

EFECTOS DE SUSTRATOS COMPETITIVOS Y DE LA INSULINA SOBRE LA CAPTACION Y EL DESTINO METABOLICO DE LA GLUCOSA EN CORAZON PERFUNDIDO DE RATAS DISLIPEMICAS

ADRIANA CHICCO, MONICA MONTES, MARIA E. D'ALESSANDRO, DARIO PIGHIN, YOLANDA B. LOMBARDO

*Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas,
Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe*

Resumen La utilización de sustratos energéticos por el músculo cardíaco depende no sólo de la disponibilidad de los mismos sino del entorno metabólico y hormonal. En el presente trabajo nos propusimos analizar la captación y el destino metabólico de la glucosa en los corazones perfundidos de ratas en un modelo experimental de hipertrigliceridemia, elevados niveles de ácidos grasos circulantes y resistencia insulínica global. Los corazones de ratas alimentadas durante 15 semanas con una dieta rica en sacarosa (DRS) (63% p/p) fueron perfundidos durante 30 min con un medio adicionado de glucosa y ácido palmítico en concentraciones semejantes a las del entorno de los animales *in vivo*, en presencia o ausencia de insulina. Los resultados muestran: i) Una alterada captación y reducida utilización de la glucosa, ii) Una menor oxidación de la glucosa (estimada como la actividad del complejo PDH) principalmente debido a mayor actividad enzimática PDH quinasa y menor actividad del complejo PDH, iii) La adición de insulina *in vitro* incrementa la captación sin lograr normalizarla, pero no muestra un efecto significativo sobre la oxidación de la glucosa durante el período de perfusión. Estos resultados nos señalan que en los corazones de ratas alimentadas con DRS perfundidos con ácidos grasos y glucosa a niveles semejantes a los del plasma del animal *in vivo*, al menos dos mecanismos podrían contribuir al alterado metabolismo de la glucosa: 1) una menor captación y utilización de la glucosa a nivel basal y frente al estímulo de la insulina y 2) una incrementada disponibilidad y oxidación de lípidos (menor actividad PDHc y mayor actividad PDH quinasa) que a su turno disminuirían la captación de la glucosa y su utilización. Finalmente cabe señalar que este modelo animal experimental inducido nutricionalmente podría ser de gran utilidad para el estudio de algunos mecanismos fisiopatológicos involucrados en lesiones cardíacas tales como las observadas en individuos dislipémicos y en diabetes mellitus no insulino dependiente.

Abstract *Effects of competitive substrates and of insulin on glucose uptake and utilization in isolated perfused hearts of dyslipemic rats.* Rats chronically fed (15 weeks) a sucrose-rich diet (SRD) developed hypertriglyceridemia (hyperTg), increased plasma free fatty acids (FFA), impaired glucose homeostasis and insulin insensitivity. An increase of Tg and glycogen (Gly) in heart muscle was also observed. HyperTg with altered glucose metabolism could have profound effects on myocardial glucose utilization. To test this hypothesis male Wistar rats were fed a semi-synthetic SRD (w/w: 62.5% sucrose, 8% corn-oil, 17% protein), and the control group (CD) received the same semi-synthetic diet, except that sucrose was replaced with starch for 90 days. At that time, the hearts from these animals were isolated and perfused for 30 min in the presence or absence of insulin (30 mU/ml). Levels of the exogenous substrates were similar to those found in the plasma of the animal *in vivo* in both dietary groups (glucose 8.5 mM, palmitate 0.8 mM in SRD and glucose 5-5 mM, palmitate 0.3 mM in CD). In the absence of insulin glucose uptake was reduced (40%) and lactate release was increased (50%) in SRD hearts. Glucose oxidation was depressed mainly due to both, an increase of PDH kinase and a decrease of 60% of PDHa (active form of PDHc). Insulin in the perfusion medium improved only glucose uptake. The results suggest that at least two different mechanisms might contribute to insulin resistance and to impaired glucose metabolism in the perfused hearts of dyslipemic SRD fed rats: 1) reduced basal and insulin-stimulated glucose uptake and its utilization and 2) increased availability and oxidation of lipids (low PDHa and PDH kinase activities), which in turn decreased glucose uptake and utilization. Thus, this experimental model may be useful to study how impaired glucose homeostasis, increased plasma FFA and hyperTg could contribute to heart tissue malfunction.

Key words: sucrose-rich diet, isolated rat heart, hypertriglyceridemia, insulin resistance, glucose uptake

La utilización de sustratos energéticos por el músculo cardíaco está estrechamente controlada por la disponibilidad de los mismos, la presencia de oxígeno, el trabajo impuesto al corazón y el entorno hormonal. Bajo condiciones normales la oxidación de los ácidos grasos es la mayor fuente de energía del miocardio. La glucosa juega también un rol importante en el metabolismo energético del corazón, proveyendo energía (ATP) a partir de la glicólisis y la oxidación en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos. La captación y la utilización de la glucosa son reguladas por la insulina y por la presencia de sustratos competitivos^{1,2}. La hormona *in vitro* incrementa la captación de glucosa y la liberación de lactato en corazones perfundidos de ratas ayunadas o diabéticas³. Trabajos de Randle y col.⁴ en corazones perfundidos de ratas controles y diabéticas demostraron una estrecha relación entre el catabolismo de los ácidos grasos y la glucosa. Al respecto, se ha descrito en corazón perfundido de ratas que la adición de niveles elevados de ácidos grasos o cuerpos cetónicos al medio de perfusión interfieren en la velocidad de glicólisis y en la oxidación de la glucosa⁴.

Trabajos previos de nuestro grupo y otros investigadores han demostrado que la variación en el porcentaje y tipo de carbohidratos en la dieta conduce a alteraciones del metabolismo lipídico y glucídico en animales de experimentación y en el hombre⁵⁻¹⁰. Al respecto, la administración a ratas machos normales de una dieta rica en sacarosa (63% p/p) (DRS) durante un período prolongado (15 semanas) induce un incremento en los niveles plasmáticos de triglicéridos y ácidos grasos libres, asociado a normoinsulinemia, moderada hiperglucemia y resistencia insulínica^{11,12}. En la actualidad se considera a la hipertrigliceridemia como una causa asociada o indirecta de enfermedad coronaria operando a través de uno o más de los factores de riesgo conocidos. Más aún Fontbonne y col.¹³ han demostrado que la hipertrigliceridemia es un factor de predicción de mortalidad por enfermedad cardiovascular en individuos con alterada tolerancia a la glucosa o con diabetes mellitus no insulino dependiente. Así, los elevados niveles de triglicéridos y ácidos grasos libres plasmáticos e hiperglucemia asociados a una ingesta rica en sacarosa podrían jugar un rol importante en la provisión y utilización de sustratos energéticos por el músculo cardíaco. Al presente este aspecto ha sido sólo parcialmente estudiado en el modelo nutricional de dislipemia y resistencia insulínica anteriormente descrito. Al respecto, trabajos de Chicco y col.¹⁴ demostraron que las alteraciones previamente mencionadas se acompañan, a nivel del músculo cardíaco *in vivo*, de una disminuida actividad del complejo enzimático Piruvato dehidrogenasa (PDHc), mayor contenido tisular de triglicéridos, citrato, glucosa-6-fosfato, glucógeno y de la relación acetyl-CoA/CoASH. Estos hallazgos nos sugieren una bifurcación del combustible energético y

disminución en la utilización de la glucosa en el músculo cardíaco de ratas alimentadas crónicamente con una dieta rica en sacarosa.

Para testear esta hipótesis nos propusimos estudiar bajo condiciones bien estandarizadas en corazón perfundido aislado: i) La captación y el destino metabólico de la glucosa y las actividades PDHc y PDH quinasa cuando niveles semejantes de glucosa y ácidos grasos plasmáticos a los obtenidos en el animal *in vivo* son utilizados como sustratos exógenos, ii) El efecto de la adición de insulina, al medio de perfusión, sobre la posible reversión de las anomalías bioquímicas observadas en el corazón del animal *in vivo*.

Materiales y métodos

Animales y dietas

Se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar de aproximadamente 180-200 gramos de peso inicial, las cuales luego de una semana de adaptación fueron divididas al azar en dos grupos: experimental y control. El grupo experimental recibió una dieta semisintética rica en sacarosa (DRS), conteniendo por peso (g/100 g): sacarosa 63%, caseína libre de vitaminas 17%, aceite de maíz 5%, celulosa 10%, mezcla de sales (AIN-93M) 3.5%, mezcla de vitaminas (AIN-93M) 1%, clorhidrato de colina 0.2% y metionina 0.3%. El grupo control (DC) recibió la misma dieta que el grupo DRS con la excepción que la fuente de hidratos de carbono, sacarosa, fue reemplazada por almidón de maíz. Las dietas fueron administradas *ad libitum* durante 15 semanas, realizándose el control de peso semanal durante todo el período experimental. En experimentos en paralelo utilizando 10 animales en cada grupo dietario se constató la ingesta calórica y la ganancia de peso tres veces por semana. Detalles de esta metodología han sido descritos previamente^{14,15}. Finalizado el período experimental, la comida fue removida a las 7.00 hs y todas las experiencias fueron llevadas a cabo entre las 8.00 y 10.00 hs.

Técnica de perfusión

Los corazones fueron perfundidos *in vitro* de acuerdo a la técnica de corazón aislado perfundido descrito por Langhendorff, utilizada en trabajos previos⁸ y extendida al modo recirculante. El medio de perfusión fue el buffer Krebs-Henseleit bicarbonato pH = 7.4 (90 ml) adicionado de 2.5 mmol/L de Ca⁺⁺, glucosa y ácidos grasos (DC = 5.5 mmol/L y 0.325 mmol/L, y DRS = 8.5 mmol/L y 0.8 mmol/L respectivamente) de acuerdo al diseño experimental de la Fig. 1. Los ácidos grasos (palmítico) se unieron a la albúmina sérica bovina (fracción V, libre de ácidos grasos) (3%) previo a su adición al medio de perfusión. Tanto la velocidad del flujo de salida (10-11 mL/min) y la frecuencia de contracción de los corazones (220-260 contracciones/min) se mantuvieron constante a lo largo de toda la perfusión. A partir de la perfusión recirculante alícuotas de perfusado (1 mL, de los 90 mL del volumen total) fueron tomadas al tiempo 0, 5 y 30 min para el análisis de glucosa y lactato. Al finalizar el período de 5 minutos de perfusión no recirculante (lavado del órgano) un grupo de corazones de ratas con DC y DRS fueron congelados rápidamente a la temperatura del nitrógeno líquido. El resto de los corazones de ambos grupos fue cambiado al sistema de perfusión recirculante y perfundidos durante 30 min. Al cabo del mismo los corazones fueron rápidamente

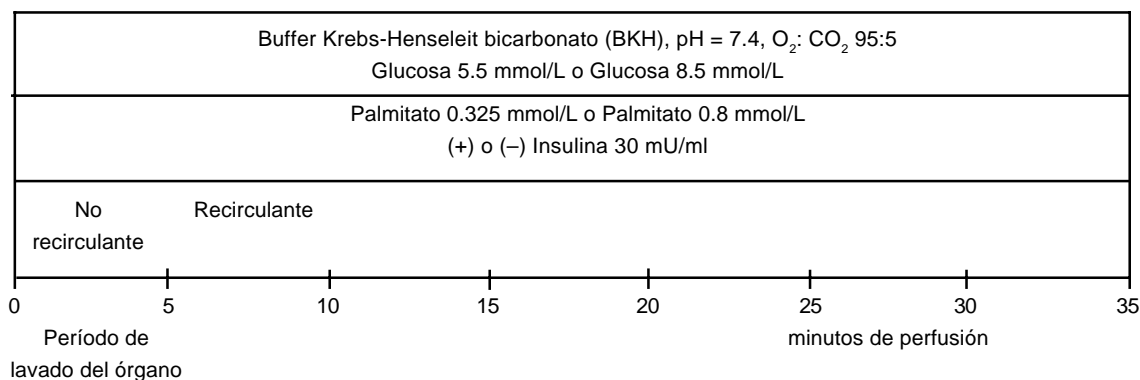


Fig. 1.— Diseño experimental

congelados a la temperatura del nitrógeno líquido y conservados a esta temperatura hasta su uso. La relación peso tejido húmedo/tejido seco fue obtenida en cada experimento. Se utilizaron alícuotas de homogeneizados de los tejidos congelados y pulverizados para la determinación del contenido de acetil-CoA, CoASH, ATP, ADP, AMP, creatina-fosfato, creatina y citrato, por los métodos enzimáticos descriptos por Bergmeyer¹⁶. La carga energética fue estimada como $\frac{1}{2} \{ [ADP + 2 (ATP)] / (AMP + ADP + ATP) \}$ de acuerdo a Atkinson¹⁷. Se determinó el contenido de triglicéridos¹⁸, glucógeno¹⁹ y proteínas²⁰. Las concentraciones de los metabolitos analizados fueron expresadas por gramo de tejido seco, corrigiendo de esta manera diferencias en el contenido de agua tisular. Mayores detalles de las metodologías utilizadas fueron descriptas previamente¹⁴.

Determinación de las actividades enzimáticas del complejo Piruvato Dehidrogenasa (PDHc) y PDH quinasa

La extracción del complejo enzimático PDH se llevó a cabo en homogeneizados de tejido congelado como se describió previamente¹⁵. La actividad del complejo PDHc se determinó espectrofotométricamente a 30 °C midiendo la reducción del NAD⁺²¹. La actividad PDH fue expresada como nmoles de NADH formado por minuto y por gr de tejido o por mg de proteína. El aislamiento y determinación de la actividad PDH quinasa se realizó como se describió previamente¹⁵. La actividad PDH quinasa se calculó a partir de la constante de la velocidad aparente de primer orden para la inactivación de la enzima dependiente del ATP en función del tiempo¹⁵.

Métodos analíticos

Las ratas fueron anestesiadas intraperitonealmente con pentobarbital (60 mg/kg peso corporal). Las muestras de sangre obtenidas a partir de la vena yugular fueron centrifugadas inmediatamente a 4 °C y el suero utilizado de inmediato o conservado a -20 °C hasta su ensayo. El contenido de triglicéridos cardíacos y plasmáticos¹⁷, así como los niveles de ácidos grasos libres (AGNE)²² y glucosa¹⁵ fueron determinados por métodos espectrofotométricos convencionales. La insulina inmunorreactiva (IRI) se analizó por el método de Herbert²³. El ensayo de IRI fue calibrado con un estándar de insulina de rata (Novo Denmark). Los niveles de lactato y glucosa en el medio de perfusión recirculante a los distintos tiempos fueron analizados fluorométricamente¹⁶.

Análisis estadísticos

Los resultados fueron expresados como media \pm SEM. Diferencias estadísticas entre los grupos experimental y control fueron analizadas por ANOVA con dieta y tratamiento como los efectos principales y posterior test de Scheffe²⁴, considerándose estadísticamente significativas las diferencias con $p < 0.05$.

Reactivos

La insulina bovina purificada fue provista gentilmente por Mary Root de Lilly Co, Indianápolis IN, USA. Enzimas, sustratos y coenzimas fueron provistas por Sigma Chemical Company, St. Louis, MO o Boehring Manneheim Biochemical Indianápolis, IN, USA. El resto de los reactivos utilizados fueron de grado reactivo.

Resultados

La ganancia de peso y la ingesta calórica fue semejante en ambos grupos de animales durante todo el período experimental. Los valores, expresados como media \pm SEM ($n = 10$), fueron los siguientes: ganancia de peso (g/día): 2.04 ± 0.2 en DRS vs 2.03 ± 0.3 en DC e ingesta calórica (Kjoule/día): 288 ± 19 en los alimentados con DRS vs 290 ± 21 en los alimentados con DC. Al finalizar el período de ingesta los niveles plasmáticos de triglicéridos, ácidos grasos libres (AGNE) y glucosa de las ratas alimentadas con DRS fueron significativamente mayores que sus respectivos controles etarios alimentados con DC, (media \pm SEM, $n = 6$): triglicéridos (mmol/L): 1.75 ± 0.10 en DRS vs 0.53 ± 0.05 en DC ($p < 0.01$); AGNE (μ mol/L): 795 ± 40 en DRS vs 310 ± 19 en DC ($p < 0.01$); glucosa (mmol/L): 8.27 ± 0.1 en DRS vs 5.92 ± 0.09 en DC ($p < 0.01$). Por otra parte, los niveles de insulina plasmática fueron semejantes en ambos grupos de animales (μ U/ml) 58 ± 4.9 en DRS vs 55 ± 5.0 en DC.

De igual forma y ratificando lo observado previamente por nuestro grupo¹⁴, el contenido de triglicéridos y

TABLA 1.– Velocidad de captación de glucosa y liberación de lactato en corazones perfundidos de ratas alimentadas con dieta control (DC) o dieta rica en sacarosa (DRS)

Dieta	Adición al medio de perfusión Insulina (30 mU/mL)	Captación de glucosa*	Liberación de lactato
		(μ mol/g tej. seco. 30 min)	
DC	–	133.0 ± 5.3 ¹	72.0 ± 3.1
DC	+	203.4 ± 8.9	101.2 ± 8.1
DRS	–	91.5 ± 9.3	106.6 ± 5.9
DRS	+	139.0 ± 9.9	150.0 ± 8.8
ANOVA 2x2**			
Dieta		S	S
Insulina		S	S
Dieta x Insulina		NS	NS
RMS		425	233

Los corazones fueron perfundidos con buffer Krebs-Henseleit bicarbonato (pH = 7.4) conteniendo glucosa y ácidos grasos como se detalló en la Fig. 1. Luego de 5 min de perfusión no recirculante, los corazones fueron conectados a un sistema de perfusión recirculante y perfundidos durante 30 min en ausencia o presencia de insulina (30 mU/ml). La perfusión se llevó a cabo como se describió en Materiales y métodos. Al finalizar la perfusión, los corazones fueron congelados inmediatamente a la temperatura del nitrógeno líquido y guardados a esa temperatura hasta la realización de los ensayos correspondientes. * La captación de glucosa (medida como la desaparición de glucosa del medio de perfusión) y el lactato liberado fueron calculados como las diferencias entre los niveles de cada metabolito en el perfusado al inicio y a los 30 min de la perfusión recirculante. ¹ Los valores se expresan como media ± SEM. Seis animales fueron usados en cada grupo experimental. ** Análisis de Variancia: S: Efecto significativo (p < 0.05) o NS no significativo.

TABLA 2.– Niveles de metabolitos y actividades enzimáticas piruvato dehidrogenasa (PDH) y PDH quinasa en corazón aislado perfundido de animales alimentados con dieta control (DC) o dieta rica en sacarosa (DRS)

Dieta	Adición al medio de perfusión Insulina (30 mU/mL)	PDHa* (% de PDHt)	PDH quinasa** (K min ⁻¹)	Relación Acetil CoA/CoASH
DC	–	52.0 ± 2.3 ¹	1.20 ± 0.17	0.25 ± 0.02 ¹
DC	+	55.0 ± 2.2	1.02 ± 0.10	0.22 ± 0.01
DRS	–	23.8 ± 2.0	2.85 ± 0.23	0.79 ± 0.10
DRS	+	29.2 ± 2.7	2.52 ± 0.21	0.70 ± 0.07
ANOVA 2x2**				
Dieta		S	S	S
Insulina		S	S	S
Dieta x Insulina		NS	NS	NS
RMS		24	0.16	0.02

Los corazones fueron perfundidos con buffer Krebs-Henseleit bicarbonato (pH = 7.4) conteniendo glucosa y ácidos grasos como se detalló en la Fig. 1. Luego de 5 min de perfusión no recirculante, los corazones fueron conectados a un sistema recirculante y perfundidos durante 30 min en presencia o ausencia de insulina (30 mU/ml). La perfusión se llevó a cabo como se describió en Materiales y métodos. Al final del período de perfusión los corazones fueron congelados inmediatamente a la temperatura del nitrógeno líquido y guardados a esa temperatura hasta la realización de los ensayos correspondientes. * PDHa: Se expresa como porcentaje de la actividad total del complejo PDH (actividad basal x 100/actividad total). **La actividad PDH quinasa fue determinada por la inhibición de la actividad del complejo PDH en presencia de ATP y en función del tiempo. K. min⁻¹ fue calculada a partir de la constante de la cinética de velocidad de primer orden. ¹ Los valores se expresan como media ± SEM. Seis animales fueron usados en cada grupo experimental. ** Análisis de Variancia: S: Efecto significativo (p < 0.05) o NS no significativo.

glucógeno fue significativamente mayor en los corazones no perfundidos de los animales alimentados con DRS respecto a sus controles etarios. Los resultados expresados como media \pm SEM, (n = 6): triglicéridos ($\mu\text{mol/g}$ tejido seco) 46.7 ± 2.8 en DRS vs 24.9 ± 3.4 en DC ($p < 0.01$); y glucógeno (μmol glucosa-glucógeno/g tejido seco): 113.1 ± 4.3 en DRS vs 81.0 ± 2.0 en DC ($p < 0.01$). Estos resultados se acompañaron de un significativo incremento en la actividad enzimática PDH quinasa (67%) y un marcado descenso en la forma activa del complejo enzimático piruvato dehidrogenasa (70%) comparados con sus respectivos controles etarios. No se observaron cambios en la actividad total del complejo (PDHt) en ambos lotes expresada en base a la actividad de la enzima citrato sintasa o relativo a mg de proteína (datos no mostrados).

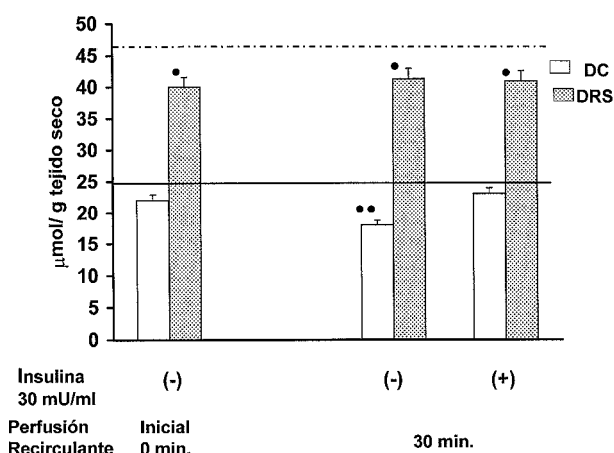
La Tabla 1 muestra la captación de glucosa y la liberación de lactato en los corazones de ratas alimentadas con DC o DRS, perfundidos en presencia de glucosa y ácidos grasos en concentraciones semejantes a las observadas a nivel plasmático *in vivo* en cada lote experimental y en presencia o ausencia de insulina. En ausencia de la hormona la cantidad acumulada de glucosa captada durante los 30 min de perfusión es significativamente menor y la liberación de lactato significativamente mayor en el lote DRS a lo constatado en el lote DC. La presencia de insulina en el medio de perfusión incrementa porcentualmente la captación de la glucosa en los corazones de las ratas DRS (53%) en forma similar a la observada en las ratas con DC (55%). Sin embargo en valor absoluto la captación es significativamente menor a la alcanzada en el lote control (Tabla 1). La liberación de lactato al medio de perfusión es similar en términos porcentuales en ambos grupos experimentales.

El contenido de glucógeno decrece en los corazones de los dos grupos dietarios durante los 5 minutos de perfusión no recirculante (lavado del órgano) cuando la glucosa 5.5 u 8.5 mmol/L es el único sustrato exógeno (media \pm SEM, n = 6) $\mu\text{mol/g}$ tejido seco DRS 82.9 ± 6.4 y DC 71.9 ± 5.4 . Esto confirma la degradación del glucógeno cuando los corazones son perfundidos con glucosa como único sustrato. El contenido de glucógeno en ambos grupos no experimenta modificaciones importantes al final de la perfusión recirculante (30 min) cuando los ácidos grasos exógenos fueron adicionados al medio de perfusión en concentraciones semejantes a las halladas en el animal *in vivo* (80.7 ± 5.3 en DRS y 72.1 ± 4.9 en DC). La adición de insulina no modifica el contenido de glucógeno en el grupo DRS. En el grupo DC la masa de glucógeno incrementa sólo ligeramente sin alcanzar diferencias significativas respecto a lo observado en ausencia de la hormona (85.0 ± 6.7 vs 72.1 ± 4.9).

La disminuida captación de la glucosa observada en los corazones de animales alimentados con DRS se

acompaña de una menor oxidación (estimada a partir de la actividad PDH). La menor actividad enzimática PDH (forma activa del complejo PDHc) se correlaciona con un incremento en la relación acetil-CoA/CoASH y con una mayor actividad PDH quinasa (Tabla 2). La adición de insulina al medio de perfusión no muestra cambios significativos en estos parámetros para ninguno de los grupos (Tabla 2).

Los niveles de ATP, ADP y AMP fueron semejantes en ambos lotes experimentales y la carga energética (CE) (de acuerdo a Atkinson¹⁶) permaneció dentro de los niveles considerados normales. Los valores expresados como media \pm SEM (n = 6): CE: 0.90 ± 0.02 en DRS vs 0.88 ± 0.03 en DC. Los niveles de creatina (Cr) y creatina fosfato (CrP) y la relación CrP/Cr no muestran diferencias significativas al final de la perfusión en ambos lotes de animales. La relación CrP/Cr expresada como media \pm SEM (n = 6) fue: 1.23 ± 0.09 en DRS vs 1.24 ± 0.08 en DC. La presencia de insulina en el medio de perfusión



Los corazones fueron perfundidos con buffer Krebs-Henseleit bicarbonato (pH = 7.4) conteniendo glucosa y ácidos grasos como se detalló en la Fig. 1. Luego de 5 min de perfusión no recirculante, los corazones fueron conectados a un sistema recirculante y perfundidos durante 30 min en presencia o ausencia de insulina (30 mU/mL). La perfusión se llevó a cabo como se describió en Materiales y Métodos. Al final del período de perfusión los corazones fueron congelados inmediatamente a la temperatura del nitrógeno líquido y conservados a esa temperatura hasta la realización de los ensayos correspondientes. Tiempo inicial (0 min) representa el contenido de triglicérido en los corazones al inicio de la perfusión recirculante. Los valores se expresan como media \pm SEM. Seis animales fueron usados en cada grupo experimental.

— Niveles de triglicéridos en los corazones de ratas alimentadas con DC sin perfundir.

-.- Niveles de triglicéridos en los corazones de ratas alimentadas con DRS sin perfundir.

1: $p < 0.05$ DRS vs DC a tiempo inicial (0 min) y a los 30 min en presencia o ausencia de insulina.

11: $p < 0.05$ DC 30 min perfusión recirculante (- Insulina) vs DC sin perfundir y DC período inicial.

Fig. 2.— Contenido de triglicéridos en corazones perfundidos de ratas alimentadas con dieta control (DC) o dieta rica en sacarosa (DRS)

no mostró diferencias significativas en ambas relaciones, entre los lotes DC y DRS (datos no presentados).

La administración de la DRS por un período de 15 semanas, conduce a un acúmulo de triglicéridos en el músculo cardíaco. En la Fig. 2 se observa en el lote DRS a los 30 minutos de perfusión en presencia de un medio conteniendo concentraciones de glucosa y ácidos grasos exógenos semejantes a las observadas en el animal *in vivo*, que los niveles de triglicéridos del músculo cardíaco no muestran cambios significativos respecto al inicio de la perfusión recirculante. En presencia de insulina el contenido de triglicéridos en la DRS es similar al observado al inicio de la perfusión recirculante (Fig. 2). En los corazones de las ratas alimentadas con DC los niveles de triglicéridos endógenos disminuyen significativamente al finalizar el período de perfusión en ausencia de la hormona. Sin embargo cuando la insulina es adicionada al medio, el contenido de triglicéridos incrementa significativamente alcanzando niveles semejantes a los encontrados en el animal *in vivo*.

Discusión

La utilización de sustratos energéticos por el músculo cardíaco depende no sólo de la disponibilidad de los mismos sino del entorno hormonal. En este estudio utilizando la técnica de corazón perfundido *in vitro* investigamos en ratas alimentadas con dieta rica en sacarosa (DRS) el efecto de sustratos exógenos competitivos (glucosa y ácidos grasos) en presencia o ausencia de insulina sobre la captación y utilización de la glucosa en el músculo cardíaco. Los resultados muestran: i) Una alterada captación y reducida utilización de la glucosa, ii) Una menor oxidación de la glucosa principalmente debido a mayor actividad enzimática PDH quinasa y menor actividad del complejo PDH, iii) La adición de insulina *in vitro* incrementa la captación sin lograr normalizarla, pero no muestra un efecto significativo sobre la oxidación de la glucosa durante el período de perfusión. Estos resultados sugieren que la resistencia insulínica global constatada en el animal *in vivo*¹² se encuentra también presente en el músculo cardíaco de la rata alimentada con DRS.

Bajo las condiciones experimentales utilizadas (sustratos exógenos semejantes a los del plasma del animal *in vivo*), la menor velocidad de captación de la glucosa y la incrementada liberación de lactato junto a un decrecimiento de la actividad del complejo PDH sugieren una bifurcación del combustible energético en el músculo cardíaco de las ratas alimentadas con DRS. El corazón de estos animales parece estar adaptado a una reducción en la utilización de la glucosa como fuente de ATP en favor de una mayor oxidación grasa. Un incremento en la oxidación de ácidos grasos favorece la relación acetil-CoA/CoASH y NADH/NAD⁺ mitocondrial, es-

timulando la actividad PDH quinasa e inhibiendo la actividad del complejo PDH y por ende el flujo de piruvato a acetil-CoA. El incremento de la relación acetil-CoA/CoASH y de la actividad PDH quinasa constatados tanto *in vivo*¹⁴ como en corazón perfundido *in vitro* de las ratas con DRS abonan esta hipótesis. Al respecto Wall y col.²⁵ demostraron una marcada inhibición de la oxidación de la glucosa en corazones de ratas diabéticas perfundidas en presencia de palmitato.

Los niveles de ácidos grasos en el medio de perfusión y el pool fácilmente metabolizable de triglicéridos endógenos constituyen una fuente energética importante del músculo cardíaco. En estudios previos constatamos una acentuada lipólisis del pool de triglicéridos endógenos en los corazones de ratas con DRS perfundidos en presencia de glucosa como único sustrato exógeno⁸. En el presente trabajo observamos que la adición de ácidos grasos a niveles semejantes al del entorno metabólico *in vivo* no modifica el contenido de los triglicéridos endógenos, lo que sugiere que el músculo cardíaco utilizaría principalmente los ácidos grasos presentes en el medio de perfusión o que las velocidades de hidrólisis y de síntesis de los triglicéridos son semejantes al menos durante los 30 minutos de perfusión. Estos resultados concuerdan con la inhibición de la lipólisis de los triglicéridos endógenos observada por Murthy y col.²⁶ y Paulson y col.²⁷ en corazones de ratas diabéticas perfundidas en situaciones experimentales semejantes. En estas condiciones la inhibición de la lipólisis de los triglicéridos endógenos podría ser la consecuencia de la inhibición producida por el incremento de los ácidos grasos y sus derivados acil-CoA sobre la actividad de la enzima triglicérido lipasa²⁸. Por otro lado, el contenido de triglicéridos de los corazones de ratas con DC perfundidos con niveles normales de ácidos grasos y glucosa desciende significativamente al final de la perfusión. Estos hallazgos concuerdan con los observados por Paulson y col.²⁷ bajo condiciones experimentales semejantes, sugiriendo que en presencia de niveles normales de glucosa y ácidos grasos exógenos la velocidad de lipólisis de los triglicéridos excedería la velocidad de síntesis.

En los corazones perfundidos de las ratas con DC, la adición de insulina al medio incrementó la captación de la glucosa y la liberación de lactato. El contenido de glucógeno al final de la perfusión fue ligeramente superior sin llegar a ser significativo al constatado en ausencia de la hormona. Al respecto Russell y col.²⁹ observaron recientemente en corazones de ratas normales perfundidos en presencia de cuerpos cetónicos una mayor incorporación de ¹⁴C-glucosa a glucógeno sin cambio significativo en la masa total de glucógeno. Esto último no se modifica por la adición de insulina al medio de perfusión. Los corazones de los animales alimentados con DRS son también sensibles a la insulina *in vitro*,

observándose un incremento en la captación de la glucosa y la liberación del lactato bajo la acción de la hormona. Sin embargo la captación de la glucosa en términos absolutos es significativamente menor que la constatada en los animales controles y el contenido final de glucógeno no se modificó. Recientemente Klimes y col.³⁰ demostraron una respuesta alterada de la enzima glucógeno sintasa al estímulo de la insulina *in vitro* en el músculo cardíaco de ratas alimentadas por un corto período de tiempo (3-4 semanas) con DRS. Al respecto hemos demostrado previamente^{11, 14} que la hipertrigliceridemia inducida por una DRS se acompaña de un entorno metabólico hormonal diferente en los animales que reciben la dieta durante un período prolongado de tiempo (15-30 semanas: moderada hiperglucemia y normoinsulinemia), comparados a los que la ingieren por un período menor (3-4 semanas: normoglucemia e hiperinsulinemia). Esto podría jugar un rol importante en la utilización del combustible energético por el miocardio. Así, por ejemplo, mientras elevados niveles de triglicéridos y citrato fueron constatados en el corazón en ambos períodos de tiempo de ingesta, los niveles de glucógeno incrementaron sólo cuando la dieta es administrada por 15-30 semanas. Carecemos al presente de publicaciones sobre la actividad glucógeno sintasa en los corazones de ratas alimentadas con DRS por largo tiempo.

La alterada captación de la glucosa aún en presencia de insulina en los animales con DRS podría también deberse a un defecto de los transportadores de glucosa y/o a su actividad. Más aún, un posible defecto en el acoplamiento insulina-receptor y la siguiente generación de señales intracelulares no debería ser descartado. Al respecto Kainulainen y col.³¹ demostraron en corazones de ratas diabéticas una menor captación de la glucosa a nivel de los transportadores de glucosa Glut1 y Glut4, y Garvey y col.³² observaron que la menor utilización de la glucosa en ratas diabéticas es el resultado de un menor transporte de glucosa, que puede ser revertido por el tratamiento con insulina.

Aunque la insulina incrementa la captación de la glucosa en los corazones de ratas alimentadas con DRS, la acción de la hormona no se refleja en cambios en la deteriorada oxidación de la misma, (las actividades PDH y PDH quinasa son semejantes en ausencia o presencia de la hormona). Esto junto a los incrementados niveles de acetil-CoA/CoASH y el contenido de triglicéridos que se mantiene constante al final de la perfusión, nos sugiere que el corazón sigue oxidando grasa en desmedro de la glucosa y que la menor oxidación de esta última podría constituir un importante defecto metabólico en el músculo cardíaco de las ratas alimentadas con DRS.

En resumen, los resultados del presente trabajo señalan que en los corazones de ratas alimentadas con DRS profundidos con ácidos grasos y glucosa a niveles

semejantes a los del plasma del animal *in vivo*, al menos dos mecanismos podrían contribuir al alterado metabolismo de la glucosa: 1) una menor captación y utilización de la glucosa a nivel basal y frente al estímulo de la insulina y 2) una incrementada disponibilidad y oxidación de lípidos (menor actividad PDHc y mayor actividad PDH quinasa) que a su turno disminuirían la captación de la glucosa y su utilización.

Si bien en la resistencia insulínica global constatada *in vivo* en este modelo de hipertrigliceridemia experimental¹², el músculo esquelético juega un rol primordial, los cambios en la utilización del combustible energético a nivel de músculo cardíaco también podrían generar efectos adversos a mediano o largo plazo. En particular una excesiva disponibilidad y utilización de ácidos grasos incrementa el contenido de acilderivados y de triglicéridos en el músculo cardíaco, y una alta concentración de estos metabolitos podrían potenciar y/o agravar procesos isquémicos³³. Finalmente cabe señalar que este modelo animal experimental inducido nutricionalmente podría ser de gran utilidad para el estudio de algunos mecanismos fisiopatológicos involucrados en lesiones cardíacas tales como los observados en individuos dislipémicos y en diabetes mellitus no insulino dependiente.

Agradecimientos: Este trabajo fue subvencionado por CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas), Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica SECYT-CONICET y por CAI+D (curso de Acción para la Investigación y Desarrollo) a través de los subsidios N° PIP 4129/96, PICT 05-921/97 y CAI+D 94/95 B011 UNL. Se agradece la colaboración técnica de las Bioquímicas Marta Fuentes y Alejandra Fortino.

Bibliografía

1. Taegtmeier H. Energy metabolism of the heart: from basic concepts to clinical applications. *Curr Probl Cardiol* 1994; 19: 57-116.
2. Sugden PH, Smith DM. The effects of insulin on glucose uptake and lactate release in perfused working rat heart preparations. *Biochem J* 1982; 206: 473-9.
3. Chain E, Mansford K, Opie L. Effects of insulin on the pattern of glucose metabolism in the perfused working and Langendorff heart of normal and insulin deficient rats. *Biochem J* 1969; 115: 537-46.
4. Randle PJ, Newsholme EA, Garland PB. Regulation of glucose uptake by muscle. Effects of fatty acids, ketone bodies, pyruvate and alloxan-diabetes and starvation on the uptake and metabolic fate of glucose in rat heart and diaphragm muscles. *Biochem J* 1964; 93: 652-65.
5. Vrana A, Kazdova L, Dobesova Z, et al. Triglyceridemia, glucoregulation and blood pressure in various rat strains. Effects of dietary carbohydrate. In Klimes I, Howard BV, Storlien LH, Sebokova E (eds). *Dietary Lipids and Insulin Action*. Annals of the New York Academic of Sciences, New York, 1993 p 57-68.
6. Rebello T, Hodges RE, Smith JL. Short-term effects of various sugars on antinatriuresis and blood pressure changes in normotensive young men. *Am J Clin Nutr* 1983; 38: 83-94.

7. Mancini M, Mattock M, Rabaya E, Chait A, Lewis B. Studies of the mechanism of carbohydrate induced lipemia in normal man. *Atherosclerosis* 1973; 17: 445-54.
8. Lombardo YB, Chicco A, Mocchiutti N, Rodi M, Nusimovich B, Gutman R. Effects of sucrose diet on insulin secretion *in vivo* and *in vitro*, and on triglyceride storage and mobilisation of the hearts of rats. *Horm Metab Res* 1983; 15: 69-76.
9. Bernal C, Gutman R, Lombardo YB. The time period on a sucrose-rich diet determines variable *in vitro* effects of insulin and fructose on rats liver triglyceride metabolism. *J Nutr Biochem* 1995; 6: 422-30.
10. Reaven GM, Risser TR, Chen YDI, Reaven P. Characterization of a model of dietary induced hypertriglyceridemia in young, non obese rats. *J Lipid Res* 1979; 20: 371-78.
11. Gutman R, Basilico MZ, Bernal C, Chicco A, Lombardo YB. Long-term hypertriglyceridemia and glucose intolerance in rats fed chronically an isocaloric sucrose-rich diet. *Metabolism* 1987; 36: 1013-20.
12. D'Alessandro ME, Chicco A, Karabatas L, Lombardo YB. Role of the skeletal muscle on the impaired insulin sensitivity in rats fed a sucrose-rich diet: effect of moderate levels of dietary fish oil. *J Nutr Biochem* 2000; 11: 273-80.
13. Fontbonne A, Eschwege E. Insulin-resistance, hypertriglyceridemia and cardiovascular risk: The Paris prospective study. *Diabetes Metab* 1991; 17: 93-5.
14. Chicco A, Soria A, Faintein-Day P, Gutman R, Lombardo YB. Multiphasic metabolic changes in the heart of rats fed a sucrose-rich diet. *Horm Metab Res* 1994; 26: 397-403.
15. Montes M, Chicco A, Lombardo YB. The effect of insulin on the uptake and metabolic fate of glucose in isolated perfused hearts of dyslipemic rats. *J Nutr Biochem* 2000; 11: 30-7.
16. Bergmeyer HU. Methods for determination of metabolites. In Bergmeyer, HU (ed). *Methods of Enzymatic Analysis*. 2nd ed. Academic Press, New York, 1974 p 1100-2110.
17. Atkinson DE. The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feed-back modifiers. *Biochemistry* 1968; 7: 4030-40.
18. Laurell S. A method for routine determination of plasma triglycerides. *Scan J Clin Lab Invest* 1966; 18: 668-72.
19. Huijing F. A rapid enzymatic method for glycogen estimation in very small tissue samples. *Clin Chem Acta* 1970; 33: 567-72.
20. Lowry OH, Rosebrough MJ, Farr AL, Randall RL. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.
21. Robertson JG, Barron LL, Olson MS. Effects of alfa-ketoisovalerate on bovine heart pyruvate dehydrogenase complex and pyruvate dehydrogenase kinase. *J Biol Chem* 1996; 261: 76-81.
22. Dumcombe WG. The colorimetric micro-determination of long-chain fatty acids. *Biochem J* 1963; 88: 7-10.
23. Herbert V, Lau KS, Gottlieb CH, Bleicher S. Coated charcoal immunoassay of insulin. *J Clin Endocr Metab* 1965; 25: 1375-84.
24. Snedecor GW, Cochran WG. In statistical methods applied to experimental in agriculture and biology. The Iowa State University Press. Ames IA, USA, 1967; p 339-59.
25. Wall S, Lopaschuck G. Glucose oxidation rates in fatty-acid perfused isolated working hearts from diabetic rats. *Biochim Biophys Acta* 1989; 1006: 97-103.
26. Murthy VK, Bauman MD, Shipp JC. Regulation of triacylglycerol lipolysis in the perfused hearts of normal and diabetic rats. *Diabetes* 1983; 32: 718-22.
27. Paulson D, Crass M. Endogenous triacylglycerol metabolism in diabetic heart. *Am J Physiol* 1982; 242: H1084-94.
28. Severson D, Hurley B. Regulation of heart triacylglycerol ester hydrolases by free fatty acids, fatty acil CoA and fatty acylcarnitines. *J Moll Cell Cardiol* 1982; 14: 467-74.
29. Russell RR, Cline GW, Guthrie PH, Goodwin GW, Shulman GI, Taegtmeier H. Regulation of exogenous and endogenous glucose metabolism by insulin and acetoacetate in the isolated working rat heart. *J Clin Invest* 1997; 100: 2892-9.
30. Klimes I, Sebokova E, Vrana A, Kazdova L. Raised dietary intake of n-3 polyunsaturated fatty acids in high sucrose-induce insulin resistance. In Klimes I, Howard BV, Storlien LH, Sebokova E (eds). *Dietary Lipids and Insulin Action*. Annals of the New York Academic of Sciences, New York, 1993 p 69-81.
31. Kainulanien H, Breiner M, Schurmann A, Marttinen A, Virjo A, Joost HG. *In vivo* glucose uptake and glucose transporter proteins glut 1 and glut 4 in heart of various types of skeletal muscle from streptozotocin diabetic rats. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1225: 275-82.
32. Garvey WT, Hardin D, Juhaszova M, Dominguez JH. Effects of diabetes on myocardial glucose transport system in rats: implications for diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol* 1993; 264: H837-44.
33. Hekimian G, Feuvray D. Reduction of ischemia-induced acyl-carnitine accumulation by TGDA and its influence on lactate dehydrogenase release in diabetic rat hearts. *Diabetes* 1986; 35: 906-10.

Medicine is not merely a science but an art. The character of the physician may act more powerfully than the drugs employed.

La medicina no es sólo una ciencia sino también un arte. El carácter del médico puede actuar con más fuerza que las drogas que usa.

Philippus Aureolus Paracelsus (c 1493-1541)

Archidoxies, 1525