



**Casa abierta al tiempo**  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDADES IZTAPALAPA-XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

EFFECTO DE LA HIPERTRIGLICERIDEMIA EXPERIMENTAL EN EL  
METABOLISMO ENERGÉTICO DEL CORAZÓN AISLADO DE RATA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
PRESENTA:

KARLA GUADALUPE CARVAJAL AGUILERA.

DIRECTOR DE TESIS: DR. RAFAEL MORENO SÁNCHEZ.

ASESORES:

DRA. GUADALUPE BAÑOS DE MAC CARTHY

DR. EDMUNDO CHÁVEZ COSSÍO

DR. RUBÉN ROMÁN RAMOS

---

El doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93.

---

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó

Karla Guadalupe Carvajal Aguilera

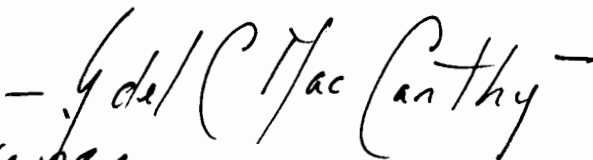
El día 11 de octubre del año del 2002

Comité Tutorial:

Tutor: Rafael Moreno Sánchez.



Asesor: Dra. Guadalupe Baños de Mac Carthy.



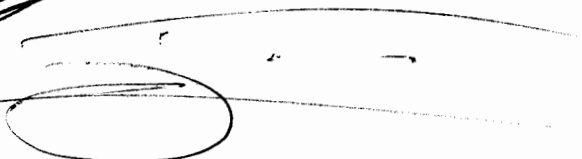
Asesor: Dr. Edmundo Chávez Cossío.



Asesor: Dr. Rubén Román Ramos.



Sinodal: Dr. José Domingo Méndez Francisco.



---

A Tufi, por la compañía de tu imborrable recuerdo.

---

## RESUMEN.

En este trabajo se evaluaron las vías metabólicas responsables de la producción de ATP en corazones de ratas hipertriglicéridémicas (HTG). En un sistema de corazón aislado de acuerdo a la técnica de Langendorff, se determinó el desempeño mecánico así como el consumo de oxígeno y la frecuencia cardiaca perfundiendo con diferentes sustratos oxidables. Ratas de igual peso y edad fueron utilizadas como controles. Los corazones de ratas HTG tuvieron un menor desempeño mecánico y una discreta disminución en el consumo de oxígeno cuando fueron perfundidos con glucosa, piruvato o lactato. No se encontraron diferencias cuando el sustrato oxidable fue palmitato, octanoato o  $\beta$ -hidroxibutirato. El flujo glucolítico en los corazones HTG fué 2.4 veces menor que en los corazones de ratas control. La actividad de la fosfofructocinasa tipo I (PFKI) disminuyó en un 16% en los corazones HTG con respecto a la actividad presente en corazones control. No se encontraron cambios en la actividad de la piruvato cinasa. Los niveles de glucosa-6-fosfato se encontraron elevados en los corazones HTG, sugiriendo una limitación del flujo glucolítico a nivel de la PFKI. La forma activa de la piruvato deshidrogenasa (PDHa) se encontró también disminuida. Sin embargo, mediante la perfusión con dicloroacetato (DCA), se restauró a los valores encontrados en corazones controles, no obstante este efecto, el desempeño mecánico no se recuperó. Los niveles de ATP y fosfocreatina, así como la actividad de la creatina cinasa total y la fracción MB se encontraron disminuidos en los corazones HTG cuando se perfundieron con glucosa. Los datos sugieren que el suministro de ATP a través de la oxidación de glucosa no es suficiente para mantener el trabajo cardiaco en los corazones HTG, lo cual se agrava por la disminución en la actividad de la creatina cinasa.

De la actividad total de CK, un 30% corresponde a la isoforma mitocondrial (CKmit). La actividad de CKmit en corazones HTG está disminuida en un 45%,

---

medida por estimulación de la FO, sin embargo cuando se cuantificó por espectrofotometría no se encontró diferencia alguna. La adenilato cinasa (AK), enzima que participa también en la transferencia energética y mantenimiento de los niveles celulares de ATP/ADP, se encuentra discreta, pero significativamente disminuida en los corazones HTG (20 % menos que los controles,  $P < 0.05$ ).

La respiración de mitocondrias HTG con  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -K) 10 mM y piruvato/malato (pyr) 5 mM fue significativamente mayor que la de los controles ( $375 \pm 32$  vs  $291 \pm 29$  ngát  $O_2$ /min/mg con  $\alpha$ -K y  $416 \pm 59$  vs  $288 \pm 64$  ngát  $O_2$ /min/mg con pyr). Las respiraciones con succinato-rotenona y desacoplada fueron semejantes en mitocondrias HTG y controles. El contenido de citocromos b, c y a fue semejantes para ambos grupos así como la actividad de citocromo C oxidasa. La actividad de  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa, fue significativamente elevada en las mitocondrias de corazones HTG:  $230 \pm 22$  vs  $180 \pm 21$  nmol NADH/min/mg prot. Se determinó de igual forma la composición de ácidos grasos de membranas mitocondriales. Las mitocondrias HTG mostraron un contenido mayor de ácidos grasos saturados y una disminución de insaturados.

Los resultados anteriores indican que el desacoplamiento entre la síntesis de ATP y la actividad contráctil en el corazón HTG se localiza en la transferencia de los equivalentes de energía, principalmente a nivel de la CKmit y de la AK. La función mitocondrial no está alterada en el corazón HTG, tal como se refleja en el corazón intacto, sin embargo parece estar aumentada debido al incremento de  $\alpha$ -Kdhasa y posiblemente a un aumento de la rigidez membranal, aunque esto último debe ser estudiado con mayor profundidad.

---

## SUMMARY

The metabolic pathways involved in ATP production in hypertriglyceridemic rat hearts were evaluated. Hearts from male Wistar rats with sugar-induced hypertriglyceridemia were perfused in an isolated organ system. Mechanical performance, oxygen uptake and beat rate were evaluated under perfusion with different oxidizable substrates. Age- and weight-matched animals were used as control. The hypertriglyceridemic (HTG) hearts showed a decrease in the mechanical work and slight diminution in the oxygen uptake when perfused with glucose, pyruvate or lactate. No differences were found when perfused with palmitate, octanoate or  $\beta$ -hydroxybutyrate. The glycolytic flux in HTG hearts was 2.4 times lower than in control hearts. Phosphofructokinase-I (PFK-I) was 16% decreased in HTG hearts, whereas pyruvate kinase activity did not change. The increased levels of glucose-6-phosphate in HTG heart, suggested a flux limitation by the PFK-I. Pyruvate dehydrogenase in its active form (PDHa) diminished as well. The PDHa level in the HTG hearts was restored to control values by dichloroacetate; however, this addition did not significantly improve the mechanical performance. Levels of ATP and phosphocreatine as well as total creatine kinase activity and the MB fraction were significant lower in the HTG hearts perfused with glucose. The data suggested that supply of ATP by glucose oxidation did not suffice to support cardiac work in the HTG hearts; this impairment was exacerbated by the diminution of the creatine kinase system output.

Myocardial performance depends upon the ATP generated through oxidative phosphorylation (OF). To ensure the ATP supply from the production to the consuming sites, the cell utilizes the channelling system of creatine kinase (CK). In the heart of sugar-induced hypertriglyceridemic rat model, cardiac performance is impaired when glucose is the fuel, however, under this condition, it becomes evident that there is an uncoupling between the ATP production, taken as the

---

oxygen uptake in the isolated heart, and the consuming sites, i.e. the mechanical performance in our model. To explore the nature of such uncoupling we evaluated the components of the systems involved. Total CK activity in myocardial tissue was greatly depressed in the HTG hearts. Mitochondrial CK (mitCK) isoenzyme normally correspond to 30% of the total activity found in the whole organ. We determined the corresponding fraction of mitCK taking advantage of the functional coupling existing between the mitCK and the OP; we determined the mitCK activity in isolated heart mitochondria as the stimulation in respiration associated with the ADP generated by mitCK. In the HTG heart mitochondria, the activity of this isoenzyme is depressed by 45% as compared with the values found in control hearts. Adenilate kinase (AK), an enzyme participating in the ATP transfer and ATP/ADP ratio, is slightly, but significantly decreased in the HTG hearts (20% less than in control hearts,  $P < 0.05$ ).

On the other hand, we evaluated heart mitochondrial function from HTG rats. Respiration with 10 mM  $\alpha$ -ketoglutarate as oxidizable substrate as well as with 5 mM pyruvate/malate (pyr) was significantly larger in HTG heart mitochondria than in the control group ( $375 \pm 32$  vs  $291 \pm 29$  ngat  $O_2$ /min/mg con  $\alpha$ -K y  $416 \pm 59$  vs  $288 \pm 64$  ngat  $O_2$ /min/mg con pyr). Respiration with 10mM succinate in the presence of 2  $\mu$ M rotenone were similar in both groups. Quantification of the content of cytochromes b, c and a<sub>3</sub> showed that they were also similar in the two kinds of mitochondria as well as the cytochrome c oxidase activity.  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase activity was also measured and was greater in the HTG heart mitochondria than in the control ones:  $230 \pm 22$  vs  $180 \pm 21$  nmol NADH/min/mg prot. Fatty acid composition was determined in mitochondrial membranes. In the HTG heart mitochondria we found a larger content of saturated fatty acids accompanied by a decreased in the content of unsaturated fatty acids.

These results indicate that the uncoupling in the energy transfer present in the HTG heart is due mainly to a dysfunction in the mit-CK and AK. Mitochondrial

---

function is preserved in the HTG heart, as reflected in the whole organ, however respiration is augmented when the substrate is  $\alpha$ -ketoglutarate since the enzyme responsible for its oxidation is augmented. The change in lipid composition may contribute to increased rigidity, however, further exploration on this matter is required.

---

# CONTENIDO

<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>16</b>
<b>AGRADECIMIENTOS. ....</b>	<b>15</b>
<b>CAPITULO 1</b>	
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>17</b>
1.1. INTRODUCCION GENERAL. ....	18
1.2. ALTERACIONES DEL METABOLISMO CARDIACO EN LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARFS. ....	22
1.3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	30
<b>CAPITULO 2</b>	
<b>HIPÓTESIS. ....</b>	<b>32</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>32</b>
<b>CAPITULO 3</b>	
<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>34</b>
INDUCCIÓN DE LA HIPERTRIGLICERIDEMIA. ....	35
PERFUSIÓN DE SUSTRATOS EN EL SISTEMA DE CORAZÓN AISLADO. ....	35
DETERMINACION DE METABOLITOS Y ACTIVIDADES ENZIMATICAS.....	37
PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	37
GLUCÓLISIS. ....	39
DETERMINACIÓN DE GLUCOSA-6-FOSFATO, ATPY PCR.....	40
DETERMINACIÓN DE ADP Y CREATINA.....	41
DETERMINACIÓN DE CITRATO .....	43
DETERMINACIÓN DE $\alpha$ -CETOGLUTARATO DESHIDROGENASA ( $\alpha$ -KGDH).....	45
DETERMINACIÓN DE CREATINA CINASA Y ADENILATO CINASA.....	46

FRACCIÓN mB DE CREATINA CINASA.....	47
DETERMINACIÓN DE FOSFOFRUCTOCINASA TIPO I. ....	48
DETERMINACIÓN DE PIRUVATO CINASA (REINHART, 1980). ....	48
AISLAMIENTO Y EXPERIMENTOS EN MITOCONDRIAS DE CORAZÓN.....	49
RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL. ....	50
ESTIMACIÓN DEL POTENCIAL TRANSMEMBRANAL MITOCONDRIAL.....	50
DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE CITOCROMOS.....	51
SEPARACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN MEMBRANAS MITOCONDRIALES. ....	52
DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA. ....	54
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	54
<b>CAPITULO 4</b>	
<b>RESULTADOS I.....</b>	<b>55</b>
<b>ALTERACIÓN DEL METABOLISMO DE LA GLUCOSA Y TRANSFERENCIA DE ENERGÍA EN EL CORAZÓN HIPERTRIGLICERIDÉMICO. ....</b>	<b>56</b>
ANIMALES.....	57
OXIDACIÓN DE SUBSTRATOS. ....	57
OXIDACIÓN DE GLUCOSA.....	60
FLUJO GLUCOLÍTICO.....	63
ACTIVIDAD DE LA PDHA.....	63
SISTEMA DE LA CREATINA CINASA.....	65
DISCUSIÓN.....	67
METABOLISMO DE GLUCOSA.....	70
ACTIVIDAD DE LA PDH.....	71
SISTEMA DE LA CREATINA CINASA.....	71
<b>CAPITULO 5</b>	
<b>RESULTADOS II.....</b>	<b>74</b>

---

<b>DESACOPLAMIENTO ENTRE LOS SITIOS PRODUCTORES Y CONSUMIDORES DE ENERGÍA EN EL CORAZÓN HTG.....</b>	<b>75</b>
CREATINA CINASA MITOCONDRIAL Y ADENILATO CINASA. ...	76
RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL. ....	79
POTENCIAL Y FLUIDEZ MEMBRANAL.....	83
DISCUSION.....	86
RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL. ....	88
COMPOSICIÓN Y FLUIDEZ MEMBRANAL.....	90
<b>CAPITULO 6</b>	
<b>DISCUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>93</b>
<b>CAPITULO 7</b>	
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>98</b>
<b>CAPITULO 8</b>	
<b>CONCLUSIONES FINALES.....</b>	<b>102</b>
<b>CAPITULO 9</b>	
<b>BIBLIOGRAFÍA. ....</b>	<b>104</b>
<b>ANEXO 1</b>	
<b>PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS.....</b>	<b>118</b>
<b>ANEXO II</b>	
<b>OTRAS PUBLICACIONES DURANTE MI DOCTORADO .....</b>	<b>168</b>

---

## ABREVIATURAS

$\alpha$ -KGDH	$\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa
$\beta$ -OH	$\beta$ -hidroxibutirato
ADP	Adenosín difosfato
AK	Adenilato cinasa
ATP	Adenosín trifosfato
BHT	Butil-hidroxi-tolueno
CK	Creatina cinasa
CKcit	Creatina cinasa citosólica
CKmit	Creatina cinasa mitocondrial
CoA	Coenzima A
CPT-I	Carnitina- palmitoil-acil-transferasa
Cr	Creatina
DCA	Dicloroacetato
DTT	Ditiotrehitol
EC	Enfermedades cardiovasculares
EDTA	Ácido etilendiaminotetra-ácetico
EGTA	Ácido etilenglicol-bis- $\beta$ -aminoetil-éter-tetra-ácetico
G6PD	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GLU	Glucosa
HEPES	Ácido hydroxi-etil-piperazina-etano sulfónico
HK	Hexocinasa
HTG	Hipertrigliceridémico (a)
LAC	Lactato
LDH	Lactato deshidrogenasa
MOPS	Ácido morfolinopropanosulfónico
NAD <sup>+</sup>	Dinucleótido de adenina y niacina oxidado
NADH	Dinucleótido de adenina y niacina reducido
NADP	Dinucleótido de adenina y niacina fosfato oxidado

---

NADPH	Dinucleótido de adenina y niacina fosfato reducido
OCT	Octanoato
PAL	Palmitato
PCr	Fosfo creatina
PDH	Piruvato deshidrogenasa
PDHa	Forma activa de la piruvato deshidrogenasa
PFK-I	Fosfofructocinasa tipo I
Pir	Piruvato
PIV	Presión intraventricular
PK	Piruvato cinasa
TPP	Tiamina de pirofosfato

---

## AGRADECIMIENTOS.

*"Gracias señor por darme la oportunidad de tener amigos"*  
Fernando Carvajal Servín.

---

Mi sincero agradecimiento al comité tutorial y sinodales: Dr. Rafael Moreno Sánchez, Dra. Guadalupe Baños Mac Carthy, Dr. Edmundo Chávez Cossío, Dr. Rubén Román Ramos y Dr. José Domingo Méndez Francisco, por su dedicación y acertados comentarios .

A mis padres, hermanos y sobrinos, quienes forman lo más preciado de mi existencia, gracias por su infinito apoyo y constante motivación.

A la gran familia de Biólogos Experimentales y aledaños: Vicky, Mirna, Edith, Paty, Lupe, Diana, Roxana, Rosa, Felipe, Esteban, Paco, Silverio, Emilio, Fernando, Marco, Alberto, Mayela, Ana, Judith, David y Ricardo, gracias por las risas, los gritos, los llantos, pero sobre todo por estar aquí, mano a mano en el camino como buenos hermanos.

A mis incomparables compañeros de laboratorio, los que están, los que se han ido y los que vendrán. Horacio, Ceci, Cochita, Mohamed, Luis, Silvia, Sara, César, Fermín, Alicia, Raúl, Adrián, Ricardo, David, Paco, Noemí, Martha, G de Jesús, Silvia, José, Norma, Fernando, José de Jesús, Natalia, Oralia y Araceli, gracias por permitirme compartir esta parte de mi vida de una forma tan enriquecedora, amena y cordial, por encontrarme cada día con algo más que simplemente ciencia y trabajo.

A Cheny, Gris y Ernesto, gracias por su amistad, que ha sabido romper las fronteras del tiempo, la distancia y el silencio.

Al Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.

A la Universidad Autónoma Metropolitana.

A Dios, por darme la vida, por darme los sueños y permitirme forjar con ellos un ideal que me gué día con día.

---

CAPITULO 1  
INTRODUCCIÓN

*“...De haber aceptado que nuestro paso por la vida no es sufrimiento  
ni menos expiación, es misión.”  
Ignacio Chávez.*

---

## 1.1. INTRODUCCIÓN GENERAL.

Las enfermedades cardiovasculares (EC) ocupan el primer lugar en morbilidad y mortalidad en los países industrializados de occidente; este problema se extiende a muchas metrópolis de los países en vías de desarrollo como México, en donde ocupa también el primer lugar en problemas de salud pública, precediendo a los problemas de cáncer y diabetes. La asociación de las EC con ciertos factores de riesgo como la hipertensión arterial, el hábito de fumar, algunos desórdenes como la diabetes, las dislipidemias, la resistencia a la insulina e hiperinsulinemia está bien establecida. Sin embargo, no se han esclarecido con detalle los mecanismos celulares y bioquímicos que están involucrados en la etiología de estas patologías.

Dentro de los factores de riesgo, las dislipidemias ocupan un lugar sobresaliente como precursores de enfermedad coronaria; se ha establecido el papel que los niveles elevados de colesterol sanguíneo tienen en el desarrollo de este tipo de enfermedades y se ha hecho un amplio estudio de algunos de los mecanismos celulares y bioquímicos en los que participa. A pesar de ello, otro tipo de dislipidemia frecuentemente asociada con EC, la hipertrigliceridemia (HTG) o elevación de triglicéridos circulantes, presenta una fuerte controversia en cuanto a su papel como factor de riesgo independiente, y la manera en cómo contribuye al desarrollo de este tipo de enfermedades está aún menos claro.

Un amplio estudio sobre la participación de los niveles elevados de triglicéridos se ha llevado a cabo por el grupo de Zicha y colaboradores, el cual ha desarrollado una línea genética de hipertrigliceridemia en rata por administración de sacarosa (Vraná, 1990). En este modelo se han encontrado alteraciones en el metabolismo de los triglicéridos y del ácido úrico (Kunes, 1995). En este mismo modelo se han

reportado también anormalidades en el manejo del calcio y magnesio intracelular y del sodio en ciertos tipos celulares, como plaquetas y eritrocitos respectivamente (Zicha, 1996).

Recientemente, en nuestro laboratorio hemos desarrollado un modelo experimental de hipertrigliceridemia en ratas, mediante la administración crónica de azúcar refinada al 30 % en el agua de bebida, las cuales desarrollan una hipertensión moderada (por arriba de 140 mm de Hg); en estas ratas hipertrigliceridémicas (HTG) se ha encontrado una importante disfunción endotelial en anillos de arterias mesentéricas y de aorta, un aumento en los productos derivados del metabolismo de la ciclooxigenasa, y se ha visto también que el suero de estos animales tiene un efecto potenciador sobre la respuesta adrenérgica vascular (Baños, 1997).

Un aspecto interesante que se ha estudiado en este último modelo ha sido la función cardíaca. Se ha encontrado que la actividad mecánica y eléctrica del miocardio está afectada en estos animales, sobre todo cuando los corazones se someten a condiciones de trabajo extremo, como la estimulación a altas frecuencias. También se ha evaluado la respuesta a situaciones de estrés agudo como la reperfusión postisquémica. Interesantemente se ha encontrado que los animales HTG presentan una mayor susceptibilidad en estas condiciones. Estudios de isquemia y reperfusión miocárdicas en animal completo han demostrado que la prevención de la sobrecarga de calcio intracelular en estos animales no revierte el daño, como sucede en animales controles. Sin embargo, la prevención de la formación de radicales libres es capaz de prevenir la extensión del daño, lo que sugiere que este proceso se encuentra intensificado, muy probablemente debido al exceso de lípidos circulantes que actúan como sustratos de las reacciones oxidativas que ocurren en esta fase del proceso (Carvajal, 1999).

Por otra parte, en el corazón aislado de animales HTG, la isquemia y la reperfusión producen una disfunción contráctil mayor que en los animales normotriglicéridémicos, y la recuperación postisquémica observada es también menor que en los animales control (Carvajal, 1997). Se ha sugerido que la recuperación contráctil del miocardio durante la reperfusión postisquémica depende fuertemente de los niveles energéticos que puedan obtenerse durante la isquemia y luego durante la reperfusión. La isquemia produce serias alteraciones en el metabolismo del miocardio, la ausencia de oxígeno priva totalmente de la energía proveniente de la fosforilación oxidativa, que en condiciones aeróbicas sustenta en casi un 100% al tejido. Como consecuencia de ello se produce una disminución del pH y el contenido de fosfocreatina se consume rápidamente, aumentando la concentración de fosfato intracelular. De la misma forma disminuyen los niveles de ATP y aumentan los de ADP y AMP, estos factores estimulan a su vez la glucólisis y la producción de lactato.

En este estado se produce también un intenso daño en las funciones mitocondriales. La acumulación de calcio en la matriz mitocondrial impide la recuperación total de la respiración y la fosforilación oxidativa aún cuando se ha restablecido la normoxia (Ferrari, 1993). Por estas razones, la glucólisis estimulada durante la isquemia se convierte en la principal fuente de generación de ATP. Estudios en corazón aislado han demostrado que existe una estrecha relación entre la velocidad de glucólisis durante la isquemia y la recuperación de la función contráctil del miocardio (Vanoveschelde, 1994) así como del daño tisular (Cargnoni, 1996). Se ha propuesto también que durante la isquemia existe una acumulación de ésteres de acil-CoA de cadena larga, afectando también las funciones mitocondriales (Lochner, 1981). En este sentido se ha demostrado que la presencia de ácidos grasos libres agrava aún más el daño producido por la isquemia y la reperfusión, disminuyendo la velocidad de glucólisis durante la isquemia (Liedtke, 1988) y exacerbando la disfunción contráctil postisquémica (Johnston y Lewandoswski, 1991).

Considerando que en las ratas HTG los niveles de ácidos grasos circulantes son elevados, es posible que los daños fisiológicos observados en este modelo estén relacionados con alteraciones en distintas vías metabólicas. Particularmente, la disfunción miocárdica observada en las ratas HTG durante la reperfusión postisquémica podría obedecer a alteraciones de la glucólisis, la fosforilación oxidativa, la fosforilación a nivel de sustrato y el sistema de transferencia energética a través de la creatina cinasa.

## 1.2. ALTERACIONES DEL METABOLISMO CARDIACO EN LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES.

La función cardíaca depende del ATP obtenido por la oxidación de varios sustratos. En el corazón adulto, esta energía proviene principalmente de la oxidación de ácidos grasos a través de la fosforilación oxidativa. Sin embargo, la fuente de energía puede cambiar dependiendo de varios factores, como la disponibilidad de sustrato, las demandas energéticas, el aporte de oxígeno y las condiciones metabólicas del individuo. Sorprendentemente, el papel del metabolismo energético en el desarrollo de enfermedades cardíacas no se ha estudiado extensivamente. Por ejemplo, las alteraciones en el transporte y oxidación de glucosa presentes en el corazón diabético pueden comprometer la funcionalidad del corazón en condiciones donde el aporte glucolítico de ATP toma relevancia, tal como sucede en episodios de isquemia y reperfusión. Varias alteraciones del metabolismo energético han sido detectadas en algunas enfermedades cardíacas como cardiomiopatía isquémica, insuficiencia cardíaca, hipertrofia ventricular y cardiomiopatía dilatada. Estas alteraciones incluyen una disminución en la producción de ATP debido a disfunciones de vías como el transporte de ácidos grasos a la mitocondria y alteraciones de las enzimas claves en el metabolismo energético. Se ha asociado también la deficiencia de algunos nutrientes que participan como cofactores, tal es el caso de la L-carnitina y creatina, lo cual conduce a un abatimiento energético. El sistema de la creatina cinasa y otras enzimas mitocondriales también se ven afectados. Se describen también algunos

intentos iniciales para modular el metabolismo energético cardiaco mediante el uso de fármacos o suplementos alimenticios con fines terapéuticos para tratar enfermedades cardiovasculares.

\*Este tema es parte del artículo de revisión "Heart metabolic disturbances in cardiovascular diseases" el cual se encuentra en revisión para su publicación en la revista Archives of Medical Research. El manuscrito completo se encuentra en el anexo 1.

El funcionamiento del corazón en condiciones normales depende del suministro adecuado de oxígeno y sustratos oxidables para generar el ATP necesario para cubrir las demandas energéticas del órgano. Este proceso se lleva a cabo a través de diferentes vías metabólicas : glucólisis,  $\beta$ -oxidación, oxidación de cuerpos cetónicos, ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa, las cuales participan directamente en la generación de ATP, mientras que el sistema de la creatina cinasa se encarga de la transferencia de energía desde la mitocondria hasta las miofibrillas. (Fig. 1.2.1).

Los estudios realizados sobre los mecanismos que conducen al desarrollo de enfermedades cardiovasculares tales como insuficiencia cardiaca, hipertrofia ventricular, cardiomiopatía diabética o dilatada, se han enfocado sobre todo en la participación de factores mecánicos (sobrecarga de volumen, tono muscular) y sobre los factores proliferativos así como agentes inotrópicos y cronotrópicos involucrados en el desarrollo de tales patologías. Sin embargo, se tiene poca información acerca del papel que juega el metabolismo energético en el desarrollo de estas enfermedades., a pesar de que existe una correlación muy importante

entre la presencia de enfermedades cardiovasculares y un déficit energético (cuadro 1.2.1).

La contribución del ATP generado a través de la ruta glucolítica en el corazón adulto es pequeña, sin embargo, existe evidencia de que el ATP así generado contribuye de manera importante el mantenimiento de los gradientes iónicos (King, 1998, Dizon, 1998). También es importante la contribución del ATP glucolítico cuando el corazón se somete a condiciones de trabajo extremo (Goodwin, 1988).

En el corazón diabético se ha reportado una disminución en el transporte de glucosa, la cual ha sido atribuido a la disminución del transporte celular dependiente de insulina llevado a cabo por los transportadores de glucosa GLUT-4, lo cual se encuentra estrechamente asociado con la resistencia a la insulina presente en individuos con diabetes tipo II (Rodrigues, 1992).

Además de la disminución en el transporte de glucosa, se ha reportado también una disminución en su oxidación, la cual puede resultar como consecuencia del efecto inhibitorio que los ácidos grasos causan sobre la actividad del complejo multienzimático de la piruvato deshidrogenasa (PDH) (Hansford, 1978; Latipää, 1985; Liedke, 1988; Johnston, 1988) pues en el individuo diabético, no insulino dependiente, los niveles séricos de ácidos grasos suelen estar elevados (Rodrigues, 1994).

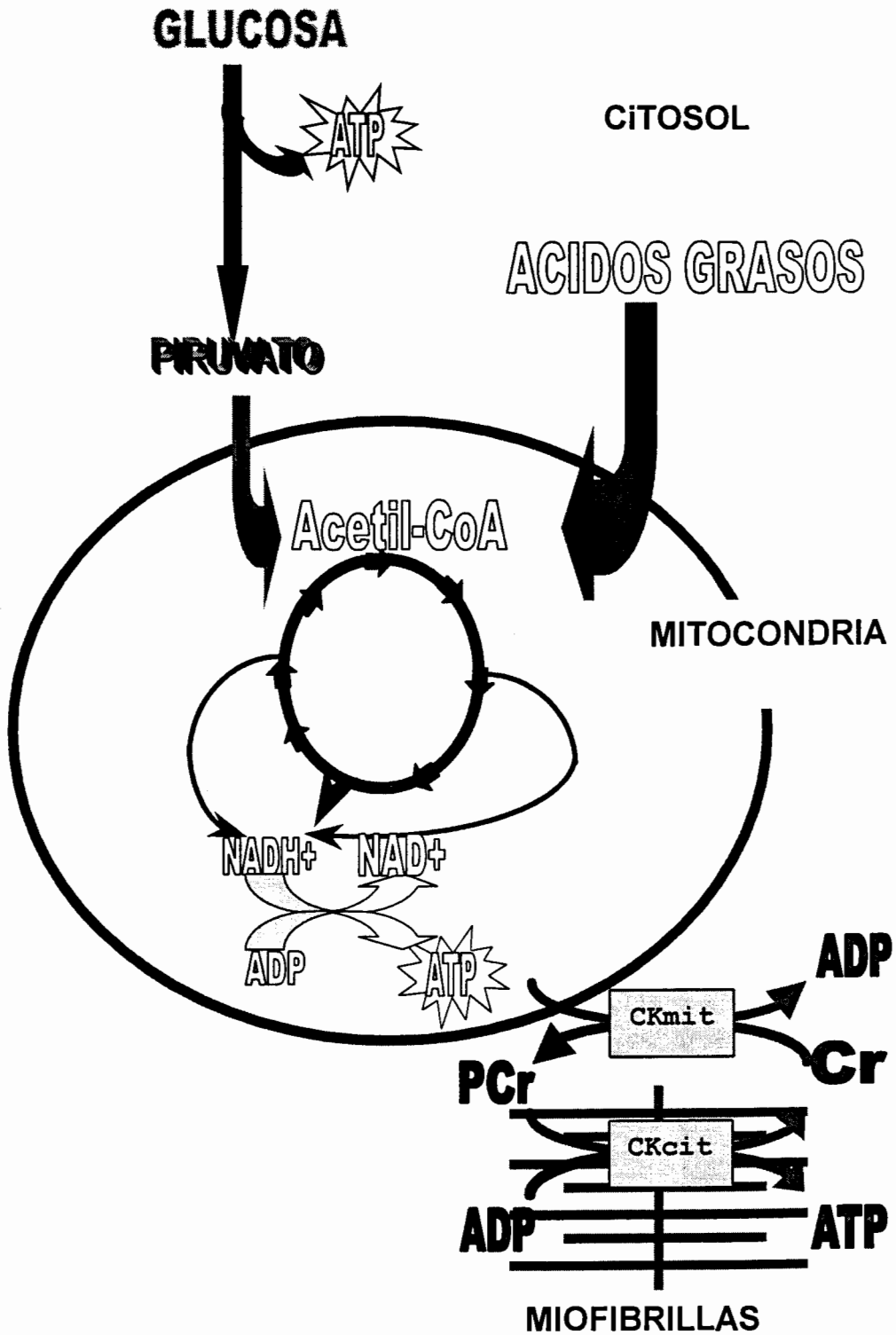


Fig. 1.2.1. Producción y transferencia de ATP. Vías involucradas en el metabolismo aeróbico del corazón y su contribución relativa al ATP utilizado para la contracción

CUADRO 1.2.1 Alteración del metabolismo energético y su asociación con algunas cardiomiopatías. Las letras indican las vías afectadas en cada condición.

CONDICIÓN ASOCIADA A DISMINUCIÓN DE ATP	VÍAS Y ENZIMAS AFECTADAS
<p>❖ <b>Hipertrofia Vventricular</b> [a,b,e,f] (Ferrari,1998;Remondino,2000;Ishino 1999;Jung,1999;Dzeja,1999)</p>	<p>❖ <sup>a</sup>Enzimas Del Ciclo De Krebs</p> <p>❖ <sup>b</sup>Enzimas DE LA Cadena Respiratoria</p>
<p>❖ <b>Insuficiencia Cardiaca</b> [b,f] (Vogt,1998;Starling,1998;Lopaschuk, 1997)</p>	<p>❖ <sup>c</sup>Transporte De Glucosa</p>
<p>❖ <b>Cardiomiopatía Diabética</b> [c,d,e,f] (Xiao,1997;Brenstrom, 1989,Mahgoub; Shafir,1993; Randle,1994;Wu,1998; Caterson, 1982; Garvey, 1993; Rodrigues, 1992; Rodrigues, 1997;Ravingerova, 2001)</p>	<p>❖ <sup>d</sup>Enzimas De La Oxidación De Glucosa</p>
<p>❖ <b>Cardiomiopatía Dilatada</b> [a,b,e,f,] (Rodrigues, 1998; Walliman, 1994)</p>	<p>❖ <sup>e</sup> Transporte De Ácidos Grasos</p>
<p>❖ <b>Síndromes Isquémicos</b> [a,d] (Kaasik, 1999; Argaud,2000; Rumsey,1999; Bassubgthwaihte, 1999)</p>	<p>❖ <sup>f</sup>Sistema De La Creatina Cinasa</p>
<p>❖ <b>Isquemia-Reperfusión</b> [a,b,f] (Vanoverschelde,1994; Shofield, 2001; West, 1983; Brenstrom, 1990)</p>	
<p>❖ <b>Infarto Miocardico</b> [a,b,e,f] (Allard, 1994)</p>	

## 1.2. ALTERACIONES DEL METABOLISMO CARDIACO EN LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES.

Debido que en su metabolismo puede resultar en serias complicaciones para el funcionamiento del órgano. De hecho, la oxidación de ácidos grasos se encuentra disminuida en individuos con hipertrofia ventricular, debido a diferentes causas como una disminución en el metabolismo oxidativo, ya que el suministro de oxígeno al tejido hipertrófico disminuye, o bien por alteraciones sutiles de la palmitoil-CoA sintetasa y la carnitina palmitoil transferasa I, incluso cuando la L-carnitina no es limitante (Brunold, 1998). Sin embargo, en otras condiciones, como desnutrición o problemas renales, se ha observado una disminución en el aporte de este aminoácido, lo cual contribuye a una deficiencia en el transporte de ácidos grasos hacia la matriz mitocondrial y con ello a su oxidación (Nakamura, 2000, Terada, 1998, Scholte,1990).

Se han descrito también algunas alteraciones en el sistema de la creatina cinasa. En pacientes con insuficiencia cardiaca y cardiopatía dilatada, se han encontrado niveles bajos de PCr y ATP (Ishino, 1999). Se han detectado también alteraciones en la actividad de la creatina cinasa en este tipo de pacientes, así como en modelos animales de hipertrofia ventricular y falla cardiaca (Spindler,1998; Dzeja,1999).

Uno de los puntos más importantes en los que puede contribuir el conocimiento de los desórdenes metabólicos asociados a enfermedades cardiacas es su aplicación con fines terapéuticos. Varios estudios clínicos han demostrado la eficacia del apoyo metabólico utilizando diferentes fármacos o suplementos que ayudan a

mejorar los defectos metabólicos en diferentes condiciones (cuadro 1.2.2). Estos fármacos tienen mecanismos de acción diferentes a la de los fármacos tradicionales: algunos actúan modificando el metabolismo energético, implementando la producción de energía a través de glucólisis y disminuyendo la oxidación de los ácidos grasos, tal como lo hace la ranolazina y la trimetazidina, derivados de la piperazina, o bien el dicloroacetato, el cual aumenta la forma activa de la PDH, a través de la inhibición de la PDHcinasa. De forma similar se ha utilizado la suplementación con L-carnitina y propionil-L-carnitina, las cuales producen un mejoramiento del metabolismo de la glucosa al ejercer un efecto dual, primero aumentando la oxidación de ácidos grasos y evitando así la acumulación de acilgraso-CoA, y segundo, al disminuir la concentración de acetyl-CoA mediante la activación de la acetyl-CoAtransferasa, lo cual en conjunto disminuye estos intermediarios que inhiben la oxidación de la glucosa a nivel de la PDHa (Veitch, 1995; Lopaschuck,1998; Ferrari, 1998; Keith, 1995) (Fig. 1.2.2).

Tabla 1.2.2. FÁRMACOS UTILIZADOS COMO APOYO METABÓLICO EN ENFERMEDADES CARDIACAS

FÁRMACO	VÍA AFECTADA	ESTADO DEL ESTUDIO Y UTILIZACIÓN CLÍNICA
TRIMETAZIDINA (Ravingerova, 2001; Veitch, 1995; Merante, 1998)	↓ Oxidación de ácidos grasos ↑ oxidación de glucosa	Aprobado en Europa para el tratamiento de angina.
LANOLAZINA (Veitch, 1995; Merante, 1998)	↓ Oxidación de ácidos grasos ↑ oxidación de glucosa	Fase III estudios en el tratamiento de angina
DICLOROACETATO (Veitch, 1995; Merante, 1998)	↑ Oxidación de glucosa ↑ PDHa	Fase experimental en enfermedad isquémica.
L-CARNITINA PROPIONIL-L-CARNITINA (Veitch, 1995; Merante, 1998; Preveti, 1996; Keith, 1995)	↑ Oxidación de glucosa ↑ PDHa	Aprobado en Europa para angina, síndromes isquémicos e infarto agudo del miocardio.
GLUCOSA E INSULINA (Veitch, 1995; Merante, 1998)	↑ Oxidación de glucosa ↑ Transporte de glucosa	Fase experimental. Terapia de reperfusión y cirugía cardíaca..

### **1.3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

Las enfermedades cardiovasculares representan uno de los problemas de salud más importantes en el mundo. Su asociación con factores de riesgo ha sido ampliamente estudiado. Algunas alteraciones endocrino-metabólicas, incluyendo el llamado síndrome X, el cual comprende hipertensión arterial, hipertrigliceridemia, resistencia a la insulina e hiperinsulinemia (Reaven, 1991) han sido relacionadas fuertemente con el desarrollo de enfermedades cardíacas. Sin embargo, la forma en la que estas patologías predisponen a sufrir alguna cardiopatía, o bien los mecanismos moleculares y celulares que se desencadenan no están bien estudiados.

Varias alteraciones en el metabolismo energético cardíaco tales como el transporte de glucosa, oxidación de glucosa y el metabolismo de los ácidos grasos (Antozzi, 1997), se han asociado con algunas patologías cardiovasculares, a pesar de que su participación en la etiología y desarrollo de la enfermedad no ha sido claramente establecida. En particular, las vías involucradas en la producción de energía son susceptibles a los cambios en el microambiente metabólico (concentraciones de O<sub>2</sub>, de sustratos, etc) y a la homeostasis del organismo.

Se han estudiado algunas alteraciones metabólicas en la producción de energía miocárdica en modelos animales, tales como la rata diabética y la hipertrofia ventricular inducida por sobrecarga de volumen en rata, entre otros. Sin embargo, los desórdenes endocrinos asociados con la diabetes involucran múltiples alteraciones tales como dislipidemias, hiperinsulinemia e hipertensión arterial, lo cual no permite definir claramente los factores que contribuyen a la alteración de la producción de energía. En este sentido, el modelo de la rata hipertriglicéridémica, inducido por una dieta alta en carbohidratos, en la cual se reemplaza el contenido

### 1.3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

de carbohidratos, generalmente almidón, por fructosa o sacarosa, produce niveles elevados de los triglicéridos séricos y una hipertensión arterial moderada (Reaven,1991b;Baños,1997) y tiene la ventaja de no desarrollar diabetes o hipertrofia ventricular. De este modo, las alteraciones metabólicas observadas obedecen directamente al estado dislipidémico del animal.

Los animales que presentan hipertrigliceridemia inducida por una dieta alta en sacarosa, muestran un daño exacerbado cuando son sometidos a un estrés del tipo de isquemia y reperfusión cardiaca, lo que resulta en una disminución de la fuerza mecánica y sobrevivencia del animal (Carvajal,1999; Carvajal 2002). En este trabajo se propone que este fenómeno puede explicarse en parte, por un inadecuado aporte energético durante la isquemia y posteriormente durante la reperfusión. Luego entonces, este estudio tiene por objeto evaluar el metabolismo energético e identificar los sitios y vías metabólicas que abaten y disminuyen los niveles de ATP, lo cual compromete al órgano frente a situaciones de alta demanda energética.

---

## CAPITULO 2

### HIPÓTESIS.

Aunados a las alteraciones órgano-funcionales descritas en los corazones de las ratas HTG, los cambios en el perfil lipídico inducidos por la dieta de sacarosa promueven alteraciones del metabolismo energético (glicólisis, fosforilación oxidativa, oxidación de ácidos grasos, oxidación de cuerpos cetónicos) que deprimen la capacidad del corazón de responder a situaciones de alta demanda energética.

### OBJETIVOS

#### OBJETIVO GENERAL:

Determinar el efecto de la hipertrigliceridemia sobre las vías metabólicas involucradas en la energización del miocardio

#### OBJETIVOS PARTICULARES:

I. Determinar el efecto de la hipertrigliceridemia sobre la oxidación de diferentes sustratos en el corazón aislado.

1. Determinar el flujo glucolítico con diferentes sustratos glucolíticos, glucosa, piruvato y lactato en corazones de ratas HTG y controles.
2. Determinar el flujo de la fosforilación oxidativa con diferentes sustratos oxidables, glucosa, piruvato, lactato, ácidos grasos y cuerpos cetónicos en corazones de ratas HTG y controles.

- 
3. Determinar la producción y utilización de ATP con diferentes sustratos oxidables glucosa, piruvato, lactato, ácidos grasos y cuerpos cetónicos en corazones de ratas HTG y controles.

II. Identificar los sitios afectados por la hipertrigliceridemia en las vías metabólicas involucradas en la producción de ATP en corazones de ratas HTG.

1. Determinar la actividad de las enzimas que ejercen un mayor control en la vía glucolítica, así como la concentración de los principales efectores para estos sitios.
2. Evaluar el estado de la forma activa de la piruvato deshidrogenasa, enzima clave en la oxidación aeróbica de la glucosa, en corazones HTG.
3. Determinar el efecto del dicloroacetato y L-carnitina sobre la glucólisis y fosforilación oxidativa en corazones HTG.

III. Evaluar el sistema de producción y transferencia de ATP en corazón: Sistema de la Creatina Cinasa.

1. Determinar la actividad de las diferentes isoformas de creatina cinasa en corazones de ratas HTG y controles.
2. Evaluar la producción de ATP en mitocondrias de corazón de ratas HTG y controles.

---

CAPITULO 3  
METODOLOGÍA.

*"...You believe in a God who plays dice, I in complete law and order."  
[..Creer en un Dios que juega a los dados, yo en uno que lo hace en total orden]  
Albert Einsten.*

## METODOLOGÍA

### INDUCCIÓN DE LA HIPERTRIGLICERIDEMIA.

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar de 250g a las que se les indujo el estado hipertigliceridémico mediante la administración de sacarosa comercial al 30 % en el agua de bebida durante un periodo de 12 semanas, tiempo al cabo del cual los niveles de triglicéridos circulantes se elevan significativamente (Baños, 1997). Ratas de igual peso y edad fueron utilizadas como controles y recibieron agua sola. Ambos grupos recibieron alimentación sólida estándar *ad libitum*. Al final de este periodo se tomó registro de la presión arterial por el método indirecto (Tail-Cuff) utilizando un transductor neumático conectado a un electroesfingomanómetro y a un fisiógrafo de Narco Bio-Systems. En muestras de sangre se cuantificó la concentración de triglicéridos séricos mediante hidrólisis enzimática y cuantificación subsiguiente del glicerol formado (Nälgene, 1956).

### PERFUSIÓN DE SUSTRATOS EN EL SISTEMA DE CORAZÓN AISLADO.

Las ratas utilizadas, HTG y controles, se anestesiaron con pentobarbital sódico, (55 mg/Kg i.p.) y se les administró por la misma vía 200 U de heparina para evitar la coagulación, se practicó una toracotomía central, removiendo la parte frontal de las costillas y el esternón a modo de dejar expuesto el corazón. Se localizó la aorta ascendente, por la que se hace pasar un hilo de seda como referencia mediante la cual se separó el corazón del cuerpo del animal y se colocó en solución de perfusión fría para inmovilizarlo. Con la mayor rapidez posible se transfirió a la cánula del sistema de Langendorff, y se

perfundió con solución Krebs-Henseleith de la siguiente composición (mM): NaCl 120.6, KCl 4.8, MgCl<sub>2</sub> 1.2, CaCl<sub>2</sub> 2.5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 24.5 y alguno de los siguientes sustratos: glucosa 10 mM, piruvato 10 mM, β-hidroxibutirato 10 mM, palmitato 0.1Mm u octanoato 0.1 Mm, a un pH de 7.4 y manteniendo una temperatura de 37 °C. Cuando se utilizó palmitato, se añadió albúmina de suero bovino al 0,2% (p/v) para solubilizar el ácido graso. El medio de perfusión se burbujeó continuamente con una mezcla de gas de 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>. La perfusión se inició con una presión constante de 80 cm de agua, que equivale a un flujo cardíaco de 20 ml/minuto, se dejó estabilizar el corazón durante 10-15 minutos. Al cabo de este tiempo se redujo el flujo a 10 ml/min,. La presión sistólica se midió introduciendo un balón de látex lleno de solución salina (NaCl 0.9%) en el ventrículo izquierdo, el cual está conectado a un transductor de presión hidrostática. La presión de perfusión (PP) se midió con un transductor similar conectado al paso de la solución unos centímetros antes de llegar al corazón. (Döring y Dehner, 1988). Para los registros electrográficos se colocaron dos electrodos, uno en el ápice y otro en la aurícula derecha del corazón. Otros dos electrodos de plata fueron colocados en la aurícula derecha para estimular externamente al corazón en los casos indicados. Todas las variables se registraron utilizando un sistema de adquisición de datos diseñado por el departamento de Instrumentación y Desarrollo Tecnológico del Instituto Nacional de Cardiología. México. (Fig. 3.1).

El consumo de oxígeno en el órgano aislado se midió registrando de forma continua la variación en la concentración de  $O_2$  en el efluente venoso. Para ello se utilizó un electrodo de platino tipo Clark conectado en línea con el corazón. Se canuló la arteria pulmonar a fin de coleccionar completamente el efluente venoso del corazón. La cava superior, así como la inferior se suturan para prevenir la pérdida del efluente venoso del corazón. Esta cánula debe ser lo más corta posible e impermeable a oxígeno, y se conecta a una cámara que contiene al electrodo de tal manera que el aire del ambiente no difunda dentro de ella. De la misma manera se conecta una cánula que permita la salida del efluente coronario en flujo continuo dentro de la cámara. El consumo de oxígeno cardiaco se determina por la diferencia de concentración entre la solución de perfusión antes de pasar por el tejido cardiaco, y la concentración en el efluente coronario.

### DETERMINACION DE METABOLITOS Y ACTIVIDADES ENZIMATICAS.

#### Preparación de las muestras.

Las muestras para determinar metabolitos se obtuvieron de la siguiente manera: después de finalizados los experimentos con el corazón aislado, éste se congeló rápidamente en  $N_2$  líquido y se pulverizó en un mortero manteniendo la temperatura con  $N_2$ . Una alícuota del homogenado (de 0.5 a 1 g) se transfirió a un tubo de centrífuga y se digirió con dos volúmenes de  $HClO_4$  al 3% (v/v). Se centrifugó entonces a 2000 rpm en frío durante 5 minutos, el sobrenadante se

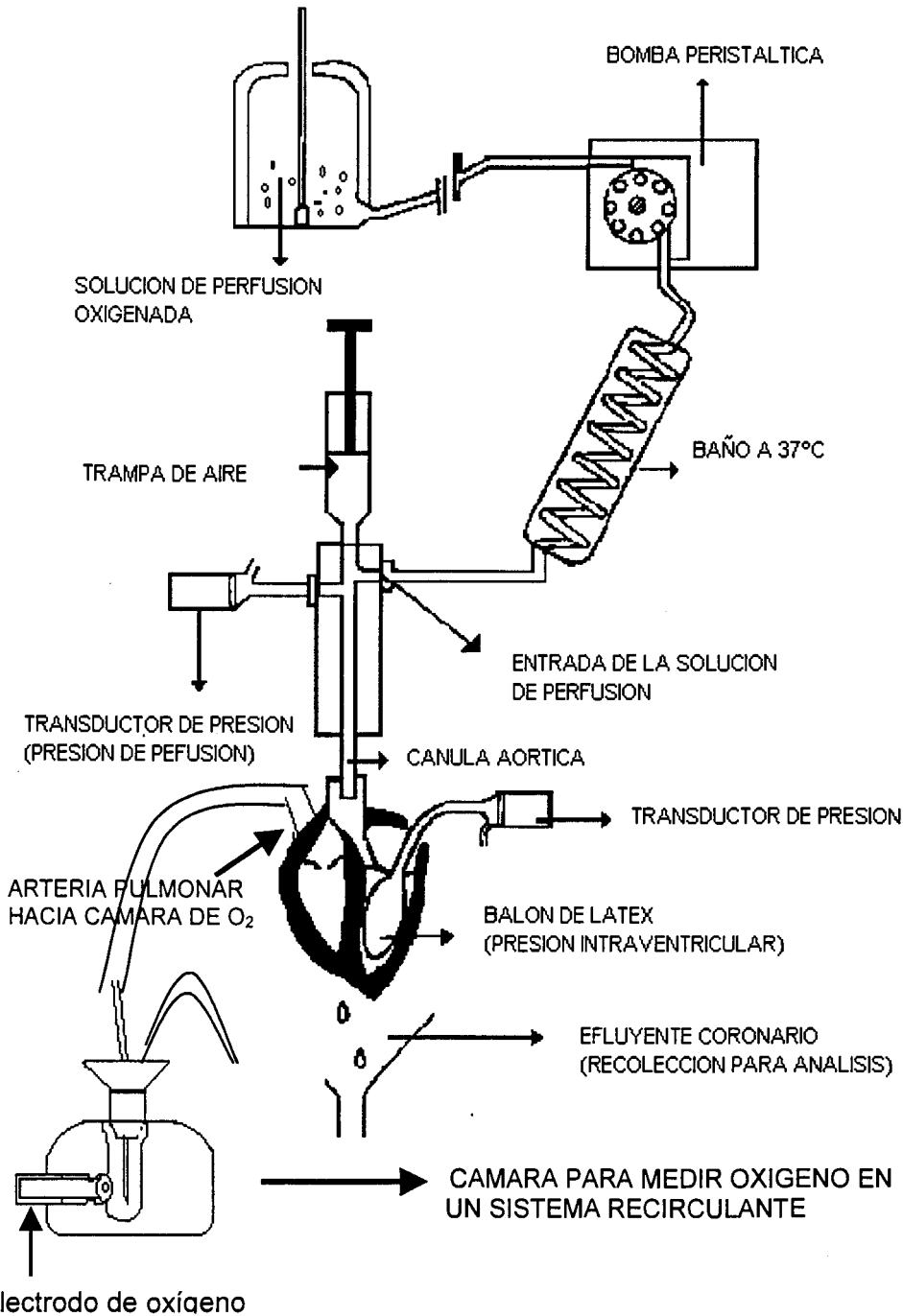


Fig. 3.1 Aparato del sistema de corazón aislado de acuerdo a la técnica de Langendorff.

separó y se neutralizó con KOH/Tris 3 M a un pH de  $7\pm 0.2$  usando como indicador 50  $\mu\text{l}$  de indicador Kodak; de la muestra neutralizada se separaron por centrifugación las sales insolubles y el sobrenadante se guardó en congelación a  $-70^\circ\text{C}$  hasta su uso posterior. Para la determinación de adenín nucleótidos, el  $\text{HClO}_4$  se enriqueció además con EDTA 20 mM a fin de reducir al máximo la hidrólisis espontánea de ATP (Wanders, 1984).

Para la medición de actividades enzimáticas, se tomó una porción del tejido homogeneizado en  $\text{N}_2$  líquido y se transfirió a una solución fría (0.1g de tejido/ml de solución) de "arresto" (stopping solution) de la siguiente composición: HEPES 50 mM, EGTA 3 mM, NaF 25 mM, dicloroacetato 1 mM, ditioneitol 1 mM y tritón X-100 al 0.1% (v/v) a pH 7.1; leupeptina 20  $\mu\text{M}$  y PMSF (Phenylmethylsulfonylfluoride) 0.4 mM. Con esta mezcla se solubilizan las enzimas membranales, se evita la interconversión de la piruvato deshidrogenasa activa en inactiva (Hansford y Cohen, 1978) y se inhibe la actividad de proteasas dependientes de cisteína y serina.

### Glucólisis.

La velocidad de glucólisis se midió mediante la liberación de lactato en el efluente coronario a diferentes tiempos. Durante cada experimento y después del tiempo de estabilización se tomó una alícuota de 2 ml del efluente coronario, la cual se mezcló con  $\text{HClO}_4$  en frío a una concentración final de 3%. Se neutralizó con KOH/Tris y se centrifugó para eliminar las sales de potasio que precipitan. En

estas muestras se cuantificó el lactato mediante la lactato deshidrogenasa de acuerdo a la reacción siguiente:



La cuantificación de lactato se realizó espectrofotométricamente con el incremento en la absorbencia a 340 nm que acompaña la formación de NADH en la siguiente mezcla de reacción: 0.2 ml de buffer de hidrazina 0.4 M, glicina 0.5 M a pH 9; 0.2 ml de NAD<sup>+</sup>, 40 mM; 0.2 ml de muestra; se registró la señal inicial y se inició la reacción con 0.02 ml de LDH (19 UI/ml) hasta el establecimiento de una meseta. (Bergmeyer, 1974).

Determinación de glucosa-6-fosfato, ATP y PCr

La cuantificación de ATP se realizó mediante la reacción con hexocinasa (HK) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD). La hexocinasa cataliza la fosforilación de la glucosa por ATP en presencia de Mg<sup>++</sup> de acuerdo a la ecuación siguiente:



la G6PD cataliza la oxidación de la glucosa-6-fosfato por NADP<sup>+</sup> de acuerdo a la ecuación:



la concentración de ATP se determina siguiendo los cambios en fluorescencia a una emisión de 340 nm y una excitación de 460 nm en la siguiente mezcla de reacción: 1.97 ml de buffer Tris-HCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, 5 mM de EDTA a pH 7.4; 0.01 ml de glucosa 1 M, 0.10 ml de NADP<sup>+</sup> 10 mg/ml; con 0.5 ml de muestra

se tomó la señal basal de fluorescencia y se inició la reacción añadiendo 0.01 ml de G6PD 0.2 mg/ml; se registró el cambio hasta que se alcanzó una meseta, este incremento corresponde a la concentración de glucosa 6- fosfato presente en la muestra. Se añadió entonces 0.01 ml de HK 2 mg/ml y se registró el cambio de absorbancia hasta que se alcanzó nuevamente una meseta, este registro correspondió a la concentración de ATP presente en la muestra. Para cuantificar PCr, se utilizó este mismo sistema y una vez alcanzada la meseta se añadió 20 µl de CK la cual mediante la reacción :



genera ATP el cual se cuantifica nuevamente con la misma secuencia de reacciones (Fig. 3.1). La concentración de metabolitos es calculada de acuerdo a una curva estándar de NADH de concentración conocida realizada en las mismas condiciones experimentales (Fig 3.2).

La solución estándar de NADH se valoró midiendo la absorbencia a 340 nm en un espectrofotómetro, usando una celda de cuarzo y de acuerdo al coeficiente de extinción milimolar de NADH 6.22 M<sup>-1</sup>.

### Determinación de ADP y creatina

El ADP se cuantificó espectrofluorométricamente con la reacción de la piruvato cinasa (PK) acoplada a la lactato deshidrogenasa (LDH). La piruvato cinasa cataliza la fosforilación del ADP a partir de fosfoenolpiruvato de acuerdo a la siguiente reacción:

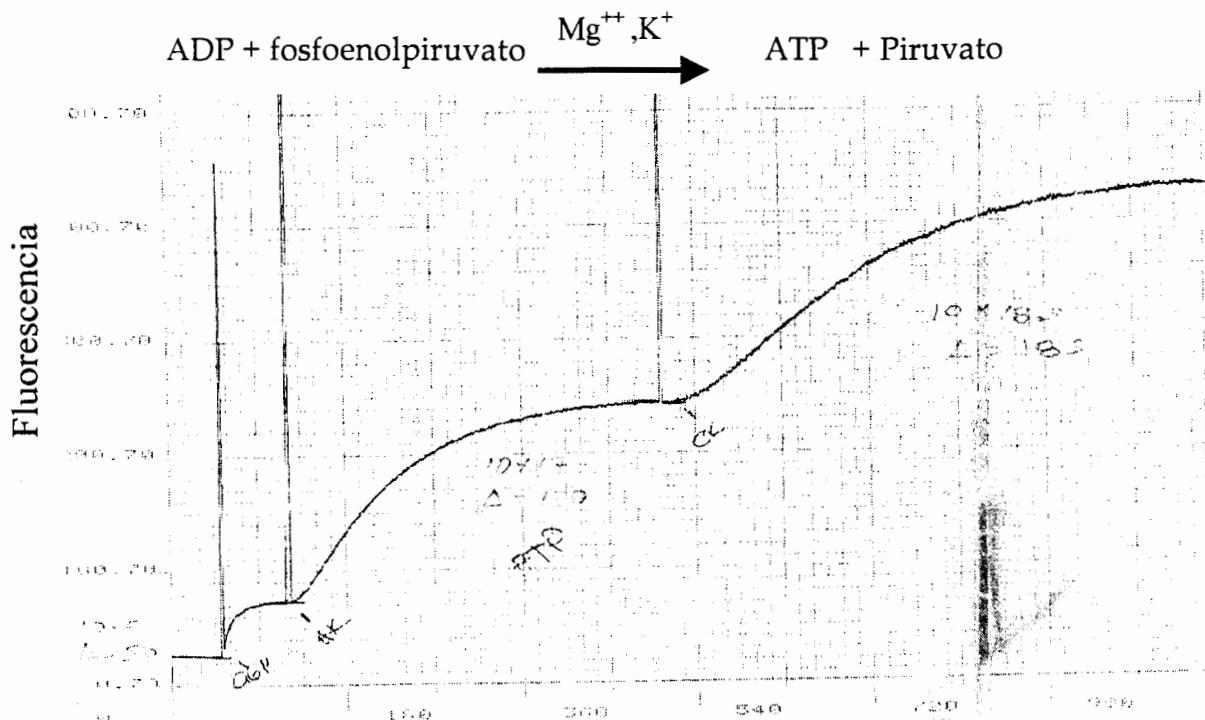


Fig 3.1. Trazo representativo de la determinación espectrofluorométrica de glucosa-6-fosfato, ATP y PCr.

el piruvato así formado es reducido hasta lactado utilizando NADH en presencia de LDH de acuerdo a la siguiente reacción:



La concentración de ADP se determinó por disminución de la fluorescencia proveniente del NADH<sup>+</sup> usando la siguiente mezcla de reacción: 1.88 ml HEPES 100 mM, MgSO<sub>4</sub> 22 mM, EGTA 0.16 mM a pH 7.1, NADH 1 mM, 0.05 ml de fosfoenolpiruvato 10 mM, 0.01 ml de LDH 0.8 mg/ml, 0.25 ml de muestra, la reacción se inició con 0.01 ml de piruvato cinasa 1mg/ml. Para la determinación de creatina, en este mismo sistema y luego de alcanzar la meseta se añadió creatina

cinasa la cual genera nuevamente ADP, de acuerdo al siguiente orden de reacciones:

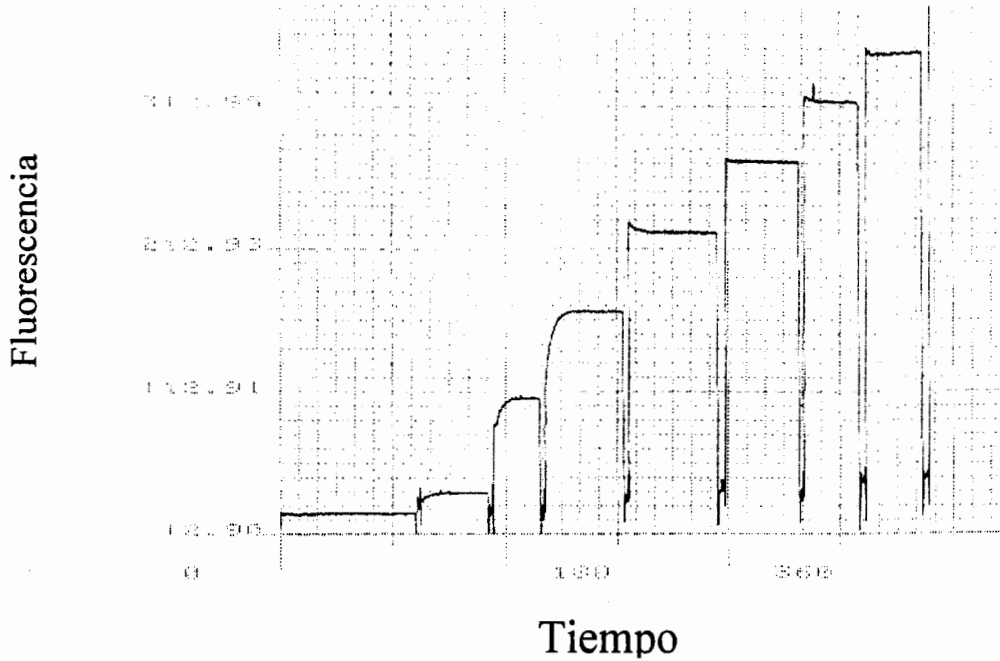
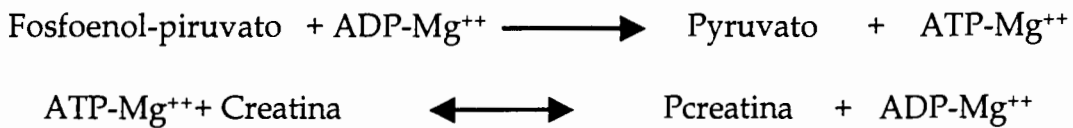


Fig. 3.3. Trazo representativo de una curva de calibración de la señal de fluorescencia con concentraciones conocidas de NADH. Estas curvas se utilizaron para calcular la concentración de los diferentes metabolitos determinados, a una longitud de excitación de 340 nm y de emisión de 460 nm.



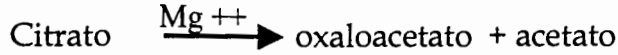
El ADP así generado es directamente proporcional a la concentración de creatina presente en la muestra (Fig 3.4).

#### Determinación de citrato

La concentración de citrato se midió en extractos ácidos de corazón mediante la cuantificación de la disminución en fluorescencia proveniente de la desaparición

## METODOLOGÍA

de NADH utilizando el siguiente medio de reacción: TEA 0.1 M,  $MgSO_4$  5 mM, EDTA 1 mM NADH 0.5 mM, en presencia de malato deshidrogenasa e iniciando la reacción con citrato liasa de acuerdo a la siguiente secuencia de reacciones:



Catalizada por la citrato liasa, y la subsecuente formación de malato catalizada por la malato deshidrogenasa

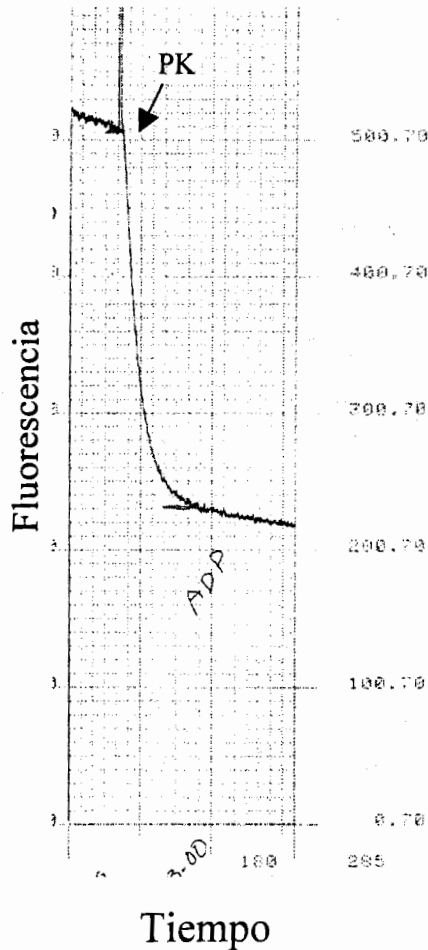
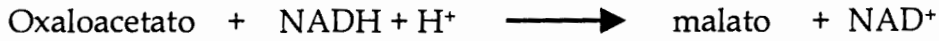


Fig 3.4. Trazo representativo de la determinación espectrofluorométrica de ADP.

Determinación de la actividad de piruvato deshidrogenasa activa (PDHa).

La cuantificación de la enzima que se encuentra en la especie desfosforilada, es decir en la forma activa, se llevó a cabo midiendo el incremento en la fluorescencia que acompaña la aparición de NADH<sup>+</sup> acoplada a la descarboxilación del piruvato por la PDH de la siguiente manera: a 200  $\mu$ l de la muestra anterior se añaden 0.8 ml del medio de reacción de la siguiente composición: HEPES 40 mM, pH 7.1; MgCl<sub>2</sub> 0.8 mM, TPP 0.18 mM, , NAD 2 mM, CoA 0.08 mM, ditioneitol 0.8 mM y rotenona 2  $\mu$ M en presencia de un sistema regenerante de piruvato que consistió en lactato 10 mM, NADH 1 mM y 20 UI/l de lactato deshidrogenasa (Hansford, 1976).

Determinación de  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa ( $\alpha$ -KGDH).

El ensayo de la  $\alpha$ -KGDH se realizó espectrofluorométricamente mediante la cuantificación de la velocidad de formación de NADH<sup>+</sup> de la siguiente manera: 200  $\mu$ l del homogenado de corazón se añadió a 0.8 ml del medio de reacción de la siguiente composición: HEPES 40 mM, pH 7.1; MgCl<sub>2</sub> 0.8 mM, TPP 0.18 mM, , NAD 2 mM, CoA 0.08 mM, ditioneitol 0.8 mM y rotenona 1  $\mu$ M y  $\alpha$ -cetoglutarato 10 mM.

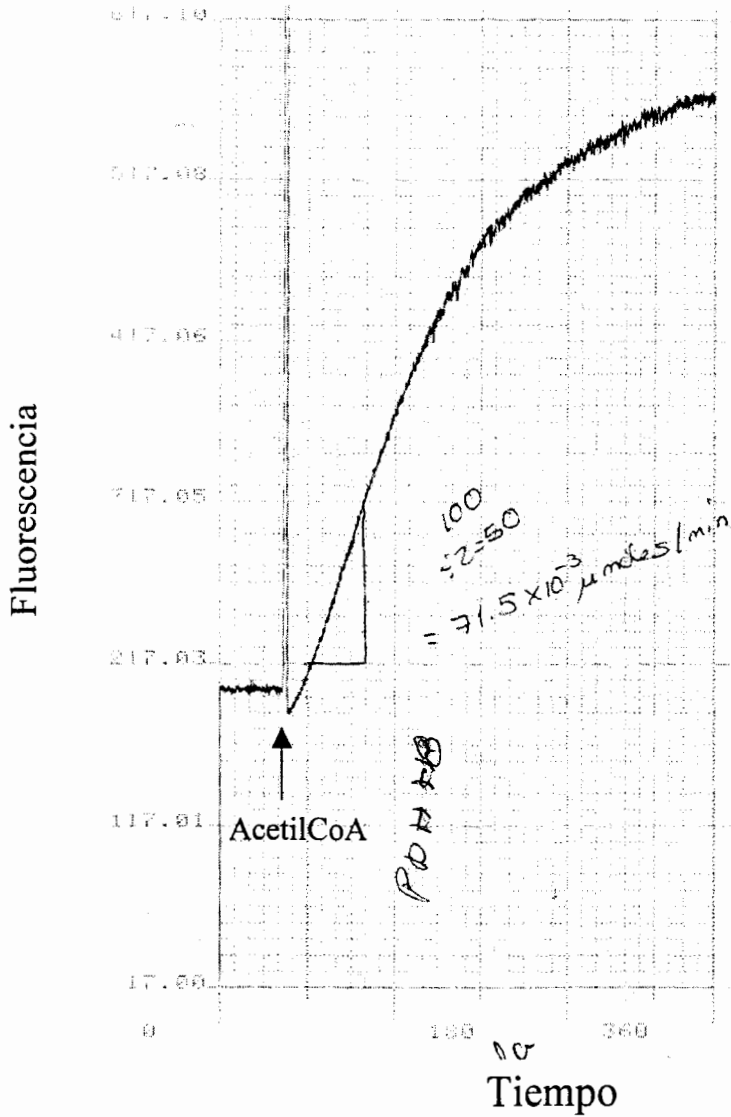


Fig 3.5. Trazo representativo de la determinación de la actividad de piruvato deshidrogenasa, la velocidad se determina como la pendiente en la zona lineal de la curva.

Determinación de creatina cinasa y adenilato cinasa.

La determinación de creatina cinasa se llevó a cabo en homogenados de tejido de corazón o en homogenados mitocondriales. La actividad se mide acoplada a la formación de ATP de acuerdo a la secuencia de reacciones siguiente:





La velocidad de la reducción del NADP a NADPH se determina midiendo el aumento en la absorbencia a 340 nm. La velocidad del cambio en la absorbencia está directamente relacionado con la actividad de la CK en la muestra. Se utiliza el siguiente medio de reacción: imidazol 100 mM, PCr 20 mM, D-glucosa 20 mM, N-acetilcisteína 20 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, ADP 4 mM, AMP 5 mM, NADP 1mM, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 16000U/l y hexocinasa 3000U/l. La determinación de adenilato cinasa se llevó a cabo en el mismo medio de reacción excepto que se suprimió la PCr y el AMP.

Fracción MB de creatina cinasa.

La fracción citósolica MB se determinó mediante el uso de un kit comercial Beckman Coulter, synchron CX, midiendo la actividad de la creatina cinasa total en presencia de un anticuerpo contra el monómero M de la CK, el cual inhibe totalmente la CKMM sin afectar la actividad del monómero B de las isoenzimas creatina cinasa-MB o CK-BB. Considerando que la CK-MB consta de las subunidades equivalentes M y B, la actividad que se mide en presencia del anticuerpo es un 50% de la actividad total para la fracción MB que se encuentra en

ausencia del anticuerpo ya que solo se inhibe el monómero M, pero el monómero B queda activo, debe entonces considerarse que por cada monómero B hay un monómero M para completar la actividad. La actividad de la fracción BB es prácticamente despreciable en corazón . Primero se incubaba la muestra con el anticuerpo anti M. La actividad del monómero CK-B es entonces determinada mediante la reacción acoplada con glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

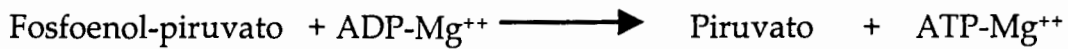
### Determinación de fosfofructocinasa tipo I.

La actividad de la fosfofructocinasa tipo I fué determinada por la desaparición de NADH medida espectrofotométricamente en un sistema de reacciones acopladas al consumo de fructosa 1,6-bifosfato por aldolasa, triosafosfato isomerasa y  $\alpha$ -glicerolfosfato deshidrogenasa en un medio de la siguiente composición: KCL 150 mM, HEPES 20 mM, EDTA 1 mM,  $Mg^{++}$  1 mM, NADH 0.1mM y pH 7.25 a 37°C. Las enzimas utilizadas que se encontraban en suspensión de sulfato de amonio se desalaron, ya que el amonio es un activador importante de la enzima, mediante un sistema de acoplamiento a través de una columna Penefsky con Sephadex G25 o dializadas a 4°C contra el buffer de reacción durante una noche.

### Determinación de Piruvato cinasa (Reinhart, 1980).

La determinación de piruvato cinasa (PK) se llevó a cabo midiendo, en los extractos ácidos de homogenados de corazón, el cambio en absorbencia generado por la desaparición de NADH, utilizado un sistema acoplado a la lactato

deshidrogenasa en el siguiente medio de reacción: HEPES 20 mM, KCl 150 mM, EDTA 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, ADP 1mM, fosfoenol-piruvato 1 mM y NADH 0.5 mM. La reacción se inicia con la adición de 20 UI de lactato deshidrogenasa y de acuerdo al siguiente orden de reacciones :



El piruvato formado es reducido a lactato y el NADH es oxidado a NAD en presencia de la lactato deshidrogenasa. El cambio en absorbencia generado por la desaparición de NADH es proporcional a la velocidad de formación de piruvato por la PK.

### ASLAMIENTO Y EXPERIMENTOS EN MITOCONDRIAS DE CORAZÓN.

El aislamiento de mitocondrias se realizó por centrifugación diferencial de acuerdo a la técnica de Moreno-Sánchez y Hansford. Brevemente, se extrajo el corazón de los animales sacrificados por dislocación cervical, y fueron suspendidos en un medio de sacarosa 250 mM, HEPES 10 mM y EGTA 1mM a pH 7.3 (medio SHE). Los corazones se cortaron hasta formar una papilla fina, la cual se incubó a 4°C durante aproximadamente 10 min con 2 mg de Nagarse tipo XVII (2 mg / corazón) para reblandecer el tejido, el cual terminó de homogeneizarse por acción mecánica en un homogenizador de vidrio. Para eliminar la Nagarse se centrifugó el homogenado a 9000 rpm y la pastilla se resuspendió en medio SHE con la ayuda

de un dedo frío, se sometió entonces a una centrifugación de baja velocidad (2000 rpm) para eliminar los restos de tejido y organelos subcelulares. Las mitocondrias son obtenidas en el sobrenadante luego de esta centrifugación y se recuperan al centrifugar nuevamente a 9000 rpm, en la pastilla, la cual se incubaba durante 10 min con albúmina libre de ácidos grasos al 1% y ADP 0.1mM, para eliminar ácidos grasos libres de las membranas y recargarlas de ADP. Se lavan nuevamente con SHE y se recuperan en la pastilla por centrifugación a 9000 rpm. Para cada experimento se utilizó un corazón de rata HTG y uno de rata control de un peso entre 400 y 450 g. .

### Respiración mitocondrial.

Los experimentos de respiración mitocondrial con diferentes sustratos se llevaron a cabo mediante oximetría polarográfica con un electrodo tipo Clark, en un medio de reacción de la siguiente composición: KCl 120 mM, MOPS 20mM, EGTA 1 mM a pH 7.2.

### Estimación del potencial transmembranal mitocondrial.

El potencial transmembranal mitocondrial fue determinado en mitocondrias frescas de corazones de ratas HTG y controles de acuerdo al método propuesto por Rottenberg, ( 1984). 2 mg de proteína mitocondrial fueron incubados en 0.5 ml de KME ,  $^3\text{H-TPP}$  (tetrafenilfosfonio) 0.8  $\mu\text{M}$  con succinato o  $\alpha$ -cetoglutarato 10 mM, en presencia o ausencia de ADP 2 mM adicionados a los 2 minutos de incubación,

tiempo en el que se centrifugó a 14 000 rpm a 4°C durante 2 min. Al término, inmediatamente se tomó una alícuota de 150µL del sobrenadante y se descartó el resto. Se añadieron 150 µl de SDS 2% a la pastilla y se resuspendió mediante una agitación vigorosa. El potencial transmembranal es calculado de acuerdo a la ecuación de Nerst corregida por la unión inespecífica del TPP a las membranas.

Determinación del contenido de citocromos.

El contenido de citocromos se determinó mediante la obtención de los espectros de absorbencia de una muestra de 2 mg de proteína mitocondrial/ml reducida con ditionita restando el espectro de absorbencia de la muestra oxidada con persulfato en un medio de la siguiente composición. KCl 60 mM, MOPS 10 mM, EGTA 0.25 mM a pH 7.2 y 50 % de glicerol. La línea basal se registró con la muestra mitocondrial bajo una atmósfera de 100 %de O<sub>2</sub>. Para calcular el contenido de citocromos a + a<sub>3</sub> se utilizó la diferencia de absorbencia entre 605 y 630 nm, utilizando un coeficiente de extinción molar de 16 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (Gray, 1994). Para calcular el contenido de citocromos c<sub>1</sub> + c, usando las diferencias en absorbencia entre 550 y 540 nm y un coeficiente de extinción de 19 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (Degli, 1991). Para estimar el contenido de citocromos b, se utilizó la diferencia de absorbencia entre 563 y 578 nm utilizando el coeficiente de extinción molar de 25.6 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (Priest, 1992).

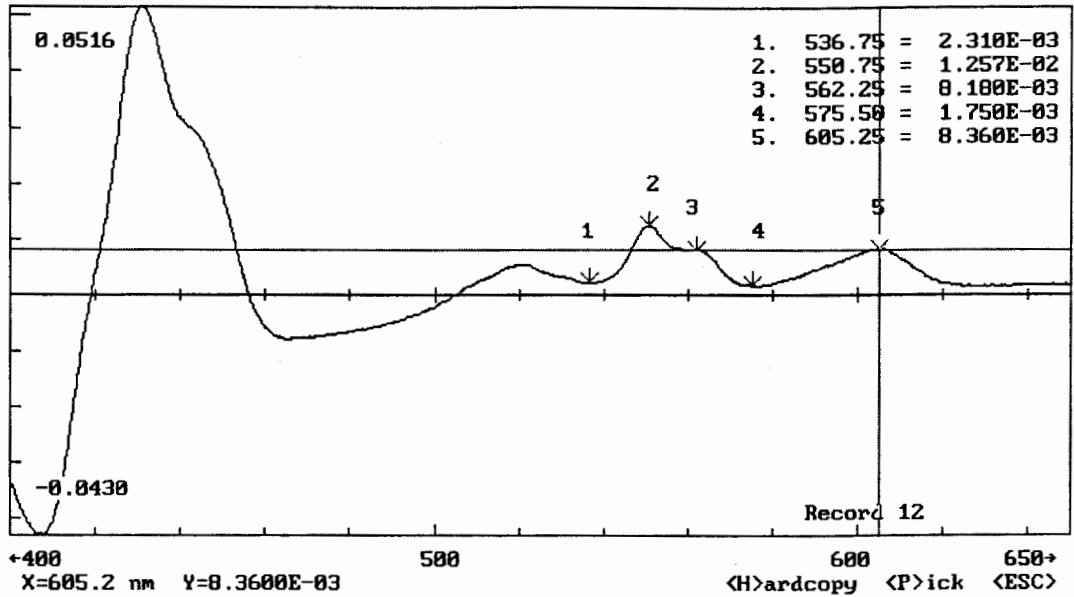
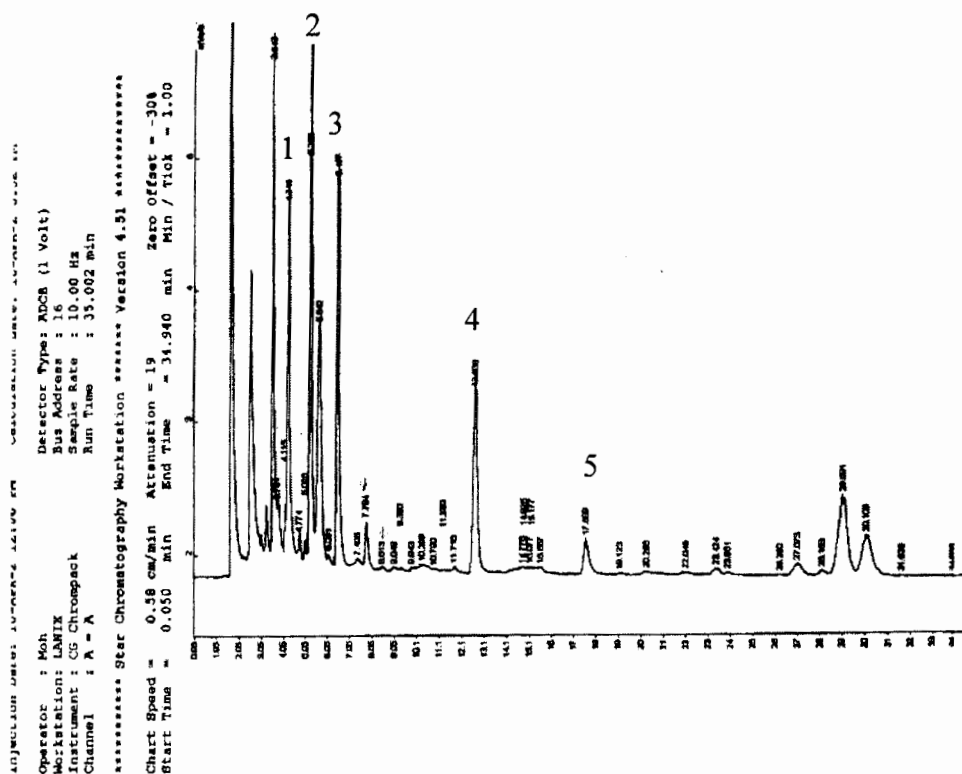


Fig. 3.5. Espectro representativo obtenido de la diferencia entre el espectro reducido con ditionita y el espectro oxidado con persulfato, donde se obtienen los picos de cada citocromos: 2, cit c, 3, cit b y 5 cit a.

SEPARACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN MEMBRANAS MITOCONDRIALES.

El análisis de la composición de ácidos grasos de las membranas mitocondriales se efectuó mediante cromatografía de gases de la siguiente forma. Los ácidos grasos de 2 mg de proteína mitocondrial fueron extraídos en una mezcla orgánica de metanol/cloroformo 1:2 en presencia de 0.002% de butil-hidroxi-tolueno (BHT) como antioxidante y utilizando como estándar interno 100µl de ácido margárico (C17:0). Los ácidos grasos extraídos fueron entonces derivatizados a sus respectivos ácido graso-metil ésteres en presencia de 2% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y metanol, incubados durante dos horas a 80 °C, después de esto, se extrajeron nuevamente

con hexano y las muestras se evaporaron bajo una atmósfera de N<sub>2</sub>. Los ácidos grasos-metil ésteres fueron separados e identificados por cromatografía de gases en un cromatógrafo Carlo Erba modelo 2300, con una columna capilar de sílica de 25m X 0.25 mm de diámetro interno cubierta con CP-Sil 88. El análisis se llevó a cabo a 195°C (temperatura del horno), utilizando helio como fase móvil a un flujo constante de 1 ml/min (Fig.3.6).



### Determinación de proteína.

La concentración de proteína en las muestras de homogenados de corazón y extractos ácidos se estimó de acuerdo a la técnica de Lowry. Para las preparaciones mitocondriales se utilizó el método de Biuret.

### Análisis estadístico.

Se utilizó la prueba de t-student para identificar las diferencias significativas entre los diferentes grupos. En los casos apropiados se utilizó una prueba de ANOVA y en caso de encontrar diferencia significativa se aplicó un post- test de Fisher. Los datos se expresan como medias de las muestras  $\pm$  error estándar. Se consideró diferencia estadísticamente significativa cuando se obtuvo una  $P < 0.05$ . El análisis estadístico y las gráficas fueron realizadas con el paquete estadístico Prism 2.01, de GraphPad Software.

---

CAPITULO 4  
RESULTADOS I.

*“Cuando quieras saber del misterio de ti mismo, busca en Cristo,  
quien te dará el significado de la vida.  
Cuando quieras saber lo que significa ser una persona madura, busca en Cristo,  
quien es la máxima realización de la humanidad.  
Y cuando quieras saber cual es tu misión en el futuro del mundo, busca en Cristo.”*  
Juan Pablo II.

---

ALTERACIÓN DEL METABOLISMO DE LA GLUCOSA Y  
TRANSFERENCIA DE ENERGÍA EN EL CORAZÓN  
HIPERTRIGLICERIDÉMICO.

**E**n esta parte del proyecto se evaluaron las diferentes rutas metabólicas que participan en la producción de ATP en los corazones de las ratas hipertrigliceridémicas, así como los puntos de aquellas vías que resultaron afectadas a fin de dilucidar los blancos afectados por el estado dislipidémico inducido por el régimen de sacarosa. Los corazones de ratas macho de la cepa Wistar a las que se les indujo hipertrigliceridemia dándoles sacarosa comercial en el agua de bebida se perfundieron con diferentes sustratos oxidables. Bajo estas condiciones se evaluó el desarrollo mecánico, el consumo de oxígeno y la frecuencia cardiaca.

\* Artículo en prensa, *Molecular and Cellular Biochemistry*.

### RESULTADOS

#### Animales

Los triglicéridos en suero fueron más altos en el grupo HTG que en el control,  $265 \pm 27$  y  $120 \pm 3$  mg/dL respectivamente ( $n=10$ ), después de 10 a 12 semanas de tratamiento, de acuerdo a datos previamente reportados (Baños,1997). Después de este corto tratamiento con sacarosa, no se desarrolló ningún cambio significativo tal como en la presión sanguínea ( $130.5 \pm 5$  mm de Hg en HTG versus  $125.4 \pm 5$  mm de Hg en controles), cambios en la masa corporal ( de  $428 \pm 38.4$  g en HTG versus  $478 \pm 11$  g en controles) o en el peso del corazón ( $1.9 \pm 0.13$  g en HTG versus  $1.9 \pm 0.14$  g en controles).

#### Oxidación de sustratos.

Para determinar el estado funcional de las diferentes vías generadoras de ATP en la hipertrigliceridemia, los corazones fueron reperfundidos con diferentes sustratos oxidables tales como glucosa (GLU), lactato (LAC), piruvato, (PIR), octanoato (OCT), palmitato (PAL) y  $\beta$ -hidroxibutirato ( $\beta$ -OH). Los corazones reperfundidos en ausencia de sustratos oxidables perdieron la capacidad de contracción después de 10 min. Esos experimentos se realizaron sin estimulación eléctrica externa, puesto que tal intervención podría activar algunas enzimas clave en las vías metabólicas evaluadas (Hansford, 1990). Al usar GLU, LAC o PIR, el desempeño mecánico de los corazones HTG fue significativamente más bajo que el de los corazones control (Fig 4.1A). Sin embargo, cuando se usaron ácidos grasos como OCT o PAL, o cuerpos cetónicos como  $\beta$ -OH, el desempeño mecánico de los corazones HTG fue similar al de los corazones control (Fig 4.2A). La velocidad de consumo de  $O_2$  fue también significativamente más baja en los corazones HTG reperfundidos con GLU, PIR o LAC (Fig 4.1B), pero fue similar a la de los corazones control reperfundidos con ácidos grasos o con cuerpos cetónicos (Fig 4.2B).

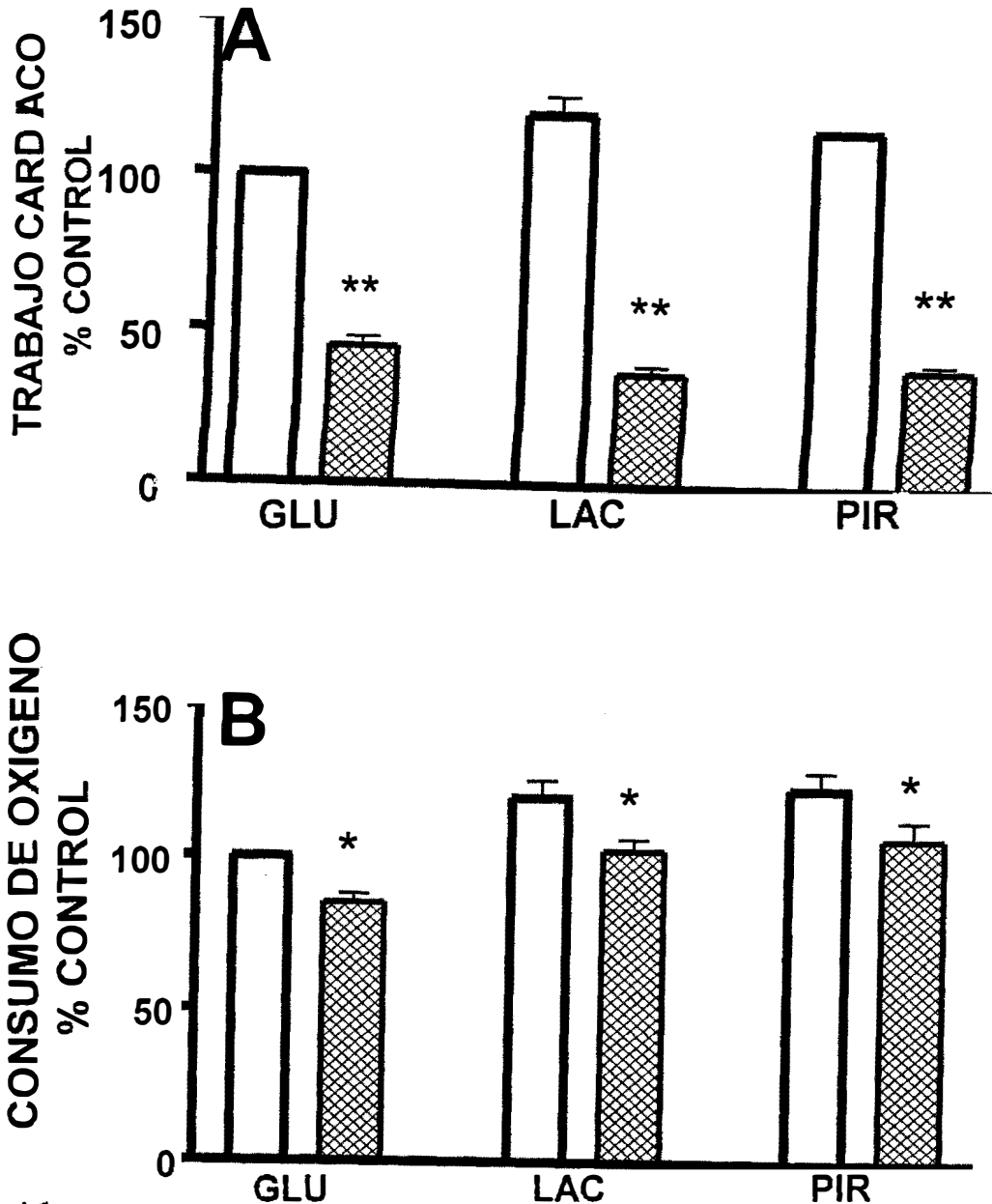


Fig. 4.1 Oxidación de sustratos glucolíticos. A. Trabajo cardíaco (presión ventricular X frecuencia cardíaca). El 100 % corresponde a  $20323.5 \pm 1258$  (latidos/min/ mm Hg) para corazones control perfundidos con 10 mM de glucosa (GLU) (barras blancas) y  $9263.9 \pm 1248$  (latidos por minuto /mm Hg) para los corazones HTG (barras rayadas), perfundidos con 10 mM de GLU B: Consumo de oxígeno. El valor de 100% corresponde a  $23.4 \pm 1.3$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  de tejido fresco obtenidos en los corazones controles con 10 mM de glucosa, en la misma condición los corazones HTG (barras rayadas) desarrollaron solo  $16.4 \pm 1.4$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  de tejido fresco.\*  $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  versus control. Los corazones fueron perfundidos con 10 mM de GLU, piruvato o lactato. N= 6-8 preparaciones.

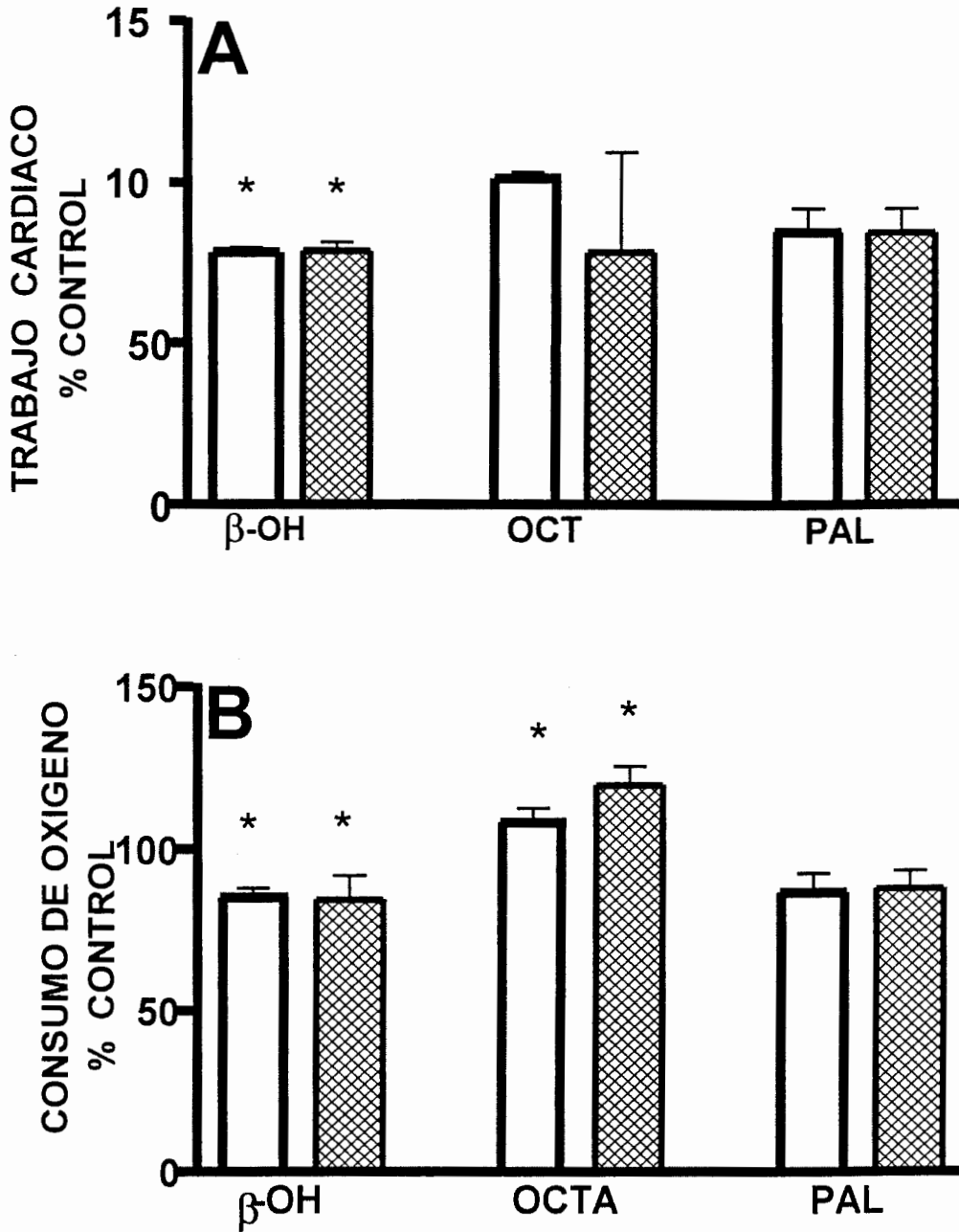


Fig. 4.2 Oxidación de sustratos mitocondriales. A: Trabajo cardíaco (presión entríaca X frecuencia cardíaca). B: Consumo de oxígeno. El 100 % corresponde a los valores indicados en la leyenda de la fig. 4.1 para corazones controles perfundidos con GLU . \* Diferencia significativa versus controles con GLU,  $P < 0.05$ . Los corazones se perfundieron con  $\beta$ -hidroxibutirato ( $\beta$ -OH), 10 mM, octanoato 0.1mM (OCT) o palmitato 0.1 mM unido a 0.2% de BSA (PAL). N= 6-8 preparaciones.

Debe notarse que tanto el desempeño mecánico como el consumo de  $O_2$  en los corazones control fue significativamente más alto con PIR o LAC que con GLU. La activación del complejo de la piruvato deshidrogenasa (PDH) mediante saturación por substrato podría estar involucrada en esta respuesta. Además, el desempeño mecánico y el consumo de  $O_2$  en los corazones controles fueron significativamente más altos al perfundir con OCT, o más bajos con  $\beta$ -OH o PAL que con GLU (cf, Figs 4.1 y 4.2). Esas observaciones indicaron que la velocidad de  $\beta$ -oxidación en corazones control fue más rápida que la velocidad de glucólisis para proveer de esqueletos de carbonos al ciclo de Krebs, pero la transferencia de ácidos de cadena larga a la matriz mitocondrial y la velocidad de oxidación de  $\beta$ -OH fueron más lentas en corazones control.

La relación entre la presión ventricular desarrollada (utilización de ATP) y el consumo de  $O_2$  (ATP producido a través de la fosforilación oxidativa en corazones perfundidos con diferentes concentraciones de GLU, de 0.01 a 10 mM (Fig 4.3A), demostró que los corazones HTG fueron menos eficientes que los corazones control en transformar la energía liberada de la cadena respiratoria a fuerza mecánica. Una relación similar fue obtenida con PIR (Fig. 4.3 B).

### Oxidación de glucosa

Con la finalidad de explorar el metabolismo de la glucosa en los corazones HTG, éstos fueron expuestos a diferentes cargas de trabajo. Mediante estimulación externa a un voltaje por encima del umbral normal (6-9 volts), los corazones fueron sometidos a diferentes velocidades de marcapaso y la PIV y el consumo de  $O_2$  fueron medidos a una concentración limitante y a otra saturante de GLU. Bajo estas condiciones, los corazones HTG siempre desarrollaron PIV más bajas que las de los corazones control (Fig 4.4). La fuerza mecánica desarrollada por los corazones reperfundidos con substrato limitante fue demasiado baja,

enmascarándose su medición exacta a velocidades altas. Las velocidades de consumo de O<sub>2</sub> fueron aproximadamente

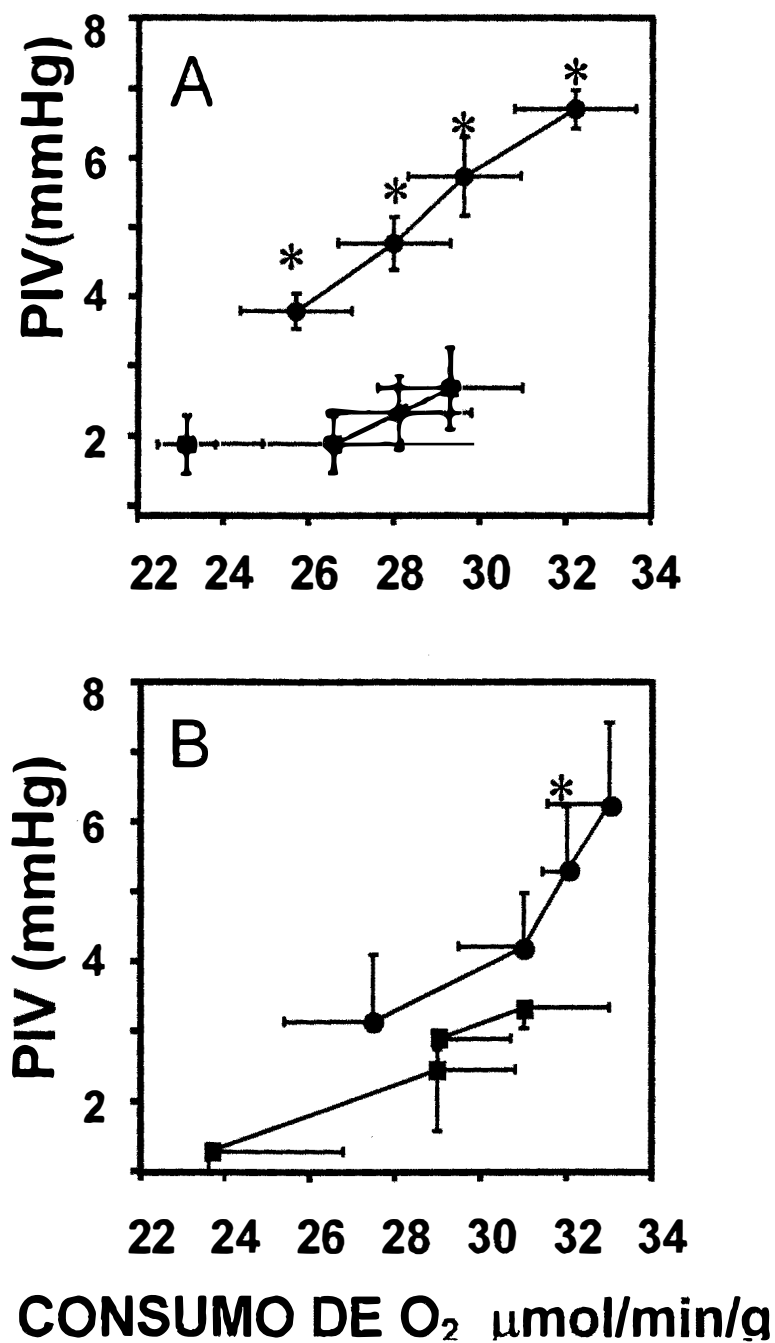


Fig. 4.3. Relación entre consumo de oxígeno y presión intraventricular (IVP) en corazones control (círculos) y HTG (cuadros) perfundidos con GLU (A) o piruvato (B). N= 6 a 8 preparaciones. \*P< 0.05 versus controles.

20% más bajas en los corazones HTG en el intervalo de frecuencias usado. Sin embargo, la disminución en la PIV de aproximadamente un 20% supera la disminución en el consumo de O<sub>2</sub>, sugiriendo que en adición a la oxidación de GLU, existen otros procesos alterados en los corazones HTG, probablemente a nivel de la transferencia de energía al sistema contráctil.

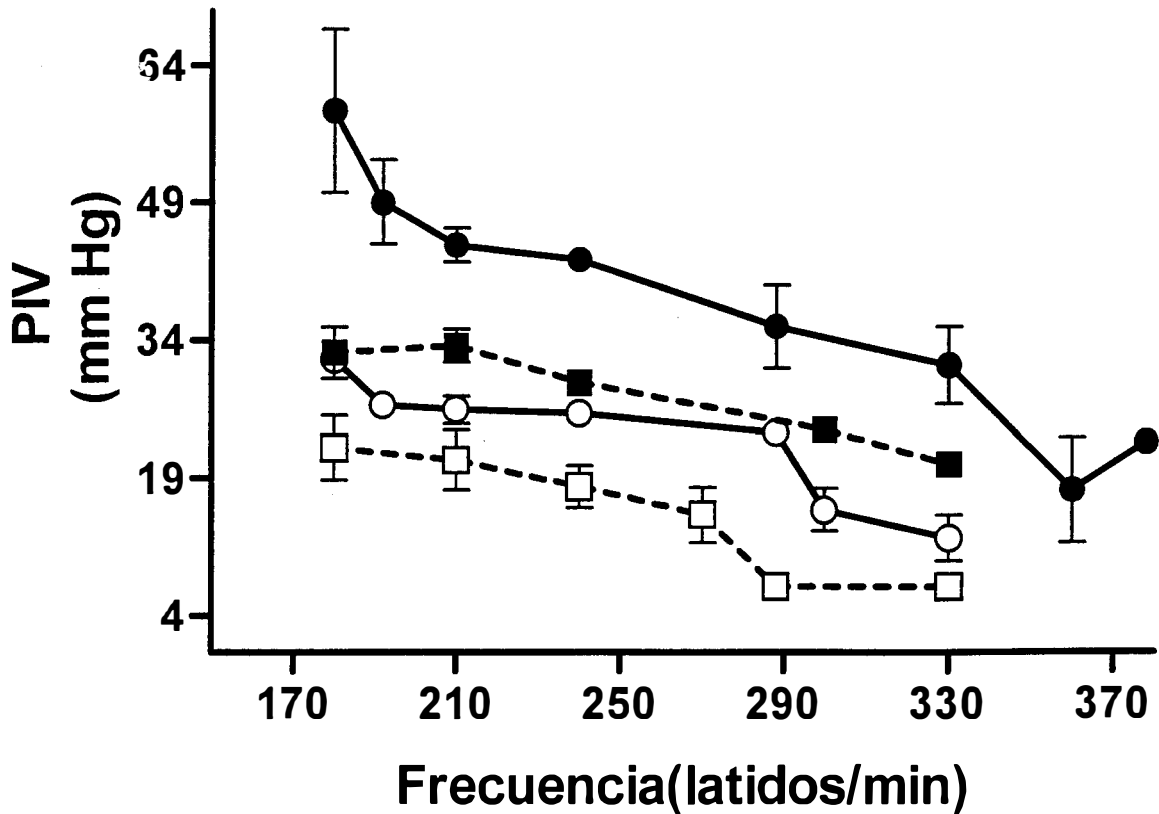


Fig. 4.4 Presión intraventricular (PIV) desarrollada a diferentes frecuencias en corazones controles (círculos) y HTG (cuadros) perfundidos con glucosa 10 mM (símbolos llenos) o 0.1 mM de glucosa (símbolos vacíos). \* P<0.05

No se obtuvieron cambios en la PIV ni en el consumo de O<sub>2</sub> en los corazones HTG por la adición de insulina 10 mUI/l al medio de reperfusión. Al usar concentraciones más altas de insulina se provocó una disminución en la PIV y en el consumo de O<sub>2</sub> (datos no mostrados).

### Flujo glucolítico

La velocidad de producción de lactato fue severamente disminuida en el corazón HTG (Cuadro 4.1). La actividad de la PFK-I fue también significativamente disminuida por la hipertrigliceridemia, mientras que la actividad de la PK no se afectó. Los valores obtenidos están en el rango reportado por otros autores (Kinecka,1997). El contenido celular de glucosa-6-fosfato fue 2.9 veces más alto en el corazón HTG (Cuadro), sugiriendo que bajo condiciones de estado estacionario, la actividad de la PFK-I fue marcadamente más baja que la velocidades de transporte de glucosa y de fosforilación. Los altos niveles de citrato (Cuadro 1), un potente inhibidor de la PFK-I sugirieron que en adición a la disminución en el contenido de enzima, la enzima remanente se encuentra bajo una fuerte inhibición alostérica.

### Actividad de la PDHa

En los corazones HTG esta actividad fue significativamente más baja que la del grupo control (Tabla 1). Esta actividad fue similar a la ya reportada en corazón de rata tanto *in vitro* como *in vivo* (Van der Vusse,1998). Para aliviar la inactivación del complejo de la PDH, presumiblemente inducida por altos niveles de acetyl-CoA derivados de la oxidación de ácidos grasos (Hansford,1978), dicloroacetato (DCA) 5 mM, un inhibidor de la PDH cinasa (Whitehouse,1974), fue adicionado al medio de reperfusión. El DCA promovió la activación del complejo de la PDH únicamente en el corazón HTG (Cuadro 4.1). El DCA también activó el desempeño

## RESULTADOS I.

CUADRO 4.1. Glucólisis y actividades de PFK-I, PK y PDHa en tejido cardiaco.

	CONTROL	HTG
Velocidad de producción de lactato (10 mM GLU) $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ peso fresco	6.8 $\pm$ 1 n= 10	2.8 $\pm$ 1* n= 11
Glucosa-6-P (10 mM GLU) nmol/mg proteína	18 $\pm$ 5 n=4	52 $\pm$ 13** n=5
PFK-I (10 mM GLU) nmol NADH/min/mg proteína	30 $\pm$ 2 n=5	23 $\pm$ 1*
Citrato (10 mM GLU) nmol/g peso fresco	18 $\pm$ 2 n=7	26 $\pm$ 4 n=7
Citrato (1 mM OCT) nmol/g peso fresco	49 $\pm$ 3 n=3	119 $\pm$ 22** n=5
PK (10 mM GLU) nmol NADH/min/mg proteína	70 $\pm$ 7 n=4	57 $\pm$ 7 n=5
PDHa (10 mM GLU) nmol NADH/min/mg proteína	35 $\pm$ 3 n=7	20 $\pm$ 5* n=6
PDHa (10 mM GLU + DCA) nmol NADH/min/mg proteína	30 $\pm$ 3 n=4	34 $\pm$ 3 n=6

Los valores representa la media  $\pm$  error estándar. PFK-I, fosfofructocinasa tipo I, PK, piruvato cinasa y (PDHa) forma activa de la piruvato deshidrogenasa se determinaron de acuerdo a Materiales y Métodos \* P< 0.05, \*\*P<0.025 versus control

mecánico y el consumo de O<sub>2</sub> (Fig. 4.5), el cual fue más alto en el corazón HTG que en los controles. La aparente falla del DCA para elevar los niveles de PDHa en los corazones control indica que con GLU 10 mM, se obtuvo una activación total de la PDH. En este sentido, la activación total del complejo de la PDH por DCA se ha

## RESULTADOS I.

---

logrado usualmente en corazones perfundidos con GLU en presencia de ácidos grasos (Hansford,1989;Bünger 1984; Shöder,1998, Nienaber,1993; Sugden,1996,Bessman, 1981). De hecho, cuando los corazones fueron reperfundidos con OCT 0.1 mM como único substrato oxidable, el nivel de PDHa disminuyó a  $7.5\pm 0.4$  nmol/mg prot/min ( $n=5$ ), el cual es aproximadamente el 16% del nivel máximo; la adición de DCA 5 mM a corazones reperfundidos con OCT, promovió la activación total del complejo de la PDH,  $43\pm 4$  nmol/mg prot/min ( $n=4$ ). De forma interesante, el 66% de estimulación de la actividad de la PDHa por DCA fue acompañada por solo un incremento de 27% en el desempeño mecánico de los corazones HTG. A pesar de que no se esperaba una correlación lineal, la escasa recuperación en el desempeño mecánico inducido por el DCA, a pesar de la activación total de la PDHa, sugirió de nuevo que otros pasos en las vías de utilización de ATP fueron alterados. En la búsqueda de una posible inhibición por producto de la actividad de la PDHa por altos niveles de acetil-CoA, los corazones fueron reperfundidos con GLU en presencia de L-carnitina 10 mM. En los corazones control, la reperfusión con L-carnitina provocó una disminución del  $20\pm 2.3\%$  en el desempeño mecánico, así como una disminución del  $30\pm 5\%$  en el consumo de  $O_2$ . En contraste, en los corazones HTG, se observó un ligero incremento en ambos parámetros ( $7\pm 4$  y  $13\pm 1\%$ ), sugiriendo que un nivel inhibitorio de acetil-CoA está presente en el corazón HTG.

### Sistema de la creatina cinasa

Puesto que el ATP usado directamente en la contracción miofibrilar surge de su regeneración por la isoenzima miofibrilar CK (Bessman, 1981;Wallimann, 1992), los niveles de los componentes de tal sistema fueron determinados. En el corazón HTG se observó una marcada disminución en los niveles de ATP y de PCr. La actividad total de la CK fue también más baja en los corazones HTG y la

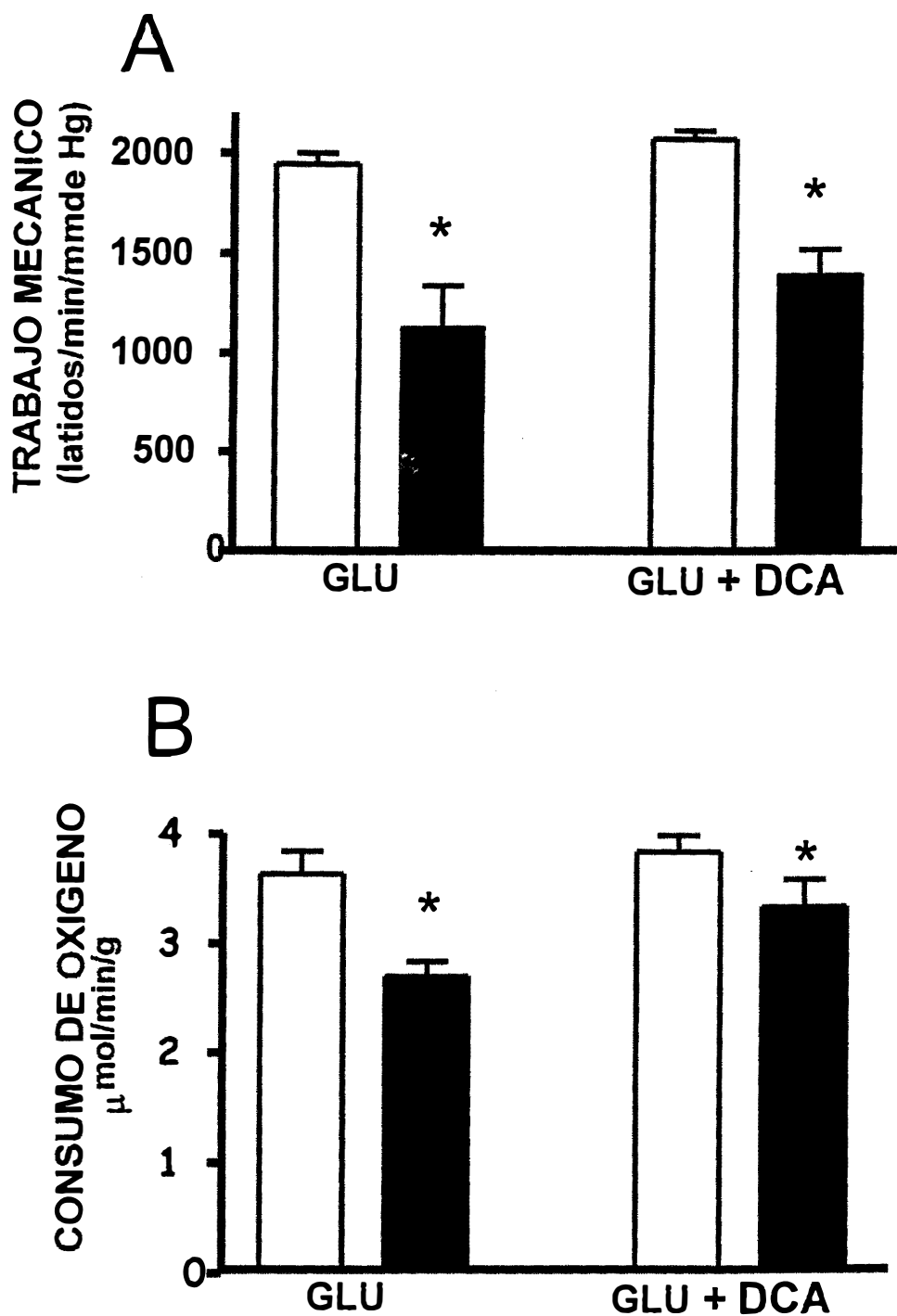


Fig. 4.5. Efecto del dicloracetato (DCA 5 mM) en el trabajo mecánico (A) y consumo de oxígeno (B) en corazones de ratas control (barras blancas) y HTG (barras oscuras) perfundidos con glucosa 10 mM. \* indica  $P < 0.05$  versus control.

mayoría de esta actividad correspondió a la isoenzima citosólica MB (Cuadro 4.2). En contraste, los niveles de ATP y de PCr en corazones HTG reperfundidos con OCT fueron similares a los de los corazones control reperfundidos con GLU. La hipertrigliceridemia no fue causante de alguna modificación en el contenido total de creatina. Aunque el contenido de ADP en los corazones HTG también disminuyó (datos no mostrados), dichos valores correspondieron al ADP total el cual en su mayoría se encuentra unido a proteína y tiene poca relevancia fisiológica (Kammermeier, 1993). No obstante, los niveles de adenín nucleótidos fueron similares a los ya reportados (Sellevold,1986). Además, la relación entre ATP y PCr también fue similar a valores previamente determinados (Neubauer, 1998).

## DISCUSIÓN

### Oxidación de substratos

La reperfusión con diferentes substratos permitió identificar las vías individuales que proveen de ATP al miocardio. De este modo, al perfundir los corazones HTG con GLU, LAC o PIR, se obtuvo una marcada disminución de la PIV, lo cual indica un severo bloqueo en la vía de degradación oxidativa de estos substratos. En contraste, los valores de oxidación de ácidos grasos y de cuerpos cetónicos por los corazones HTG fueron muy cercanos a los de corazones controles. De hecho, la oxidación de OCT se mantuvo más alta en los corazones HTG, aunque no hubo diferencias significativamente estadísticas. El desacoplamiento de la fosforilación oxidativa por ácidos grasos (Rotenberg,1990) podría estar involucrado en el incremento del consumo de O<sub>2</sub> obtenido con OCT. Sin embargo, esta interpretación puede ser descartada dado que el desempeño mecánico también aumentó ligeramente tanto en corazones HTG como en los controles.

CUADRO 4.2. Componentes del sistema de la Creatina Cinasa (CK)

nmol/mg proteina	CONTROL (10 mM GLU)	HTG (10 mM GLU)	HTG (1 mM OCT)
ATP	23±3 n=5	14±3 <sup>a</sup> n=5	18±2 <sup>b</sup> n=5
PCr	30±5 n=5	19±4 <sup>a</sup> n=6	25±2 <sup>b</sup> n=4
Cr	125±12 n=5	129±15 n=5	Nd
CK nmol/min/mg proteina	20±4 n=8	12±3 n=7	Nd
Fración MB % de CK total	91±4 n=6	74±5 <sup>c</sup> n=6	nd

Los valores representan la media ± error estándar. <sup>a</sup> P<0.05 versus control; <sup>b</sup> P<0.05 versus HTG+GLU; <sup>c</sup> P<0.01 versus control. nd, no determinado.

Se ha reportado que la deficiencia en el transporte de ácidos grasos es responsable del daño en su oxidación, esto se ha observado en algunas cardiopatías tales como la cardiomiopatía diabética, hipertrofia e insuficiencia cardiaca congestiva (Rodriguez, 1992; Smolenski,1998). En muchos casos, este daño es debido a un bajo contenido y a un suministro insuficiente de L-carnitina, la coenzima esencial de la carnitina-palmitoil-transferasa-I (CPT-I) (Paulson,1998). Sin embargo, dicha

posibilidad puede ser eliminada en el corazón HTG, dado que las velocidades de oxidación de palmitato obtenidas en corazones control y HTG fueron similares.

Otra vía evaluada en los corazones HTG fue la oxidación de cuerpos cetónicos. A pesar de que esta vía provee energía sólo en extremas condiciones metabólicas tales como la inanición y el ayuno, se ha demostrado que el corazón de rata aislado y reperfundido es capaz de oxidar cuerpos cetónicos sin previo ayuno cuando estos metabolitos están disponibles (Jeffrey,1995). Sin embargo, y como es de esperarse en corazones de animales sin previo ayuno, tanto el desempeño mecánico como el consumo de O<sub>2</sub> en el corazón control fue significativamente más bajo con  $\beta$ -OH que con cualquier otro substrato utilizado. En contraste, en el corazón HTG, la oxidación de  $\beta$ -OH mejoro el desempeño mecánico y el consumo de O<sub>2</sub> en comparación con GLU, indicando que la provisión de esqueletos de carbono, a partir de la oxidación de cuerpos cetónicos, al ciclo de Krebs no fue alterada en el corazón HTG.

En contraste con los reportes que indican alteraciones en las enzimas del ciclo de Krebs y de la fosforilación oxidativa, asociados con algunas enfermedades cardiacas (Antozzi, 1997; Lucas,1999), nuestros datos de perfusión con ácidos grasos indican que la síntesis mitocondrial de ATP (y el desempeño mecánico) no fue afectada en el corazón HTG. Velocidades bajas de respiración y de desempeño mecánico también han sido asociadas con incrementos de la masa cardiaca, lo cual no se acompaña con un incremento de la vascularización, produciéndose así una hipoxia parcial (Kalsi, 1999; Hak,1993). En los corazones HTG no hubo desarrollo de hipertrofia aparente; en consecuencia, las vías oxidativas no se encuentran comprometidas por un suministro deficiente de O<sub>2</sub>. Por lo tanto, la disminución en el consumo de O<sub>2</sub> y en el desempeño mecánico en el corazón HTG perfundido con GLU, LAC o PIR están relacionados con una alteración tanto de la vía glucolítica como la del transporte de PIR y su descarboxilación oxidativa.

### Metabolismo de glucosa

El daño en el metabolismo de la glucosa frecuentemente se desarrolla en enfermedades cardiovasculares. Por ejemplo, en el corazón diabético, varios pasos como el transporte y fosforilación de glucosa y las actividades de algunas otras enzimas glucolíticas son severamente alterado (Rodrigues, 1998). Con base en esto, examinamos la oxidación de la GLU en el corazón HTG. Mediante la aplicación externa de un estímulo eléctrico, lo cual es una forma eficiente de activar la oxidación de glucosa (El Alaoui-Talibi, 1997) y de sobrecargar el trabajo mecánico del corazón (Goodwin,1998, Mekhfi,1996), determinamos que los corazones HTG no fueron capaces de desarrollar niveles comparables de PIV y de consumo de O<sub>2</sub> con los desarrollados por los corazones control bajo una concentración limitante o saturante de glucosa. La captación de glucosa en el músculo cardiaco es deficiente en algunas enfermedades cardiacas, principalmente en el corazón diabético donde se presenta resistencia a insulina (Stanley, 1997). En el modelo de rata hipertrigliceridémica, se han reportado perturbaciones sobre la acción de la insulina (Klimes, 1995). Sin embargo, la captura de glucosa no parece ser un paso limitante para su oxidación en el corazón HTG, puesto que la insulina no reestableció el desempeño mecánico. Además, las velocidades de transporte de glucosa y de fosforilación podrían descartarse de ser posibles sitios blanco en el corazón HTG, dado que el contenido de PFK-I disminuyó ligeramente, pero el nivel de glucosa-6-fosfato se incremento, y la PK no se afectó.

La menor actividad de la PFK-I en el corazón HTG podría estar relacionada con un proceso degenerativo, el cual es promovido por la generación de radicales libres, proceso inducido en este modelo (Carvajal, 1999). Más aún, hay anomalías en el metabolismo de lípidos que afectan la actividad de la PFK-I e inhiben a esta enzima, principalmente son altos niveles de ATP y citrato, los cuales se acumulan al ocurrir altas velocidades de oxidación de ácidos grasos (Jucker, 1997). Debido a

esto, bajo una condición de estado estacionario, una fuerte inhibición de la PFK-I es probable que ocurra en los corazones HTG, debido a la alta concentración inhibitoria de citrato, resultando así el incrementado nivel de glucosa-6-P. Esto último podría explicar las velocidades glucolíticas menores en los corazones HTG.

### Actividad de la PDH

La oxidación deprimida de PIR y LAC en los corazones HTG indicó que hay alteraciones en los pasos que conectan la glucólisis y la fosforilación oxidativa: el transporte de piruvato y la actividad de la PDH. De hecho, la observación de que en los corazones HTG perfundidos con PIR se revierte en cierta medida el daño observado con GLU, apoya la idea de que la oxidación de PIR es otro paso alterado en la hipertrigliceridemia. Como productos finales de la oxidación de ácidos grasos, el NADH y la acetil-CoA activan a la PDH cinasa (Kerbey, 1976; Latipää, 1985); no fue sorprendente encontrar niveles más bajos de la forma activa de la enzima en los corazones HTG. La adición de DCA indujo un incremento en el consumo de  $O_2$  en los corazones HTG a valores cercanos a los de los corazones control; el desempeño mecánico de los corazones HTG reperfundidos con DCA también condujo a valores más altos, pero éstos fueron todavía menores que los desarrollados por los corazones de animales control. Esto nos sugiere que la hipertrigliceridemia también afecta otros sitios en las vías de utilización de ATP o de la maquinaria contráctil.

### Sistema de la creatina cinasa

Se midió la eficiencia del sistema de la creatina cinasa, con el fin de elucidar por qué la síntesis de ATP a través de la fosforilación oxidativa no es suficiente para que los corazones HTG desarrollen un trabajo mecánico similar al del control a pesar de que tengan velocidades de consumo de  $O_2$  similares. El sistema de la CK funciona como un reservorio de ATP, y también como un sistema de transferencia

## RESULTADOS I.

---

directa de ATP, proveyendo así la difusión de energía vía el transporte de PCr/Cr y de igual forma para mantener niveles óptimos de ATP/ADP (Harrison, 1999). Al oxidar GLU, los corazones HTG experimentaron una severa disminución de los niveles de PCr y ATP así como de la actividad de la CK. En consecuencia, la disminución en la síntesis de ATP mitocondrial y su transferencia hacia las miofibrillas contribuyó a la disminución del desempeño mecánico. Sin embargo, cuando la producción de ATP fue alta, tal como ocurrió cuando los ácidos grasos se usaron como sustratos oxidables, se puede compensar la baja actividad de la CK y la transferencia de energía para obtener una función contráctil adecuada del miocardio. De hecho, la disfunción mecánica en el corazón ha sido asociada con bajas cantidades de PCr, sugiriendo una baja actividad de la CK (Starling, 1998). La disminución tanto en el contenido como en la actividad de la CK se ha asociado a daño por estrés oxidativo, dado que existe una mayor susceptibilidad de la CK a los radicales libres (Hayasahi,1998; Mekhfi,1996). En efecto, en la rata HTG, se ha postulado una exacerbación del estrés oxidativo (Carvajal, 1999; El Hafidi,1997). En este sentido, se ha propuesto que los radicales libres reprimen el flujo glucolítico atacando a nivel de ciertas enzimas blanco como la PFK-I Y la GAPDH, entre otras.

Estos datos en conjunto indican que la hipertrigliceridemia altera las vías metabólicas involucradas en la producción de energía en el corazón. Bajo condiciones fisiológicas normales la energía es provista esencialmente por la oxidación de ácidos grasos (Neely,1974), por lo que no es de esperar alteraciones de la función contráctil en el corazón HTG. Sin embargo, bajo condiciones de estrés, tales como una sobrecarga de trabajo o isquemia, donde la producción de ATP vía glucólisis toma relevancia, un metabolismo alterado en los corazones HTG podría comprometer la viabilidad del órgano. Bajo tales circunstancias, la participación del ATP glucolítico en el mantenimiento de la función cardiaca resulta esencial (Cargnoni, 1996). Ciertamente, la extensión del daño depende de

## RESULTADOS I.

---

las velocidades de glucólisis durante y después del periodo de isquemia (Vanoverschelde, 1994). El flujo glucolítico aeróbico depende esencialmente de las actividades de las enzimas regulatorias, tales como la hexocinasa, PFK-I y la PDHa. De hecho, la recuperación mecánica del miocardio se encuentra estrechamente asociada con la actividad de la PDHa, sugiriendo que la oxidación de la glucosa no solo es relevante durante la isquemia, sino también durante la reperfusión.

En conclusión, este trabajo demuestra que el desarreglo metabólico inducido por dislipidemias, es un paso no solo para el entendimiento de los mecanismos que conducen a estados patológicos en el miocardio, sino también un blanco para intervenciones terapéuticas.

---

**CAPITULO 5**  
**RESULTADOS II**

---

## DESACOPLAMIENTO ENTRE LOS SITIOS PRODUCTORES Y CONSUMIDORES DE ENERGÍA EN EL CORAZÓN HTG.

La actividad cardiaca llevada a cabo principalmente por la maquinaria contráctil, depende esencialmente del ATP generado a través de la fosforilación oxidativa (FO). Para asegurar el suministro directo de ATP desde su sitio de producción hasta el sitio de utilización existe un sistema de transferencia directa mediado por la creatina cinasa (CK). En la hipertrigliceridemia inducida por el consumo elevado de carbohidratos, de la cual manejamos como modelo a la rata HTG, la actividad cardiaca se encuentra disminuida cuando la fuente de energía es glucosa. Sin embargo, en esta condición se hace evidente también un desacoplamiento entre la producción de ATP, medida como consumo de oxígeno, y su utilización, medida como actividad contráctil, en el corazón aislado. Para identificar la naturaleza de este desacoplamiento hemos evaluado la contribución de los diferentes sistemas involucrados: a) Las diferentes isoenzimas de creatina cinasa, principalmente la mitocondrial; y b) la adenilato cinasa, AK, enzima que participa también en la transferencia energética y mantenimiento de los niveles celulares de ATP/ADP. Además se evaluó la función mitocondrial de corazones de ratas HTG incluyendo la respiración con diferentes sustratos, así como la permeabilidad de la membrana interna y la actividad de enzimas claves en la producción de energía.

\* Este trabajo se encuentra en preparación para ser enviado y publicado en la revista Biochimica et Biophysica Acta.

### RESULTADOS.

#### Creatina cinasa mitocondrial y adenilato cinasa.

Cuando los corazones de ratas HTG son perfundidos con glucosa se hace evidente un desacoplamiento entre la producción de energía, medida como consumo de O<sub>2</sub> y su utilización, medida como trabajo cardiaco (Fig. 4.3). El punto de conexión entre estos dos fenómenos es la transferencia de energía desde los sitios productores hasta los sitios de utilización, medida por los sistemas de la creatina cinasa, la adenilato cinasa, y la fosforilación oxidativa.

La actividad de la creatina cinasa mitocondrial (CKmit) se evaluó en mitocondrias aisladas de corazones HTG y controles, medida como la estimulación ejercida por el ADP generado a través de este sistema sobre la respiración con  $\alpha$ -cetoglutarato 10 mM. La actividad de CKmit en los corazones HTG resultó ser alrededor de un 50% mas baja que en los corazones controles (Fig 5.1); estos valores son semejantes a los reportados por otros autores (Saks,1986) Sin embargo, cuando la actividad de la CKmit se evaluó directamente en homogenados mitocondriales por métodos enzimáticos no se encontró esta diferencia (Fig.5. 2A). A fin de averiguar si esta inconsistencia se debía a cuestiones metodológicas o si bien nos estaba dando otro tipo de información, determinamos la actividad de Ckmit en extractos

**CREATINA CINASA  
MITOCONDRIAL  
(ESTIMULACIÓN DE LA  
RESPIRACIÓN)**

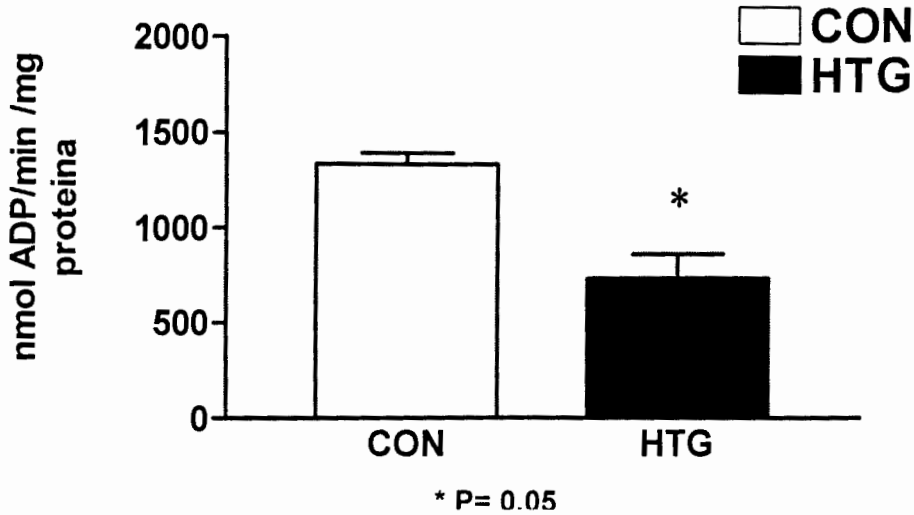


Fig. 5.1. Actividad de creatina cinasa mitocondrial en mitocondrias frescas de corazón, medida como estimulación de la respiración con  $\alpha$ -cetoglutarato 10 mM. La velocidad de producción de ADP se calculó de acuerdo a la relación ADP/O calculada para la misma preparación en presencia del mismo sustrato y con 800 n moles de ADP. La relación ADP/O para ambos grupos varió entre 2.5 y 2.8.

mitocondriales omitiendo la adición del agente reductor DTT, pues el mayor daño producido en la actividad de la CK se debe a la oxidación de grupos tioles esenciales en la proteína (Konorev, 2000, Hurne, 2000) los cuales pueden oxidarse fácilmente por estrés oxidativo. Cuando se evaluó la actividad de CK espectrofotométricamente en estas condiciones, encontramos que la actividad de CKmit en mitocondrias de corazones HTG sin DTT es significativamente menor que la actividad encontrada en presencia de DTT, mientras que en las mitocondrias de corazones controles, no varió la actividad en presencia o en ausencia de DTT (Fig, 5.2b).

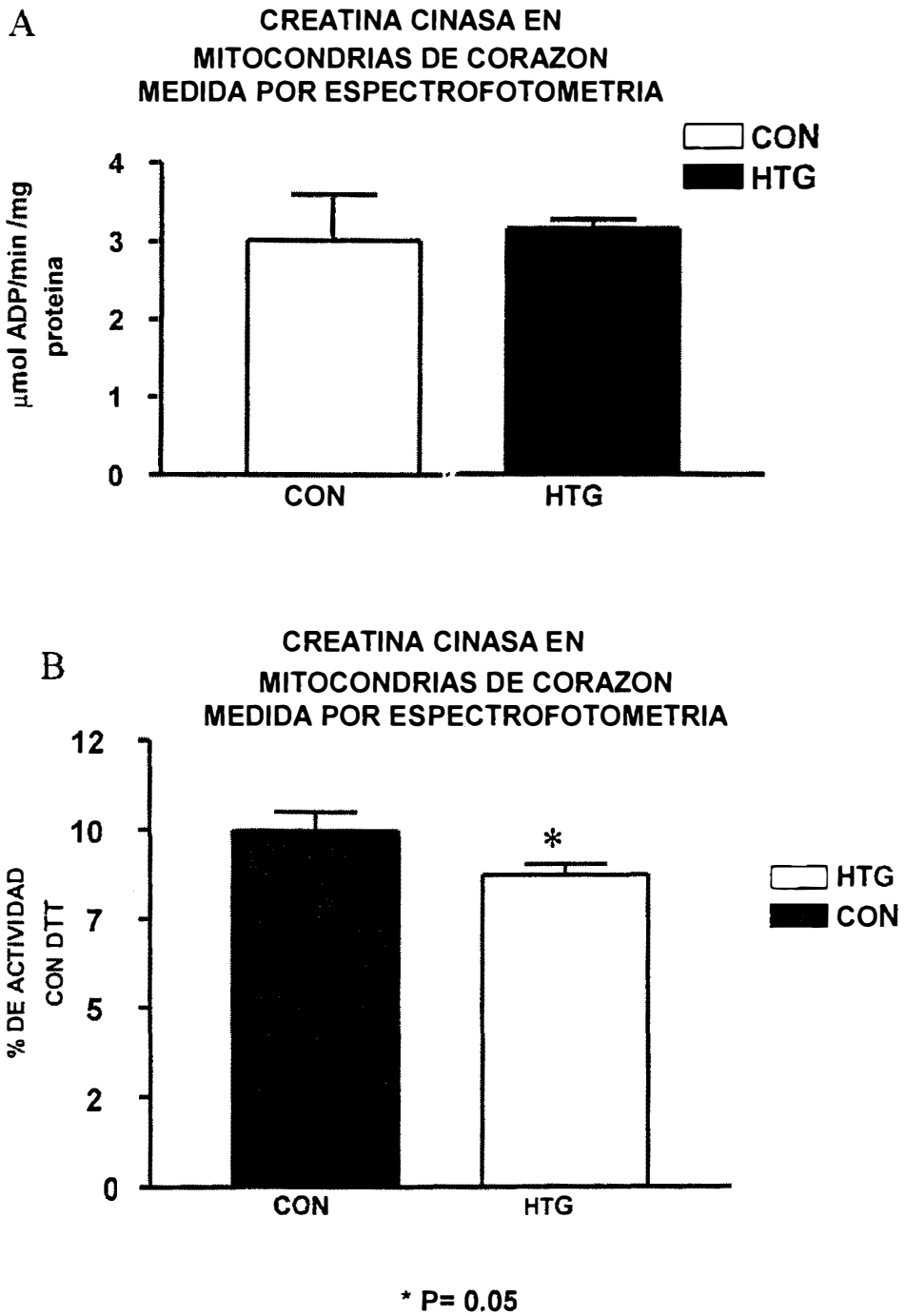


Fig.5.2 Actividad de creatina cinasa mitocondrial en extractos mitocondriales (CKmit) medida por espectrofotometría en presencia de 1mM de DTT (A) y en ausencia de DTT (B), expresada como el porcentaje de la actividad con respecto a la encontrada con DTT.

## RESULTADOS II

Otro sistema involucrado en la transferencia de ATP desde los sitios de producción hacia los sitios de utilización es la adenilato cinasa (AK), la cual contribuye también a mantener los niveles de la relación ATP/ADP. En homogenados de tejido de corazón esta actividad se encontró discreta pero significativamente disminuida en corazones HTG, con respecto a los controles (Fig. 5.3)

Respiración mitocondrial.

El otro sistema involucrado en la producción y transferencia energética en corazón es precisamente el sitio productor de energía. Por lo tanto se evaluó la capacidad de fosforilación oxidativa en mitocondrias intactas de corazones de ratas HTG y controles y se determinó la velocidad de respiración en estado 3 (estimulada con ADP) utilizando varios sustratos oxidables. En las mitocondrias de corazones HTG, la velocidad de respiración con  $\alpha$ -cetoglutarato 10 mM, al igual que con piruvato/malato 5 mM, resultó ser significativamente mayor con respecto a los controles (Cuadro 5.1). Con sustratos como succinato 10 mM en presencia de rotenona 2  $\mu$ M y glutamato/malato 5 mM se observó una tendencia a una mayor respiración en las mitocondrias de corazones HTG, aunque no se alcanzó diferencia estadísticamente significativa. Es importante señalar que este incremento en la respiración no podría ser atribuido a un desacoplamiento de las mitocondrias HTG ya que los controles respiratorios para mitocondrias de corazones HTG osciló entre 8 y 12, mientras que para las de corazones controles osciló entre 6 y 8 con  $\alpha$ -cetoglutarato como sustrato. Se evaluó también la

respiración desacoplada con CCCP utilizando una concentración de 1.2  $\mu\text{M}$ , la cual resultó, en experimentos previos, ser la concentración con la cual se alcanzó la máxima estimulación utilizando como sustrato  $\alpha$ -cetoglutarato (cuadro 5.1.). Sin embargo, como puede observarse en el cuadro 5.1, la respiración desacoplada es menor que con cualquiera de los sustratos utilizados, esto podría deberse a que la concentración utilizada ejerce un efecto inhibitorio, por lo que debe explorarse esta posibilidad.

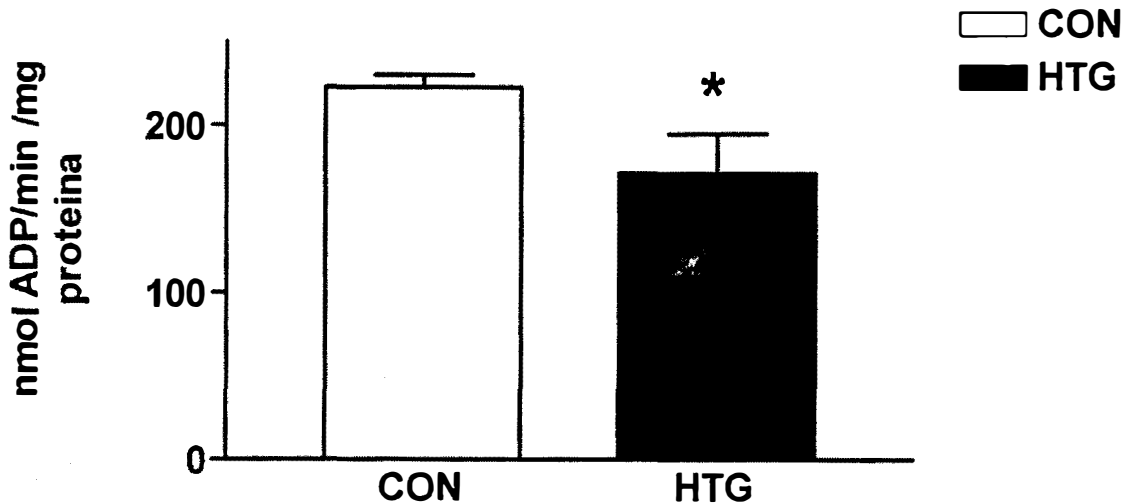
Cuadro 5.1. RESPIRACIÓN DE MITOCONDRIAS DE CORAZÓN DE RATA

ESTADO 3 .ng átomo de  $\text{O}_2$  / min / mg proteína

SUSTRATO	CONTROLES	HTG
$\alpha$ -keto 10 mM	291 $\pm$ 77 n= 7	376 $\pm$ 85* n=7
glu/mal 5 mM	253 $\pm$ 67 n=6	303 $\pm$ 79 n=6
pyr/mal 5 mM	289 $\pm$ 157 n=3	415 $\pm$ 103* n=3
cccp1.2 $\mu\text{M}$	240.2 $\pm$ 39.7 n=6	314.3 $\pm$ 59.0 n=6
Succinato 10 mM	322.3 $\pm$ 62.9 n= 8	459.5 $\pm$ 77.58 n= 8

Los valores representan la media  $\pm$  la desviación estándar de n diferentes preparaciones mitocondriales.  $\alpha$ -keto:  $\alpha$ -cetoglutarato, glu/mal: glutamato/malato, pyr/mal: piruvato/malato. \* Diferencia estadísticamente significativa  $P < 0.05$ .

### ADENILATO CINASA EN HOMOGENADO DE CORAZON



**\*P ≤ 0.05**

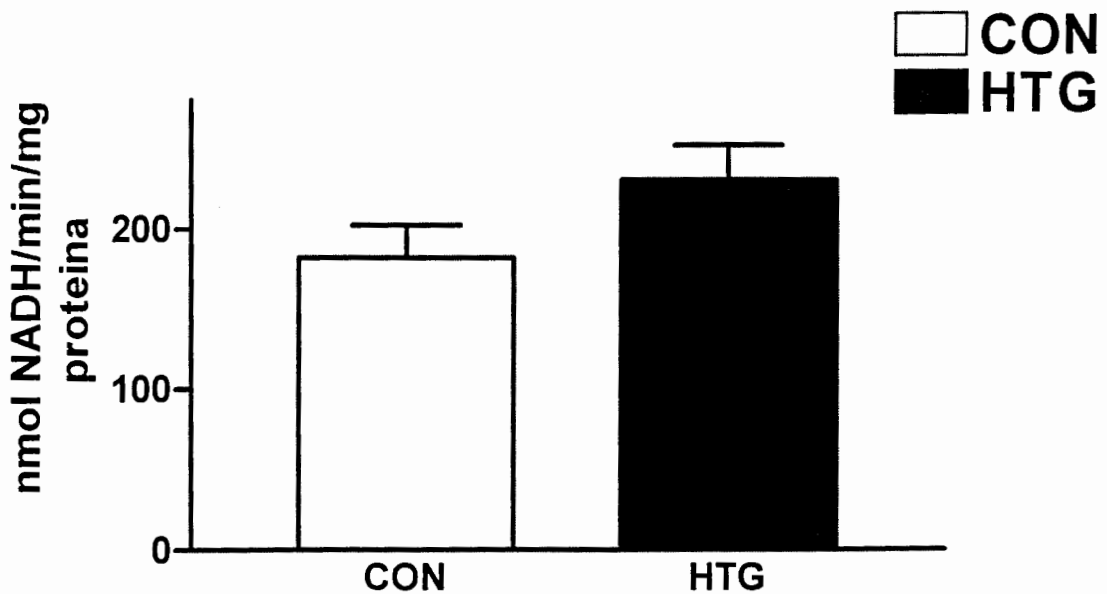
Fig.5.3. Actividad de adenilato cinasa en homogenados totales de corazón.

Enzimas respiratorias y contenido de citocromos.

Para tratar de entender el aumento en la respiración mitocondrial encontrado en las mitocondrias de corazones HTG, evaluamos el contenido de algunas enzimas respiratorias, para lo cual medimos la actividad de la citocromo c oxidasa, y el contenido de citocromos b, c y a. La actividad de TMPD-oxidasa medida a 30 °C en mitocondrias frescas permaneció constante en ambos grupos, así como el contenido de citocromos b, c, c<sub>1</sub>, a y a<sub>3</sub> (cuadro 2). Estos datos implican que el

aumento de la respiración en mitocondrias de corazones controles no puede deberse a un aumento del contenido de citocromos, en cambio al evaluar la actividad de la enzima  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa en condiciones de velocidad máxima, encontramos un incremento significativo (Fig. 5.4).

### $\alpha$ -CETOGLUTARATO DESHIDROGENASA EN MITOCONDRIAS DE CORAZON



\*P<0.05

Fig. 5.4. Actividad de  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa en mitocondrias de corazón, controles CON, y HTG. La actividad se midió en condiciones de velocidad máxima, como se indica en la metodología.

Cuadro 5.2. CITOCROMO OXIDASA Y CONTENIDO DE CITOCROMOS

EN MITOCONDRIAS DE CORAZÓN DE RATA

	CONTROLES	HTG
TMPD-OXIDASA ng átomo de O <sub>2</sub> /min / mg proteína	6500±2500 n= 3	8000±2900 n=3
CITOCROMOS b nmol/mg prot. mit	0.13±0.004 n=3	0.14±0.28 n=3
CITOCROMOS c+c <sub>1</sub> nmol/mg prot. mit	0.25±0.07 n=3	0.26±0.04 n=3
CITOCROMOS a+ a <sub>3</sub> nmol/mg prot. mit	0.21±0.08 n=3	0.21±0.04 n=3

Potencial y fluidez membranal.

El aumento de la respiración podría deberse también en un aumento de la rigidez de la membrana o a un incremento de colesterol, lo que implica una disminución de la "fuga de protones" y aumento del potencial transmembranal. El potencial transmembranal fue evaluado utilizando la distribución diferencial del catión lipofílico tetrafenil fosfonio. El uso de esta técnica nos permite obtener una alta sensibilidad y detectar cambios pequeños en el potencial transmembranal. En el cuadro 5.3 se observan los potenciales determinados en preparaciones frescas de

mitocondrias con  $\alpha$ -cetoglutarato y succinato como sustratos en estado basal (Edo 4 de la respiración) y estimulados con ADP (Edo 3 de la respiración) . Puede observarse un incremento en el potencial transmembranal en Edo 3 de alrededor de 10 mV en mitocondrias de corazones HTG con  $\alpha$ -cetoglutarato como sustrato, lo cual representa un incremento significativo en la síntesis de ATP.

Por otro lado se determinó la composición de ácidos grasos de las membranas mitocondriales a fin de encontrar cambios en el grado de insaturación inducidos por la hipertrigliceridemia. En el cuadro 5.4 se muestra el contenido de diferentes ácidos grasos saturados e insaturados cuantificados e identificados por cromatografía de gases. En las mitocondrias de corazones HTG se encontró un

Cuadro 5 3. POTENCIAL TRANSMEMBRANAL DE MITOCONDRIAS DE CORAZÓN DE RATA mV

SUSTRATO	EDO 4	EDO 3
CON $\alpha$ -keto 10mM	161.8 $\pm$ 5.4 n= 3	130.5 $\pm$ 13 n=3
HTG $\alpha$ -keto 10mM	160.0 $\pm$ 5.3 n=3	139.7 $\pm$ 6.2 n=3
CON Succinato 10mM	159.6 $\pm$ 7.2 n=3	126.5 $\pm$ 3.8 n=3
HTG Succinato 10mM	153.6 $\pm$ 11.3 n=2	130.6 $\pm$ 2.9 n=2

## Cuadro 5.4. COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE MITOCONDRIAS DE CORAZÓN

(Porcentaje de cada ácido graso con respecto al total de ácidos grasos presentes.)

	<b>CONTROLES</b> n= 5	<b>HTG</b> n=5
<b>Palmitoleico</b> <b>C16:1n-7</b>	<b>1.48 ± 0.31</b>	<b>4.34 ± 2.1</b>
<b>Oleico</b> <b>C18:1n-9</b>	<b>10.82 ± 1.16</b>	<b>14.64 ± 0.29**</b>
<b>Palmitico</b> <b>C16:0</b>	<b>12.87± 0.4</b>	<b>18.06± 0.95**</b>
<b>Estearico</b> <b>C18:0</b>	<b>18.68± 0.88</b>	<b>17.38± 0.76</b>
<b>Linoleico</b> <b>C18:2n-6</b>	<b>16.81± .48</b>	<b>14.72±1.92</b>
<b>γ-linolénico</b> <b>C18:3n-6</b>	<b>1.17± 0.56</b>	<b>0.63± 0.17</b>
<b>Dihomo γ-linolénico</b> <b>C20:3n-6</b>	<b>0.51 ± 0.10</b>	<b>0.63± .06</b>
<b>Araquidónico</b> <b>C20:4n-6</b>	<b>15.18 ± 0.78</b>	<b>11.65± 0.42*</b>
<b>Eicosapentaenoico</b> <b>C20:5n-3</b>	<b>0.37 ± 0.05</b>	<b>0.57± 0.13</b>
<b>Docosapentanoico</b> <b>C22:5n-3</b>	<b>2.29 ± 0.32</b>	<b>1.68±0.46</b>
<b>Docosahexanoico</b> <b>C22:6n-3</b>	<b>12.83 ±1.75</b>	<b>10.8 ± 1.26</b>
<b>Saturados</b>	<b>31.55± 0.75</b>	<b>35.43± 0.81**</b>
<b>Monoinsaturados</b>	<b>13.09 ± 1.17</b>	<b>27.63± 1.93**</b>
<b>AGPI (n-6)</b>	<b>33.68 ± 1.63</b>	<b>27.63 ±1.93*</b>
<b>AGPI (n-3)</b>	<b>19.07± 1.81</b>	<b>15.92±1.65</b>

\*P&lt; 0.05. AGPI.: Acidos grasos polinsaturados.

## RESULTADOS II

importante en el contenido de ácido araquidónico, precursor importante de prostaglandinas y prostaciclina. El balance de ácidos grasos saturados e insaturados se modificó de manera importante en el estado hipertiglicéridémico, aumentando el contenido de ácidos grasos saturados y monoinsaturados totales, mientras que los ácidos grasos polinsaturados n-6 y n-3 tuvieron una disminución significativa.

## DISCUSIÓN.

Actividad de creatina cinasa mitocondrial.

La creatina cinasa mitocondrial se localiza en el espacio intermembranal, en los sitios de contacto entre la membrana interna y la externa de tal forma que puede utilizar directamente el ATP generado intramitocondrialmente para generar fosfocreatina, la cual es exportada hacia el citosol donde sirve como un metabolito acarreador de energía fácilmente difundible hacia los sitios de utilización de energía (Walliman, 1994). El funcionamiento adecuado de este sistema de canalización de ATP depende entonces de cada uno de sus componentes, los sitios de producción y los de utilización. Si uno de ellos se encuentra alterado se perturbará consecuentemente el "circuito" energético.

En los corazones de ratas HTG, la actividad de creatina cinasa se encuentra disminuida, una fracción importante (al rededor del 30%) de la actividad total corresponde a la fracción mitocondrial. En estos corazones, la actividad de CKmit, medida como su acoplamiento a la fosforilación oxidativa, se encuentra

severamente disminuida. Sin embargo, este desacoplamiento no necesariamente puede deberse a una disminución en la cantidad de enzima, sino a su funcionalidad y estado de asociación ( Kaldis, 1995; Forstner, 1998, Schlattner, 2000 ). En este trabajo hemos podido dilucidar que la pérdida del acoplamiento del circuito de la CK se encuentra en los corazones HTG principalmente dado por una pérdida de la asociación funcional entre la CK mit y la fosforilación oxidativa, ya que cuando la actividad se mide directamente en extractos mitocondriales en el ensayo acoplado enzimáticamente y en presencia de DTT, la diferencia entre las mitocondrias de ratas HTG y controles se pierde. Estos datos sugieren además que posiblemente la isoforma mitocondrial se encuentre dañada, posiblemente por la oxidación de los grupos sulfhidrilos esenciales, sin embargo es necesaria más evidencia experimental para corroborar esta hipótesis.

La alta susceptibilidad de las diferentes isoformas de CK al daño por estrés oxidativo ha sido ya demostrada, y aunque pudiera pensarse que sí los grupos sulfhidrilos de esta enzima se encuentran oxidados, lo mismo debería de suceder con otras enzimas que contienen grupos sulfhidrilos esenciales como las deshidrogenasas del ciclo de Krebs. Sin embargo, ha sido demostrado que en preparaciones de fibras musculares, donde se conserva el acoplamiento entre las diferentes isoformas de la CK y la fosforilación oxidativa, son solamente las isoformas de CK las que se dañan bajo el efecto de estrés oxidativo controlado, mientras que otras actividades enzimáticas permanecen intactas ( Mekhfi, 1996) .

No se sabe aún con certeza la razón de la alta susceptibilidad de la CK al daño oxidativo, pero la localización y exposición de los residuos de cisteína esenciales en la unión de los adenín nucleótidos, así como los residuos que los rodean podrían estar involucrados (Kabsch, 1997). Hasta ahora no podemos decir que además de la isoforma mitocondrial otras isoformas citosólicas se dañen de igual manera y contribuyan al desacoplamiento en la transferencia de energía, aunque en experimentos previos habíamos demostrado que una parte importante de la fracción CKMB citosólica se encuentra también disminuida. Es necesario, no obstante, un escrutinio a detalle del cambio en isoformas de CK inducidos por el estado hipertrigliceridémico.

### Respiración mitocondrial.

La respiración de mitocondrias aisladas de corazones HTG no muestra una alteración en la función de la cadena respiratoria. Esto se correlaciona con los hallazgos en el órgano intacto, en donde la oxidación de sustratos no glucolíticos, como ácidos grasos y cuerpos cetónicos no presentaba disminución ni en el consumo de oxígeno ni en el desarrollo de trabajo mecánico. Sin embargo, el aumento del estado 3 de la respiración observado con sustratos como  $\alpha$ -cetoglutarato y piruvato/malato, se correlacionan también con el ligero aumento en el consumo de oxígeno observado en el corazón aislado de ratas HTG cuando se encuentran oxidando ácidos grasos. A pesar de que en el corazón aislado la oxidación de piruvato se encuentra disminuida, este resultado no contradice lo

encontrado en mitocondrias aisladas, donde la oxidación de piruvato no se ve afectada. Debe tenerse en cuenta primeramente que en el corazón aislado la disminución en la oxidación de piruvato obedecía principalmente a una disminución en la forma activa de la PDH, pero no en la cantidad de enzima total. En las mitocondrias aisladas se preserva la cantidad de enzima pero no la proporción fosforilada presente *in situ*, pues ya sea el proceso de aislamiento o bien la presencia de concentraciones saturantes de piruvato, pueden promover la forma activa de la enzima. En todo caso, los resultados de respiración con piruvato comulgan con el hecho de que en el órgano intacto la cantidad total de enzima es la misma en los corazones HTG que en los controles, y que por lo tanto, es la forma activa de ésta la que disminuye a consecuencia del ambiente metabólico proporcionado por el estado hipertrigliceridémico. Es también importante señalar que el sistema de piruvato acompañado de malato, genera también  $\alpha$ -cetoglutarato, del cual está aumentada su oxidación.

El aumento en la respiración podría deberse entonces a un aumento en la cantidad de cadena respiratoria, sin embargo, los resultados de respiración desacoplada y succinato indican que no es tan evidente este hecho. Más aún, el contenido de citocromos y la actividad de citocromo c oxidasa, no cambian significativamente en los corazones de ratas HTG.

Como el aumento mayor en la respiración se presenta cuando el sustrato oxidable es  $\alpha$ -cetoglutarato o bien sustratos asociados a la producción de  $\text{NADH}^+$ , se

cuantificó la actividad de la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa. El aumento en la actividad de esta enzima, parece estar asociado a una respuesta dependiente intrínsecamente del estado hipertriglicéridémico, dado que el aumento se presenta solamente a este nivel, al menos en los casos evaluados en este trabajo. A pesar de que se ha descrito que la hipertriglicéridemia provoca un aumento de hormonas tiroideas, y que podrían de algún modo explicar el aumento en la síntesis de esta enzima, en el modelo de rata HTG utilizado, los niveles de esta hormona son semejantes a los de ratas controles. ( $2.93 \pm 0.5$  para HTG vs  $3.1 \pm 0.6 \mu\text{g}/100\text{ml}$  para controles). Además el efecto de la hormona tiroidea afecta no sólo enzimas del ciclo de Krebs sino también de la cadena respiratoria como son el translocador de adenín nucleótidos, el complejo bc1, algunas subunidades de la FoF1 y la citocromo oxidasa (Pillar, 1997) si bien en este trabajo no ha sido evaluado el contenido de estas enzimas, los resultados de respiración y el contenido de citocromos indican que no existe un aumento significativo en la cantidad de enzimas de la cadena respiratoria, sino que más bien este aumento obedece a un aumento en la oxidación de sustratos ligados a la formación de  $\text{NADH}^+$ .

Composición y fluidez membranal.

El aumento en la actividad de la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa no es suficiente para explicar el aumento en la respiración observado en las mitocondrias de corazones HTG, lo que implica que algún otro componente podría modificarse por la hipertriglicéridemia; tal es el caso de la composición lipídica de las membranas.

En la rata HTG ha sido reportado un cambio importante de la actividad de ciertas desaturasas en hígado, y cambios en la composición de membranas en diferentes órganos (El Hafidi, 1999) . Sin embargo, este análisis no había sido reportado para mitocondrias de corazón. El perfil de ácidos grasos de las mitocondrias de corazones HTG señala un cambio importante en el contenido de ácidos grasos insaturados y saturados, favoreciendo la presencia de saturados y monoinsaturados que confieren mayor rigidez a la membrana. Una menor fluidez confiere un mejor acoplamiento del transporte de electrones y la síntesis de ATP, ya que disminuye la fuga de protones y permite la formación de potencial transmembranal de manera más eficiente. Esto se refleja en las mitocondrias de corazones HTG, en los que el potencial transmembranal es mayor. No obstante, la fluidez membranal está determinada además por el tipo de fosfolípidos que la conforman, y aún más, éstos pueden modificar la actividad de ciertas enzimas como el complejo  $bc_1$  y la adenín nucleótido translocasa (Bobyleva, 1997; Schlame, 2000). Los cambios que el exceso de triglicéridos sanguíneos y el aporte hacia el miocardio pudieran ejercer sobre el tipo de fosfolípidos queda aún por ser determinado.

En resumen, podemos decir que el desacoplamiento entre los sitios de producción y utilización de energía, el cual se evidencia cuando el sustrato oxidable es glucosa, se debe principalmente a una disminución en el sistema de transferencia de ATP,

principalmente de la creatina cinasa mitocondrial y adenilato cinasa, sin embargo, el estado hipertriglicéridémico desencadena un aumento en la vía oxidativa, principalmente dado por un aumento en las deshidrogenasas del ciclo de Krebs. Si este aumento es un proceso de compensación, o bien es el resultado meramente de la respuesta inducida por un exceso de sustrato (ácidos grasos), queda aún por resolverse.

CAPITULO 6  
DISCUSIÓN GENERAL

*...Voici mon secret: on ne voit bien qu 'avec le coeur. L 'essentiel est invisible pour les yeux.  
(...He aquí mi secreto: no se ve bien más que con el corazón. Lo esencial es invisible para los ojos...)  
Le petit prince. Antoine de Saint Exupéry*

Uno de los principales puntos que debe ser considerado cuando se habla de la función cardiaca es el suministro de energía a este órgano. Queda bien claro que la producción de ATP es un paso limitante en el funcionamiento del corazón. De hecho, en la mayoría de los padecimientos cardiovasculares existe una perturbación en la producción y utilización de energía. Sin embargo, uno de los principales puntos débiles en el conocimiento y tratamiento de tales padecimientos es saber si este déficit obedece al estado actual generado por el desarrollo de la enfermedad o si bien es la causa de, y prevalece durante el curso de la misma. Este trabajo deja en claro que el aporte energético en el corazón, y por ende su funcionamiento, depende mucho de los cambios metabólicos que se presenten, los cuales a su vez dependen de la presencia y de las concentraciones de ciertos metabolitos, es decir, el ambiente metabólico que prevalezca en un momento dado determinará el flujo en la producción de energía que mantiene funcional al órgano. Particularmente la hipertrigliceridemia, causa un desajuste a nivel de la oxidación de glucosa, el cual no es el sustrato preferencial para el corazón cuando trabaja en condiciones aeróbicas. Sin embargo, como se demostró en este trabajo, un cambio incluso a este nivel puede ocasionar un desbalance general en el resto del metabolismo, que puede hacerse evidente en situaciones de demandas energéticas fluctuantes.

Otro aspecto interesante que esclarece este trabajo, radica en que a pesar de no presentarse aún una disfunción palpable del órgano, los cambios y alteraciones a nivel metabólico existen. Este hecho abre la perspectiva de indagar más sobre el orden de acontecimientos que conducen al desarrollo de enfermedades cardíacas.

A pesar de que no se ha hecho un seguimiento suficientemente largo en el modelo de la rata hipertriglicéridémica, como para saber si este desequilibrio metabólico pudiera conducir al desarrollo de posteriores padecimientos o bien de agravarlos, los hallazgos de este estudio muestran una fuerte evidencia que así pudiera ser.

Por otro lado, en este trabajo se ha demostrado que las alteraciones en el funcionamiento cardíaco causadas por la hipertriglicéridemia, se deben principalmente a cambios en el metabolismo energético, muchos de los cuales pueden ser manipulados a distintos niveles. De hecho aquí mismo se demuestra que el uso de suplementos y algunas drogas como la L-carnitina y el dicloroacetato, pueden revertir el déficit energético causado por la hipertriglicéridemia. Este hallazgo abre una amplia gama de posibilidades referentes al uso del manejo y modulación del metabolismo como herramienta terapéutica, el cual empieza a ser aplicado en este y muchos otros campos de la medicina. La nueva propuesta subyacente de este trabajo es la utilización del apoyo metabólico, no en individuos que han desarrollado una enfermedad cardíaca avanzada, como la insuficiencia cardíaca o cardiomiopatía dilatada, sino en aquellos individuos que son susceptibles de padecerlas, por presentar un alto

## DISCUSIÓN GENERAL

número de factores de riesgo. De hecho, este estudio aporta una fuerte evidencia apoyando el mecanismo por el cual un factor de riesgo promueve el desarrollo de una enfermedad mayor, alterando discreta pero significativamente el metabolismo energético del órgano comprometido.

Es importante señalar que las alteraciones metabólicas no se dan exclusivamente a nivel del metabolismo energético, ni solamente en órganos altamente demandantes de energía como el corazón, sino que estas alteraciones pueden extenderse, en primer lugar, a otros órganos y a otras vías que puedan comprometer el funcionamiento integral del organismo. La propuesta concreta que puede obtenerse de este estudio es que dado que la mayoría de los procesos celulares dependen de un adecuado suministro de ATP, cualquier condición que altere la producción de este metabolito estará afectando de la misma manera las funciones celulares. Hasta qué punto la disminución en la producción de ATP puede afectar la función celular o del órgano, eso estará determinado por la dependencia de ésta por el ATP, o bien por el control que ejerza el ATP sobre el flujo de la vía o el desarrollo de la función. De hecho, en este trabajo es evidente que sólo cuando la producción de ATP disminuye significativamente, es decir cuando se oxida glucosa, se compromete la función global del órgano, mientras el suministro de ATP sea elevado, como ocurre cuando se oxidan ácidos grasos, incluso la disminución en el sistema de transferencia energética de la CK puede no ser

esencial. Este es un punto importante que debe tomarse en cuenta para posteriores estudios y aplicaciones del apoyo metabólico en enfermedades.

Hasta este punto se ha dejado claro que la deficiencia energética se debe principalmente a cambios en el ambiente metabólico de la célula cardiaca, sin embargo, en los mecanismos que conducen a estos cambios están involucrados no solamente la actividad y regulación de ciertas enzimas, sino también la actividad y regulación de ciertos genes. De hecho, en los últimos años y con el advenimiento de la conclusión del proyecto del genoma humano, se ha venido manejando el estudio y comprensión de la genética de las enfermedades complejas (Thomson,1999; Thomson,2001), en donde obviamente entran las enfermedades cardiovasculares, indicando que tales padecimientos obedecen no solamente a disfunciones de un solo gen, sino a la combinación de varios de ellos, y más aún, podemos agregarle ahora, a la modulación no genética del metabolismo intermediario. Debemos mantener en mente que cada evento biológico es el resultado de la interacción de los factores genéticos y los factores ambientales.

Por último, cabe mencionar que los estudios realizados en este trabajo muestran sólo una perspectiva del panorama general que constituye la hipertrigliceridemia y el metabolismo energético. Aún quedan muchas preguntas sin respuesta, como por ejemplo los cambios discretos que ocurren en el perfil de las isoformas de la creatina cinasa y cómo éstos pueden afectar el metabolismo energético del corazón., lo cual constituye un amplio espectro de investigación futura.

CAPITULO 7  
PERSPECTIVAS

A partir de este trabajo en el que hemos demostrado que la hipertigliceridemia tiene serias repercusiones sobre el metabolismo energético, pueden ser propuestos varios estudios posteriores que contribuyan a esclarecer más detalladamente el mecanismo bioquímico por el cual la hipertigliceridemia sea considerada un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

DETERMINACIÓN DEL CAMBIO EN EL PERFIL DE ISOFORMAS DE LA CREATINA CINASA EN CORAZÓN.

En este trabajo encontramos que las isoformas mitocondrial y MB citosólica de la creatina cinasa se encuentran disminuidas, al menos en actividad. Queda entonces por esclarecer si esta disminución en la actividad se debe a que hubo una disminución en la cantidad de enzima total, o bien si es la respuesta a cambios en el ambiente metabólico, tal como el estado redox . También es necesario averiguar si las otras isoenzimas, las fracciones citosólicas MM y BB se han modificado en respuesta al estado hipertriglicéridémico.

En este sentido además, es sabido que en algunas patologías cardiovasculares el estado de oligomerización de la CKmit se encuentra alterado, favoreciendo la presencia de tetrámeros en lugar de octámeros, lo cual disminuye la actividad total

de la fracción. Proponemos entonces que sería interesante determinar si la disminución en la actividad de CKmit que encontramos en este trabajo se deba a una disminución de la cantidad de enzima, o bien a alteraciones en su estructura que modifiquen su actividad. Este estudio permitiría también esclarecer los mecanismos que favorecen estos diferentes estados de oligomerización, ya que no hay evidencias contundentes sobre este aspecto.

### DISTRIBUCIÓN DE CONTROL METABÓLICO DE LA FOSFORILACIÓN OXIDATIVA EN EL CORAZÓN HIPERTRIGLICERIDÉMICO.

De acuerdo a la literatura existente, y este trabajo, queda bien demostrado que la función cardiaca depende predominantemente del aporte energético a través de diferentes vías metabólicas, dependiendo del sustrato oxidado y de la actividad y demanda energética del corazón. Sin embargo la velocidad de producción de energía, en forma de ATP por las diferentes vías, depende de los puntos que controlan dicha vía, es decir, de la distribución del control de flujo en las diferentes enzimas que la conforman. Este punto es importante dado que si una enzima con un alto grado de control (un coeficiente de control alto) es una de las vías afectadas, esto modificará significativamente el flujo de la vía, es decir la producción de ATP. El análisis del control de flujo de una vía metabólica es una estrategia muy útil en el manejo y modulación del metabolismo, ya que nos

suplementos dietéticos, tal es el caso de antioxidantes, de la propia L-carnitina, en animales que presenten un desorden lipídico como la hipertrigliceridemia. En animales HTG se utilizaría como estrategia el uso de suplementos que ayudaran a revertir o bien, prevenir el desarrollo de los desajustes metabólicos producidos por la hipertrigliceridemia.

**CAPITULO 8**  
**CONCLUSIONES.**

1. Existe un déficit energético asociado a la oxidación de glucosa en las ratas HTG, el cual se pone de manifiesto cuando el aporte de ATP depende de la oxidación de este sustrato, tal como ocurre durante periodos de isquemia y reperfusión.
2. El metabolismo de la glucosa se encuentra disminuido principalmente por una alteración en enzimas claves de su oxidación como son la fosfofructocinasa-I y la piruvato deshidrogenasa. El contenido total de fosfofructocinasa-I se encuentra disminuido, mientras que de la PDH sólo disminuye su forma activa y no el contenido total de enzima.
3. Existe una alteración importante en el sistema de transferencia energética mediado por la creatina cinasa, de la cual, la asociación funcional de la isoforma mitocondrial y la fosforilación oxidativa se encuentra disminuida.
4. Aunado a la elevación de los triglicéridos circulantes existe un aumento en la capacidad fosforilante de las mitocondrias, mediado al menos por un incremento en la actividad de la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa.
5. La hipertrigliceridemia experimental estudiada induce cambios en la composición lípidica de la membrana mitocondrial, favoreciendo una mayor rigidez y un mejor acoplamiento de la respiración y la síntesis de ATP.

## CONCLUSIONES.

Las alteraciones en el metabolismo energético asociadas al desarrollo de hipertrigliceridemia en el modelo utilizado encontradas en este trabajo pueden resumirse en la Fig 7.1:

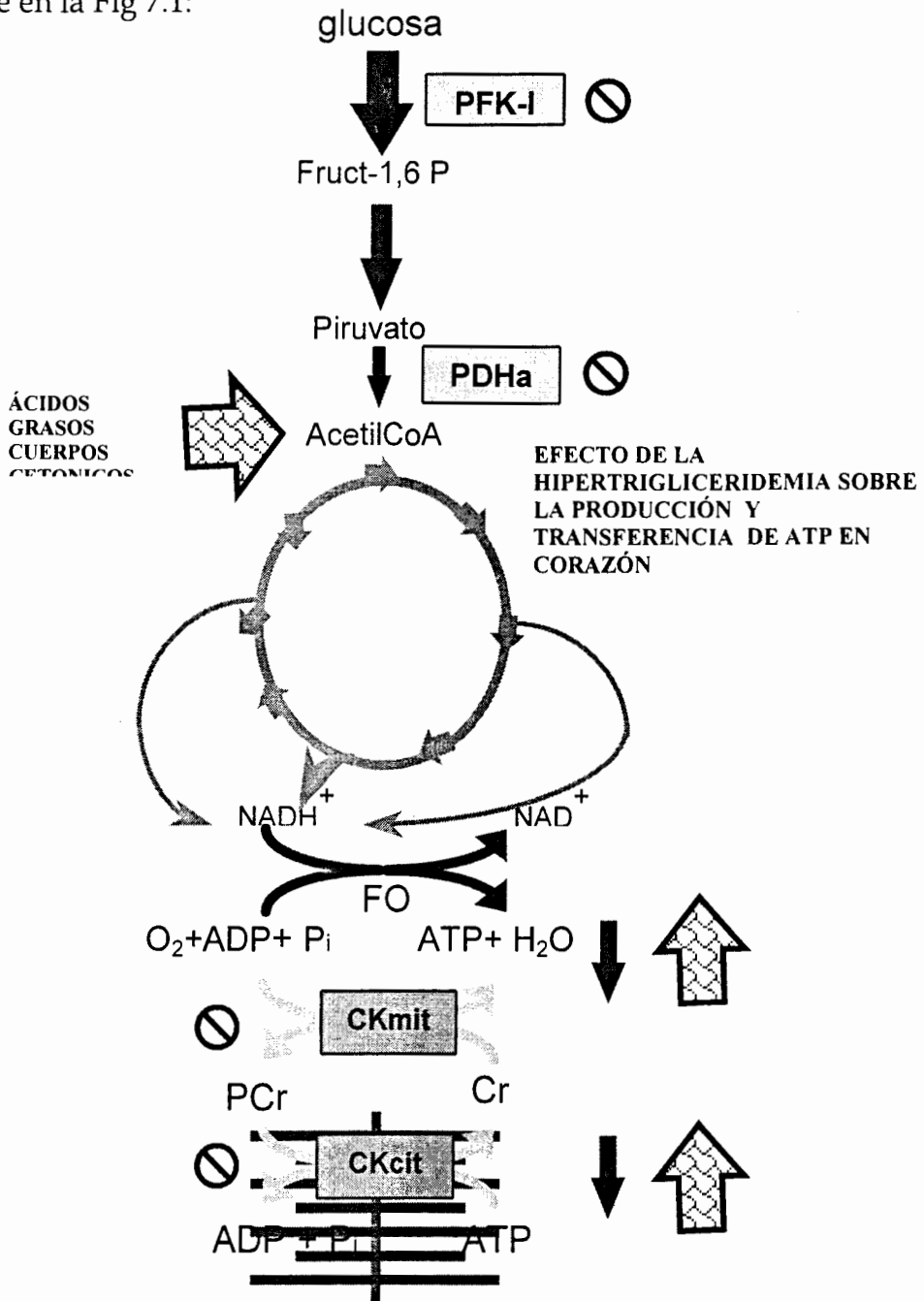


Fig 7.1. Alteraciones del metabolismo energético en el corazón hipertrigliceridémico. PFK-I, fosfofructocinasa I, CK, creatina cinasa, PDH, piruvato deshidrogenasa, Cr, creatina, PCR, FO, fosforilación oxidativa, fosfocreatina. Las flechas negras indican el flujo y contribución relativa de ATP cuando se oxida glucosa, las flechas rayadas indican el flujo y contribución relativa de ATP cuando se oxidan ácidos grasos. El símbolo  $\otimes$  indica las enzimas afectadas.

**CAPITULO 9**  
**BIBLIOGRAFÍA.**

- Allard MF, Schönekeess BO, Henning SL, English DR, Lopaschuk GD: The contribution of oxidative metabolism and glycolysis to ATP production in hypertrophied heart. *Am J Physiol* 267:H742-H750. 1994.
- Antozzi C, Zeviani M: Cardiomyopathies in disorders of oxidative metabolism. *Cardiovasc Res* 35:184-199. 1997.
- Baños G, Carvajal K, Cardoso G, Zamora J, Franco M: Vascular reactivity and effect of serum in a rat model of hypertriglyceridemia and hypertension. *Am J Hypertens* 10:379-388. 1997.
- Basingthwaihte JB, Zheng L: Heterogeneities in myocardial flow and metabolism: exacerbation with abnormal excitation. *Am J Cardiol* 83:7H-12H. 1999.
- Bobyleva V, Bellei M, Paziienza TL, Muscatello U: Effect of cardiolipin on functional properties of isolated rat liver. *Biochem Mol Biol Inter* 41:469-480. 1997.
- Bergmeyer HU: *Methods of enzymatic Analysis.. vol III..* Weinheim, Verlag Chemie, p 1465-1473. 1974
- Bergmeyer HU: *Methods of Enzymatic Analysis. vol VIII.* Weinheim, Verlag Chemie, p 500-514. 1983
- Bessman SP, Geiger PJ: Transport of energy in muscle: the phosphorylcreatine shuttle. *Science* 211:448-452. 1981.
- Brenstrom B, Liedtke AJ, Nellis SH: Mechanism of substrate preference for oxidative metabolism during early myocardial reperfusion. *Am J Physiol* 259:H317-H323. 1990.

## BIBLIOGRAFÍA.

---

- Brevetti G, di Lisa F, Perna S, Menabó R, Barbato R, Martone VD, Siliprandi N. Carnitine-related alterations in patients with intermittent claudication. *Circulation* 93:1685-1689. 1996.
- Brunold C, El Alaoui-Talibi Z, Moravec M, Moravec J: Palmitate oxidation by the mitochondria from volume-overloaded rat hearts. *Mol Cell Biochem* 180:117-128. 1998.
- Bünger R, Permanetter B: Parallel stimulation by  $Ca^{2+}$  of inotropism and pyruvate dehydrogenase in perfused heart. *Am J Physiol* 247:C45-C52. 1984.
- Cargnoni A, Ceconi C, Curello S, Benigno M, de Jong JW, Ferrari R: Relation between energy metabolism, glycolysis, noradrenaline release and duration of ischemia. *Mol Cell Biochem* 160/161:187-194. 1996.
- Carvajal K and Baños G: Myocardial function and effect of serum in isolated heart from hypertriglyceridemic and hypertensive rats. *Clin Exper Hypertens* 24:235-248. 2002.
- Carvajal K, El Hafidi M, Baños G: Myocardial damage due to ischemia and reperfusion in hypertriglyceridemic and hypertensive rats: participation of free radicals and calcium overload. *J Hypertens* 17:1607-1616. 1999.
- Carvajal K: Estudio de la función cardiovascular en un modelo de rata hipertrigliceridémica e hipertensa. Tesis de Maestría en Biología Experimental. 1997
- Caterson ID, Tylor KW: Islet cell function in gold thioglucose-induced obesity in mice *Diabetologia* 23:119-123. 1982.
- Degli EM, Lenaz G: The kinetic mechanism of ubiquinol:citochrome c reductase at steady state. *Arch Biochem Biophys* 289:303-312. 1991.
- Dizon J, Burkhoff D, Tauskela J, Whang J, Cannon P, Katz J: Metabolic inhibition in the perfused rat heart: evidence for glycolytic requirement for normal sodium homeostasis. *Am J Physiol* 274:H1082-H1089. 1998.

## BIBLIOGRAFÍA:

- Döring JH, Denherd H: The isolated perfused warm blooded heart according to Langendorff. in: *Methods in Experimental Physiology and Pharmacology. Biological measurements techniques. V. Biomesstechnik-Verlang Mars. Germany. 1988.*
- Dzeja PP, Redfield MM, Burnett JC, Terzic A. Reduced activity of enzymes coupling ATP-generating with ATP-consuming processes in the failing myocardium. *Mol Cel Biochem* 201:33-40. 1999.
- El Alaoui-Talibi Z, Gurnouz A, Moravec M, Moravec J: Control of oxidative metabolism in volume-overloaded rat hearts: effect of propionyl-L-carnitine. *Am J Physiol* 272 :H1615-H1624. 1997.
- El Hafidi M, Baños G: In vivo plasma lipid oxidation in sugar-induced rat hypertriglyceridemia and hypertension. *Hypertension* 30:624-62. 1997.
- El Hafidi M, Váldez R, Baños G: Possible relationship between altered fatty acid composition of serum, platelets, and aorta and hypertension induced by sugar feeding in rats. *Clin Exper Hypertens* 22:99-108. 2000.
- Ferrari R, Pedersini P, Bongraziio M, Gaia G, Bernocci P, Di Lisa F, Visioli O: Mitochondrial energy production and cation control in myocardial ischaemia and reperfusion. *Basic Res Cardiol* 88:495-512. 1993.
- Ferrari R, Pepi P, Ferrari F, Nesta F, Benigno M, Visioli O. Metabolic derangement in ischemic heart disease an its therapeutic control. *Am J Cardiol* 82:2K-13K. 1998.
- Fisher Y, Böttcher U, Eblenkamp M, Thomas J, Jüngling E, Rösen P, Kammermeier H: Glucose transport and glucose transporter GLUT4 are regulated by products(s) of intermediary metabolism in cardiomyocytes. *Biochem J.*321:629-633. 1997
- Forstner M, Kriechbaum M, Laggner P, Walliman T: Structural changes of creatine kinase upon substrate bindng. *Biophysical J* 75:1016-1023. 1998.

## BIBLIOGRAFÍA.

---

- Gray KA, Grooms M, Myllykallio H, Moomaw C, Salughter G, Daldal F: *Rhodobacter capsulatus* contains a novel cb-type cytochrome c oxidase without a Cu<sub>A</sub> center. *Biochemistry* 33:3120-3127. 1994.
- Goodwin GW, Taylor CS, Taegtmeier H: Regulation of energy metabolism of the heart during acute increase in heart work. *J Biol Chem* 272:29530-29539-29539. 1998.
- Hak JB, Van Beek HGM, Eijgelshoven MHJ, Westerhof N: Mitochondrial dehydrogenase activity affects adaptation of cardiac oxygen consumption to demand. *Am J Physiol* 264:H448-453. 1993.
- Hansford RG, Moreno-Sánchez R, Lewartowski B: Activation of pyruvate dehydrogenase complex by Ca<sup>2+</sup> in intact heart, cardiac myocytes, and cardiac mitochondria. *Ann NY Acad Sci* 573:240-253. 1989.
- Hansford RG, Castro F: Role of Ca<sup>2+</sup> in pyruvate dehydrogenase interconversion in brain mitochondria and synaptosomes. *Biochem J* 227:129136. 1985.
- Hansford RG, Cohen L: Relative importance of pyruvate dehydrogenase interconversion and feed-back inhibition in the effect of fatty acids on pyruvate oxidation by rat heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 191:65-81.1978.
- Hansford RG, Hogue B, Prokopczuk A, Wasilewka E, Lewartowski B: Activation of pyruvate dehydrogenase by electrical stimulation, and low Na<sup>+</sup> perfusion of Guinea-pig heart. *Biochim Biophys Acta* 1018:282-286. 1990.
- Hansford, RG: Studies on the effects of coenzyme A-SH: acetyl coenzyme A, nicotinamide adenine dinucleotide: reduced nicotinamide adenine dinucleotide, and adenosine diphosphate: adenosine triphosphate ratios on the interconversion of active and inactive pyruvate dehydrogenase in isolated rata heart mitochondria. *J Biol Chem* 251:5483-5489. 1976.

## BIBLIOGRAFÍA.

- Harrison GJ, van Wijhe MH, de Groot B, Dijk FJ, van Beek HGM. CK: Inhibition accelerates transcytosolic energy signalling during rapid workload steps in isolated rabbit hearts. *J Physiol* 276 :H134-H140. 1999.
- Hayashi H, Iimuro M, Masumoto Y, Kaeko M: Effects of gamma-glutamylcysteine ethyl ester on heart mitochondrial creatine kinase activity: involvement of sulfhydryl groups. *Eur J Pharmacol* 349:133-136. 1998.
- Hurne AM, Chais CLL, Waring P: Inactivation of rabbit muscle creatine kinase by reversible formation of an internal disulfide bond induced by the hypertriglyceridemic and hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens* 24:235-248. 2002.
- Ishinno K, Botker E, Clausen T, Hetzer R, Sehested J. Myocardial adenine nucleotides, glycogen, and Na, K<sup>+</sup>ATPase in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy requiring mechanical circulatory support. *Am J Cardiol* 83:396-399.1999.
- Janero DR, Hreniuk D, Sharif HM: Hydroperoxide-induced oxidative stress impairs heart muscle cell carbohydrate metabolism. *Am J Physiol* 266: C179-C188, 1994.
- Jeffrey FMH, Siczku V, Sherry AD, Malloy CR: Substrate selection in the isolated working rat heart. Effects of reperfusion, afterload, and concentration. *Basic Res Cardiol* 90:388-396.1995.
- Johnston D, Lewandowski DE. Fatty acid metabolism and contractile function in the reperfused myocardium. *Circ Res* 68:714-725.1991.
- Jucker BM, Rennings JM, Cline G, Shulman GI : <sup>13</sup> C and <sup>31</sup> P NMR studies on the effects of increases plasma free fatty acids on intramuscular glucose metabolism in the awake rat. *J Biol Chem* 272:10464-10473, 1997.
- Jung W, Dietze GJ: <sup>31</sup>P Nuclear magnetic resonance spectroscopy: a non-invasive tool to monitor metabolic abnormalities in left ventricular hypertrophy in humans. *Am J Cardiol* 83:19H-24H. 1999.

## BIBLIOGRAFÍA.

- Kaasik A, Minajeva A, De Sousa E, Ventura-Clapier R, Veksler V: Nitric oxide inhibits cardiac energy production via inhibition of mitochondrial creatine kinase. *FEBS* 444:75-77. 1999.
- Kabsch W, Fritz-Wolf K. Mitochondrial creatine kinase – a square protein. *Curr Opin Struct Biol* 7:811-818. 1997.
- Kaldis P, Walliman T. Functional differences between dimeric and octameric mitochondrial creatine kinase. *Biochem J* 308:623-627. 1995.
- Kalsi KK, Smolenski RT, Pritchard RD, Khaghani A, Seymour AML, Yacoub MH: Energetics and function of the failing human heart with dilated or hypertrophic cardiomyopathy. *Eur J Clin Invest* 29:469-477.1999.
- Kammermeier H :Meaning of energetic parameters. *Basic Res Cardiol* 88:380-384. 1993
- Katz LA, Swain JA, Portman MA, Balaban RS: Relation between phosphate metabolites and oxygen consumption of heart in vivo. *Am J Physiol* ; 25: H265-H274.1989.
- Keith V, Maisin L, Hue L. Trimetazidine effects on the damage to mitochondrial functions caused by ischemia and reperfusion. *Am J Cardiol* 76:25B-30B. 1995.
- Kerbey AL, Randle PJ, Cooper RH, Whitehouse S, Pask HT, Denton RM: Regulation of pyruvate dehydrogenase in rat heart. *Biochem J* 154:327-348.1976.
- King LM, Opie LH. Glucose and glycogen utilisation in myocardial ischemia- Changes in metabolism and consequences for the myocyte. *Mol Cell Biochem* 180:3-26. 1998.
- Klimes Y, Vràna A, Kunes J, Sebökova E, Dobesová Z, Stolba P, Zicha J: Hereditary hypertriglyceridemic rat: a new model of metabolic alterations in hypertension. *Blood Pressure* 4:137-142.1995.

## BIBLIOGRAFÍA.

---

- Konecka A, Jezierski T : Effect of cholesterol-enriched diet on liver and heart enzymes in male rabbits. *Comp Biochem Physiol B* 118:505-508. 1997.
- Konorev EA, Kaluanaram B , Hogg N: Modification of creatine kinase by s-nitrosothiols: s-nitrosation VS S-thiolation. *Free Radical Biol Med* 28:1671-1678. 2000.
- Kunes J, Dobesová Z, Zicha J:. High blood pressure of hypertriglyceridaemic rats is related to metabolic disturbances. *Physiol Res* 44:421-424. 1995.
- Latipää PM, Penttinen KJ, Hiltunen JK, Hassinen IE: Regulation of pyruvate dehydrogenase during infusion of fatty acids of varying chain lengths in the perfused rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 17:1161-1171.1985.
- Liedtke AJ, DeMaison L, Eggleston AM, Cohen LM, Nelis SH:. Changes in substrate metabolism and effects of excess fatty acids in reperfused myocardium. *Circ Res.*62:535-542.1988.
- Liedtke AJ, DeMaison L, Eggleston AM, Cohen LM Nelis SH: Changes in substrate metabolism and effects of excess fatty acids in reperfused myocardium. *Circ Res* 89:1019-1023. 1988.
- Lochner A, Niekerk V, Kotze JCN: Mitochondrial Acyl-CoA, adenine nucleotide translocase activity and oxidative phosphorylation in myocardial ischaemia. *J Mol Cell Cardiol* 13:991-997. 1981.
- Lopaschuk GD, Stanley WC: Manipulation of energy metabolism in the heart. *Science Med*;6:42-51. 1997.
- Lopaschuk GD: Treating ischemic heart disease by pharmacologically improving cardiac energy metabolism. *Am J Cardiol* 82;14K-17K. 1988.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Ferr AL, Randall RJ:Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 14:425-449.1951.

- Lucas DT, Szewda LI: Declines in mitochondrial respiration during cardiac reperfusion: age-dependent inactivation of  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:6689-6693. 1999.
- Mahgoub MCA, Abd-Elfattah AS: Diabetes mellitus and cardiac function. *Mol Cell Biochem* 180:59-64. 1998.
- Mekhfi H, Veksler V, Mateo P, Maupoil V, Rochette L, Ventura-Clapier R: Creatine kinase is the main target of reactive oxygen species in cardiac myofibrils. *Circ Res* 78:6 1016-1027.1996.
- Mekhfi H, Veksler V, Mateo P, Maupoil V, Rochette, Ventura-Clapier R: Creatine kinase is the main target of reactive oxygen species in cardiac myofibrils. *Cir Res* 78:1016-1027. 1996.
- Merante F, Mickle DAG, Weisel RD, Li R, Tumati LC, Rao V, Williams WG, Robinson BH: Myocardial aerobic metabolism is impaired in a cell culture model of cyanotic heart disease. *Am J Physiol* 275:H1673-H1681. 1998.
- Minhaz U, Koide S, Shohtsu A, Fujishima M, Nakazawa H: Perfusion delays causes unintentional ischemic preconditioning in isolated heart preparation. *Basic Res Cardiol* 90:418-423.1995.
- Moreno-Sánchez , Hansford R: Relation between cytosolic free calcium and respiratory rates in cardiac myocytes. *Am J Physiol* 171:374-388. 1988.
- Nakamura T, Sugihara H, Kinoshita N, Toneyama S, Azuma A, Nakagawa M. Can serum carnitine levels distinguish hypertrophic cardiomyopathy from hypertensive hearts?. *Hypertension* 36:215-219. 2000.
- Neely JR, Morgan HE : Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of the heart. *Ann Rev Physiol* 36:413-459.1974.
- Neubauer S: Influence of left ventricular pressures and heart rate on myocardial high-energy phosphate metabolism. *Basic Res Cardiol* 93: 102-107. 1998.

## BIBLIOGRAFÍA.

- Nienaber CA, Gambhir SS, Mody FV, Ratib O, Huang SC: Regional myocardial blood flow and glucose utilization in symptomatic patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 87:1580-1590.1993.
- Paulson DJ: Carnitine deficiency-induced cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem* 180:33-41.1998.
- Pillar MT, Seitz HJ: Thyroid hormone and gene expression in the regulation of mitochondrial respiratory function. *Eur J Endocrinol* 136:231-239. 1997.
- Priest JW, Hajduk JW: Cytochrome c reductase purified from *Crithidia fasciculata* contains an atypical cytochrome c1. *J Biol Chem* 267:20188-20195. 1992.
- Randle PJ, Priestman DA, Mistry S, Halsall A: Mechanisms modifying glucose oxidation in diabetes mellitus. *Diabetologia* 37:S155-s161. 1994.
- Ravingerova T, Neckar J, Kolar F, Steka R, Volkovova K, Ziegelhöffer, Styk J. Ventricular arrhythmias following coronary artery occlusion in rats: is the diabetic heart less or more sensitive to ischaemia?. *Basic Res Cardiol*;96:160-168. 2001.
- Reaven GM, Ho H: Sugar -induced hypertension in sprague-Dawley rats. *Hypertension* 4:610-614.1991.
- Reaven GM: Insulin resistance, hyperinsulinemia, hypertriglyceridemia, and hypertension. Parallels between human disease and rodent models. *Diabetes Care* 14:195-203.1991.
- Reinhart, GD, Lardy HA: Rat liver phosphofructokinase: kinetic activity on the near- physiological conditions. *Biochemistry* 19:1477-1484. 1980.
- Remondino A, Rosenblatt-Velin N, Montessuit IT, Papageorgiou, Dorsaz P, Jorge-Costa M, Lerch R. Altered Expression of proteins of metabolic regulation during remodelling of the left ventricle after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 32:2025-2034. 2000.

- Rodrigues B, Cam MC, Kong J, Goyal RK, McNeill JH: Strain differences in susceptibility to streptozotocin-induced diabetes: effects on hypertriglyceridemia and cardiomyopathy. *Cardiovascular Res* 34:199-205. 1997.
- Rodrigues B, Cam MC, McNeill JH. Metabolic disturbances in diabetic cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem* 180:53-57. 1998.
- Rodrigues B, Grassby PF, Battell ML, Lee SYN, McNeill JH: Hypertriglyceridemia in experimental diabetes: Relationship to cardiac dysfunction. *Can J Physiol Pharmacol* 72:447-455. 1994.
- Rodrigues B, McNeill JH: The diabetic heart. Metabolic causes for the development of a cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem* 180:53-57. 1998.
- Rodrigues B, McNeill. The diabetic heart: metabolic causes for the development of a cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 26:913-922. 1992.
- Rottenberg H : Decoupling of oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 1018:1-17.1990.
- Rottenberg, H: Membrane potential and surface potential in mitochondria: uptake and binding of lipophilic cations. *J Membrane Biol* 81:127-138; 1984.
- Saks VA, Khucua ZA, Kuznetsov AV, Veksler VI, Sharov VG.:Heart mitochondria in physiological salt solutions: not ionic strength but salt composition is important for association of creatine kinase with the inner membrane surface. *Biochem Biophys Res Comm* 139:1262-1271. 1986.
- Schlattner U, Wallimann T: Octamers of mitochondrial creatine kinase isoenzymes differ in stability and membrane binding. *J Biochem Chem* 275:173114-17320. 2000.
- Schlame M, Rua D, Greenberg ML: The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Progress Lipid Res* 39:257-288. 2000.

- Scholte HR, Rodrigues-Pereira R, de Jongue PC, Luyt-Houwin IE, Hedwing M, Verduin M, Ross JD: Primary carnitine deficiency. *J Clin Chem Clin Biochem* 28:351-357. 1990.
- Sellevold OFM, Jynge P, Arstad K: High performance liquid chromatography: a rapid isocratic method for determination of creatine compounds and adenine nucleotides in myocardial tissue. *J Mol Cell Cardiol* 18:517-527. 1986.
- Shafrir E: The plurimetabolic syndrome in animals: Models for experimentation, their implications and relation to NIDDM. In: Crepaldi G, Tiengo A, Manzato E. *Diabetes, obesity and hyperlipidemias: V The plurimetabolic syndrome*. Ed. Excerpta Medica. Amsterdam; p 45-55. 1993.
- Shöder H, Knight RJ, Kofoed KF, Schelbergt HR, Buxton DB: Regulation of pyruvate dehydrogenase activity and glucose metabolism in post-ischaemic myocardium. *Biochim Biophys Acta* 1406:62-72. 1998.
- Shofield RS, Hill JA: Role of metabolically active drugs in the management of ischemic heart disease. *Am J Cardiovasc Drugs* 1:23-35. 2001.
- Smolenski RT, Jayakumar J, Seymour ML, Yacoub MH: Energy metabolism and mechanical recovery after cardioplegia in moderately hypertrophied rats. *Mol Cell Biochem* 180:137-143. 1998.
- Spindler M, Saupe KW, Christie ME, Sweeney L, Seidman CE, Seidman JG, Ingwall JS: Diastolic dysfunction and altered energetics in the  $\alpha$ MHC403/+ mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 101:1775-1783. 1998.
- Stanley WC, Lopaschuk GD, McCormack JG: Regulation of energy substrate metabolism in the diabetic heart. *Cardiovasc Res* 34:25-33. 1997.
- Starling RC, Hammer DF, Altschuld RA : Human myocardial ATP content and in vivo contractile function. *Mol Cell Biochem* 180:171-177. 1998.

- Sugden MC, Fryer LGD, Holness MJ: Regulation of hepatic pyruvate dehydrogenase kinase by insulin and dietary manipulation in vivo. Studies with the euglycaemic-hyperinsulinaemic clamp. *Biochim Biophys Acta* 1316:114-120. 1996.
- Terada R, Matsubara T, Koh N, Nakamura J, Hotta N. Effects of propionyl-L-carnitine on cardiac dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 357:185-197. 1998.
- Thomson G. An overview of genetic analysis of complex disease, with reference to type I diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 15:265-72. 2001.
- Thomson G, Esposito MS: The genetics of complex Diseases. *Trends Cell Biol* . 9:M17-20.
- Van der Vusse GJ, Dubelaar ML, Coumans WA, Seymor AML, Clarke SB, Bonen A, Drake-Holland AJ, Noble MIM: Metabolic alterations in the chronically denervated dog heart. *Cardiovasc Res* 37:160-170. 1998.
- Vanoverschelde JL, Janier MF, Bakke JE, Marshall DR, Bergmann SR: Rate of glycolysis during ischemia determines extent of ischemic injury and functional recovery after reperfusion. *Am J Physiol* 267:H1785-H1794.1994.
- Vanoverschelde JLJ, Janier MF, Bakke JS Marshall, Bergmann SR : Rate of glycolysis during ischemia determines extent of ischemic injury and functional recovery after reperfusion. *Am J Physiol* 36:H1785-H1794. 1994.
- Vázquez C , Carvajal K: Modelos experimentales fisiológicos para estudios bioquímicos: el corazón aislado y perfundido. *BEB* 97. 16:61-66. 1997.
- Veitch K, Maisin L, Hue L: Trimetazidine effects on the damage to mitochondrial functions caused by ischemia and reperfusion. *Am J Cardiol* 76:25B-30B. 1995.
- Vogt A, Kübler W. Heart failure: Is there an energy deficit contributing to contractile dysfunction? *Basic Res Cardiol* 93:1-10. 1998.

- Vraná A, Kazdová L: The hereditary hypertriglyceridemic non-obese rat: an experimental model of human hypertriglyceridemia. *Transplant Proc* 22:2579. 1990.
- Walliman T: Dissecting the role of creatine kinase. The phenotype of "gene knockout" mice deficient in a creatine kinase isoform sheds new light on the physiological function of the phosphocreatine circuit. *Curr Biol* 1:42-46. 1994.
- Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K, Eppenberger HM: Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the "phosphocreatine circuit" for cellular energy homeostasis. *Biochem J* 281:21-40. 1992.
- Wallimann T: Dissecting the role of creatine kinase. *Curr Biol* 4:42-46. 1994.
- Wanders RJA, Van Den Berg G B y Tager J M : A re-evaluation of conditions required for an accurate estimation of the extramitochondrial ATP/ADP ratio in isolated rat-liver mitochondria. *BBA* 129- 135. 1984.
- West KM, Ahuja MMS, Bennett PH: The role of circulating glucose and triglyceride concentrations and their interactions with other "risk factors" as determinants of arterial disease in nine diabetic population samples from WHO multi-national study. *Diabetes Care* 6:361-369. 1983.
- Whitehouse S, Cooper RH, Randle PJ : Mechanism of activation of pyruvate dehydrogenase by dichloroacetate and other halogenated carboxylic acids. *Biochem J* 141:761-774. 1974.
- Williamson J, Corkey BE: Assays of intermediates of the citric acid cycle and related compounds by fluorometric enzyme methods. *Methods Enzymol.* 13:434-513. 1969.
- Wu P, Sato, J, Zhao Y, Jaskieicz J, Popov KM Harris RA: Starvation and diabetes increase the amount of pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 4 in rat heart. *Biochem J* 329:197-201. 1998.

## BIBLIOGRAFÍA.

---

- Xiao CY, Chen M, Hara A, Hashizume H, Abiko Y: Palmitoyl-L-carnitine modifies the myocardial levels of high-energy phosphates and free fatty acids. *Basic Res Cardiol* 92:320-330. 1997.
- Zicha J, Kunes J, David-Duflho M. Pernollet MG, Devynck MA: Cell, calcium handling and intracellular pH regulation reduced platelet response to thrombin stimulation. *Life Science* 59:803-813. 1996.