

Capítulo II

Capítulo II-1

Utilización y destino de la glucosa y metabolismo de los triglicéridos en corazón aislado perfundido en presencia de glucosa como única fuente energética. Acción de la Insulina.

Introducción

La captación de glucosa en corazones perfundidos, correctamente oxigenados, está sujeta a diversas regulaciones. La disponibilidad de sustratos, el trabajo cardíaco, el entorno metabólico hormonal, etc. pueden modificar el transporte de éste azúcar a través de la membrana y hacia el interior de la célula. (115,116).

Trabajos de Chain y col. (98), han demostrado que la insulina aumenta la captación de glucosa y la liberación de lactato en corazones perfundidos de ratas controles y diabetizadas con estreptozotocina. Más aún, utilizando glucosa marcada (^{14}C -Glucosa), estos autores demostraron que la adición de insulina al medio de perfusión favorece la incorporación de ^{14}C -Glucosa a glucógeno, aunque la producción de $^{14}\text{CO}_2$ permanece 50% por debajo de los valores normales.

Una disminuía actividad del complejo enzimático Piruvato Dehidrogenasa ha sido constatada en corazones de ratas diabéticas o ayunadas. Más aún Caterson y col.(117) demostraron un decrecimiento en la actividad PDHa (forma activa del complejo PDH) en el miocardio de ratones con obesidad experimental inducida por administración de oro-tioglucona. En estos animales hiperglicémicos e hiperinsulinémicos la menor actividad PDHa podría ser el resultado de una incrementada oxidación de ácidos grasos.

Al presente, el efecto de la hormona insulina, sobre el complejo enzimático Piruvato Dehidrogenasa no es claro, Ohlen y col. (118) observaron un efecto directo de la hormona sobre la actividad del complejo PDH en corazones perfundidos de ratas diabetizadas con aloxano, mientras Kerbey y col. (119) no constataron ninguna acción de la hormona sobre la actividad enzimática en situaciones experimentales

semejantes. Recientemente Wu y col. (120), observaron en corazones de animales ayunados o diabéticos, un incremento permanente de la actividad de la enzima Piruvato Dehidrogenasa-Quinasa (enzima responsable de fosforilar el complejo PDH e inactivarlo) que se correlacionaba con un incremento de la masa proteica de la PDK₄, una de las isoenzimas de la PDH-Quinasa. Sin embargo estos autores constataron que, cuando se alimentaba a los animales ayunados o se administraba tratamiento insulínico en los animales diabéticos, se revertía el incremento de la masa proteica PDK₄ y se restauraba a niveles normales la actividad de la enzima PDH-Quinasa.

Intolerancia a la glucosa en presencia de normoinsulinemia, es un hallazgo constante en ratas alimentadas crónicamente con una dieta rica en sacarosa (DRS). En los corazones de estos animales, perfundidos en un entorno metabólico semejante al animal "in vivo", pudimos constatar una disminución de la captación y utilización de la glucosa acompañados de una menor actividad del complejo enzimático PDH consecuente a un incremento en la actividad enzimática PDH-Quinasa. En estas condiciones, lípidos (ácidos grasos) y carbohidratos (glucosa) compiten como sustratos energéticos.

Con el objeto de estudiar algunos mecanismos responsables de estas alteraciones, utilizamos el sistema de perfusión de corazón aislado desprovisto del sustrato exógeno lipídico, y analizamos:

- 1- La captación y destino de la glucosa y la actividad del complejo PDH y PDH-Quinasa utilizando glucosa (en niveles similares a los del animal "in vivo"), como única fuente de sustrato exógeno en el medio de perfusión.
- 2- Si la insulina "in vitro", adicionada al medio de perfusión, podría revertir las anomalías bioquímicas observadas en el corazón de los animales alimentados con DRS.

Protocolo experimental

Se utilizaron ratas macho cepa Wistar, de 180-200 gramos de peso inicial, las cuales luego de un período de adaptación, fueron agrupadas al azar en dos lotes experimentales (según se detalló en el ítem Metodología y en el capítulo 1 de resultados). Las dietas fueron administradas durante 15 semanas "ad libitum", brevemente:

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

Lote experimental: ratas alimentadas con dieta rica en sacarosa (DRS), (sacarosa 63% p/p).

Durante todo el período de experimentación, se constató dos veces por semana, el peso de los animales y la ingesta calórica. Al finalizar dicho período, el alimento fue retirado de las jaulas a las 7.00 hs. y las experiencias fueron realizadas entre las 9.00 y 12.00 hs. Los animales fueron anestesiados intraperitonealmente con pentobarbital sódico (60 mg/kg peso rata).

En estas experiencias, los corazones fueron perfundidos utilizando la técnica de corazón aislado de Langendorff(100) de perfusión retrógrada, descrita previamente (Capítulo 1 de resultados), en un sistema recirculante (presión hidrostática 60 mmHg). Luego de 5 minutos de lavado del órgano (perfusión no recirculante) con buffer Krebs Heinseleit bicarbonato (Ca^{++} 2.5 mM, pH=7.4, glucosa 5.5 o 8.5 mM), los corazones fueron perfundidos en un sistema recirculante durante 30 minutos. El volumen total (100 ml) de buffer Krebs Henseleit (Ca^{++} 2.5 mM, pH=7.4, glucosa 5.5 o 8.5 mM), adicionado o no de insulina bovina altamente purificada, Lily Co., Indianápolis USA, (30 mU/ml de medio de perfusión), fue continuamente gasificado con O_2 : CO_2 (95:5) y mantenido a 37°C. El flujo de salida permaneció entre 10-12 ml/minuto y la frecuencia cardíaca en 220-260 contracciones/minuto a lo largo del período de perfusión.

i) Los corazones de animales alimentados con dieta control (DC) fueron perfundidos con niveles de glucosa 5.5 mM (semejantes a los observados en el animal "in vivo") en ausencia o presencia de insulina (30 mU/ml) en el medio de perfusión y

ii) En los corazones de animales alimentados con dieta rica en sacarosa (DRS) se utilizó 8.5 mM de glucosa (semejantes a los observados en el plasma de los

animales in vivo) en ausencia o presencia de la hormona (30 mU/ml) en el medio de perfusión. En este lote de animales se realizaron también experiencias utilizando 5.5 mM de glucosa en el medio de perfusión (similares a la de los animales controles), en ausencia y presencia de insulina.

Se obtuvieron muestras del perfusado (1 ml) al minuto cero de perfusión recirculante y a los 15 y 30 minutos, las que fueron inmediatamente desproteinizadas y congeladas hasta su procesamiento. En las muestras desproteinizadas se determinaron los niveles de glucosa (92), lactato (103) y de piruvato (104). La desaparición de glucosa del medio (captación) y la liberación de lactato y piruvato fueron calculados según se detalló en el capítulo 1 de Resultados.

Al finalizar el período de perfusión los corazones fueron congelados en forma inmediata utilizándose una pinza de Wolleberger (74) previamente enfriada a la temperatura del N₂ líquido. Los tejidos congelados fueron pulverizados y homogeneizados determinándose en los mismos los niveles de: triglicéridos (88), glucógeno (89), glucosa 6-fosfato (85), ATP (86), creatina fosfato (87), actividad del complejo enzimático Piruvato Dehidrogenasa (75) y de la enzima Piruvato Dehidrogenasa Quinasa (78,79). Las técnicas utilizadas fueron descritas en el ítem Metodología.

Los valores obtenidos de los metabolitos analizados en el medio de perfusión o en el tejido muscular fueron expresados por gramos de tejido seco, corrigiendo de esa manera cualquier diferencia debida al contenido de agua en el tejido.

Resultados

La ingesta calórica (*Kjoule/día*) y la ganancia de peso (*g/día*) de los animales alimentados con DRS fueron similares a las observadas en el lote DC durante todo el protocolo experimental y comparables a los mencionados en el capítulo 1.

Los datos obtenidos fueron:

-ingesta calórica (*kJoule/día*): media \pm SEM, DRS 293 ± 23 vs. 289 ± 18 en DC

-ganancia de peso (*gramos/día*): media \pm SEM, DRS 2.03 ± 0.05 vs. 2.0 ± 0.08 en DC

Captación y destino metabólico de la glucosa

La captación de glucosa, liberación de lactato y piruvato y contenido tisular de glucosa-6-fosfato y glucógeno de los corazones perfundidos de animales alimentados con DRS y DC podemos observarlos en la *Tabla 8*. Los resultados muestran que al final del período de perfusión, la cantidad de glucosa captada (desaparición del medio de perfusión) en los corazones alimentados con DRS, representa solamente la mitad de la observada en los animales controles -Montes y col.(121)-. Esto se acompaña de un significativo incremento ($p < 0.05$) en el contenido de lactato + piruvato liberado al medio de perfusión.

La concentración de glucógeno en el músculo cardíaco decrece en ambos lotes (DRS y DC) durante los 5 minutos iniciales de perfusión no recirculante (Langendorff) y continúan decreciendo, alcanzando valores similares al final de la perfusión. Este comportamiento muestra una neta degradación del glucógeno durante el período de perfusión cuando la glucosa es el único sustrato exógeno utilizado, confirmando resultados obtenidos en perfusiones de corazones de ratas controles por otros autores (111). Es interesante resaltar que aunque al finalizar el período de perfusión, el contenido neto de glucógeno es similar en ambos grupos experimentales, el decrecimiento del mismo con respecto a su nivel basal es significativamente mayor en el lote de ratas alimentadas con DRS. Los valores observados en el músculo cardíaco inmediatamente "ex vivo" en ambos grupos, fueron ($\mu\text{mol glucógeno-glucosa/gr. tej. seco}$) media \pm SEM, Lote DC= 83.0 ± 4.0 vs. Lote DRS= 108.3 ± 5.2 , ($p < 0.05$).

Por otro lado los niveles de glucosa-6-fosfato (glucosa 6P) al final del período experimental se mantienen aún muy elevados en el lote DRS cuando se comparan con los observados en los controles de igual sexo y edad (lote DC).

El contenido de ATP y Creatina fosfato del músculo cardíaco al final del período de perfusión fue similar en los lotes analizados. Los resultados obtenidos fueron: ATP

Tabla 8: Captación de glucosa, liberación de lactato y piruvato, y contenido tisular de glucosa 6 fosfato (glucosa-6P) y glucógeno en corazón perfundido de ratas alimentadas con dieta control (DC) y dieta rica en sacarosa (DRS)

Dieta	glucosa ¹ (mM)	glucosa captación ($\mu\text{mol}/\text{gr.tej.seco}$ 30 min.)	lactato + piruvato liberación ($\mu\text{mol}/\text{gr.tej.seco}$ 30 min.)	glucosa-6P ($\mu\text{mol}/\text{gr.tej.seco}$)	glucógeno ²
DC	5,5	264,2 \pm 20,3	79,2 \pm 3,8	0,61 \pm 0,04	56,2 \pm 4,3
DRS	8,5	134,7 \pm 12,2 *	113,3 \pm 6,2 *	1,15 \pm 0,10 *	60,3 \pm 3,8

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

2- los valores son expresados como μmoles glucógeno-glucosa equivalentes.

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

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

* DRS vs. DC ,p<0,05

(*umol/gramo tejido seco*): media \pm SEM, DC 19.1 ± 1.1 vs DRS: 19.6 ± 0.8 ; Creatina fosfato (*umol /gramo tejido seco*): media \pm SEM, DC: 20.5 ± 1.4 vs DRS: 21.0 ± 0.6 .

Durante el período de perfusión no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el flujo coronario: *ml/minuto*: media \pm SEM, DC 11.5 ± 0.6 vs. DRS 10.8 ± 0.8 ; ni en la frecuencia cardíaca: *contracciones/minuto*: media \pm SEM, DC = 230 ± 12 vs. DRS = 238 ± 11 .

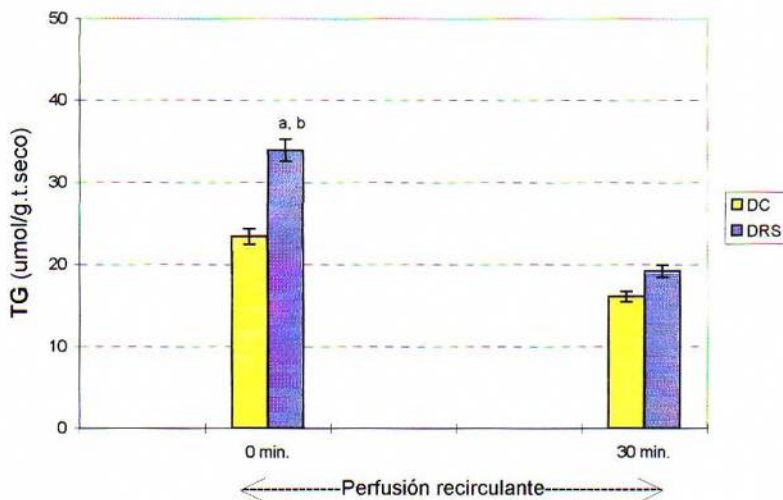
Cuando la glucosa es el único sustrato exógeno en el medio de perfusión, el corazón utiliza cantidades considerables de sustratos endógenos (no carbohidratos) presumiblemente triglicéridos. Dentro de este contexto la utilización y posterior oxidación de lípidos en el corazón perfundido, depende del contenido intracelular del pool accesible de triglicéridos presentes en dicho órgano, que como hemos visto en el capítulo precedente, se encuentra significativamente incrementado en los animales alimentados con DRS.

Bajo las condiciones experimentales utilizadas, y de acuerdo a los resultados que se describen en la *Tabla 8*, nos propusimos examinar la posibilidad de una mayor utilización de triglicéridos endógenos (provenientes del pool accesible) como fuente energética en desmedro de la glucosa en los corazones de estas ratas dislipémicas.

A los fines de analizar esta hipótesis, *cuantificamos el contenido de triglicéridos* en el músculo cardíaco al comienzo y al final de la perfusión recirculante.

En la *Figura 11* podemos observar el decrecimiento del contenido de triglicéridos en el músculo cardíaco durante el período de perfusión en ambos grupos de animales. El contenido inicial de triglicéridos al minuto 0 de la perfusión recirculante (luego de 5 minutos de lavado del órgano), es significativamente mayor en los corazones de los animales alimentados con DRS ($p < 0.05$), pero declina rápidamente hacia los 30 minutos de perfusión. La velocidad de desaparición del contenido de triglicéridos del músculo cardíaco (como índice de la lipólisis de triglicéridos) en los animales alimentados con DC, fue significativamente menor. Sin embargo el contenido final de este metabolito fue similar en ambos lotes experimentales al final del período experimental.

Figura 11: Contenido de triglicéridos (TG) en corazón perfundido de ratas alimentadas con dieta control (DC) o dieta rica en sacarosa (DRS).



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

DRS ("ex vivo") = $44,2 \pm 0,8$, DC ("ex vivo") = $24,9 \pm 0,3$.

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

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

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

b - DRS 0 minuto vs. DRS 30 minutos, $p < 0,05$.

Bajo las presentes condiciones experimentales, el marcado decrecimiento del contenido de triglicéridos en el miocardio (hidrólisis del pool accesible de triglicéridos) conduciría a una mayor disponibilidad de ácidos grasos en este tejido y posiblemente a una mayor oxidación de los mismos a nivel mitocondrial, en desmedro de la vía oxidativa de la glucosa.

Para testear esta hipótesis, *cuantificamos la actividad enzimática del complejo PDH y la actividad de la PDH-Quinasa* al final del período experimental.

La *Tabla 9* muestra los niveles de PDHa forma activa del complejo expresados como % de la actividad total y la actividad de la enzima PDH-Quinasa. El significativo decrecimiento de la actividad enzimática PDHa, podría deberse a un incremento en la oxidación de ácidos grasos provenientes de la hidrólisis de los triglicéridos endógenos, ya que en nuestras condiciones de experimentación la glucosa es la única fuente de sustrato exógeno. Es bien conocido que los ácidos grasos en el tejido cardíaco compiten con la glucosa oxidándose y por lo tanto inhibiendo la utilización de la misma (62). Un aumento de la oxidación de acilCoA de cadena larga, provenientes de la hidrólisis del incrementado pool de triglicéridos endógenos, se traduce en una mayor relación acetil CoA/COASH mitocondrial, favoreciendo la inactivación del complejo enzimático PDH. Además la elevada relación acetil CoA/COASH favorece la mayor actividad enzimática PDH-Quinasa, que a su turno fosforila el complejo PDH y lo inactiva. En relación a esto, nuestros resultados demuestran una relación inversa entre las actividades enzimáticas PDHa y PDH Quinasa.

Se observa en la *Figura 12*, la actividad de la enzima PDH-Quinasa, expresada como la constante de inactivación del complejo PDH dependiente de ATP ($k \cdot \text{min}^{-1}$). La mayor pendiente ($p < 0.05$) observada en el lote DRS con respecto al lote DC, indica una mayor actividad de ésta en el corazón de los animales alimentados con DRS.

Acción de la insulina

Como era de esperar, los corazones perfundidos de ratas alimentadas con DC en presencia de insulina (30 mU/ml) en el medio de perfusión, incrementan la captación de glucosa en aproximadamente 70% y la liberación de lactato un 60% aproximadamente, cuando la glucosa es el único sustrato exógeno (*Tabla 10*).

Tabla 9: Actividad del complejo enzimático Piruvato Dehidrogenasa (PDHa) y Piruvato Dehidrogenasa Quinasa (PDH-Quinasa) en corazón perfundido de ratas alimentadas con dieta control (DC) o dieta rica en sacarosa (DRS).

Dieta	glucosa ¹ (mM)	PDHa (% de PDH total)	PDH-Quinasa (K min ⁻¹)
DC	5,5	61,0 ± 4,2	0,96 ± 0,1
DRS	8,5	22,0 ± 2,1 *	2,9 ± 0,4 *

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

PDHa: forma activa del complejo Piruvato Dehidrogenasa (PDH), expresada como el porcentaje de la actividad total PDH.

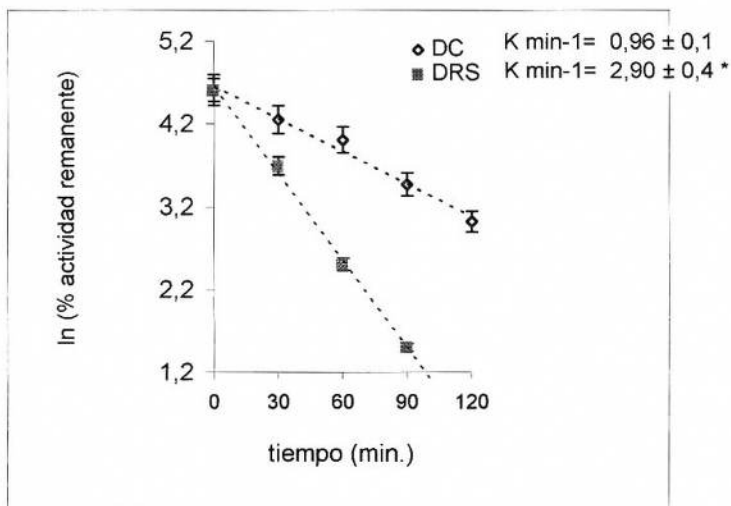
Los corazones fueron perfundidos durante 5 minutos en un sistema no recirculante (lavado del órgano). Luego fueron perfundidos durante 30 minutos en un sistema recirculante con buffer Krebs Henseleit bicarbonato pH 7,4, Ca⁺⁺ 2,5 mM, glucosa 5,5 mM u 8,5 mM. (Ver detalles en el ítem Metodología).

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

PDH-Quinasa: La actividad (Kmin⁻¹) fue determinada por inhibición de la actividad del complejo PDH con ATP en función del tiempo.

* DRS vs. DC, p<0,05

Figura 12: Actividad enzimática PDH-Quinasa en corazón perfundido de ratas alimentadas durante 15 semanas con dieta control (DC) o dieta rica en sacarosa (DRS).



La actividad enzimática PDH-Quinasa fue determinada por inhibición de la actividad del complejo PDH con ATP en función del tiempo.

El ln del % de la actividad PDH residual es planteado en función del tiempo (0 -2 minutos).

La pendiente de la curva corresponde a la actividad PDH-Quinasa (Kmin-1). Cada punto representa la media \pm SEM de al menos 4 animales en cada grupo experimental.

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

La concentración de glucosa-6-fosfato y de glucógeno en éstos órganos al final de la perfusión fue significativamente mayor en presencia de la hormona ($p < 0.05$). Bajo la acción de la misma, ambos parámetros sobrepasan los valores obtenidos en el corazón de los animales inmediatamente "ex vivo".

Los corazones de las ratas alimentadas con DRS fueron también sensibles a la acción de la hormona. En la *Tabla 10* también podemos observar un significativo incremento en la captación de glucosa y liberación de lactato al medio de perfusión. Sin embargo los valores alcanzados son significativamente menores a los del lote DC. Es importante destacar que la captación de glucosa en presencia de insulina en los animales con DRS es similar a la observada en el lote DC en ausencia de la hormona. La liberación de piruvato en los corazones perfundidos de las ratas con DRS, es similar en ausencia o presencia de insulina.

Los niveles de glucosa-6-fosfato incrementan solamente un 40% en el lote DRS, versus un aumento de 120% en el lote DC bajo la acción de la hormona. Además el contenido de glucógeno, aunque incrementa significativamente al final de la perfusión no alcanza los niveles observados en los corazones de animales con DRS inmediatamente "ex vivo".

La síntesis y degradación del glucógeno, es un sistema dinámico, resultando dificultoso cuantificar en las condiciones experimentales del protocolo utilizado, qué porcentaje es degradado y cuánto sintetizado. No obstante, podemos sugerir una importante disminución en los depósitos tisulares de glucógeno en ausencia de insulina, que no se observa cuando la hormona se encuentra presente en el medio de perfusión.

A concentraciones fisiológicas de glucosa (5.5 mM) la insulina activa el transporte de glucosa, el cual es independiente de la acción de la hormona a concentraciones altas de este azúcar (por encima de 10-15 mM)(122). Más aún, en corazón perfundido, la acción máxima de la insulina sobre la captación de glucosa ocurre a concentraciones fisiológicas de glucosa cuando ésta es utilizada como único sustrato exógeno.

Tabla 10: Captación de glucosa, liberación de lactato y piruvato, y contenido tisular de glucosa-6-fosfato (glucosa-6P) y glucógeno en corazón perfundido de ratas alimentadas con dieta control (DC) o dieta rica en sacarosa (DRS).

Dieta	glucosa ¹ (mM)	insulina	glucosa captación	lactato liberación al medio	piruvato	glucosa-6P	glucógeno ²
DC	5,5	(-)	240,6 \pm 25,5 ^a	74,7 \pm 5,4 ^a	5,5 \pm 0,55 ^b	0,66 \pm 0,08 ^a	61,1 \pm 9,0 ^b
DC	5,5	(+)	400,6 \pm 30,9 ^b	118,0 \pm 10,4 ^b	6,59 \pm 0,21 ^b	1,40 \pm 0,07 ^b	102,5 \pm 7,6 ^a
DRS	8,5	(-)	127,7 \pm 11,7 ^c	111,4 \pm 7,2 ^b	6,30 \pm 0,99 ^b	1,18 \pm 0,11 ^b	62,0 \pm 4,4 ^b
DRS	8,5	(+)	202,5 \pm 11,6 ^a	150,0 \pm 3,61 ^b	6,37 \pm 0,94 ^b	1,65 \pm 0,13 ^c	98,2 \pm 11,8 ^a

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

2- los valores son expresados como μmoles de glucógeno-glucosa equivalentes.

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

Los resultados son expresados como media \pm SEM. Las diferencias estadísticas entre los grupos fue analizada por Anova (insulina y dieta) y posterior test de Scheffe's. Los valores de cada columna que no comparten la misma letra superescrita, son significativamente diferentes, $p<0,05$.

Al menos 5 animales fueron utilizados en cada grupo experimental.

En relación a lo antedicho, corazones de animales alimentados con DRS fueron perfundidos con glucosa 5.5 mM e insulina (30 mU/ml). Esto nos permitió comparar el efecto de la hormona a dos niveles de glucosa en el medio de perfusión: (5.5mM) fisiológico y (8.5mM) nivel semejante a los encontrados en los animales "in vivo".

La *Tabla 11*, muestra que todos los parámetros anteriormente analizados cuando los corazones del grupo DRS fueron perfundidos con un medio que contenía glucosa 5.5 mM e insulina, presentan un comportamiento similar a los constatados cuando son perfundidos en presencia de la hormona y 8.5 mM de glucosa.

Analizando el contenido de los triglicéridos endógenos al final de la perfusión en presencia de la hormona, pudimos constatar (*Figura 13*) una menor utilización de los mismos en el lote de animales alimentados con DC cuando se los compara con los resultados obtenidos en ausencia de la hormona.

Por otro lado, el decrecimiento del contenido total de triglicéridos en el corazón de los animales alimentados con DRS es aún significativamente elevado. Sin embargo los valores alcanzados al final de la perfusión fueron más altos que los observados en ausencia de la hormona.

Estos resultados sugieren que, aún en presencia de la insulina, los corazones de las ratas con DRS, manifiestan todavía una acelerada lipólisis.

La disminuída captación de glucosa constatada en los corazones de ratas con DRS se acompaña de una significativa disminución de su oxidación (esta última estimada a partir de la cuantificación de la actividad del complejo PDH). Los valores de la actividad PDHa y PDH-Quinasa obtenidos al final de la perfusión -en ausencia de insulina en el medio- fueron similares a aquellos observados en el corazón de los animales alimentados con DRS inmediatamente "ex vivo" (*Tabla 12 y Tabla 3*).

Con el objeto de investigar el posible efecto de la insulina en la normalización de las actividades PDHa y PDH-Quinasa, se determinó la actividad de ambas enzimas en presencia de esta hormona, en el corazón perfundido de las ratas DRS al final del período experimental. Los resultados obtenidos (*Tabla 12*), señalan que aunque la acción de la hormona incrementa la actividad PDHa, y disminuye simultáneamente la

Tabla 11: Captación de glucosa, liberación de lactato y piruvato, y contenido tisular de glucosa-6-fosfato (glucosa-6P) y glucógeno en corazón perfundido de ratas alimentadas con dieta rica en sacarosa (DRS).

Dieta	glucosa ¹ (mM)	insulina	glucosa captación	lactato		piruvato	glucosa-6P	glucógeno ²
				($\mu\text{mol}/\text{gr.tej.seco}$ 30 minutos)	liberación			
DRS	5,5	(-)	141,2 \pm 6,95 ^a	106,3 \pm 9,8 ^a	7,59 \pm 1,54 ^a	1,09 \pm 0,12 ^a	53,0 \pm 3,81 ^a	
DRS	5,5	(+)	242,0 \pm 19,3 ^b	142,1 \pm 16,7 ^a	6,19 \pm 0,41 ^a	1,59 \pm 0,10 ^b	101,3 \pm 15,04 ^b	
DRS	8,5	(-)	127,7 \pm 11,7 ^a	111,4 \pm 7,2 ^a	6,30 \pm 0,99 ^a	1,18 \pm 0,11 ^a	62,0 \pm 4,4 ^a	
DRS	8,5	(+)	202,5 \pm 11,6 ^b	150,0 \pm 3,6 ^a	6,37 \pm 0,94 ^a	1,65 \pm 0,13 ^b	98,2 \pm 11,8 ^b	

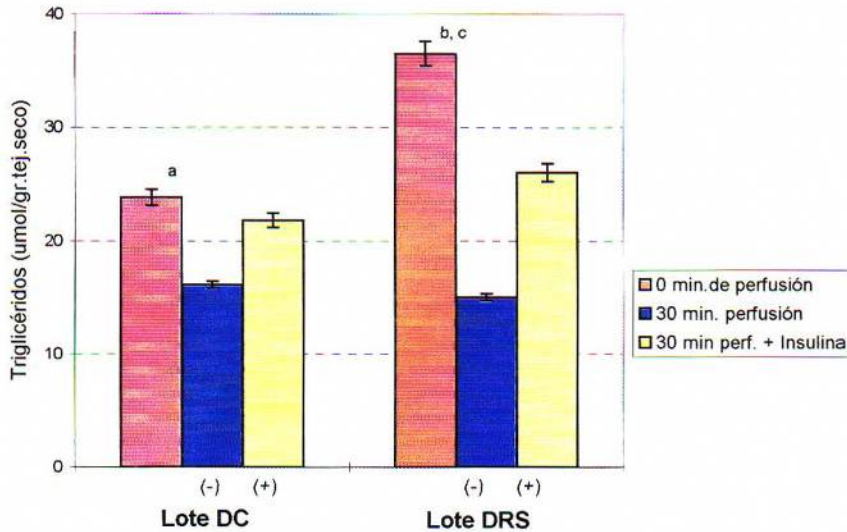
1- concentración inicial de glucosa en el medio de perfusión.

2- los valores son expresados como μmoles glucógeno-glucosa equivalentes. Los valores de glucógeno a los 5 min. de perfusión no recirculante, fueron: DRS=82,9 \pm 6,4 vs. DC=71,9 \pm 5,4.

Los corazones fueron perfundidos durante 5 minutos en un sistema no recirculante (lavado del órgano). Luego fueron perfundidos durante 30 minutos en un sistema recirculante con un buffer Krebs Henseleit bicarbonato, pH=7,4, Ca⁺⁺ 2,5 mM, conteniendo glucosa 5,5mM u 8,5mM en presencia o ausencia de Insulina 30 mU/ml de perfusado. Ver más detalles en el ítem Metodología.

Los valores son expresados como media \pm SEM. Las diferencias estadísticas fueron analizadas por Anova (insulina y concentración de glucosa en el medio) y posterior test de Sheffe's. Los valores de cada columna que no compartan la misma letra superescrita, son significativamente diferentes, p<0,05. Al menos 5 animales fueron utilizados en cada grupo experimental.

Figura 13: Contenido de triglicéridos en corazón perfundido de ratas alimentadas con dieta control (DC) o dieta rica en sacarosa (DRS).



Los corazones fueron perfundidos durante 5 minutos en un sistema no recirculante (lavado del órgano). Luego fueron perfundidos durante 30 minutos en un sistema recirculante con buffer Krebs Henseleit bicarbonato, pH=7,4, Ca^{++} 2,5 mM, en presencia (+) o ausencia (-) de insulina 30 mU/ml de medio de perfusión. (Ver detalles en el ítem Metodología.)

Los valores son expresados como media \pm SEM. Al menos 6 animales fueron utilizados en cada grupo experimental.

a- DC (0 min. perf. recirculante) vs. DC (30 min. perf. recirculante), $p < 0,05$.

b- DRS (0 min. perf. recirculante) vs. DRS (30 min. perf. recirculante), $p < 0,05$.

c- DRS (0 min. perf. recirculante) vs. DRS + Insulina (30 min. perf. recirculante), $p < 0,05$.

Tabla 12: Acción de la insulina sobre la actividad del complejo enzimático Piruvato Dehidrogenasa (PDHa) y Piruvato Dehidrogenasa-Quinasa (PDH-Quinasa) en corazón perfundido de ratas alimentadas con dieta control (DC) o dieta rica en sacarosa (DRS).

Dieta	glucosa ¹ (mM)	insulina	PDHa (% de PDH total)	PDH-Quinasa (K min ⁻¹)
DC	5,5	(-)	62,2 ± 3,5 ^a	0,90 ± 0,11 ^a
DC	5,5	(+)	68,9 ± 3,6 ^a	0,89 ± 0,06 ^a
DRS	8,5	(-)	21,0 ± 3,2 ^b	3,12 ± 0,46 ^b
DRS	8,5	(+)	36,0 ± 4,4 ^c	1,58 ± 0,15 ^c

1- concentración inicial de glucosa en el medio de perfusión

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

Los corazones fueron perfundidos durante 5 minutos en un sistema no recirculante (lavado del órgano). Luego fueron perfundidos durante 30 minutos en un sistema recirculante con buffer Krebs Henseleit bicarbonato, pH=7,4, Ca⁺⁺ 2,5 mM, conteniendo glucosa 5,5mM u 8,5 mM en presencia o ausencia de Insulina 30 mU/ml de medio de perfusión. (Ver detalles en el ítem Metodología.)

Los valores son expresados como media ± SEM. Las diferencias estadísticas entre los grupos fue analizada por Anova (dieta e insulina) y posterior test de Scheffe's. Los valores de cada columna que no comparten la misma letra superescrita, son significativamente diferentes, p<0,05.

Al menos 6 animales fueron utilizados en cada grupo experimental.

PDH-Quinasa: La actividad (Kmin-1) fue determinada por inhibición de la actividad del complejo PDH con ATP en función del tiempo.