil-glutamina para su uso en la inhibición de una lesión cutánea o de la mucosa proveniente de radiación terapéutica o quimioterapia, en el que el medicamento aumenta la expresión de cualquier proteína de choque térmico o factor 1 de choque térmico y en el que el medicamento está dispuesto para administrarse como una dosis en bolo intravenoso.

35

Fig. 1

Posibles mecanismos de los beneficios de la glutamina sobre la lesión por
reperfusión / isquemia miocárdica en pacientes
con injerto de derivación de arterias coronarias

Administración de glutamina preoperatoria

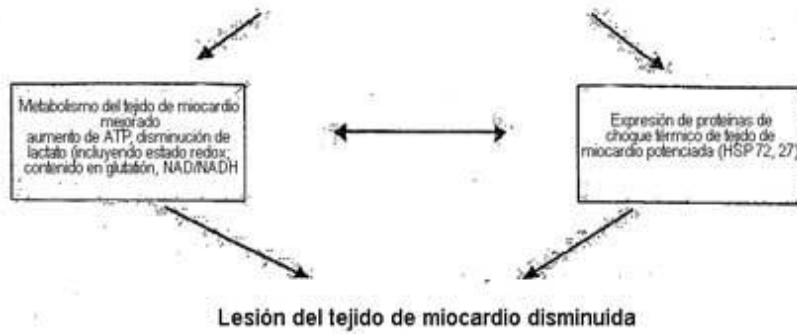


Fig. 2

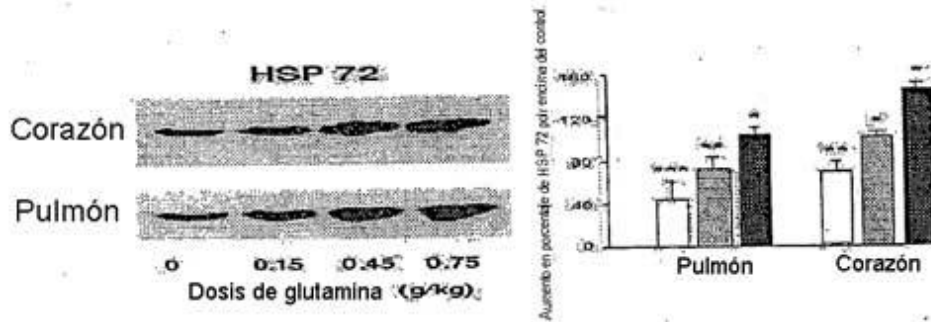


Fig. 3

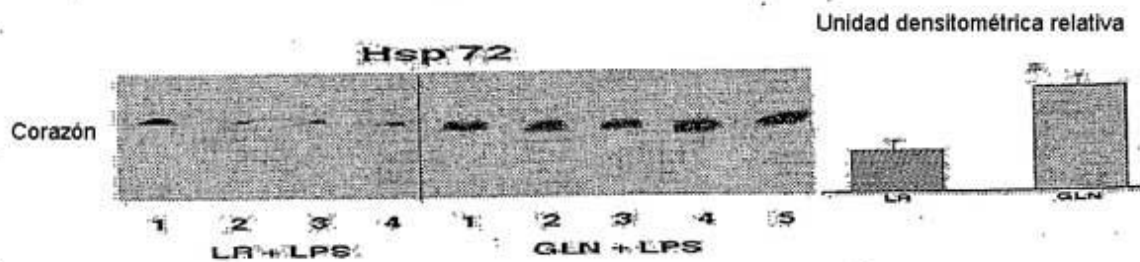


Fig. 4

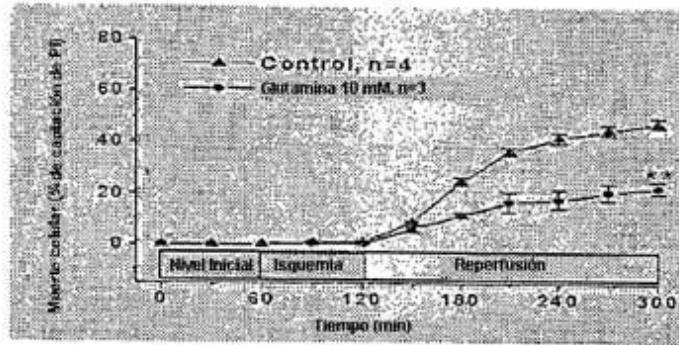


Fig. 5

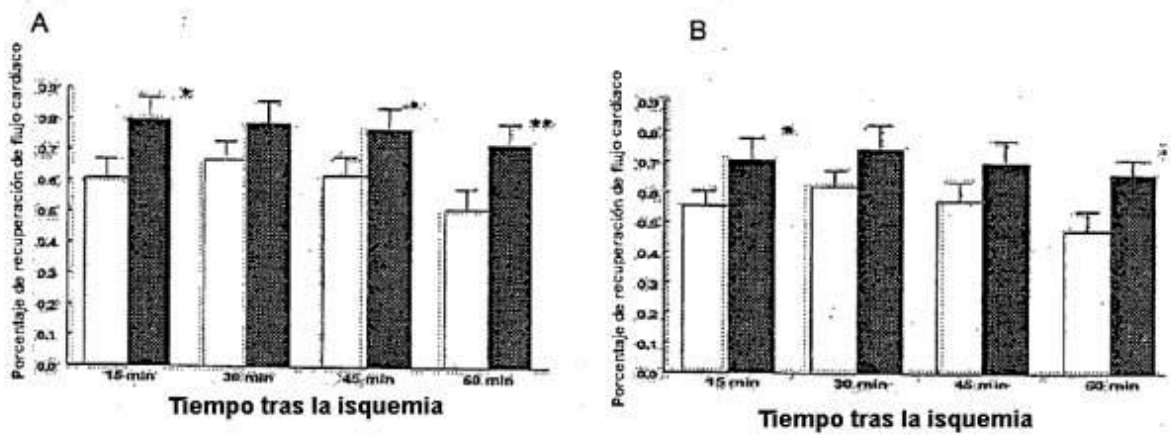


Fig. 6

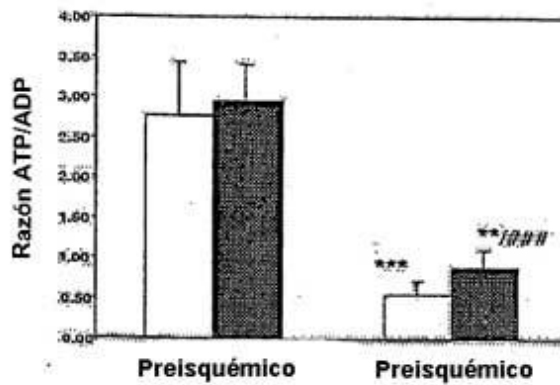


Fig. 7

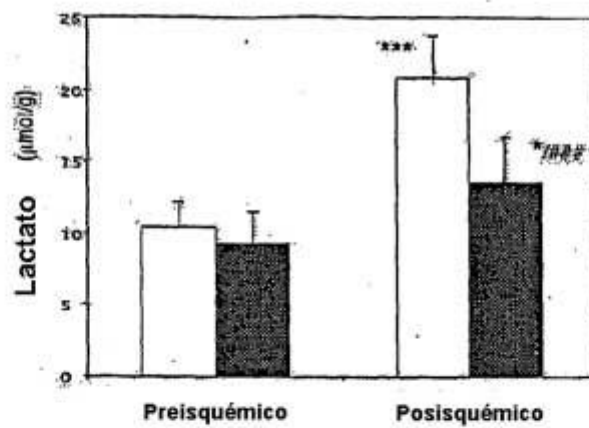


Fig. 8

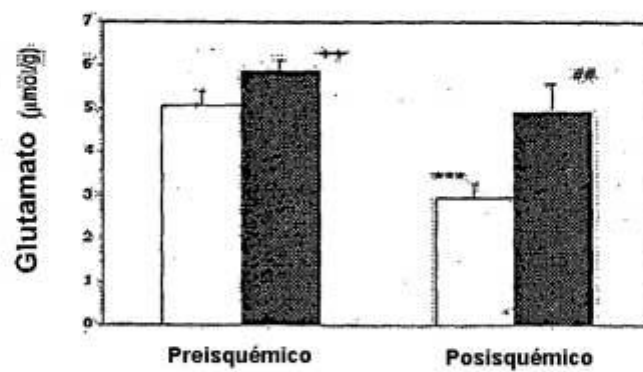


Fig. 9

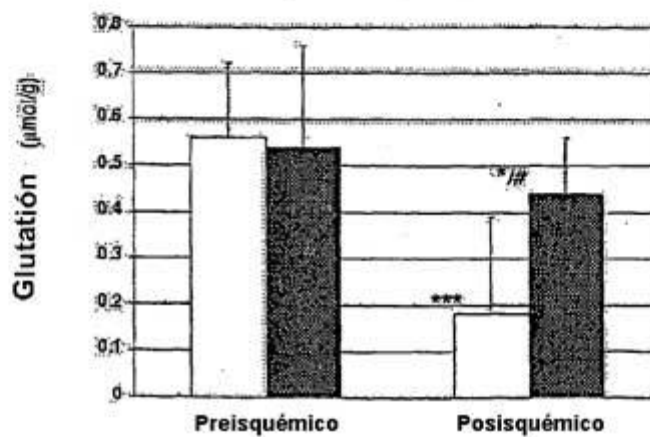


Fig. 10

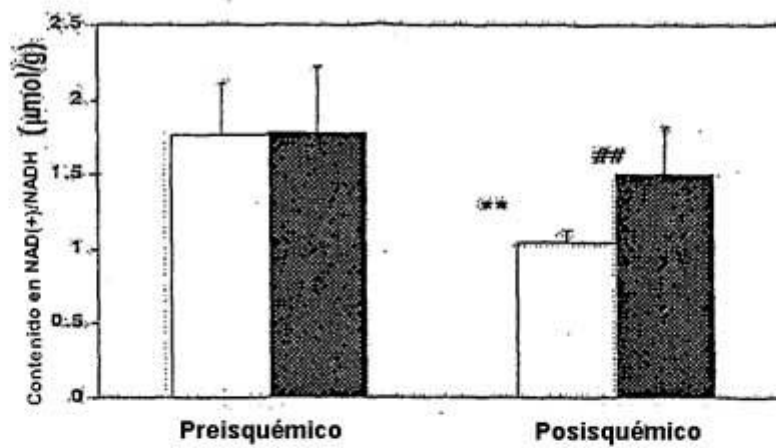
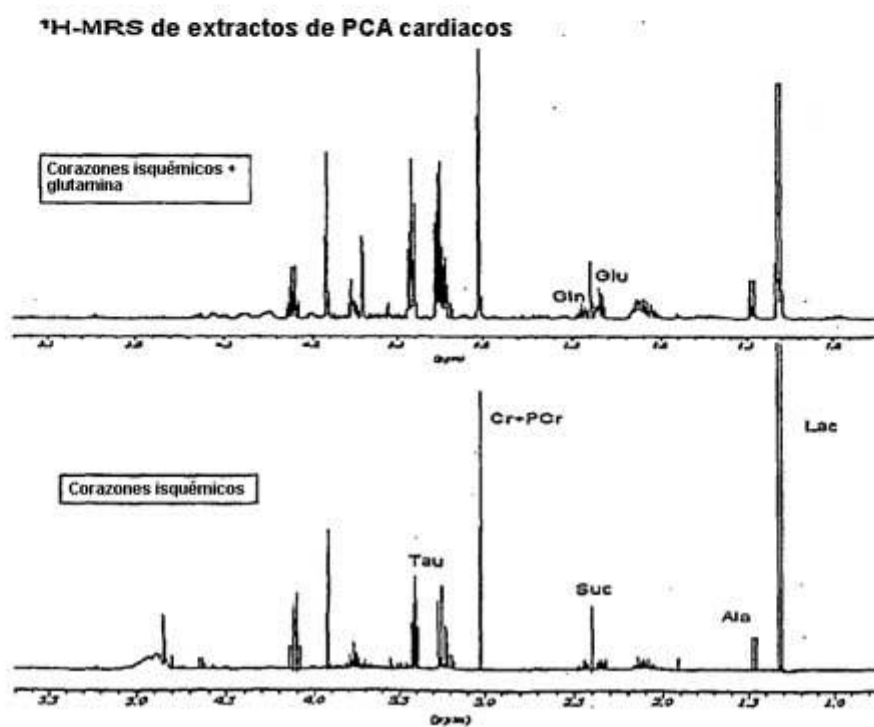


Fig. 11



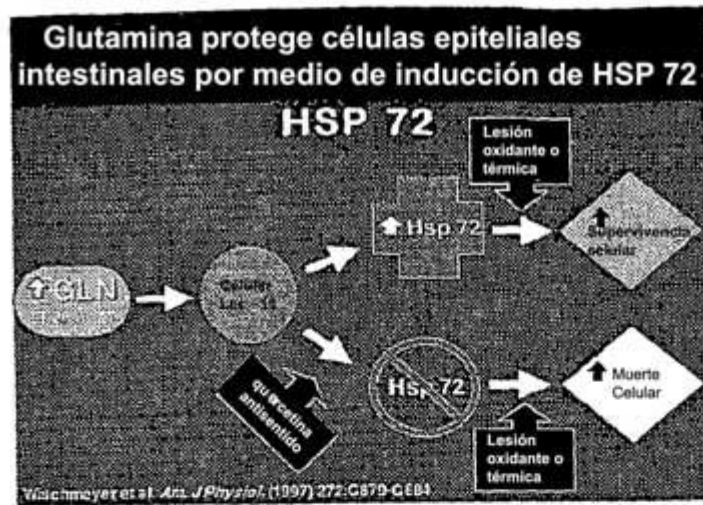


Fig. 12

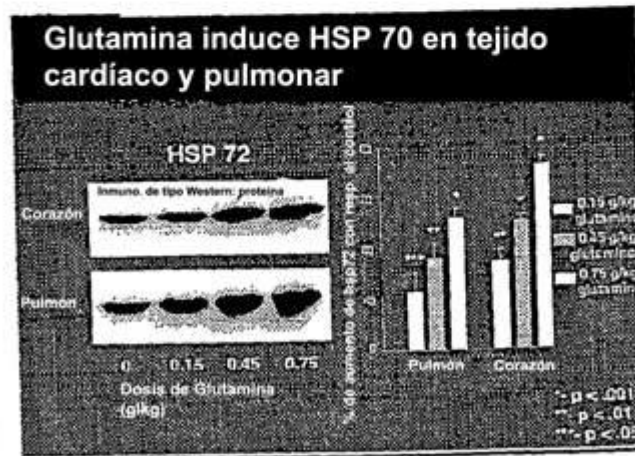


Fig. 13

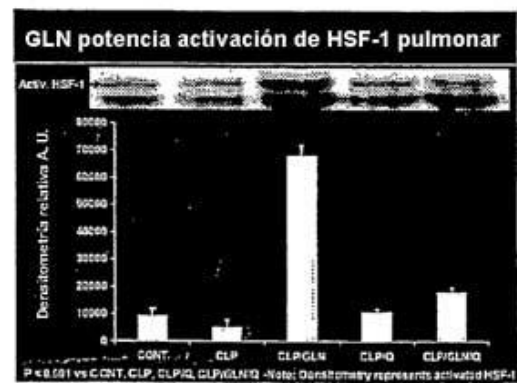
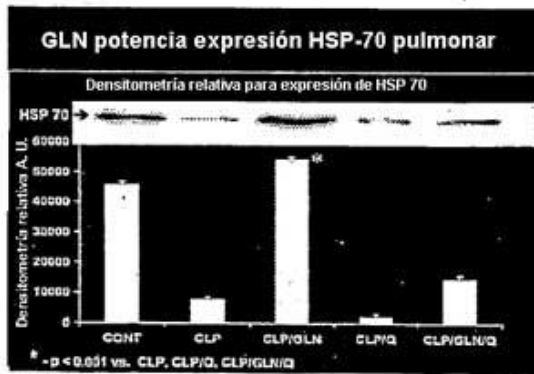
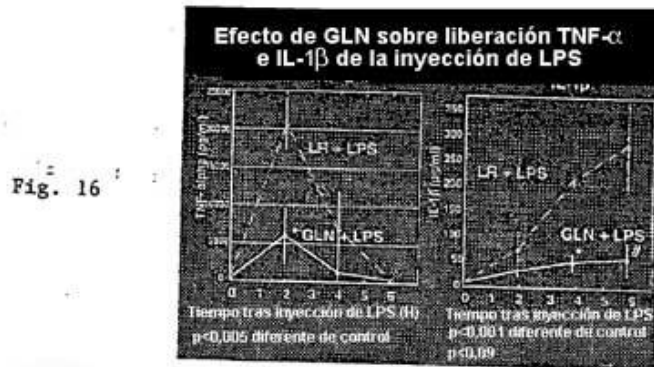
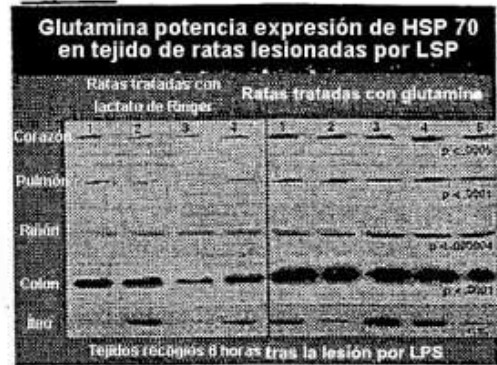
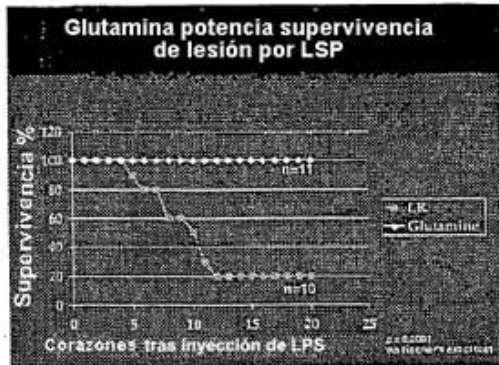




Fig. 19

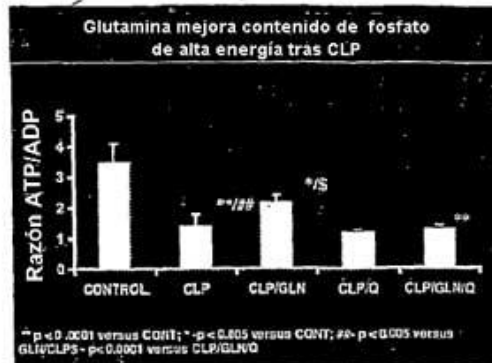


Fig. 20

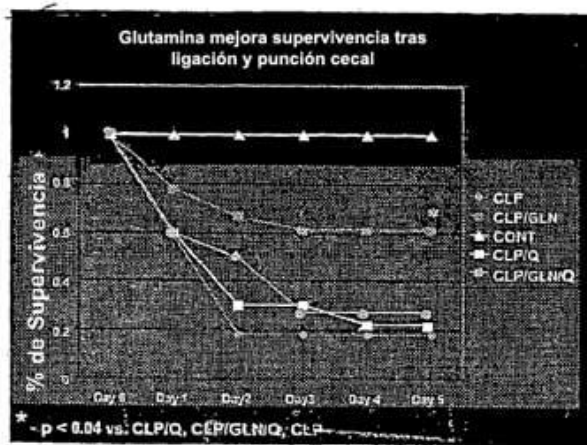


Fig. 21

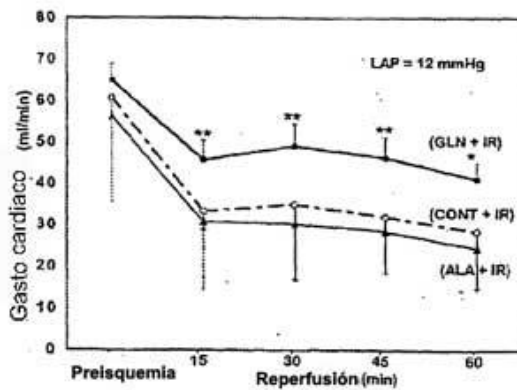


Fig. 22

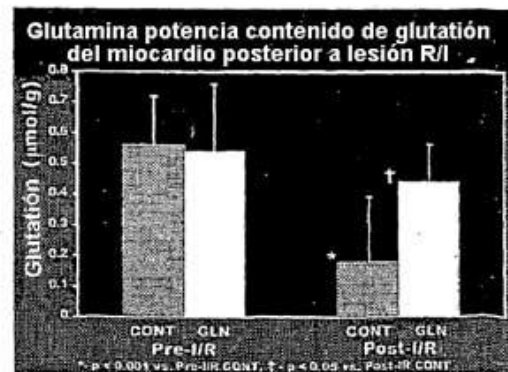


Fig. 23

Fig. 24

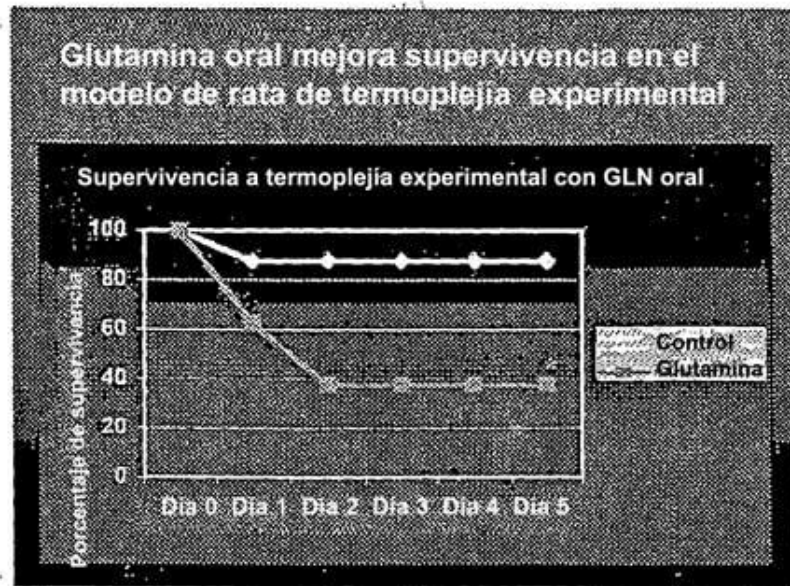


Fig. 25

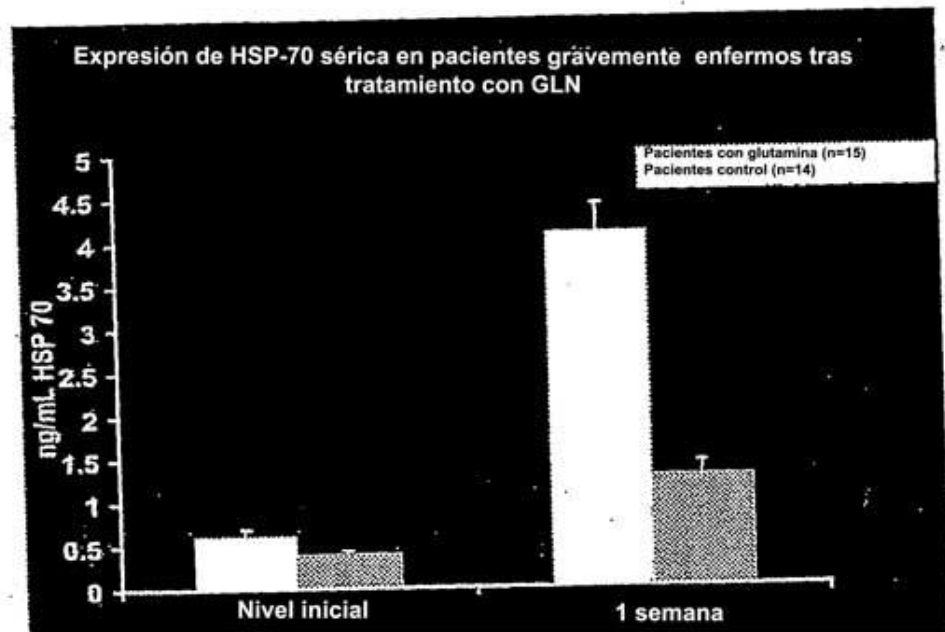


Fig. 26

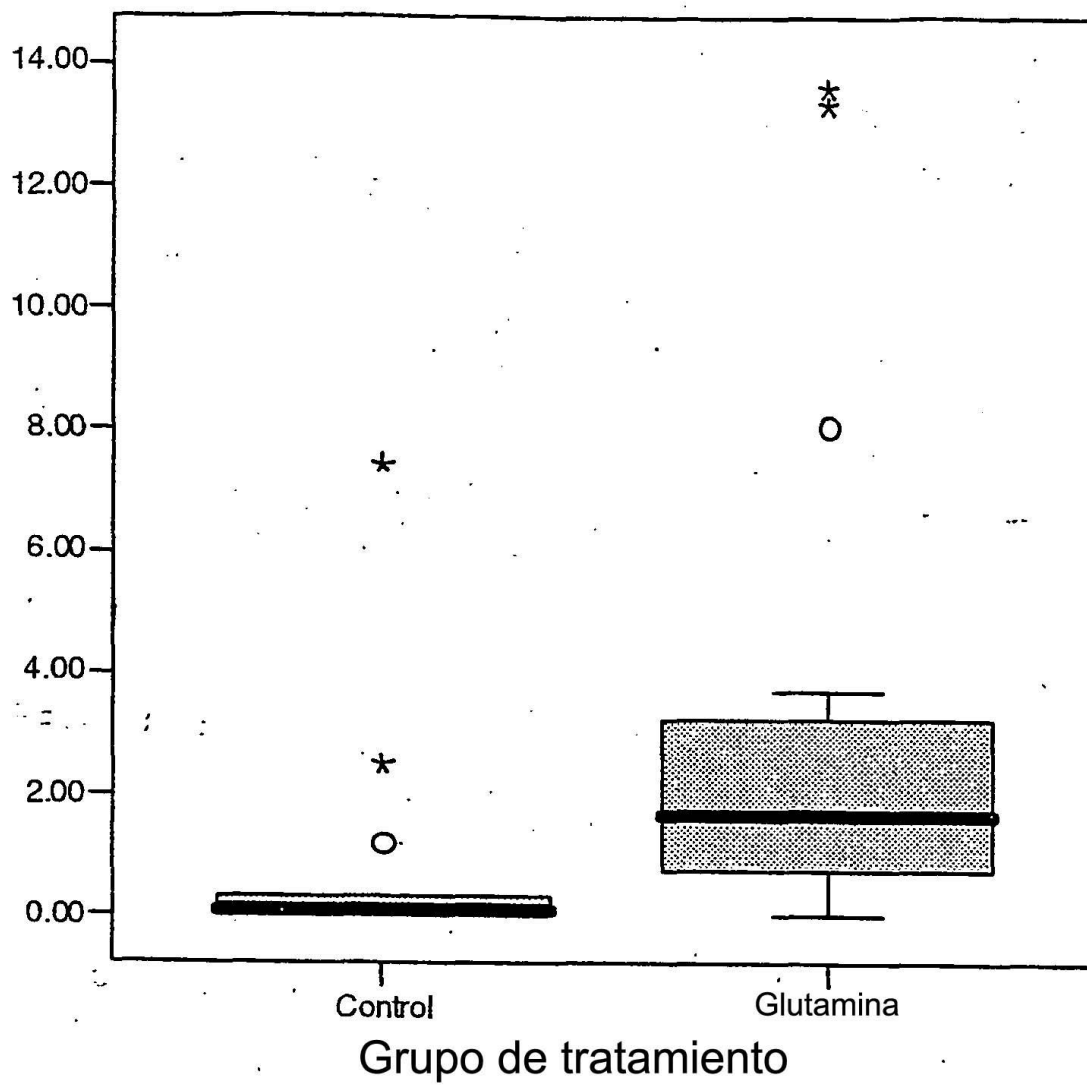
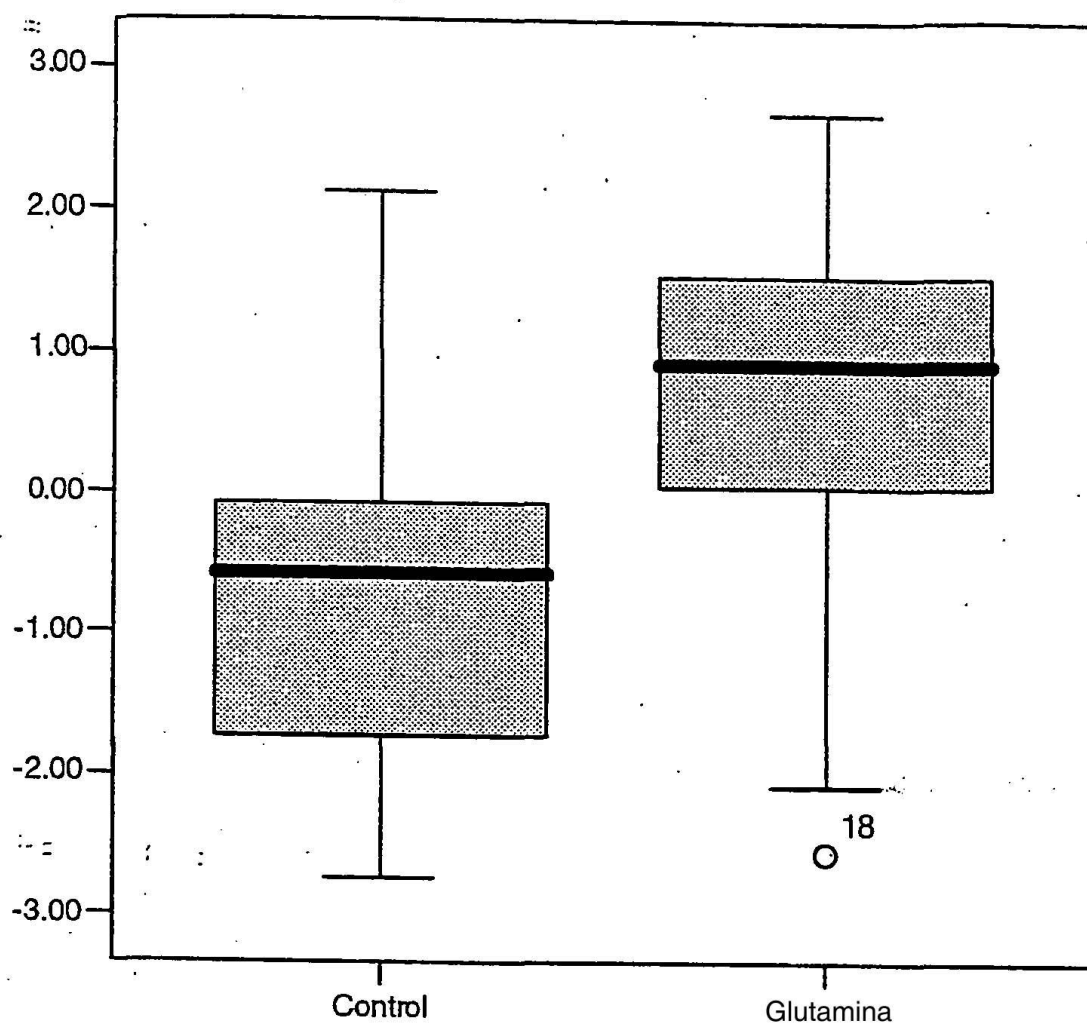


Fig. 27



Grupo de tratamiento

Fig. 28

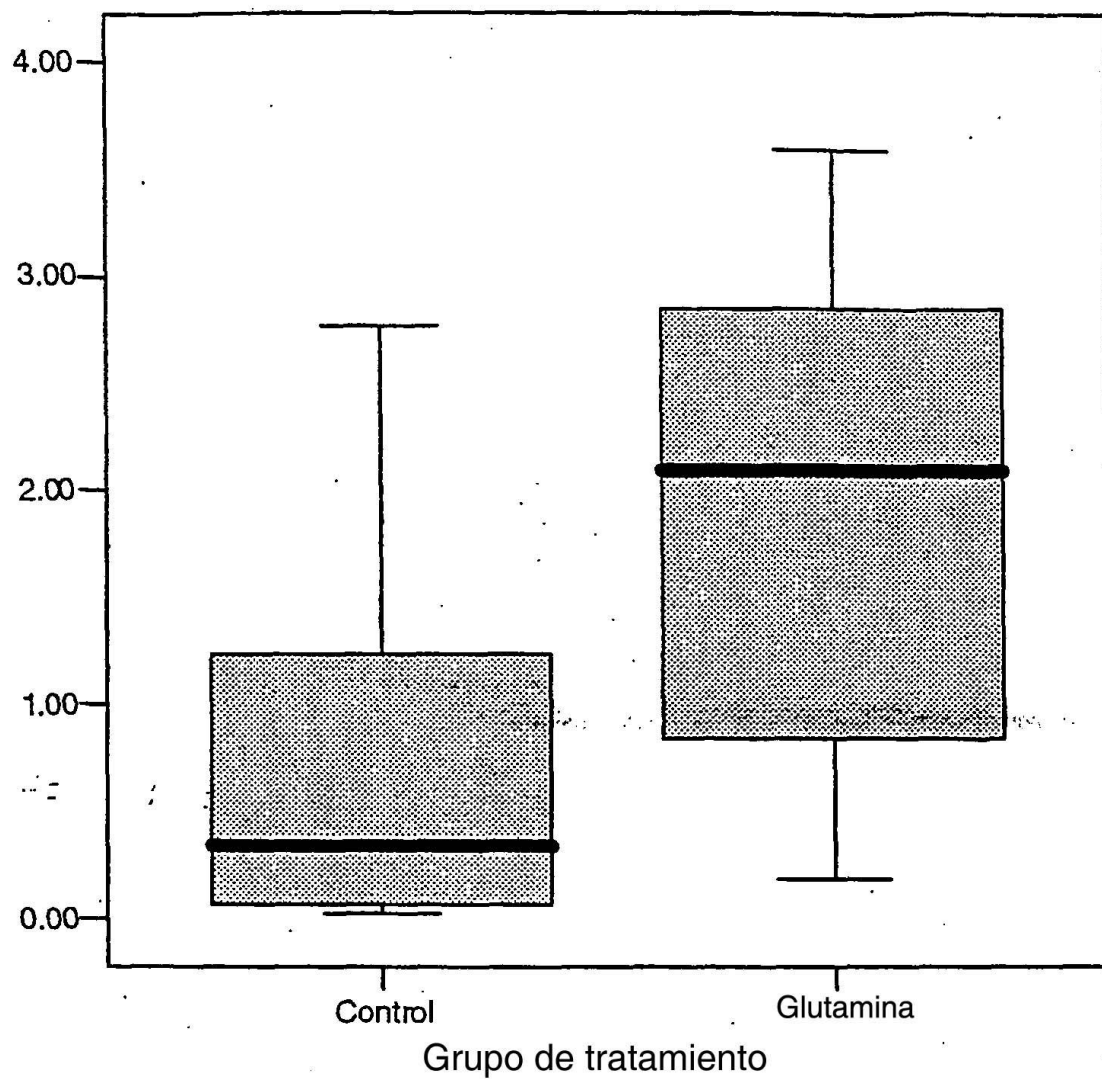


Fig. 29

