

Laura Cristina Jardim Pôrto

***Influência do ácido orótico no metabolismo
energético cardíaco de ratos***

Tese de doutorado apresentada ao Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Fisiologia).

**Belo Horizonte
2007**

PÔRTO, LAURA CRISTINA JARDIM

Papel do ácido orótico no metabolismo energético cardíaco de ratos. /

Laura Cristina Jardim Pôrto – Belo Horizonte, 2007.

xiv, 82 p.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia.

Role of orotic acid on the cardiac energetic metabolism of rats.

1. Ácido orótico
2. Metabolismo energético
3. Função cardíaca
4. Isquemia/reperfusão
5. Ratos

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia e Biofísica
Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia

Chefia do Departamento: Prof^ª. Dra. Maria Carolina Doretto

Coordenação do Programa de Pós-graduação: Prof^ª. Dra. Maria José Campagnole-Santos

Orientação: Prof^ª. Dra. Leida Maria Botion

Co-orientação: Prof. Dr. Alvair Pinto de Almeida

Auxílio Financeiro: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal - CAPES

À DEUS Nosso Pai, Minha Luz e Minha Vida!

À Minha Família, nas pessoas de meu pai Lauro, minha mãe Lourdes, irmãs Lêila, Lucinéia e Lizélia, cunhados Damon e Jaquilane, sobrinhos Gian, Damylla, Weslen, Weverton, Yasmine e Heitor; meu porto seguro! À Lembrança Sempre Viva de meu avô querido José Gomes e meu irmão Lélío!

Aos meus familiares queridos, madrinha Glória, tia Maura e primos todos!

À Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia, nas pessoas das Prof^{as}. Dra. Adelina Martha dos Reis e Prof^a. Dra. Maria José Campagnole-Santos, por proporcionarem a realização deste trabalho.

À minha orientadora Prof^a. Dra. Leida Maria Botion e ao meu co-orientador Prof. Dr. Alvair Pinto de Almeida, muito obrigada pelas excelentes orientações, pelos exemplos de profissionalismo e seriedade perante a ciência!

Ao Prof. Dr. Robson Augusto S. Santos, ao Prof. Dr. Cândido Celso Coimbra e à Prof^a. Dra. Maria José Neves, pelas cooperações, permitindo a execução de algumas práticas experimentais em seus laboratórios.

Aos colegas de laboratório Gilbert, Jonas e em especial às amigas Adaliene, Érica e Zélia, pelo convívio carinhoso, troca de idéias e grandes ajudas sempre que necessário.

Aos colegas Carlos Henrique, Dênis, Serginho e Sílvia, pelas colaborações imprescindíveis para o desenvolvimento desse trabalho e pelo convívio amigável.

Às colegas de luta Adelaide, Celinha, Rose da faxina, Rose da “renal” e Vanessa, muito obrigada pelos serviços prestados e amizade adquirida.

Aos demais professores e aos vários colegas do Departamento de Fisiologia e Biofísica, pelos auxílios prestados e convívio agradável.

Ao ICB-UFMG, representado pelo Magnífico Reitor Prof. Dr. Ronaldo Tadêu Pena, pela disponibilização da infra-estrutura necessária ao desenvolvimento dessa pesquisa.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos e auxílio técnico-financeiro, apoio que tornou concreta a possibilidade desse trabalho.

À minha irmã Lucinéia em especial, por tanto carinho, atenção e disponibilidade sempre.

RESUMO

A *performance* cardíaca funcional está intimamente relacionada ao metabolismo energético. Estudos mostram que os desarranjos comumente associados à isquemia e reperfusão, como desequilíbrio iônico e comprometimento das proteínas contráteis, são consequentes às mudanças metabólicas instaladas, sendo chave nessa questão a diminuição do pool de ATP. Várias pesquisas experimentais e clínicas têm revelado que agentes terapêuticos que otimizam o metabolismo energético cardíaco constituem importante enfoque para o tratamento das disfunções cardíacas. Considerando que o ácido orótico (AO) apresenta efeitos cardiovasculares benéficos, o presente estudo objetivou investigar a influência desse composto nas vias metabólicas envolvidas no suprimento de energia para o coração.

Ratos Wistar machos foram alimentados por nove dias com dieta controle (grupo C) ou com dieta C suplementada com AO a 1% (grupo AO). O tratamento com AO aumentou a utilização cardíaca de ácidos graxos (AG), evidenciada pelos aumentos da captação e incorporação dos mesmos pelo tecido cardíaco e corroborado pelos aumentos da atividade da enzima LPL, da expressão dos genes para PPAR α , carnitina palmitoil transferase-1 e acil CoA oxidase, tanto em condições basais quanto após oclusão parcial da coronária. No que se refere ao metabolismo cardíaco da glicose, a administração AO aumentou a captação da mesma, o conteúdo de glicogênio, a concentração dos intermediários glicolíticos glicose 6-P e frutose 6-P e a produção de lactato, em ambas as condições experimentais, basal e após oclusão parcial da coronária. Isso se refletiu em aumento do conteúdo energético cardíaco ainda na pré-isquemia. Foi evidenciado, nos animais AO, um estímulo da via glicolítica e da oxidação de AG, particularmente importante para manutenção do pool residual de ATP durante a fase isquêmica.

A análise dos índices de contratilidade cardíaca revelou um efeito inotrópico positivo do AO, fato que se deve, pelo menos em parte, ao maior rendimento energético alcançado. Isso nos permite sugerir que as modificações metabólicas induzidas pelo ácido orótico repercutem em alterações apreciáveis na função contrátil do miocárdio.

ABSTRACT

The functional cardiac performance is closely related to energetic metabolism. Studies have shown that the disarrangements usually associated to ischemia and reperfusion, such as ionic imbalance and impairment of contractile proteins, are consequence of installed metabolic changes, associated with a reduction of ATP levels. Several experimental and clinical researches have shown that therapeutic agents that optimize the energetic metabolism constitute important approach for cardiac disorders treatment. Considering that the orotic acid (OA) exhibit beneficial cardiovascular effects, the experiments reported here were designed to investigate the influence of this compound on the metabolic pathway involved in energy supply to heart.

Male Wistar rats were fed during nine days with a balanced diet (C – control group) or with a C diet supplemented with 1% OA (OA group). The treatment with OA increased the cardiac utilization of fatty acids (FA), evidenced by the cardiac increase of uptake and incorporation of FA, and corroborated by increased activity of LPL, and genetic expression of peroxisome proliferator activated receptor alpha, carnitine palmitoyl transferase and acyl CoA oxidase, both in basal conditions and after coronary partial occlusion. In relation to cardiac metabolism of glucose, OA administration increased the glucose uptake, the cardiac glycogen content, the concentration of the glucose 6-P and fructose 6-P glycolytic intermediates and the lactate production, in basal conditions and after coronary partial occlusion. These effects in the OA group resulted in an increased fuel supply to the heart in pre-ischemia yet. It was evidenced, on AO animals, a stimulus of glycolytic pathway and FA oxidation, particularly important to residual ATP pool handling during the ischemic phase.

The analysis of the cardiac contractility index showed a positive inotropic effect of OA due, at least in part, to the increased availability of energy. This allow us to suggest that the metabolic

changes induced by OA administration results in appreciable alteration on myocardial contractile function.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
SUMÁRIO	v
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
1.0 INTRODUÇÃO	1
1.1 Integração do metabolismo intermediário	1
1.2 Metabolismo energético cardíaco	5
1.2.1 Metabolismo energético e performance cardíaca	9
1.3 Ácido orótico e função cardíaca	11
2.0 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivos específicos	14
3.0 MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 Animais e seu tratamento	16
3.2 Metodologia	17
3.2.1 Perfusão cardíaca	17
3.2.2 Medida da atividade da lipase lipoprotéica	20
3.2.3 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RCP-TR)	22
3.2.3.1 Extração do RNA total	22
3.2.3.2 Tratamento com DNase	24

3.2.3.3 Retro transcrição (RT)	24
3.2.3.4 Seleção de oligonucleotídeos iniciadores para RCP em tempo real	24
3.2.3.5 RCP em tempo real	25
3.2.4 Análise semi-quantitativa do transportador de glicose (GLUT ₄) por <i>western blot</i>	26
3.2.5 Análises bioquímicas	27
3.2.6 Medida da captação e da incorporação de substratos energéticos	29
3.2.6.1 Captação e incorporação de ácido graxo marcado	29
3.2.6.2 Inter-relação entre a captação e a incorporação de AG e glicose marcados	30
3.2.6.3 Medida da captação e da incorporação de AG e glicose marcados	31
3.2.7 Análise estatística	32
4.0 RESULTADOS	33
4.1 Ingestão alimentar, ganho de peso corporal e peso tecidual	33
4.2 Parâmetros séricos	33
4.3 Atividade da enzima lipase lipoprotéica	35
4.4 Expressões cardíacas dos mRNAs para PPAR α , CPT-1 e ACO	38
4.5 Conteúdo da proteína GLUT ₄ do tecido cardíaco	40
4.6 Conteúdo cardíaco de Glicose 6-P e Frutose 6-P	42
4.7 Produção cardíaca de lactato	44
4.8 Conteúdo de glicogênio cardíaco	45
4.9 Captação e incorporação de substratos energéticos	46
4.9.1 Inter-relação entre a captação e a incorporação de ácidos graxos e glicose	46
4.10. Rendimento energético tecidual	49
4.11 Função cardíaca	50

5.0 DISCUSSÃO	57
6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

LISTA DE FIGURAS

1. Ciclo glicose-ácido graxo no músculo	4
2. Modulação da utilização celular de AG pelo malonil-CoA	5
3. Utilização de substratos energéticos pelo miocárdio	8
4. Estrutura química do ácido orótico	12
5. Protocolo de perfusão cardíaca	19
6. Separação de fases	23
7. Protocolo de perfusão com ³ H-trioleína	30
8. Protocolo de perfusão com ³ H-trioleína e [U- ¹⁴ C] glicose	30
9. Concentrações de triglicerídios, colesterol total, ácidos graxos livres e glicerol presentes no soro dos grupos C e AO	34
10. Atividade da enzima LPL presente em plasma dos grupos C e AO	36
11. Atividade da enzima LPL total presente no tecido cardíaco intacto dos grupos C e AO	36
12. Atividade da enzima LPL liberável pela heparina (LPL funcional), determinada em perfusato cardíaco dos grupos C e AO	37
12 A. atividade da LPL em perfusato de coração normóxico	37
12 B. atividade da LPL em perfusato de coração submetido à isquemia parcial e reperfusão	37
13. Expressão do gene do fator de transcrição PPAR α no tecido cardíaco dos grupos C e AO	38
13 A. expressão do PPAR α em coração normóxico	38
13 B. expressão do PPAR α em coração submetido à isquemia parcial e reperfusão	38
14. Expressão do gene da enzima CPT-1 no tecido cardíaco dos grupos C e AO	39

14 A. expressão da CPT-1 em coração normóxico	39
14 B. expressão da CPT-1 em coração submetido à isquemia parcial e reperfusão	39
15. Expressão do gene da enzima ACO no tecido cardíaco dos grupos C e AO	39
15 A. expressão da ACO em coração normóxico	39
15 B. expressão da ACO em coração submetido à isquemia parcial e reperfusão	39
16 A. imunoblotes para GLUT ₄ e β-actina	41
16 B. análise semi-quantitativa da massa de proteína GLUT ₄ , medida em coração normóxico dos grupos C e AO	41
16 C. análise semi-quantitativa da massa de proteína GLUT ₄ , medida em coração submetido à isquemia parcial e reperfusão, dos grupos C e AO	41
17. Concentrações dos intermediários glicolíticos, glicose 6-P (G 6-P) e frutose 6-P (F 6-P), presentes no tecido cardíaco dos grupos C e AO	43
17 A. concentrações de G 6-P e F 6-P em coração normóxico	43
17 B. concentrações de G 6-P e F 6-P em coração submetido à isquemia parcial e reperfusão	43
18. Concentrações de lactato determinadas em perfusatos de corações normóxicos e submetidos à isquemia parcial e reperfusão, nos grupos C e AO	44
19. Conteúdo de glicogênio por 100mg de tecido cardíaco, dos grupos C e AO	45
19 A. conteúdo de glicogênio em coração normóxico	45
19 B. conteúdo de glicogênio em coração submetido à isquemia parcial e reperfusão	45
20. Utilização cardíaca de ácidos graxos de ³ H-trioleína fornecida como único substrato energético, pelos grupos C e AO	47
20 A. captação de AG presentes em solução de perfusão	47

20 B. incorporação tecidual de AG	47
21. Utilização cardíaca de ácidos graxos de ^3H -trioleína pelos grupos C e AO, perfundidos com uma mistura de ^3H -trioleína e $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ glicose	48
21 A. captação de AG presentes em solução de perfusão	48
21 B. incorporação tecidual de AG	48
22. Utilização cardíaca de $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ glicose pelos grupos C e AO, perfundidos com uma mistura de ^3H -trioleína e $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ glicose	48
22 A. captação de glicose presente em solução de perfusão	48
22 B. incorporação tecidual de glicose	48
23. Concentração de ATP no tecido cardíaco dos grupos C e AO	49
23 A. concentração de ATP em coração normóxico	49
23 B. concentração de ATP em coração submetido à isquemia parcial e reperfusão	49
24. Frequência cardíaca dos grupos C e AO	51
24 A. frequência cardíaca em coração normóxico	51
24 B. frequência cardíaca em coração submetido à isquemia parcial	51
25. Tensão sistólica ventricular dos grupos C e AO	52
25 A. tensão sistólica em coração normóxico	52
25 B. tensão sistólica em coração submetido à isquemia parcial	52
26. Tensão diastólica ventricular dos grupos C e AO	53
26 A. tensão diastólica em coração normóxico	53
26 B. tensão diastólica em coração submetido à isquemia parcial	53
27. $+d\text{T}/d\text{t}$ ventricular dos grupos C e AO	54
27 A. $+d\text{T}/d\text{t}$ em coração normóxico	54

27 B. + dT/dt em coração submetido à isquemia parcial	54
28. - dT/dt ventricular dos grupos C e AO	55
28 A. - dT/dt em coração normóxico	55
28 B. - dT/dt em coração submetido à isquemia parcial	55
29. Fluxo coronariano dos animais C e AO	56
29 A. fluxo coronariano em coração normóxico	56
29 B. fluxo coronariano em coração submetido à isquemia parcial	56
30. Esquema das alterações metabólicas evidenciadas pelo tratamento com ácido orótico.	69

LISTA DE TABELAS

1. Composição básica da dieta controle	16
2. Composição final da solução Krebs-Ringer	18
3. <i>Primers</i> para RCP em tempo real	25
4. Ganho de peso corporal, ingestão alimentar diária e peso do tecido cardíaco dos grupos C e AO	33
5. Utilização cardíaca de AG em modelos de perfusão contendo soluções com diferentes composições de substratos	47

LISTA DE ABREVIATURAS

ACO	Acil CoA oxidase
AG	Ácidos graxos
AGL	Ácidos graxos livres
AMP	Monofosfato de adenosina
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
AO	Ácido orótico
Apo B	Apolipoproteína B
Apo CII	Apolipoproteína CII
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Albumina de soro bovino
C	controle
CAT	Ciclo do ácido tricarboxílico
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CPT-1	Carnitina palmitoil transferase - 1
CTE	Cadeia de transporte de elétrons
dT/dt	Varição da tensão / variação do tempo
F 6-P	Frutose 6-fosfato
FABP's	Proteínas ligadoras de ácidos graxos
FAT's	Translocases de ácidos graxos
FATP's	Proteínas transportadoras de ácidos graxos
FC	Frequência cardíaca

FFQ	Fosfofrutoquinase
FGI	Fosfoglicose isomerase
G 6-P	Glicose 6-fosfato
G6P-DH	Glicose 6-P desidrogenase
GLUT's	Transportadores de glicose
GLUT₄	Transportador de glicose - 4
HQ	Hexoquinase
K-R	Solução Krebs-Ringer
LPL	Lipase lipoprotéica
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
OA	Orotic acid
PD	Complexo piruvato desidrogenase
PPARs	Receptores nucleares ativados pelos proliferadores de peroxissomos
PPAR_α	Receptor nuclear α ativado pelos proliferadores de peroxissomos
PRPP	5-fosforribosil-1-pirofosfato
RCP-TR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RNA	Ácido ribonucléico
RT	Retro transcrição
TG	Triglicerídios
UMP	Uridilato ou monofosfato de uridina
VLDL	Lipoproteínas de muito baixa densidade

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Integração do metabolismo intermediário

Os sistemas fisiológicos que mantêm a homeostase energética operam pela regulação integrada do metabolismo em diferentes órgãos, embora cada um apresente necessidades energéticas e nutricionais particulares. A eficiência dessa relação é que garante que os produtos metabólicos de um órgão sejam usados como substratos por outro. A integração metabólica é essencial para sobrevivência a curto e longo prazo e sob condições fisiológicas, o metabolismo de lipídios e de carboidratos ocorre de forma coordenada, permitindo a manutenção da glicemia e lipemia em faixas estreitas de concentração.

A escolha do substrato energético por tecidos particulares obedece a um complexo sistema de controle funcional e proliferativo. As enzimas envolvidas em cada passo metabólico têm suas expressões reguladas por fatores de transcrição diversos, além de suas atividades reguladas por fatores humorais, nutricionais e metabólicos (CHINETTI et al., 2001; KATZ, 2006).

As expressões dos numerosos genes envolvidos no metabolismo energético são reguladas por fatores de transcrição ativados por ligantes, denominados receptores nucleares (CHINETTI et al., 2001). Os receptores nucleares governam numerosos processos de importância biológica e seus mecanismos de ação envolvem a ligação a sítios específicos do DNA, chamados elementos responsivos. Uma vez ligados, o complexo pode ativar ou inibir a expressão de genes alvos (STAELS et al, 1998).

Os receptores nucleares ativados pelos proliferadores de peroxissomos (PPARs) são membros de uma superfamília de receptores nucleares. Estes receptores foram inicialmente identificados em 1990, quando foi verificado que uma das isoformas, PPAR $_{\alpha}$, era receptora de xenobióticos capazes de

induzir a proliferação de peroxissomos em fígado de roedores. Subseqüentemente dois outros genes de PPARs, PPAR β e PPAR γ_1/γ_2 , foram descritos (CHINETTI, et al., 2001).

O PPAR α é expresso principalmente em tecidos que apresentam altas taxas de oxidação como fígado, músculo esquelético, tecido adiposo marrom, coração e rim (KERSTEN, 2002). Ele é o regulador transcricional chave de genes envolvidos na oxidação de ácidos graxos (AG), estando diretamente ligado ao controle da expressão e atividade de enzimas da oxidação mitocondrial e peroxissomal de AG, como a carnitina palmitoil transferase-1 e a acil CoA oxidase, respectivamente (NÖHAMMER et al, 2000; TOTLAND et al, 2000).

A insulina e os hormônios contra-reguladores glucagon, adrenalina, glicocorticóides e hormônio do crescimento desempenham papel central no controle hormonal do metabolismo. A ação coordenada desses hormônios é necessária para a manutenção do nível sanguíneo fisiológico de glicose em uma faixa de 4-6 mmoles/L entre as refeições e até 10mmoles/L após uma refeição. Taxas elevadas de glicose no sangue estimulam secreção pancreática de insulina, o que resulta em aumento da captação de glicose pelos tecidos muscular e adiposo, inibição da gliconeogênese e glicogenólise e aumento da oxidação de glicose e síntese de glicogênio no fígado, bem como inibição da lipólise no tecido adiposo (SALTIEL & KAHN, 2001). No estado de jejum destacam-se os efeitos dos hormônios contra-reguladores e as fontes energéticas corporais alternam de carboidratos e gorduras para gorduras principalmente, e os ácidos graxos que foram estocados no período pós-prandial são liberados pelos adipócitos. O fluxo de ácidos graxos livres (AGL) é primariamente dependente dos triglicerídios (TG) armazenados no tecido adiposo, os quais são liberados deste, pelo processo de lipólise, e transportados para os tecidos onde são oxidados para produção de energia, e no caso do fígado, também podem ser incorporados em lipoproteínas (ARNER, 2001).

Nesse contexto, RANDLE e colaboradores, em 1963, descreveram o ciclo glicose-ácido graxo, o qual estabelece uma relação inversa entre a concentração de AG e a oxidação de carboidratos. O aumento da concentração de AGL no músculo restringe a captação e utilização de glicose, via inibição de enzimas-chave envolvidas nas reações oxidativas e não oxidativas da glicose. Desta forma, observa-se uma redução da capacidade de oxidar a glicose e/ou armazená-la como glicogênio. A glicólise, via anaeróbica de oxidação da glicose, é altamente regulada por múltiplos fatores e as enzimas mais importantes na regulação dessa via são a fosfofrutoquinase, a gliceraldeído 3-P desidrogenase e o complexo piruvato desidrogenase. O aumento da oxidação de ácidos graxos aumenta a formação de acetil-CoA, inibindo, dessa forma o complexo piruvato desidrogenase; a formação de citrato e ATP inibe a atividade da fosfofrutoquinase, levando ao acúmulo de glicose-6-fosfato que, por sua vez, inibe a hexoquinase (Figura 1) (RANDLE et al, 1963; KOCKSKÄMPER et al, 2005).

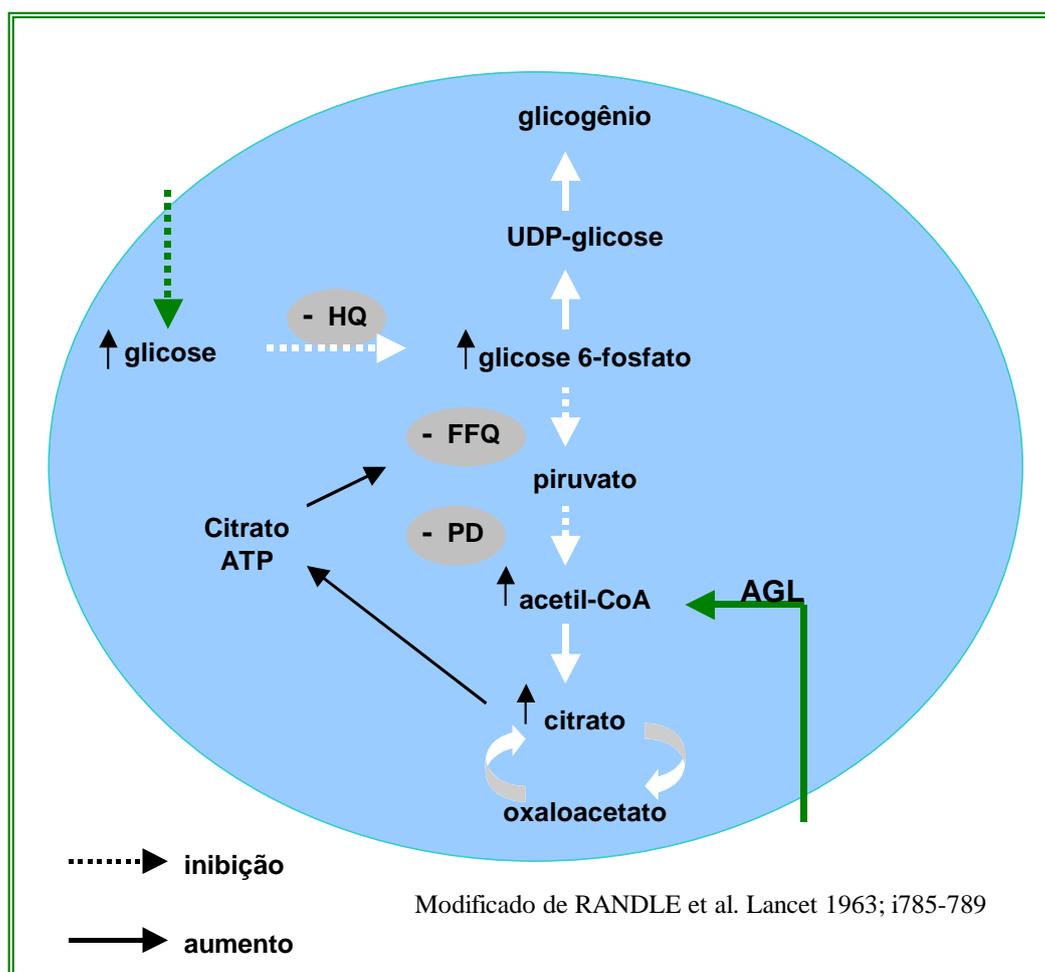


Figura 1. Ciclo glicose-ácido graxo no músculo. HQ: hexoquinase; FFQ: fosfofrutoquinase; PD: complexo piruvato desidrogenase; AGL: ácidos graxos livres.

Em contrapartida, foi relatado que a utilização muscular de AG também pode ser modulada pela concentração de glicose. O malonil-CoA, composto de 3 carbonos derivado da carboxilação do acetil-CoA, é capaz de coordenar a oxidação de AG com a demanda energética. Ele age inibindo alostericamente a carnitina palmitoil transferase-1 (CPT-1), enzima envolvida no transporte de AG de cadeia longa do citosol para a mitocôndria e, desta forma, inibe a oxidação de AG, promovendo a utilização de glicose (Figura 2) (ENRIQUEZ, 2002; DYCK et al, 2004).

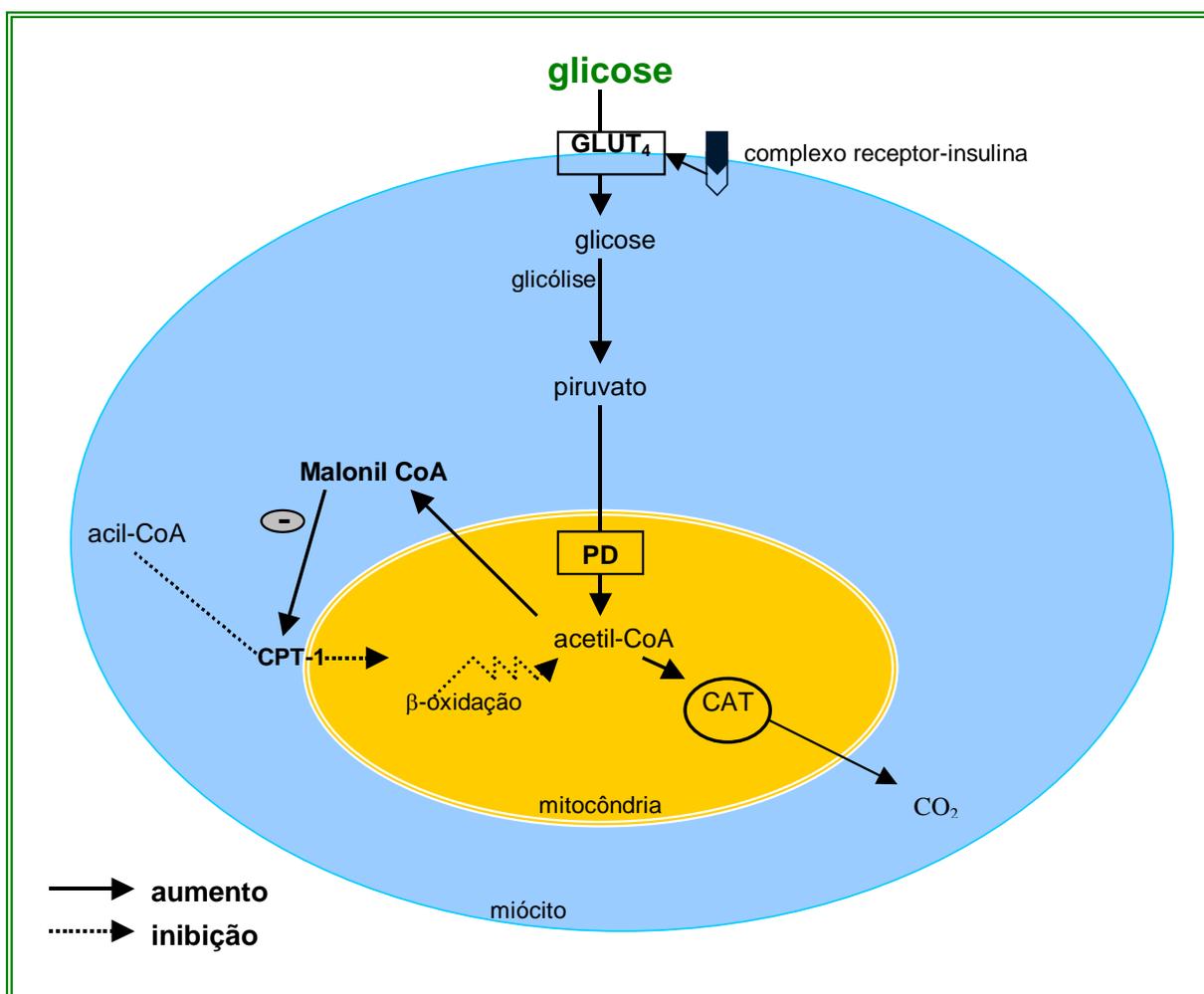


Figura 2. Modulação da utilização celular de AG pelo malonil-CoA. PD: complexo piruvato desidrogenase; CAT: ciclo do ácido tricarboxílico; CPT-1: carnitina palmitoil transferase.

1.2 Metabolismo energético cardíaco

O suprimento energético do coração é alcançado pela utilização conjunta de diferentes substratos, incluindo AG, glicose, lactato, aminoácidos e corpos cetônicos. Sob condições aeróbicas normais, no entanto, os AG e glicose constituem as maiores fontes de energia para o coração, sendo que os AG contribuem com cerca de 70% do suprimento energético (PEDERSEN et al., 1981; DEPRE

et al, 1999; SAMBANDAM et al., 2000; SAMBANDAM & LOPASCHUK, 2003; SCHMIDT et al., 2004; ARMONI et al, 2005).

A glicose utilizada pelo coração é derivada do plasma ou de estoques intracelulares de glicogênio. O transporte de glicose para o interior dos cardiomiócitos ocorre a favor de um gradiente de concentração e é regulado por transportadores específicos, os GLUTs. A isoforma predominante no cardiomiócito adulto é o GLUT4, que é sensível à insulina. Também são encontradas em menores quantidades as isoformas GLUT1 e GLUT3. Uma vez no interior do miócito, a glicose é fosforilada e entra na via glicolítica, da qual origina-se o piruvato, com formação oxidativa e/ou não-oxidativa de ATP. A glicose pode ainda servir de substrato para síntese de glicogênio e ribose nesse tecido (DEPRE et al., 1999).

Os AGL são captados pela célula cardíaca por mecanismo de difusão passiva e/ou facilitada por algumas proteínas, como as FATP's (proteínas transportadoras de AG), as FAT's (translocases de AG), em especial a CD₃₆, e as FABP's (proteínas ligadoras de AG). No interior da célula, os AG são ativados a acil-CoA graxos, transportados para a mitocôndria e oxidados para liberar acetil CoA. No transporte dos AG de cadeia longa para matriz mitocondrial, a enzima CPT-1 assume papel central. Resíduos de CoA do acil- CoA graxo são transpostos com carnitina por ação dessa enzima, presente na membrana mitocondrial externa. Em seguida, por ação de uma translocase, o AG entra na matriz da mitocôndria, dando início ao processo de β -oxidação. A oxidação peroxissomal de AG também contribui para a geração de energia e a enzima acil CoA oxidase (ACO) exerce papel chave nesse processo. A oxidação dos AG nos peroxissomos independe da carnitina, mas os produtos metabólicos dessa organela são disponibilizados, em seguida, para a β -oxidação mitocondrial. O acetil-CoA gerado nesses processos entra, então, no ciclo dos ácidos tricarboxílicos para formar ATP, CO₂ e H₂O

(NÖHAMMER et al, 2000; TOTLAND et al, 2000; HAJRI & ABUMRAD, 2002; SAMBANDAM & LOPASCHUCK, 2003; NIU et al, 2004; AN et al., 2005; KATZ, 2006).

O coração não participa de forma importante da síntese de AG. Sendo assim, este tecido conta com suprimento exógeno, o qual inclui AGL do plasma e AG liberados pela hidrólise de lipoproteínas ricas em TG – os *quilomicra* e lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL). As lipoproteínas constituem as principais fontes de AG para o tecido cardíaco e a enzima lipase lipoprotéica (LPL) exerce papel chave na hidrólise dos TG contidos nessas moléculas. Partículas remanescentes dessas lipoproteínas podem, ainda, ser internalizadas por receptores presentes nos miócitos, processo este que também depende da LPL ativa (AUGUSTUS et al, 2003; PULINILKUNNIL et al., 2003; TEUSINK et al., 2003; NIU et al, 2004; AN et al., 2005) (Figura 3).

A LPL é sintetizada nos cardiomiócitos e secretada como uma enzima dimérica ativa, se liga à superfície dos miócitos e/ou transloca-se para sítios de ligação no endotélio vascular, ancorando-se em cadeias de proteoglicanas heparano sulfato, onde ocorre a hidrólise dos TG (BLANCHETTE-MACKIE et al., 1989; SAXENA et al., 1991). Os ácidos graxos gerados nessa hidrólise podem alcançar os tecidos para oxidação ou esterificação, ou ainda podem ser liberados no plasma, onde se complexam à albumina. A porção de LPL translocada para o endotélio vascular constitui a fração funcional, que responde rapidamente à manipulação nutricional e é liberada pela heparina (PEDERSEN et al., 1981).

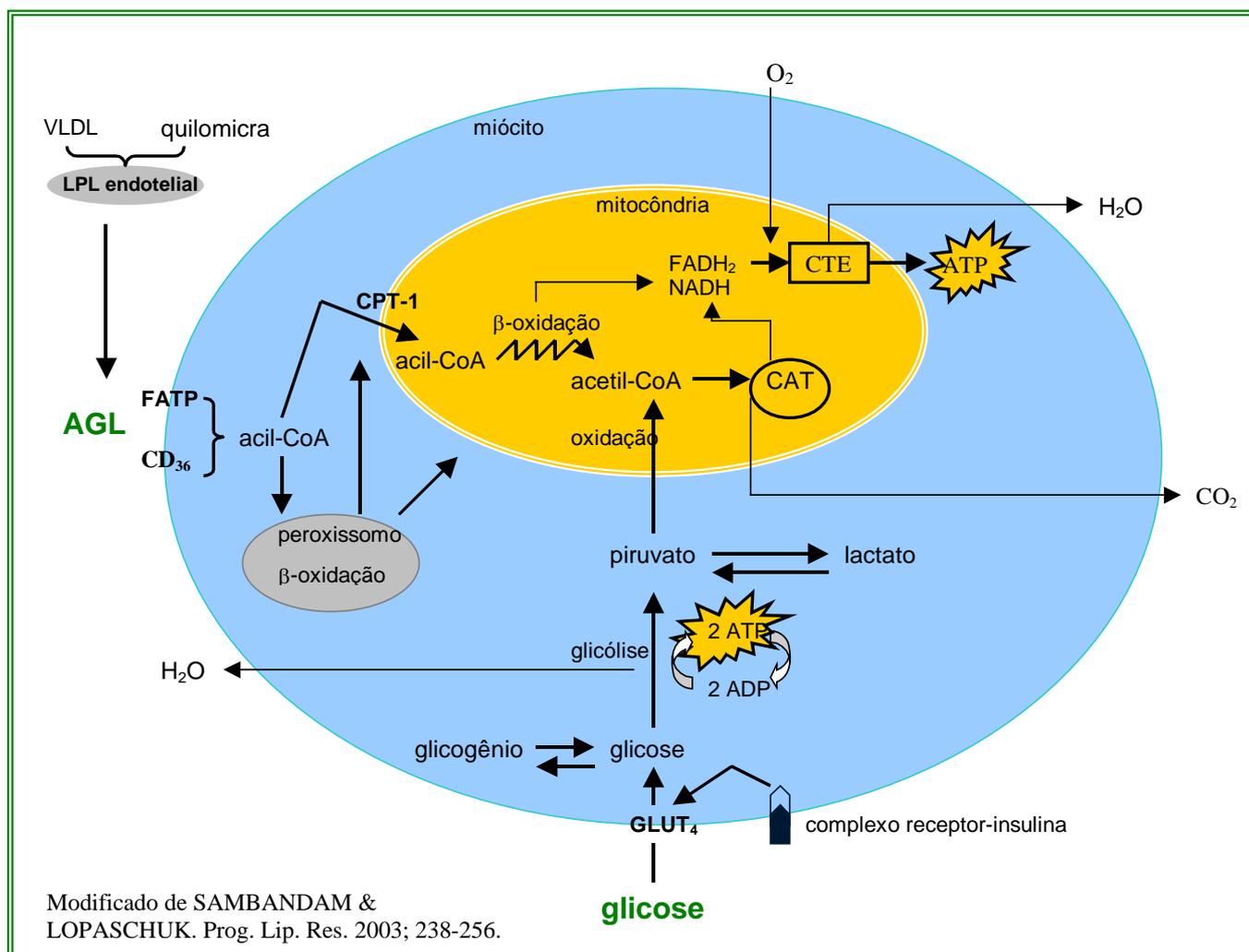


Figura 3. Utilização de substratos energéticos pelo miocárdio. CAT: ciclo dos ácidos tricarboxílicos; CTE: cadeia de transporte de elétrons; AGL: ácidos graxos livres; CPT-1: carnitina palmitoil transferase; VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade; LPL: lipase lipoprotéica; FATP: proteína transportadora de ácidos graxos; CD₃₆: translocase de ácidos graxos.

Considerando a íntima relação entre o metabolismo energético e a performance funcional cardíaca, avaliou-se a no presente estudo a utilização de ácidos graxos e de glicose pelo tecido cardíaco após a administração de dieta contendo ácido orótico.

1.2.1 Metabolismo energético e performance cardíaca

O sistema cardiovascular é de importância vital para o organismo, por estar envolvido em funções homeostáticas particulares como nutrição celular e ação endócrina. Nesse sistema, o coração funciona como um transdutor de energia, convertendo energia química em trabalho mecânico quando o sangue é ejetado, sob pressão, em direção a aorta e artéria pulmonar. Para isso, é necessário um suprimento ininterrupto de substratos e oxigênio ao coração, sob o risco de grave comprometimento funcional em caso de interrupção do fluxo coronariano normal (KATZ, 2006).

O desequilíbrio metabólico cardíaco, por desestabilizar o sistema miocárdico de condução elétrica, contribui para a maior incidência de morbidade e mortalidade entre os seres humanos. Várias pesquisas experimentais e clínicas têm revelado que agentes terapêuticos que otimizam o metabolismo energético cardíaco constituem importante enfoque para o tratamento de disfunções cardíacas.

Dentre os fatores que comprometem a função contrátil durante e após a isquemia miocárdica, o tipo de substrato energético metabolizado pelo coração tem sido bastante estudado. Estudos colocam que o uso excessivo de AG contribui para a disfunção contrátil e injúria isquêmica, parecendo ocorrer como mecanismo secundário à inibição da oxidação aeróbica da glicose no coração. Durante a isquemia cardíaca, o coração adapta-se rapidamente a uma condição de baixo suprimento de oxigênio e nutrientes, com um desvio do metabolismo aeróbico para o anaeróbico. Nessa fase, a via glicolítica que contribui minimamente com a produção de energia para o coração aeróbico (menos que 10%), se torna a principal responsável pelo suprimento de ATP. O fluxo glicolítico é estimulado, em parte, pela ativação da enzima fosfofrutoquinase-1, em virtude do decréscimo na produção energética, aumentando a relação AMP/ATP. No entanto, apesar da via glicolítica se tornar fundamental para a manutenção de um nível crítico de ATP necessário para as funções cardíacas vitais como canais iônicos, função contrátil e integridade celular, essa mudança pode comprometer a eficiência cardíaca durante o período isquêmico e mesmo durante a reperfusão aeróbica subsequente.

Na dependência da severidade e duração da isquemia, há um acúmulo intracelular de lactato e prótons, com conseqüente queda do pH e desequilíbrio iônico. O acúmulo de íons H^+ leva ao aumento intracelular de Na^+ via trocador Na^+ / H^+ , com subseqüente acúmulo intracelular de Ca^{2+} via trocador Na^+ / Ca^{2+} . Isso resulta em menor eficiência das proteínas contráteis, recuperação funcional prejudicada durante a reperfusão e decréscimo da eficiência cardíaca, além de possível morte celular. Durante a reperfusão, o “desarranjo metabólico” tende a se intensificar. A oxidação de AG se recupera e intensifica rapidamente, inibindo a oxidação da glicose. A captação de glicose e a via glicolítica, no entanto, são afetadas em proporção muito menor que a oxidação; com isso, há uma exacerbação do desacoplamento glicólise-oxidação de glicose, com conseqüente aumento do acúmulo de H^+ (RANDLE, 1963; DEPRE, 1999; SAMBANDAM & LOPASCHUK, 2003).

No entanto, o impacto desse rearranjo metabólico relaciona-se com a intensidade e o período em que a isquemia é imposta. O retorno da função contrátil na reperfusão depende, particularmente, da manutenção residual de ATP durante a isquemia e da extensão do acúmulo de produtos glicolíticos. Na isquemia de baixo fluxo, modelo utilizado no presente trabalho, a isquemia é induzida reduzindo-se o fluxo coronariano de forma que o coração não pode sustentar sua atividade contrátil por período prolongado. O fluxo residual, no entanto, é ainda capaz de permitir um suprimento residual de substratos energéticos e a extrusão de parte dos produtos metabólicos finais, como prótons e lactato (DEPRE et al., 1999). É importante frizar que o incremento na produção de ATP pela glicólise ajuda a manter os processos celulares vitais durante a isquemia, melhorando a recuperação da função contrátil pós-isquêmica (ZHU et al., 2000). Segundo KING & OPIE (1998), com a queda do fluxo coronariano, apesar da diminuição da captação absoluta desse metabólito, a taxa de extração cardíaca da glicose aumenta drasticamente. Isso indica uma habilidade do miocárdio para aumentar a sua capacidade de transporte da glicose, de forma a garantir o ATP necessário para a função celular. O conteúdo de glicogênio miocárdico tem se mostrado atuante no prognóstico da isquemia/reperfusão. CROSS et al.

(1996) e FERDINANDY et al. (1998) mostraram que o nível elevado de glicogênio antes de uma isquemia e sua manutenção durante esse processo pode melhorar a função cardíaca pós-isquêmica.

As mudanças metabólicas instaladas durante o processo de isquemia e reperfusão se devem, em grande parte, à modulação pela proteína quinase ativada por AMP (AMPK). Com a produção energética comprometida durante essa fase, a relação AMP/ATP aumenta, resultando na fosforilação e ativação da enzima. A AMPK ativada é capaz de estimular vários mecanismos geradores de energia, ligados tanto ao metabolismo de glicose, quanto de AG, a saber:

- estimula a captação de glicose pelo estímulo da translocação de GLUT₄ para a membrana sarcolemal; aumenta o fluxo glicolítico pelo estímulo das enzimas fosfofrutoquinase-1, via ativação da fosfofrutoquinase-2, e piruvato quinase; aumenta o *turnover* de glicogênio, pelo estímulo conjunto das enzimas glicogênio sintetase e glicogênio fosforilase.

- estimula a captação de AG pelo estímulo da atividade da enzima LPL e da translocase de AG, CD₃₆; aumenta a oxidação de AG, pela remoção da inibição alostérica da enzima CPT-1, visto que diminui a produção de malonil-CoA, através da inibição da enzima acetil CoA carboxilase e provável ativação da enzima malonil-CoA decarboxilase (SAMBANDAM & LOPASCHUCK, 2003; AN et al, 2005).

1.3 Ácido orótico e função cardíaca

O ácido orótico (AO), C₅H₄N₂O₄, é um intermediário da via biossintética das pirimidinas (Figura 4). Para a síntese *de novo* das bases nitrogenadas pirimidínicas, o primeiro passo de conversão hepática do AO no nucleotídeo UMP (uridilato) é catalisado pela enzima orotato fosforibosil transferase, que facilita o ataque de um grupamento ribose e um fosfato, provenientes da hidrólise do PRPP (5-fosforribosil-1-pirofosfato).

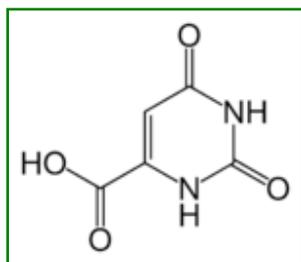


Figura 4. Estrutura química do ácido orótico

O AO é encontrado em baixas concentrações em células nucleadas e em muitos fluidos biológicos e a ingestão deste componente na dieta humana ocorre através do leite bovino (80mg/L) (MORIFUJI & AOYAMA, 2002).

Alguns estudos prévios designaram um extrato solúvel vegetal destilado como vitamina B₁₃, por sua alta capacidade na promoção do crescimento de modelos experimentais (NOVAK & HAUGE, 1948; AUSTIN & BORUFF, 1949; CUNHA et al, 1950). Mais tarde, MANNA & HAUGE (1953) postularam que o AO é um produto de degradação dessa vitamina. No entanto, esses dados ainda são objetos de questionamentos e um trabalho de OTT et al (1958) descaracteriza a propriedade vitamínica do extrato. Embora o AO não seja reconhecido oficialmente como vitamina, seu papel na promoção do crescimento é característico e foi demonstrado, ainda, que esse composto apresenta efeito compensatório sobre a deficiência da vitamina B12 (MANNA & HAUGE, 1953).

Investigações prévias têm revelado que o AO apresenta efeitos cardiovasculares benéficos, melhorando a função miocárdica pós-isquêmica. O mecanismo de ação do AO ainda não foi elucidado, porém é sabido que este elemento interfere em vários processos bioquímicos que envolvem nucleotídeos pirimidina, tais como síntese de RNA, de glicogênio e de fosfolipídeos. (RICHARDS et al., 1997; FERDINANDY et al., 1998). Em estudo realizado por RICHARDS et al (1997), corações pós-infartados tratados com AO apresentaram maior disponibilidade de ATP e, por conseguinte, melhor eficiência pós-isquêmica. Esses autores propõem que o metabolismo hepático do AO propicia

um aumento plasmático de nucleosídeos uridina e citidina. A degradação da uridina a uracil pela uridina fosforilase miocárdica, pode suprir o tecido com a ribose necessária para as reações de recuperação e/ou síntese *de novo* de nucleotídeos purina. KYPSON e colaboradores (1978) e AUSSEDAT (1983) sugeriram que a síntese de ATP e nucleotídeos adenina totais pode ocorrer por estímulo da captação de glicose, via uridina, e conseqüente glicólise para produção anaeróbica de energia. FERDINANDY e colaboradores (1998) mostraram que o tratamento com AO em ratos aumentou o conteúdo de glicogênio de corações normóxicos e isquêmicos, com significativa melhora da função miocárdica pós-isquêmica.

Diante do exposto, objetivamos investigar a existência de alterações em vias metabólicas envolvidas no suprimento energético cardíaco, em ratos suplementados com o ácido orótico.

2.0 OBJETIVOS

O objetivo principal foi verificar a influência do ácido orótico sobre o metabolismo energético cardíaco em ratos.

2.1 Objetivos Específicos

Foi investigado o efeito da administração dietética do ácido orótico sobre os parâmetros metabólicos e funcionais cardíacos, em condições normóxicas e isquêmicas:

2.1.1 A utilização de substrato lipídico pelo tecido cardíaco e as vias metabólicas envolvidas nesse processo. Para alcançar esse objetivo, foram determinadas:

- a atividade da enzima LPL presente no tecido cardíaco, perfusato cardíaco e plasma;
- a captação e a incorporação tecidual de ácidos graxos (AG);
- as expressões dos genes para o receptor alfa ativado por ploriferadores de peroxissomos (PPAR α) e para as enzimas carnitina palmitoil transferase-1 (CPT-1) e acil CoA oxidase (ACO);
- as concentrações séricas de triglicerídios (TG), AG, colesterol e glicerol.

2.1.2 A utilização de glicose pelo tecido cardíaco e as vias metabólicas envolvidas nesse processo. Para alcançar esse objetivo, foram determinadas:

- a expressão tecidual da proteína GLUT $_4$;
- a captação e a incorporação tecidual de glicose;
- as concentrações cardíacas dos intermediários metabólicos glicose 6-fosfato (G 6-P), frutose 6-fosfato (F 6-P) e lactato;
- o conteúdo de glicogênio cardíaco.

2.1.3 O rendimento energético tecidual. Para alcançar esse objetivo, foi determinada, além do exposto acima, a concentração cardíaca de ATP.

2.1.4 A performance cardíaca. Para alcançar esse objetivo, foram determinados os índices de contratilidade - frequência cardíaca, tensões sistólica e diastólica ventriculares, dT/dt (máxima e mínima) - e o fluxo coronariano.

3.0 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e seu tratamento

Foram utilizados ratos Wistar machos, pesando cerca de 200g, provenientes do centro de bioterismo da UFMG (CEBIO), os quais foram mantidos em gaiolas individuais, em ambiente com ciclo de luz controlado (14 horas luz, das 6 às 20h) e temperatura constante ($23 \pm 3^\circ\text{C}$).

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais:

- 1) C - alimentado com dieta controle;
- 2) AO - alimentado com dieta C contendo ácido orótico a 1 %.

A dieta controle preparada em nosso laboratório foi adaptada de KETTELHUT, FOSS & MIGLIORINI (1980), conforme tabela 1. As dietas experimentais foram administradas *ad libitum* durante 9 dias, após 2 dias de adaptação, e os animais tiveram livre acesso a água.

Tabela 1. Composição básica da dieta controle:

Dieta controle (% de peso)	
Proteína	18
Lipídio	7
Carboidrato	58
Minerais	4
Vitaminas	1
Umidade	12

Os grupos estudados tiveram suas ingestões alimentares de 24 horas determinadas durante nove dias consecutivos, e seus pesos corporais foram determinados no primeiro e último dias de submissão às referidas dietas. No décimo primeiro dia de experimento, os ratos foram sacrificados por decapitação, por volta das 14hs, e os corações foram removidos, pesados e utilizados imediatamente ou congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C, para posteriores análises bioquímicas. Os sangues foram coletados para obtenção de soro e armazenados à - 20°C.

3.2 Metodologia

3.2.1 Perfusão cardíaca

Os corações foram canulados via aorta ascendente conforme técnica de *Langendorff* para coração isolado de rato, adaptada por GOES et al. (1993). Esse sistema consiste de um tubo de vidro de aproximadamente 12 mm de diâmetro e 90 cm de altura, com uma pequena cânula conectada a extremidade inferior. Um reservatório contendo solução nutritora é ligado ao tubo e fica sobre um suporte regulável, o qual permite o ajuste da pressão de perfusão, mantida constante a 65mmHg durante todo o experimento. O tubo de vidro fica envolto em uma jaqueta de água em circulação, aquecida a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$. O sistema de oxigenação utilizado possibilita o borbulhamento de mistura carbogênica – 95% de O₂ e 5% de CO₂ – na solução nutritora.

A solução nutritora utilizada na perfusão dos corações foi a solução de Krebs-Ringer (solução K-R), conforme composição descrita na tabela 2 abaixo, acrescida de 1% de albumina (BSA).

Tabela 2. Composição final da solução Krebs-Ringer:

Composto	Concentração em mM
Na Cl	118,41
KCl	4,69
KH ₂ PO ₄	1,17
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,17
CaCl ₂ .2H ₂ O	2,51
Dextrose anidra (glicose)	11,65
NaHCO ₃	26,24

Considerando que o uso de anestésicos pode induzir o aparecimento de arritmias, inclusive de reperfusão, por alterar o metabolismo celular dos animais (GOES et al., 1993), os animais foram decapitados e toracotomizados rapidamente, retirando-se o coração em bloco. Após retirado, o coração foi colocado em um béquer contendo solução nutritora à temperatura ambiente, sendo realizada fraca pressão com os dedos para vazão do sangue contido nas câmaras cardíacas. Em seguida, o coração foi transferido para uma placa de Petri contendo solução nutritora fria ($\cong 4^{\circ}\text{C}$) e oxigenada. O resfriamento tem por objetivo diminuir o metabolismo miocárdico na fase anterior a canulação do coração.

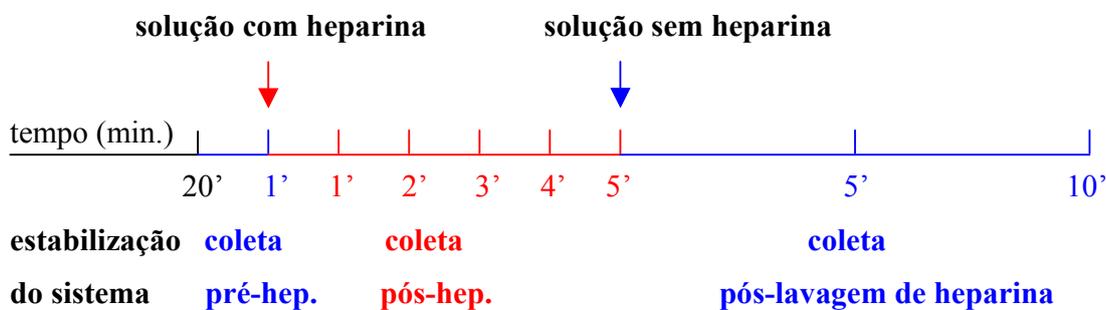
Após a canulação da aorta, aguardou-se 20 min. para estabilização do sistema.

Os modelos experimentais foram submetidos, em alguns casos, à isquemia/reperfusão. A montagem dos corações seguiu a técnica descrita por JOHNS & OLSON (1954) e LUBBE et al. (1978), com oclusão parcial da artéria coronária esquerda, já que a maioria dos casos clínicos de isquemia envolve uma forma de oclusão parcial da coronária com fluxo residual (KING et al, 2001). O sucesso da operação foi confirmado pela queda imediata do fluxo coronariano.

Para introdução de heparina, em protocolo de medida da atividade da LPL presente em perfusato cardíaco, todo o tubo foi desprovido da solução nutritora original. Rapidamente, nova solução nutritora contendo 5UI/ml de heparina foi introduzida no sistema. Para o retorno da sç. original, na lavagem da heparina, procedeu-se da mesma forma.

A coleta dos perfusatos cardíacos obedeceu os seguintes esquemas (Figura 5):

- Corações intactos:



- Corações submetidos à oclusão/reperfusão:

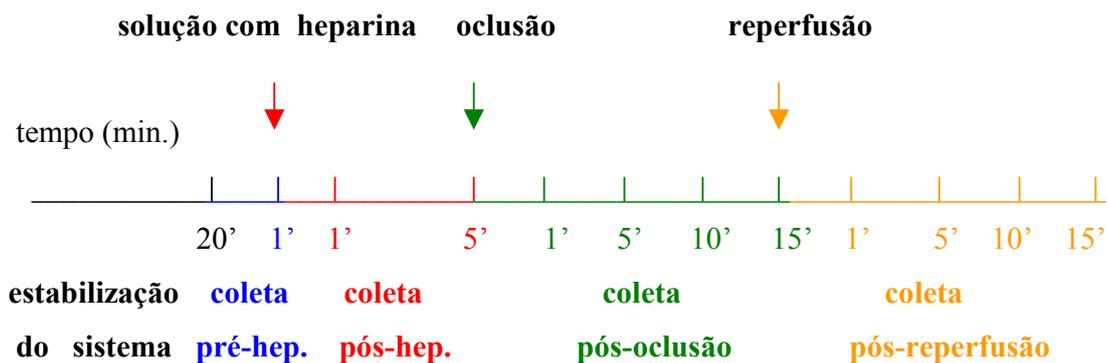


Figura 5. Protocolo de perfusão cardíaca

Após coletados, os perfusatos e os ventrículos dos corações perfundidos foram imediatamente imersos em nitrogênio líquido e estocados em freezer -80°C para posteriores dosagens. Esse protocolo foi utilizado nas dosagens da atividade da LPL liberável pela heparina, das expressões dos genes para $\text{PPAR}\alpha$, CPT-1 e ACO, da expressão da proteína GLUT_4 e para determinação dos metabólitos glicose-6-fosfato, frutose-6-fosfato, ATP, lactato e glicogênio.

Foram realizadas também as análises dos parâmetros cardíacos. A força de contração era medida através de um anzol fixado ao ápice do coração e conectado ao transdutor de força. A frequência cardíaca (FC) e dT/dt , sendo a velocidade de desenvolvimento de força, originavam-se da onda de força gerada. A aquisição dos sinais foi realizada por um sistema de conversão analógico-digital, os quais eram enviados a um amplificador (Biopac System, Santa Bárbara, USA) e, em seguida, registrados em um microcomputador com sistema de aquisição de dados. O fluxo coronariano foi determinado a cada cinco minutos, nos períodos basal, de isquemia e de reperfusão.

3.2.2 Medida da atividade da lipase lipoprotéica

A lipase lipoprotéica (LPL) é uma glicoproteína dimérica, cujas características funcionais mais importantes são: possuir um pH ótimo de ação alcalino (8,0 – 8,5), ser inibida por NaCl 1 M e requerer um cofator específico para manifestar sua atividade, a apolipoproteína C-II (Apo-CII). O ensaio da atividade enzimática da LPL baseia-se no método de NILSSON-EHLE & SCHOTZ (1976) e se fundamenta na reação:



Os ácidos graxos liberados (^3H -oleato) são separados pela utilização de um sistema de partição líquido-líquido e uma alíquota dos AGL situados na fase superior polar, é removida para a determinação da radioatividade correspondente. O grau de hidrólise é diretamente proporcional à atividade da enzima.

Para determinação da atividade da LPL total, tecidos cardíacos intactos foram homogeneizados em tampão Tris-HCL (pH 8,3) contendo detergentes, centrifugados a 2500 rpm por 15 minutos e as camadas intermediárias, abaixo das camadas gordurosas, foram utilizadas para a medida da atividade enzimática.

Uma emulsão-substrato foi preparada com trioleína fria e $[9,10^3\text{H}]$ trioleato e estabilizada com lecitina. Os lipídios foram sonicados com glicerol a 4°C durante 5 min. No dia do experimento foi preparada a mistura de reação, contendo 2 partes de tampão LPL (Tris 0,2M - pH 8,3, 6 % de albumina bovina livre de ácidos graxos e cloreto de sódio 0,15M), 2 partes de emulsão-substrato e 1 parte de soro de rato em jejum por 24 horas como fonte de Apo-CII. Após 45 min. de incubação, foram adicionados 3,25 ml da mistura de extração clorofórmio-heptano-metanol, 1,25 : 1,1 : 1,41 (BELFRAGE & VAUGHAN, 1969) e em seguida 1,05 ml de tampão carbonato-borato 0,1M pH 10,5, sob agitação em vortex. Os tubos de ensaio foram centrifugados à temperatura ambiente por 10 minutos e uma alíquota de 0,1 ml da fase aquosa superior foi colocada em 1,6 ml de coquetel de cintilação (tolueno-triton-PPO-POPOP), para quantificação de radioatividade por espectroscopia de cintilação líquida.

Para as amostras líquidas - plasma e perfusato cardíaco – seguiu-se o mesmo procedimento acima, com a incubação, porém, de 100 μl de cada amostra (NILSSON-EHLE & SCHOTZ, 1976).

O cálculo da atividade enzimática obedeceu a seguinte fórmula:

- para LPL tecidual (nmoles de AG liberados . mg de tecido cardíaco⁻¹ . min.⁻¹):

$$\frac{\text{CPM amostra}}{\text{ativ. específica AG}} \times \frac{1}{\text{tempo}} \times \frac{100}{70} \times \frac{\text{vol. fase superior}}{\text{vol. amostra}} \times \frac{\text{vol. total do homogenato}}{\text{vol. homogenato usado} \times \text{peso tecido}}$$

- para LPL presente em plasma e perfusato (nmoles de AG liberados . ml de perfusato [ou plasma⁻¹ . min.⁻¹):

$$\frac{\text{CPM amostra}}{\text{ativ. específica AG}} \times \frac{1}{\text{tempo}} \times \frac{100}{70} \times \frac{\text{vol. fase superior}}{\text{vol. amostra}} \times \frac{1}{\text{vol. perfusato (ou plasma) usado}}$$

3.2.3 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RCP-TR)

3.2.3.1 Extração do RNA total

Para análise da expressão gênica do fator de transcrição PPAR α e das enzimas CPT-1 e ACO, fragmentos de tecido cardíaco foram homogeneizados com com TrizolTM (Life Technologies), conforme protocolo do fabricante. O homogenato foi transferido para um microtubo e deixado à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 200 μ l de clorofórmio, misturando-se vigorosamente por cerca de 20 segundos e, novamente, deixou-se em repouso à temperatura ambiente por 3 minutos. O homogenato foi centrifugado a 12.000 rpm, a 4°C, por 15 minutos, para separação de fases (Figura 6).

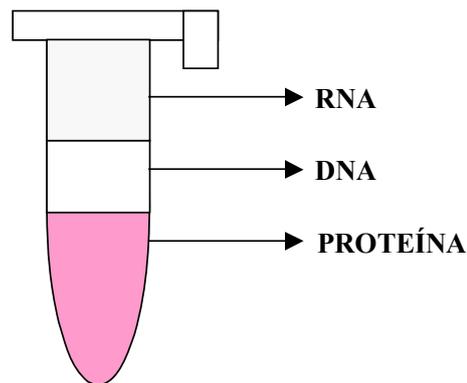


Figura 6. Separação de fases

A fase aquosa sobrenadante foi cuidadosamente transferida para outro microtubo. Em seguida, foram acrescentados 500 μl de isopropanol, deixando-se em repouso por 10 minutos, à temperatura ambiente. Nova precipitação foi, então, realizada a 12.000 rpm, a 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o *pellet* resultante foi ressuscitado em 1 ml de etanol a 70%. Após 5 minutos de centrifugação a 9.500 rpm, a 4°C, descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi seco à temperatura ambiente, ressuscitado em 60 μl de água DEPC (dietilpirocarbonato) e incubado a 55°C, por 10 minutos, para melhor dissolução do RNA.

As concentrações do RNA total foram determinadas pela leitura da densidade óptica, em espectrofotômetro *GeneQuant*. Aliquotas do RNA total foram diluídas 50 vezes em água DEPC estéril, filtrada a 0,22 μm , para quantificação em cubeta de quartzo específica. As leituras foram realizadas nos comprimentos de ondas de 260 nm para ácido nucléico e 280 nm para contaminantes protéicos. A relação entre essas leituras demonstrou uma razão maior que 1,6, garantindo a qualidade do RNA obtido, segundo as exigências vigentes para a biologia molecular. Para o cálculo da concentração de RNA na amostra, utilizou-se a seguinte fórmula, onde DO significa densidade óptica:

$$[\text{RNA em } \mu\text{g}/\mu\text{L}] = \text{DO } (\lambda = 260 \text{ nm}) \times \text{FATOR DE DILUIÇÃO} \times 40 / 1000$$

3.2.3.2 Tratamento com DNase

Inicialmente foi preparado um mix contendo o tampão para RCP, MgCL₂ a 50mM e a DNase, tendo o cuidado de adicionar a enzima no último momento. Em outros microtubos foram pipetadas as amostras de RNA e água DEPC, conforme cálculo prévio (para cada 1 µg de amostra, utiliza-se 3,81 µl de água). Em seguida, foram adicionados 5,2 µl do mix/µg de amostra, deixando-se em repouso à temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, a DNase foi inativada pelo acréscimo de 1 µl de EDTA a 2,5 mM, aquecendo-se à 65° C, por 10 minutos. Após esse procedimento, as amostras foram mantidas em gelo por 1 minuto.

3.2.3.3 Retro Transcrição (RT)

A reação de transcrição reversa foi realizada segundo protocolo previamente descrito por MARTINS et al (1995), com pequenas alterações. Resumidamente, 2 µg de RNA total tratado com DNase foram utilizados para a síntese do DNA complementar (cDNA). Em cada reação, adicionou-se às amostras de RNA 12 µl do tampão de reação/µg de amostra, contendo 3 µl do primer universal (RH) e 3 µl das bases nitrogenadas (dNTP), além de 1 µl da enzima RNAsim, que inibe a RNase, e 2 µl da enzima transcriptase reversa (MLV). A transcrição reversa foi realizada a 37°C por 60 minutos e o cDNA foi, posteriormente, armazenado à -20°C.

3.2.3.4 Seleção de oligonucleotídeos iniciadores para RCP em tempo real

As seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) dos genes-alvo para RCP-TR estudados foram selecionados através da análise das seqüências de mRNAs, depositadas no *genebank* e acessadas através do programa BLASTn do National Center for Biotechnology Information-(NCBI). Os amplicons alvos foram selecionados e analisados através da ferramenta *PrimerQuest*, disponível no

IDT SciTools (*Integrated DNA technologies*). A partir da análise de homologia entre as seqüências dos mRNAs do PPAR α , CPT-1, ACO e β -actina, obteve-se as respectivas regiões-alvo para a confecção dos pares de oligonucleotídeos iniciadores específicos (tabela3).

Tabela 3. *Primers* para RCP em tempo real

Gene	Primer	Sequência
β Actina	Senso	5'-ggttccgatgccctgaggctc-3'
	Antisenso	5'-tgctccaaccaactgctgtcgc-3'
PPAR α	Senso	5'- taccactatggagtccacgcatgt- 3'
	Antisenso	5'- ttgcagcttcgatcacactgtcgc- 3'
Carnitina palmitoil transferase 1	Senso	5'- acgtgagtgactgggtggaagaat-3'
	Antisenso	5'- tctccatggcgtagtagttgctgt- 3'
Acil-Coa oxidase	Senso	5'- atctctgtggtgctgtggagtca-3'
	Antisenso	5'- tctggatgcttctctccaaggt-3'

3.2.3.5 RCP em tempo real

Para a reação de RCP em tempo real, foi utilizado o kit *SYBR GREEN PCR core Reagents* da PE Biosystems (No. Cat. 4304886; Warrington, UK). Utilizou-se um protocolo básico mantendo as concentrações usuais de reagentes num volume final de reação de 25 μ l. A reação consistiu-se de 19 μ l do mix *SYBR Green PCR*, 4 μ l de *primer mix* (1 pmol de cada primer analisado – senso e anti-senso) e 2 μ l de cDNA da reação de transcrição reversa. Os controles negativos foram feitos substituindo-se as amostras pelo mesmo volume de água na reação. A reação em tempo real foi realizada no aparelho *ABI Prism 7000 SDS* no seguinte ciclo termal: [estágio 1] um ciclo de 50°C/2 min.; [estágio 2] um ciclo a 95°C/10 min.; [estágio 3] 40 ciclos de 95°C/0,15 min. e 60°C/1 min.

Para a análise da expressão dos genes-alvo no tecido cardíaco, utilizou-se o método semi-quantitativo delta delta CT, segundo o modelo matemático desenvolvido por PTAFFL (2001). O valor de CT (*threshold cycle*) representa o momento da reação de RCP em que a fluorescência de determinada amostra é detectada inequivocamente acima do ruído de fundo (*background*). O resultado foi expresso em unidades arbitrárias. O modelo matemático utilizado para a obtenção das unidades arbitrárias para essa análise foi:

- 1- Subtração do valor de CT do gene-alvo pelo CT da β -actina (Δ CT);
- 2- média do Δ CT das amostras;
- 3- Δ CT de cada amostra – a média do Δ CT do grupo controle ($\Delta\Delta$ CT);
- 4- elevação negativa do $\Delta\Delta$ CT na base 2 = $2^{-\Delta\Delta$ CT

3.2.4 Análise semi-quantitativa do transportador de glicose (GLUT₄) por *western blot*

Fragmentos de tecido cardíaco ventricular foram homogeneizados em tampão de lise contendo inibidores de proteases e posteriormente centrifugados (2500 rpm, 20 min, 4°C) para remoção do infranadante. As proteínas contidas no infranadante foram quantificadas através do método de BRADFORD (1976).

A eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS) foi realizada de acordo com o método descrito por LAEMMLI (1970). Cinquenta μ g de proteína das amostras foram aquecidas a 98°C por 5 min e aplicadas em gel de poliacrilamida a 10%. Na lateral do gel foi aplicado o padrão de peso molecular (20 – 200 kDa), sabendo-se que o GLUT₄ possui um peso molecular de, aproximadamente, 54kDa. A eletroforese foi realizada numa cuba de acrílico, contendo tampão de corrida (Tris-HCl 25mM, SDS 0,1%), sob 100 Volts, por 2 horas. As proteínas foram transferidas

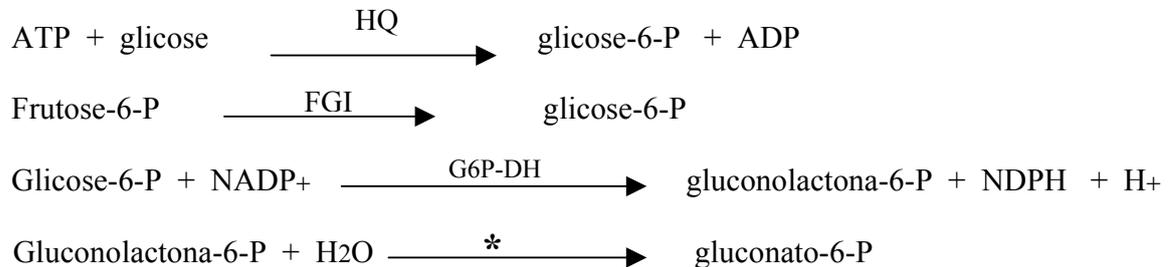
eletroforeticamente (tampão: Tris-HCl 25mM, glicina 192mM, metanol 20%) para uma membrana de nitrocelulose, sob 100 Volts, por 1,5hora. Em seguida, as membranas foram bloqueadas para as ligações não específicas com tampão contendo leite desnatado a 5% em TBS-T 1x, por 1 hora. Após, as membranas foram incubadas com anticorpo primário para GLUT₄, por 3h a 37°C e sob agitação constante. As membranas foram lavadas novamente com TBS-T 1x e incubadas com anticorpo secundário (anti-coelho) por 1 hora e, posteriormente, foram lavadas.

Finalmente, foi realizada a revelação quimioluminescente utilizando ECL *plus* (Amersham). Após a identificação das bandas referentes a proteína GLUT₄, foi feita, na mesma membrana, a identificação das bandas referentes a β-actina, que foi utilizada como controle endógeno. Para isso, foi feito o “stripping” da membrana, que consiste na retirada dos anticorpos da superfície da mesma, e a incubação por 1 hora com anticorpo primário, para a proteína β-actina. As membranas foram, então, lavadas com TBS-T 1x e incubadas com anticorpo secundário (anti-camundongo) por 1 hora e após, lavadas novamente. Posteriormente, foi realizada a revelação quimioluminescente utilizando ECL *plus* (Amersham). As bandas imuno-reativas foram quantificadas por densitometria no programa Image J quant, da National Institute of Health, USA. Os resultados foram expressos a partir da relação GLUT₄/β-actina em unidades de densidade relativas.

3.2.5 Análises bioquímicas

Os intermediários glicolíticos, glicose-6-fosfato e frutose-6-fosfato, bem como o ATP e glicogênio cardíacos, foram dosados no coração após a extração com ácido perclórico, conforme método de HOROST (1973). Os compostos glicose-6-fosfato, frutose-6-fosfato (“Michel” *in* BERGMAYER, 1988) e ATP (“Trautschold, Lamprecht, Schweitzer” *in* BERGMAYER, 1989) foram

medidos, indiretamente, em espectrofotômetro a 340 nm, pela formação enzimática do metabólito gluconato-6-fosfato. O método fundamenta-se nas reações enzimáticas:



onde:

HQ = hexoquinase

FGI = fosfoglicose isomerase

G6P-DH = glicose 6-P desidrogenase

* = reação não-enzimática.

O cálculo para determinação do conteúdo dos metabólitos cardíacos (nmol/g tecido) é apresentado a seguir:

$$\text{(ex): } \frac{\text{abs.1} - \text{abs.0}}{6,22 \text{ (constante)}} \times \frac{3 \text{ ml (vol. do ác. de extração)}}{\text{vol. pós-acerto do pH}} \times \frac{1000 \text{ (vol. da cubeta)}}{\text{vol. da amostra}} \times \frac{1}{\text{peso}} \times 1.000$$

onde:

G 6-P = absorbância 1 (enzima 1) - absorbância 0 (sem enzima)

F 6-P = absorbância 2 (enzima 2) - absorbância 1

ATP = absorbância 3 (enzima 3) - absorbância 2

O conteúdo total de glicogênio cardíaco foi quantificado pelo método da antrona (HASSID, 1957). Os triglicerídios (TG), colesterol e glicerol no soro foram quantificados por kit enzimático (KATAL, Belo Horizonte, MG), e os (AGL) foram avaliados com o emprego de kit da WACO

Chemicals (Richmond, VA). Para dosagem do lactato presente no perfusato cardíaco, foi utilizado um analisador por método enzimático de glicose e lactato oxidase (Glucose analyser YSI 300 Plus).

3.2.6 Medida da captação e da incorporação de substratos energéticos

Para medida da utilização de substratos energéticos, realizou-se uma adaptação das técnicas descritas por GOLFMAN et al (2005) e NIU et al (2004).

A perfusão cardíaca seguiu o protocolo descrito anteriormente, com algumas modificações. Durante a estabilização, os corações foram perfundidos no modo Langendorff não recirculante, com solução nutritora K-R contendo BSA a 1%. Em seguida, o sistema foi desviado para o modo recirculante, com a introdução de nova solução contendo os substratos radioativamente marcados, conforme protocolos:

3.2.6.1 Captação e incorporação de ácido graxo marcado

Para confecção da lipoproteína marcada, utilizou-se uma adaptação da técnica descrita por FARAJ & CIANFLONE (2004). Uma emulsão-substrato foi preparada com trioleína fria e [9,10³H] trioleato e estabilizada com lecitina. Os lipídios foram sonicados com tampão aquoso (Tris-HCL), a 4⁰C durante 5 minutos. A emulsão-substrato foi adicionada ao reservatório de solução nutritora para uma concentração final de 0,4mM de TG.

Após 15 minutos de estabilização, a solução nutritora original foi removida e, rapidamente, nova solução nutritora contendo ³H-trioleína (15μCi/L) e desprovida de glicose foi introduzida no sistema. Aliquotas de 1ml de perfusato foram coletadas a intervalos de 10 minutos, por 30 minutos (Figura 7).

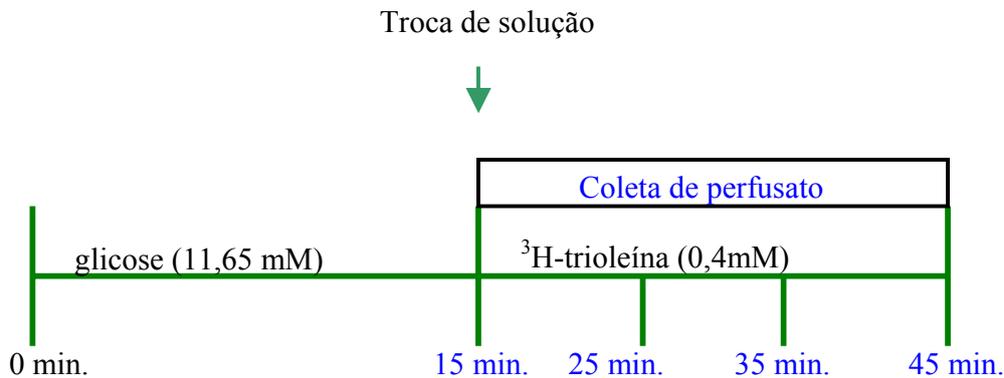


Figura 7. Protocolo de perfusão com ³H-trioleína.

3.2.6.2 Inter-relação entre a captação e a incorporação de AG e glicose marcados

Após 15 minutos de estabilização, todo o tubo foi desprovido da solução nutritora original. Rapidamente, nova solução nutritora contendo [U-¹⁴C] glicose (10 μ Ci/L), insulina (40 μ U/ml) e ³H-trioleína (15 μ Ci/L) foi introduzida no sistema. Alíquotas de 1ml de perfusato foram coletadas, a intervalos de 10 minutos, por 30 minutos. (Figura 8)

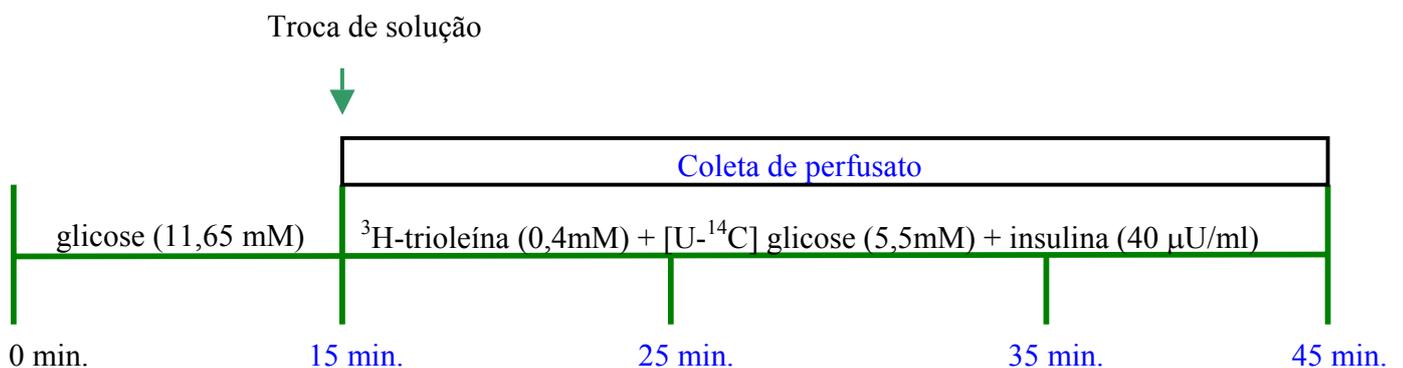


Figura 8. Protocolo de perfusão com ³H-trioleína e [U-¹⁴C] glicose

3.2.6.3 Medida da captação e da incorporação de AG e glicose marcados

A determinação da captação cardíaca dos substratos energéticos foi realizada, indiretamente, através da medida da queda desses componentes na solução nutridora recirculante, durante trinta minutos. A incorporação dos substratos foi avaliada diretamente em fragmentos de ventrículos cardíacos.

Alíquotas de 1 ml de perfusato e amostras de tecido cardíaco pós-perfusão foram sujeitas à extração lipídica, segundo FOLCH et al (1957), com clorofórmio:metanol 2:1 (v/v). A captação e incorporação de AG foram medidas na fase infranadante orgânica dos extratos de FOLCH, enquanto a captação e incorporação de glicose foram determinadas na fase aquosa superior. As amostras foram pipetadas em coquetel de cintilação para quantificação de radioatividade por espectroscopia de cintilação líquida, utilizando tolueno-PPO para as amostras orgânicas e tolueno-triton-PPO-POPOP para as amostras inorgânicas.

Os cálculos de captação e incorporação dos substratos energéticos foram feitos como segue:

- captação de glicose (nmoles . min.⁻¹):

$$\frac{\text{CPM amostra}}{\text{ativ. específica glicose}} \times \frac{1}{\text{tempo}} \times \frac{100}{40} \times \frac{\text{fase superior}}{\text{vol. amostra}} \times \frac{1}{\text{vol. perfusato usado}}$$

- captação de AG (nmoles . min.⁻¹):

$$\frac{\text{CPM amostra}}{\text{ativ. específica AG}} \times \frac{1}{\text{tempo}} \times \frac{100}{60} \times \frac{\text{fase infranadante}}{\text{vol. amostra}} \times \frac{1}{\text{vol. perfusato usado}}$$

- incorporação de glicose (nmoles . min.⁻¹ . peso tecido em g⁻¹):

$$\frac{\text{CPM amostra}}{\text{ativ. específica glicose}} \times \frac{1}{\text{tempo}} \times \frac{100}{40} \times \frac{\text{fase superior}}{\text{vol. amostra}} \times \frac{\text{vol. total do homogenato}}{\text{vol. homogenato usado} \times \text{peso tecido}}$$

- incorporação de AG (nmoles . min.⁻¹ . peso tecido em g⁻¹):

$$\frac{\text{CPM amostra}}{\text{ativ. específica AG}} \times \frac{1}{\text{tempo}} \times \frac{100}{60} \times \frac{\text{fase infranadante}}{\text{vol. amostra}} \times \frac{\text{vol. total do homogenato}}{\text{vol. homogenato usado} \times \text{peso tecido}}$$

3.2.7 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Para comparação entre as diferentes condições de perfusão cardíaca, no mesmo grupo, foi utilizada a análise de variância - ANOVA one way - seguida do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. A comparação entre dois grupos utilizou o teste “t de Student” não pareado.

O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

4.0 RESULTADOS

4.1 Ingestão alimentar, ganho de peso corporal e peso tecidual

Conforme exposto na Tabela 4, não foram observadas diferenças na ingestão alimentar de 24 horas, na evolução ponderal e peso do tecido cardíaco entre os grupos analisados.

Tabela 4. Ganho de peso corporal, ingestão alimentar diária e peso do tecido cardíaco dos grupos C e AO.

Grupo	Ingestão alimentar diária (g)	Ganho de peso corporal (g)	Peso do coração (g/100g de peso corporal)
C	21 ± 0,7 (n=4)	61 ± 8,8 (n = 4)	0,4 ± 0,02 (n=6)
AO	22 ± 1,2 (n=4)	58 ± 5,9 (n = 5)	0,4 ± 0,01 (n=5)

Os dados representam média ± erro padrão da média. “n” representa o número de animais.

4.2 Parâmetros séricos

A Figura 9 mostra os níveis séricos de TG, colesterol, AGL e glicerol dos grupos estudados.

A administração dietética de AO reduziu as concentrações séricas pós-absortivas de TG e colesterol, com uma redução da ordem de 81% e 52%, respectivamente, em relação ao grupo controle.

A concentração de AGL no soro dos animais AO mostrou-se elevada (aumento de 44%), comparada aos controles. No entanto, não foi observada variação nos valores de glicerol entre os grupos analisados.

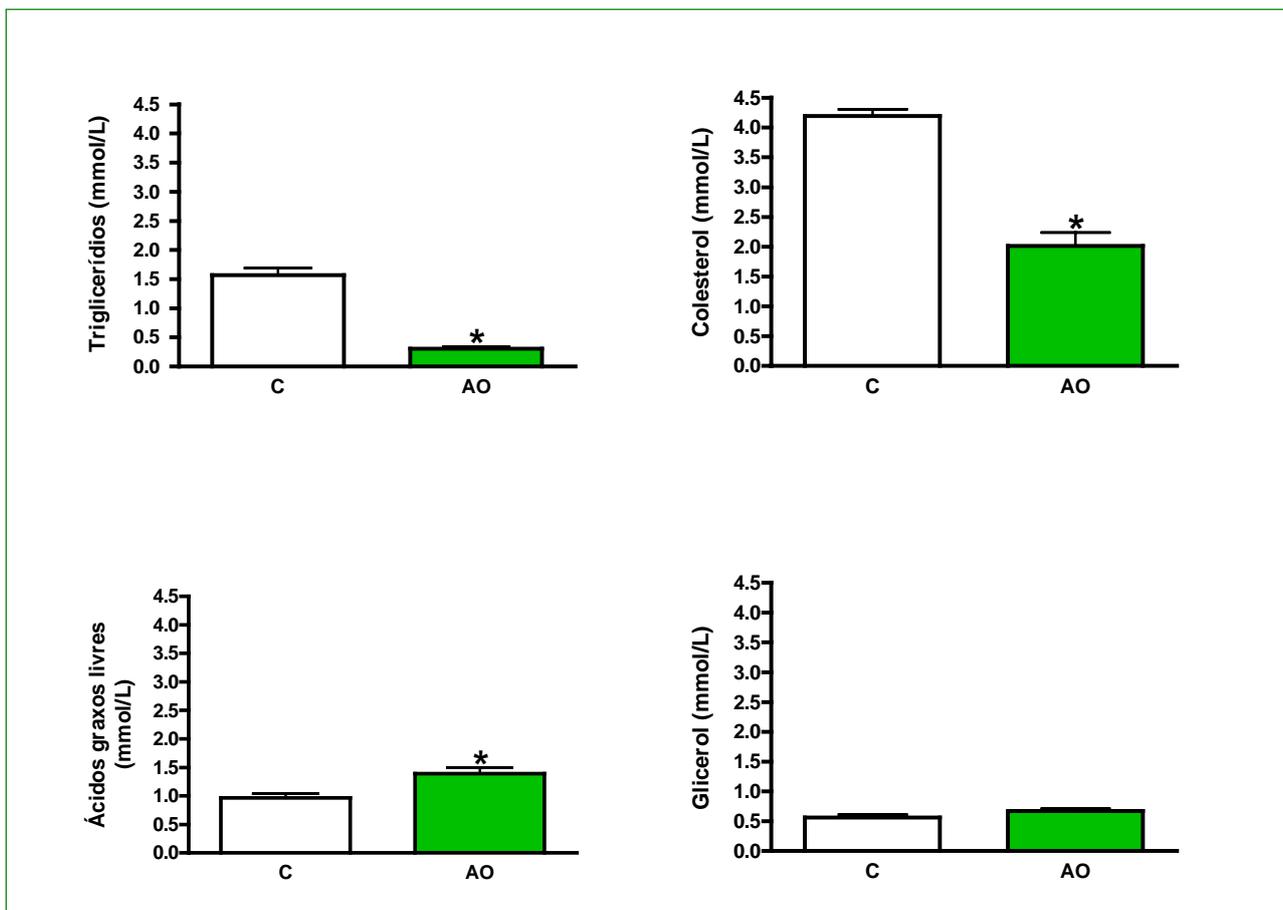


Figura 9. Concentrações de triglicerídios (n = 6), colesterol total (n = 7), ácidos graxos livres (n = 10 – 12) e glicerol (n = 6) presentes no soro dos grupos C e AO. Os dados representam média \pm erro padrão da média. * p < 0,05 vs C.

4.3 Atividade da enzima lipase lipoprotéica

A atividade da enzima LPL no plasma mostrou-se similar nos grupos analisados (Figura 10).

Conforme referido anteriormente, a enzima LPL cardíaca ativa pode ser encontrada em polos distintos no tecido:

- localizada em sítios de ação na superfície luminal do endotélio vascular, dita LPL funcional, ou na superfície dos miócitos, sendo que nesses casos a enzima é ancorada em cadeias de proteoglicanas heparano sulfato. A LPL pode se localizar, ainda, no interior de vesículas no citoplasma das células. O somatório dessas três frações nos dá a idéia da atividade enzimática total (BLANCHETTE-MACKIE et al., 1989; SAXENA et al., 1991; SHEPHERD et al., 1998).

A atividade da LPL cardíaca total (Figura 11) mostrou-se elevada nos ratos tratados com dieta AO, com um aumento de 58% em relação aos controles. No que se refere à fração liberável pela heparina em corações normóxicos (Figura 12A), notamos que o AO induziu aumento de 74% nesse parâmetro, quando comparado aos animais C. Durante a isquemia e reperfusão (Fig. 12B) o quadro acima foi mantido, mostrando o grupo AO um aumento de 90% na atividade enzimática, em relação ao controle.

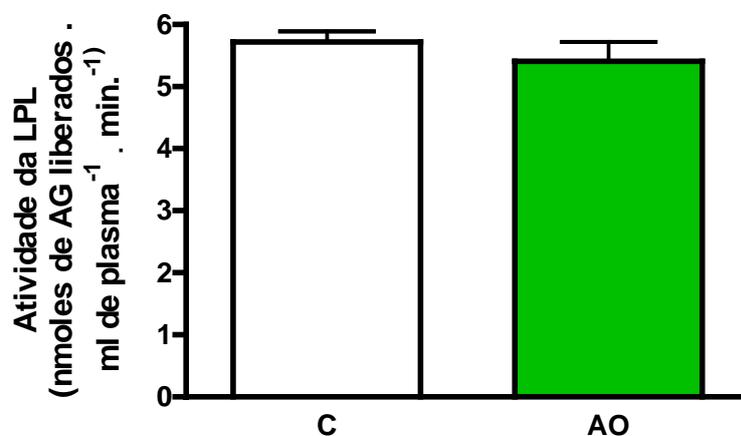


Figura 10. Atividade da enzima LPL presente em plasma dos grupos C e AO. Os dados representam média \pm erro padrão da média de 5 animais.

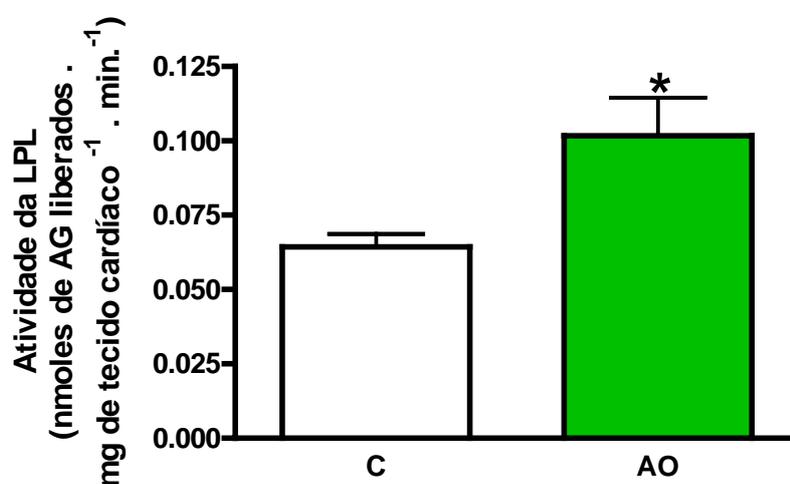


Figura 11. Atividade da enzima LPL total presente no tecido cardíaco intacto dos grupos C e AO. Os dados representam média \pm erro padrão da média de 5 animais. * $p < 0,05$ vs C.

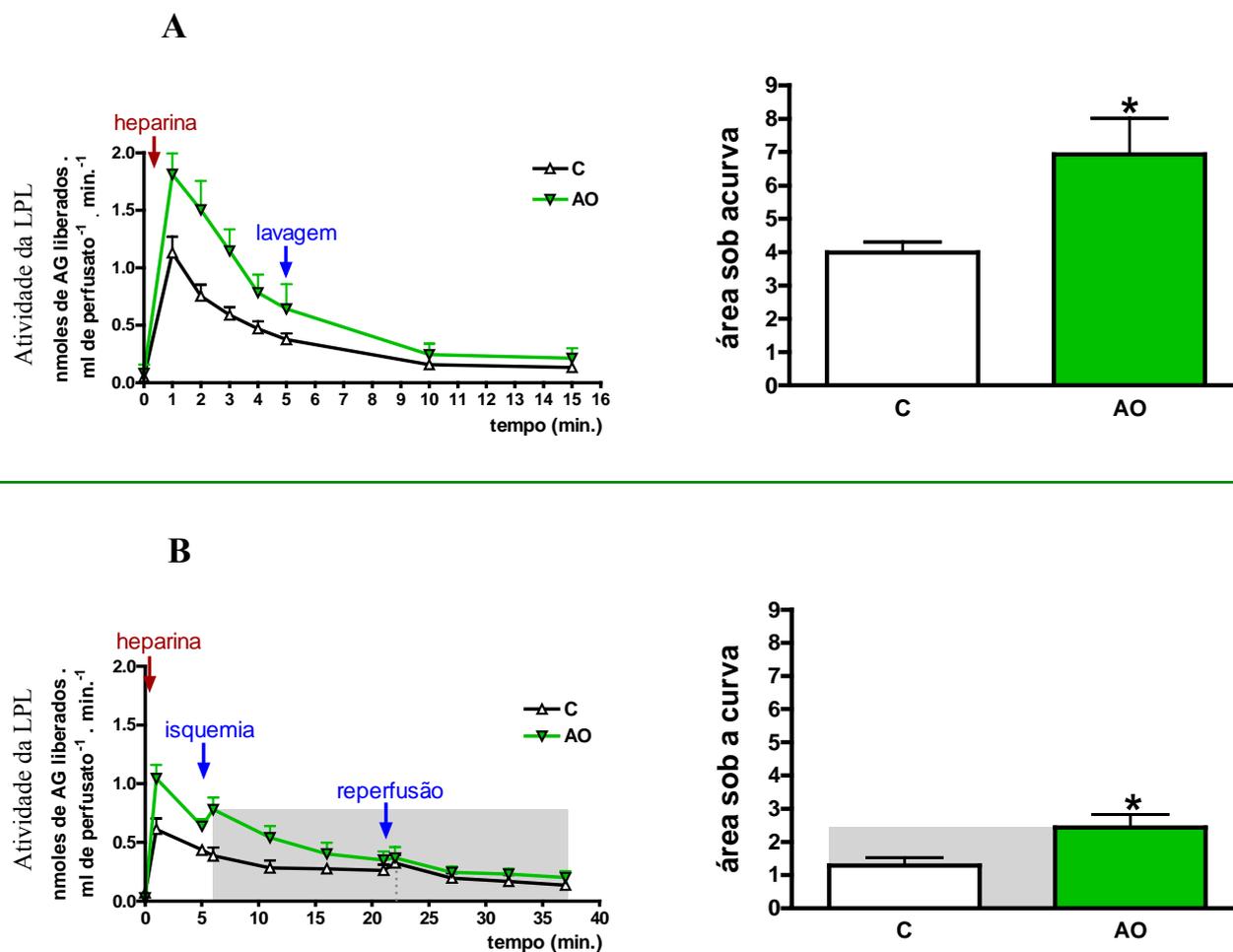


Figura 12. Atividade da enzima LPL liberável pela heparina (LPL funcional), determinada em perfusato cardíaco dos grupos C e AO. **A:** atividade da LPL em perfusato de coração normóxico (n = 5-6 animais). **B:** atividade da LPL em perfusato de coração submetido à isquemia parcial e reperusão (n = 5 animais). Os dados representam média \pm erro padrão da média. * p < 0,05 vs C.

4.4 Expressões cardíacas dos mRNAs para PPAR α , CPT-1 e ACO

Através da técnica da reação em cadeia da polimerase em tempo real, foi avaliada a expressão cardíaca do gene do receptor nuclear alfa ativado pelos proliferadores de peroxissomos (PPAR α), bem como a expressão de duas enzimas importantes envolvidas na β -oxidação mitocondrial e peroxissomal de ácidos graxos, a carnitina palmitoil transferase-1 (CPT-1) e a acil-Coa oxidase (ACO), respectivamente. A Figura 13 mostra que a expressão cardíaca do mRNA para o PPAR α apresentou um aumento de 179% e 96% nos animais tratados com AO, em relação aos controles, para as condições normóxica e de pós-isquemia e reperfusão, respectivamente. O mesmo quadro foi observado para as expressões genéticas das enzimas CPT-1 (Figura 14) e ACO (Figura 15). O AO induziu um aumento da expressão do mRNA da ordem de 1.836% e 89% para CPT-1 e de 90% e 169% para ACO, nas condições normóxica e de pós-isquemia e reperfusão, respectivamente.

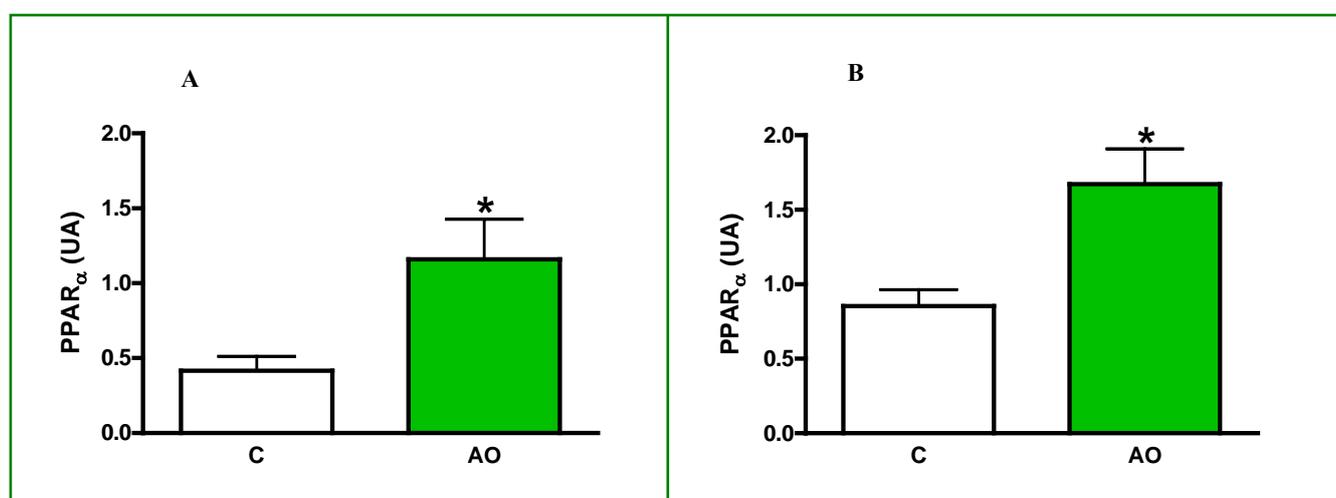


Figura 13. Expressão do gene do fator de transcrição PPAR α no tecido cardíaco dos grupos C e AO. **A:** expressão do PPAR α em coração normóxico (n = 5-6 animais). **B:** expressão do PPAR α em coração submetido à isquemia parcial e reperfusão (n = 4-5 animais). Os dados representam média \pm erro padrão da média. * p < 0,05 vs C.

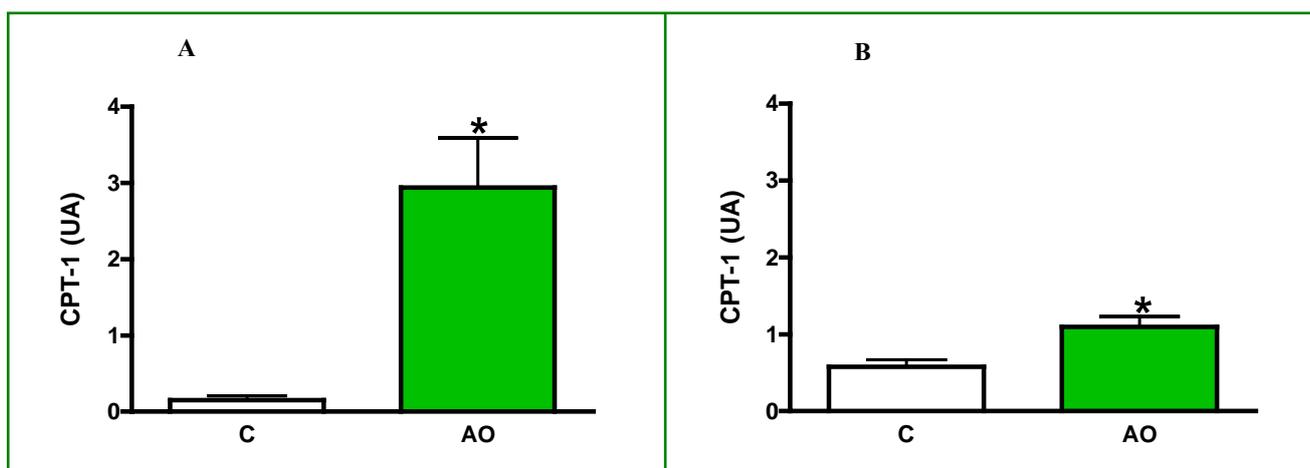


Figura 14. Expressão do gene da enzima CPT-1 no tecido cardíaco dos grupos C e AO. **A:** expressão da CPT-1 em coração normóxico (n = 4-5 animais). **B:** expressão da CPT-1 em coração submetido à isquemia parcial e reperfusão (n = 4 animais). Os dados representam média \pm erro padrão da média. * p < 0,05 vs C.

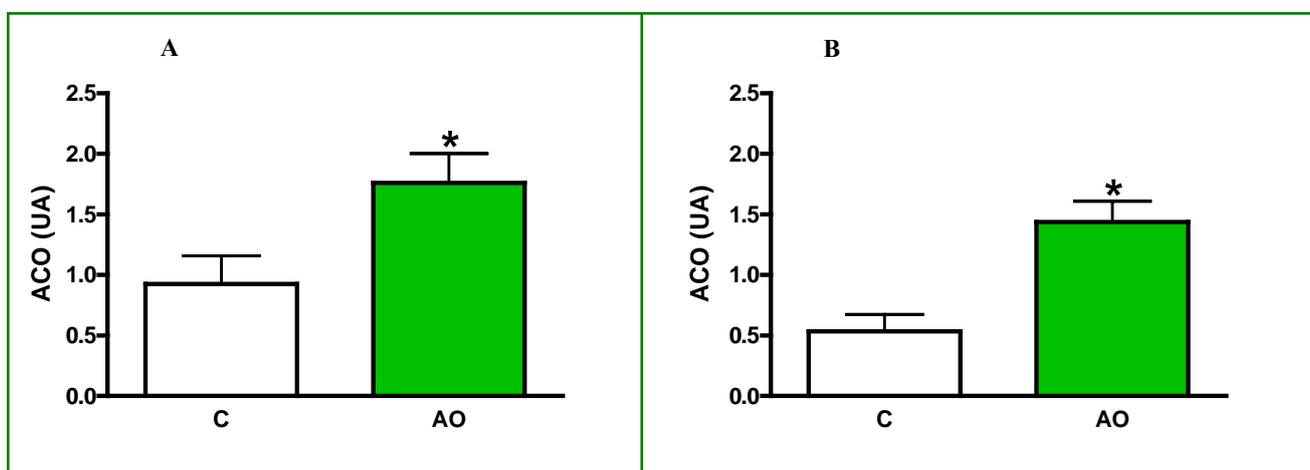


Figura 15. Expressão do gene da enzima ACO no tecido cardíaco dos grupos C e AO. **A:** expressão da ACO em coração normóxico (n = 4-5 animais). **B:** expressão da ACO em coração submetido à isquemia parcial e reperfusão (n = 3-4 animais). Os dados representam média \pm erro padrão da média. * p < 0,05 vs C.

4.5 Conteúdo da proteína GLUT₄ do tecido cardíaco

O transportador de glicose GLUT₄ foi analisado através da técnica *western blot*. A Figura 16A mostra os imunoblotes das bandas de 54 KDa da proteína GLUT₄ e de 43 KDa da proteína β -actina dos corações dos animais C e AO.

A submissão do miocárdio ao processo isquêmico provoca modificações estruturais e conformacionais do esqueleto de β -actina (SASHIDA et al, 1984; SUKOYAN et al, 2005). Dessa forma, nos corações que sofreram isquemia e reperfusão não foi possível medir o conteúdo dessa proteína e a análise da massa protéica do GLUT₄ não foi baseada na relação GLUT₄/ β -actina.

A Figura 16B apresenta a análise semi-quantitativa do transportador de glicose presente em corações normóxicos. A análise em corações submetidos à isquemia e reperfusão é mostrada na Figura 16C. O tratamento com AO não alterou a quantidade da proteína no miocárdio dos animais em estudo, em ambas as condições – normoxia e pós-isquemia e reperfusão.

A

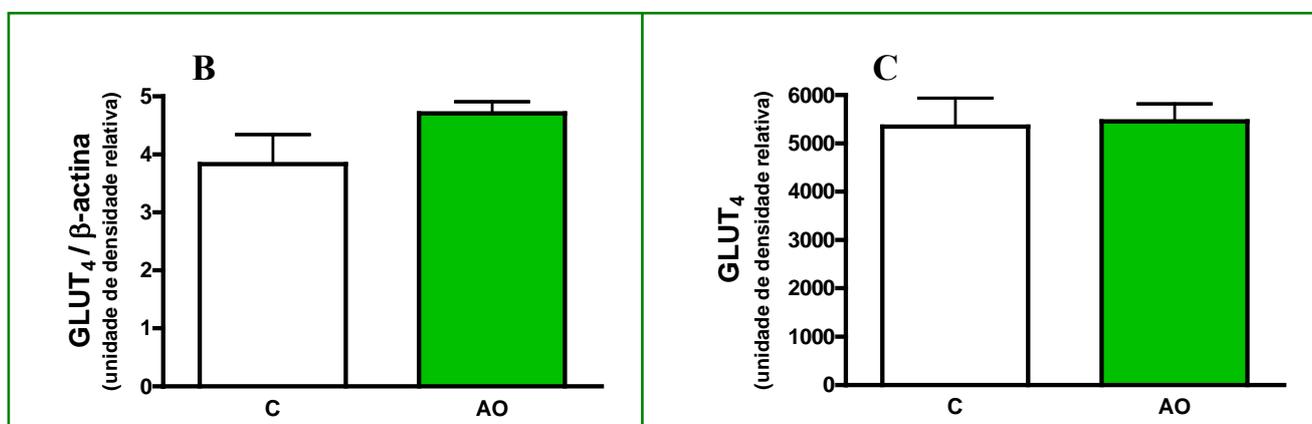
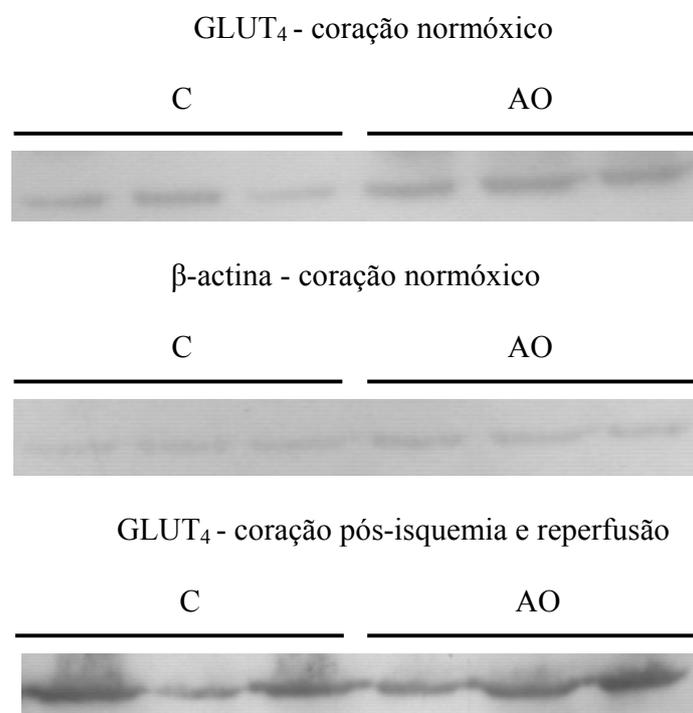


Figura 16. A: imunoblotes para GLUT₄ e β -actina. B: análise semi-quantitativa da massa de proteína GLUT₄, medida em coração normóxico dos grupos C e AO. C: análise semi-quantitativa da massa de proteína GLUT₄, medida em coração submetido à isquemia parcial e reperfusão, dos grupos C e AO. Os dados representam média \pm erro padrão da média de 3 animais.

4.6 Conteúdo cardíaco de Glicose 6-P e Frutose 6-P

A determinação das concentrações dos intermediários glicolíticos G 6-P e F 6-P nos permite estimar a condição metabólica do tecido alvo. No presente estudo, os corações dos animais que receberam a dieta contendo AO apresentaram, quando comparados ao grupo controle, elevadas concentrações desses metabólitos, tanto na situação normóxica (Figura 17A), quanto após a isquemia e reperfusão (Figura 17B) (aumento de 260% e 21% na pré-isquemia para G 6-P e F 6-P, respectivamente, e de 374% e 67% após isquemia e reperfusão para G 6-P e F 6-P, respectivamente).

A redução do suprimento cardíaco de nutrientes, característica da oclusão coronariana, refletiu na queda significativa da concentração dos intermediários glicolíticos, em ambos os grupos analisados (redução de 94% e 83% no grupo controle, para G 6-P e F 6-P, respectivamente, e de 92% e 91% no grupo AO, para G 6-P e F 6-P, respectivamente). Essa queda também pode ser atribuída ao maior gasto imposto pela intensificação do fluxo glicolítico como principal fonte de energia durante essa fase.

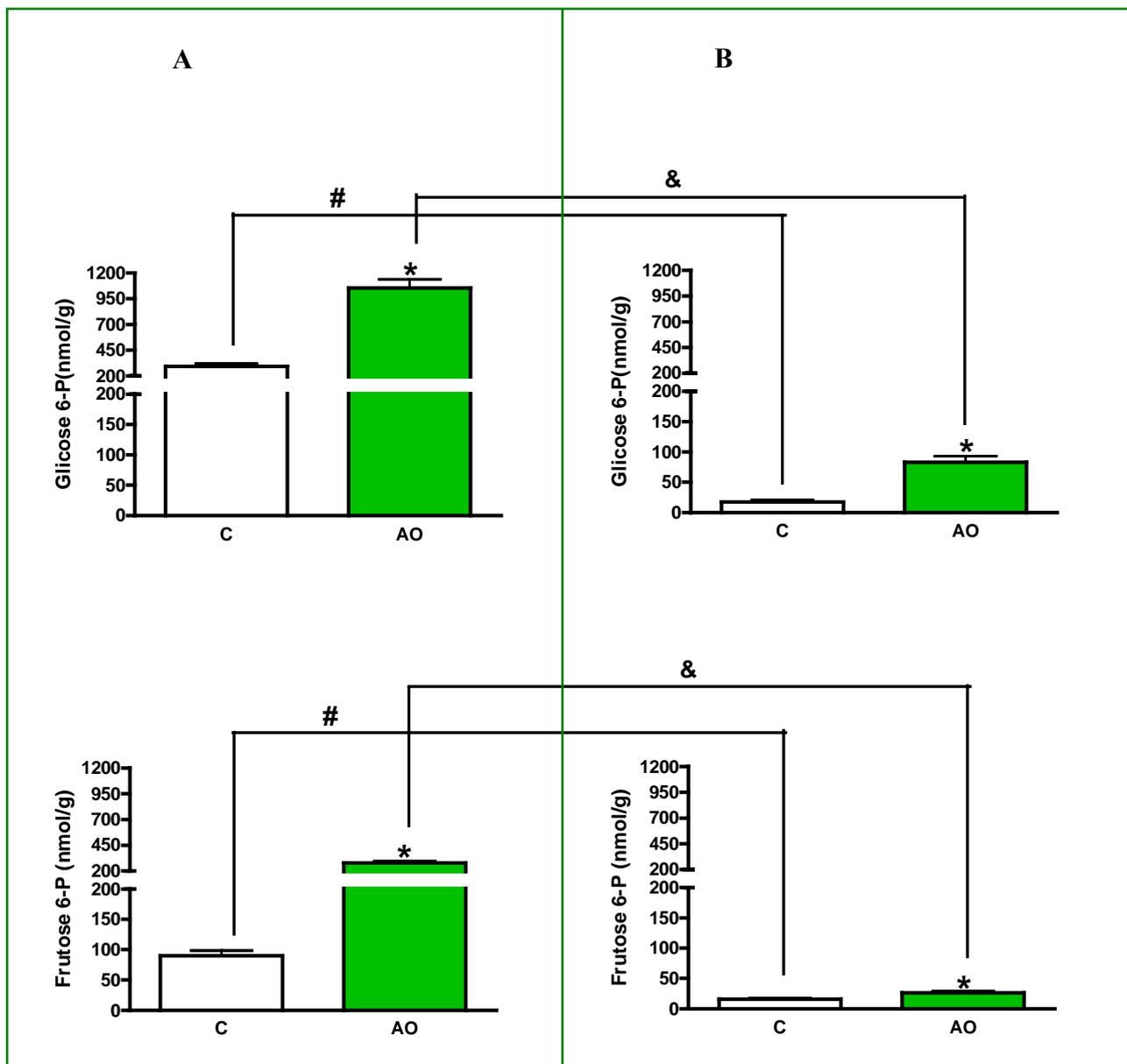


Figura 17. Concentrações dos intermediários glicolíticos, glicose 6-P (G 6-P) e frutose 6-P (F 6-P), presentes no tecido cardíaco dos grupos C e AO. **A:** concentrações de G 6-P e F 6-P em coração normóxico (n= 7 animais). **B:** concentrações de G 6-P e F 6-P em coração submetido à isquemia parcial e reperfusão (n = 7-12 animais). Os dados representam média \pm erro padrão da média.

* p < 0,05 vs C; # p < 0,05 vs C; & p < 0,05 vs AO.

4.7 Produção cardíaca de lactato

Os dados de lactato (Figura 18) presente em perfusato cardíaco, conjuntamente com a análise dos intermediários glicolíticos, apontam um fluxo glicolítico estimulado nos ratos tratados com AO. O grupo AO apresentou maior concentração de lactato em relação ao grupo C, em todas as fases de perfusão cardíaca (aumento de 155% na pré-isquemia, 47% durante a isquemia e 149% na reperfusão). Conforme esperado, a isquemia miocárdica induziu aumento na produção de lactato, pelo estímulo glicolítico, em ambos os grupos – de 267% no grupo C e de 112% no grupo AO.

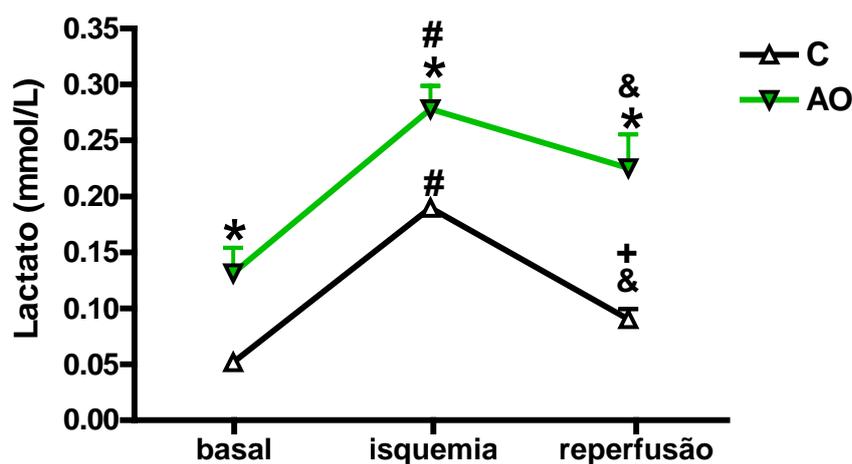


Figura 18. Concentrações de lactato determinadas em perfusatos de corações normóxicos (n = 5-6 animais) e submetidos à isquemia parcial (n = 5 animais) e reperfusão (n = 5-6 animais), nos grupos C e AO. Os dados representam média \pm erro padrão da média.

* p < 0,05 vs. C; # p < 0,05 vs. basal; & p < 0,05 vs. basal; + p < 0,05 vs. isquemia.

4.8 Conteúdo de glicogênio cardíaco

Ao proceder à análise do conteúdo de glicogênio no miocárdio, notou-se um maior acúmulo desse metabólito no grupo AO em relação ao controle, tanto em condição normal (Fig. 19A), quanto após isquemia e reperfusão (Fig. 19B). Em termos percentuais, observou-se um aumento de 123% na pré-isquemia e de 63% aos 15 min. de reperfusão.

Quanto à evolução dos estoques cardíacos de glicogênio após introdução do processo isquêmico, podemos notar que apenas o grupo AO apresentou uma queda significativa desse parâmetro, com uma redução percentual de 45%.

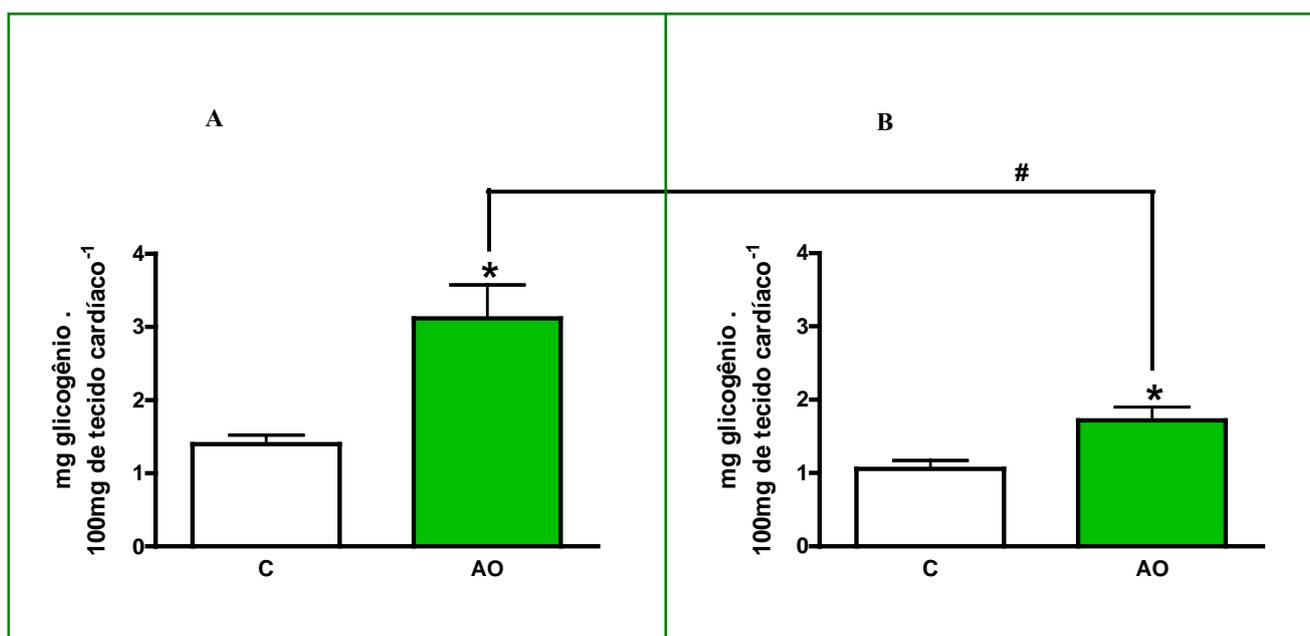


Figura 19. Conteúdo de glicogênio por 100mg de tecido cardíaco, dos grupos C e AO.

A: conteúdo de glicogênio em coração normóxico (n= 7 animais). **B:** conteúdo de glicogênio em coração submetido à isquemia parcial e reperfusão (n = 5 animais). Os dados representam média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ vs C; # $p < 0,05$ vs AO.

4.9 Captação e incorporação de substratos energéticos

Considerando que os AG e a glicose constituem as duas principais fontes de energia para o coração e que as lipoproteínas circulantes respondem pela maior parte do suprimento de AG para esse órgão (AN et al., 2005, AUGUSTUS et al, 2003; NIU et al, 2004; PULINILKUNNIL et al., 2003; TEUSINK et al., 2003), a utilização de substratos energéticos pelo miocárdio foi avaliada com duas soluções nutritivas diferentes:

- uma contendo somente lipoproteína, composta de ^3H -trioleína, como fonte de energia e outra contendo uma mistura de lipoproteína, composta de ^3H -trioleína, e $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ glicose.

4.9.1 Inter-relação entre a captação e a incorporação de ácidos graxos e glicose

O uso do AO na dieta aumentou a captação e a incorporação cardíacas de AG, em relação à dieta controle, em ambas as condições experimentais – na perfusão com ^3H -trioleína como único substrato (aumentos de 86% para captação e incorporação [Figuras 20A e 20B, respectivamente]) e com ^3H -trioleína e $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ glicose conjuntamente (aumento de 117% para captação [Figura 21A] e de 25% para incorporação [Figura 21B]).

Pôde-se observar, conforme o esperado, que a introdução de glicose no meio de perfusão diminuiu a captação cardíaca de AG nos animais AO (queda de 37%), bem como a incorporação de AG em ambos os grupos (queda de 92% e de 95% para os grupos C e AO, respectivamente) (Tabela 5).

Nossos dados revelaram que o AO também induziu aumento na captação (elevação de 290%) e incorporação de glicose (elevação de 46%), quando comparado ao grupo C (Figura 22).

Tabela 5. Utilização cardíaca de AG em modelos de perfusão contendo soluções com diferentes composições de substratos:

	³ H- trioleína		³ H-trioleína e [U- ¹⁴ C] glicose	
	Captação (nmoles/min.)	Incorporação (nmoles/g tecido/min.)	Captação (nmoles/min.)	Incorporação (nmoles/g tecido/min.)
C	1.023,0 ± 273,3 (n = 7)	176,7 ± 17,2 (n = 7)	548,1 ± 144,8 (n = 7)	13,93 ± 0,7 # (n = 9)
AO	1.898,0 ± 207,8 (n = 6)	328,7 ± 38,8 (n = 6)	1.189,0 ± 223,6 * (n = 8)	17,38 ± 0,5 & (n = 8)

Os dados representam média ± erro padrão da média. “n” representa o número de animais. * p

< 0,05 AO, na captação; # p < 0,05 C, na incorporação; & p < 0,05 AO, na incorporação.

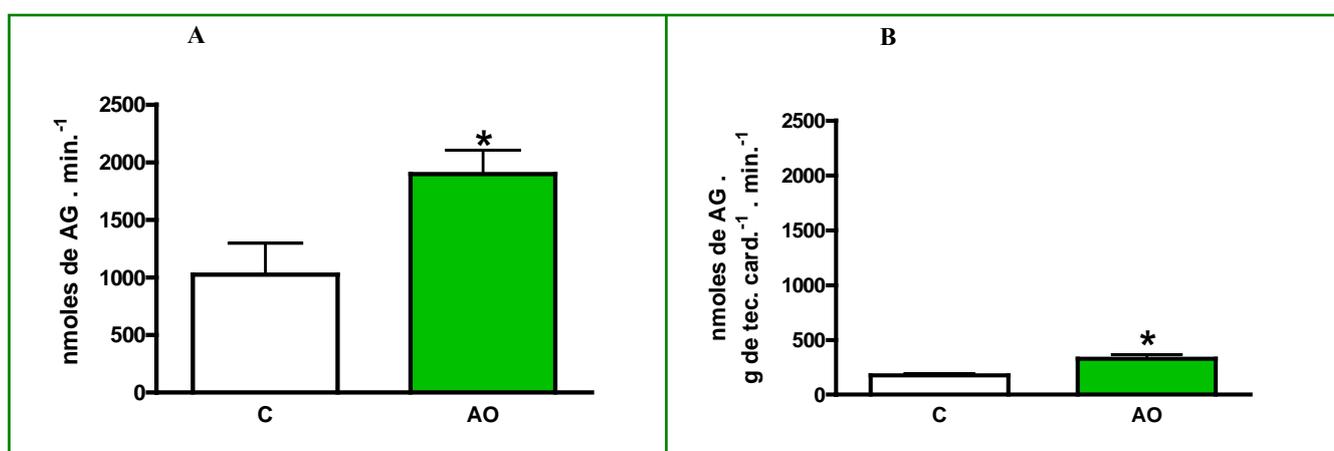


Figura 20. Utilização cardíaca de ácidos graxos de ³H-trioleína fornecida como único substrato energético, pelos grupos C e AO. **A:** captação de AG presentes em solução de perfusão (n= 5-6 animais). **B:** incorporação tecidual de AG (n= 6-7 animais). Os dados representam média ± erro padrão da média. * p < 0,05 vs C.

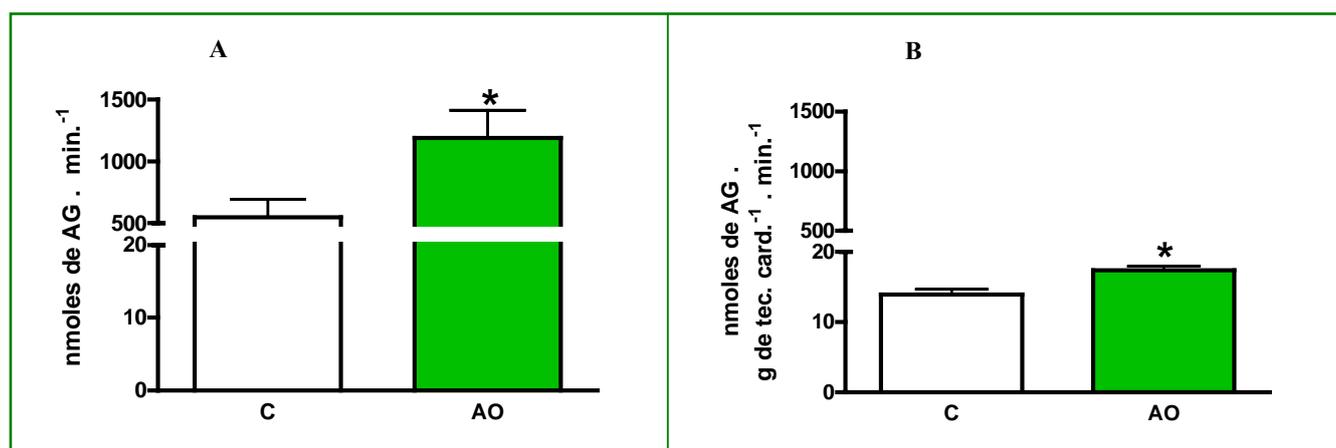


Figura 21. Utilização cardíaca de ácidos graxos de ^3H -trioleína pelos grupos C e AO, perfundidos com uma mistura de ^3H -trioleína e $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ glicose. **A:** captação de AG presentes em solução de perfusão (n= 7-8 animais). **B:** incorporação tecidual de AG (n= 8-9 animais). Os dados representam média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ vs C.

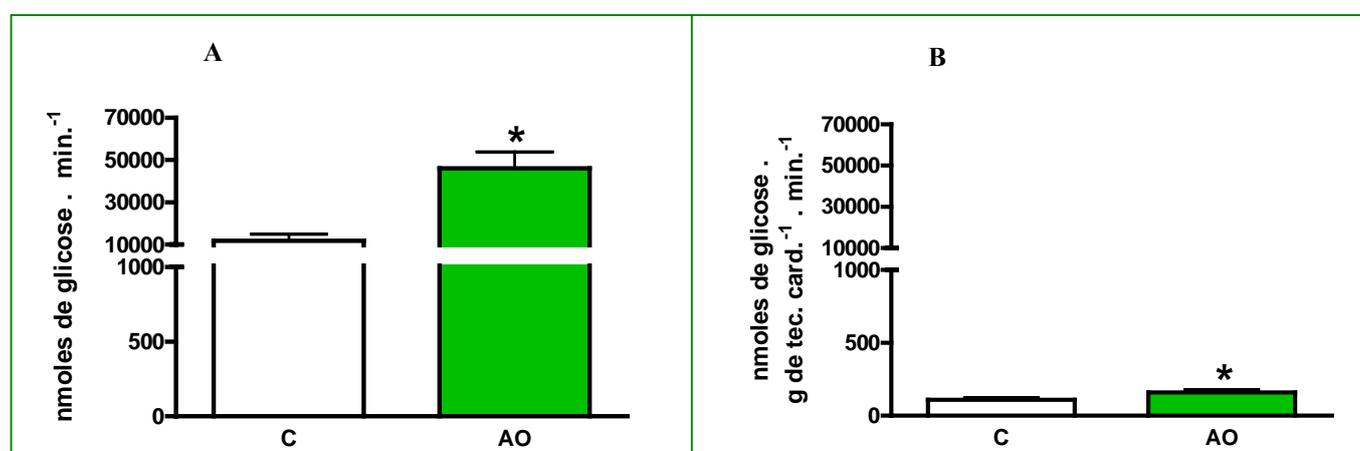


Figura 22. Utilização cardíaca de $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ glicose pelos grupos C e AO, perfundidos com uma mistura de ^3H -trioleína e $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ glicose. **A:** captação de glicose presente em solução de perfusão (n= 7-10 animais). **B:** incorporação tecidual de glicose (n= 7-9 animais). Os dados representam média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ vs C.

4.10 Rendimento energético tecidual

Em relação ao rendimento energético tecidual, pôde-se observar que o tratamento com AO provocou aumento no conteúdo miocárdico de ATP, quando comparado ao grupo controle (aumento de 261% nos corações normóxicos [Figura 23A] e de 227% nos corações submetidos à isquemia de baixo fluxo [Figura 23B]).

A reserva energética, como esperado, foi comprometida pelo processo isquêmico em ambos os grupos, apresentando um déficit percentual de 91% e 92% no conteúdo de ATP em relação à condição basal, para os grupos C e AO, respectivamente.

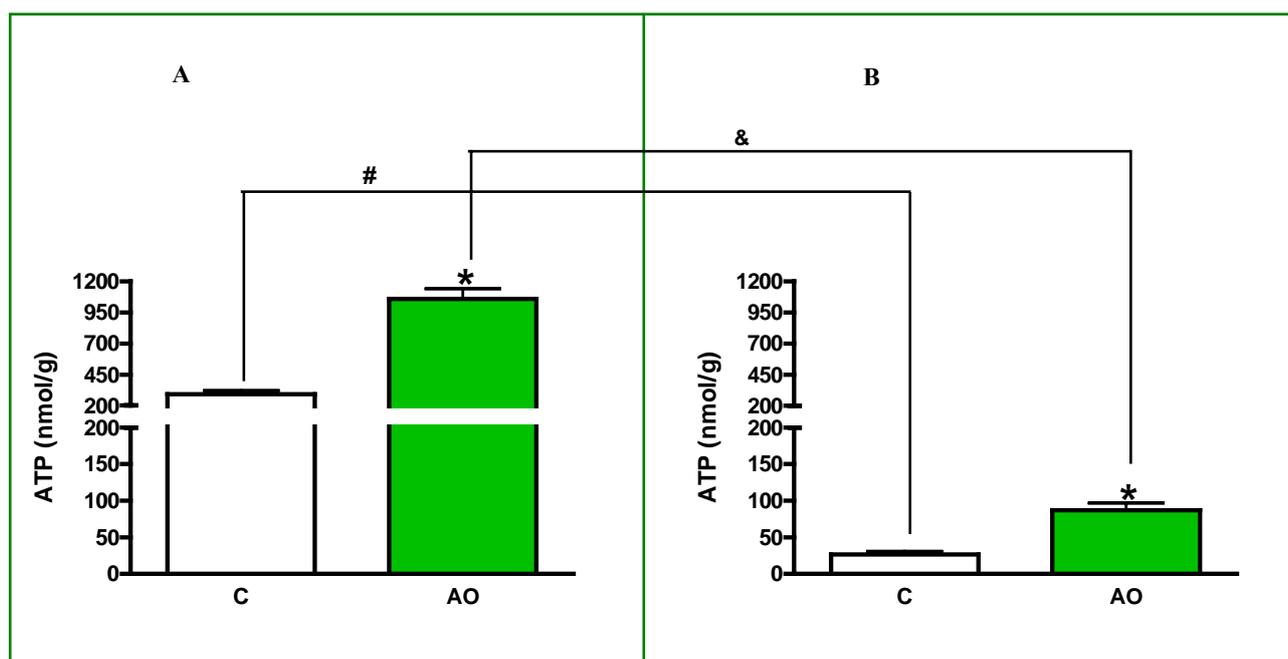


Figura 23. Concentração de ATP no tecido cardíaco dos grupos C e AO. **A:** concentração de ATP em coração normóxico (n= 7 animais). **B:** concentração de ATP em coração submetido à isquemia parcial e reperfusão (n = 7-12 animais). Os dados representam média \pm erro padrão da média.

* $p < 0,05$ vs C; # $p < 0,05$ vs C; & $p < 0,05$ vs AO.

4.11 Função cardíaca

Ao analisarmos os índices de contratilidade em corações normóxicos, bem como durante o período isquêmico, notamos que a frequência cardíaca (Figura 24), a tensão diastólica (Figura 26) e a $+ dT/dt$ (Figura 27) apresentaram valores similares nos grupo estudados (C e AO). Em relação aos dados de tensão sistólica ventricular e $- dT/dt$, no entanto, foram observadas elevações desses parâmetros nos ratos tratados com a dieta AO, quando comparados aos controles (22% e 25% para tensão sistólica, nas fases normóxica [Figura 25A] e isquêmica [Figura 25B], respectivamente; 37% e 46% para $- dT/dt$, nas fases normóxica [Figura 28A] e isquêmica [Figura 28B], respectivamente).

A isquemia foi confirmada pela queda imediata do fluxo coronariano, o qual se manteve semelhante nos grupos analisados durante todo o período de perfusão cardíaca. Com a oclusão coronariana, observou-se um decréscimo na função cardíaca em ambos os grupos.

O protocolo experimental utilizado não permitiu a avaliação da função cardíaca durante a reperfusão, visto que os corações apresentaram arritmias de reperfusão devido ao uso de elevada concentração de albumina na solução nutritora. A albumina pode comprometer a recuperação funcional do coração em virtude do extravasamento para o espaço intersticial, como resultado da aumentada permeabilidade celular endotelial após a isquemia, ou, ainda, devido um encolhimento celular pré-isquêmico em resposta à elevação da pressão oncótica (KING et al, 2001).

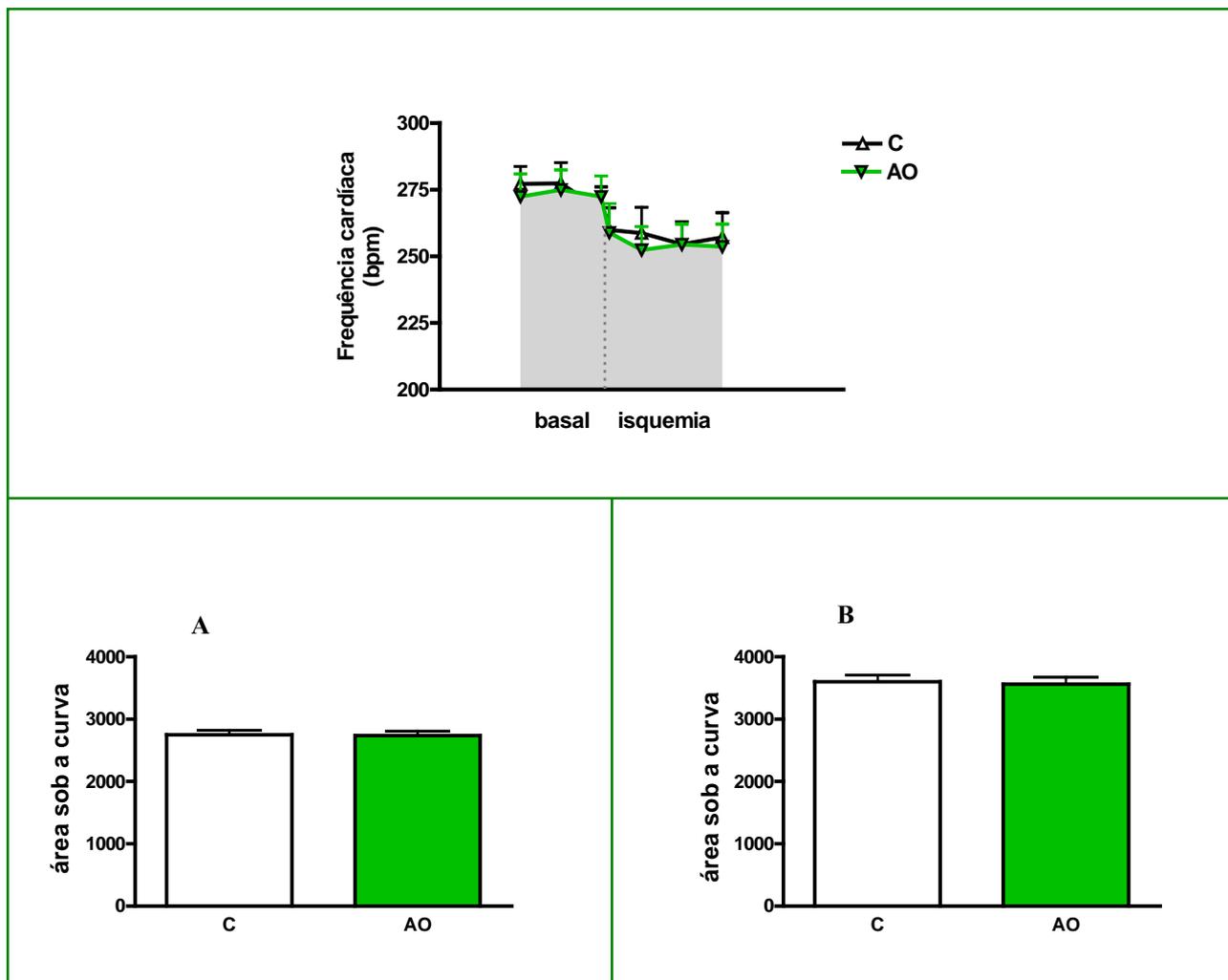


Figura 24. Frequência cardíaca dos grupos C e AO. **A:** frequência cardíaca em coração normóxico (n = 20-22 animais). **B:** frequência cardíaca em coração submetido à isquemia parcial (n = 13-14 animais). Os dados representam média \pm erro padrão da média.

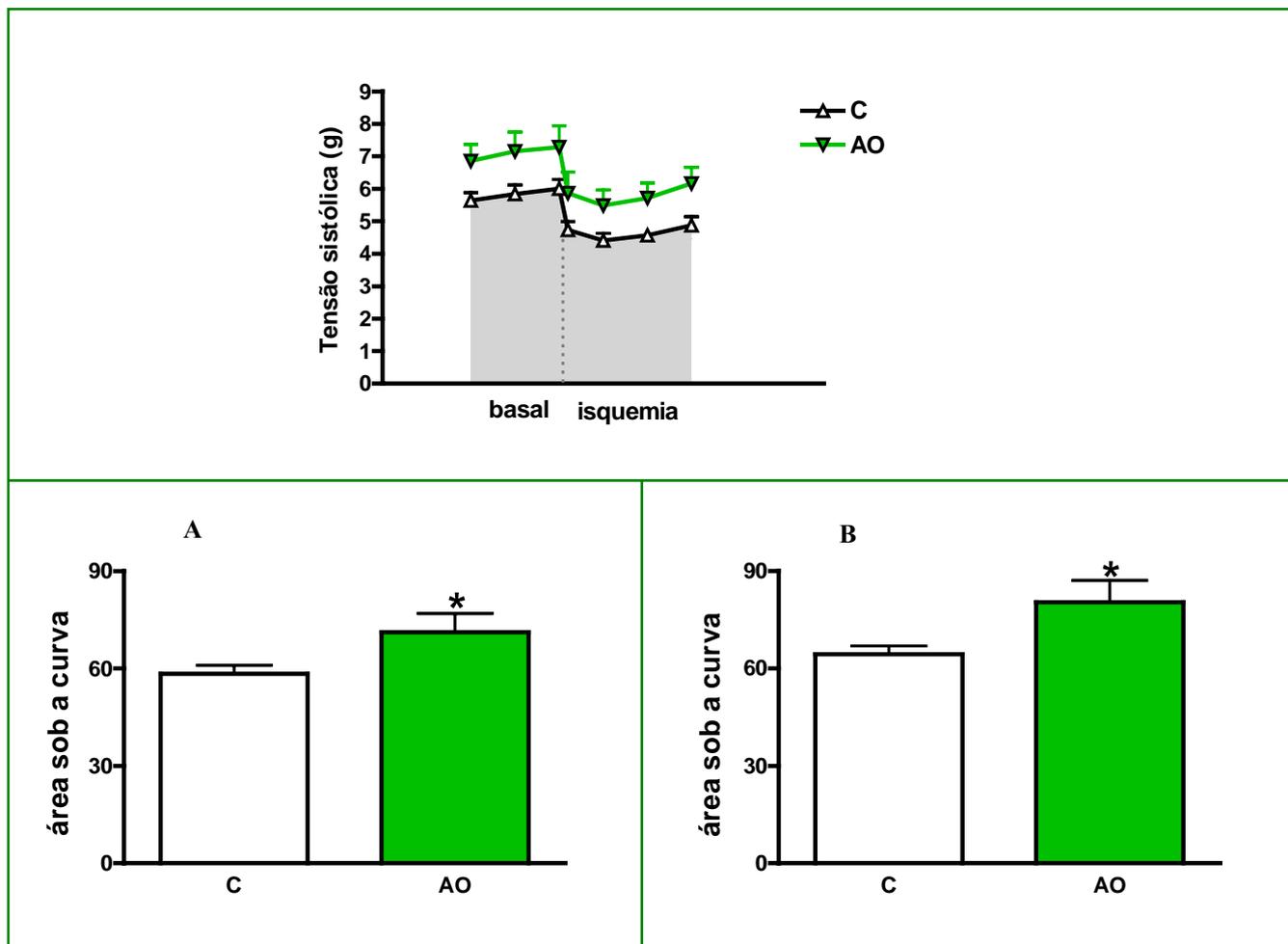


Figura 25. Tensão sistólica ventricular dos grupos C e AO. **A:** tensão sistólica em coração normóxico (n = 20-22 animais). **B:** tensão sistólica em coração submetido à isquemia parcial (n = 9-14 animais). Os dados representam média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ vs C.

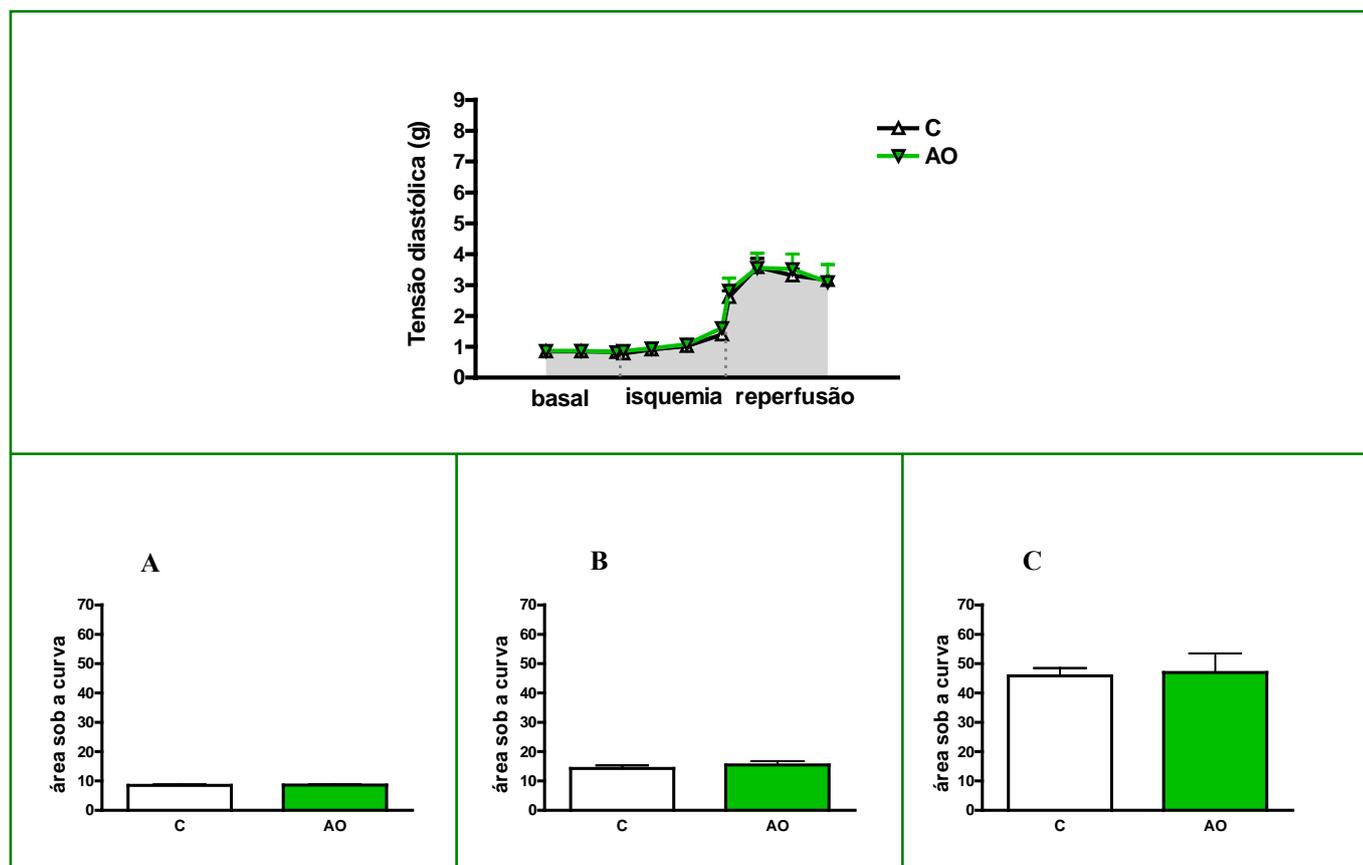


Figura 26. Tensão diastólica ventricular dos grupos C e AO. **A:** tensão diastólica em coração normóxico (n = 19-23 animais). **B:** tensão diastólica em coração submetido à isquemia parcial (n = 11-15 animais). **C:** tensão diastólica em coração submetido à reperfusão (n = 11-15 animais). Os dados representam média \pm erro padrão da média.

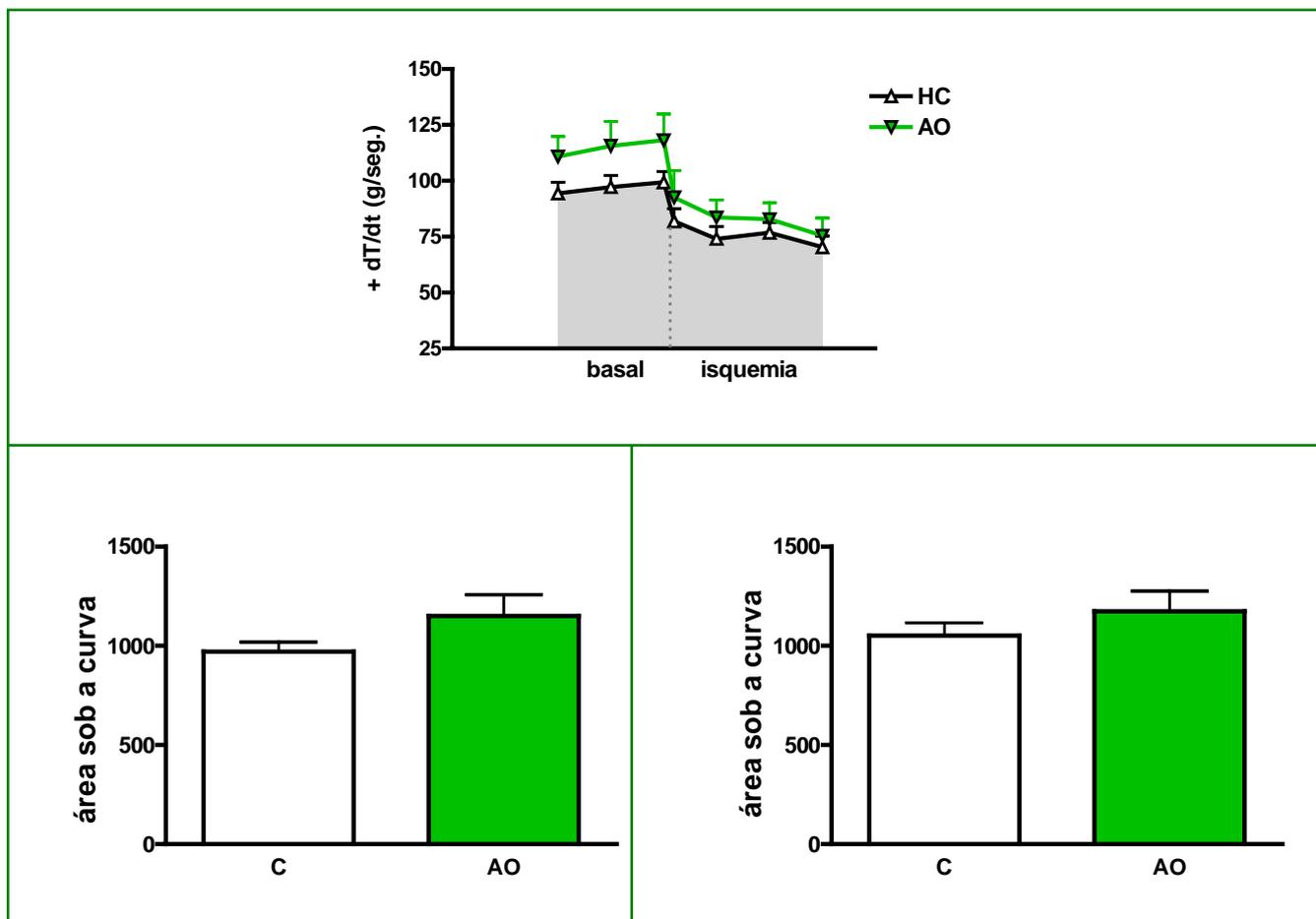


Figura 27. $+dT/dt$ ventricular dos grupos C e AO. **A:** $+dT/dt$ em coração normóxico (n = 18-22 animais). **B:** $+dT/dt$ em coração submetido à isquemia parcial (n = 12-16 animais). Os dados representam média \pm erro padrão da média.

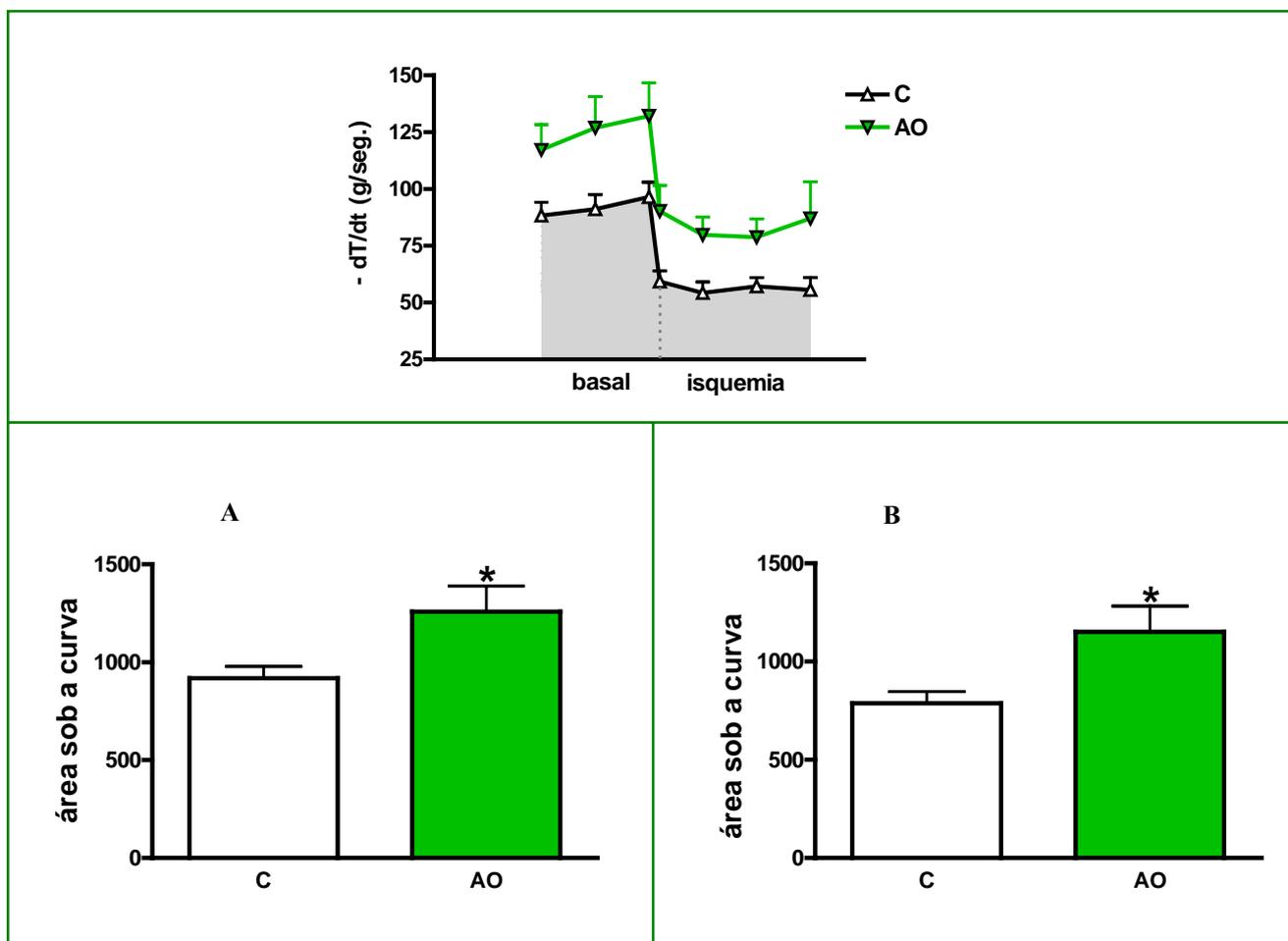


Figura 28. - dT/dt ventricular dos grupos C e AO. **A:** - dT/dt em coração normóxico (n = 16-18 animais). **B:** - dT/dt em coração submetido à isquemia parcial (n = 10-11 animais). Os dados representam média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ vs C.

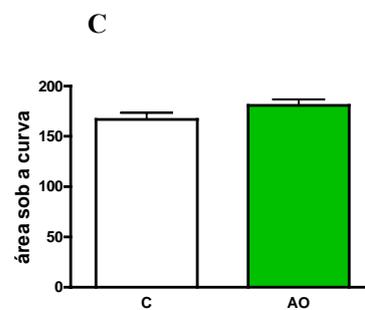
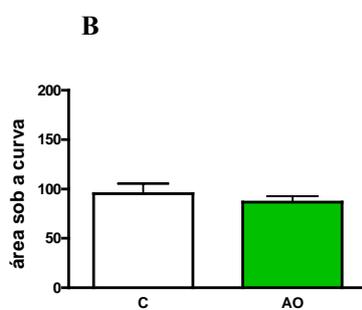
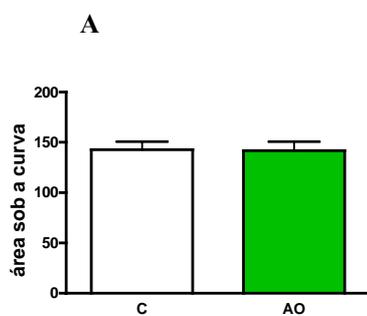
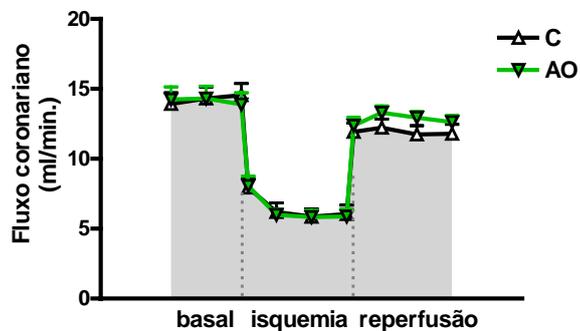


Figura 29. Fluxo coronariano dos animais C e AO. **A:** fluxo coronariano em coração normóxico (n = 15-16 animais). **B:** fluxo coronariano em coração submetido à isquemia parcial (n = 9-10 animais). **C:** fluxo coronariano em coração submetido à reperusão (n = 9-10 animais). Os dados representam média \pm erro padrão da média.

5.0 DISCUSSÃO

O coração é considerado um órgão omnívoro, ou seja, funciona mais eficientemente quando oxida diferentes substratos simultaneamente (DEPRE, 1999; GOLFMAN, 2005). Considerando que a performance funcional desse órgão está intimamente relacionada à sua capacidade metabólica, o nosso estudo investigou o efeito do ácido orótico sobre as vias de suprimento de energia, em condições de fluxo normal e isquemia.

A ingestão de dieta contendo AO reduziu as concentrações séricas pós-absortivas de TG e colesterol. Essa diminuição parece ser conseqüente, pelo menos em parte, à redução da secreção hepática de VLDL nesses animais. Vários estudos na literatura mostram que ratos desenvolvem esteatose hepática quando tratados com AO, e um dos mecanismos envolvidos nesse acúmulo lipídico é a baixa síntese e/ou transporte das VLDL do fígado para o sangue (STANDERFER, 1955; WINDMUELLER, 1964; WINDMUELLER & SPAETH, 1966; LAWRENCE et al, 1971; HAMILTON et al, 1986; HAY et al, 1988; HEBBACHI et al, 1997). A síntese de VLDL é um processo complexo que ocorre no aparelho secretor do hepatócito e envolve a transferência de TG para a apolipoproteína B (Apo B), processo este que requer uma proteína de transferência de TG microsomal. A inibição da síntese de VLDL pelo ácido orótico parece ser conseqüente à falha na conjugação das partículas de Apo B com as moléculas de TG e não à deficiência de precursores (HEBBACHI et al, 1997). Trabalhos mais recentes demonstraram que a administração de AO causa aumento na síntese de TG pelo fígado (CHA et al, 1998), além de alteração mitocondrial, a qual se reflete na menor oxidação de AG (PICARD, 2002). FERREIRA (2007) atribuiu a diminuição na oxidação de AG à redução da expressão hepática do PPAR α e de sua enzima alvo ACO, envolvida na β -oxidação peroxissomal de AG. Além do exposto acima, trabalho desenvolvido por FERREIRA (2007) mostrou que o tratamento com AO aumentou a atividade da enzima LPL do tecido adiposo

epididimal e resultado semelhante foi observado na atividade da LPL cardíaca no presente estudo. Esse fato pode estar contribuindo para o *clearance* sérico de lipídios, induzido pela ingestão de AO. Os estudos de LEVAK-FRANK et al (1999) mostram que a expressão dessa enzima apenas no coração é suficiente para manter normalizados os níveis de TG no plasma.

Além dos ácidos graxos, a concentração de glicerol no soro também é considerada um índice lipolítico (BOTION & GREEN, 1999; ZIMMERMANN et al, 2004). Os resultados do presente estudo mostraram um aumento da concentração sérica de ácidos graxos no grupo AO; no entanto, a concentração de glicerol não foi diferente entre os grupos estudados. Considerando que a atividade lipolítica do tecido adiposo é semelhante (FERREIRA, 2004), pode-se inferir que a elevada concentração sérica de AGL é consequente a uma menor captação hepática de AGL pelo grupo AO, como um mecanismo compensatório da reduzida taxa de oxidação deste metabólito no fígado, propiciando, assim, o acúmulo de AGL no soro.

A enzima LPL é um determinante importante da distribuição de lipídios entre os tecidos (PREISS LANDL et al, 2002) e a atividade dessa enzima pode ser modulada tanto pelo estado nutricional, como pela composição da dieta (PEDERSEN et al, 1981; DESHAIES et al, 1988). Não foi observada diferença na atividade da enzima LPL presente no plasma dos animais em estudo. A LPL plasmática, no entanto, ocorre como consequência do deslocamento da enzima de todos os tecidos secretores (BALLART et al, 2003). Assim, o resultado não deve retratar exclusivamente a LPL cardíaca liberada. TAVANGAR et al (1992) postularam que a atividade da enzima LPL funcional apresenta maior susceptibilidade a alterações fisiológicas e patológicas. No presente estudo, os animais AO revelaram aumento da atividade da LPL, tanto funcional, quanto total, comparada aos controles. Pôde-se notar, ainda, que a maior atividade da LPL funcional foi mantida após a instalação do processo isquêmico. Conforme relatado anteriormente, o músculo cardíaco é o tecido que, proporcionalmente, apresenta maior expressão da enzima LPL, de forma que somente a atividade da

fração cardíaca da enzima é capaz de normalizar os níveis lipídêmicos. Sendo assim, a hidrólise de TG contidos em lipoproteínas circulantes tem sido sugerida como a principal fonte de AG para a utilização cardíaca (PEDERSEN et al, 1981; LEVAK-FRANK et al, 1999; AUGUSTUS et al, 2003; PULINILKUNNIL, 2004). Diante do exposto, considera-se que a elevada atividade da LPL miocárdica, induzida pelo AO, possa estar contribuindo significativamente para o suprimento de energia nesses animais. Esse fato é particularmente importante na condição isquêmica, quando a recuperação da função cardíaca encontra-se inteiramente na dependência do nível de energia produzido. Convém lembrar que a oclusão parcial da coronária, modelo utilizado nessa pesquisa, permite, ainda, uma utilização lipídica residual durante o processo isquêmico (KING et al, 2001).

Corroborando com a hipótese acima de uma maior utilização de AG por corações isolados de ratos suplementados com AO, a análise das expressões dos genes do receptor nuclear PPAR α e das enzimas CPT-1 e ACO revelaram aumento induzido por esse tratamento, em ambas as condições, basal e pós-isquemia e reperfusão. Dentre os vários efeitos da ativação do PPAR α , incluem o aumento da biogênese mitocondrial e da oxidação de ácidos graxos (BARGER & KELLY, 2000), limitando, conseqüentemente, a oferta para a produção hepática de TG e VLDL (STAELS et al, 1998; CARROLL & SEVERSON, 2001; STAVINOHA, 2004). O PPAR α é altamente expresso no coração e é relatado na literatura que a atividade desse receptor nuclear é um importante determinante da homeostase lipídica e da produção de ATP nos cardiomiócitos, via regulação da transcrição de várias proteínas ligadas ao transporte e metabolismo de AG (CARROLL & SEVERSON, 2001; GOIKOETXEA et al, 2004; STAVINOHA, 2004). O aumento da atividade do PPAR α no tecido cardíaco foi evidenciado pela maior expressão das enzimas oxidativas, CPT-1 e ACO. Esses dados corroboram outros estudos, segundo os quais a ativação do PPAR α estimula a expressão das enzimas CPT -1 e 2 no músculo, coração e fígado (AOYAMA, 1998; BRANDT, 1998; LOUET , 2001) e de

várias enzimas da β -oxidação peroxissomal, como a ACO, em roedores (STAELS et al, 1998; LAWRENCE et al, 2001). Sendo assim, os resultados da atividade da LPL e das expressões dos genes do PPAR α , CPT-1 e ACO indicam um aumento da captação e oxidação cardíaca de AG, favorecendo, dessa forma, a energética tecidual. NIU et al (2004) mostraram em seus estudos em corações perfundidos que o aumento da captação e da oxidação de TG provenientes de quilomicra melhorou a função cardíaca.

BOCHER et al (2002) relataram que o uso de fenofibrato, agonista do PPAR α , induz a expressão da LPL em tecidos com altas taxas de oxidação de AG como fígado, músculo e coração. Por outro lado, o estudo de CARROLL & SEVERSON (2001) indica que a LPL cardíaca não é um alvo direto para o PPAR α e que a ação desse receptor ocorre por via pós-transcrição e pós-tradução, resultando em inibição da atividade da enzima. Diante do exposto, questiona-se no presente estudo a importância do PPAR α na hidrólise das lipoproteínas ricas em TG e, conseqüentemente, na oferta de AG para o miocárdio e na redução da lipemia nos animais AO, visto que foram observados aumentos concomitantes da expressão do receptor e da atividade da enzima.

Os dados de captação e incorporação de AG pelo miocárdio confirmam os passos metabólicos discutidos anteriormente. A suplementação com AO aumentou a captação e a incorporação de AG, tanto nos corações perfundidos somente com trioleína, quanto naqueles perfundidos concomitantemente com trioleína e glicose. De qualquer forma, de acordo com a literatura (ENRIQUEZ, 2002; DYCK et al, 2004), a introdução de glicose no tampão de perfusão reduziu a utilização cardíaca de AG.

Alguns estudos atribuíram o aumento da concentração plasmática de AGL como causa do comprometimento funcional cardíaco, particularmente na condição isquêmica. O nível elevado de AGL culminaria em acúmulo tecidual deste metabólito com alteração da estrutura de membrana e

geração de espécies reativas de oxigênio, além da inibição da oxidação de glicose. Foi admitido, mais tarde, o envolvimento do fator de transcrição PPAR α nesse processo, induzindo a utilização excessiva de AG e, conseqüentemente, a diminuição da utilização de glicose, pela queda da massa de transportador GLUT₄ (SAMBANDAM et al, 2000; OLIVER, 2002; SAMBANDAM & LOPASCHUK, 2003; GOLFMAN et al., 2005; SAMBANDAM et al, 2006; PANAGAIA et al, 2005). No entanto, muitos desses trabalhos levaram em conta estados patológicos crônicos, como o diabetes, ou, ainda, modelos experimentais distintos do aplicado em nosso estudo como, por exemplo, a imposição da isquemia total. No trabalho em questão, as maiores concentração de AGL e expressão do PPAR α nos animais AO não foram acompanhadas de redução da utilização de glicose em relação aos controles, fato que repercutiu em melhor performance cardíaca, conforme discutido posteriormente. KING et al (2001) mostraram que a presença de AG no tampão de perfusão protegeu inclusive corações diabéticos durante a isquemia de baixo fluxo. Admite-se que a utilização de AG nesse período, além de permitir maior produção de ATP, equilibra a produção de prótons pela via glicolítica, contribuindo, dessa forma para manutenção da homeostase iônica.

Em relação à utilização cardíaca de glicose, os resultados obtidos não revelaram diferença na massa do transportador de glicose GLUT₄ entre os grupos analisados, tanto na condição aeróbica normal, quanto após a isquemia e reperfusão. Ainda assim, o AO aumentou o conteúdo miocárdico dos intermediários glicolíticos G 6-P e F 6-P, bem como a produção de lactato, em todas as condições de perfusão analisadas, sugerindo um estímulo da via glicolítica. Os dados acima indicam que nos corações dos animais AO ocorre uma maior produção de energia proveniente de glicose, condição particularmente importante no processo isquêmico. O trabalho de TIAN & ABEL (2001) aponta a importância da glicólise para o funcionamento cardíaco e mostra que corações de camundongos com deleção do transportador GLUT₄ apresentam disfunções sistólicas e diastólicas irreversíveis, com acelerada depleção de ATP durante a isquemia de baixo fluxo. É importante ressaltar que no modelo

de isquemia utilizado, os produtos metabólicos da glicose não representam risco em potencial para a integridade funcional da célula cardíaca. O fluxo coronariano residual ainda permite a extrusão de prótons, impedindo a excessiva acidificação intracelular (DEPRE et al., 1999). Os resultados de utilização de glicose obtidos pela perfusão dos corações com uma mistura de glicose, insulina e trioleína confirmam os dados acima, mostrando um aumento da captação de glicose e conseqüente elevação da incorporação deste metabólito. Acredita-se aqui que o elevado suprimento de glicose, induzido pelo AO, seja conseqüência de uma maior translocação dos transportadores GLUT₄ para a membrana plasmática. Segundo KING & OPIE (1998), os passos iniciais da glicólise são os mais importantes no controle dessa via, destacando-se a capacidade da membrana em transportar a glicose, a qual é determinada pelo número de transportadores presentes. Conforme relatado na INTRODUÇÃO, o metabolismo hepático do AO pode estimular a captação cardíaca de glicose, via formação de uridina (KYPSON et al, 1978; AUSSÉDAT, 1983). Sugere-se no presente modelo uma ativação isolada da via glicolítica induzida pelo AO, evidenciada pela maior formação de lactato ainda na condição basal, com vistas a alimentar a produção de ATP destinado à manutenção da homeostase iônica, conforme teoria da “compartimentalização energética” discutida posteriormente. Sabe-se que o PPAR α , estimulado pelo AO no presente estudo, codifica a expressão da piruvato desidrogenase quinase, enzima que inibe o metabolismo oxidativo da glicose (WU et al, 1999) e, conforme relatado na INTRODUÇÃO, na presença de elevada utilização de AG, a captação de glicose e a via glicolítica são afetadas em proporção muito menor que a oxidação mitocondrial desse metabólito (DEPRE, 1999; SAMBANDAM & LOPASCHUK, 2003).

Considerando o acúmulo miocárdico de prótons como causa apreciável da injúria isquêmica, embora a produção de lactato seja um marcador indireto da condição metabólica da célula, sua produção retarda a acidose induzida pela via glicolítica. A hidrólise de ATP acoplada a glicólise, pelas reações catalisadas pelas enzimas hexoquinase e fosfofrutoquinase-1, é a principal fonte de produção

de íons H^+ . A oxidação do gliceraldeído 3-P, pela gliceraldeído 3-P desidrogenase, também contribui com a acidificação do meio, via produção de $NADH + H^+$. O lactato, ao contrário, retarda o desenvolvimento de acidose metabólica, além de contribuir na remoção de prótons da célula. Na reação de redução do piruvato a lactato, um próton é consumido e, ainda, essa reação catalisada pela enzima lactato desidrogenase mantém o potencial redox ($NAD^+/NADH$) citosólico, necessário para manutenção do fluxo glicolítico e geração de ATP. O lactato é removido da célula via transportador de monocarboxilado, que também contribui para o efluxo celular de prótons (ROBERGS et al., 2004). Sendo assim, esses mecanismos celulares contribuem para o restabelecimento da homeostase iônica e da integridade funcional do coração.

Ao comparar a concentração dos metabólitos da glicose nas diferentes condições de perfusão cardíaca, observou-se uma redução da G 6-P e da F 6-P conseqüente ao processo de isquemia e reperfusão, nos dois grupos analisados. Notou-se, ainda, que a isquemia induziu aumento da produção de lactato em ambos os grupos, sendo que o grupo C reduziu significativamente essa produção com a reperfusão dos corações. Esses dados evidenciam a ativação da via glicolítica na fase isquêmica, como alternativa para produção de energia para o miocárdio, conforme reportado previamente por outros autores (DEPRE, 1999; KING & OPIE, 1998; SAMBANDAM & LOPASCHUK, 2003). O estudo realizado por KING & OPIE (1998) contraria, em parte, os resultados obtidos nesse estudo, ao mostrar que as concentrações cardíacas dos intermediários glicolíticos foram mantidas durante todo o período de isquemia imposta. No entanto, os trabalhos de SAMAJA et al (1998 e 1999) explicam esse fato pela conjugação do binômio “perfusão-contração”. Nesses modelos de fluxo constante, o conteúdo energético é mantido durante a isquemia por uma restrição bem mais drástica do fluxo coronariano que a imposta em nosso estudo; a isquemia mais severa leva à diminuição mais acentuada da contratilidade cardíaca nesse período e, com isso, a um menor gasto metabólico. O fluxo residual diminuído ainda implica em menor perda de substratos difusíveis de ATP.

Vale salientar a importância da reserva tecidual de glicose durante a isquemia, momento em que o restrito suprimento de nutrientes e a elevada demanda energética se tornam críticos para a posterior recuperação funcional do tecido.

A contribuição do glicogênio para a via glicolítica na condição isquêmica é apreciável (SAMAJA et al, 1998), e os dados aqui apresentados apontam um aumento do conteúdo miocárdico de glicogênio nos animais AO, em ambas as condições basal e pós-isquemia e reperfusão. Esses resultados corroboram com os estudos de CROSS et al. (1996) e FERDINANDY et al. (1998), que mostram que o tratamento com AO aumentou o conteúdo de glicogênio em corações normóxicos e isquêmicos, com significativa melhora da função miocárdica pós-isquêmica. Sabe-se que a quebra do glicogênio é rapidamente estimulada durante aumento súbito de trabalho cardíaco (DEPRE et al., 1999). Esse fato pôde ser observado no presente estudo, onde o estoque de glicogênio nos corações AO apresentou redução subsequente ao processo isquêmico, sugerindo a utilização deste metabólito na geração de energia. Estudo de DEPRE (1995) mostrou que, em coração perfundido isoladamente e submetido à isquemia de baixo fluxo, a glicogenólise cardíaca providenciou nos primeiros 15 min. cerca de 60 μ moles de glicose/g de peso contra 35 μ moles de glicose/g de peso, provenientes da captação extracelular. Vale ressaltar, que para a produção glicolítica de duas moléculas de piruvato, quando o glicogênio é a fonte de glicose 6-P, ocorre gasto de uma molécula de ATP e liberação líquida de apenas um íon H⁺, ao contrário da glicose, a qual produz dois prótons e com menor rendimento energético (ROBERGS t al., 2004). Além disso, segundo COLLINS-NAKAI et al (1994) e GOODWIN et al (1998), a glicose proveniente do glicogênio cardíaco é preferencialmente oxidada ao invés de ser convertida a lactato, o que implica em menor liberação de prótons quanto maior a energia produzida via glicogenólise. ROSSI & OLIVARES (1998) propõem uma relação direta entre o metabolismo de nucleotídeos pirimidinas e glicogênio miocárdiais. Esses autores postulam que, ao

considerar o papel essencial dos nucleotídeos pirimidinas na síntese de macromoléculas, alterações no metabolismo desses nucleotídeos refletem em profundas conseqüências na viabilidade e função cardíacas.

Considerando a homeostase glicêmica primordial para a sobrevivência, a glicose é o substrato energético mais confiável para a produção cardíaca de energia. A glicose se torna o principal substrato para o metabolismo oxidativo do coração, quando os níveis de AG estão baixos ou quando a glicose e insulina estão altas. A captação de glicose pelo coração nunca é completamente inibida, mesmo quando perfundido com AG. A importância da via anaplerótica pode explicar esse fato, visto que a glicose e o lactato, pela produção de acetil-CoA e oxaloacetato, permitem a realimentação de intermediários do ciclo de Krebs com fixação de CO₂, e assim impedindo o seqüestro de acetil-CoA durante uma oxidação prolongada de AG (DEPRE et al., 1999).

Alguns autores evidenciaram a teoria da “compartimentalização intracelular da produção cardíaca de energia” para explicar que o ATP derivado da fosforilação oxidativa e da glicólise pode subsidiar diferentes processos celulares isoladamente. Por esse conceito, o ATP derivado aerobicamente é utilizado preferencialmente para sustentar a contratilidade cardíaca e a via glicolítica é requerida para a manutenção da homeostase iônica. Vários estudos demonstraram a habilidade do metabolismo glicolítico para manter normais os níveis de Na⁺ intracelular e a atividade da bomba Na-K ATPase durante a isquemia de baixo fluxo, bem como para preservar a função miocárdial durante a reperfusão (CROSS et al, 1995; DIZON et al., 1998; GLITSCH & TAPPE, 1993; PAUL, 1983; SATOH et al, 1995; WEISS & HILTBRAND, 1985). KOCKSKÄMPER et al (2005) mostraram que a via glicolítica é requerida para manter a homeostase de Ca²⁺ intracelular, processo que envolve a modulação da bomba Ca-ATPase e dos receptores de rianodina. Esses autores confirmaram a hipótese de que a homeostase iônica está sujeita à modulação tanto do ATP derivado glicoliticamente, quanto

dos metabólitos da via. O canal de K^+ sensível ao ATP também foi demonstrado ser dependente de energia gerada pela via glicolítica (WEISS & LAMP, 1989). Em uma visão mais ampla da teoria da “compatimentalização metabólica cardíaca”, a organização modular dos processos de produção, consumo e distribuição de energia obedece à distribuição espacial dos sistemas enzimáticos dentro do cardiomiócito. Como as mitocôndrias encontram-se dispersas entre os miofilamentos, o ATP derivado mitocondrialmente é utilizado preferencialmente para suportar a atividade contrátil; as enzimas glicolíticas, ligadas ao sarcolema, estão associadas com os canais e transportadores de íons da membrana; as enzimas envolvidas na glicogenólise permitem o adequado funcionamento da bomba de Ca-ATPase sarcoplasmática e, por fim, os sistemas creatina quinase e adenilato quinase, responsáveis pela regeneração de ATP, asseguram a distribuição e sinalização energética entre os módulos metabólicos (WEISS et al., 2006). Estes estudos suportam a noção que a glicólise, apesar da menor produção de ATP comparada com a fosforilação oxidativa, desempenha papel fundamental na fisiopatologia miocárdica, atuando como importante moduladora do acoplamento excitação-contração.

No presente trabalho, observou-se que os ratos suplementados com AO apresentaram maior conteúdo miocárdico de ATP ainda na pré-isquemia e esse quadro foi mantido após a oclusão parcial da coronária. A reserva energética do coração pode ditar a duração de sua resistência ao episódio de isquemia e reperfusão subsequente. Iniciando a isquemia já com baixos níveis de ATP, reduz-se o tempo para que o estoque de energia atinja um nível crítico, abaixo do qual os prejuízos celulares se tornam irreversíveis (JENNINGS & STEENBERGEN, 1985; SAMAJA et al., 1998 e 1999). A maior disponibilidade de ATP pode minimizar a sobrecarga iônica intracelular pós-isquemia e reperfusão e, assim, retardar o comprometimento celular e funcional. A perda de substâncias difusíveis é outro aspecto crucial na determinação da recuperação cardíaca pós-isquêmica. No coração aeróbico, a desfosforilação do ATP é acoplada a fosforilação do ADP, de forma que a difusão passiva de

catabólitos de ATP no miocárdio é desprezível e facilmente compensada pela recuperação e síntese *de novo* de ATP. No entanto, quando o suprimento de energia é relativamente menor que a demanda, como na condição isquêmica, a hidrólise de ATP supera a sua síntese e, assim, ocorre perda de seus metabólitos - inosina, hipoxantina, xantina e uratos. Conforme relatado anteriormente, uma forma adaptativa de se minimizar essa perda é a adequação cardíaca do binômio perfusão-contração, onde a redução do trabalho contrátil com consequente conservação de ATP, nucleotídeos adenina totais, purinas e fosfocreatina, aproxima o suprimento energético do gasto imposto. Essa adaptação, porém, é alcançada mais facilmente quando o tecido miocárdico é submetido a pequenos episódios recorrentes de isquemia, isto é, quando é realizado o condicionamento cardíaco (DEPRE, 1999; GABEL et al, 1997; SAMAJA et al, 1998 e 1999; VOGT et al, 2002). O fluxo coronariano residual durante o processo isquêmico, segundo alguns pesquisadores, também pode delinear a extensão da perda de catabólitos difusíveis pelo sistema contrátil do miocárdio (SAMAJA et al., 1998 e 1999). Assim, a sobrecarga energética aliada ao fluxo coronariano elevado prejudica a recuperação da performance cardíaca após a reperfusão, pela inabilidade de preservação do pool de ATP. No presente estudo não foi observada nenhuma modificação do fluxo coronariano pela administração do AO.

Conforme relatado na introdução, a enzima AMPK é capaz de modular vários passos metabólicos geradores de energia. Como a suplementação dietética com AO induziu modificações metabólicas semelhantes às observadas pela ativação dessa enzima, questiona-se aqui um possível envolvimento da AMPK na otimização energética provocada pelo AO, especialmente na condição isquêmica.

Os índices de contratilidade cardíaca são importantes indicadores da integridade funcional nesse órgão. No trabalho em questão, pudemos observar que os animais que consumiram dieta suplementada com AO apresentaram maiores força sistólica ventricular e $-dT/dt$, nas condições normóxicas e isquêmicas, implicando em melhor contratilidade e recuperação do relaxamento

ventricular. Esses dados indicam que o AO induziu um efeito inotrópico positivo nesses animais, fato que se deve, ao menos em parte, ao maior rendimento energético alcançado. Isso nos permite sugerir que as modificações metabólicas induzidas pelo ácido orótico repercutem em alterações apreciáveis na função contrátil do miocárdio. Acredita-se que a otimização energética alcançada pela administração dietética de AO possa contribuir para a recuperação funcional do miocárdio durante o processo de reperfusão, fato que ainda se traduz num desafio clínico atualmente.

Sumarizando, além do AO contribuir com o suprimento de ribose necessária para síntese cardíaca de ATP e estimular a captação de glicose, via formação de nucleotídeos uridina, conforme sugerido por alguns autores (AUSSEDAT, 1983; KYPSON et al, 1978; RICHARDS et al, 1997), nossos dados permitem concluir que esse elemento melhora a performance cardíaca por interferir em vários passos metabólicos, aumentando a utilização cardíaca de glicose e ácidos graxos e, dessa forma, o pool de ATP (Figura 30).

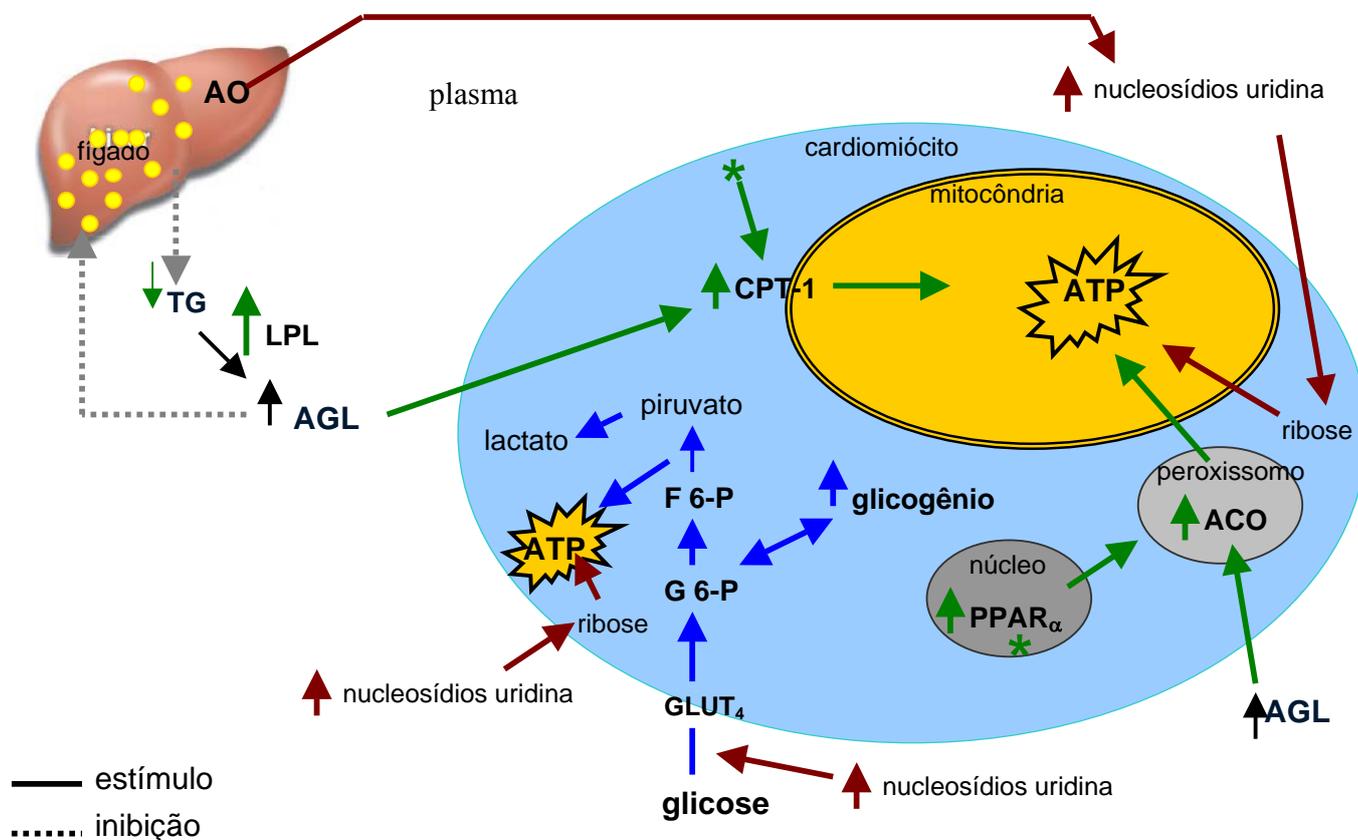


Figura 30. Esquema das alterações metabólicas evidenciadas pelo tratamento com ácido orótico:

↑ “aumento do suprimento de ribose e estímulo da captação cardíaca de glicose, pelo incremento na síntese e secreção hepática de uridina” (conforme AUSSEDT, 1983; KYPSON et al, 1978; RICHARDS et al, 1997);

↑ aumento da captação cardíaca de glicose, do fluxo glicolítico e da síntese e estoque de glicogênio;

↑ aumento da atividade da enzima LPL cardíaca e da captação de AG; aumento da oxidação de AG evidenciada pelo aumento da expressão do fator de transcrição PPAR α e das enzimas CPT-1 e ACO.

6.0 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AN, D.; PULINILKUNNIL, T.; QI, D.; GHOSH, S.; ABRAHANI, A.; RODRIGUES, B. – The metabolic “AMPK” regulates cardiac heparin-releasable lipoprotein lipase. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** **288**: 246-253, 2005.

AOYAMA, T.; PETERS, J. M.; IRITANI, N.; NAKAJIMA, T.; FURIHATA, K.; HASHIMOTO, T.; GONZALEZ, F. J. - Altered constitutive expression of fatty acid metabolizing enzymes in mice lacking the peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α). **J. Biol. Chem.** **273**: 5678–84, 1998.

ARMONI, M.; HAREL, C.; BAR-YOSEPH, F.; MILO, S.; KARNIELI, E. – Free fatty acids repress the GLUT $_4$ gene expression in cardiac muscle via novel response elements. **The J. of Biolog. Chem.** **280(41)**: 34786-95, 2005.

ARNER, P. - Free fatty acids - do they play a central role in type 2 diabetes? **Diabetes, Obesity and Metabolism** **3**: 11-19, 2001.

AUGUSTUS, A. S.; KAKO, Y.; YAGYN, H.; GOLDBERG, I. J. – Routes of FA delivery to cardiac muscle: modulation of lipoprotein lipase alters uptake of TG-derived FA. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** **284**: 331-339, 2003.

AUSSEDAT, J. – Effect of uridine supply on glycogen resynthesis after ischemia in the isolated perfused rat heart. **Cardiov. Res.** **17**: 145-151, 1983.

AUSTIN, F. L.; BORUFF, C. S. – **Proceedings of 4th conference on feeds of the grain distilleries.** **77**, Cincinnati, março, 1949.

BALLART, X.; SICHES, M.; PEINADO-ONSURBE, J.; LÓPEZ-TEJERO, D.; LLOBERA, M.; RAMÍREZ, I.; ROBERT, M. Q. – Isoproterenol increases active lipoprotein lipase in adipocyte médium and in rat plasma. **Biochimie** **85**: 971-82, 2003.

- BARGER, P. M.; KELLY, D. P. – PPAR signaling in the control of cardiac energy metabolism. **Trends Cardio. Med.** **10(6)**: 238-45, 2000.
- BELFRAGE, P.; VAUGHAN, M. - Simple liquid-liquid partition system for isolation of labeled oleic acid from mixtures with glycerides. **J. Lipid. Res.** **10**: 341-344, 1969.
- BERGMEYER – Monosaccharides and derivatives. **Methods of Enzymatic Analysis VI - Metabolites 1: Carbohydrates**: 191-198, 1988.
- BERGMEYER – UV-method with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Methods of Enzymatic Analysis VII - Metabolites II: Tri and dicarboxylic acids, purines, pyrimidines and derivatives, coenzymes, inorganic compounds**: 346-357, 1989.
- BLANCHETTE-MACKIE, E. J.; MASUNO, H.; DWYER, N. K.; OLIVECRONA, T.; SCOW, R. O. – Lipoprotein lipase in myocytes, and capillary endothelium of heart: immunocytochemical study. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** **256**: 818-828, 1989.
- BOCHER, V.; TORRA, P. I.; FRUCHART, C. J.; STAELS, B. - PPARs: Transcription factors controlling lipid and lipoprotein metabolism. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** **967**: 7-18, 2002.
- BOTION; L. M.; GREEN, A. - Long-term regulation of lipolysis and hormone sensitive lipase by insulin and glucose. **Diabetes** **48**: 1691-7, 1999.
- BRADFORD, M. - A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** **72**: 248-254, 1976.
- BRANDT, J. M.; DJOUADI, F.; KELLY, D. P. – Fatty acids activate transcription of the muscle carnitine palmitoyltransferase I gene in cardiac myocytes via the peroxisome proliferator-activated receptor α . **J. Biol. Chem.** **273**: 23786-92, 1998.

CARROLL, R.; SEVERSON, D. L. – Peroxisome proliferator-activated receptor- α ligands inhibit cardiac lipoprotein lipase activity. **Am. J. Physiol. Circ. Physiol.** **281**: 888-94, 2001.

CHA, J.Y.; MAEDA, Y.; YAMAMOTO, Y.; OOGAMI K.; YANAGITA, T. - Association between hepatic triacylglycerol accumulation induced by administering orotic acid and enhanced phosphatidate phosphohydrolase activity in rats. **Biosc. Biotech. Bioch.** **62**: 508-513, 1998.

CHINETTI, G.; LESTAVEL, S.; BOCHER, V. - PPAR α and PPAR γ activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. **Nature Med.** **7**: 53-58, 2001.

COLLINS-NAKAI, R. L.; NOSEWORTHY, D.; LOPASCHUCK, G. D. – Epinephrine increases ATP production in hearts by preferentially increasing glucose metabolism. **Am. J. Physiol.** **267**: 1862-1871, 1994.

CROSS, H. R.; OPIE, L. H.; RADDA, G. K.; CLARKE, K. – Is a high glycogen content beneficial or detrimental to the ischaemic rat heart? A controversy resolved. **Circ. Res.** **78**: 482-91, 1996.

CROSS, H. R.; RADDA, G. K.; CLARKE, K. – The role of Na⁺/K⁺ ATPase activity during low flow ischemia in preventing myocardial injury: a ³¹P, ²³Na and ⁸⁷Rb NMR spectroscopic study. **Magn. Reson. Med.** **34**: 673-85, 1995.

CUNHA, T. J.; EDWARDS, H. M.; MEADOWS, G. B.; BENSON, R. H.; SEWELL, R. F.; PEARSON, A. M.; GLASSCOCK, R. F.. **Arch. Bioch.** **28**: 140, 1950.

DEPRE, C.; VANOVERSCHELDE, J-L.; GOUDEMANT, J. F.; MOTTET, I.; HUE, L – Protection against ischemic injury by nonvasoactive concentrations of nitric oxide synthase inhibitors in the perfused rabbit heart. **Circulation** **92**:1911-1918, 1995.

DEPRE, C.; VANOVERSCHELDE, J-L.; TAEGTMEYER, H. – Glucose for the heart. **Circulation** **99**: 578-588, 1999.

DESHAIES, Y.; ARNOLD, J.; LALONDE, J.; RICHARD, D. - Lipoprotein lipase in white and brown adipose tissues of exercised rats fed a high-fat diet. **Am. Physiol. Society**. **255**: 226-31, 1988.

DIZON, J.; BURKHOFF, D.; TAUSKELA, J; WHANG, J.; CANNON, P.; KATZ, J. – Metabolic inhibition in the perfused rat heart: evidence for glycolytic requirement for normal sodium homeostasis. **Am. J. Physiol.** **274(Heart Circ. Physiol. 43)**: 1082-9, 1998.

DYCK, J. R. B.; CHENG, J.-F.; STANLEY, W. C.; BARR, R.; CHANDLER, M. P.; BROWN, S.; WALLACE, D.; ARRHENIUS, T.; HARMON, C.; YANG, G.; NADZAN, A. M.; LOPASCHUK, G. D. – Malonyl coenzyme A decarboxylase inhibition protects the ischemic heart by inhibiting fatty acid oxidation and stimulating glucose oxidation. **Circ. Research** **94**: 78-84, 2004.

ENRIQUEZ, Y. R. – Interpretaciones recientes sobre el metabolismo lipídico en la resistencia a la insulina. **Revista Cubana Alim. Nutr.** **16(1)**: 54-62, 2002.

FARAJ, M.; CIANFLONE, K. – Differential regulation of fatty acid trapping in mouse adipose tissue and muscle by ASP. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** **287**: 150-159, 2004.

FERDINANDY, P.; FAZEKAS, T.; KÁDÁR, É. – Effects of orotic acid on ischaemic/reperfused myocardial function and glycogen content in isolated working rat hearts. **Pharmacol. Res.** **37(2)**: 111-114, 1998.

FERREIRA, A. V. M. - Efeito do Fenofibrato (agonista PPAR α) no metabolismo lipídico de ratos com esteatose hepática induzida pela administração de ácido orótico. Dissertação de mestrado apresentada ao Departamento de Fisiologia e Biofísica – ICB-UFMG, 2004.

FERREIRA, A. V. M. - Efeito do Fenofibrato sobre o metabolismo de ratos alimentados com ou sem indução de esteatose hepática. Tese de doutorado apresentada ao Departamento de Fisiologia e Biofísica – ICB-UFMG, 2007.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. – A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J. Biol. Chem.** **226**: 497-509, 1957.

GABEL, S. A.; CROSS, H. R.; LONDON, R. E.; STEENBERGEN, C.; MURPHY, E. – Decreased intracellular pH is not due to increased H⁺ extrusion in preconditioned rat hearts. **Am. J. Physiol.** **273 (Heart Circ. Physiol. 42)**: 2257-62, 1997.

GLITSCH, H.G.; TAPPE, A. – The Na⁺/K⁺ pump of cardiac Purkinje cells is preferentially fuelled by glycolytic ATP production. **Pflügers Arch.** **422**: 380-5, 1993.

GOES, S.; FREIRE-MAIA, L.; ALMEIDA, A. P. – Effects of anesthetics on the incidence and duration of reperfusion arrhythmias in isolated rat heart. **Brazilian J. Med. Res.** **26**: 1091-1095, 1993.

GOIKOETXEA, M. J.; BEAUMONT, J.; DIEZ, J. – Peroxisome proliferator-activated receptor alpha and hypertense heart disease. **Drugs**, **64(2)**: 9-18, 2004.

GOLFMAN, L. S.; WILSON, C. R.; SHARMA, S.; BURGMAIER, M.; YOUNG, M. E.; GUTHRIE, P. H.; ARSDALL, M. V.; ADROGUE, J. V.; BROWN, K. K.; TAEGTMEYER, H. – Activation of PPAR γ enhances myocardial glucose oxidation and improves contractile function in isolated working hearts of ZDF rats. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** **289**: 328-36, 2005.

GOODWIN, G. W.; AHMAD, F.; DOENST, T.; TAEGTMEYER, H. – Energy provision from glycogen, glucose and fatty acids on adrenergic stimulation of isolated working rat hearts. **Am. J. Physiol.** **274**: 1239-1247, 1998.

HAJRI, T.; ABUMRAD, N. A. – Fatty acid transport across membranes: relevance to nutrition and metabolic pathology. **Annu. Rev. Nutr.** **22**: 383-415, 2002.

HAMILTON, R. L.; GUO, L. S.; FELKER, T. E.; CHAO, Y. S.; HAVEL, R. J. - Nascent high density lipoproteins from liver perfusates of orotic acid-fed rats. **J. Lipid Res.** **27(9)**: 967-78, 1986.

HASSID, W. Z.; ABRAHAM, S. – Determination of glycogen with anthrone reagent. **Methods Enzimol. III**: 35-36, 1957.

HAY, R.; FLEMING, R.; O'CONNELL, W.; KIRSCHNER, J.; OPPLIGER, W. - Apolipoproteins of the orotic acid fatty liver: implications for the biogenesis of plasma lipoproteins. **J. Lipid Research** **29**: 981-995, 1988.

HEBBACHI, A. M.; SEELAENDER, M. C. L.; BAKER, P. W.; GIBBONS, G. F. - Decreased secretion of very low density lipoprotein triacylglycerol and apolipoprotein B is associated with decreased intracellular triacylglycerol lipolysis in hepatocytes derived from rats fed orotic acid or n-3 fatty acids. **Biochem. J.** **325**: 711-719, 1997.

HOROST, H. J. – D-glucose-6-phosphate and D-fructose-6-phosphate determination with glucose-6-phosphate dehydrogenase and phosphoglucose isomerase. In. Bergmeyer H. V., **Methods of Enzymatic Analysis**, Acad. Pres., New York, London, 134-139, 1973.

JENNINGS, R. B.; STEENBERGEN C. JR. - Nucleotide metabolism and cellular damage in myocardial ischemia. **Annu Rev Physiol.** **47**: 727-49, 1985.

JOHNS, T. N.; OLSON, B. J. – Experimental myocardial infarction: A method of coronary occlusion in small animals. **Ann. Surg.** **140(5)**: 675-682, 1954.

KATZ, A. M. – Physiology of the heart. 4th ed.. Energetics and Energy production, p40-p81. **Library of Congress Cataloging**, 2006.

KERSTEN, S. - Peroxisome Proliferator activated Receptor and obesity. **European J. Pharm.** **440**: 223-234, 2002.

KETTELHUT, I. C.; FOSS, M. C.; MIGLIORINI, R. H. - Glucose homeostasis in a carnivorous animal (rat) and in rats fed a high-protein diet. **Am. J. Physiol.** **239**: 437-444, 1980.

KING, L. M.; OPIE, L. H. – Glucose delivery is a major determinant of glucose utilization in the ischemic myocardium with a residual coronary flow. **Cardiovasc. Res.** **39**: 381-92, 1998.

KING, L. M.; SIDELL, R. J.; WILDING, J. R.; RADDA, G. K.; CLARCKE, K. – Free fat acids, but not ketone bodies, protect diabetic rat hearts during low-flow ischemia. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** **280**: 1173-81, 2001.

KOCKSKÄMPER, J.; ZIMA, A. V.; BLATTER, L. A. – Modulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release by glycolysis in cat atrial myocytes. **J. Physiol.** **564(3)**: 697-714, 2005.

KYPSON, J.; HAIT, G.; MATHEW, R – Effects of uridine on the performance and the metabolism of oxygenated and hypoxic rabbit hearts. **J. Mol. Cell. Cardiol.** **10**: 545-565, 1978.

LAEMMLI, U. K. - Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** **227**: 680-685, 1970.

LAWRENCE, A.; POTTENGER; GODFREY, S.; GETZ - Serum lipoprotein accumulation in the livers of orotic acid-fed rats. **J. Lip. Res.** **12**: 450-459, 1971.

LAWRENCE, J. W.; LI, Y.; CHEN, S.; DELUCA, J. G.; BERGER, J. P.; UMBENHAUER, D. R.; MOLLER, D. E.; ZHOU, G. - Differential gene regulation in human vs rodent hepatocytes by peroxisome proliferator - activated receptors alpha: PPAR alpha fails to induce peroxisome proliferation- associated genes in humans cells independently of the level of receptor expression. **J Biol Chem.** **276**: 31521-27, 2001.

LEVAK-FRANK, S.; HOFMAN, W.; WEINSTOCK, P. H.; RADNER, H.; SATTLER, W.; BRESLOW, J. L.; ZECHNER, R. – Induced mutant mouse lines that express lipoprotein lipase in cardiac muscle, but not in skeletal muscle and adipose tissue, have normal plasma triglyceride and high-density lipoprotein-cholesterol levels. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **96**: 3465-70, 1999.

LOUET, J. F.; CHATELAIN, F.; DECAUX, J. F.; PARK, E. A.; KOHL, C.; PINEAU, T.; GIRARD, J.; PEGORIER, J. P. - Long-chain fatty acids regulate liver carnitine palmitoyl- transferase I gene (L-CPT1) expression through a peroxisome proliferator - activated receptors alpha - independent pathway. **Biochem. J.** **354**: 189-97, 2001.

LUBBE, W. F.; DARIES, P. S.; OPIE, L. H. – Ventricular arrhythmias associated with coronary artery occlusion and reperfusion in the isolated perfused rat heart: a model for assessment of antifibrillatory action of antiarrhythmic agents. **Cardiovasc. Res.** **12**: 212-220, 1978.

MANNA, L.; HAUGE, S. M. - A possible relationship of vitamin B₁₃ to orotic acid. **The J. Biolog. Chem.** **202(1)**: 91-6, 1953.

MARTINS, A. S.; GREENE, L. J.; YOHO, L. L.; MILSTED, A. - The cDNA encoding canine dihydrolipoamide dehydrogenase contains multiple termination signals. **Gene** **161**: 253-257, 1995.

MORIFUJI, M.; AOYAMA, Y. - Dietary orotic acid affects antioxidant enzyme mRNA levels and oxidative damage to lipids and proteins in rat liver. **J. Nutrit. Bioch.** **13**: 403-410, 2002.

NILSSON-EHLE, P. E.; SCHOTZ, M. C. - A stable radioactive substrate emulsion for assay of lipoprotein lipase. **J. Lipid Res** **17**: 536-541, 1976.

NIU, Y-G.; HAUTON, D.; EVANS, R. D. – Utilization of triacylglycerol-rich lipoproteins by the working rat Herat: routes of uptake and metabolic fates. **J. Physiol.** **558 (1)**: 225-37, 2004.

NÖHAMMER, C.; EL-SHABRAWI, Y.; SCHAUER, S.; HIDEN, M.; BERGER, J.; FORSS-PETTER, S.; WINTER, E.; EFERL, R.; ZECHNER, R.; HOEFLER, G. – cDNA cloning and analysis of tissue-specific expression of mouse peroxisomal straight-chain acyl-CoA oxidase. **Eur. J. Bioch.** **267**: 1254-60, 2000.

NOVAK, A. F.; HAUGE, S. M. – Isolation of the unidentified growth factor (vitamin B₁₃) in distillers dried solubles. **J. Biol. Chem.** **174**: 647, 1948.

OLIVER, M. F. – Metabolic causes and prevention of ventricular fibrillation during acute coronary syndromes. **The Am. J. Medicine** **112**: 305-11, 2002.

OTT, W. H.; DICKINSON, A. M.; INDERSTINE, A. V.; BAZEMORE, A. W.; PAGE, A. C.; FOLKERS, K. – Studies related to vitamin B₁₃. **The J. Nutrition** **64(4)**: 525-31, 1958.

PANAGAIA, M.; GIBBONS, G. F.; RADDA, G. K.; CLARKE, K. – PPAR- α activation required for decreased glucose uptake and increased susceptibility to injury during ischemia. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** **288**: 2677-83, 2005.

PAUL, R. J. – Functional compartmentalization of oxidative and glycolytic metabolism in vascular smooth muscle. **Am. J. Physiol.** **244(Cell. Physiol. 13)**: 399- 409, 1983.

PEDERSEN, M. E.; WOLF, L. E.; SCHOTZ, M. C. – Hormonal mediation of rat heart lipoprotein lipase activity after fat feeding. **Bioch. Biophys. Acta** **666**: 191-197, 1981.

PICARD, C. - Steatosis is not sufficient to cause an impaired regenerative response after partial hepatectomy in rats. **J. Hepat.** **32**: 645-652, 2002.

PREISS-LANDL, K.; ZIMMERMANN, R.; HAMMERLE, G.; ZECHNER, R. - Lipoprotein lipase: the regulation of tissue specific expression and its role in lipid and energy metabolism. **Curr. Opin. Lipidol.** **13**: 471-481, 2002.

PTAFFL, M. W. – A new mathematical model for relative quantification in real-time PCR. **Nucleic Acids Res.** **29 (9)**: e45, 2001.

PULINILKUNNIL, T.; ABRAHANI, A.; VARGHESE, J.; CHAN, N.; TANG, I.; GHOSH, S.; KULPA, J.; ALLARD, M.; BROWNSEY, R.; RODRIGUES, B. – evidence for rapid “ metabolic switching” through lipoprotein lipase occupation of endothelial-binding sites. **J. Mol. Cell. Cardiol.** **35**: 1093-1103, 2003.

PULINILKUNNIL, T.; AN, D.; YIP, P.; CHAN, N.; QI, D.; GHOSH, S.; ABRAHANI, A.; RODRIGUES, B. – Palmitoyl lysophosphatidylcholine mediated mobilization of LPL to the coronary luminal surface requires PKC activation. **J. Mol. Cell. Cardiol.** **37**: 931-8, 2004.

RANDLE, P. J.; HALES, C. N.; GARLAND, P. B.; NEWSHOLME, E. A. – The glucose fatty acid cycle: its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. **Lancet** **1**: 785-789, 1963.

RICHARDS, S. M.; CONYERS, R. A. J.; FISHER, J. L.; ROSENFELDT, F. L. – Cardioprotection by orotic acid: metabolism and mechanism of action. **J. Mol. Cell. Cardiol.** **29**: 3239-3250, 1997.

ROBERGS, R. A.; GHIASVAND, F.; PARKER, D. – Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. **Am. J. Physiol. Reg. Integr. Comp. Physiol.** **287**: 502-516, 2004.

ROSSI, A.; OLIVARES, J. - Basis of pyrimidine nucleotide metabolism in the myocardium. **Cardiovasc Drugs Ther.** **12(2)**: 171-7, 1998.

SASHIDA, H.; UCHIDA, K.; ABIKO, Y. – Changes in cardiac ultrastructure and myofibrillar proteins during ischemia in dogs, with special reference to changes in Z lines. **J. Mol. Cell. Cardiol.** **16**: 1161-72, 1984.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. - Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature** **414**: 799-806, 2001.

SAMAJA, M.; ALLIBARDI, S.; CHIERCHIA, S. L. – Biochemical consequences of electrical pacing in ischemic-reperfused isolated rat hearts. **Mol. and Cell. Bioch.** **194**: 245-249, 1999.

SAMAJA, M.; ALLIBARDI, S.; JONGE, R.; CHIERCHIA, S. L. – High-energy phosphates metabolism and recovery in reperfused ischaemic hearts. **Eur. J. Clin. Inv.** **28**: 983-988, 1998.

SAMBANDAM, N.; ABRAHANI, M. A.; CRAIG, S.; AL-ATAR, O.; JEON, E.; RODRIGUES, B. – Metabolism of VLDL is increased in streptozotocin-induced diabetic rat hearts. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** **278**: 1874-1882, 2000.

SAMBANDAM, N.; LOPASCHUK, G. D. – AMP- activated protein kinase (AMPK) control of fatty acid and glucose metabolism in the ischemic heart. **Progress in Lipid Res.** **42**: 238-256, 2003.

SAMBANDAM, N.; MORABITO, D.; WAGG, C.; FINCK, B. N.; KELLY, D. P.; LOPASCHUK, G. D. – Chronic activation of PPAR α is detrimental to cardiac recovery after ischemia. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** **290**: H87-95, 2006.

SATOH, H.; HAYASHI, H.; KATOH, H.; TERADA, H. KOBAYASHI, A. - Na⁺/H⁺ and Na⁺/Ca²⁺ exchange in regulation of [Na⁺]_i and [Ca²⁺]_i during metabolic inhibition. **Am. J. Physiol.** **268**(Heart Circ. Physiol. **37**): 1239-48, 1995.

SAXENA, U.; KLEIN, M. G.; GOLDBERG, I. J. – Transport of lipoprotein lipase across endothelial cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **88**: 2254-2258, 1991.

SCHMIDT, M. R.; KRISTIANSEN, S. B.; WHITE, P.; SMERUP, M.; BOTKER, H. E.; VOGEL, M.; HJORTDAL, V.; SORENSEN, K.; REDINGTON, A. – Glucose-insulin infusion improves cardiac function during fetal tachycardia. **J. Am. Coll. Cardiol.** **43**(3): 445-452, 2004.

SHEPHERD, G.; CAM, M. C.; SAMBANDAM, N.; ABRAHANI, M. A.; RODRIGUES, B. - Streptozotocin-induced diabetes enhances cardiac heparin-releasable lipoprotein lipase activity in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension** **31**(3): 878-84, 1998.

STAELS, B.; DALLONGEVILLE, J.; AUWERX, J.; SCHOONJANS, K.; LEITERSDORF, E.; FRUNCHART, C. J. - Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. **Circulation** **98**: 2088-2093, 1998.

STANDERFER, S. B.; HANDLER, P. - Fatty liver induced by orotic acid feeding. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** **90(1)**: 270-1, 1955.

STAVINOHA, M. A.; SPELLICY, J. W. R.; ESSOP, M. F.; GRAVELEAU, C.; ABEL, E. D.; HART-SAILORS, M. L.; MERSMANN, H. J.; BRAY, M. S.; YOUNG, M. E. – Evidence for mitochondrial thioesterase 1 as a peroxisome proliferator-activated receptor- α -regulated gene in cardiac and skeletal muscle. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metabol.** **287**: 888-95, 2004.

SUKOYAN, G. V.; BERBERASHVILI, T. M.; TATULASHVILI, D. R.; SAMSONIDZE, T. G. – Structural and conformational changes in myocardial and erythrocyte actin during cardiac ischemia. **Bull. Exper. Biol. And Medic.** **140(5)**: 495-8, 2005.

TAVANGAR, K.; MURATA, Y.; PEDERSON, M.E.; GOERS, J.F.; HOFFMAN, A. R.; KRAEMER, F.B. Regulation of lipoprotein lipase in the diabetic rat. **J. Clin. Invest.** **90**: 1672-1678, 1992.

TEUSINK, B.; VOSHOL, P. J.; DAHLMANS, V. E.; RENSEN, P. C.; PIJL, H.; ROMIJN, J. A.; HAVEKES, L. M. – Contribution of fatty acids released from lipolysis of plasma triglycerides to total plasma fatty acid flux and tissue-specific fatty acid uptake. **Diabetes** **52**: 614-620, 2003.

TIAN, R.; ABEL, E. D. – Responses of GLUT4-deficient hearts to ischemia underscore the importance of glycolysis. **Circulation** **103**: 2961-6, 2001.

TOTLAND, G. K.; MADSEN, L.; KLEMENTSEN, B.; VAAGENES, H.; KRYVI, H.; FROYLAND, S. H.; BERGE, R. K. – Proliferation of mitochondria and gene expression of carnitine palmitoyltransferase and fatty acyl-CoA oxidase in rat skeletal muscle, heart and liver by hypolipidemic fatty acids. **Biology of the Cell** **92**: 317-29, 2000.

VOGT, A. M.; POOLMAN, M.; ACKERMANN, C.; YILDIZ, M.; SCHOELS, W.; FELL, D. A.; KÜBLER, W. – Regulation of glycolytic flux in ischemic preconditioning. **The J. Biol. Chem.** **277(27)**: 24411-19, 2002.

WEISS, J. & HILTBRAND, B. – Functional compartmentation of glycolytic versus oxidativemetabolism in isolated rabbit heart. **J. Clin. Invest.** **75**: 436-47, 1985.

WEISS, J. N.; LAMP, S. T. – Cardiac ATP-sensitive K⁺ channels. Evidence for preferential regulation by glycolysis. **J. Gen. Physiol.** **94**: 911-35, 1989.

WEISS, J. N.; YANG, L.; QU, Z. – Network perspectives of cardiovascular metabolism. **J. Lipid Res.** **47**: 2355-66, 2006.

WINDMUELLER, H.G. - An Orotic Acid-induced, adenine-reversed inhibition of hepatic lipoprotein secretion in rat. **J. Biol. Chem.** **239**: 530-537, 1964.

WU, P.; INSKEEP, K.; BOWKER-KINLEY, M. M.; POPOV, K. M.; HARRIS, R. A. - Mechanism responsible for inactivation of skeletal muscle pyruvate dehydrogenase complex in starvation and diabetes. **Diabetes** **48(8)**: 1593-9, 1999.

WINDMUELLER, H. G.; SPAETH, A. E. - Perfusion in situ with tritium oxide to measure hepatic lipogenesis and lipid secretion. Normal and orotic acid-fed rats. **J. Biol. Chem.** **241(12)**: 2891–9, 1966.

ZHU, P.; LU, L.; XU, Y.; GREYSON, C.; SCHWARTZ, G. G. – Glucose-insulin-potassium preserves systolic and diastolic function in ischemia and reperfusion in pigs. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** **278**: 595-603, 2000.

ZIMMERMANN, R.; STRAUSS, J. G.; HAEMMERLE, G.; SCHOISWOHL, G.; BIRNERGRUENBERGER, R.; RIEDERER, M.; LASS, A.; NEUBERGER, G.; EISENHABER, F.; HERMETTER, A.; ZECHNER, R. – Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. **Science** **306**: 1383-1386, 2004.