

INTRODUCCION

1- Metabolismo de la fructosa

La sacarosa, uno de los componentes hidrocarbonados importantes de la dieta, es fuente de glucosa y fructosa, siendo ésta última la responsable de diversos cambios a nivel enzimático y del medio hormonal, que involucran entre otros al metabolismo de lípidos e hidratos de carbono. Estos cambios, pueden observarse por una ingesta incrementada de fructosa tanto en el hombre como en animales de experimentación (1,2).

En las últimas décadas los países occidentales, introdujeron paulatinamente cambios en la composición de los carbohidratos de la dieta (disminución de carbohidratos complejos como el almidón, que fueron reemplazados por azúcares refinados tales como sacarosa y fructosa). Al respecto, estudios de Hallfrisch y col. (3), señalan que el consumo de fructosa en estos países se incrementó del 10 al 15 % del total de las calorías y más aún, que éste porcentaje sigue aumentando.

A nivel intestinal, la sacarosa es hidrolizada a glucosa y fructosa por la enzima Sacarasa, ubicada en el ribete en cepillo de las células intestinales. La Sacarasa, enzima adaptativa, aumenta su actividad con la ingesta de sacarosa (3).

La absorción de la fructosa a nivel intestinal se lleva a cabo en forma pasiva, utilizando el transportador de glucosa (Glut 5) ubicado en el ribete en cepillo de las células del intestino delgado. Una pequeña porción de la fructosa en el interior de la célula intestinal es metabolizada, lo cual permite mantener el gradiente de concentración intra-extracelular, aumentando la velocidad de absorción de la misma.

La mayor parte de la fructosa absorbida egresa de la célula intestinal a través de la proteína transportadora de glucosa, Glut 2, ubicada en la membrana basolateral de la célula intestinal, y vía vena porta llega al hígado, sitio fundamental de metabolización de este hidrato de carbono.

Por otra parte, la glucosa (componente del disacárido sacarosa) es absorbida a nivel intestinal por medio de un sistema de co-transporte Na^+ -glucosa a través del co-

transportador SGLT1: proteína transportadora de Na^+ y glucosa. La energía necesaria para este primer paso metabólico, es obtenida acoplando el transporte de glucosa al del Na^+ . El gradiente de Na^+ se mantiene gracias al transporte de Na^+ fuera de la célula a través de la membrana basolateral del enterocito por la bomba de Na^+/K^+ ATPasa.

Ha sido demostrado en distintas especies, que dietas ricas en carbohidratos pueden modular tanto los niveles, como la actividad de estas proteínas transportadoras (SGLT1) en la membrana del ribete en cepillo de las células intestinales (4). Al respecto Dyer y col.(5), demostraron que tanto la glucosa como la fructosa pueden inducir la síntesis de proteína transportadora SGLT1.

La fructosa a nivel hepático, como otros azúcares, es primeramente fosforilada en el carbono 1, reacción catalizada por las enzimas Hexoquinasa o Fructoquinasa a Fructosa 1-fosfato (Fructosa-1P). La glucosa inhibe la fosforilación de la fructosa por la enzima Hexoquinasa, siendo la actividad de la Fructoquinasa estimulada por la sacarosa y la fructosa (6).

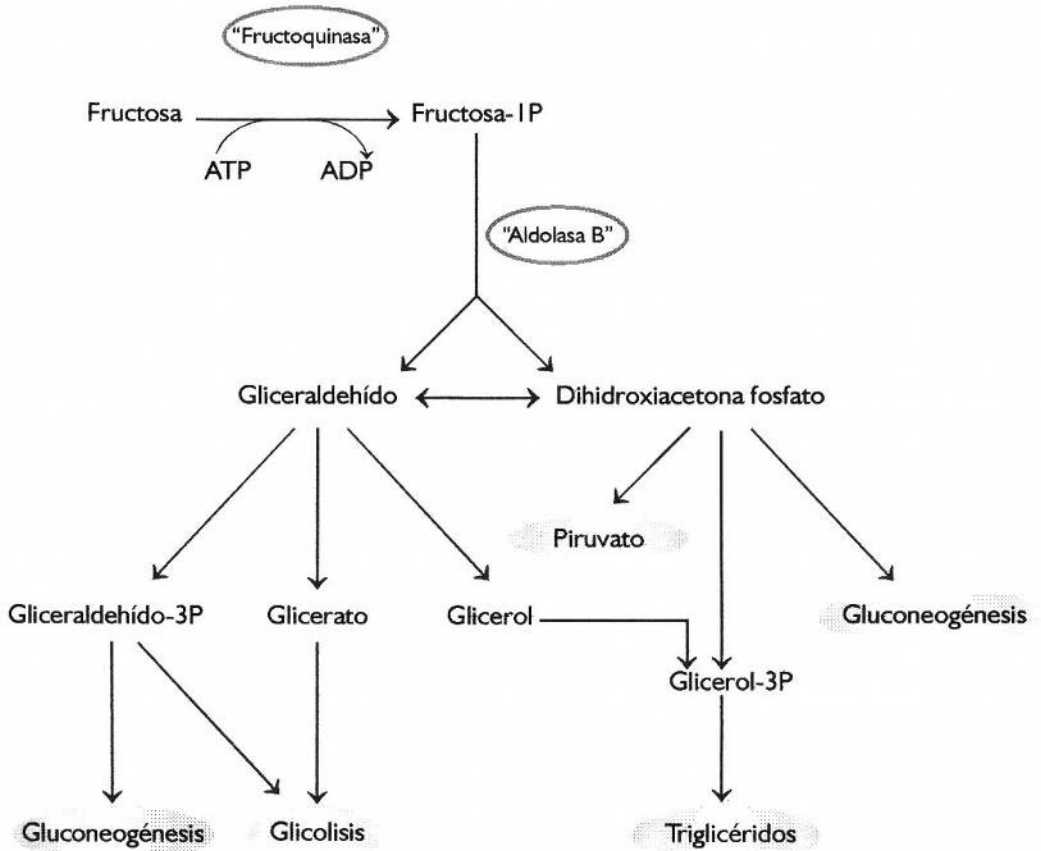
La Fructosa 1-P, es rápidamente clivada por la enzima Fructosa 1-P Aldolasa B, en dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y gliceraldehído.

La DHAP puede seguir 3 vías metabólicas: 1- La isomerización hasta piruvato, que en condiciones de anaerobiosis es transformado en lactato y en aerobiosis entra en el Ciclo de Krebs como AcetilCoA. 2- Reducción a glicerol, que podrá luego utilizarse para sintetizar triglicéridos. 3-Condensación para formar glucosa o glucógeno.

El gliceraldehído, también tiene 3 posibilidades: 1- Ser fosforilado (Triosa quinasa) y continuar en la glicólisis. 2- Convertirse en glicerato y entrar en vía glicolítica. 3- Reducirse a glicerol para participar de la síntesis de lípidos. (Figura 1).

De lo expuesto, la Fructosa 1-P, "bypasea" la reacción catalizada por la enzima Fosfofructoquinasa-I (PFK-I), siendo éste un paso limitante en la glicólisis. Más aún, experiencias realizadas en trozos de hígado demostraron que la Fructoquinasa hepática es mucho más activa que las actividades combinadas de las dos

Figura 1: Metabolismo de la fructosa en células hepáticas.



fosfotransferasas que fosforilan la glucosa (Hexoquinasa y Glucoquinasa) (6). Estos hallazgos avalan, el rápido metabolismo de la fructosa en hígado y su importante inducción a una mayor síntesis de ácidos grasos.

La actividad de las enzimas que actúan en el metabolismo de la fructosa son en gran medida reguladas por factores nutricionales y hormonales. Así por ejemplo,

- a) la actividad de la enzima Fructoquinasa hepática, es estimulada por un incremento en la ingesta de fructosa o sacarosa.
- b) los mecanismos de regulación de la enzima Fructoquinasa, a nivel hormonal, difieren de los de la enzima Glucoquinasa, ya que esta última es regulada principalmente por los niveles plasmáticos de la hormona Insulina.
- c) la incorporación de ^{14}C -fructosa en ácidos grasos, triglicéridos, glicerol y glucógeno tiene una velocidad mayor en hígado que la incorporación de ^{14}C -glucosa en estos metabolitos y su oxidación (6).

Al respecto, numerosos estudios en animales de experimentación demuestran un incremento de triglicéridos hepáticos como consecuencia de la ingesta crónica de fructosa. La adaptación a dietas ricas en fructosa, incrementa la actividad de las enzimas lipogénicas: Acetil CoA Carboxilasa, complejo Acido graso sintasa, NADP-Malato Dehidrogenasa, ATP Citrato Liasa, Glicerol acil transferasa, Fosfatidasa fosfohidrolasa (2,6,7).

2- Hipertrigliceridemia, Intolerancia a la glucosa y Resistencia insulínica asociadas a ingestas ricas en carbohidratos.

Hace más de tres décadas desde que Ahrens y col.(2), y posteriormente el grupo de Mancini y col. (1) publicaron los primeros trabajos que mostraban la inducción de hipertrigliceridemia por una ingesta iterativa de carbohidratos simples (sacarosa o fructosa) en individuos normales y obesos.

El interés que se originó por los estudios metabólicos del efecto de los carbohidratos dietarios, simples: sacarosa versus complejos: almidón, fue probablemente impulsado por los hallazgos epidemiológicos de Cohen y col.(8). Estos autores observaron que la sustitución de sacarosa por almidón en una dieta que mantenía en términos generales una composición semejante de los otros nutrientes, podría explicar la alta prevalencia de intolerancia a la glucosa observada en los habitantes judíos que migraban de países de Arabia o Africa a Israel.

A nivel experimental Laube y col.(9), observaron efectos metabólicos diferentes cuando se ingieren azúcares complejos tales como almidón, y disacáridos (sacarosa) o monosacáridos (glucosa y fructosa). Estos estudios, han demostrado niveles plasmáticos elevados de triglicéridos y ácidos grasos libres en ratas alimentadas con dieta rica en sacarosa o con mezcla de cantidades equivalentes de glucosa y fructosa, en comparación a los animales alimentados con almidón durante el mismo período experimental. Más aún, Reaven y col.(10) demostraron que ratas jóvenes alimentadas durante 3-4 semanas con una dieta rica en sacarosa desarrollaban hipertrigliceridemia -mayor secreción hepática de preβlipoproteína, (VLDL-TG), e hiperinsulinemia en ausencia de obesidad.

Por otra parte Mancini y col.(1), observaron una menor velocidad de remoción de los triglicéridos plasmáticos en sujetos alimentados con una dieta isocalórica rica en hidratos de carbono simples, sugiriendo que un menor clearance de triglicéridos por parte de los tejidos periféricos, contribuiría también a la hipertrigliceridemia.

El incremento de sacarosa en la dieta (reemplazando al almidón) conduce también a un deterioro en la homeostasis a la glucosa, asociada con hiperinsulinemia basal y post estímulo (test de glucosa endovenosa) (12). Un incremento en la secreción pancreática de insulina fue observada en estudios "in vitro" en órgano aislado y en islotes de Langerhans (la secreción de la hormona incrementó bajo el estímulo de glucosa, sulfonilúreas (HB-419) o arginina) cuando se compararon animales alimentados por un período corto de tiempo con dieta rica en sacarosa versus almidón (6,9). Bajo estas condiciones también se demostró en islotes aislados, un incremento en la síntesis de insulina y pro insulina a partir de aminoácidos marcados (7).

Estos hallazgos confirmarían que por una simple manipulación nutricional, sustitución de sacarosa por almidón, es posible en ratas normales, inducir cambios metabólicos importantes como hipertrigliceridemia, intolerancia a la glucosa y resistencia insulínica (12,13,14).

Se ha demostrado recientemente que la resistencia insulínica (disminuída acción de la insulina), se asocia a una mayor oferta de lípidos, ya sea a través de un incremento en los niveles circulantes de ácidos grasos libres y triglicéridos, o un incremento del contenido de triglicéridos almacenados en "tejidos blancos" para la acción de la hormona (ej. músculo esquelético) (15).

Dentro de este contexto, nuestro laboratorio ha constatado durante los últimos años (13,16,17) que ratas Wistar normales alimentadas crónicamente con una dieta rica en sacarosa (63%p/p), presentan un síndrome polifásético caracterizado de acuerdo al tiempo de administración de la misma, por tres períodos bien definidos: 1- *Período de Inducción* (PI): 3-5 semanas de ingesta, 2- un *Período de Adaptación* (PA): 6-8 semanas de ingesta, y 3- un *Período de Recurrencia* (PR) cuando los animales son alimentados durante 15-30 semanas con la dieta rica en sacarosa .

En el Período de Inducción, los animales desarrollan hipertrigliceridemia, con normoglucemia e hiperinsulinemia. Se observa además un incremento del contenido de triglicéridos en hígado y corazón, mayor secreción hepática de VLDL-TG ("in vivo" y en perfusión de hígado aislado) y decrecimiento en la remoción de los triglicéridos plasmáticos, como consecuencia, al menos en parte, de una menor actividad lipolítica post heparínica -PHLA- (18,19).

La hipertrigliceridemia se acompaña de un incremento en la concentración plasmática de ácidos grasos libres (mayor lipólisis basal del tejido adiposo) y una disminuída acción antilipolítica de la insulina en adipocitos aislados (20), lo que favorece la mayor oferta de estos metabolitos a los tejidos extrahepáticos.

Estos hallazgos se asocian a intolerancia a la glucosa (en pruebas de estímulo con glucosa endovenosa) e hiperinsulinemia, basal y frente a estímulos (páncreas aislado,(19)).

En este Período de Inducción, Lombardo y col.(21) demostraron también a nivel del músculo cardíaco, un significativo incremento en el contenido de triglicéridos tisulares que se asocia a una serie de anomalías bioquímico metabólicas tales como: una disminución de la actividad de la enzima Piruvato Dehidrogenasa (forma activa del complejo, PDHa), incremento de los niveles de citrato, acetil CoA y de la relación acetilCoA/CoASH, con niveles normales de glucógeno cardíaco. Más aún hemos observado en perfusión de corazón aislado, que la adición de la hormona Insulina "in vitro" al medio de perfusión, no logra normalizar la disminuída actividad del complejo PDH (21).

Cuando la dieta se prolonga por 6-7 semanas (Período de Adaptación -PA-), todos los parámetros metabólicos anteriormente analizados, alcanzan valores normales semejantes a los observados en animales de igual sexo y edad alimentados con dieta control -DC- (14). Mancini y col.(1) y Sheorin y col.(22), demostraron que la baja actividad lipolítica postheparínica (PHLA) observada luego de 3-5 semanas de ingesta (PI). se normaliza cuando la dieta se prolonga por 7 semanas (PA).

Si bien no conocemos los mecanismos íntimos involucrados en esta etapa de adaptación, se podría sugerir, que si los mecanismos patofisiológicos que operan en este período, son similares a los del PI, la remisión de la hiperinsulinemia podría jugar un rol importante en el perfil de los cambios bioquímicos metabólicos observados en el PI y PA.

Lombardo y col. (14,23,24,25), demostraron que la hipertrigliceridemia, niveles elevados de ácidos grasos libres plasmáticos e intolerancia a la glucosa reaparecen cuando la dieta continúa por 13-15 semanas. Este último período denominado Período de Recurrencia -PR- se diferencia del PI por presentar además de lo ya mencionado, una secreción "in vitro" de VLDL-TG ligeramente superior (aunque no significativamente) a la observada en los animales controles, que se acompaña de un

extremadamente elevado contenido de triglicéridos hepáticos, con un pool de triglicéridos plasmáticos incrementado y una velocidad de remoción de VLDL-TG plasmática muy disminuída. En este período, la homeostasis de la glucosa se encuentra alterada, ya que los animales presentan hiperglucemia basal, acompañada de normoinsulinemia y una respuesta insulínica en pruebas de estímulos de glucosa endovenosa normal (in vivo) o ligeramente aumentada "in vitro", en perfusión de páncreas aislado (14,23).

Estos hallazgos nos muestran que un perfil metabólico y hormonal diferente acompaña a los distintos períodos de hipertrigliceridemia inducida por una ingesta crónica de sacarosa: que evolucionan desde normoglucemia e hiperinsulinemia (P. Inducción) a hiperglucemia y normoinsulinemia (P. Recurrencia).

Sin embargo los mecanismos involucrados en este síndrome nutricional experimental cuando la dieta es administrada por un período prolongado de tiempo (15 semanas) no han sido aún bien dilucidados.

En particular a nivel del **músculo cardíaco**, hemos demostrado que algunas de las alteraciones mencionadas en el PI se encuentran más acentuadas en el PR (26). Al respecto se observa un mayor contenido tisular de triglicéridos y una aún más acentuada disminución de la actividad del complejo PDH. Estas anomalías se asocian, solamente en este período, a un mayor contenido de glucosa-6-fosfato y glucógeno, sugiriendo que la administración crónica (15 semanas) de una dieta rica en sacarosa a ratas normales, conduciría a cambios en la utilización del combustible energético que podrían asociarse a una alteración en la captación y destino metabólico de la glucosa.

3- Miocardio: Metabolismo normal

El abastecimiento de energía necesaria para la contracción del miocardio depende de una transferencia suficiente de O_2 a la cadena respiratoria en las mitocondrias así como de la disponibilidad de sustratos de origen endógeno o exógeno, la metabolización de los mismos y la competición entre los diferentes pasos de las oxidaciones biológicas.

En los corazones bien oxigenados, la participación de los hidratos de carbono y los lípidos en dichas oxidaciones biológicas depende de la concentración plasmática de los sustratos, del transporte de los mismos a través de las membranas celulares y del flujo en las vías de la glicólisis y la β -oxidación. Ambos procesos generan acetilCoA, que ingresa al ciclo de Krebs con producción de CO_2 , mientras que los H_2 son transportados a la cadena respiratoria, estando el flujo de electrones determinado por la relación ATP/ADP y el cociente NADH/NAD⁺. En estas condiciones, los ácidos grasos han sido identificados como los sustratos preferenciales, tanto en estudios "in vivo" como "in vitro" (27).

Metabolismo lipídico

Dado que el músculo cardíaco presenta una capacidad limitada para acumular ácidos grasos libres y una muy reducida capacidad de "síntesis de novo", los triglicéridos (TG) constituyen los depósitos grasos, que dependen del continuo abastecimiento de ácidos grasos desde la circulación (28).

Los ácidos grasos llegan al miocardio desde el aporte dietario como componentes de los triglicéridos (Quilomicrones), sintetizados "de novo" por el hígado (pre β -lipoproteína de muy baja densidad VLDL-TG) o de la lipólisis de los depósitos de triglicéridos del tejido adiposo, ácidos grasos plasmáticos no esterificados, -AGNE-

unidos a la albúmina. La albúmina plasmática contiene diferentes sitios de unión a ácidos grasos, lo que permite su vehiculización y el aporte al corazón y otros tejidos.

Los AGNE componentes de las VLDL-TG y Quilomicrones ingresan a los cardiocitos luego de que dichas partículas sufran una hidrólisis en la superficie luminal del endotelio vascular. Este proceso hidrolítico está mediado por la enzima Lipoproteína lipasa (LPL). Dicha enzima -LPL- se localiza en sitios de unión específicos de la superficie luminal de las membranas celulares endoteliales. Al respecto existen claras evidencias mostrando que la LPL cardíaca es sintetizada de novo en las células parenquimatosas del músculo cardíaco y que el gen que codifica la LPL está localizado exclusivamente en los cardiocitos. (29,30)

La velocidad de hidrólisis llevada a cabo por la enzima LPL se encuentra influenciada por la concentración de triglicéridos plasmáticos, por la disponibilidad de enzima unida a la superficie luminal del endotelio capilar y por la presencia del activador proteico, la apoproteína apoCII, presente en los Quilomicrones y VLDL. La cantidad (masa) y actividad de esta enzima en el miocardio no es constante, variando en situaciones tales como el ayuno (31) y la alimentación con dietas ricas en grasas (32). Scholtz y col. (33,34) demostraron que dietas ricas en hidratos de carbono disminuyen la actividad de la enzima LPL cardíaca liberable por la heparina. Otras hormonas como glucagon, norepinefrina y sustancias relacionadas también ejercen acción sobre la actividad LPL (35) y situaciones tales como diabetes tienen un efecto regulatorio a largo plazo (28).

Los productos de la hidrólisis de las lipoproteínas ricas en triglicéridos, predominantemente ácidos grasos y monoacilgliceroles (éstos últimos degradados por una enzima Monoglicerido hidrolasa), son captados por las células endoteliales y los cardiocitos. Los mecanismos de transporte celulares, ya sea para los ácidos grasos no esterificados o los provenientes de las VLDL y Quilomicrones, son muy similares.

Los cardiocitos extraen los ácidos grasos desde la circulación en forma eficiente; esta extracción es determinada por la concentración sanguínea de ácidos

grasos, el trabajo cardíaco y la presencia de sustratos competitivos. La ruta en el transporte de los ácidos grasos desde el espacio vascular al citoplasma del cardiocito, comprende la secuencia que se observa en la *Figura 2*:

Inicialmente los ácidos grasos liberados de la albúmina sufren una translocación a través de la membrana luminal de la célula endotelial. La difusión a través del citoplasma de la misma, estaría facilitada por una proteína intracelular (FABPc, proteína ligadora de ácidos grasos de origen citoplasmático). Luego de atravesar la célula endotelial, se produce una difusión de los ácidos grasos a través del espacio intersticial situado entre las células endoteliales y las células del parénquima del corazón. Esta difusión intersticial parecería estar mediada por la albúmina. El desplazamiento a través del sarcolema se realiza en forma pasiva o es facilitada por una proteína de membrana específica: FABPm, -proteína ligadora de ácidos grasos de origen en las membranas plasmáticas-. Luego del pasaje a través del sarcolema, la unión a una FABPc -de origen citoplasmático- facilita el transporte en el citoplasma.

Si bien el mecanismo predominante en la captación de ácidos grasos por el corazón, se debe al gradiente de concentración entre el espacio vascular y el interior de la célula, el transporte de ácidos grasos desde el plasma al citoplasma, no parecería ser un simple mecanismo de difusión a través de la membrana (36,37,38).

En el interior del cardiocito, los ácidos grasos son activados, uniéndose a la coenzima A, reacción catalizada por la enzima Acil-CoA sintetasa, que se halla muy próxima a la cara externa de la membrana mitocondrial externa. Este ácido graso activado, puede seguir distintas vías metabólicas:

1- ser esterificado formando triglicéridos y fosfolípidos (condensación entre acilCoA y glicerol-3P), y

2- oxidarse dando como producto final CO_2 , H_2O y energía, en mitocondrias

(*Figura 2*).

En condiciones normales, los ácidos grasos son principalmente utilizados para la producción de ATP, siendo una menor proporción incorporada como lípidos esterificados. En virtud de la naturaleza dinámica de este pool de triglicéridos tisulares,

Figura 2: Captación y metabolización de ácidos grasos en células cardíacas.

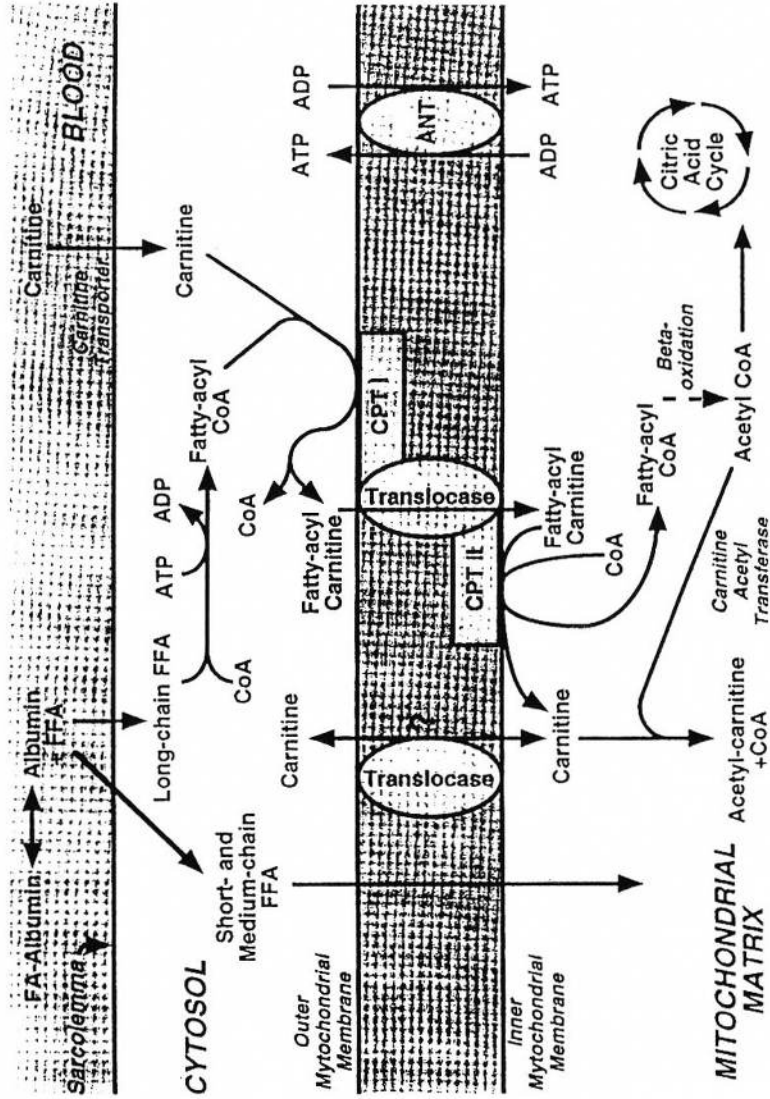


Figure 2. Major metabolic pathways and functions of carnitine within lipid metabolism. FA, fatty acids; FFA, free fatty acids; ATP, adenosine triphosphate; ADP, adenosine diphosphate; CoA, coenzyme A; CPT, carnitine palmitoyl transferase; ANT, adenine nucleotide translocase.

parte de los ácidos grasos son temporariamente almacenados y luego utilizados en los procesos catabólicos para la producción de energía.

Los ácidos grasos acilados, se unen a la carnitina y son transportados a las mitocondrias, para su oxidación, mediante un sistema enzimático, la Carnitina-acil-transferasa I, y la Carnitina-acil-transferasa II, enzimas ubicadas en la cara interna de la membrana mitocondrial externa y en la cara externa de la membrana mitocondrial interna, respectivamente.. Dentro de la matriz mitocondrial, la β -oxidación da como producto final acetilCoA que se condensa en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos con oxaloacetato produciendo citrato y CoA libre. El citrato es luego principalmente metabolizado en el Ciclo de Krebs.

Un sitio adicional para la oxidación de ácidos grasos de cadena larga son los peroxisomas. La diferencia fundamental es que estas organelas no poseen un sistema de transporte dependiente de la carnitina. Por otra parte la β -oxidación es muy similar a la que ocurre en mitocondria, excepto que los electrones son transferidos directamente al O_2 molecular generando H_2O_2 que luego es degradado por el sistema de las catalasas. Los productos de la β -oxidación peroxisomal con carbono-6 y carbono-4 son posteriormente oxidados en mitocondria. Esta vía metabólica no es cuantitativamente importante cuando se la compara con la β -oxidación mitocondrial.

Los factores que controlan la β -oxidación de ácidos grasos en el músculo cardíaco son: la disponibilidad de ácidos grasos desde el plasma, los niveles energéticos (ATP), el estado redox ($NADH/NAD^+$) y la disponibilidad de CoA tanto en el compartimento mitocondrial como en el espacio citoplasmático. (28)

Los fosfolípidos y triglicéridos son las principales formas de depósito de ácidos grasos en corazón. Los fosfolípidos forman parte de las membranas sarcoplasmáticas, siendo los triglicéridos reservados como fuente endógena de sustratos para producción de ATP.

La síntesis de triglicéridos en los miocitos, consiste básicamente en la esterificación del glicerol 3-fosfato con 3 moléculas de acilCoA, proceso catalizado por

diversas enzimas celulares. En células cardíacas el glicerol 3-fosfato, proviene de la reducción de la dihidroxiacetona fosfato (DHAP), producto de la glicólisis. La unión de la primer molécula de acilCoA al glicerol 3P es catalizada por la Glicerol 3 fosfato aciltransferasa, seguida de una segunda condensación para formar el ácido fosfatídico, en la que interviene la 1-Aciliglicerol fosfato aciltransferasa. La escisión del grupo fosfato, da lugar a la formación del 1,2 diacilglicerol, que se condensa por la Diacilglicerol aciltransferasa, con una tercera molécula de acilCoA formando triacilglicerol.

Los depósitos de triglicéridos cardíacos están localizados en diferentes sitios del corazón. Una parte del pool de triglicéridos se encuentra presente en los adipocitos cardíacos (cerca de la superficie epicárdica de la arteria coronaria, tanto en ratas como en perros). Otra está presente como gotas lipídicas flotantes en el citoplasma fácilmente visible a la microscopía (39). Un resto está asociado a partículas semejantes a los lisosomas.

La regulación a corto plazo de la síntesis de triglicéridos depende de la disponibilidad de sustratos, concentración celular de cofactores, y del estado de fosforilación y localización subcelular de las enzimas involucradas. Un aumento de glicerol 3P y acilCoA promueve la formación de lípidos.

Ha sido demostrado por diferentes investigadores (40,41,42) la regulación a largo plazo de las enzimas lipogénicas en el miocardio y su relación con el contenido de triglicéridos cardíacos, en diferentes situaciones tales como ayuno o diabetes experimental inducida por aloxano.

En el músculo cardíaco, el pool lipídico (TG) se encuentra en un estado dinámico (esterificación - hidrólisis). Cuando la esterificación excede la hidrólisis, se traduce en un mayor contenido de triglicéridos, mientras que estudios en corazón perfundido, muestran que la lipólisis provee los sustratos necesarios para cubrir las necesidades metabólicas cuando el corazón carece de provisión externa de los mismos (43).

La hidrólisis de los triglicéridos en el músculo cardíaco es mediada por una serie de reacciones en cadena. La Triglicérido lipasa cataliza la remoción del primer ácido graso. El segundo y tercer ácido graso, son hidrolizados por la Diacilglicerol (DG lipasa) y Monoacilglicerol (MG lipasa) lipasas. Dado que la actividad de la DGlipasa y la MG lipasa son muy superiores a la Triglicérido lipasa, esta última es la que determina la velocidad limitante de hidrólisis de los triglicéridos endógenos.

La localización de la Triglicérido lipasa, ha sido definida en base a su pH óptimo de acción. En el miocardio se indentifican 3 Triglicérido lipasas: alcalina, neutra y ácida. La ácida parece tener su sitio preferente de localización en los lisosomas y jugaría un rol primordial en la hidrólisis de los triglicéridos endógenos. Se ha sugerido que la Lipasa neutra representa la lipoproteína lipasa sintetizada y procesada en los cardiocitos antes de ser transferida a su sitio de acción en la superficie luminal de la membrana de la célula endotelial (44).

La regulación a largo plazo de la hidrólisis de los triglicéridos endógenos involucra fundamentalmente síntesis y degradación de la enzima, resultando en un cambio en el número de moléculas enzimáticas en la célula cardíaca (45). La diabetes mellitus disminuye la actividad de la Lipasa neutra. La actividad de la enzima Lipasa ácida, por su parte aumenta en el ayuno. Se ha demostrado "in vitro" que la enzima Triglicérido lipasa está regulada por feed back por diferentes factores, entre ellos ácidos grasos y sus ésteresCoA y acilcarnitina.

Metabolismo hidrocarbonado

La glucosa , molécula hidrofílica, es incapaz de atravesar libremente la membrana citoplasmática; por lo que utiliza un sistema de difusión facilitada mediada por un transportador. Este proceso independiente de energía es saturable y estereoespecífico y existe una familia de estos transportadores, cuya expresión se limita al tipo de tejido. En los tejidos sensibles a la insulina, como el corazón, la proteína Glut-4, y en menor medida la Glut-1, son las que determinan principalmente la entrada de glucosa (46,47). En miocardio la insulina puede inducir la traslocación rápida y

reversible de dichas proteínas transportadoras hacia la membrana plasmática a partir de los pools intracelulares, así como también puede inducir un incremento de la actividad intrínseca de los transportadores (48,49,50,51).

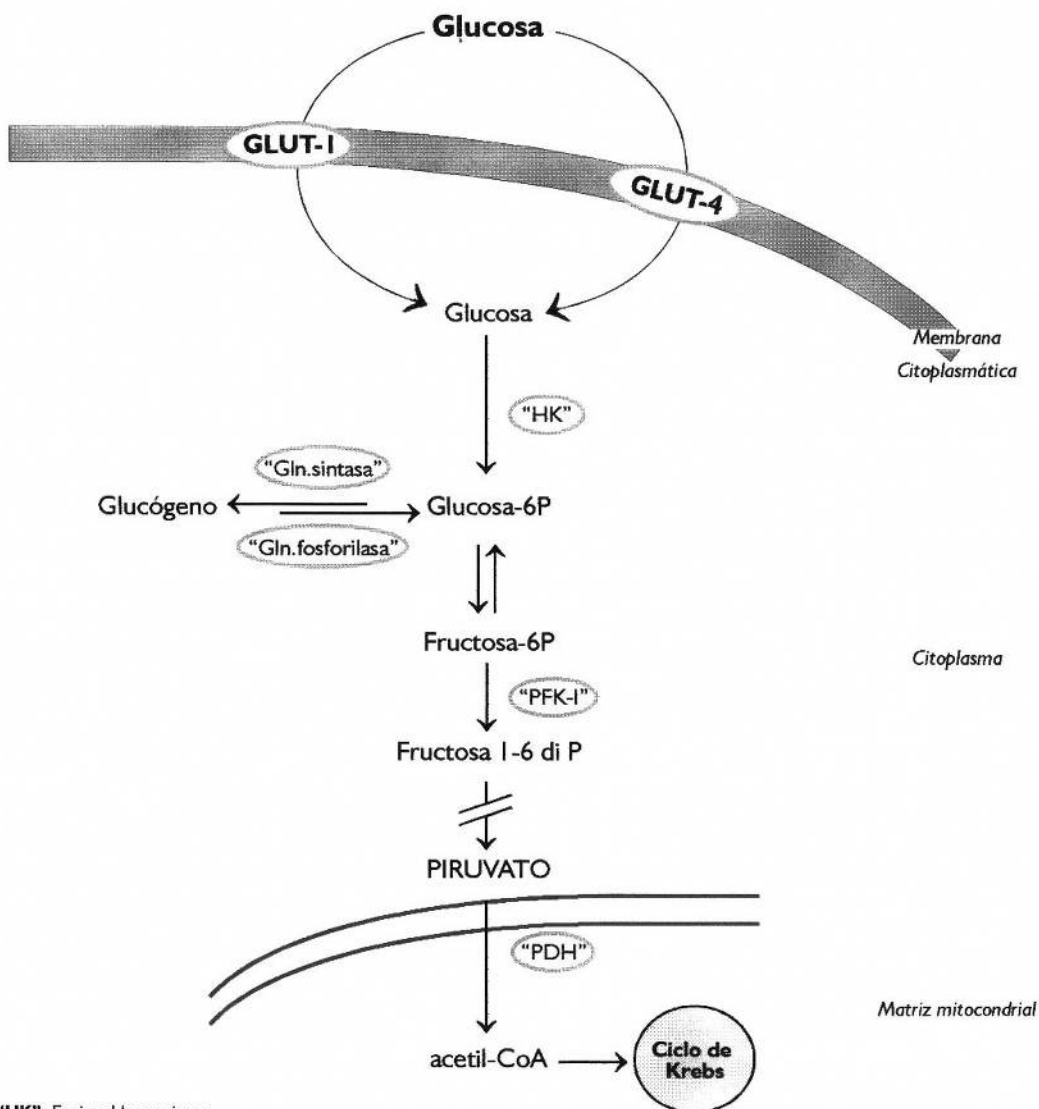
Las diversas acciones de la insulina se inician por interacción con su receptor transmembrana ($\alpha_2\text{-}\beta_2$). La subunidad α (extracelular) confiere una alta afinidad de unión a la insulina. El componente transmembrana de la subunidad β es responsable de traducir la señal de unión de la insulina al interior de la célula. Luego de la unión de la insulina, residuos de tirosina específicos de la región intracelular de la subunidad β son rápidamente fosforilados y se activa la Tirosina quinasa intrínseca a esta región. La autofosforilación del receptor y tirosil fosforilación de otros sustratos proteicos requieren de un sitio de unión intacto para el ATP, dentro de la subunidad β . Muchas de las acciones de la insulina son reguladas por fosforilación o defosforilación de residuos serina o treonina (48,49).

Las consecuencias metabólicas de la unión de la insulina a la superficie celular son múltiples y depende de la naturaleza del tejido blanco. Enzimas claves del metabolismo lipídico y glucídico son estimuladas o inhibidas por la insulina (entre ellas la Glucógeno sintasa y la Piruvato Dehidrogenasa), aunque se desconoce la cascada de fosforilación-defosforilación que une la activación del receptor de insulina a esas enzimas (52). La inhibición de la fosforilación y/o estimulación de la defosforilación, por activación de proteínas fosfatasas, han sido demostrados como mecanismos de acción de insulina (53).

La utilización intracelular de la glucosa ocurre a través de varios caminos: el no oxidativo que refleja la conversión de la glucosa en glucógeno (De Fronzo y col. (54)), mientras que el oxidativo involucra la oxidación completa de los átomos de Carbono derivados de la glucosa a CO_2 (Figura 3).

La glicólisis y/o la ruptura de glucógeno hasta piruvato, provee una cantidad limitada de ATP, mientras que la subsecuente entrada del piruvato a la mitocondria y su oxidación brinda la mayoría de la energía obtenida a partir de la glucosa.

Figura 3: Captación y metabolización de glucosa en células cardíacas



"HK": Enzima Hexoquinasa

"Gln. sintasa": Enzima Glucógeno sintasa

"Gln. fosforilasa": Enzima Glucógeno fosforilasa

"PFK-I": Enzima Fosfofructoquinasa

"PDH": Complejo enzimático Piruvato dehidrogenasa

La glucosa es primeramente fosforilada por el ATP en una reacción catalizada por la enzima Hexoquinasa. Este paso metabólico está regulado por el producto final de reacción glucosa 6-fosfato (glucosa 6P), así como por la relación ATP/ADP.

La glucosa-6-fosfato, puede seguir la vía degradativa a través del proceso de glicólisis o conducir a la síntesis de glucógeno (*Figura 3*).

La enzima Glucógeno sintasa, cataliza el paso limitante en la síntesis del glucógeno en diferentes tejidos (hígado, músculo) (55). Esta enzima se presenta en dos formas: *I* y *D*, la conversión de una forma en otra depende del mecanismo de fosforilación-defosforilación. La forma *I*, defosforilada, incrementa su afinidad por la uridina di-fosfo-glucosa (UDPG) en presencia de glucosa-6-fosfato; siendo la forma *D* menos sensible a este metabolito.

La conversión de la forma fosforilada en defosforilada es catalizada por una Glucógeno sintasa fosfatasa.

Por su parte la enzima Glucógeno fosforilasa, es la responsable de la degradación del glucógeno generando unidades de glucosa-1-fosfato. Esta enzima también se presenta en forma fosforilada y defosforilada, siendo la forma fosforilada (a) fisiológicamente activa aún en ausencia de AMP. La conversión de las formas fosforilada-defosforilada, es catalizada por las enzimas Fosforilasa quinasa y Fosforilasa fosfatasa. La Fosforilasa quinasa es activada, por un mecanismo en cascada mediado por AMPcíclico como segundo mensajero, e independientemente, por los niveles intracelulares de Ca^{++} .

En miocardio la regulación del contenido de glucógeno es mediada por factores hormonales y no hormonales. El glucagon y la adrenalina, promueven la conversión hacia la forma (a) de la fosforilasa y la forma *D* de la sintasa. En cambio la insulina, incrementa la fracción *I* de la sintasa. En cuanto a los factores no hormonales, los más importantes son los niveles de 5'AMP, ATP, glucosa 6-P, fosfato (Pi), y el contenido de glucógeno presente en el tejido.

Por otra parte, la glucosa-6-fosfato en su vía degradativa genera piruvato. En este camino glicolítico, la enzima Fosfofructoquinasa-I (PFK-I) juega un rol primario en la conversión de glucosa en piruvato, dado que es la enzima limitante y está regulada por numerosos factores entre los que pueden mencionarse, los niveles de ATP, fructosa-6-fosfato, fructosa 1-6 di-fosfato, citrato, AMPc y el pH del medio. (27)

El piruvato proveniente de la glicólisis, puede ser convertido en AcetilCoA, lactato o alanina en músculo cardíaco. Los dos primeros productos son los que se producen en mayor cantidad.

La conversión de piruvato a acetilCoA, mediante el proceso de decarboxilación oxidativa, es catalizada por el complejo enzimático Piruvato Dehidrogenasa (PDH).

Este complejo, localizado en la membrana mitocondrial interna, consta de 3 unidades catalíticas diferentes: la E1: Piruvato dehidrogenasa, E2: Dihidrolipoamida transacetilasa y la E3: la Dihidrolipoamida dehidrogenasa.

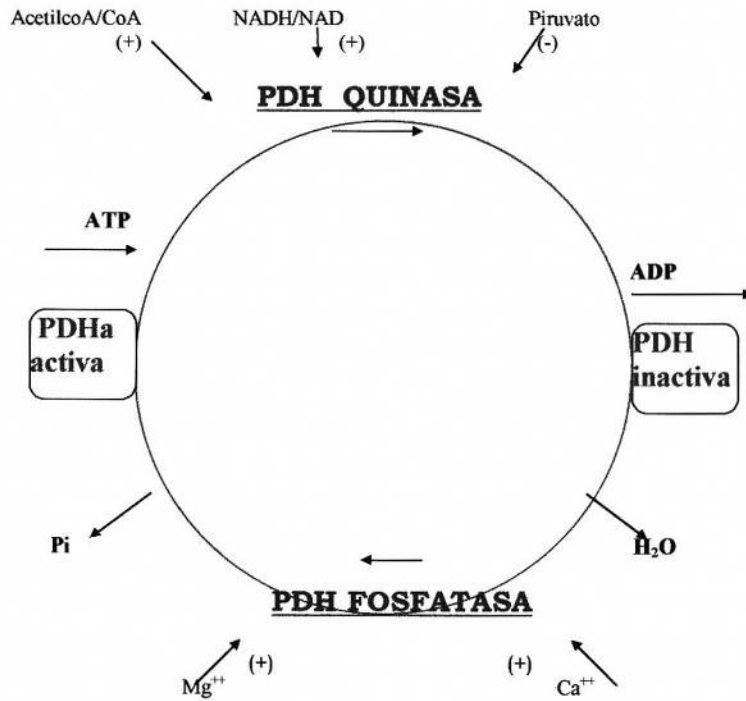
Otras dos proteínas, se hallan asociadas al complejo PDH, la Piruvato Dehidrogenasa-Quinasa, que cataliza la fosforilación de tres residuos de serina de la subunidad E1, causando la inactivación del complejo y la Piruvato Dehidrogenasa-Fosfatasa que cataliza la defosforilación de la subunidad E1, con la concomitante activación del complejo.

Numerosos estudios "in vitro" han demostrado que la actividad del complejo enzimático PDH puede ser regulada por al menos dos mecanismos:

1-inhibición por producto final de reacción. Se ha sugerido que las relaciones elevadas de AcetilCoA/CoA y NADH/NAD⁺ conducen a una menor actividad enzimática (56).

2-interconversión enzimática por modificaciones covalentes a través de cambios postranslacionales de fosforilación y defosforilación. Diferentes autores (57-59) han demostrado en tejidos aislados, entre ellos corazón, que la fosforilación y subsecuente inactivación de la actividad enzimática Piruvato Dehidrogenasa es catalizada por su Quinasa específica, mientras que la defosforilación y reactivación del complejo enzimático es catalizada por una Fosfatasa de amplio espectro (más inespecífica) (Figura 4).

Figura 4: Regulación del complejo enzimático Piruvato Dehidrogenasa (PDH) por interconversión de la forma activa e inactiva.



La PDH-Quinasa es un heterodímero que consiste en una subunidad α , que posee actividad catalítica, y una subunidad β con capacidad regulatoria. Esta Quinasa se encuentra presente en pequeñas cantidades y está fuertemente unido al complejo PDH, siendo inhibida por altas concentraciones de NAD^+ y CoASH, y estimulada por elevados niveles de NADH y acetilCoA.

La PDH-Fosfatasa, que se encuentra más debilmente unida al complejo, es inhibida en presencia de altas concentraciones de NADH, situación que se revierte en presencia de NAD^+ (60).

La conversión de piruvato en lactato depende del estado de óxido-reducción celular y de la actividad del complejo enzimático Piruvato Dehidrogenasa.

4- Interrelación entre metabolismo de lípidos e hidratos de carbono en corazón.

Aunque los ácidos grasos, como mencionáramos previamente, son los sustratos preferenciales para el abastecimiento de energía en el músculo cardíaco, otras sustancias no lipídicas son captadas también y metabolizadas por las células cardíacas. Entre estos sustratos oxidables, además de la glucosa, podemos mencionar el lactato, piruvato y cuerpos cetónicos. En condiciones normales, en el corazón de ratas, la oxidación de los ácidos grasos provee entre el 30-70% de la energía producida, aunque los sustratos provenientes de la circulación pueden interferir a través de sus metabolismos (61,27).

Cuando la oferta de ácidos grasos es suficiente para mantener las necesidades fisiológicas de ATP intracelular, la degradación de glucosa ya sea proveniente del torrente sanguíneo o del glucógeno tisular, disminuye a diferentes niveles. La Fosfofructokinasa-I (PFK-I), enzima determinante de la velocidad de glicólisis, es modulada por los niveles citoplasmáticos de ATP. Altas concentraciones de ATP disminuyen su actividad.

Si bien se ha demostrado un efecto inhibitorio directo "in vitro" de los ácidos grasos libres sobre las actividades de las enzimas glicolíticas, en condiciones fisiológicas, la concentración de éstos ácidos en el músculo cardíaco es muy baja, por lo que es poco probable que los mismos ejerzan un efecto inhibitorio directo sobre el camino glicolítico "in vivo" (28).

Otros intermediarios metabólicos como las concentraciones de citrato, acetilCoA y NADH, pueden contribuir también a una utilización preferencial de los ácidos grasos en el miocardio (62).

La oxidación de ácidos grasos, da como resultado un incremento en el contenido de: citrato, acetilCoA y de la relación NADH/NAD⁺. Se ha observado "in vitro" que el citrato modula la actividad de la enzima Fosfofructoquinasa-I, aunque "in vivo", no se conoce realmente su efecto. Además los altos niveles de NADH y AcetilCoA en mitocondria, deprimen la actividad del complejo PDH y por lo tanto enlentecen la oxidación de la glucosa. Esto contribuye a una reducida utilización de glucosa en presencia de un exceso de ácidos grasos.

En situaciones tales como ayuno o diabetes, donde existe una mayor disponibilidad de ácidos grasos libres plasmáticos provenientes de la lipólisis exagerada del tejido adiposo, el músculo cardíaco utiliza preferencialmente los ácidos grasos como fuente energética, mientras que en situaciones de anoxia o isquemia, existe una acelerada utilización de la glucosa - glicólisis y una reversión de la β -oxidación, dando como resultado un incrementado contenido de triglicéridos en el miocardio.

Por su parte el lactato es capaz de competir con los ácidos grasos para la oxidación mitocondrial (63). Se postula que el lactato estimula la actividad enzimática AcetilCoA carboxilasa, resultando en un incremento de los niveles citoplasmáticos de malonil CoA. Este último metabolito es un potente inhibidor de la enzima Carnitina acilCoA transferasa I (64,65). Además, el lactato incrementa la relación citoplasmática

NADH/NAD⁺. El concomitante aumento en el estado redox mitocondrial conduce a una disminución de la velocidad de la β -oxidación.

El piruvato también compite con la oxidación de los ácidos grasos. Un incremento en los niveles tisulares de piruvato, inhibe la β -oxidación como resultado de un aumento en los niveles de acetilCoA.

5- Hipertrigliceridemia y miocardio

Diferentes investigaciones (66,67) han demostrado que un sostenido incremento de triglicéridos plasmáticos puede constituir un factor de riesgo adicional de enfermedad cardiovascular, independiente de otros factores de riesgo tales como: niveles plasmáticos de colesterol y LDL-colesterol, hipertensión, obesidad, etc..

Estudios epidemiológicos retrospectivos realizados en París por Fontbonne y col. (68), demuestran que la hipertrigliceridemia es un factor a tener en cuenta, en la predicción de mortalidad por enfermedades coronarias en individuos con intolerancia a la glucosa o Diabetes Mellitus no insulino dependiente (Tipo II). Otros estudios también han observado que la disfunción cardíaca en pacientes diabéticos podría relacionarse con los elevados niveles de ácidos grasos libres plasmáticos y/o con el mayor contenido lipídico cardíaco (69).

Es bien aceptada la influencia de los componentes dietarios en las enfermedades cardiovasculares. Diferentes estudios, recomiendan incluir en el tratamiento de ciertos desórdenes cardiovasculares una limitada ingesta de sodio y grasa de origen animal. Con respecto a los hidratos de carbono (70), el consumo de sacarosa en la dieta se ha incrementado notablemente en los últimos años en las culturas occidentales (71), y estudios a nivel experimental y clínicos han sugerido que el mayor consumo de este nutriente podría contribuir al desarrollo de hipertensión arterial (70,72,73).

Como mencionáramos anteriormente en este capítulo, alimentando crónicamente (15-30 semanas) a ratas normales con una dieta rica en sacarosa se observa una hipertrigliceridemia estable que se acompaña de alterada homeostasis de la glucosa e insensibilidad insulínica en los tejidos periféricos (músculo esquelético).

Sin embargo, al presente, es muy escasa la información existente sobre el metabolismo lipídico-hidrocarbonado y la bifurcación del combustible energético en el **músculo cardíaco** durante situaciones de hipertrigliceridemia estable e insensibilidad insulínica (24) como las observadas en este modelo experimental.

En relación a lo expuesto y teniendo en cuenta los antecedentes sobre el tema desarrollado en el presente capítulo, el **Objetivo General de la Tesis fue:**

Estudiar algunos mecanismo básicos -posibles responsables de las alteraciones observadas en el músculo cardíaco-, asociados a la administración prolongada (15 semanas) de una dieta rica en sacarosa.

Para lograr este objetivo, se analizó la utilización y destino de la glucosa y el metabolismo de los triglicéridos en el corazón aislado perfundido (sistema recirculante de Langendorff) bajo las siguientes condiciones experimentales:

1- En presencia de glucosa y ácidos grasos en concentraciones similares a las del animal "in vivo".

2- En presencia de glucosa como único sustrato exógeno a diferentes concentraciones.

3-Acción de la hormona insulina "in vitro" en presencia de glucosa como fuente energética.

4-Acción de inhibidores de la β -oxidación de ácidos grasos.