

**RESULTADOS**



## Capítulo I-1

### Parámetros generales que caracterizan al modelo experimental

#### Introducción

##### Consideraciones generales del modelo

Como se mencionó anteriormente, la hipertrigliceridemia inducida en ratas alimentadas con una dieta rica en sacarosa, evoluciona desde normoglucemia e hiperinsulinemia (Período de Inducción, 3-5 semanas de DRS) a hiperglucemia con normoinsulinemia (Período de Recurrencia, 15 semanas de DRS).

Investigaciones recientes de nuestro grupo mostraron que las características principales de este último período continúan hasta al menos las 30 semanas de ingesta (95).

En este Período de Recurrencia se alcanza un estado de hipertrigliceridemia estable, y las anomalías a nivel sistémico son diferentes a las observadas en el Período de Inducción (21).

Dentro de este contexto endócrino metabólico, es muy escasa la información disponible sobre los efectos de la hipertrigliceridemia en el metabolismo de la glucosa y los triglicéridos en el músculo cardíaco en este período experimental. Estudios realizados por nuestro grupo, mostraron un significativo incremento en el contenido de triglicéridos y glucógeno del miocardio en el animal inmediatamente "ex vivo" (niveles basales) (26).

Por ello en la primera parte del presente capítulo, utilizamos un lote de animales alimentados durante 15 semanas con DRS, a los fines de corroborar los cambios que ocurren a nivel plasmático y del tejido muscular, en condiciones basales,

comparándolos con los observados en animales de igual sexo y edad alimentados con dieta control (DC).

## **Protocolo experimental**

Se utilizaron ratas macho cepa Wistar, con un peso inicial de 180-200 grs., las cuales fueron agrupadas al azar en dos lotes:

*Lote control:* animales que recibieron dieta control (DC), donde la fuente de hidratos de carbono fue almidón 63 % p/p.

*Lote experimental:* animales que recibieron dieta rica en sacarosa (DRS 63 % p/p).

La composición de las dietas, semisintéticas, isocalóricas, se observan en la *Tabla 1* (mayores detalles de las mismas fueron descritos en el ítem Metodología).

Los animales de cada lote recibieron la dieta respectiva "ad libitum" durante 15 semanas, verificándose el peso de los mismos dos veces por semana durante todo el período experimental. En un ensayo en paralelo se constató dos veces por semana el peso y la ingesta calórica de 10 animales en cada grupo.

Al cabo del período experimental, el alimento fue retirado a las 07.00hs. y las experiencias llevadas a cabo entre las 9.00 y 10.00 hs. Los animales fueron anestesiados intraperitonealmente con pentobarbital sódico (60 mg/kg peso rata) y sacrificados como se describió en el ítem Metodología, obteniéndose muestras de sangre y tejido cardíaco.

En las muestras de sangre se realizaron las determinaciones de glucosa (92), insulina (93), ácidos grasos libres (91) y triglicéridos plasmáticos (88).

Las muestras de tejido, fueron congeladas a la temperatura del Nitrógeno líquido y pulverizadas. En los homogeneizados de estos tejidos, se cuantificó el contenido de glucógeno (89), glucosa 6-fosfato (85), triglicéridos (88), citrato (84), acetil CoA y CoASH (83), como así también la actividad del complejo enzimático

Piruvato Dehidrogenasa (75). La metodología utilizada fue descrita previamente en el ítem Metodología.

## **Resultados**

### **Incremento de peso e ingesta calórica**

La *Tabla 2* muestra el incremento de peso (gramos/día) y la ingesta calórica (kjoule/día) de las ratas alimentadas con Dieta Control (DC) y Dieta Rica en Sacarosa (DRS) durante 15 semanas.

Como se observa, la dieta experimental (DRS) fue bien aceptada, ya que la ganancia de peso y la ingesta calórica es similar a la de los animales alimentados con DC.

### **Efecto de la dieta rica en sacarosa sobre los parámetros plasmáticos y tisulares (músculo cardíaco).**

En la *Tabla 3*, podemos observar los niveles plasmáticos de glucosa, insulina, ácidos grasos no esterificados (AGNE) y triglicéridos, así como la forma activa del complejo enzimático Piruvato Dehidrogenasa (PDHa) (como % de la actividad total PDH) en tejido cardíaco. En la misma constatamos que la disminución de la actividad del complejo PDHa en miocardio de los animales alimentados con DRS se correlaciona con niveles plasmáticos significativamente elevados de AGNE y Triglicéridos.

La homeostasis de la glucosa está claramente alterada en presencia de niveles de insulina plasmática semejantes a los observados en los animales alimentados con dieta control de igual sexo y edad.

La *Figura 6* muestra la relación entre niveles de AGNE plasmáticos y actividad de la enzima PDHa, como % de la actividad enzimática total PDH, y la *Figura 7* relaciona el contenido de triglicéridos intracelulares y actividad enzimática PDHa (% de PDH). En ambos casos podemos observar que tanto los niveles elevados de AGNE plasmáticos o el contenido de triglicéridos del músculo cardíaco, presentan una relación inversa con la actividad enzimática PDHa cardíaca en los animales alimentados con DRS o DC. Es interesante destacar que la actividad total del complejo enzimático (PDHt) no se modificó en el lote experimental.

**Tabla 2:** Ganancia de peso e ingesta calórica en ratas alimentadas durante 15 semanas con dieta control (DC) o dieta rica en sacarosa (DRS).

Dieta	Peso inicial (gr.)	Peso final (gr.)	$\Delta$ Peso (gr./día)	Calorías (Kjoule/día)
DC	186,4 $\pm$ 3,4	370,0 $\pm$ 10,1	2,03 $\pm$ 0,11	298 $\pm$ 25,6
DRS	190,0 $\pm$ 2,5	387,0 $\pm$ 7,3	2,18 $\pm$ 0,07	300 $\pm$ 11,8

Los valores son expresados como media  $\pm$  SEM.  
10 animales componen cada grupo experimental.

**Tabla 3:** Niveles basales de metabolitos e insulina plasmática y actividad PDHa del músculo cardíaco en ratas alimentadas durante 15 semanas con dieta control (DC) o dieta rica en sacarosa (DRS).

Dieta	DC	DRS
Parámetro		
Glucosa (mM)	6,63 $\pm$ 0,10	8,11 $\pm$ 0,09 *
Insulina (uU/ml)	42,2 $\pm$ 2,2	40,6 $\pm$ 5,2
AGNE (uM)	266 $\pm$ 26	703 $\pm$ 22 **
Triglicéridos (mM)	0,51 $\pm$ 0,05	1,50 $\pm$ 0,16 **
PDHa (% de PDHtotal) $\square$	69,0 $\pm$ 2,10	25,2 $\pm$ 2,8 **

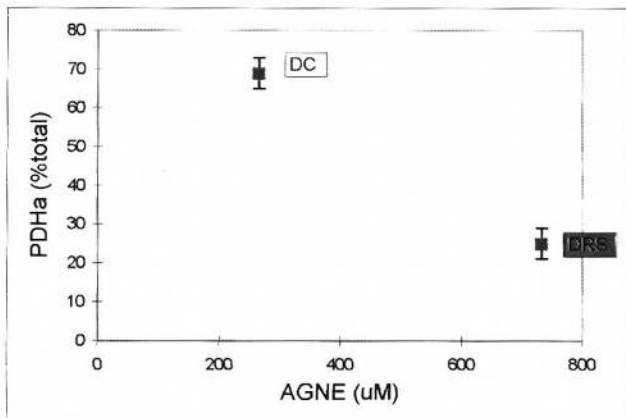
$\square$  PDHa: forma activa del complejo enzimático Piruvato Dehidrogenasa (PDH)

Los valores son expresados como media  $\pm$  SEM.

Al menos 6 animales componen cada grupo experimental.

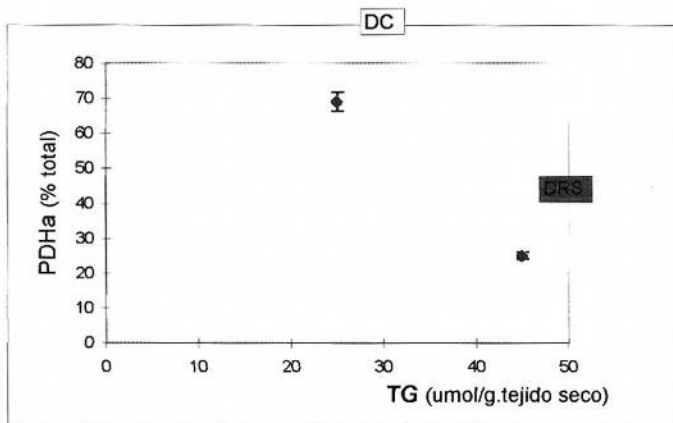
\* DRS vs. DC  $p < 0,05$ , \*\* DRS vs. DC  $p < 0,01$

**Figura 6:** Relación entre actividad 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).



Los valores son expresados como media  $\pm$  SEM. Al menos 8 animales fueron utilizados en cada grupo experimental.

**Figura 7:** Relación entre actividad PDHa (%de PDH total) y niveles de triglicéridos (Tg) en miocardio de ratas alimentadas durante 15 semanas con dieta control (DC) o dieta rica en sacarosa (DRS).



Los valores son expresados como media  $\pm$  SEM. Al menos 8 animales fueron utilizados en cada grupo experimental.

En estas condiciones experimentales, el descenso de la actividad del complejo enzimático PDHa (como % del total) observado en el tejido cardíaco del lote DRS, se acompaña de un significativo incremento en los niveles de triglicéridos, glucógeno, glucosa 6-fosfato, citrato y de la relación Acetil CoA/CoASH (Tabla 4).

Los resultados aquí presentados a nivel plasmático y tisular, abonan los previamente descritos por nuestro grupo (26), e inducen a pensar que las presentes modificaciones bioquímico metabólicas, podrían contribuir a cambios sustanciales en la captación, utilización de la glucosa y bifurcación del combustible energético (utilización de ácidos grasos) en el músculo cardíaco.

Dentro de este contexto, la propuesta de trabajo de esta tesis tratará de dilucidar en los capítulos siguientes algunos aspectos de este interrogante.



**Tabla 4:** Niveles de metabolitos en tejidos cardíaco de ratas alimentadas durante 15 semanas con dieta control (DC) o dieta rica en sacarosa (DRS).

<b>Dieta</b>	<b>triglicéridos</b> ( $\mu\text{mol}/\text{gr. tej. seco}$ )	<b>glucógeno</b> <sup>1</sup> ( $\mu\text{mol}/\text{gr. tej. seco}$ )	<b>glucosa 6-P</b> ( $\mu\text{mol}/\text{gr. tej. seco}$ )	<b>citrato</b>	<b>AcetilCoA</b> <b>COASH</b>
DC	26,3 $\pm$ 0,9	82,5 $\pm$ 3,5	1,15 $\pm$ 0,08	0,9 $\pm$ 0,1	0,28 $\pm$ 0,04
DRS	47,0 $\pm$ 3,0 *	109,0 $\pm$ 4,6 *	2,4 $\pm$ 0,3 *	1,7 $\pm$ 0,2 *	0,83 $\pm$ 0,12 *

1- Los valores son expresados como  $\mu\text{moles glucógeno-glucosa equivalentes}$   
Los valores son expresados como  $\text{media} \pm \text{SEM}$ .

Al menos 6 animales componen cada grupo experimental.

\* DRS vs. DC  $p < 0,05$ .

## Capítulo I-2

### **Utilización y destino de la glucosa y metabolismo de los triglicéridos en corazón perfundido aislado en condiciones metabólicas semejantes a la del animal “in vivo”.**

#### **Introducción**

Como constatamos en el capítulo anterior el medio metabólico-hormonal de este modelo de dislipemia nutricional se caracteriza por elevados niveles plasmáticos de glucosa, triglicéridos (VLDL-TG) y ácidos grasos libres (AGNE) sin modificaciones en los niveles de insulina. En este entorno, los ácidos grasos libres o los constituyentes de los triglicéridos provenientes de la VLDL-TG, *sustratos altamente competitivos como fuente energética del músculo cardíaco*, son capaces de influenciar la utilización de la glucosa y el metabolismo de los triglicéridos en este tejido.

Diferentes autores demostraron la influencia que ejerce una mayor disponibilidad de ácidos grasos libres plasmáticos sobre la glicólisis y oxidación de la glucosa en el tejido muscular cardíaco. Al respecto Randle y col.(96) observaron que un incremento en los niveles de ácidos grasos y cuerpos cetónicos en el medio de perfusión en corazones perfundidos de animales controles induce alteraciones del metabolismo de la glucosa a diferentes niveles, por ejemplo:

- a) disminución velocidad de glicólisis asociada a una inhibición de la actividad enzimática de la Fosfofructoquinasa I (PFK-I),
- b) menor oxidación del piruvato por inhibición del complejo enzimático Piruvato dehidrogenasa, enzima clave en la conversión irreversible de piruvato a acetilCoA.

En estas condiciones una mayor captación de ácidos grasos como sustrato energético favorece un incremento en el miocardio de acilCoA y acil carnitina. Un

aumento de estos metabolitos y de ácidos grasos podría favorecer el daño isquémico semejante al observado en el corazón de la rata diabética.(97)

Estudios de Chain y col (98) y Randle y col. (62), entre otros, mostraron también una marcada disminución en la captación de la glucosa en corazones perfundidos (sistema Langendorff) de ratas diabetizadas con streptozotocina. En estos animales, los niveles elevados de ácidos grasos libres plasmáticos se acompañan de hiperglucemia e hipoinsulinemia.

Por otra parte, una marcada inhibición de la lipólisis del pool accesible de triglicéridos endógenos fue observada por Murthy y col. (99) , cuando corazones de ratas diabéticas y controles fueron perfundidos en presencia de glucosa y concentraciones elevadas de palmitato.

De lo expuesto anteriormente y con el objeto de analizar los posibles mecanismos involucrados en la utilización de la glucosa y/o bifurcación del combustible energético en animales alimentados con DRS, se utilizó un diseño experimental de corazón aislado perfundido, que contempla un entorno metabólico semejante al observado en el animal "in vivo" (moderada hiperglucemia y elevados niveles de ácidos grasos no esterificados). El sistema elegido, (que se detalla a continuación en el ítem Protocolo experimental) permite el estudio de la captación de sustratos así como la liberación de enzimas y metabolitos por dicho órgano en diferentes condiciones experimentales. Con este fin se evaluó:

**a-** captación y utilización de la glucosa por el músculo cardíaco

**b-** metabolismo del pool endógeno de triglicéridos

## Protocolo experimental

Se utilizaron ratas macho cepa Wistar, de 180-200 gramos de peso inicial, las cuales luego de un período de adaptación, fueron agrupadas al azar en dos lotes: control y experimental, según se detalló en el ítem Metodología, brevemente:

*Lote control:* ratas que recibieron dieta control (DC), cuya fuente de hidratos de carbono es almidón 63 %p/p

*Lote experimental:* ratas alimentadas con dieta rica en sacarosa (DRS), cuya fuente de hidratos de carbono es sacarosa 63% p/p.

Las dietas son isocalóricas, proveen aproximadamente 15.2 Kjoule/gramos de comida y fueron administradas durante 15 semanas "ad libitum".

El peso de los animales fue constatado dos veces por semana durante todo el período de experimentación. En un experimento por separado el peso individual y la ingesta calórica de al menos 10 animales en cada grupo fue determinado dos veces por semana. Al finalizar el período experimental, el alimento fue retirado de las jaulas a las 7.00hs. y las experiencias se realizaron entre las 9.00 y 12.00 hs.

Los animales fueron anestesiados por vía intraperitoneal con pentobarbital sódico (60 mg/kg peso rata) como se describió en el ítem Metodología.

## Técnica de perfusión

En estas experiencias dinámicas, los corazones fueron perfundidos utilizando la técnica de corazón aislado de Langendorff(100) de perfusión retrógrada, en un sistema recirculante (presión hidrostática 60mmHg), que permite el estudio de la captación de sustratos y liberación de metabolitos y enzimas.

Una vez anestesiado el animal, se practicó una incisión por debajo de la caja torácica, cortándose luego el diafragma para dejar expuesto el corazón. El corazón fue removido y colocado en un buffer de Krebs Henseleit bicarbonato a 0°C. En el término de 1-2 minutos de comenzar la operación, el corazón congelado, fue inicialmente perfundido (canulación por la aorta) en un sistema de perfusión retrógrada no recirculante, -que permite lavar la sangre residual y reanudar las

contracciones-, utilizando buffer Krebs Henseleit bicarbonato,  $\text{Ca}^{++}$  2.5 mM y  $\text{pH}=7.4$ , conteniendo glucosa (5.5 o 8.5 mM), constantemente gasificado con una mezcla  $\text{O}_2:\text{CO}_2$  (95:5) y temperatura de  $37^\circ\text{C}$ . El buffer fue filtrado antes de ser utilizado, a través de un filtro millipore Tipo SSWP y colocado en un reservorio a 70 cm de altura del órgano a fin de mantener la presión hidrostática adecuada.

Luego de 5 minutos de lavado (perfusión no recirculante) los corazones fueron conectados a un sistema recirculante, utilizando el sistema de perfusión retrógrada de Langendorff anteriormente descrito. El buffer (100 ml) Krebs Henseleit bicarbonato,  $\text{Ca}^{++}$  2.5 mM,  $\text{pH}$  7.4, fue continuamente gasificado con  $\text{O}_2:\text{CO}_2$  (95:5) y mantenido a  $37^\circ\text{C}$ . La presión aórtica de 60 mmHg se mantuvo utilizando una bomba peristáltica.

El medio de perfusión, fue adicionado con ácidos grasos (ácido palmítico) y glucosa como sustratos exógenos, en concentraciones semejantes a las que se encuentran en el plasma de cada grupo experimental "in vivo":

1- corazones de animales alimentados con dieta control (DC) perfundidos con niveles de glucosa 5.5 mM y 0.4 mM de ácido palmítico.

2- corazones de animales alimentados con dieta rica en sacarosa (DRS) perfundidos con niveles de glucosa de 8.5 mM y 0.8mM de ácido palmítico.

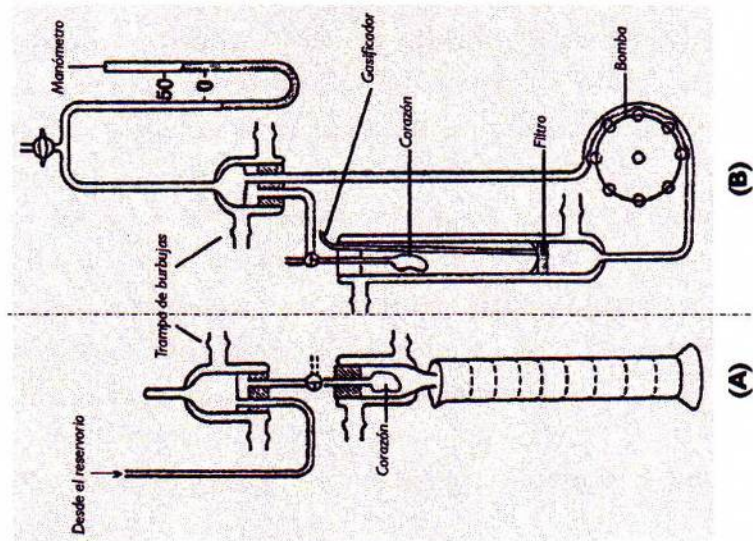
El flujo de salida se mantuvo entre 9-10 ml/minuto y la frecuencia cardíaca de 220-260 contracciones/minuto a lo largo de todo el período de perfusión.

El esquema del sistema de perfusión utilizado se observa en la *Figura 8*.

Entre la salida del efluente del órgano perfundido y la bomba peristáltica se colocó un filtro que impide el paso de alguna partícula que pudiera estar presente en el medio de perfusión.

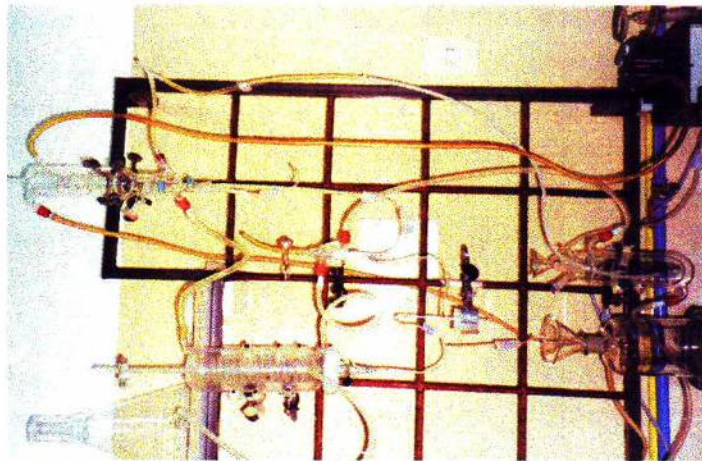
El ácido palmítico unido a albúmina sérica bovina, fracción V, libre de ácidos grasos, fue adicionado al buffer de perfusión, en las concentraciones antes mencionadas. La albúmina fue previamente tratada de acuerdo a la técnica de Chen(101), como se detalla brevemente a continuación.

**Figura 8:** Aparato de Langendorff de perfusión de corazón.



**(A)** Perfusión no recirculante. El buffer proveniente del reservorio superior (60mmHg) entra a la aorta luego de pasar por la trampa de burbujas.

**(B)** Perfusión recirculante. Circuito similar, el buffer es impulsado por una bomba peristáltica, el sistema consta de una trampa de burbujas y un filtro a la salida del corazón.



### Delipidación de albúmina bovina fracción V

Se disolvieron 7 gramos de Albúmina sérica bovina fracción V (Sigma Chemical Company), en 70 ml de agua destilada a 23°C. A esta solución se adicionaron 3.5 gramos de carbono activado, llevándose el pH a 3.0 mediante la adición de HCl 0.2N. La solución resultante, es homogeneizada en baño de hielo (0-4°C). El carbono activado fue removido por centrifugación en una centrifuga refrigerada, y la solución clara (despojada de restos de carbono activado) fue llevada a pH=7,0 con la adición de NaOH 0.2N -Chen(101)-.

### Solución ácidos grasos - albúmina (unión de los ácidos grasos a la albúmina)

En la preparación del complejo albúmina-ácidos grasos, se obtuvo inicialmente la sal potásica del ácido graso, que luego fue agregada a una solución tibia (50°C) de albúmina al 10%. La solución de albúmina fue agitada constantemente durante la adición de los ácidos grasos.

La solución de sales de ácidos grasos (sal potásica), fue preparada disolviendo el ácido palmítico en cantidades mínimas de etanol, adicionando KOH (1N) y gotas de agua. A continuación el etanol fue evaporado calentando cuidadosamente en rotavapor. Esta solución fue adicionada a la solución tibia de albúmina. La mezcla ácidos grasos-albúmina debe ser clara, una solución turbia indica que la concentración de ácidos grasos excede la capacidad de unión a la albúmina.

La solución ácidos grasos-albúmina, fue finalmente dializada durante toda la noche contra un volumen adecuado de Buffer Krebs Henseleit (102). La concentración final de albúmina utilizada en la perfusión, fue de 3gr%. Para prevenir la formación de espuma, se agregaron al medio de perfusión, cantidades adecuadas de Antifoam A (Sigma Chemical Company).

En todos los experimentos, el tiempo de perfusión en el sistema recirculante fue de 30 minutos.

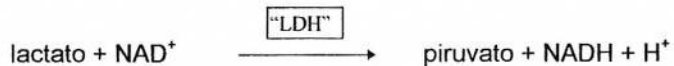
Durante el transcurso de los experimentos, y a intervalos convenientes de tiempo, se midieron: flujo coronario (ml/minuto), frecuencia cardíaca (contracciones/minuto) y pH del efluente, el que se mantuvo a  $7.4 \pm 0.015$ .

Se colectaron muestras del perfusado (1 ml) al minuto cero de perfusión recirculante y a los 15 y 30 minutos, las que fueron inmediatamente desproteinizadas y congeladas hasta su procesamiento. Esto nos permitió determinar el metabolismo global de la glucosa, cuantificando la desaparición de la glucosa del medio de perfusión. En las muestras desproteinizadas se determinaron los niveles de lactato (103) y de piruvato (104) liberados al medio de perfusión.

### Determinación de lactato

En la determinación de la liberación de lactato en el medio de perfusión se utilizó el método de Hohorst y col. (103). Brevemente:

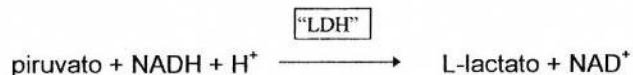
La enzima Lactico Dehidrogenasa (LDH) cataliza la reacción:



La utilización de una solución buffer de hidrazina - glicina (pH=9.5) permite que la reacción proceda irreversiblemente hacia la derecha, por lo que el incremento de fluorescencia debida al NADH producido nos permite cuantificar los niveles de lactato en el perfusado.

### Determinación de piruvato

Para la determinación del piruvato liberado al medio se utilizó la técnica de Bucher y col.(104). Brevemente:



El equilibrio de esta reacción en las condiciones de temperatura y pH utilizado, 7.0, está desplazado hacia la derecha, favoreciendo la formación de



lactato. Siguiendo la disminución de fluorescencia de NADH, se puede cuantificar el nivel de piruvato en el medio de perfusión.

La captación de glucosa se calculó cuantificando las diferencias en las concentraciones de este sustrato en el medio al tiempo cero y a los 30 minutos de perfusión (92). Los valores son expresados como *umol/gramos tejido seco/30 minutos*.

Al finalizar el período de perfusión los corazones fueron congelados en forma inmediata utilizándose una pinza de Wolleberger (74) previamente enfriada a la temperatura del N<sub>2</sub> líquido. Los tejidos congelados fueron pulverizados en un mortero previamente enfriado a la misma temperatura procediéndose a realizar en los mismos las determinaciones siguientes: triglicéridos (88), glucógeno (89), glucosa 6-fosfato (85), ATP (86), creatina fosfato (87), citrato (84), actividad del complejo enzimático Piruvato Dehidrogenasa(75) y de la enzima Piruvato Dehidrogenasa Quinasa (78,79). Las técnicas utilizadas fueron descriptas en el ítem Metodología.

La relación tejido húmedo/tejido seco fue determinada en cada experimento. Los valores obtenidos de los metabolitos analizados en el medio de perfusión o en el tejido muscular fueron expresados por gramos de tejido seco, corrigiendo de esa manera cualquier diferencia por el contenido de agua en el tejido.

### **Experiencia preliminar**

A los fines de corroborar el correcto funcionamiento del sistema de perfusión recirculante, realizamos una experiencia preliminar utilizando ratas de igual sexo y edad que fueron alimentadas durante 15 semanas con dieta standard de laboratorio (DC).

Finalizado el período experimental, los animales fueron sacrificados bajo anestesia de pentobarbital (60 mg/kg peso) y los corazones rápidamente removidos y perfundidos como se describió previamente. El medio de perfusión Krebs Henseleit bicarbonato, pH=7.4,  $Ca^{++}$  2.5mM, fue adicionado de glucosa 5.5 o 8.5 mM como único sustrato exógeno. Se cuantificó durante la perfusión la captación de glucosa (92) -desaparición del medio de perfusión- y la liberación de lactato (103). Al finalizar el período experimental (30 minutos), los corazones fueron inmediatamente congelados (como se describió previamente) y en alícuotas de homogeneizados del tejido cardíaco se cuantificó el contenido de glucógeno (89), ATP (86) y creatina-fosfato (87).

En la *Tabla 5*, podemos observar que elevando la concentración de glucosa en el medio de perfusión, se incrementa la captación de glucosa (25%) y la liberación de lactato (14%).

El contenido final de glucógeno que disminuyó 30%, cuando se perfunde con glucosa 5.5 mM, con respecto a los niveles observados en el corazón de los animales "ex vivo"; solo descendió un 10% con respecto al nivel basal cuando se utiliza 8.5 mM de glucosa como único sustrato exógeno.

El contenido de ATP y Creatina fosfato en el tejido muscular al final de la perfusión fue similar en ambas condiciones experimentales. Los valores obtenidos fueron: ( $\mu\text{mol/gramo tejido seco, media} \pm \text{SEM}$ ) 5.5 mM de glucosa: ATP=19.5 $\pm$ 0.9, Creatina fosfato=21.0  $\pm$  1.3 y 8.5 mM de glucosa: ATP= 19.3  $\pm$  0.8, Creatina fosfato= 20.8  $\pm$  1.6. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Chain y col.(98) en condiciones experimentales similares, mostrando un funcionamiento correcto del sistema de perfusión utilizado.

Comprobada la factibilidad de la metodología utilizada, y cumpliendo con uno de los objetivos de la presente Tesis, nos propusimos analizar la captación y utilización de la glucosa en corazones aislados perfundidos de ratas alimentadas durante 15 semanas con dieta rica en sacarosa (DRS), contemplando un entorno metabólico semejante al del animal "in vivo" (glucosa 8.5mM y ácido palmítico 0.8 mM). Estos parámetros fueron comparados con los obtenidos en animales de igual

**Tabla 5:** Captación de glucosa, liberación de lactato y contenido de glucógeno en corazón perfundido de ratas alimentas con dieta control (DC).

glucosa <sup>1</sup> (mM)	glucosa captación ( $\mu\text{mol}/\text{gr.tej.seco}/30 \text{ min}$ )	lactato liberación ( $\mu\text{mol}/\text{gr.tej.seco}$ )	glucógeno ( $\mu\text{mol}/\text{gr.tej.seco}$ )
5,5	278 $\pm$ 16,5	75,43 $\pm$ 3,1	53,0 $\pm$ 3,8
8,5	348,0 $\pm$ 18,5 *	86,11 $\pm$ 2,2 *	71,85 $\pm$ 4,2 *

1- concentración inicial de glucosa en el medio de perfusión.

Los corazones fueron perfundidos durante 5 minutos en un sistema no recirculante (lavado del órgano). Luego fueron perfundidos durante 30 minutos en un sistema recirculante con buffer Krebs Henseleit bicarbonato pH 7,4,  $\text{Ca}^{++}$  2,5 mM, glucosa 5,5 mM u 8,5 mM. (Ver detalles en el ítem Metodología).

Los valores son expresados como media  $\pm$  SEM. Al menos 4 animales fueron utilizados en cada grupo experimental.

\* DC (8,5mM) vs. DC (5,5 mM),  $p < 0,05$ .

sexo y edad alimentados con dieta control (DC), y perfundidos con su entorno metabólico correspondiente (glucosa 5.5 mM y ácido palmítico 0.4 mM).

## Resultados

### Incremento de peso e ingesta calórica

En la *Figura 9* podemos observar la evolución del peso de los animales alimentados con dieta control y con dieta rica en sacarosa por un período de 15 semanas. Durante este tiempo, tanto la ganancia de peso (*gramos/día*), media  $\pm$  SEM, DC:  $2.1 \pm 0.5$  vs. DRS:  $2.2 \pm 0.7$ , como la ingesta calórica (*kJoule/día*), media  $\pm$  SEM, DC:  $297 \pm 15$  vs DRS:  $288 \pm 19$ , fue semejante en ambos lotes.

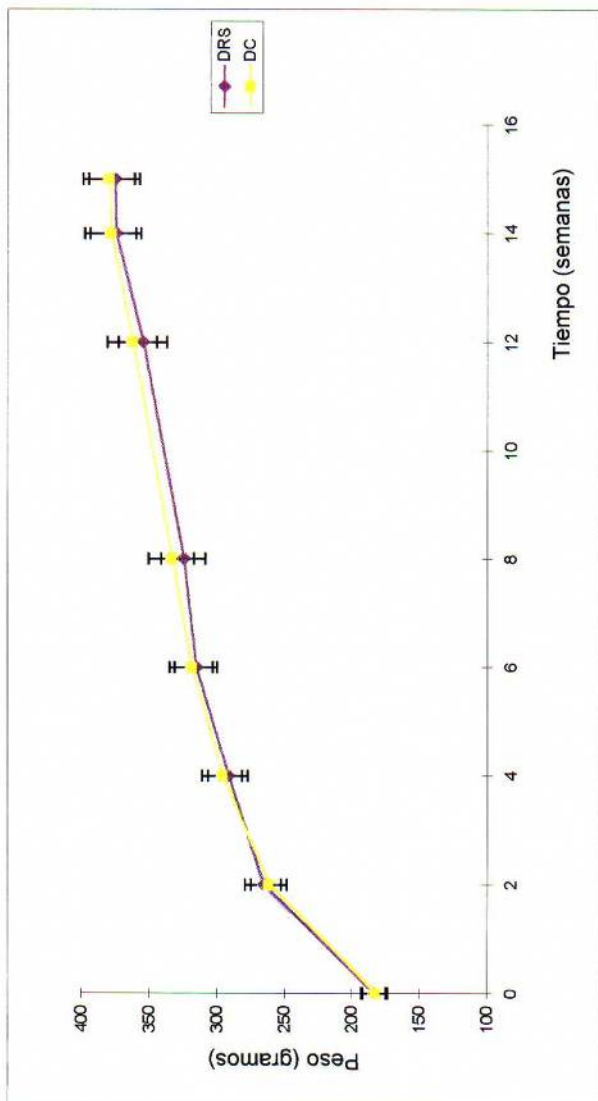
Estos parámetros corroboran los previamente demostrados por nuestro grupo (14), reflejando la buena aceptación de la dieta por parte del lote experimental alimentado con DRS.

### Captación y destino metabólico de la glucosa

En la *Tabla 6*, observamos la captación de glucosa y la liberación de lactato + piruvato en los corazones de animales alimentados con DC o DRS, perfundidos en presencia de sustratos exógenos en concentraciones semejantes al entorno metabólico "in vivo". En los corazones del lote DC, el comportamiento de ambos parámetros es similar al descrito en los trabajos de Randle y col.(96) y Tamboli y col.(105) utilizando corazones de ratas normales perfundidos en condiciones experimentales semejantes. La captación de glucosa decreció en aproximadamente un 50% y la producción de lactato y piruvato (suma de lactato y piruvato liberado al medio) incrementó un 47% ( $p < 0.05$ ) en los corazones de ratas alimentadas con DRS, cuando comparamos con animales de igual sexo y edad alimentados con DC.

Los hallazgos descritos para el lote DRS, se asemejan a los observados por Randle y col.(96) en corazones de animales diabéticos perfundidos en condiciones experimentales semejantes.

**Figura 9:** Evolución del Peso de las ratas alimentadas con dieta control (DC) o dieta rica en sacarosa (DRS).



Los valores son expresados como media  $\pm$  SEM.  
10 animales fueron analizados en cada grupo experimental.

**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).

Dieta	1		2		glucógeno		
	glucosa (mM)	palmitato (mM)	glucosa captación (umol/gr.tej.seco 30 minutos)	lactato + piruvato liberación (umol/gr.tej.seco 30 minutos)		glucosa 6P citrato (umol/gramo de tejido seco)	
<b>DC</b>	5,5	0,4	180,0 ± 35,4	75,1 ± 2,5	1,20 ± 0,07	1,04 ± 0,15	84,8 ± 6,6
<b>DRS</b>	8,5	0,8	92,0 ± 10,3 *	110,2 ± 4,2 *	1,55 ± 0,06 *	1,90 ± 0,2 *	76,7 ± 6,4

1- concentración inicial de glucosa y palmitato en el medio de perfusión.

2- los valores son expresados como umoles de glucógeno-glucosa equivalentes. Los niveles de glucógeno a los 5 minutos de perfusión no recirculante fueron: DC:70,8 ± 3,3; DRS: 80,4 ± 3,4.

Los corazones fueron perfundidos durante 5 minutos en un sistema no recirculante (lavado del órgano). Luego fueron perfundidos durante 30 minutos en un sistema recirculante con buffer Krebs Henseleit bicarbonato, pH=7,4, Ca<sup>++</sup> 2,5 mM, conteniendo glucosa y palmitato en las concentraciones indicadas. (Ver detalles en el ítem Metodología.)

Los valores son expresados como media ± SEM. Al menos 5 animales fueron utilizados en cada grupo experimental.

\* DRS vs. DC, p<0,05.

Luego de 30 minutos de perfusión los niveles de glucosa-6-fosfato, citrato y glucógeno en el músculo cardíaco de ratas controles concuerdan con lo observado por otros autores. Trabajos de Crass y col.(106) y Nelly y col.(24) sugieren, que en corazones normales perfundidos en presencia de concentraciones cuasifisiológicas de glucosa y ácidos grasos (AGNE), la provisión de AGNE parece ser suficiente para mantener los niveles de ATP e impedir la degradación de los depósitos de glucógeno. Los corazones de animales del lote DRS, muestran al final del período de perfusión un ligero decrecimiento del contenido tisular de glucógeno que no llega a ser significativo. (Tabla 6).

El contenido final de glucosa-6-fosfato y citrato es significativamente diferente en los corazones del lote experimental, comparados con los de sus respectivos controles etarios alimentados con DC (Tabla 6). Nótese que el entorno metabólico del lote DRS, que simula al observado en el plasma del animal "in vivo", es significativamente diferente al del grupo DC, (DRS: glicemia = 8.5 mM y AGNE = 0.8 mM vs. DC: glicemia = 5.5mM y AGNE = 0.4mM).

El contenido de ATP y Creatina fosfato del músculo cardíaco al final del período de perfusión fue similar en ambos lotes analizados. Los resultados obtenidos fueron: ATP ( $\mu\text{mol/gr.tej.seco}$ ) media  $\pm$  SEM, DC= 18.9 $\pm$  1.2 vs. DRS= 19.2  $\pm$  0.9 y Creatina fosfato: ( $\mu\text{mol/gr.tej.seco}$ ) media  $\pm$  SEM, DC= 21.2  $\pm$  1.1 vs. DRS=20.6  $\pm$  1.4.

No se observaron diferencias significativas durante el período de perfusión en los valores de flujo coronario: *ml/min*: media  $\pm$  SEM, DC= 10.6  $\pm$  0.9 vs. DRS= 10.1  $\pm$  1.0; ni en la frecuencia cardíaca: *contracciones/minuto*: media  $\pm$  SEM, DC= 215  $\pm$  10 vs. DRS= 227  $\pm$  14.

### **Contenido tisular de triglicéridos y actividad del complejo enzimático PDH**

El pool accesible de triglicéridos del miocardio es una fuente potencial de ácidos grasos para su oxidación mitocondrial y subsecuente provisión de energía. Como vimos al inicio del presente capítulo, los niveles de triglicéridos cardíacos en el animal "ex vivo", son significativamente mayores en los animales alimentados con

DRS respecto al grupo DC. En estudios previos (12) observamos que perfundiendo corazones normales en presencia de glucosa como único sustrato exógeno, la velocidad de lipólisis (medida como el contenido de triglicéridos en función del tiempo), decrece moderadamente. Esta lipólisis se ve muy acentuada en corazones de animales diabéticos perfundidos en condiciones experimentales semejantes (99)

En la *Figura 10* constatamos que luego de 5 minutos de lavado del órgano (minuto 0 de perfusión recirculante), el decrecimiento en el contenido de triglicéridos es significativamente mayor en los animales alimentados con DRS. Al finalizar el período de perfusión (medio: glucosa + palmitato) el contenido de triglicéridos en ambos lotes es semejante a lo observado al inicio de la perfusión recirculante (tiempo cero). Esto sugiere que la provisión de los ácidos grasos exógenos y su oxidación, posibilita el mantenimiento del pool dinámico de triglicéridos endógenos.

En la *Tabla 7* observamos un significativo descenso de la actividad del complejo enzimático Piruvato Dehidrogenasa, en su forma activa (PDHa), expresada como el % de la actividad total, en los corazones perfundidos del lote DRS comparado con los observados en el lote DC. Estos resultados se asocian a una incrementada actividad de la enzima Piruvato Dehidrogenasa Quinasa, sugiriendonos que bajo estas condiciones experimentales (niveles de sustratos exógenos semejantes a los del animal in vivo) la oxidación de la glucosa (medida a través de la actividad PDHa) está muy disminuída.

## **Discusión**

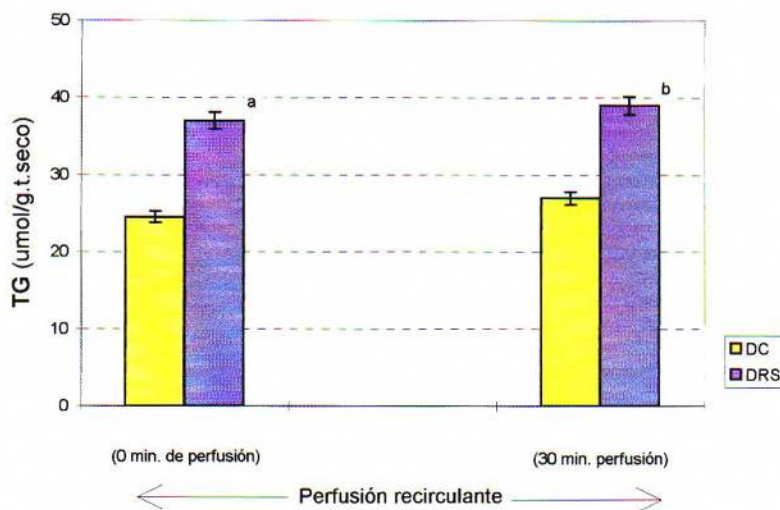
El primer interrogante planteado en esta tesis fue conocer la captación y utilización de la glucosa a nivel del músculo cardíaco en este modelo de dislipemia nutricional cuando este órgano aislado es expuesto a los principales sustratos metabólicos en concentraciones semejante a las observadas en el animal "in vivo".

Bajo estas condiciones experimentales observamos:

1- Una menor captación y oxidación de la glucosa (ésta última medida a través de la actividad PDHa, forma activa del complejo PDH)



**Figura 10:** Contenido de triglicéridos en corazón perfundido de ratas alimentadas con dieta control (DC) o dieta rica en sacarosa (DRS).



Triglicéridos (umol/gr.tej.seco), media  $\pm$  SEM:

DRS ("ex vivo") =  $46,0 \pm 2,4$ , DC ("ex vivo") =  $25,2 \pm 1,9$ .

Los corazones fueron perfundidos durante 5 minutos en un sistema no recirculante (lavado del órgano). Luego fueron perfundidos durante 30 minutos en un sistema recirculante con buffer Krebs Henseleit bicarbonato pH 7,4,  $Ca^{++}$  2,5 mM, glucosa 5,5 mM y ác. palmítico 0,4 mM (lote DC) o glucosa 8,5 mM y ác. palmítico 1,0 mM (lote DRS). (Ver detalles en el ítem Metodología).

Los valores son expresados como media  $\pm$  SEM. Al menos 4 animales fueron utilizados en cada grupo y tiempo de experimentación.

a: DRS vs DC a tiempo cero,  $p < 0,05$ .

b: DRS vs DC a los 30 minutos,  $p < 0,05$ .

**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).

Dieta	glucosa <sup>1</sup> (mM)	palmitato <sup>1</sup> (mM)	PDHa (% de PDH total)	PDH-Quinasa (k min <sup>-1</sup> )
DC	5,5	0,4	52,0 ± 4,3	1,5 ± 0,13
DRS	8,5	1	15,0 ± 5,1 *	2,8 ± 0,3 *

1- concentración inicial de glucosa y palmitato en el medio de perfusión.

PDHa (forma activa del complejo PDH, expresada como porcentaje de la actividad total PDH)

Los corazones fueron perfundidos durante 5 minutos en un sistema no recirculante (lavado del órgano). Luego fueron perfundidos durante 30 minutos en un sistema recirculante con buffer Krebs Henseleit bicarbonato pH 7,4, Ca<sup>++</sup> 2,5 mM, conteniendo glucosa y palmitato como se indica en la tabla. (Ver detalles en el ítem Metodología).

La actividad de la PDH-Quinasa (Kmin<sup>-1</sup>), fue determinada por inhibición de la actividad del complejo PDH con ATP en función del tiempo.

Los valores son expresados como media ± SEM. Al menos 4 animales fueron utilizados en cada grupo experimental.

\* DRS vs DC, p<0,05.

## 2- Una menor utilización del pool de triglicéridos endógenos

La velocidad de captación de los ácidos grasos por el músculo cardíaco depende de la concentración plasmática de los mismos ("in vivo") o de los niveles presentes en el medio de perfusión ("in vitro").

En los animales alimentados con DRS hemos demostrado previamente un incremento en los niveles plasmáticos de ácidos grasos libres, consecuente a una acelerada lipólisis del tejido adiposo (20). A nivel del músculo cardíaco, el camino metabólico predominante de estos ácidos grasos podría ser la oxidación.

Cuando el aporte y oxidación de los ácidos grasos está incrementado, se inhibe la utilización de la glucosa exógena y del depósito intracelular de glucógeno. Esta inhibición ocurre a diferentes niveles entre los que podemos mencionar la captación, glicólisis (menor actividad enzimática Fosfofructoquinasa-I) (107) y la oxidación (menor actividad enzimática Piruvato Dehidrogenasa) de la glucosa (61) así como la degradación del glucógeno (incremento de la actividad enzimática Glucógeno fosforilasa) (108).

La disminuída velocidad de captación de la glucosa observada en los corazones de los animales del grupo DRS, asociada a una incrementada liberación de lactato y piruvato y una disminuída actividad del complejo PDH en su forma activa, son concordantes con los resultados obtenidos por Randle y col.(96) en animales diabéticos, y nos sugieren que las alteraciones se producen no sólo a nivel de la vía no oxidativa de la glucosa sino también afectando la oxidación del piruvato.

La incrementada actividad de la enzima PDH-Quinasa observada en el lote DRS parece ser la causa principal de la baja actividad PDHa, que conduciría a una menor oxidación de la glucosa. Trabajos de Garland y col.(109) demostraron que la adición de ácidos grasos o cuerpos cetónicos al medio de perfusión afectan preferentemente la oxidación del piruvato. Más aún en corazones diabéticos perfundidos en presencia de trabajo muscular externo Wall y col.(110), demostraron que la adición de palmitato al medio de perfusión inhibe casi completamente la vía oxidativa de la glucosa.

Como era previsible, en presencia de concentraciones de ácidos grasos capaces de mantener la energía necesaria para el funcionamiento del músculo cardíaco (ATP), el balance total del contenido de glucógeno en las ratas normales es semejante a la del animal "in vivo". Los mecanismos involucrados en este proceso podrían estar relacionados con : 1- una menor glucógenolisis, 2- una mayor glucogenogénesis y 3- un efecto combinado de ambas vías metabólicas. Al respecto, estudios de Russel y col.(111) observaron que la adición al medio de perfusión de acetoacetato induce una mayor incorporación de  $^{14}\text{C}$ -glucosa a glucógeno, permaneciendo invariable el depósito final de glucógeno, lo que sugiere un turnover acelerado del mismo. A diferencia de lo que sucede en los animales controles, un balance neto de glucógeno que no alcanza los valores "in vivo" se observa al final de la perfusión en los corazones de ratas con DRS, aún en presencia de cantidades adecuadas de sustratos metabólicos exógenos similares a los observados en el plasma del animal "in vivo".

Por otra parte debemos recordar que en el lote DRS, se observa un mayor contenido de citrato, como consecuencia posiblemente de la oxidación de los ácidos grasos. Esto conduciría a una inhibición de la actividad enzimática Fosfofructoquinasa-I, lo cual a su turno contribuiría al aumento de los niveles de glucosa-6-fosfato observado en estos corazones. Los corazones perfundidos de animales controles o diabéticos en presencia de glucosa utilizan, ácidos grasos (provenientes de los triglicéridos endógenos) a diferente velocidad de lipólisis (mayor en los diabéticos). Más aún, cuando el palmitato se encuentra presente en concentraciones semejantes a las del plasma del animal "in vivo", se inhibe en ambos grupos experimentales la lipólisis endógena (99). Nuestros resultados en los corazones de animales alimentados con DC y DRS concuerdan con los mostrados por Murthy y col.(99).

La inhibición de la lipólisis de los triglicéridos endógenos inducida por la captación y utilización de los ácidos grasos exógenos es considerada como la consecuencia del feed-back negativo de los ácidos grasos y sus derivados acilCoA sobre la enzima Triglicérido lipasa . Más aún bajo estas condiciones experimentales, Severson y col.(112), demuestran una estimulación de la síntesis

de triglicéridos, posiblemente a través de la estimulación de la enzima fosforilasa del ácido fosfatídico .

Estudios de Rösen y col.(113) en ratas obesas insulino resistentes de la cepa Zucker, observaron una velocidad de lipólisis acelerada en corazones aislados perfundidos. Sin embargo, en estos estudios, el medio de perfusión contenía glucosa como único sustrato exógeno. Al respecto, trabajos de Paulson y Crass(114) sostienen que la mayor lipólisis observada en el corazón diabético, aislado perfundido con glucosa como único sustrato exógeno, es posiblemente el resultado de la remoción de la inhibición de la actividad Triglicérido lipasa, por la ausencia de ácidos grasos exógenos, junto con un incremento del contenido de triglicéridos endógenos, condiciones que no reflejarían la situación metabólica del animal "in vivo".

Finalmente, el metabolismo de los carbohidratos y los lípidos en el músculo cardíaco juegan un rol muy importante en la utilización de la glucosa. Sin embargo, este aspecto ha sido poco analizado en el corazón de los animales alimentados por tiempo prolongado con DRS, un modelo de dislipemia, alterada homeostasis de la glucosa e insulino resistencia.

Los resultados observados en este capítulo, aportan nuevos datos sobre los caminos metabólicos de la glucosa en este tejido y la utilización lipídica en el músculo cardíaco perfundido en presencia de sustratos metabólicos semejantes a los observadas en el animal "in vivo".

A los efectos de profundizar sobre los posibles mecanismos involucrados en estos hallazgos, en el siguiente capítulo analizamos la captación y vías metabólicas de la glucosa en presencia de glucosa como único sustrato.