

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE BIOQUÍMICA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

**“Anormalidades bioquímico metabólicas en corazón de ratas con
hipertrigliceridemia experimental inducida por
ingesta de una dieta rica en sacarosa”**

Tesista: Bioqca. Mónica R. Montes

Director: Dra. Yolanda B. de Lombardo

*Departamento de Ciencias Biológicas
Sección de Química Biológica*

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas

Universidad Nacional de Litoral

Año 1998

Miembros del Jurado:

Dr. Ignacio de la Riva

Dr. Lucio Cicchitti

Dra. Ma. Angela Tessi

*A mis compañeros del Dpto. de Ciencias Biológicas,
investigadores, docentes y no docentes,
por haberme tolerado todos estos años.*

Agradecimientos

Esta Tesis ha sido realizada en la Sección Química Biológica de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral y dirigida por la Dra. Yolanda B. de Lombardo, Profesor Titular de la Cátedra de Química Biológica, Directora del Dpto. de Ciencias Biológicas e Investigadora del CONICET.

Deseo agradecer profundamente a quienes han colaborado en la realización de esta Tesis:

- Mi sincero reconocimiento a la Dra. Yolanda B. de Lombardo, que a lo largo del desarrollo de la misma, ejerció la dirección con suma responsabilidad, orientándome en el empleo de las metodologías utilizadas y en la interpretación de los resultados obtenidos. Gracias a su total compromiso y colaboración, este trabajo ha llegado a buen término.

- A mi familia y amigos, que como siempre, estuvieron alentando mi trabajo en todo momento, y prestando su apoyo indefinido.

- A todos mis compañeros de trabajo del Dpto. de Ciencias Biológicas, docentes y no docentes, en especial al Bioqco. Norberto Mocchiutti -co Director de Tesis- y a la Dra. Adriana Chicco, quienes constantemente demostraron interés en el tema colaborando en aspectos críticos del mismo.

- Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), que a través de las Becas de Iniciación y Perfeccionamiento y PID # 4129, facilitaron la realización de este trabajo.

- A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, programación CAI+D 94, que con su apoyo económico colaboraron en la concreción de esta Tesis.

Prefacio

Los trabajos de investigación que se desarrollan desde hace numerosos años en la Sección Química Biológica del Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, se encuadran dentro de un Programa General de Alimentación y Nutrición: Investigaciones básicas (experimental) y aplicadas en áreas de alimentación y nutrición estrechamente vinculadas a enfermedades metabólicas de alta incidencia en la población.

En particular, investigaciones realizadas hasta el presente por nuestro grupo y otros investigadores, han demostrado en animales de experimentación (ratas y ratones normales) que una ingesta elevada de azúcares refinados (sacarosa, fructosa) por períodos breves de tiempo, desarrolla hipertrigliceridemia. Este hecho fue también observado en estudios realizados en humanos por Mancini y col. (1).

La hipertrigliceridemia inducida por la ingesta de una dieta rica en sacarosa se acompaña en los animales de experimentación, con intolerancia a la glucosa, resistencia insulínica e hipertensión arterial. La magnitud de estos desórdenes se agrava cuando se prolonga el tiempo de administración de la dieta. Investigaciones recientes han demostrado que un sostenido incremento de los triglicéridos plasmáticos constituye un factor de riesgo adicional de la enfermedad cardiovascular independiente de otros factores de riesgo como: niveles plasmáticos de colesterol y β -lipoproteína-colesterol (LDL-colesterol), hipertensión, etc.

Por otro lado la hipertrigliceridemia, obesidad, hipertensión, hipercolesterolemia, Diabetes Mellitus Tipo II (no insulino dependiente), intolerancia a la glucosa y resistencia insulínica integran un grupo de desórdenes metabólicos frecuentemente observados en el humano, incluidos en el recientemente denominado Síndrome "X". Al respecto existe consenso general, que el síndrome "X" representa uno de los principales factores de riesgo de la enfermedad cardiovascular, existiendo una interacción negativa en las evoluciones de las distintas patologías que integran el mismo.

Si bien los mecanismos íntimos de estas interacciones deletéreas son desconocidos, se ha postulado recientemente que la hipertrigliceridemia, intolerancia a la glucosa y resistencia insulínica podrían ser factores importantes, responsables de dichas asociaciones.

Estos hallazgos en su conjunto hacen que el modelo experimental de dislipemia inducida por una dieta rica en sacarosa resulte de interés para analizar algunos mecanismos básicos, posibles responsables de las alteraciones observadas en el músculo cardíaco asociadas a la administración prolongada (15 semanas) de una dieta rica en sacarosa.

Los sustratos que llegan y son utilizados por el miocardio, se encuentran controlados no solamente por la disponibilidad de los mismos sino también por su entorno hormonal y el trabajo impuesto sobre el corazón.

Mientras que la oxidación de los ácidos grasos es la mayor fuente de energía del corazón bajo condiciones normales "in vivo", cambios en los factores antes mencionados pueden alterar la relativa contribución del combustible exógeno metabólico para la producción de energía en el miocardio .

La glucosa juega un rol muy importante en el metabolismo energético del miocardio, proveyendo ATP, a través de los procesos metabólicos de glicólisis y oxidación en el ciclo de Krebs. Numerosos estudios han demostrado que la captación de la glucosa por el corazón está regulada por la insulina. Cuando la glucosa exógena entra en el miocito, puede ser metabolizada a piruvato (glicólisis), convertirse en lactato, o entrar al ciclo de Krebs (oxidarse). Además puede ser utilizada para sintetizar glucógeno (vía no oxidativa), que a su turno es utilizado para la producción de energía. Algunos estudios señalan que el glucógeno actúa como una reserva de sustrato, que es requerido en respuesta a una gran demanda metabólica .

El objetivo del presente trabajo se relaciona específicamente con la posible diversificación del combustible energético en el miocardio aislado perfundido "in vitro", analizando la utilización y destino metabólico de la glucosa en entornos metabólicos diferentes: i) similares a los del animal "in vivo", ii) con glucosa como único sustrato

exógeno, iii) en presencia de insulina y iiiii) en presencia de inhibidores específicos de la enzima Carnitin Acil Transferasa-I (CPT-I).

Las técnicas utilizadas en el desarrollo de esta tesis, pueden agruparse entre las *generales* de laboratorio: espectrofotométricas, fluorométricas, de cinética enzimática, etc. y *específicas*, que en este caso particular, se refieren a estudios dinámicos, realizados en corazón aislado perfundido en un sistema no-recirculante y recirculante de Langendorff.

•INTRODUCCIÓN	1
1- Metabolismo de la fructosa	2
2 -Hipertrigliceridemia, intolerancia a la glucosa y resistencia insulínica	5
3 -Miocardio: metabolismo normal	10
4 -Interrelación entre metabolismo de lípidos e hidratos de carbono en corazón	22
5-Hipertrigliceridemia y miocardio	24
•METODOLOGÍA	26
1- Animales de experimentación y dietas	27
2-Obtención de muestras de sangre y tejidos	29
3-Métodos analíticos	29
3-1- <u>Determinaciones enzimáticas</u>	29
-Ensayo de la actividad del complejo enzimático Piruvato Dehidrogenasa en miocardio	29
-Determinación de la actividad enzimática Piruvato Dehidrogenasa-Quinasa	30
-Ensayo de la actividad enzimática Piruvato Dehidrogenasa-Quinasa	31
-Determinación de la actividad enzimática Citrato Sintasa	32
3-2- <u>Determinación de metabolitos y nucleótidos en músculo cardíaco</u>	32
-Obtención de extractos ácidos de tejidos	32
-Determinación de acetilCoA/CoASH	34
-Determinación de citrato	34
-Determinación de glucosa-6-fosfato	35
-Determinación de Adenosina Trifosfato (ATP)	36
-Determinación de creatina-fosfato	37
-Determinación de triglicéridos	38
-Determinación de glucógeno	38
-Determinación de proteínas	38
3-3- <u>Determinaciones séricas</u>	40
-Cuantificación de ácidos grasos no esterificados	40
-Cuantificación de glucosa	40
-Cuantificación de insulina inmunorreactiva	41
-Cuantificación de triglicéridos	42
4-Análisis estadístico	42

•RESULTADOS	43
CAPÍTULO I	44
Capítulo I-1	45
-Introducción	45
-Protocolo experimental	46
-Resultados	47
-Incremento de peso e ingesta calórica	47
-Efecto de la dieta rica en sacarosa sobre los parámetros plasmáticos y tisulares (músculo cardíaco)	47
Capítulo I-2	52
-Introducción	52
-Protocolo experimental	54
-Técnica de perfusión	54
-Determinación de lactato	58
-Determinación de piruvato	58
-Experiencia preliminar	59
-Resultados	62
-Incremento de peso e ingesta calórica	62
-Captación y destino metabólico de la glucosa	62
-Contenido tisular de triglicéridos y actividad del complejo enzimático Piruvato Dehidrogenasa	65
-Discusión	66
CAPÍTULO II	72
Capítulo II-1	73
-Introducción	73
-Protocolo experimental	75
-Resultados	76
-Captación y destino metabólico de la glucosa	77
-Acción de la insulina	81
-Discusión	90
Capítulo II-2	96
-Introducción	96
-Protocolo experimental	97

	<i>página</i>
-Cuantificación del glicerol	98
-Resultados	99
-Efecto del POCA-II sobre la actividad del complejo enzimático Piruvato Dehidrogenasa	99
-Discusión	102
•CONCLUSIÓN	106
•BIBLIOGRAFÍA	110

Figuras y Tablas

FIGURAS

	<i>página</i>
Figura 1: Metabolismo de la fructosa en células hepáticas.	4
Figura 2: Captación y metabolización de ácidos grasos en células cardíacas.	13
Figura 3: Captación y metabolización de glucosa en células cardíacas.	18
Figura 4: Regulación del complejo enzimático Piruvato Dehidrogenasa (PDH) por interconversión de la forma activa e inactiva.	21
Figura 5: Obtención de extractos ácidos.	33
Figura 6: Relación entre PDHa (% de PDH total) y niveles de ácidos grasos no esterificados (AGNE) en ratas alimentadas durante 15 semanas con dieta control (DC) o dieta rica en sacarosa (DRS).	49
Figura 7: Relación entre actividad PDHa (% de PDH total) y niveles de triglicéridos (TG) en miocardio de ratas alimentadas con dieta control (DC) o dieta rica en sacarosa (DRS).	49
Figura 8: Aparato de Langendorff de perfusión de corazón.	56
Figura 9: Evolución del peso de ratas alimentadas con dieta control (DC) o dieta rica en sacarosa (DRS).	63
Figura 10: Contenido de triglicéridos en corazón perfundido de ratas alimentadas con dieta control (DC) o dieta rica en sacarosa (DRS).	67
Figura 11: Contenido de triglicéridos en corazón perfundido de ratas alimentadas con dieta control (DC) o dieta rica en sacarosa (DRS), utilizando glucosa como único sustrato exógeno.	80
Figura 12: Actividad PDH-Quinasa en corazón perfundido de ratas alimentadas durante 15 semanas con dieta control (DC) o dieta rica en sacarosa (DRS).	83
Figura 13: Contenido de triglicéridos en corazón perfundido de ratas alimentadas con dieta control (DC) o dieta rica en sacarosa (DRS), utilizando glucosa como único sustrato exógeno. Acción de la insulina.	88

TABLAS

	<i>página</i>
Tabla 1: Composición de las dietas experimentales.	28
Tabla 2: Ganancia de peso e ingesta calórica en ratas alimentadas durante 15 semanas con dieta control (DC) o dieta rica en sacarosa (DRS).	48
Tabla 3: Niveles basales de metabolitos e insulina plasmática y actividad PDHa en músculo cardíaco en ratas alimentadas durante 15 semanas con dieta control (DC) o dieta rica en sacarosa (DRS).	48
Tabla 4: Niveles de metabolitos en tejidos cardíacos de ratas alimentadas durante 15 semanas con dieta control (DC) o dieta rica en sacarosa (DRS).	51
Tabla 5: Captación de glucosa, liberación de lactato y contenido de glucógeno en corazón perfundido de ratas alimentadas con dieta control (DC).	61
Tabla 6: Captación de glucosa, liberación de lactato y piruvato al medio de perfusión y contenido tisular de glucosa-6-fosfato (glucosa-6P), citrato y glucógeno en corazones perfundidos de ratas alimentadas con dieta control (DC) o dieta rica en sacarosa (DRS).	64
Tabla 7: Actividad del complejo enzimático Piruvato Dehidrogenasa (PDHa) y Piruvato Dehidrogenasa Quinasa (PDH-Quinasa) en corazón perfundido de ratas alimentadas con dieta control (DC) o dieta rica en sacarosa (DRS).	68
Tabla 8: Captación de glucosa, liberación de lactato y piruvato, y contenido tisular de glucosa-6-fosfato (glucosa-6P) y glucógeno en corazón perfundido de ratas alimentadas con dieta control (DC) o dieta rica en sacarosa (DRS), utilizando glucosa como único sustrato exógeno.	78
Tabla 9: Actividad del complejo enzimático Piruvato Dehidrogenasa (PDHa) y Piruvato Dehidrogenasa Quinasa (PDH-Quinasa) en corazón perfundido de ratas alimentadas con dieta control (DC) o dieta rica en sacarosa (DRS), utilizando glucosa como único sustrato exógeno.	82
Tabla 10: Captación de glucosa, liberación de lactato y piruvato, y contenido de tisular de glucosa-6-fosfato (glucosa-6P) y glucógeno en corazón perfundido de ratas alimentadas con dieta control (DC) o dieta rica en sacarosa (DRS) utilizando glucosa como único sustrato exógeno. Acción de la insulina.	85
Tabla 11: Captación de glucosa, liberación de lactato y piruvato, y contenido tisular de glucosa-6-fosfato (glucosa-6P) y glucógeno en corazón perfundido de ratas alimentadas con dieta rica en sacarosa (DRS), utilizando glucosa como único sustrato exógeno. Acción de la insulina.	87
Tabla 12: Acción de la insulina sobre la actividad del complejo enzimático Piruvato Dehidrogenasa (PDHa) y Piruvato Dehidrogenasa Quinasa (PDH-Quinasa) en corazón perfundido de ratas alimentadas	

con dieta control (DC) o dieta rica en sacarosa (DRS).	89
Tabla 13: Efecto del POCA II sobre la actividad PDH en corazón perfundido de ratas alimentadas con dieta control (DC) o dieta rica en sacarosa (DRS).	100
Tabla 14: Efecto del POCA II sobre el contenido tisular de triglicéridos, glicerol liberado y relación acetilCoA/COASH en corazón perfundido de animales alimentados con dieta control (DC) o dieta rica en sacarosa (DRS).	101
Tabla 15: Efecto del POCA II sobre el contenido de metabolitos y liberación de lactato en corazón perfundido de ratas alimentadas con dieta control (DC) o dieta rica en sacarosa (DRS).	103