

actividad PDH-Quinasa (y por lo tanto mejora la oxidación de la glucosa), ésta no es suficiente para normalizar completamente estos parámetros.

No se observaron efectos de la insulina sobre las actividades enzimáticas PDHa y PDH-Quinasa en el corazón perfundido de los animales alimentados con DC. Bajo las condiciones experimentales empleadas, no se constataron cambios en la actividad PDH total (expresada como *U/gr.tej.seco* o *mU/unidad CitratoSintasa*) en ninguno de los grupos analizados.

Discusión

Diferentes factores afectan el metabolismo de la glucosa en el miocardio. Entre ellos, los sustratos competitivos, el melieu hormonal, trabajo, etc. (123). En el presente estudio hemos caracterizado algunos aspectos del metabolismo de los carbohidratos (glucosa) en el miocardio, utilizando ratas dislipémicas que presentan una alterada homeostasis de la glucosa.

Los resultados obtenidos demuestran:

- a) una anormal captación y utilización de la glucosa
- b) la oxidación de la glucosa, estimada a partir de la actividad del Complejo PDH, es significativamente menor, presumiblemente debido a un incremento de la actividad PDH-Quinasa
- c) la adición de insulina "in vitro" al medio de perfusión, aunque mejora todos estos parámetros, es incapaz de normalizarlos completamente.

Estos hallazgos sugieren que la menor utilización periférica de glucosa (principalmente en el músculo esquelético), observada "in vivo" (clamp euglucémica hiperinsulinémica) en ratas alimentadas con DRS durante 15 semanas (24), se encuentra también presente en el músculo cardíaco aislado perfundido cuando la glucosa es la única fuente exógena de energía disponible.

La glucosa juega un rol importante en la provisión de energía en el miocardio, a

través del ATP, proveniente de la glicólisis y de la oxidación en el Ciclo de Krebs. La disminuída captación de la glucosa y la enfatizada liberación de lactato al medio de perfusión en los corazones perfundidos de ratas con DRS es acompañada por un sinificativo decrecimiento de los depósitos de glucógeno y de la actividad enzimática PDHa. Hiperglucemia (alterada homeostasis de la glucosa), e incremento de ácidos grasos libres plasmáticos es un hallazgo permanente en los animales alimentados cronicamente con DRS. Esto se acompaña de una disminuída actividad del complejo PDH (PDHa forma activa) en el músculo cardíaco (26). Esto nos sugiere que los corazones de ratas alimentadas cronicamente (3-4 meses) con DRS podrían haberse adaptado a una menor utilización de la glucosa como fuente de ATP, utilizando preferentemente ácidos grasos. Más aún, si una mayor disponibilidad de ácidos grasos, fuera la causa responsable de la menor captación y oxidación de la glucosa, la porción metabolizable de los elevados depósitos de triglicéridos en el miocardio, deberían proveer la fuente endógena de ácidos grasos bajo las condiciones experimentales utilizadas.

Diferentes autores mostraron que los depósitos endógenos de triglicéridos en corazones correctamente oxigenados son sustratos oxidables durante la perfusión, en presencia o ausencia de glucosa (27,99,124). Como era previsible, nuestros resultados mostraron un descenso en el contenido global de triglicéridos en los corazones de los animales controles. Sin embargo, una acelerada lipólisis (mayor velocidad de hidrólisis de los triglicéridos) se observó en el miocardio de los corazones perfundidos de ratas alimentadas con DRS. Similarmente Rösen y col.(125) observaron una acelerada lipólisis en corazones aislados de ratas diabéticas insulínopénicas perfundidas con glucosa como único sustrato exógeno.

El menor flujo a través del complejo PDH, se encuentra asociado con bajos niveles en la actividad PDHa. La inhibición del complejo PDH limita la oxidación del piruvato proveniente de la glicólisis. Esta situación fue observada en diferentes estados como ayuno o diabetes (62,126). Recientemente Wu y col.(120) demostraron en las condiciones metabólicas mencionadas, un incremento estable de la actividad de la enzima PDH Quinasa. Nuestros estudios muestran una disminución significativa de la actividad del complejo PDH (PDHa), acompañada de niveles incrementados en la

actividad de la enzima PDH-Quinasa en los corazones perfundidos del lote DRS. Estos hallazgos sugieren que un incremento en la oxidación de ácidos grasos, los cuales elevan a nivel mitocondrial la relación acetylCoA/CoA, y NADH/NAD^+ , estimulan la actividad PDH-Quinasa, pudiendo ser el mecanismo responsable de la alterada oxidación de glucosa en el corazón de las ratas alimentadas crónicamente con dieta rica en sacarosa. Más aún, el elevado contenido de glucógeno y glucosa-6-fosfato, observado en este lote "ex vivo", junto con los altos niveles plasmáticos de ácidos grasos no esterificados, son consistentes con la operatividad del ciclo glucosa-ácidos grasos en este tejido (62).

Es bien conocido que la insulina estimula la captación de glucosa, la incorporación de glucosa en glucógeno y cambios en la contribución relativa de la glucosa exógena y de los carbohidratos endógenos al metabolismo energético del miocardio. Además la hormona, puede incrementar el turnover del glucógeno, por lo que un camino importante de la glucosa exógena, es el de mantener los depósitos del glucógeno tisular (111). Hemos observado, como otros autores (98,127), que la insulina estimula la captación de glucosa, la liberación de lactato e incrementa los niveles de glucógeno, en los corazones de ratas controles (DC) perfundidos con glucosa como único sustrato exógeno. No se observaron cambios en la actividad PDHa ni de la actividad PDH- Quinasa en este grupo de animales.

Los corazones perfundidos del lote DRS son también sensibles a la acción de la insulina, así por ejemplo la captación de glucosa, el depósito de glucógeno (contenido neto de glucógeno) y la producción de lactato se incrementaron bajo la acción de la hormona "in vitro". Sin embargo la respuesta de estas variables metabólicas a la hormona fue significativamente menor, cuando se la compara con los resultados obtenidos en corazones perfundidos de ratas alimentadas con DC.

Chain y col.(98), mostraron que la adición de insulina al medio de perfusión, restaura la incorporación de ^{14}C glucosa a glucógeno y lactato en corazones de ratas diabéticas con estreptozotocina, perfundidos en el sistema de Langendorff, pero estos autores observaron también que la producción de $^{14}\text{CO}_2$ se encontraba

significativamente disminuída con respecto a los valores normales. Más aún, Das y col.(127) observaron un incremento en la radioactividad específica de los intermediarios de glucosa y glucógeno cuando los corazones de ratas diabéticas fueron perfundidos en presencia de insulina.

Rösen y col (113) observaron que la hormona estimula "in vitro" la captación y oxidación de glucosa en corazones de ratas de la cepa Zucker, obesas, hiperinsulinémicas, aunque la respuesta de estas vías metabólicas a la acción de la insulina, fue menor que en los animales controles.

La insulina "in vitro" incrementa la disponibilidad de glucosa extracelular, activa la enzima Glicógeno sintasa, incrementando la forma I de la enzima, aumenta los niveles de glucosa-6-fosfato y por lo tanto incrementa los niveles tisulares de glucógeno en los corazones aislados perfundidos (128).

Nuestros datos muestran un significativo incremento de la concentración de glucógeno bajo la acción de la hormona en corazones de ratas alimentadas con DRS. Sin embargo, los valores alcanzados al finalizar la perfusión en presencia de Insulina, fueron aún bajos comparados con aquellos obtenidos en el corazón de estas ratas inmediatamente "ex vivo". Más aún en ratas alimentadas con DC, los niveles de glucógeno al final de la perfusión, sobrepasan en un 30%, los obtenidos en corazones sin perfundir.

Recientemente, Klimes y col.(129) demostraron una alterada respuesta de la enzima Glicógeno sintasa a la acción de la insulina "in vitro" en músculo cardíaco de ratas alimentadas con dieta rica en sacarosa por un período corto de tiempo (3-4 semanas). Nuestro laboratorio ha demostrado recientemente (26), que un entorno metabólico hormonal diferente acompaña a los animales alimentados con dieta rica en sacarosa durante un período largo de tiempo (15-30 semanas), comparado a los que ingirieron la dieta por un corto período (3 a 4 semanas). Esta circunstancia podría jugar un rol importante en la utilización del combustible energético en miocardio. Por ejemplo, aunque elevados niveles de citrato fueron constatados en el músculo cardíaco en ambos períodos de ingesta, los niveles de glucógeno y glucosa-6-fosfato se encuentran elevados solamente cuando la dieta se ha administrado por un período prolongado (15-30 semanas).

Zaninetti y col.(130) postularon que el efecto estimulante de la insulina sobre el transporte de glucosa podría deberse, a: 1-una traslocación de los transportadores de glucosa hacia la membrana plasmática y 2-cambios en la propiedades funcionales de los mismos una vez que están presentes en la membrana.

Por otro lado, una menor captación de glucosa "in vivo", a nivel de los Glut-1 y Glut-4, fue observada en corazones de ratas diabetizadas con estreptozotocina (131). Más aún Garvey y col.(132) observaron que la menor utilización de glucosa en ratas diabéticas es el resultado de un menor transporte de la glucosa, que puede ser revertido por el tratamiento con insulina.

Los resultados obtenidos muestran alteraciones en la captación y metabolismo de glucosa en los corazones del lote DRS. Esto ocurre con altos niveles de insulina (dosis de estimulación máxima) y sistema Langendorff de perfusión (bajo trabajo), condiciones en las que el efecto de la hormona sobre la captación de glucosa es óptimo. Si bien el aumento de los niveles de glucosa-6-fosfato observado en el músculo cardíaco, podría contribuir a la anormal captación de glucosa, no podemos descartar la posibilidad de que una alteración a nivel de los transportadores de glucosa y/o su actividad, puedan jugar un rol importante en la utilización de este sustrato.

Independientemente del incremento observado en la disponibilidad de glucosa en presencia de insulina, la oxidación de glucosa se encuentra aún disminuída (la actividad PDHa solo alcanza el 50% de los niveles obtenidos en el músculo cardíaco del lote de ratas alimentadas con DC, y la actividad PDH-Quinasa se encuentra significativamente incrementada). Esto sugiere que los corazones de las ratas alimentadas con DRS, continúan utilizando preferencialmente ácidos grasos como fuente de energía. En relación a esto, nuestros resultados muestran que la lipólisis de los depósitos endógenos de triglicéridos permanece aún acelerada en presencia de insulina, mientras que en los corazones controles este camino metabólico es de menor importancia.

Wu y col. (120) mostraron que los altos niveles de la proteína PDK4 (isoenzima de la PDH-Quinasa) y la abundancia relativa del PDK4 RNAm, se normalizan realimentando ratas ayunadas o por tratamiento insulínico de ratas diabéticas. La actividad PDH-Quinasa, también se restaura en ambos grupos experimentales a niveles comparables a los observados en el músculo cardíaco de animales alimentados con dieta control de laboratorio.

En relación a estos resultados, la incrementada actividad PDH-Quinasa presente en los corazones de animales alimentados con DRS y el retardo en la reactivación del complejo PDH bajo la acción de la insulina, cuando la glucosa es el único sustrato exógeno presente en el medio, sugeriría que probablemente se requieren tiempos más prolongados para la regulación de la isoenzima PDK4, y consecuentemente la reactivación del complejo PDH.

Finalmente los hallazgos aquí expuestos (Montes y col.-133,134-) sugieren que al menos dos mecanismos diferentes podrían contribuir a la resistencia insulínica y anormal metabolismo de la glucosa en el músculo cardíaco de los animales alimentados con dieta rica en sacarosa:

a- la menor captación y utilización de glucosa (basal) y bajo el estímulo de la insulina podría ser el resultado de una disminuída capacidad de los transportadores de glucosa y/o podría reflejar un defecto en el proceso acoplado insulina-receptor en la generación de señales intracelulares

b- una incrementada disponibilidad y oxidación de lípidos (baja actividad del complejo PDH y alta actividad de la enzima PDH-Quinasa) que a su turno disminuirían la captación de la glucosa y su utilización

A partir de los resultados obtenidos en el transcurso de esta Tesis y en función de los posibles mecanismos aquí planteados nos interesó analizar si inhibiendo específicamente la actividad Carnitina Acil Transferasa-1 (y consecuentemente la β -oxidación de ácidos grasos), se normalizaba la actividad del complejo PDH (vía oxidativa de la glucosa).

Este aspecto del problema es desarrollado en el siguiente capítulo.

Capítulo II-2

Acción de Inhibidores de la β -oxidación de ácidos grasos.

Introducción

Los resultados presentados previamente, plantean como una posibilidad que en los corazones perfundidos de los animales alimentados con DRS, la oxidación de ácidos grasos, provenientes de la captación desde el medio de perfusión (exógenos), o de la hidrólisis del pool de triglicéridos endógenos (cuando la glucosa es el único sustrato exógeno), es el combustible de preferencia utilizado por el miocardio, en desmedro de la glucosa.

En estos corazones hemos constatado también que la oxidación de la glucosa, estimada como la actividad del complejo enzimático Piruvato Dehidrogenasa, se encuentra significativamente disminuída.

Surge así, la pregunta, si inhibiendo la oxidación de los ácidos grasos podría mejorarse la vía oxidativa de la glucosa.

Como mencionáramos en el ítem Introducción, la transferencia del ácido graso activado de cadena larga hacia el interior de la mitocondria, se realiza por un sistema conformado por dos enzimas, la Carnitina acil transferasa I (CPT-I) y la Carnitina acil transferasa II. El compuesto Etomoxir, etil -2(6(-cloro-fenoxi)hexil) oxirano-2 carboxilato (POCA-II) es un inhibidor específico de la actividad CPT-I, y por lo tanto limita la entrada y consecuente β -oxidación de ácidos grasos de cadena larga a nivel mitocondrial.

Al respecto, trabajos de Rösen y Reinauer(135) en corazones aislados en presencia de POCA-II de ratas diabetizadas con streptozotocina, demostraron inhibición de la lipólisis y normalización de la oxidación de la glucosa.

De lo expuesto, nuestro interés fue analizar en el corazón perfundido de la rata con DRS: "si una mayor disponibilidad y oxidación de ácidos grasos, sería la causa de la anormal actividad del complejo enzimático PDH (y consecuentemente de la oxidación de la glucosa), la utilización de un inhibidor de la enzima CPT-I (POCA-II) debería normalizar la actividad del complejo".

Protocolo experimental

Se utilizaron ratas macho cepa Wistar de 180-200 grs. de peso inicial, que fueron separadas al azar en dos lotes y alimentadas durante 15 semanas con dieta control (DC) y dieta rica en sacarosa (DRS), según se detalló en capítulos previos.

Los animales fueron anestesiados y los corazones removidos y perfundidos en un sistema de perfusión retrógrada no recirculante, descrita por Langendorff(100), utilizando buffer Krebs Henseleit bicarbonato, pH 7.4, Ca^{++} 2.5 mM, glucosa 11 mM, constantemente gasificado con una mezcla $O_2:CO_2$ 95:5 y mantenido a 37°C durante toda la perfusión.

Luego de un período de estabilización de 15 minutos, se infundió en forma constante durante 20 minutos POCA-II (Etomoxir, etil -2(6(-cloro-fenoxi)hexil) oxirano-2 carboxilato) 10 μ M disuelto en el buffer mencionado anteriormente. Esta infusión se realizó mediante una jeringa, conectada a una entrada adicional del perfusor, impulsada por una bomba con velocidad controlada.

Se tomaron muestras del perfusado a intervalos de un minuto desde el minuto 13 y hasta el minuto 35, analizándose en las mismas las concentraciones de glicerol (136) y lactato (103) liberados al medio.

Los resultados obtenidos se compararon con los de animales perfundidos en idénticas condiciones en las cuales el POCA-II fue reemplazado por buffer.

El flujo coronario fue de 10-12 ml por minuto y las contracciones cardíacas de 240-280 por minuto, permaneciendo ambos parámetros constantes a lo largo del período de perfusión.

Al finalizar este período, los corazones fueron rápidamente congelados utilizando la pinza de Wolleberger previamente enfriada a la temperatura de Nitrógeno líquido. En las muestras de tejido, previamente pulverizadas se cuantificó el contenido de acetil CoA, CoASH (84), ATP (89), creatina-fosfato (87), citrato (84), glucógeno (89) y triglicéridos (88) (según se detalló en el ítem Metodología). Otra alícuota de tejido, fue utilizada para determinar la actividad del complejo PDH (75).

Las concentraciones de los metabolitos analizados fueron expresados por gramo de tejido seco, corrigiendo de esta manera diferencias en el contenido de agua tisular.

Cuantificación de glicerol

Para la cuantificación de glicerol liberado, se utiliza el método de Davidson y Karjala (136) cuyo fundamento es el siguiente:

La enzima Glicerol Dehidrogenasa (GDH) cataliza la oxidación de glicerol a dihidroxiacetona fosfato con la reducción directa de NAD^+ a NADH, de acuerdo a:



Siguiendo el incremento de la fluorescencia del NADH, se puede cuantificar de la manera mencionada anteriormente la cantidad de glicerol liberado al medio de perfusión.

Resultados

La *ingesta calórica* fue similar en ambos grupos de animales durante todo el período experimental, como así también la *ganancia de peso*. Los resultados obtenidos son comparables con los observados en capítulos anteriores.

Efecto del POCA-II sobre la actividad del complejo Piruvato Dehidrogenasa

En la *Tabla 13* se observa una disminución estadísticamente significativa de la actividad PDHa del músculo cardíaco de ratas alimentadas con DRS perfundidas con 11 mM de glucosa como único sustrato exógeno. El descenso de la actividad PDHa, se constata independientemente de la forma de expresión utilizada (unidades/gramo tejido seco, o mUnidades/unidades de citrato sintasa). La adición de POCA-II (10 μ M), normaliza la actividad enzimática. No se observaron modificaciones de la actividad PDHa en los corazones perfundidos de ratas alimentadas con DC en ausencia o presencia del inhibidor. La actividad total del complejo (PDH) es igual en los lotes DRS y DC, bajo las condiciones experimentales expuestas (*Tabla 13*). Los valores de PDHa y PDHtotal expresados como mU/unidad Citrato Sintasa tampoco mostraron diferencias en los lotes analizados.

La normalización de la actividad PDHa en presencia de POCA II (inhibidor de la β -oxidación) en músculo cardíaco de las ratas alimentadas con DRS, nos llevó a analizar en dicho tejido el contenido de metabolitos y nucleótidos directa o indirectamente relacionados con su regulación.

La *Tabla 14* muestra que la adición de POCA-II (10 μ M), normaliza la elevada relación acetil-CoA/CoASH presente en los corazones de las ratas alimentadas con DRS. Los niveles alcanzados son similares a los observados en los corazones perfundidos del lote control bajo el efecto del inhibidor. Como mencionáramos previamente el contenido basal de triglicéridos fue significativamente mayor en los corazones no perfundidos de las ratas con DRS. Sin embargo, al final de la perfusión

Tabla 13: Efecto del POCA II sobre la actividad PDH en corazón perfundido de ratas alimentadas con dieta control (DC) o dieta rica en sacarosa (DRS) .

Dieta	Tratamiento	ACTIVIDAD PDH		PDHa
		PDHa(activa) (U/gramo.tej.seco)	PDHt(total) (U/gramo.tej.seco)	(% de PDH total)
DC	- POCA II	19,25 ± 0,71 ^a	30,64 ± 1,51 ^a	65,30 ± 3,20 ^a
DRS	- POCA II	8,10 ± 0,80 ^b	29,82 ± 1,93 ^a	27,40 ± 1,56 ^b
DC	+ POCA II	21,04 ± 1,85 ^a	29,80 ± 0,96 ^a	70,24 ± 4,50 ^a
DRS	+ POCA II	17,27 ± 1,85 ^a	30,21 ± 1,09 ^a	57,80 ± 5,54 ^a

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

Luego de 15 minutos de perfusión (período de equilibración) comenzó la infusión de POCA II (10 uM), la que se mantuvo hasta el minuto 35. (Ver detalles en el ítem Metodología).

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

Las diferencias estadísticas entre los grupos fue analizada por Anova (dieta y tratamiento) y posterior test de Scheffe's. Los valores de las columnas que no comparten la misma letra superescrita, son significativamente diferentes ($p < 0,05$) .

Tabla 14. Efecto del POCA II sobre el contenido tisular de triglicéridos, glicerol liberado y relación acetilCoA/CoASH en corazón perfundido de animales alimentados con dieta control (DC) o dieta rica en sacarosa (DRS).

Dieta	Tratamiento	triglicéridos ($\mu\text{mol}/\text{gr} \cdot \text{tej} \cdot \text{seco}$)	glicerol liberado ¹ (16-35 minutos)	$\frac{\text{AcetylCoA}}{\text{CoASH}}$
DC	- POCA II	20,0 \pm 2,0 ^a	3,96 \pm 0,18 ^a	0,067 \pm 0,007 ^a
DRS	- POCA II	23,2 \pm 2,29 ^a	5,92 \pm 0,17 ^b	0,39 \pm 0,052 ^b
DC	+ POCA II	22,6 \pm 2,20 ^a	3,32 \pm 0,08 ^a	0,089 \pm 0,003 ^a
DRS	+ POCA II	34,5 \pm 3,72 ^b	3,42 \pm 0,38 ^a	0,11 \pm 0,025 ^a

Luego de 15 minutos (período de equilibración) comenzó la infusión de POCA II (10 μM), la que se mantuvo hasta el minuto 35. (Ver detalles en el ítem Metodología).

1- el glicerol fue analizado en las muestras de perfusado obtenidas a intervalos de un minuto, desde el minuto 16 al 35.

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

Las diferencias estadísticas entre los grupos fue analizada por Anova (dieta y tratamiento) y posterior test de Scheffe's. Los valores de las columnas que no comparten la misma letra superescrita, son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

con glucosa como único combustible exógeno, el contenido de triglicéridos desciende a niveles semejantes a los observados en el lote DC. Esto indica una elevada lipólisis basal espontánea del pool de triglicéridos metabolizables en los corazones de las ratas con DRS. La adición de POCA-II al perfusado, disminuye el decrecimiento del contenido de triglicéridos en los corazones perfundidos de las ratas con DRS, mientras que no los modifica en el lote DC. Los cambios en el contenido de triglicéridos en el músculo cardíaco de ambos lotes experimentales concuerdan con los niveles de glicerol liberado al medio de perfusión, en presencia o ausencia de POCA-II (*Tabla 14*).

Al final del período de perfusión (35 minutos) con glucosa como único sustrato exógeno, los niveles tisulares de glucosa-6-fosfato y citrato permanecen significativamente más elevados en los corazones de ratas con DRS respecto a su control etario (DC). De igual forma los niveles de lactato liberado al medio de perfusión (16-35 minutos) son significativamente mayores. La adición de POCA-II (10 μ M) normaliza estos parámetros (*Tabla 15*).

POCA-II no modifica los niveles de glucosa-6-fosfato, citrato y lactato liberado en los corazones perfundidos de ratas con DC.

Niveles similares de ATP, y creatina-fosfato, fueron obtenidos al final del período de perfusión en los corazones de ambos lotes. La adición de POCA II no modifica estos parámetros en ambos grupos.

Discusión

Los resultados obtenidos en este capítulo y los mencionados en capítulos anteriores muestran que el músculo cardíaco de ratas Wistar normales alimentadas por un período prolongado de tiempo con una dieta rica en sacarosa (DRS), presenta importantes cambios bioquímicos metabólicos relacionados con la regulación del metabolismo de lípidos y carbohidratos.

Tabla 15: Efecto del POCA II sobre el contenido de metabolitos y liberación de lactato en corazón perfundido de ratas alimentadas con dieta control (DC) o dieta rica en sacarosa (DRS).

Dieta	Tratamiento	glucosa-6P ($\mu\text{mol}/\text{gr. tej. seco}$)	citrato	lactato liberado (16 - 35 minutos) ($\mu\text{mol}/\text{g. t. s. min.}$)
DC	- POCA II	1,03 \pm 0,05 ^a	0,76 \pm 0,06 ^a	6,67 \pm 0,5 ^a
DRS	- POCA II	1,46 \pm 0,10 ^b	1,47 \pm 0,12 ^b	12,6 \pm 1,43 ^b
DC	+ POCA II	0,91 \pm 0,10 ^a	0,73 \pm 0,10 ^a	7,13 \pm 0,6 ^a
DRS	+ POCA II	0,85 \pm 0,12 ^a	0,87 \pm 0,04 ^a	6,97 \pm 0,66 ^a

Luego de 15 minutos de perfusión (período de equilibración) comenzó la infusión de POCA II (10 μM), la que se mantuvo hasta el minuto 35. (Ver detalles en el ítem Metodología).

1- el Lactato fue analizado en las muestras de perfusado obtenidas a intervalos de un minuto, desde el minuto 16 al 35.

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

Las diferencias estadísticas entre los grupos fue analizada por Anova (dieta y tratamiento con POCA) y posterior test de Scheffe's. Los valores de las columnas que no comparten la misma letra superescrita, son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Corroborando los resultados descritos en el capítulo anterior, una acentuada disminución de la actividad PDHa (forma activa del complejo PDH) fue observada en los corazones perfundidos de ratas DRS en ausencia de POCA-II. Al mismo tiempo, un incremento en la relación acetilCoA/CoA e indirectamente de citrato y glucosa-6-fosfato señala una mayor utilización de lípidos como fuente energética. En apoyo de lo antedicho se constató un significativo incremento ($p < 0.05$) del glicerol liberado (índice de lipólisis), que se relaciona estrechamente a una mayor velocidad de lipólisis del pool de triglicéridos endógenos.

Por otro lado, los productos de oxidación de los ácidos grasos (acetilCoA) y el incremento en la relación acetilCoA/CoA, favorecen la actividad enzimática PDH-Quinasa inactivando el complejo PDH.

La normalización de la actividad PDHa en el lote DRS paralelamente a un decrecimiento de la relación acetilCoA/CoA en presencia de POCA-II, junto con la simultánea normalización de los niveles de citrato, glucosa-6-fosfato y lactato liberado al medio de perfusión, apoyan la idea que, la inhibición de la Carnitina acil Transferasa-I, favorece la oxidación de la glucosa.

Trabajos de Rösen y col.(135) observaron una inhibición de la lipólisis endógena por acción del POCA-II, que normalizaba la actividad PDH en corazones de ratas diabetizadas. Sin embargo estos autores y también nosotros en el presente trabajo constatamos que el POCA-II no tiene efecto directo sobre la actividad del complejo PDH (PDH total), el que permanece sin cambios en ambos lotes de animales (DC y DRS). Más aún, la actividad PDHa no varió en el lote de ratas con dieta control en presencia de POCA-II.

De lo expuesto podemos sugerir que el mejoramiento en la actividad PDHa, y consecuentemente de la oxidación de la glucosa, sería debido a una menor oxidación de ácidos grasos, y no al efecto directo del inhibidor sobre la actividad enzimática (Montes y col.-137,138-).

De manera similar a lo que acontece con los corazones de animales diabéticos insulino pénicos (109), los resultados obtenidos en este modelo de dislipemia e intolerancia a la glucosa inducida nutricionalmente, sugieren que al menos uno de los mecanismos involucrados en estos cambios, es la marcada preferencia del músculo

cardíaco en la utilización de sustrato lipídicos (ácidos grasos) como fuente energética. Esta situación se relaciona estrechamente con una mayor oxidación de los ácidos grasos en el miocardio consecuente a una incrementada disponibilidad de los mismos.