

Efectos de la inhibición de la oxidación de ácidos grasos sobre la actividad piruvato dehidrogenasa en corazón perfundido de ratas hipertriglicéridémicas.*

Montes, Mónica; Chicco, Adriana; Lombardo, Yolanda

Dpto. Cs. Biológicas. FBCB. UNL. CC 530. (3000) Santa Fe.

RESUMEN: Ratas Wistar normales alimentadas por quince semanas con dieta rica en sacarosa, desarrollan hipertriglicéridemia, aumento de ácidos grasos libres plasmáticos, hiperglicemia y normoinsulinemia. A nivel del músculo cardíaco, se observa un incremento en los niveles tisulares de triglicéridos, glucógeno, glucosa 6 fosfato, citrato, relación AcetilCoA/CoASH y disminución de la actividad del complejo enzimático Piruvato Dehidrogenasa (PDHa). Resultados que sugieren una bifurcación del combustible energético en dicho órgano.

El objetivo del presente trabajo fue analizar la actividad de dicho complejo enzimático y su regulación en presencia de un inhibidor de la carnitina acetil transferasa (CPT-I), en corazón perfundido de ratas alimentadas con dieta rica en sacarosa.

Los resultados señalan que la adición del POCA II al medio de perfusión, logra normalizar la baja actividad PDHa y los metabolitos que la regulan directa o indirectamente. Esto sugiere una alteración en el flujo glicolítico, con menor oxidación de glucosa, probablemente debido a una mayor disponibilidad y oxidación de los ácidos grasos libres presente en este modelo experimental.

SUMMARY: Normal Wistar rats fed with a sucrose rich diet (SRD) for 15 weeks developed hypertriglyceridemia, hyperglycemia and normoinsulinemia with an increase of plasma free fatty acids levels. This was accompanied by a significant increase in heart acetyl CoA/CoASH ratio, triglyceride, glycogen, glucose 6 phosphate and citrate levels. Moreover, PDHa -active forms of the pyruvate dehydrogenase complex- was significantly lower in the cardiac muscle of these animals, suggesting changes in the metabolic fuels in this tissue.

In the present study we investigate the effect of POCA II (specific inhibitor of the carnitin palmitoil transferase I) on PDH interconversion in the "in vitro" perfused heart obtained from rats fed a SRD for 15 weeks. Our results show that PDHa activity as well as acetyl/CoA/CoASH ratio, citrate and glucose 6 phosphate levels reached normal values under the effect of POCA II. Therefore these data suggest that an impaired glycolytic flux and glucose oxidation in heart muscle of SRD fed rats could be a consequence of increased availability and oxidation of free fatty acids.

Introducción

La variación en el tipo y cantidad de carbohidratos dietarios induce modificaciones en el metabolismo glucídico y lipídico, las que se manifiestan como hipertriglicéridemia, intolerancia a la glucosa y resistencia insulínica. Estas alteraciones han sido observadas en el hombre y en animales de experimentación (1,2).

Trabajos recientes de nuestro grupo han demostrado que la hipertriglicéridemia inducida por administración a ratas machos normales de una dieta rica en sacarosa (63% p/p) (DRS) durante un período prolongado (15 semanas) se acompaña de

hiperglicemia, normoinsulinemia y acelerada lipólisis basal del tejido adiposo epididimal con incremento de ácidos grasos libres plasmáticos (AGNE) (3,4).

Estos cambios en el entorno hormonal y metabólico podrían jugar un rol importante en la provisión de sustratos energéticos para el músculo cardíaco. Al respecto, es bien conocido que en condiciones normales y en estado de alimentación el músculo cardíaco utiliza aproximadamente un 70% de ácidos grasos y un 30% de glucosa como fuente energética. Mas aún, Randle y col. (5) postularon que una excesiva oxidación de ácidos grasos de cadena larga generada ya sea por hidrólisis de los triglicéridos endógenos o por captación de los mismos desde el plasma, serían los responsables de la disminuida oxidación de la glucosa en el corazón de animales diabéticos.

* Datos preliminares fueron presentados en el XV Congreso Interamericano de Cardiología. Santiago de Chile, Diciembre de 1995.

Un sistema enzimático clave en la oxidación de la glucosa en el músculo cardíaco es el complejo enzimático mitocondrial piruvato dehidrogenasa (PDH). Este complejo que cataliza la conversión irreversible de piruvato a acetilCoA, está regulado metabólicamente y hormonalmente en diferentes tejidos incluyendo el músculo cardíaco. Por ejemplo PDHa (forma activa del complejo) disminuye dramáticamente en ayuno y en diabetes experimental aloxánica (6).

Trabajos previos de nuestro grupo (7,8) demostraron también, una disminución muy significativa de la actividad PDHa sin cambios en la actividad total del complejo en músculo cardíaco de ratas alimentadas con dieta rica en sacarosa durante 15 semanas. Estos cambios se acompañan de un significativo incremento en los niveles tisulares de citrato, glucosa 6 fosfato, triglicéridos, glucógeno y de la relación acetilCoA/CoASH, lo que sugiere un cambio en la utilización de combustible energético (lípidos por carbohidratos) en dicho músculo.

De lo expuesto, el objetivo del presente trabajo fue: Analizar la actividad del complejo PDH y su regulación en corazón perfundido de ratas alimentadas con dieta rica en sacarosa en presencia de un inhibidor de la carnitina palmitoil transferasa I (CPT-I), con el fin de recabar información adicional acerca de cómo una oferta diferente de sustratos oxidables al músculo cardíaco, podría contribuir a las alteraciones bioquímicas metabólicas previamente descritas en este tejido.

Materiales y Métodos

Animales y Dietas

Se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar de aproximadamente 180-200 gramos de peso inicial, las cuales fueron divididas al azar en dos grupos: experimental y control. El grupo experimental recibió una dieta semisintética rica en sacarosa (DRS) conteniendo por peso (g/100g): sacarosa 63%, caseína libre de vitaminas 17%, aceite de maíz 5%, celulosa 10%, mezcla de sales (AIN-76A) 3,5%, mezcla de vitaminas (AIN-76A) 1%, clorhidrato de colina 0.2% y metionina 0.3%. El grupo control (DC) recibió la misma dieta semisintética que el grupo DRS con la excepción que la fuente de hidratos de carbono, sacarosa, fue reemplazada por almidón de maíz. La composición de la mezcla de sales minerales y vitaminas agregadas a ambas dietas fue realizada de acuerdo a las recomendaciones del

Report of the American Institute of Nutrition ad-hoc Committee on Standards for Nutritional Studies (9,10). Ambas dietas proveen aproximadamente 15,28 Kjoule/g de comida. Los animales fueron alimentados "ad libitum" durante 15 semanas, realizándose el control de peso durante todo el período experimental. Las condiciones del bioterio fueron: temperatura $22 \pm 1^\circ\text{C}$, ciclo de luz-oscuridad de 12 horas (7.00-19.00). En experimentos en paralelo de 10 animales en cada grupo dietario se constató la ingesta calórica y la ganancia de peso dos veces por semana. Detalles de la metodología usada han sido descritos previamente (11). Finalizado el período experimental, la comida fue removida a las 7.00 hs y los experimentos que se detallan a continuación fueron llevados a cabo entre las 8.00 - 10.00 hs.

Técnica de Perfusión de Corazón

Los corazones fueron perfundidos "in vitro" de acuerdo a la técnica retrógrada no recirculante descrita por Langendorff usando un reservorio localizado a 60-65 cm por encima del corazón conteniendo un buffer Krebs-Henseleit-bicarbonato con 11mM de glucosa, 2,5 mM Ca^{++} , pH=7,4, $\text{O}_2:\text{CO}_2$ 95:5. Luego de un período de estabilización de 15 minutos se infundió, en forma constante durante 20 minutos, POCA II (Etomoxir, etil-2[6-(4-cloro-fenoxi) hexil] oxirano-2-carboxilato) 10 μM , disuelto en el buffer mencionado previamente. Muestras de perfusado fueron recolectadas a intervalos de un minuto entre los minutos 13 y 35, analizándose en las mismas las concentraciones de glicerol (12) y lactato liberado (13). Los resultados obtenidos se compararon con los de animales perfundidos en idénticas condiciones pero en los cuales el POCA II fue reemplazado por buffer. El flujo coronario fue de 10 ml/min y las contracciones cardíacas 240-280/min., permaneciendo ambos parámetros constantes a lo largo de todo el período de perfusión. Al finalizar éste, los corazones fueron rápidamente congelados usando una pinza tipo Wollenberger previamente enfriada a la temperatura del Nitrógeno líquido y conservados a la misma hasta su uso. En todos los experimentos se determinó la relación peso húmedo/seco. Alicuotas de los tejidos congelados y pulverizados fueron utilizadas para la determinación del contenido de acetil-CoA, CoASH, ATP, ADP, AMP, creatina fosfato, creatina, citrato y glucosa 6 fosfato, por los métodos enzimáticos descritos por Bergmeyer (14). Otra alicuota fue utilizada

para la determinación del contenido de triglicéridos (15). Las concentraciones de los metabolitos analizados fueron expresadas por gramo de tejido seco, corrigiendo de esta manera diferencias en el contenido de agua tisular. Mayores detalles de las metodologías utilizadas fueron descriptas previamente (8).

Actividad Enzimática del Complejo Piruvato Dehidrogenasa (PDH)

La actividad enzimática PDH fue determinada en homogeneizados de tejidos cardíacos usando un sistema de reacciones acopladas con la formación final de acetil-fosfato y su posterior determinación colorimétrica como acetil-hidroxiacetato (16). La homogenización del tejido fue realizada a la temperatura de 0-2 °C, corroborándose la eficiencia de la extracción del complejo PDH, mediante el ensayo de la actividad de la enzima mitocondrial citrato-sintasa (17) en dichos homogeneizados. La forma activa del complejo PDH (PDHa) se determinó directamente en el homogeneizado previa inhibición de la PDH fosfatasa por adición de 20mM de NaF. La actividad total (PDHt) fue ensayada luego que la forma inactiva -fosforilada- fue convertida a activa -no fosforilada-, preincubando el homogeneizado en presencia de 0,5 mM de Ca^{++} y 10 mM de $MgCl_2$ durante 60 minutos a 25°C. La actividad PDH fue expresada por gramo de tejido seco y por unidad de citrato sintasa. Mayores detalles de la metodología utilizada fueron descriptos previamente (7,8).

Métodos Analíticos

Las ratas fueron anestesiadas intraperitonealmente con pentobarbital (60 mg/Kg de peso corporal). Las muestras de sangre obtenidas a partir de la vena jugular fueron centrifugadas inmediatamente a 4 °C y el suero utilizado el mismo día o conservado a -20°C hasta su ensayo. Los contenidos plasmáticos de triglicéridos (15), ácidos grasos libres (AGNE)(18) y glucosa (14) fueron determinados por métodos espectrofotométricos convencionales.

Análisis Estadísticos

Los resultados fueron expresados como media \pm SEM. Diferencias estadísticas entre los grupos

experimental y control fueron analizadas por Anova, con dieta y tratamiento como los efectos principales y posterior test de Scheffe (19).

Reactivos

Enzimas, sustratos y coenzimas fueron obtenidos en Sigma Chemical Co (St Louis, MO) o Boehringer Mannheim Biochemical (Indianapolis, IN). El resto de los reactivos químicos utilizados fueron de grado analítico. POCA II fue suministrado gentilmente por el Dr. H.P.O.Wolf, Byk Guldemn Pharmazeutika, Komstanz, Germany.

Resultados

La ingesta calórica (Kjoule/día) fue similar en ambos grupos de animales durante todo el período experimental: 286 ± 9 en los alimentados con DRS vs 285 ± 25 en los que se suministró DC. La ganancia de peso (gramo/día) también fue comparable en ambos grupos: $2,05 \pm 0,2$ en DRS vs $2,04 \pm 0,3$ en DC, lo que nos indica que la DRS fue bien aceptada por los animales en experimentación.

Al finalizar el período de ingesta los niveles plasmáticos de triglicéridos, AGNE y glucosa de las ratas alimentadas con DRS fueron significativamente mayores que sus respectivos controles etarios alimentados con DC: triglicéridos (mM): $1,80 \pm 0,18$ en DRS vs $0,55 \pm 0,05$ en DC, $p < 0,01$; AGNE (μ M): 650 ± 35 en DRS vs 282 ± 24 en DC, $p < 0,01$; glucosa (mM): $7,8 \pm 0,1$ en DRS vs $6,4 \pm 0,5$ en DC, $p < 0,05$.

De igual forma y ratificando lo observado previamente el contenido de triglicéridos fue significativamente mayor y la actividad del complejo PDH (PDHa- forma activa) significativamente menor en los corazones de ratas alimentadas con DRS respecto a los animales alimentados con DC. Triglicéridos (μ mol/gramo tejido seco): $46,20 \pm 2,40$ en DRS vs $24,05 \pm 1,92$ en DC, $p < 0,01$; PDHa (% de PDHt): $20,35 \pm 3,10$ en DRS vs $69,50 \pm 2,02$ en DC, $p < 0,01$.

En la Tabla 1 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, mUnidades/unidades de citrato sintasa). La adición

Tabla 1. Efecto del POCA II sobre la actividad PDH en corazón perfundido de ratas alimentadas con dieta rica en sacarosa (DRS) o dieta control (DC).

Dieta	Tratamiento	ACTIVIDAD PDH (U/g.t.s) *		ACTIVIDAD PDH (mU/U.citrato sintasa)		PDHa (% del total)
		PDHa(activa)	PDHt(total)	PDHa(activa)	PDHt(total)	
DC	- POCA II (6)	19,25 ± 0,71 ^{1,a}	30,64 ± 1,51 ^a	40,84 ± 1,47 ^a	65,85 ± 4,03 ^a	65,30 ± 3,20 ^a
DRS	- POCA II (6)	8,10 ± 0,80 ^b	29,82 ± 1,93 ^a	16,70 ± 1,65 ^b	65,54 ± 4,72 ^a	27,40 ± 1,56 ^b
DC	+ POCA II (6)	21,04 ± 1,85 ^a	29,80 ± 0,96 ^a	43,30 ± 3,84 ^a	61,92 ± 2,01 ^a	70,24 ± 4,50 ^a
DRS	+ POCA II (6)	17,27 ± 1,85 ^a	30,21 ± 1,09 ^a	35,60 ± 2,50 ^a	62,8 ± 2,19 ^a	57,80 ± 5,54 ^a
2 x 2 Anova ²						
Dieta		S	NS	S	NS	S
Tratamiento (POCA II)		S	NS	S	NS	S
Dieta x Tratamiento		S	NS	S	NS	S
RMS		8,1	121,02	34,12	51,81	90,42

(*) g.t.s.: gramo tejido seco

La infusión de 10 uM de POCA II, comenzó a los 15 minutos de iniciada la perfusión y se mantuvo hasta el minuto 35. (Más detalles ver Materiales y Métodos).

(1) Los valores son expresados como $\bar{X} \pm \text{SEM}$. () indica el número de experimentos.

(2) Análisis de Varianza: S efecto significativo ($p < 0,05$); NS no significativo.

Los valores de las columnas que no comparten la misma letra superescrita, son significativamente diferentes ($p < 0,05$) cuando cada una de las variables es analizada por el test de Scheffe.

de POCA II (10 uM), 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 (PDHt) es igual en los lotes DRS y DC, bajo las condiciones experimentales expuestas. Similar actividad citrato sintasa fue constatada en los lotes analizados (datos no mostrados).

La normalización de la actividad PDHa en presencia de POCA II (inhibidor de la β -oxidación) en músculo cardiaco 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 2 muestra que la adición de POCA II (10uM), 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 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 cardiaco de ambos lotes experimentales concuerdan con los niveles de glicerol liberado al medio de perfusión, en presencia o ausencia de POCA II.

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

Tabla 2. Efecto del POCA II sobre el contenido tisular de triglicéridos, glicerol liberado y relación acetilCoA/CoASH en corazón perfundido de animales alimentados con dieta rica en sacarosa (DRS) o dieta control (DC).

Dieta	Tratamiento	Triglicéridos ($\mu\text{mol/g.t.s.}$)*	Glicerol liberado (16-35 minutos) ($\mu\text{mol/g.t.s.}$)	AcetylCoA CoASH
DC	- POCA II (6)	$20,0 \pm 2,0$ ^{1a}	$3,96 \pm 0,18$ ^a	$0,067 \pm 0,007$ ^a
DRS	- POCA II (6)	$23,2 \pm 2,29$ ^a	$5,92 \pm 0,17$ ^b	$0,39 \pm 0,052$ ^b
DC	+ POCA II (6)	$22,6 \pm 2,20$ ^a	$3,32 \pm 0,08$ ^a	$0,089 \pm 0,003$ ^a
DRS	+ POCA II (6)	$34,5 \pm 3,72$ ^b	$3,42 \pm 0,38$ ^a	$0,11 \pm 0,025$ ^a
2 x 2 Anova ²				
Dieta		S	S	S
Tratamiento (POCA II)		S	S	S
Dieta x Tratamiento		NS	S	S
RMS		31,99	0,29	0,006

(*) g.t.s.: gramo tejido seco

La infusión de 10 μM de POCA II, comenzó a los 15 minutos de iniciada la perfusión y se mantuvo hasta el minuto 35. (Más detalles ver Materiales y Métodos).

El Glicerol fue analizado en las muestras de perfusado obtenidas a intervalos de un minuto, desde el minuto 16 a 35.

(1) Los valores son expresados como $\bar{X} \pm \text{SEM}$. () indica el número de experimentos.

(2) Análisis de Varianza: S efecto significativo ($p < 0,05$); NS no significativo.

Los valores de las columnas que no comparten la misma letra superescrita, son significativamente diferentes ($p < 0,05$) cuando cada una de las variables es analizada por el test de Scheffe.

μM) normaliza estos parámetros (Tabla 3). 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, ADP, AMP, creatina y creatina fosfato, fueron obtenidos al final del período de perfusión en los corazones de ratas DRS y DC. POCA II no modifica estos parámetros en ambos grupos (data no mostrada).

Discusión

El músculo cardíaco de las ratas Wistar normales alimentadas por un período prolongado de tiempo con una dieta isocalórica rica en sacarosa (DRS) muestra cambios metabólicos importantes relacionados con la regulación de lípidos y carbohidratos. La disminución de la forma activa del complejo PDH constatado en el animal "in situ" continúa presente cuando el músculo cardíaco es perfundido "in vitro" con glucosa como único sustrato energético exógeno. Paralelamente un incremento en las concentraciones de glucosa 6 fosfato, citrato y en

la relación acetilCoA/CoASH indicarían una mayor disponibilidad y oxidación de ácidos grasos en desmedro de la utilización de la glucosa en los corazones alimentados con DRS.

La disminución de la actividad PDHa podría deberse a una estimulación de la actividad PDH-quinasa como consecuencia, probablemente, de un incremento de la relación acetilCoA/CoASH mitocondrial (20). Esta elevada relación refleja una mayor oxidación de ácidos grasos. El diseño experimental de corazón perfundido utilizado contempla solamente como sustrato exógeno la glucosa, por lo que la lipólisis del pool metabolizable de los triglicéridos endógenos, particularmente elevado en la DRS, sería la única fuente disponible de ácidos grasos. Al respecto Wieland y col. (6) señalaron una relación inversa entre los niveles de AGNE plasmáticos y la actividad PDHa cardíaca en animales controles.

La adición de POCA II al perfusado condujo a la normalización de la actividad PDHa sin modificar la actividad PDHt. Esta observación junto con una disminución de la relación acetilCoA/CoASH y de los niveles tisulares de citrato, glucosa 6 fosfato así

Tabla 3. Efecto del POCA II sobre el contenido de metabolitos y liberación de lactato en corazón perfundido de ratas alimentadas con dieta rica en sacarosa (DRS) o dieta control (DC).

Dieta	Tratamiento	Glucosa 6-P ($\mu\text{mol/g.t.s.}$)*	Citrato ($\mu\text{mol/g.t.s.}$)	Lactato liberado (16 - 35 minutos) ($\mu\text{mol/g.t.s.min.}$)
DC	- POCA II (6)	$1,03 \pm 0,05$ ^{1,a}	$0,76 \pm 0,06$ ^a	$6,67 \pm 0,5$ ^a
DRS	- POCA II (6)	$1,46 \pm 0,10$ ^b	$1,47 \pm 0,12$ ^b	$12,6 \pm 1,43$ ^b
DC	+POCA II (6)	$0,91 \pm 0,10$ ^a	$0,73 \pm 0,10$ ^a	$7,13 \pm 0,6$ ^a
DRS	+POCA II (6)	$0,85 \pm 0,12$ ^a	$0,87 \pm 0,04$ ^a	$6,97 \pm 0,66$ ^a
2 x 2 Anova ²				
Dieta		S	S	S
Tratamiento (POCA II)		S	S	S
Dieta x Tratamiento		S	S	S
RMS		0,022	0,027	2,157

(*) g.t.s.: gramo tejido seco

La infusión de 10 μM de POCA II, comenzó a los 15 minutos de iniciada la perfusión y se mantuvo hasta el minuto 35. (Más detalles ver Materiales y Métodos).

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

(1) Los valores son expresados como $\bar{X} \pm \text{SEM}$. () indica el número de experimentos.

(2) Análisis de Varianza: S efecto significativo ($p < 0,05$); NS no significativo.

Los valores de las columnas que no comparten la misma letra superescrita, son significativamente diferentes ($p < 0,05$) cuando cada una de las variables es analizada por el test de Scheffe.

como de lactato liberado avalan aún más el hecho de que una reducción en la oxidación de los ácidos grasos en presencia del inhibidor, normaliza los parámetros bioquímicos mencionados.

Cabe destacar que Rösen y col. (21,22) demostraron que POCA II no ejerce un efecto directo sobre la triglicérido lipasa del músculo cardíaco, por lo tanto el descenso en la lipólisis observada en el lote DRS en presencia del inhibidor se debería a una inhibición por productos intracelulares (ácidos grasos de cadena larga).

Trabajos experimentales han señalado en músculo cardíaco que elevados niveles de ácidos grasos libres interfieren con la glicólisis y la oxidación de la glucosa (23). Por otro lado, Chicco y col. (8) demostraron que la menor actividad PDHa en corazón perfundido de ratas alimentadas durante 15 semanas con DRS, no pudo ser normalizada "in vitro" en presencia de cantidades considerables de insulina, lo que indicaría una disminuida acción insulínica (resistencia insulínica) en dicho órgano. Estos resultados sumados a los del presente trabajo -normalización de la actividad PDHa en el músculo cardíaco en presencia de un inhibidor de la oxida-

ción de ácidos grasos- sugieren una alteración en el flujo glicolítico y en la oxidación de la glucosa como resultado de una incrementada disponibilidad de AGNE que es secundaria a los cambios hormonales y metabólicos presentes en este modelo experimental de dislipidemia nutricional.

Agradecimientos

Agradecemos a las Bqcas: Fontanarrosa ME, Rodi MA, Ferraris NG, por el análisis composicional de la dieta control.

Este trabajo fue realizado en el marco de un Proyecto de investigación CAI+D 94-95 nro.:12/B011.UNL.

Bibliografía

- 1- Mancini, M., Matlock M., Rabaya E., Chait A., Lewis B. (1973) Studies of the mechanism of carbohydrate induced lipemia in normal man. *Atherosclerosis* 17: 445-454.
- 2- Reaven G.M., Rissler TR, Chen YDI, Reaven EP. (1979) Char-

- acterization of a model of dietary induced hypertriglyceridemia in young non obese rats *J.Lipid Res.* **20**: 371-378.
- 3- Gutman R., Basilio MZ, Bernal C., Chicco A., Lombardo YB. (1987) Long term hypertriglyceridemia and glucose intolerance in rats fed chronically an isocaloric sucrose-rich diet *Metabolism* **36**: 1013-1020.
- 4- Soria A. Estudio de aspectos morfológicos, bioquímicos y funcionales del tejido adiposo blanco en la hipertrigliceridemia inducida por dieta rica en sacarosa en animales de experimentación. Tesis doctoral. U.N.L. 1995.
- 5- Randle P.J. (1986) Fuel selection in animals *Biochem. Soc. Trans* **14**: 799-806.
- 6- Wieland OH. (1983) The mammalian pyruvate dehydrogenase complex: structure and regulation *Rev.Physiol. Biochem.Pharmacol.* (ed.) Springer Verlag **96**: 123-170.
- 7- Chicco A., Soria A., Fainstein Day P., Gutman R., Lombardo YB. (1994) Multiphasic metabolic changes in heart of rats fed a sucrose-rich diet. *Horm. Metab. Res.* **26**: 397-403.
- 8- Chicco A., Soria A., Lombardo YB. (1994). "In vitro" insulin fails to normalize the low activity of PDH complex in perfused heart of rats fed a sucrose-rich diet. International Society for heart research. XV European Section Meeting STG Hauns and K.Kjeldsen (ed.) Monduzzi Editore 605-609.
- 9- Report of the American Institute of Nutrition ad-hoc Committee on Standards for Nutritional Studies (1977).
- 10- Second Report of the ad-hoc Committee on Standards for Nutritional Studies (1980).
- 11- Lombardo YB, Chicco A, DAlessandro ME, Martinelli M, Soria A, Gutman R. (1996) Dietary fish oil normalize dyslipidemia and glucose intolerance with unchanged insulin levels in rats fed a high sucrose diet **1299**: 175-182.
- 12- Davidson M.B., Karjala R. (1970). Simplified fluorometric method for the determination of plasma glycerol. *J.Lipid Res.* **11**: 609-612.
- 13- Hohorst H.J., Arese P, Bartels H., Stratmann D., Talke H. (1965) L(+)- lactic acid and the steady state of cellular redox systems. *Ann. NY Acad. Sci.* **119**: 974-994.
- 14- Bergmeyer H.U.(1974).Methods of enzymatic analysis. 2nd. English edn. ,section D. Methods for determination for metabolites (ed.). New York, Academic Press, vol I-IV.
- 15- Laurell S. (1966) A method for routine determination of plasma triglycerides. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **18**: 668-672.
- 16- Wieland O.H., Siess E., Schulze-Wethmar F.H., Funcke H.J., and Winton B. (1971) Active and inactive forms of pyruvate dehydrogenase in rat heart and kidney: Effect of diabetes, fasting, and refeeding on pyruvate dehydrogenase interconversion. *Arch. Biochem. Biophys.* **143**: 593-601.
- 17- Kerbey AL, Randle P.J, Cooper RH, Whitehouse S, Pask HT, Denton RM (1976) Regulation of pyruvate dehydrogenase in rat heart. *Biochem J.* **154**: 327-348.
- 18- Duncombe WB. (1963) The colorimetric micro-determination of long chain fatty acids. *Biochem J.* **88**: 7-10.
- 19- Snedecor GWP, Cochran WG. (1967) Statistical methods. Iowa State University Press, Ames, IA,269.
- 20- Garland PB, Randle P.J. (1964) Control of pyruvate dehydrogenase in perfused rat heart by the intracellular concentration of acetyl-coenzyme A *Biochem J.* **91**: 6C-7C.
- 21- Rösen P, Budde IH, Reinauer H.(1981) Triglyceride lipase activity in the diabetic rat heart *J.Moll.Cell. Cardiol* **13**: 539-550
- 22- Rösen P, Ubrig C., Budde T. (1981) Regulation of lipolysis and triglyceride lipase in the diabetic heart. In Kovach AGB, Monos E, Rubanyi (eds). *Advances in physiological science.* Budapest, Pergamon Press **8**: 167-173.
- 23- Neely JR, Morgan HE (1974) Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle. *Annu. Rev. Physiol.* **36**: 413-459.