

**METODOLOGÍA**

En esta sección se describen las diferentes metodologías utilizadas a lo largo del desarrollo de la Tesis. Aspectos técnicos complementarios son mencionados en la descripción de ciertos tipos de experiencias. Las condiciones particulares de los experimentos donde se utilizaron técnicas de perfusión de corazón "in vitro", en un medio no recirculante y recirculante, son analizadas en detalle en el Item correspondiente a Resultados experimentales.

## **1-Animales de experimentación y dietas**

Se utilizaron ratas macho cepa Wistar C.F. de 180-200 gramos de peso. Desde su llegada al bioterio, los animales recibieron durante una semana comida standard de laboratorio para roedores y agua "ad libitum" en un ambiente climatizado ( $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) y humedad controlada (40-70%), con ciclo de luz oscuridad de 12 horas (7.00 a 19.00).

Al cabo de este período los animales fueron divididos al azar en dos lotes: *Lote control* (DC) y *Lote experimental* (DRS). Ambos lotes fueron alimentados "ad libitum" con dietas isocalóricas que proveen aproximadamente 15,28 Kj/gramo de comida y que difieren únicamente en la fuente de carbohidratos. En el lote experimental (DRS) la fuente de hidratos de carbono es la sacarosa (63%p/p), mientras que en el grupo control es almidón (63%p/p).

La composición de las dietas se describe en la *Tabla 1*. Las mismas fueron administradas durante 15 semanas (Período de Recurrencia).

Durante el transcurso de la experiencia, se constató la variación de peso corporal e ingesta calórica en ambos grupos: control (DC) y experimental (DRS).

**Tabla 1:** Composición de las dietas experimentales

* Ingredientes	DC	DRS
	(Dieta Control) (%p/p)	(Dieta Rica en Sacarosa) (%p/p)
Caseína	17	17
Sales(**)	3,5	3,5
Vitaminas(***)	1	1
Cloruro Colina	0,2	0,2
Metionina	0,3	0,3
Celulosa	10	10
Almidón	63	0
Sacarosa	0	63
Aceite de Maíz	5	5

\* La composición de las dietas se basa en la descrita por la dieta AIN-76A:  
 1-Report of the American Institute of Nutrition ad hoc Committee on Standards for nutritional Studies (1977)  
 2-Second Report of the ad hoc Committee on Standar for Nutritional Studies (1980)

(\*\*) La mezcla de sales se basa en la composición determinada por la dieta AIN-76A (en g/Kg de dieta): fosfato dibásico de potasio 17,5; óxido de magnesio 0,84; citrato de potasio monohidratado 7,7; sulfato de potasio 1,82; cloruro de sodio 25,9; sulfato crómicopotásico 0,019; carbonato cúprico 0,05; iodato de potasio 0,0003; citrato férrico 2,1; carbonato de manganeso 0,1225; selenito de sodio 0,0003; carbonato de zinc 0,056.

(\*\*\*) La mezcla de vitaminas se basan en la composición determinada por la dieta AIN-76A (en mg/Kg de dieta) Vitamina A palmitato (500,000UI/g): 8,8; Vitamina D3 (4000,000UI/g):2,75; Vitamina E acetato (500UI/g)11,0; menadiona bisulfato de sodio: 0,8; biotina (1%):22,0; cianocobalamina (0,1%); ácido fólico 22,0; niacina 33,0; pantotenato de calcio 17,6; piridoxina hidroclorehídrica 7,7; riboflavina 6,6; clorhidrato de tiamina 6,6.

## **2-Obtención de muestras de sangre y tejidos**

Una vez finalizado el período de ingesta, se retiró la comida de las jaulas a las 7.00 hs. y las experiencias se realizaron entre las 8 y 10 hs.

Los animales fueron anestesiados intraperitonealmente con pentobarbital sódico (60mg/kg de peso corporal). Las muestras de sangre fueron extraídas de la vena cava inferior, colocadas en tubos de centrifuga previamente enfriados, y centrifugadas en centrifuga refrigerada. El suero se conservó a -20°C hasta su procesamiento.

Con posterioridad a la extracción de sangre, se extrajo el músculo cardíaco. El tejido fue inmediatamente llevado a la temperatura de Nitrógeno líquido utilizando para ello la pinza de Wollemberger y col.(74) previamente enfriada a esa temperatura. Los tejidos congelados fueron pesados, pulverizados y las muestras transferidas a tubos apropiados y conservadas a la temperatura de Nitrógeno líquido en un termo crioscópico hasta su utilización.

## **3-Métodos analíticos**

### **3-1 Determinaciones enzimáticas**

#### **Actividad Piruvato Dehidrogenasa y Piruvato Dehidrogenasa-Quinasa.**

##### **Ensayo de la actividad de la enzima Piruvato Dehidrogenasa en miocardio**

Los homogeneizados de músculo cardíaco (0,1 gramos), fueron preparados a 0-2°C en buffer fosfato, conteniendo 40% de glicerol. La homogenización se realizó en un homogeneizador con vástago de teflón durante 30 segundos a la misma temperatura (0-2°C). Finalmente el homogeneizado fue sonicado (0-2°C) con un disruptor celular Tipo Sonifier (USA).

La eficiencia de la extracción tisular del complejo enzimático PDH, fue determinada en cada homogeneizado midiendo la actividad de la enzima Citrato

Sintasa (enzima de estricta localización mitocondrial), por el método descrito por Sheperd y col.(80).

La actividad de la Piruvato Dehidrogenasa, en los homogeneizados del tejido muscular, fue ensayada en un sistema de reacciones acopladas con la formación final de acetil Hidroxamato (Wielland y col. (75)).

La forma activa de la PDH (PDHa), fue ensayada directamente en el homogeneizado, inhibiendo la actividad de la enzima PDH fosfatasa, por el agregado del NaF 20 mM al extracto.

La actividad total del complejo PDH (PDHt), fue ensayada incubando los homogeneizados con una mezcla de  $MgCl_2$  y  $CaCl_2$  en concentraciones óptimas que permiten la máxima activación de la enzima PDH fosfatasa y de este modo la defosforilación y activación completa del complejo PDH.

La actividad PDH fue expresada por gramo de tejido seco o por unidades de citrato sintasa. (Lombardo y col.(76)).

#### Determinación de la actividad Piruvato Dehidrogenasa-Quinasa

El aislamiento del complejo Piruvato Dehidrogenasa-Quinasa (PDH-Quinasa) se efectuó a través de una pequeña modificación de Lombardo y col.(77) del procedimiento de Shimomura y col.(78) y Popov y col.(79). El músculo cardíaco fue congelado, pulverizado y guardado a la temperatura del nitrógeno líquido. Una muestra del mismo (aproximadamente un gramo) fue suspendida (1:5%p/v) en Buffer A [Hepes 30mM, EDTA 1mM, KCl 0.15M, Triton X-100 al 4%, suero de rata 2%(v/v), N-tosil L-lisil diclorometano (TLCK) 0.1mM, inhibidor de tripsina 10 ug/ml, leupeptina 1uM, tiamina pirofosfato(TPP) 0.1mM, DTT 3mM] pH 7,4.

La suspensión fue homogeneizada (Polytron) en frío durante 30 segundos a baja velocidad, al final de este período el homogeneizado fue rápidamente congelado a  $-10^{\circ}C$  aproximadamente. Esta operación fue repetida varias veces en idénticas condiciones. La suspensión fue centrifugada a 15000 Xg durante 10 minutos, al cabo de los cuales se midió el volumen de la fracción sobrenadante y se adicionó polietilenglicol (PEG) al 27% hasta alcanzar una concentración de PEG final de 1%. La

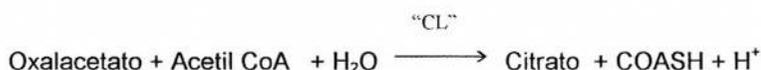
mezcla conteniendo el PEG final de 1% se agitó con ayuda de agitadores magnéticos en un baño de hielo durante 20 minutos y se centrifugó a 15000Xg por 10 minutos. Nuevamente se midió el volumen de la fracción sobrenadante y se adicionó una cantidad de PEG 27% hasta alcanzar una concentración de PEG final de 5%. La suspensión fue agitada nuevamente como se indicó anteriormente durante 20 minutos, al cabo de los cuales se centrifugó a 15000 Xg durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió (1:5 p/v del peso inicial del músculo) en Buffer B (Hepes 30mM, EDTA 0.1mM , DTT 5mM, Kcl 0.1mM, Triton X-100 0.1%, inhibidor de tripsina 10ug/ml, leupeptina 1uM, SO4Mg 10mM) pH 7.4, se homogeneizó suavemente y se incubó a 37°C durante 60 minutos. Al final del período de incubación se enfrió en baño de hielo y se adicionó PEG 27% de manera de llevar a una concentración de PEG final de 4%. Se agitó nuevamente durante 20 minutos en baño de hielo y se centrifugó durante 10 minutos a 15000 Xg. El pellet fue resuspendido en Buffer C (Hepes 30 mM, EDTA 0.1mM, Triton X-100 0.05%, inhibidor de tripsina 10 ug/ml, leupeptina 0.1 uM, DTT 5mM) pH 7.4 y homogeneizado suavemente. Esta suspensión es la fuente del complejo PDH-Quinasa.

#### Ensayo de la enzima PDH-Quinasa

La actividad PDH-Quinasa fue ensayada midiendo la pérdida de actividad del complejo enzimático PDH en presencia de ATP como fue descrita por Shimomura y col.(78) y Popov y col. (79). La mezcla de reacción completa contiene Hepes 30 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, DTT 5mM, EDTA 0.1mM, Triton X-100 0.05%(p/v), leupeptina 1 uM, inhibidor de tripsina 10 ug/ml y ATP 0.5 mM, pH 7.35 y cantidades adecuadas del complejo enzimático PDH-Quinasa. La muestra fue incubada a 30°C durante 5-10 minutos. A diversos intervalos de tiempo, se removieron alícuotas y se transfirieron a una mezcla de ensayo para determinar la actividad enzimática del complejo PDH. La misma fue ensayada espectrofotométricamente a 340 nm. Se calculó la actividad enzimática PDH-Quinasa como la constante de primer orden ( $k^{\text{min}^{-1}}$ ) y se graficó como logaritmo natural del porcentaje de la actividad remanente en función del tiempo.

### Determinación de la actividad enzimática Citrato Sintasa

Se utilizó el método fluorométrico descrito por Shepherd y col. (80). Este método se basa en el ensayo acoplado con la enzima Málico Dehidrogenasa (MDH) descrita por Ochoa (81) de acuerdo a la siguiente reacción:



La cinética de la reacción es muy rápida y la técnica de gran sensibilidad, por lo que para su correcta determinación el fluorómetro debe estar acoplado a un registrador. Los valores obtenidos en los respectivos homogeneizados de tejidos permiten expresar por ejemplo la actividad de la enzima Piruvato Dehidrogenasa en relación con el contenido de Citrato Sintasa. Una unidad de citrato sintasa se define como la cantidad de enzima que sintetiza un umol de citrato por minuto a 25°C, bajo las condiciones standard de ensayo.

### **3-2 Determinación de metabolitos y nucleótidos en músculo cardíaco**

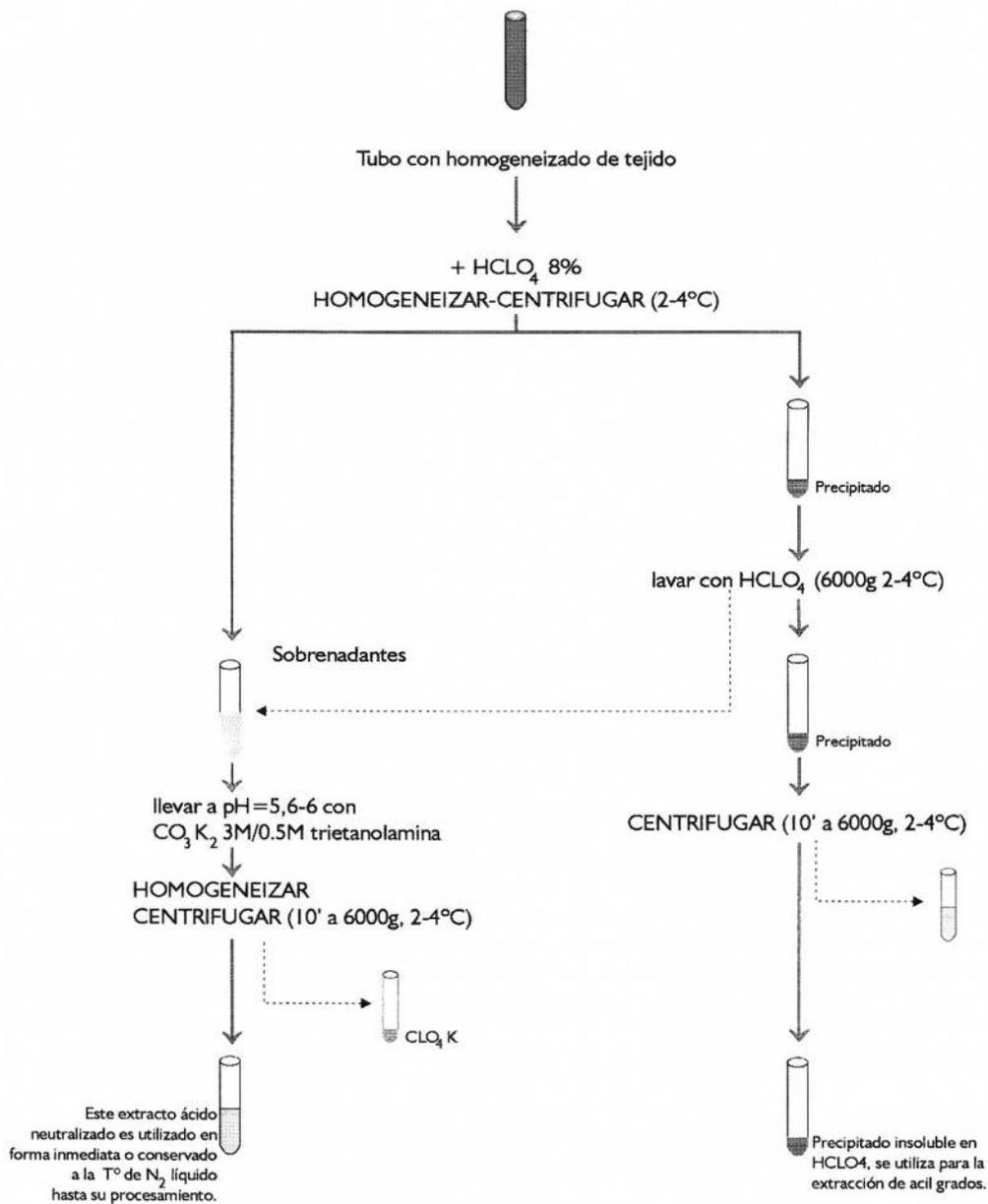
#### Obtención de extractos ácidos de tejidos

La mayoría de los metabolitos y nucleótidos analizados, fueron cuantificados en alícuotas de extractos de tejidos obtenidos con ácido perclórico neutralizado. El uso de ácido perclórico para la obtención de dichos extractos presenta ventajas con respecto al ácido tricloroacético, debido a que puede ser fácilmente removido como sal de potasio por precipitación (82).

Sintéticamente la obtención de dichos extractos se realizó de la siguiente forma:

-a una alícuota de tejido pulverizado (0.5-1 gr.)se le adicionó aproximadamente

**Figura 5:** Obtención de extractos ácidos de tejidos.

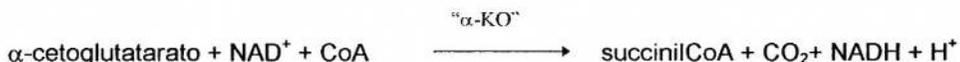


Para la determinación de CoASH y Acetil-CoA la extracción fue realizada en forma rápida y agregando al extracto neutralizado, ditioneitol (DTT) para mantener la CoASH y Acetil-CoA como en su estado "in situ", sin interconversión.

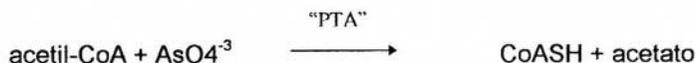
### 3-2-1- Determinación de AcetilCoA/CoASH

La determinación de CoASH y acetilCoA se realizó según Garland y col. (83), el principio de la reacción es el siguiente:

La enzima  $\alpha$ -Cetoglutarato Oxidasa ( $\alpha$ -KO) cataliza la decarboxilación del  $\alpha$ -cetoglutarato en presencia de  $\text{NAD}^+$  y CoA a succinil-CoA y NADH de acuerdo a la siguiente reacción:



El incremento de fluorescencia del  $\text{NADH}^+$  concomitante con la conversión de CoA en succinil CoA permite la determinación cuantitativa de: CoASH presente en el extracto perclórico de los tejidos, y Acetil CoA cuando se acopla la reacción de arsenólisis catalizada por la enzima Fosfotransacetilasa (PTA), de acuerdo a:



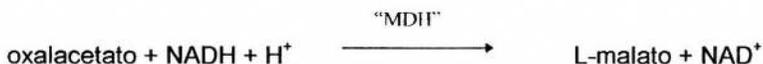
### 3-2-2 Determinación de Citrato

En los extractos de tejido homogeneizado se determinó el contenido de citrato mediante la técnica de Passonneau y Brown (84).

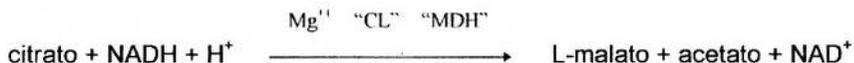
El citrato es convertido en oxalacetato y acetato en una reacción catalizada por la enzima Citrato Liasa (CL), en presencia de iones  $\text{Mg}^{++}$ :



El oxalacetato formado, en presencia de la enzima Málico Dehidrogenasa (MDH) y de NADH reacciona de acuerdo a:



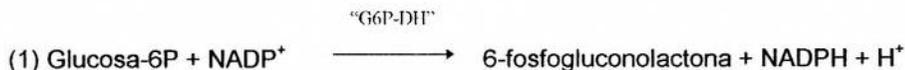
La constante de equilibrio molar de la reacción de la Citrato Liasa es 1.56 en favor de la síntesis de citrato. Al acoplarse la primera reacción con la segunda, se remueve cuantitativamente el oxalacetato formado por la acción de la enzima Málico Dehidrogenasa, favoreciendo la reacción final. La ecuación global es:



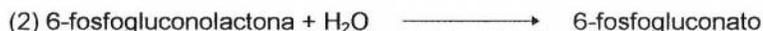
La disminución de la fluorescencia del NADH, nos da una medida cuantitativa de los niveles de citrato en los extractos ácidos.

### 3-2-3 Determinación de Glucosa 6-fosfato

El método utilizado fue el de Lang y Michal (85), cuyo fundamento es la oxidación de la Glucosa-6-fosfato (Glucosa-6P) a 6-fosfogluconolactona mediante la enzima Glucosa 6-fosfato Dehidrogenasa (G6P-DH):



La 6-fosfogluconolactona se transforma espontáneamente a 6-fosfogluconato:

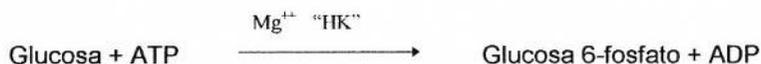


A pH=7,6, la conversión de Glucosa-6P, es cuantitativa en presencia de un exceso de NADP<sup>+</sup>. Esta reacción se apoya en la hidrólisis irreversible de la 6-fosfogluconolactona. La reacción es seguida fluorométricamente y la cuantificación de la Glucosa-6P se determina midiendo el aumento de fluorescencia asociado con la reducción del NADP<sup>+</sup> en los extractos ácidos neutralizados.

### 3-2-4 Determinación de Adenosina Trifosfato (ATP)

La determinación de ATP en tejido cardíaco fue realizada de acuerdo al método de Williamson y Corkey (86) cuyo fundamento es el siguiente:

La enzima Hexoquinasa (HK) cataliza la fosforilación de la glucosa por el ATP, en presencia de iones Mg<sup>++</sup> de acuerdo a la siguiente reacción:



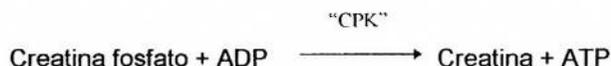
La enzima Glucosa 6-fosfato Dehidrogenasa (G-6PDH) cataliza la oxidación de la Glucosa 6-P por el NADP<sup>+</sup> para obtener 6-fosfogluconato de acuerdo a:



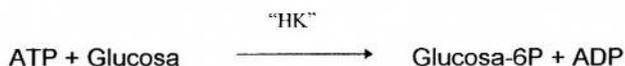
Por cada mol de ATP, se forma un mol de NADPH. El incremento de fluorescencia que acompaña estas reacciones acopladas brinda una medida cuantitativa de los niveles de ATP en los extractos tisulares ácidos con la condición que los niveles de glucosa estén en exceso.

### 3-2-5 Determinación de Creatina fosfato

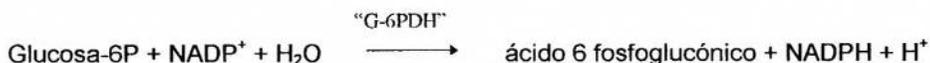
Se utilizó la técnica descrita por Lampretch y col. (87), que se basa en la transferencia de fosfato desde la Creatina fosfato a Adenosina fosfato catalizada por la enzima Creatina Fosfoquinasa (CPK) de acuerdo a:



El pH óptimo para que esta reacción esté desplazada a la derecha es 6.5-7.0. La presencia de Hexoquinasa (HK), permite que el ATP formado, fosforile la Glucosa a Glucosa 6-fosfato (Glucosa-6P) regenerando el ADP:



La oxidación de la Glucosa-6P dependiente de  $\text{NADP}^+$  por la enzima Glucosa 6-fosfato Dehidrogenasa (G-6PDH) conduce a la formación de 6-fosfogluconato y NADPH, lo que es usado como indicador de la reacción de acuerdo a la ecuación:



El equilibrio de las reacciones dependientes de las enzimas Hexoquinasa y Glucosa-6 fosfato Dehidrogenasa, permite que la reacción global se desplace hacia la derecha (formación de 6-fosfogluconato). Con exceso de ADP, las tres reacciones enzimáticas acopladas proceden cuantitativamente y el cambio en la extinción a 340 o 360 nm es proporcional a la concentración de creatina fosfato presente en los extractos de los tejidos analizados.

### 3-2-6 Determinación de Triglicéridos

En una alícuota del homogeneizado de tejido diluido 1:10 con solución fisiológica, se determinaron espectrofotométricamente los niveles de triglicéridos por el método de Laurell (88), expresándose los resultados como  $\mu\text{moles}$  por gramo de tejido seco.

### 3-2-7 Determinación de Glucógeno

En otra alícuota de tejido congelado, el homogeneizado fue diluido adecuadamente, y los niveles de glucógeno fueron determinados por el método descrito por Huijing (89), expresándose los resultados como  $\mu\text{moles}$  de glucógeno-glucosa por gramo de tejido seco.

### 3-2-8 Determinación de Proteínas

Las proteínas fueron cuantificadas por el Método de Lowry y col. (90), y los valores expresados como  $\text{mg./gramo}$  tejido seco.

En las reacciones mencionadas en el ítem 3-Métodos Analíticos, que utilizan técnicas fluorométricas, es necesario realizar en primer término la standarización espectrofotométrica de las soluciones, debido a que los cambios de fluorescencia de NADH y NADPH en las reacciones enzimáticas no proveen una medida absoluta de la concentración de nucleótidos y metabolitos en las muestras procesadas. El cambio de fluorescencia de la muestra incógnita es comparado con el cambio de fluorescencia observado luego de la adición a la misma de 5-20  $\mu\text{l}$  de una solución standard de un metabolito en particular (dependiendo de la determinación que estamos realizando). La concentración del metabolito standard en dicha solución, se determina previamente espectrofotométricamente midiendo el cambio de Densidad Óptica de los Nucleótidos de Piridina reducidos a 340 nm en el ensayo.

Las soluciones estándares, generalmente tienen una concentración de 0.1 mM, y se utilizan 0.5ml para los ensayos espectrofotométricos.

La concentración del metabolito en la solución standard usada para el ensayo, es calculada mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Conc (mM)} = \frac{V_1 \times 1 \times [(R_f - R_i)] - \Delta \text{blanco}}{6.22 \times V_2}$$

Donde:

$V_1$ : volúmen total final de la cubeta.

$V_2$ : volúmen de la solución standard agregado a la cubeta.

$R_f$ : densidad óptica final a 340 nm

$R_i$ : densidad óptica inicial a 340 nm

$\Delta$ blanco: cambio de densidad óptica que resulta de la adición de la enzima a la cubeta que contiene todos los compuestos excepto la solución standard, la cual es reemplazada por el mismo volúmen de agua destilada.

6,22: es el coeficiente de extinción ( $\text{cm}^2/\text{mmol}$ ) del NADH y NADPH a 340 nm para un paso de luz de la cubeta de 1 cm.

### Expresión de Resultados

Los niveles de los metabolitos en los tejidos son expresados generalmente como micromoles por gramo de tejido seco. Es conveniente hacerlo sobre la base de tejido seco, particularmente en órganos perfundidos, ya que el contenido de agua en las muestras es un factor variable.

Para la determinación del contenido de agua, un trozo de tejido congelado, fue pesado y luego llevado a sequedad en estufa a 105°C hasta peso constante, obteniéndose allí la relación peso tejido húmedo/peso tejido seco a utilizar.

Así, el contenido de cada metabolito en  $\mu\text{moles por gramo de tejido seco}$  (A), es expresado según:

$$A = \frac{(V_a + V_b) \times (V_c + V_d) \times B}{V_c \times W}$$

Donde:

A=  $\mu$ moles/gramo de tejido seco

Va = cantidad de HClO<sub>4</sub> agregado durante la extracción

Vb = contenido de agua en el tejido congelado

Vc = volúmen de la alícuota utilizado en la neutralización

Vd = volúmen de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> agregado para neutralizar la alícuota Vc

W = peso seco en gramos de la muestra de tejido

B = concentración del metabolito en el extracto

### **3-3 Determinaciones séricas**

#### **3-3-1 Cuantificación de ácidos grasos no esterificados**

Se empleó un volumen adecuado de suero para la cuantificación espectrofotométrica de ácidos grasos libres (AGNE) utilizando el método de Duncombe (91). El fundamento del mismo consiste en que los ácidos grasos libres de cadena larga forman jabones con iones cúpricos en medio clorofórmico. La adición de dietil-tiocarbamato a esta capa orgánica determina la formación de un cromógeno amarillo con los iones cúpricos, cuya intensidad de color a 440 nm es directamente proporcional a la concentración de ácidos grasos libres presentes.

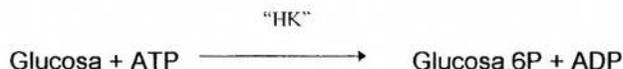
Los resultados son expresados como  $\mu$ equivalentes de AGNE/litro de suero.

#### **3-3-2 Cuantificación de glucosa**

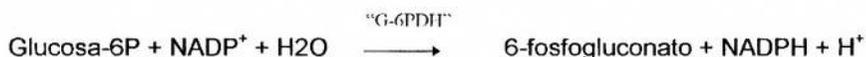
Para este fin, las muestras de sangre extraídas, son mantenidas a 4°C y procesadas inmediatamente.

Para la determinación de glucemia se utilizó el método enzimático descrito por Bergmeyer (92) cuyo fundamento es el siguiente:

La enzima Hexoquinasa (HK) cataliza la fosforilación de la glucosa por ATP según:



La oxidación de glucosa 6-fosfato (Glucosa-6P) dependiente de  $\text{NADP}^+$  por la enzima Glucosa-6-fosfato Dehidrogenasa (G-6PDH) conduce a la formación de 6-fosfogluconato y NADPH, lo que es usado como indicador de la reacción de acuerdo a:



El equilibrio de ambas reacciones determina la conversión estequiométrica hacia la formación de los productos. El incremento de extinción del NADPH es determinado a 340-360 nm, siendo proporcional a la glucosa presente en la muestra analizada.

Los resultados son expresados como mmoles de glucosa/litro de plasma.

### 3-3-3 Cuantificación de Insulina inmunoreactiva

Las muestras de sangre se recolectaron en tubos de centrifuga enfriados en hielo y posteriormente se centrifugaron a 3500 Xg durante 15 minutos. El sobrenadante fue fraccionado en alícuotas, y mantenido a  $-30^\circ\text{C}$  hasta su utilización.

Los niveles de insulina inmunoreactiva circulantes fueron determinados por radioinmunoensayo con el método de Herbert y col.(93), utilizando un standard de insulina de rata. Los resultados fueron expresados como microunidades/mililitro ( $\mu\text{U/ml}$ ).

### 3-3-4-Cuantificación de triglicéridos

Se determinó el contenido de triglicéridos plasmáticos por el método de Laurell (88) previamente descrito. Los resultados fueron expresados como mmol/litro.

## **4-Análisis estadístico**

Los resultados son expresados como la media  $\pm$  SEM. Las diferencias estadísticas entre los grupos fue determinada por el test "t" de Student o Anova - análisis de Varianza- y posterior comparación por el test de Scheffe's. Valores de  $p < 0.05$  fueron considerados como estadísticamente significativo. (Snedecor (94)).