

Vías metabólicas en el músculo cardíaco de ratas sometidas a estrés hipobárico

Luisa Ramírez de Martens, Diana López de Piña, Luz Suárez de León, Jorge Martens Cook.

Escuela de Nutrición, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes.

Resumen

En el presente trabajo se han estudiado tres vías de producción de energía en el músculo cardíaco de ratas con hipoxia hipobárica: La glicólisis anaeróbica, representada por el ácido láctico, la fosforilación oxidativa a través de la actividad de la ICD y la utilización de los cuerpos cetónicos a través de la 3-HBD. Simultáneamente se estudió el papel de la CK citoplasmática y mitocondrial como sistemas de conexión y transporte de energía entre las fuentes de producción y su utilización por las ATPasa Mg^{++} y $Na^+ K^+$ dependientes. Los hallazgos obtenidos permiten concluir que existe una activación de la glicólisis y una mayor utilización de los cuerpos cetónicos, en los animales hipóxicos tal como se deduce del aumento del ácido láctico y de la actividad de la 3-HBD.

Esto se correlaciona con el aumento de la CK de origen citoplasmático, lo cual se asocia con la glicólisis y una disminución de la CK de origen mitocondrial. En cuanto a la utilización de la energía, ésta probablemente se encuentra derivada en mayor porcentaje hacia el control del flujo iónico, tal como se deduce del aumento de la actividad de la ATPasa $Na^+ K^+$ dependiente en mayor proporción que la Mg^{++} dependiente.

Palabras claves: Vías metabólicas, corazón de ratas, hipoxia hipobárica.

Abstract

Metabolic Pathway in the myocardial tissue of rats under hypobaric stress

Three pathway of energy production were studied in the cardiac muscle of rats exposed to hypobaric pressure stress: Anaerobic glycolysis (AG), whose marker was the lactic acid; oxidative phosphorylation, marked by Isocitrate dehydrogenase (ICD) activity. Site of regulation of respiration and fatty acid synthesis, and utilization of ketone bodies by the activity of 3-hydroxybutyrate dehydrogenase (3HBD). Also, the function of the cytoplasmic and mitochondrial creatine kinase (CK) was studied as system of connection and transport of energy between the source of energy production and utilization by Mg^{2+} and $Na^+ K^+$ dependent ATPases. The results suggest that glycolysis and ketone bodies metabolism were increased in accord with the enhanced lactic acid production and 3-HBD activity, this correlates with and increase of cytoplasmic CK, associated with glycolysis and reduced mitochondrial CK activity. With respect to energy utilization, it is probably used to a large extent for the control of the ionic flux as revealed by the increased activity of the $Na^+ K^+$ -dependent ATPase much more than the Mg^{2+} dependent ATPase.

Key words: Metabolic pathway, cardiac muscle of rats, hypoxic hypobaric stress.

INTRODUCCIÓN

El músculo cardíaco normal utiliza diferentes sustratos para satisfacer sus demandas energéticas. Este proceso se cumple por una conversión continua de energía desde los sustratos completamente reducidos a los enlaces del ATP. Entre los diferentes metabolitos utilizados para este proceso, destacan en orden de importancia los ácidos grasos libres, la glucosa, los aminoácidos de cadenas

ramificadas y en circunstancias de alta demanda los cuerpos cetónicos exportados por el hígado (Mela Riker y col, 1985). Estos últimos penetran en la mitocondria a través de translocadores de la membrana interna y allí se emplean para la producción de energía. De esta forma el hidroxibutirato se transforma en acetoacetato en presencia de la 3-Hidroxibutirato deshidrogenasa enzima de la membrana interna de la mitocondria (Jungermann, 1984). En el interior de la mitocondria, el acetoacetato se activa a acetil Co-A y es utilizado en el ciclo de Krebs;

este proceso es regulado en algunos pasos metabólicos claves entre los cuales destaca la participación de la Isocitrato deshidrogenasa Moyle y col (1956). Por otra parte, en condiciones de alta demanda, el corazón puede incrementar la producción de lactato, mediante una mayor activación de la glicólisis anaeróbica.

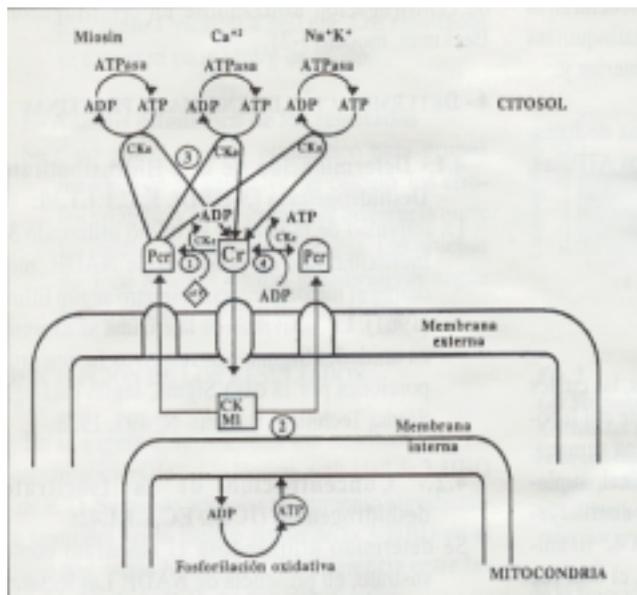


FIG. 1 Circuito de la Fosfocreatina y de las Isoenzimas de la CK. En el esquema se muestran los dos principales pasos para la síntesis de ATP. La fosforilación oxidativa representada por un círculo O y la glicólisis o glicólisis, representada por un rombo . Se indica también los cuatro compartimientos principales para las isoenzimas de la CK: (1)- CK citosólica, acoplada funcionalmente a la glicólisis y participante en el circuito de la Pcr. (2) - La CK mitocondrial, funcionalmente acoplada a la fosforilación oxidativa, también participa en el circuito de la Pcr. (3) - La CK a citosólica, específicamente asociada con las estructuras subcelulares en los sitios de elevada y fluctuante utilización de ATP, donde está funcionalmente acoplada a las ATPasos y (4) La CK estrictamente soluble (CKc) o citosólica, la cual mantiene el equilibrio entre las relaciones Pcr /cr y ATP /ADP en el citosol.

(Tomado y adaptado de Wallimann y col. *Biochem J* (1992) 281, 21-40)

Numerosas investigaciones realizadas en este órgano, muestran que hay una estrecha vinculación entre estos sistemas productores de energía y las miofibrillas,

existiendo una efectiva comunicación entre la producción mitocondrial de ATP y su hidrólisis citosólica por la miosin ATPasa, lo cual implica la coordinación entre el aporte de energía y su demanda y se cumple por la participación de un sistema de lanzadera en el cual intervienen las isoenzimas de las Creatinquinasa. Esta enzima cataliza la transferencia reversible de un residuo de alta energía entre el ATP y la Creatina, produciéndose la Fosfocreatina (FCr), que representa una reserva de energía necesaria para la contracción, relajación y transporte de sustancias dentro de la célula muscular, Wallimann y col (1992). En esta forma, la Fosfocreatina (FCr) podría servir como un transportador de energía, que conecta los sitios de producción con los sitios de su utilización por medio de sus isoenzimas subcelulares compartimentalizadas: Creatinquinasa citoplasmática y Creatinquinasa mitocondrial. Esta conexión permite que el ATP, pueda ser utilizado en el proceso de contracción por la Miosin ATPasa y para la relajación por la Ca^{++} ATPasa, estableciéndose un equilibrio entre los procesos productores y consumidores de energía (Ver Figura 1).

Este esquema puede alterarse por diversas causas; así se ha visto en estudios bioquímicos y morfométricos que en el corazón hipertrofiado existen cambios en la composición celular

que pueden contribuir a un estado de carencia energética, al observarse un incremento en el número de miofibrillas consumidoras y una reducción del número de mitocondrias, productoras de energía respectivamente, Katz (1992). Este desequilibrio contribuye probablemente a un déficit relativo de energía química, que puede, en determinado plazo, originar una insuficiente cardíaca, Matthews (1986). Ha sido también reportado que en las condiciones de estrés, particularmente el estrés hipóxico pueden aumentar los requerimientos energéticos, modificándose este patrón metabólico. Reynafarje (1985) Costa y col (1988), Ingwall (1990).

El propósito del presente trabajo es:

- a) Establecer cual de las vías metabólicas para la utilización de los combustibles anteriormente mencionados, se activa en mayor proporción frente al estrés hipobárico.

- b) Determinar la proporción en que se encuentran la Creatinquinasa citoplasmática y la Creatinquinasa mitocondrial en la misma situación anterior y.
- c) Comparar la actividad de este sistema de transporte energético con la actividad de los ATPasas, consumidoras de energía.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- PROCEDIMIENTOS GENERALES

Se utilizó ratas machos, Wistar, adultas, las cuales fueron previamente adaptadas al ambiente del laboratorio en jaulas individuales, durante una semana. Recibieron «ad libitum» Ratarina Protinal, suplementada con vitaminas y minerales. Se distribuyeron al azar en dos grupos experimentales de 10 animales. El grupo I (Control) y el grupo II, el cual fue sometido a estrés hipobárico en una cámara de descompresión, estableciéndose una presión atmosférica de 488 mm de hg, equivalente a una altura aproximada de 3.500 m. durante dos horas. Simultáneamente se controló la temperatura y la humedad dentro de la cámara, siendo los valores de 38.33±11.72% para la humedad relativa y de 24.13 ± 0.23 °C par la temperatura. Las ratas fueron pesadas antes y después de la descompresión, sin observarse variaciones significativas.

2.- PREPARACIÓN DE LOS HÓMOGENATOS

Ulterior al estrés fueron inmediatamente decapitados y desangrados durante varios minutos, previa anestesia con éter. El sacrificio se realizó a la misma hora de la mañana para evitar las variaciones circadianas sobre la actividad enzimática. Se procedió a disecar los corazones, los cuales fueron lavados con Sacarosa 0.25 M fría. Se eliminó restos de tejido conectivo. Se homogenizaron según Potter y Elvehjem (1963). Los homogenatos fueron filtrados a través de una capa de seda, obteniéndose alícuotas para las determinaciones de proteínas, enzimas y ácido láctico, el resto de los homogenatos se utilizó para la obtención de mitocondrias.

3.- OBTENCIÓN DE LAS MITOCONDRIAS

Fueron separadas mediante el método de Schneider (1957), utilizándose el medio de separación compuesto por Fosfato de Potasio 10 mM a pH 7.6. El proceso de separación se realizó mediante varios pasos de centrifugación utilizándose un centrifugadora Beckman, modelo J-21.

4.- DETERMINACIÓN DE ENZIMAS Y PROTEÍNAS

4.1.- Determinación de la 3-Hidroxiacetil-CoA deshidrogenasa (3-HAD). E.C.1.1.1.30:

La actividad de la enzima se midió utilizando 3-hidroxiacetil-CoA en presencia de NADH, mediante el método fotolorímetro según Elliot (1961). La actividad de la enzima se expreso en unidades Sigma. Los reactivos fueron proporcionados por la casa Sigma, según catálogo Sigma Technical Bulletin N° 495, 1978.

4.2.- Concentración de la Isocitrato deshidrogenasa (ICD). EC.1.1.1.42:

Se determinó utilizándose el isocitrato como sustrato, en presencia de NADP. Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro Coleman, en una longitud de onda de 400 nm. La actividad de la enzima se expresó en Unidades Sigma, Bell (1960). Los reactivos fueron proporcionados por la casa Sigma, según catálogo Sigma Technical Bulletin 1982, 176.

4.3.- Determinación de la Creatinquinasa total y Creatinquinasa Mitocondrial. (CK) EC.2.7.3.2:

Se determinaron mediante un método espectrofotométrico descrito en catálogo Sigma Technical Bulletin N° 46 UV (1979). Las lecturas se realizaron en espectrofotómetro Uvichem a 340 nm. Los resultados se expresaron en Unidades Sigma /mg de Proteínas.

4.4.- Determinación de la ATPasa Na-K- y Mg⁺⁺ dependientes en la fracción total y en la fracción mitocondrial

Se utilizó para tal fin el método de Kielley (1953) para ambas enzimas. La actividad se expresa en μ Mol de Pi liberados, por unidad de tiempo y por G de tejido.

4.5.- Valoración de las proteínas:

Se utilizó el método de Lowry y col (1951). Los resultados se expresan en mg /g de tejido.

4.6.- Valoración del ácido Láctico:

El ácido láctico fue determinado mediante un método espectrofotométrico descrito por Henry (1968) utilizándose un espectrofotómetro Uvichem a 340 nm. Los resultados se expresan en mMol/g de tejido.

5.- Análisis estadístico de los resultados

Se rigió por el criterio estadístico para grupos menores de 30 animales. Se calculó los errores estándar y se determinó la diferencia entre las medias de series no pareadas. Las pruebas de T de Student, fueron significativas según $P < .05$ (Parker, 1976 y Fisher, 1949).

DESCRIPCIÓN DE LOS RESULTADOS

En la Figura 2 se resumen los resultados de las concentraciones de ácido láctico, actividad de 3-HBD y de ICD. Se puede apreciar un aumento significativo tanto del ácido láctico como de la 3-HBD en el grupo con estrés hipobárico. La diferencia entre las actividades de la ICD, no fue significativa.

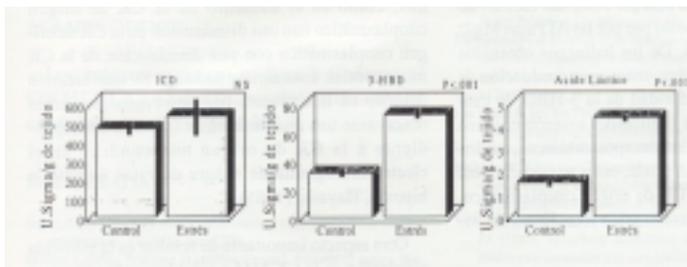


Fig. 2 Sistemas productores de energía: Actividad de ICD, 3H-BD y concentración de ácido láctico en corazón de ratas con estrés hipobárico. Los resultados se expresan en medias \pm errores estándar. Valores significativos: $p < .05$, NS: No significativo. N=10 ratas por grupo. ICD: Deshidrogenasa iso-citrica; 3-HBD: Deshidrogenasa 3-hidroxi-butírica.

En la Figura 3, se muestra los valores de la CK Total y CK Mitocondrial. Se puede observar un aumento bastante significativo de la CK Total, en cambio, la CK Mitocondrial disminuye notablemente con el estrés hipobárico.

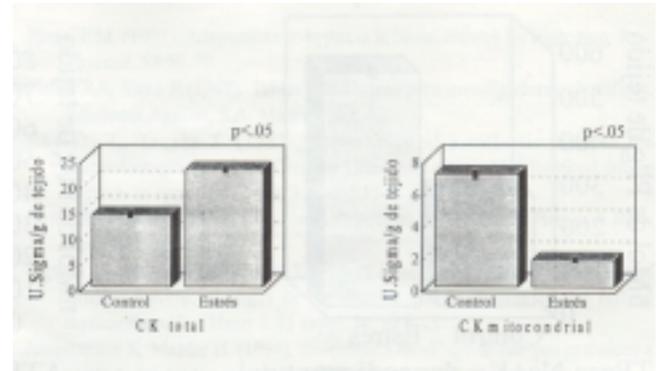


Fig. 3 Los Sistemas transformadores de energía: Actividades de la Ck total y Ck mitocondrial en corazón de ratas con estrés hipobárico. Los resultados se expresan como valores de las medias \pm sus errores estándar. Diferencias significativas entre medias: $p < .05$. NS: No significativas. N=10 ratas por grupo. CK: Creatinquinasa.

En la Figura 4 se resumen los resultados de las actividades de las ATPasas $\text{Na}^+ \text{K}^+$ y Mg^{++} dependientes. Se puede observar el aumento significativo tanto de la actividad total como mitocondrial de la ATPasa $\text{Na}^+ \text{K}^+$ dependiente en relación con el estrés hipobárico; en cambio, la ATPasa Mg^{++} dependiente de la fracción total no se modifica significativamente por el contrario, la ATPasa Mg^{++} dependiente mitocondrial, exhibe un aumento significativo de su actividad por efecto del estrés hipobárico.

DISCUSIÓN

Todos los procesos involucrados en el crecimiento y metabolismo de las células requieren de un aporte de energía. La producción, transporte, conversión y utilización de esta energía depende de vías metabólicas claves. En el presente trabajo se ha estudiado 3 vías de producción de energía, la glicólisis anaeróbica, representada por la producción de ácido láctico, la fosforilación oxidativa a través de la actividad de la ICD y por último una vía alterna utilizada por el músculo cardíaco en condiciones extraordinarias para alimentar la fosforilación oxidativa; como es el caso de la utilización de los cuerpos cetónicos. Se estudió además el papel de la CK citoplasmática y mitocondrial como sistemas de conexión y transporte de energía entre las fuentes de producción y su utilización por las ATPasas Mg^{2+} y $\text{Na}^+ \text{K}^+$ dependientes. De los hallazgos obtenidos se puede

inferir que existe una mayor producción de ácido láctico y una actividad de la 3-HBD, lo cual sugiere un aumento de la glicólisis anaeróbica y una mayor utilización de los cuerpos cetónicos, en los animales sometidos a hipoxia, estos se correlaciona con un aumento de la CK de origen citoplasmático, lo cual ha sido demostrado por varias líneas de investigación.

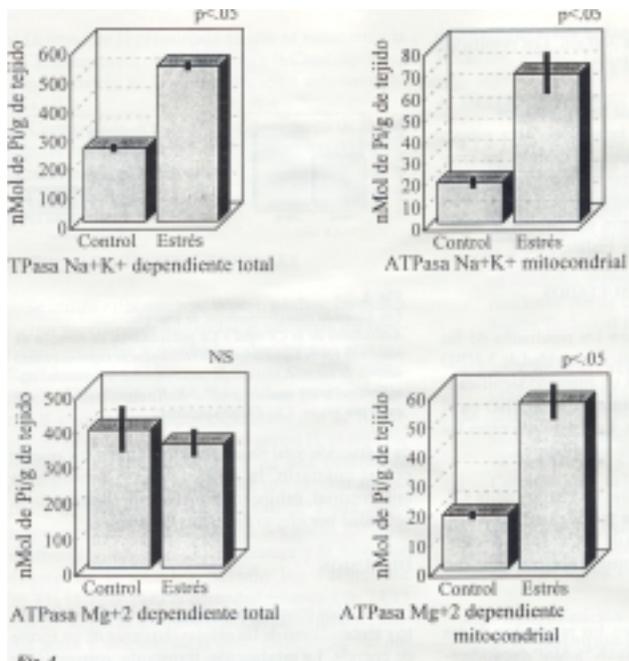


Fig. 4. Sistemas consumidoras de energía: Actividades de las ATPasa Na⁺ K⁺ y ATPasa Mg²⁺ dependiente, total y mitocondrial en corazón de ratas con estrés hipobárico. Los resultados se dan en medias ± errores estándar. Diferencias significativas entre medias: p<.05, NS: No significativas. N=10 ratas por grupo

Así Bronstein y col (1981) observó que las enzimas glicolíticas forman el llamado complejo glicolítico, localizado en la banda 1 donde se encuentran fuertemente asociadas con las filamentos finos. Ocasionalmente la mayoría de la CK MM o soluble está también específicamente localizada en la banda I Wallimann y col (1989). De esta manera la cantidad de Ck MM soluble se correlaciona con el potencial glicolítico del músculo. En nuestro caso particular, a pesar de que el corazón en general depende ATPasa Na⁺ K⁺ mitocondrial del metabolismo oxidativo, la energía derivada de la glicólisis está también contribuyendo, al menos en alguna extensión al mantenimiento de altos niveles de fosfatos y contractilidad, para compensar la

inhibición de la fosforilación oxidativa a causa de la hipoxia. Este hecho ha sido también demostrado en experimentos realizados con músculos anóxicos de peces que pueden sobrevivir bajo condiciones anaeróbicas, derivando su energía de la glucógenolisis (Van Waarde y col, 1990) y puede explicar los resultados obtenidos en nuestro caso; en los cuales coinciden algunos hallazgos, como es el aumento de la CK de origen citoplasmático con una disminución de la CK de origen citoplasmático con una disminución de la CK mitocondrial. Este último hallazgo ha sido también descrito en la literatura por otros autores quienes observaron una disminución de la banda correspondiente a la CK de origen mitocondrial en el electroforetograma de sangre de ratas durante la hipoxia, Hayashi (1985).

Otro aspecto importante de resaltar es la conocida asociación de la CK MM o soluble con los procesos que requieren ATP. Particularmente se ha descrito una asociación a la banda M de las miofibrillas. Wallimann y col. (1984) donde la CK está funcionalmente acoplada a la ATPasa Mg²⁺ dependiente miofibrillar. La cantidad de CK unida a la banda M es suficiente para regenerar el ATP hidrolizado durante la contracción muscular.

En el músculo se ha encontrado otras porciones de la CK MM específicamente asociadas con el retículo sarcoplásmico, donde está funcionalmente acoplada a la ATPasa Ca²⁺ dependiente, Rossi y col (1990). Estos resultados indican que la CK está críticamente involucrada en la regulación del flujo de iones que tiene lugar durante el acoplamiento entre la excitación y la contracción.

También se ha demostrado que cantidades relativamente pequeñas, pero significativas de esta isoenzima se han encontrado en la membrana sarcolema donde la CK está funcionalmente acoplada a la ATPasa Na⁺ K⁺ dependiente. (Wallimann 1992).

Uno de los objetivos propuestos en el presente trabajo fue el de establecer una relación entre la actividad de la CK con las ATPasa, tanto miofibrillar (Mg²⁺ dependiente) como con la ATPasa asociada a las membranas (Na⁺ K⁺ dependiente). Los datos obtenidos en el presente trabajo, concernientes a la actividad de la CK de origen citoplasmático no permiten concluir si esta enzima se encuentra asociada en mayor concentración a las miofibrillas o a las membranas. Sin embargo, el aumento de la actividad de la CK de origen citoplasmático guarda correlación en este caso, con un aumento de la actividad

de la ATPasa $\text{Na}^+ \text{K}^+$ dependiente, lo cual nos permite sugerir que bajo las condiciones experimentales señaladas, el mayor porcentaje de energía está siendo utilizado para el control de flujo iónico, necesario para el proceso de con-tracción.

AGRADECIMIENTO

Los autores expresan su agradecimiento al CDCHT-ULA por haber financiado la realización de este trabajo con el código M-202.

BIBLIOGRAFIA

- Bell JL, Baron DN (1960). A colorimetric method for determination of Isocitric dehidrogenase. *Clin Chim Acta* 5:740.
- Bradford A (1958). Principios de estadística médica. Editorial El Ateneo. Buenos Aires Pág. 116.
- Bessman SP, Geiger PJ (1981). Transport in muscle; The phosphorylcreatine shuttle. *Science* 211(4481): 448-52.
- Bronstein W W, Knull H R. (1981). Interaction of muscle glycolytic enzymes with thin filaments proteins. *Can J. Biochem.* 59(494-499).
- Brown C. (1992). Control of respiration and ATP synthesis in mammalian mitochondria and cells. *Biochem. J.* 284(1-13).
- Elliot BA, Wilkinson JH (1961). Serum hydroxybutyrate dehidrogenase activity in liver mitochondria from diabetic rats. *Arch. Biochem Biophys* 224:659.
- Faraci FM. (1991). Adaptations to hypoxia in birds: How to fly high. *Ami. Rev. Physiol.* 53:59-70.
- Fisher RA, Yates F (1949). Tablas estadísticas para investigadores científicos. Ediciones Aguilar, S.A. Madrid. pág. 52.
- Hayashi T., Tanaka T. (1985). Appearance of a cathodic band in the electrofortogram of blood Creatine kinase isoenzyme-MM fractions during hypoxia in rats *Clin. Chem.* 31 (4): 533-6.
- Henry RJ: (1968). *Clinical Chemistry. Principles and Technics*, Harper & Row. New York PP 664-666.
- Ingwall JS, Atkinson DE, Clarke K, Fetters JK, (1990). Energetic correlates of cardiac failure: changes in the creatine kinase system in the failing myocardium. *Eur Heart J.* 11 suppl. B: 108-15.
- Jungermann K, Mahler H. (1984). *Bioquímica en «Flujo de cuerpos cetónicos a partir de los ácidos grasos*. Ed. Pirámide pág. 279.
- Katz AM. (1990). Cardiomiopathy of overload: A mayor determinant of prognosis in congestive heart failure. *N. Engl. J Med.* 332-100.
- Katz AM. (1992). Metabolismo energético en el corazón insuficiente. *Hospital Practice (edc. espec)* Vol 7,3:9-21.
- Kielley W, Kielley RK. (1953) A specific method for adenosine triphosphatase of liver mitochondria. *J. Biol. Chem* 200: 213-222.
- Lund DD, Tomanek RJ. (1980) The effects of chronic hypoxia on the myocardial cell of normotensive and hypertensive rats. *The Anatomical Record* 196:421-430.
- Matthes PM, Taylor DJ, Radda OK, (1986). Biochemical mechanism of acute contractile failure in the hypoxic rat heart. *Cardiovasc. Res.* 20 (1): 13-9.
- Mela-Riker LM, Bukoski RD (1985). regulation of mitochondrial activity in cardiac cells. *Ann. Rev. Physiol.* 47: 645-63.
- Meyer RA, Brown Tr, Krilowics BL, Kushmerick MJ. (1986). Phosphagen and intracellular PH changes during contraction of creatine depleted rat muscle. *Am. J. Physiol.* 250(2 p.1): C264-74.
- Moyle J, Dixon M. (1956). Purification of the Isocitric enzyme (triphosphopiridine nucleotide linked isocitric dehidrogenase oxalosuccinic carboxylase). *Biochem J* 63:548-53.
- Parker RE. (1976). *Estadística para biólogos*. Ediciones Omega. Barcelona.
- Pereira AM, Ramírez de Martens LM, Martens JE (1981). Efectos de la ingesta de NaCl y del «strés» hipobárico sobre la actividad de la ATPasa $\text{Na}^+ \text{K}^+$ dependiente en músculo cardíaco de rata. *Acta Cient Ven.* vol 39 (supli 1): 28, 1988.
- Robertson JIS (1987). Salt, volume and hypertension: Causation or correlation. *Kidney international* (vol 32)590-602.
- Rossi AM, Eppenberger HM, Volpe P, Cotrufo R, Wallimann T. (1990) Muscle type MM creatine kinase is specifically bound to sarcoplasmic reticulum and can support Ca^{++} uptake and regulate local ATP/ADP ratios. *25:265 (9):5228-66.*
- Schneider Wc, Umbreit W, Burris R, Stauffer JF, (1957). *Manometric thecniques*. Burger Publishing Co. Minneapolis. pág 188.
- The Committee on Enzymes of the Scandinavian Society for Clinical Chemistry and Clinical physiology: Recommended method for the determination of creatine kinase in blood modified by the inclusion of EDTA. (1979). *Scand J Clin lab Invest* 39:1.
- Van Vaarde A, Van den ThiIhart O, Erkelens C, Addink A, Lugtenburg J. (1990). Functional coupling of glycolysis and phosphocreatine utilization in anoxic fish muscle. An in vivo ^{31}P NMR study. *J Biol Chem* 265 (2): 914-23.
- Wallimann T, Scholossner T, Eppenberger HM. (1984). Function of MI-line-boud creatine kinase as intramyofibrillar ATP regenerator at the receiving end of the phosphorylcreatine shuttle in muscle *J Biol Chem* 259(8):5238-46.
- Wallimann T, Walzthony D, Wegmann O, Moser H, Eppenberger HM, Barrantes FJ. (1985). Subcellular localization of Creatine kinase in Torpedo electrocytes: association with acetylcholine receptor rich membranes. *J Cell Biol* 100(4):1063-72.
- Wallimann T, Schnyder T, Schlegel J, Wyss M, Wegmann O, Rossi Am, Hemmer W, Eppenberger HM, Quest AF (1989). Subcellular compartmentation of creatine kinase isoenzymes, regulation of CK and octameric structure of mitochondrial CK: important aspects of the phosphoryl creatine circuit. *Prog Clin Biol Res.* 344:877-89.
- Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K, Eppenberger HM (1992). Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in.