

Tesis de Posgrado

Estudios sobre el mecanismo de las alteraciones producidas en la glucólisis y la glucogenolisis en el miocardio de ratas intoxicadas con fluoroacetato

Godoy, Héctor Manuel

1975

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Godoy, Héctor Manuel. (1975). Estudios sobre el mecanismo de las alteraciones producidas en la glucólisis y la glucogenolisis en el miocardio de ratas intoxicadas con fluoroacetato. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1504_Godoy.pdf

Cita tipo Chicago:

Godoy, Héctor Manuel. "Estudios sobre el mecanismo de las alteraciones producidas en la glucólisis y la glucogenolisis en el miocardio de ratas intoxicadas con fluoroacetato". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1975.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1504_Godoy.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTUDIOS SOBRE EL MECANISMO DE LAS ALTERACIONES PRODUCIDAS

EN LA GLUCCLISIS Y LA GLUCOGENOLISIS EN EL MIOCARDIO

DE RATAS INTOXICADAS CON FLUROACETATO

HECTOR MANUEL GODOY

Tesis presentada para optar al título de

DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

1975

Deseo expresar mi reconocimiento al Dr. José A. Castro, Director de esta Tesis, no sólo por haber impulsado y apoyado este trabajo, sino fundamentalmente por haber inyectado en mí una inquietud que los años y las dificultades no han logrado atenuar.

Agradezco también:

- Al Dr. Marcelo J. Vernengo, por el interés demostrado en estos estudios, y por su positiva labor para desarrollar esta especialidad en el país.
- Al Instituto Nacional de Farmacología y Bromatología, por el apoyo prestado a través de una beca que permitió la concreción de esta Tesis.
- A María del Carmen Villarruel, por su infatigable compañerismo y su generoso espíritu de ayuda.
- A Eileen C. Lawes, por su desinteresada y eficientísima colaboración en la escritura a máquina de este trabajo.
- A Mercedes C. de Godoy, por la impecable realización de los dibujos.
- A mis compañeros y demás integrantes del Laboratorio de Química Biotoxicológica, CITEFA, por sus múltiples atenciones y su permanente cordialidad.

Agradezco muy especialmente:

A MIS PADRES

A MI ESPOSA

A MIS HIJOS

A quienes debo todo lo que soy,
y hacia quienes se destinan en
última instancia todos los es-
fuerzos, así como los modestos
frutos de una tarea realizada
con fe y con cariño.

INDICE

	<u>Página</u>
INTRODUCCION	1
PARTE EXPERIMENTAL	
MATERIALES	27
METODOS	28
RESULTADOS	41
DISCUSION	55
CONCLUSIONES	76
REFERENCIAS	78

INTRODUCCION

Generalidades

El ácido monofluoroacético y sus derivados son sustancias de alto interés para los toxicólogos, los bioquímicos y los biólogos en general. Esto se debe a sus extraordinarias propiedades biológicas, cuyo estudio ha constituido un capítulo ya clásico de la ciencia toxicológica.

Si bien estas sustancias fueron preparadas por síntesis hacia fines del siglo pasado (1), sus efectos sobre los seres vivos sólo se conocieron casi cincuenta años más tarde (2). En esos momentos los investigadores llegaron al convencimiento de que el ácido fluoroacético puede considerarse una de las sustancias más tóxicas que se conocen. Para algunas especies, es más tóxico incluso que el ácido cianhídrico, el monóxido de carbono o el fosgeno (3).

Posteriormente el fluoroacetato pudo ser identificado como el principio activo de la *Dycapetalum cymosum* (4), una planta ponzoñosa que crece en África meridional y que es un riesgo considerable para el ganado de la región. Más recientemente este tóxico fue también encontrado en otras especies vegetales: *Palicourea margravii* (5), *Acacia georginae* (6), *Gastrolubium grandiflorum* (7), y en diversas especies de *Oxylobium* (8). El caso de *Acacia georginae* es particularmente serio en Australia, donde ha sido estimado que, debido a la toxicidad del fluoroacetato las pérdidas de animales en una sola estancia pueden alcanzar un valor de 50.000 libras

esterlinas.

Hacia 1945 el fluoroacetato de sodio (en adelante FAc) fue introducido en el mercado como rodenticida, y en general, como agente de control de plagas mamíferas, bajo el nombre de "Compuesto 1080". Lamentablemente su uso dio origen a varias intoxicaciones humanas, muchas de ellas fatales. Por otra parte, dada la considerable estabilidad química y biológica del FAc, puesto que es difícilmente metabolizado en los organismos vivos, su uso extensivo puede dar lugar a la destrucción de toda la población animal en las áreas tratadas. Por estas razones la aplicación de esta sustancia como rodenticida ha sido restringida a los casos de extrema gravedad. En algunos países, sin embargo, se lo sigue utilizando en forma rutinaria.

Otra aplicación importante que ha tenido el FAc ha sido como herramienta en el laboratorio bioquímico. Por su condición de inhibidor específico ha sido utilizado para estudiar mecanismos de regulación de algunos caminos metabólicos en los tejidos (9).

Durante la segunda guerra mundial, diversos grupos de científicos estudiaron estas sustancias con miras de desarrollar medios de defensa frente a su hipotética utilización como agresivos químicos, aunque afortunadamente esta posibilidad no llegó a concretarse. A pesar de los esfuerzos realizados, no fue posible hasta el presente desarrollar un antídoto eficaz

para contrarrestar la intoxicación.

En 1949, Chenoweth publicó una excelente monografía sobre el tema (3), donde puede consultarse con abundancia de detalles todo lo referente a las propiedades químicas y biológicas del FAc y sus derivados, dosis letales y síntomas en las distintas especies, etc. En fechas más recientes R. E. Peters, a quien se debe la aclaración del mecanismo de la toxicidad del FAc, publicó diversos trabajos monográficos de actualización sobre este tema (10,11).

Efectos sobre animales vivos

Los efectos directos y los síntomas observados después de administrar este tóxico a animales no anestesiados difieren considerablemente con la especie. En líneas generales se puede decir que los puntos de ataque principales son el sistema nervioso central o el corazón (3). Ambos sistemas suelen estar afectados en grados variables de acuerdo con la especie, y la muerte suele sobrevenir por alguna de las siguientes causas: a) paro respiratorio asociado con fuertes convulsiones tónicas que paralizan los músculos respiratorios, b) paro cardíaco o fibrilación ventricular, y c) depresión progresiva del sistema nervioso central terminando en paro respiratorio o cardíaco (10).

Un factor común a todas las especies es la existencia de un período de latencia durante el cual no se manifiestan

síntomas, si bien la duración de este período varía considerablemente de una especie a otra (3). En realidad, existen pocas sustancias tóxicas cuyo efecto sea tan variable para distintas especies como el FAc. La Dosis Letal 50 varía desde 0,05 mg/kg en el perro hasta mas de 500 mg/kg en una especie de sapos (3). La DL 50 para el hombre fue estimada entre 2 y 5 mg/kg.

Otro de los síntomas observados en los animales intoxicados es el desarrollo paulatino de un síndrome hiperglucico e hipercetonémico que fue estudiado sobre todo en ratas (12) y en ovejas (13). Este síndrome tiene una semejanza tan grande con la diabetes natural o inducida, que ha sido denominado "diabetes fluoroacetica" (14). En la rata este síntoma se manifestó diversas horas después de la administración del tóxico, y fue observado inclusive con dosis subletales (14).

Aspectos bioquímicos y mecanismo de acción

Los estudios más tempranos llevados a cabo sobre las alteraciones bioquímicas producidas por la intoxicación, no permitieron evidenciar la inhibición de algún sistema enzimático "in vitro" por el FAc o sus derivados (11). Los experimentos realizados con cortes u homogenatos de tejidos, con mitocondrias aisladas, etc., en cambio, revelaron que el tóxico produce una inhibición del consumo de oxígeno, así

como un bloqueo en la oxidación de diversos sustratos (3).

Posteriormente se postuló que el FAc ejerce su efecto tóxico a través de una inhibición de la conversión de acetato en "acetato activo" (hoy conocido como acetyl coenzima A), puesto que en diversas preparaciones se encontraba una acumulación de acetato (15). Más tarde se comprobó que esta hipótesis era incorrecta, ya que se vio que en homogenato de riñón de cobayo el FAc es capaz de bloquear la oxidación del fumarato sin que se acumule acetato (16).

Un avance importantísimo en este campo se logró cuando Kalnitzky y Barron (17) observaron que en homogenato de riñón de conejo tratados con FAc se producía una notable acumulación de ácido cítrico. Este fenómeno fue confirmado más tarde con otras preparaciones, y se demostró que esta acumulación se debía a una inhibición de la oxidación de citrato a través del ciclo de Krebs (18). Buffa y Peters (19) encontraron que el citrato también se acumula "in vivo", y desde entonces hasta el presente este fenómeno ha sido reiteradamente registrado por todos los autores que trabajaron con este tóxico, utilizando una amplia gama de animales y tejidos (11).

Como vemos, se presentaba una aparente contradicción, puesto que: por un lado esta inhibida la oxidación del ácido cítrico a través del ciclo de Krebs, en tanto que el FAc no inhibe las enzimas que componen el ciclo. Para

resolver esto, Liebecq y Peters propusieron que el FAc podría convertirse en fluorocitrato, a través de un mecanismo similar al que permite la conversión de acetato en citrato (20). Este fluorocitrato podría ser el verdadero agente tóxico. Los experimentos que se realizaron con posterioridad confirmaron plenamente esta hipótesis. En efecto, Peters y sus colaboradores pudieron aislar ácido fluorocítico de los tejidos intoxicados, y comprobaron que en un potentísimo inhibidor de la aconitasa, enzima del ciclo de Krebs que cataliza la transformación de citrato en isocitrato (11). El fluorocitrato demostró así ser tóxico en condiciones en que el FAc no lo era, por ejemplo, cuando se lo inyecta intracerebralmente en palomas, produce convulsiones y muerte, en tanto que el FAc no tiene efecto (21). Esto revela que este tejido es incapaz de promover la síntesis de fluorocitrato, y confirma que éste es el verdadero agente tóxico.

Posteriormente se pudo demostrar que el FAc sigue efectivamente la misma vía metabólica que el acetato, siendo transformado en el interior de los tejidos en fluoroacetil coenzima A (22), la cual es capaz de condensarse posteriormente con oxalacetato para dar fluorocitrato. Este proceso fue denominado "síntesis letal" por Peters, pues implica la formación en el organismo de un tóxico poderoso a partir de un precursor que no lo es (10).

La aclaración de este mecanismo permitió explicar muchas de los interrogantes que había planteado el estudio de este toxico. Por ejemplo, la existencia de un período de latencia se explica teniendo en cuenta el tiempo necesario para que se sintetice fluorocitrato en cantidad suficiente; la gran variabilidad de sensibilidad de diferentes especies animales, o de diferentes órganos dentro de un mismo animal, podría deberse en parte a la distinta capacidad de cada tejido para llevar a cabo la síntesis letal, etc. (11).

Consecuencias fisiológicas de la inhibición de la aconitasa

La inhibición de la aconitasa determina el bloqueo de todo el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, que es como se sabe la principal vía del metabolismo aerobio de las células (23). Esto explica la inhibición del consumo de oxígeno de los tejidos, puesto que si bien la respiración celular, o sea la cadena respiratoria, no está inhibida, la célula no puede efectuar la transferencia de grupos reductores necesaria para que se complete el proceso de la respiración (24). De esto se deduce que el balance energético de los tejidos estará alterado, puesto que la mayor parte de la energía necesaria para las funciones fisiológicas se obtiene a través del metabolismo oxidativo (23). Naturalmente, no todos los tejidos resultarán afectados en la misma magnitud. Se puede

suponer que serán más sensibles aquellos tejidos cuya función requiera un mayor consumo de energía, dado que son al mismo tiempo los más dependientes del metabolismo aerobio (25). Tal es el caso del corazón, el riñón o el sistema nervioso central (26).

Todo esto ha sido confirmado mediante determinaciones del contenido de "fosfatos de alta energía", tales como el adenosina-trifosfato (ATP) o el creatina-fosfato (CP). La concentración de estos compuestos disminuye en los tejidos intoxicados (10), en tanto que aumenta la de los productos de degradación (adenosina-monofosfato, AMP, fosforo inorgánico, etc.) (10). De hecho, las alteraciones bioquímicas son análogas a las que se producen como consecuencia de una hipoxia o una isquemia del tejido (27). Esto puede explicar los trastornos observados en la función cardíaca o nerviosa.

Por otra parte, la conexión entre la inhibición de la aconitasa y el desarrollo de la hiperglucemia y la cetonemia no resulta tan clara. Se ha sugerido que la hiperglucemia puede resultar de una inhibición del consumo periférico de glucosa debida a la acumulación de citrato en los tejidos (14), puesto que se sabe que el citrato ejerce un efecto inhibitorio sobre el consumo de glucosa (28). La cetonemia a su vez podría derivar de la acumulación de acetil coenzima A en algunos tejidos, especialmente en hígado, que al no poder

ser metabolizada a través del ciclo de Krebs derivaría en la síntesis incrementada de acetoacetato (3).

Tratamiento

Hasta el momento no se ha logrado desarrollar un antídoto satisfactorio contra este tóxico. El tratamiento es enteramente sintomático, si bien existe una sustancia, la monoacetina, que ha sido recomendada dado su efecto beneficioso en animales de experimentación (10). Pero en realidad no se trata de un verdadero antídoto, puesto que su acción se ejerce a través de un aumento en la concentración de acetil coenzima A, la cual compete con la fluoroacetil coenzima A, retardando la síntesis de fluorocitrato (11). Es decir, la eficacia de la monoacetina depende de que sea administrada durante el período de latencia de la intoxicación, pero es incapaz de reactivar la aconitasa una vez que esta ha sido inhibida por el fluorocitrato (11).

En este punto conviene mencionar que experimentos realizados in vitro, con diversas preparaciones de aconitasa representando crecientes niveles de organización, permitieron hallar compuestos que son capaces de reactivar la aconitasa inhibida por fluorocitrato. Es el caso, particularmente, de ciertos malonatos sustituidos (11). Sin embargo, el intento de utilizar estas sustancias como antídotos condujo invariablemente al fracaso, por razones que se ignoran (11). Este

hecho llevó a plantear la posibilidad de que exista algún factor todavía desconocido acerca del mecanismo de la intoxicación. Entre las diversas hipótesis que se enunciaron, vamos a mencionar dos que están relacionadas con el presente trabajo. Una de ellas tiene en cuenta la posibilidad de que la acumulación intracelular de tan grandes cantidades de citrato tenga un efecto nocivo por si misma, es decir, que una vez producida dicha acumulación ya el daño sea irreversible con respecto a la lesión bioquímica inicial. Otra idea se refiere al posible papel agravante que puede ejercer el estado diabético (hiperglucemia, cetoacidosis, etc.) sobre los síntomas de la intoxicación.

En resumen, no todos los efectos que tiene el FAc son explicables en términos de la sola inhibición de la aconitasa por el fluorocitrato. Existe la posibilidad de que efectos aparentemente secundarios de la intoxicación fluoroacética, tales como el estado diabético que la acompaña o la gran acumulación de citrato que se observa, u otros, tenga una participación importante en los trastornos que finalmente producen la muerte. Hasta ahora no se ha logrado obtener evidencia experimental concluyente para avalar estas u otras posibilidades.

Descripción del tema específico enfocado en el presente trabajo

Como hemos visto, uno de los órganos cuyo funcionamiento está severamente alterado en el animal intoxicado es el corazón. Sin duda, el mantenimiento de la función cardíaca requiere un considerable consumo de energía, la cual sólo puede ser provista adecuadamente cuando funcionan todos los mecanismos metabólicos del tejido. A este respecto, se sabe que el bloqueo del metabolismo aerobio puede producir un serio trastorno en la función del órgano. En el caso extremo, o sea en la anoxia total, se vio que muy corto tiempo, quizás no más de un minuto, es suficiente para producir alteraciones irreversibles (29). Esto parecería indicar que el metabolismo anaerobio es por sí solo totalmente incapaz de sostener el funcionamiento del tejido, posiblemente debido a la baja eficiencia de esta vía metabólica en la producción de energía. No obstante, se considera que el aporte energético obtenido a través de la glucogenólisis y la glucólisis puede ayudar considerablemente a un corazón que tenga parcial o transitoriamente comprometida su oxigenación (30). Desde el punto de vista experimental, esto se puede apreciar particularmente bien cuando se utilizan algunos modelos, como por ejemplo el corazón perfundido, en los cuales se puede producir hipoxia sin interrumpir el flujo sanguíneo. Este tipo de modelo es en alguna medida relevante con respecto a la intoxicación con FAc, ya que, como vimos, este tóxico produce una serie de alteraciones bioquímicas similares a las que causa

la hipoxia del tejido, pero, a diferencia de lo que sucede en la isquemia coronaria, etc., no interrumpe el flujo sanguíneo. Con este tipo de experimentos se probó que la glucólisis puede jugar un papel importante en la provisión de energía para el corazón hipóxico. Por ejemplo, Jang (31) encontró que en aurículas de conejo sometidas a perfusión anóxica, se lograba una mayor fuerza de contracción y frecuencia incrementada en presencia de glucosa. Estos efectos eran inhibidos por iodoacetato y 2-deoxiglucosa. Regen y col.(32) informaron recientemente que, después de 15 min. de perfusión anaeróbica en ausencia de glucosa, el contenido de ATP de corazones de rata era en promedio 2.8μ moles/g de tejido seco, pero en presencia de glucosa 5.6 mM , un grupo comparable de corazones contenía $13.3 \mu\text{mol ATP/g}$. Después de perfusión aeróbica, en cambio, los corazones tenían $17.7 \mu\text{mol ATP/g}$ sin glucosa y $17.9 \mu\text{mol/g}$ con glucosa. Austen y col.(33) informaron que, cuando un período de isquemia en el corazón del perro era precedido por una infusión de glucosa a través de las arterias coronarias (la isquemia era inducida por oclusión aórtica), la función ventricular y la fuerza contráctil mejoraban notablemente. Weissler y col. (34) encontraron que tras una exposición de 30 minutos a condiciones de perfusión anóxica, el corazón de rata mejoraba notablemente en su desempeño eléctrico y mecánico cuando se incluía glucosa en el líquido de perfusión. La microscopía electrónica de secciones del miocardio reveló que

la perfusión anóxica sin glucosa originaba cambios morfológicos a nivel de las mitocondrias y los túbulos longitudinales, que no se manifestaban en los corazones perfundidos con glucosa. A conclusiones parecidas llevan los trabajos de Opie (35), Majid y col. (36) y otros. Como vemos, estos experimentos revelan que la glucólisis puede desempeñar un papel importante no sólo a través de la provisión de energía para el corazón anóxico, sino también mediante la preservación de la integridad estructural del órgano durante las condiciones adversas, ayudando luego a la posible recuperación de las propiedades fisiológicas normales.

En el caso de la intoxicación fluoroacética, sin embargo, existe una complicación adicional, debida a la acumulación de citrato en el tejido. Se considera que el citrato puede actuar como inhibidor del flujo glucolítico, dado que es un poderoso inhibidor de la fosfofructokinasa, enzima que parece ser el paso limitante de la velocidad de todo el proceso (37). Se plantea entonces la posibilidad de que además de la lesión bioquímica inicial, es decir, la inhibición de la aconitasa por el fluorocitrato, se produzca un daño adicional derivado del papel inhibitorio del citrato sobre el proceso glucolítico. Esto privaría al tejido de los efectos protectores de la glucólisis que hemos mencionado más arriba. Por lo tanto, resulta importante establecer cuál es el efecto real del citrato en este proceso.

Mediante el presente trabajo se intenta contribuir al conocimiento en este terreno. Se estudiaron aspectos de la regulación de la glucólisis y la glucogenólisis en relación con el citrato y los otros metabolitos que tienen acción regulatoria y que se alteran por efecto del tóxico. También se trató de aclarar el efecto que tiene sobre estos fenómenos el síndrome diabético que se desarrolla en una etapa tardía de la intoxicación.

Los estudios realizados acerca del efecto del FAc sobre el proceso glucolítico en músculo produjeron resultados variables según las distintas preparaciones utilizadas. Por ejemplo, Clark y Riker, trabajando con músculo de rana tratado con FAc "in vitro", encontraron que en esas condiciones la velocidad de la glucólisis está incrementada (38). Otros estudios, sin embargo, condujeron a pensar que la glucólisis se inhibe como consecuencia de la intoxicación. Trabajando con corazón de rata perfundido Bowman encontró acumulación de glucosa intracelular y velocidad de fosforilación de glucosa disminuída utilizando FAc en el líquido de perfusión (39). Perfundiendo corazones de ratas previamente intoxicadas con FAc, los resultados fueron cualitativamente similares.

En experimentos más recientes, Williamson verificó parte de los resultados de Bowman, y demostró que en corazones perfundidos provenientes de ratas intoxicadas con FAc existe una inhibición de la captación de glucosa (40). Además, el

estudio de las concentraciones relativas de hexosa fosfatos indicaba que en esas condiciones estaba inhibida la fosfofructokinasa (FFK). Sin embargo, al intoxicar los corazones "in vitro", utilizando FAc en el líquido de perfusión, la FFK estaba activada.

Los estudios realizados "in vitro" sobre las propiedades regulatorias de la FFK, revelaron que un numeroso grupo de sustancias presentes en el medio intracelular son capaces de modificar alostéricamente su comportamiento cinético. En particular, se vio que el ATP actúa como inhibidor a pH fisiológico, en tanto que el citrato es capaz de reforzar considerablemente el efecto inhibidor del ATP. Asimismo, el AMP y el ADP, así como la fructosa difosfato (FDP) y la fructosa-6-fosfato (F6P), antagonizan dichos efectos inhibidores, y lo mismo sucede con el fosfato inorgánico (Pi) (41, 42, 43). Ahora bien, se sabe que el equilibrio de concentraciones entre dichos metabolitos está íntimamente asociado con el mantenimiento de la integridad de los mecanismos energéticos del tejido. El FAc, puesto que bloquea el metabolismo aerobio, desplaza ese equilibrio de concentraciones en forma tal que produce condiciones de activación de la FFK (menor ATP, mayor AMP, Pi, etc.), pero por otra parte también produce una espectacular acumulación de citrato, el cual es inhibidor de la enzima. Los resultados divergentes obtenidos por Williamson en sus experimentos fueron explicados postulando un predominio

de los efectos inhibitorios del citrato en un caso, o de los efectos activadores del AMP, Pi, etc. en el otro caso (40). Más aún, en base a estos resultados y otros obtenidos también en corazones perfundidos intoxicados (44), Williamson propuso el siguiente mecanismo para la intoxicación en el tejido: la inhibición de la aconitasa da lugar a disminución de las reservas energéticas, defosforilación de los nucleótidos de adenina, etc. En estas condiciones se produce una activación de la glucólisis da lugar a la acumulación de piruvato, y si la disponibilidad de oxalacetato es suficiente, se acumulará citrato. El punto clave de la hipótesis es la suposición de que la acumulación de citrato sera capaz de generar una reactivación de la aconitasa, puesto que la inhibición por el fluorocitrato es competitiva (45). La reactivación de la aconitasa traería como consecuencia el mejoramiento del balance energético del tejido, puesto que volverían a funcionar el ciclo de Krebs, la respiración celular y la fosforilación oxidativa. A raíz de todo esto aumentarían los niveles de ATP, y la FFK resultaría inhibida por el efecto combinado del ATP y el citrato. Esta inhibición de la FFK, y por lo tanto del flujo glucolítico, resultaría finalmente fatal, puesto que impediría que se siga acumulando citrato para superar la inhibición del ciclo. En apoyo a esta hipótesis, se citan experimentos en los cuales se comprobó que la administración de piruvato en el líquido de perfusión, en corazones

previamente intoxicados con FAc, produce no sólo un aumento en el contenido de citrato, sino también en el de los demás componentes del ciclo, lo que parece indicar que éste se reactiva. Además se produce un incremento en la fuerza contráctil del órgano, indicando que el balance energético ha mejorado (44). Sin embargo, no se midieron en esos experimentos los niveles de ATP, AMP, etc., los cuales hubieran podido aportar una indicación crítica acerca de la viabilidad de la hipótesis propuesta.

En este punto conviene mencionar otra serie de experimentos en los que se midieron los niveles de glucógeno cardíaco "in vivo", en ratas tratadas con FAc (46). En este caso, a diferencia de los anteriores, las determinaciones se efectuaron en función del tiempo de intoxicación. Los resultados fueron interesantes, dado que se obtuvo una curva bifásica del glucógeno cardíaco, es decir, se observó primero una brusca disminución seguida varias horas más tarde por un aumento hasta alcanzar valores similares a los de los controles. Se midieron también el citrato cardíaco y la glucemia. El citrato aumentaba rápidamente, alcanzando un máximo varias horas antes de que se iniciase la fase de acumulación de glucógeno. En cambio, el desarrollo de la hiperglucemia característica del síndrome diabético se producía en forma paralela a los aumentos del glucógeno cardíaco. En la figura No.1 hemos reproducido la graficación de estos

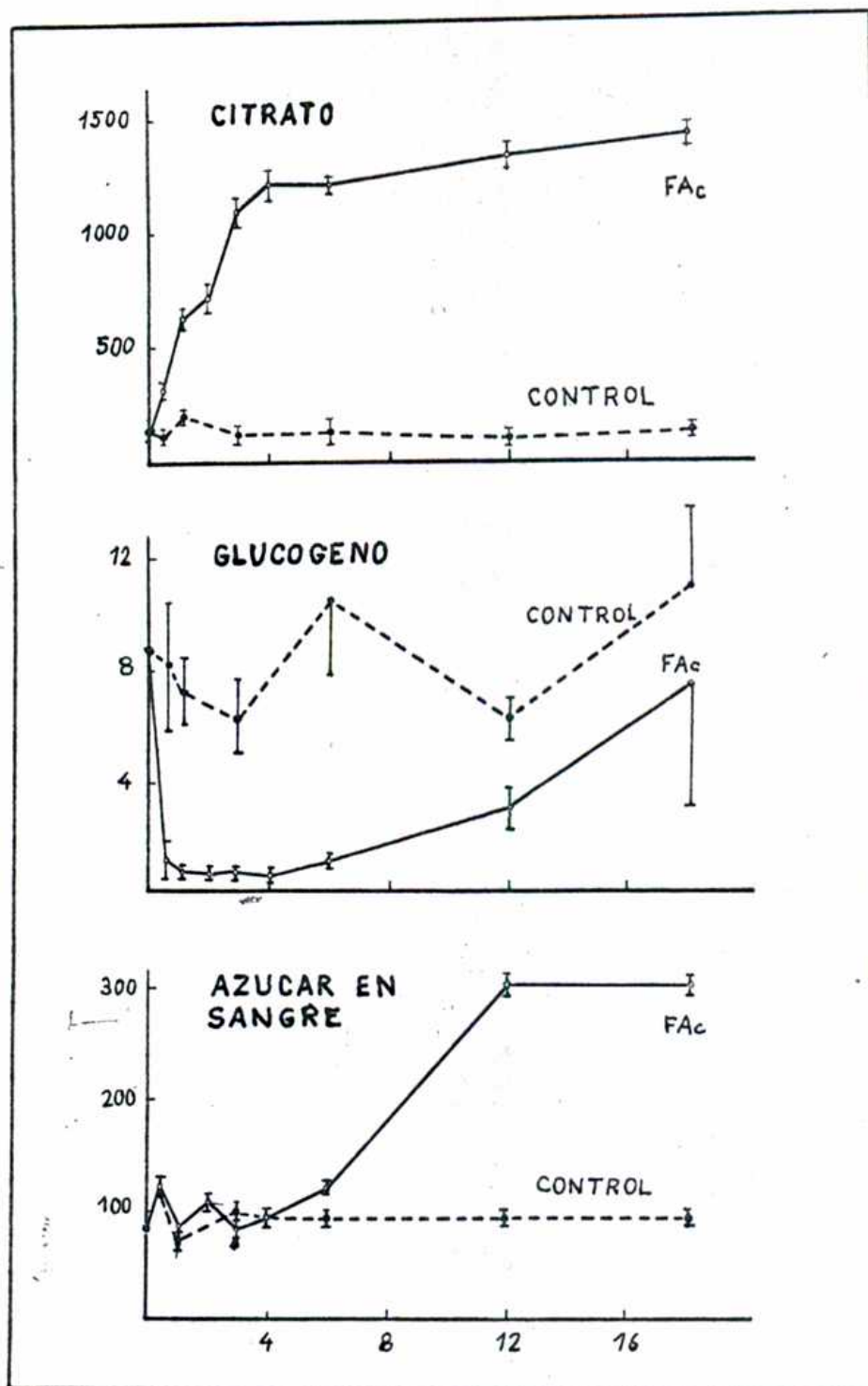


FIG. 1 .- Niveles de citrato y glucógeno cardíacos, y azúcar sanguínea en ratas tratadas con fluoroacetato (6 mg/Kg, i.p.) en función del tiempo de intoxicación. Cada punto es el valor medio de 3 a 6 determinaciones. Las barras verticales representan la desviación standard. El contenido de citrato estuvo significativamente elevado ($p < 0.001$) durante todo el período estudiado, en tanto que los niveles de glucógeno difirieron significativamente de los controles sólo durante las primeras 6 horas ($p < 0.001$), y los de azúcares sanguíneos sólo aumentaron significativamente después de las 12 horas ($p < 0.001$).

datos para que se puedan visualizar mejor las correlaciones temporales.

En la interpretación de estos resultados es preciso tener en cuenta diversos hechos relativos al mecanismo de regulación del contenido de glucógeno cardíaco. Se sabe que una rápida glucogenólisis, tal como la que se produce poco tiempo después de la intoxicación, suele obedecer a una brusca activación de la fosforilasa, enzima que degrada el glucógeno a glucosa-1-fosfato (47). Esta activación puede producirse por dos mecanismos: a) acumulación de AMP, que es activador de la fosforilasa b, y disminución del ATP, que es inhibidor de la misma (47), o b) transformación de la fosforilasa b en fosforilasa a a través de un mecanismo en el cual juegan un papel importante las catecolaminas de las terminales nerviosas adrenérgicas y el 3,5 AMP cíclico (48). En cualquiera de los dos casos la glucogenólisis incrementada va acompañada por una aceleración del flujo glucolítico, ya que tanto el AMP como el 3,5 AMP cíclico son poderosos activadores de la FFK (43). En base a esto, se consideró que la rápida glucogenólisis que se observa poco tiempo después de administrar FAc indica que en esas condiciones la glucólisis está probablemente acelerada, y se señaló como posible mecanismo, dadas las alteraciones que produce el FAc en el metabolismo energético, una activación de la fosforilasa y de la FFK por acción combinada del AMP, el Pi, la disminución

del ATP, etc. (46). Sin embargo, la acumulación de glucógeno que se produce en la etapa posterior no se puede interpretar fácilmente con sólo estos elementos de juicio. Un análisis superficial llevaría a pensar que en esta segunda etapa de la intoxicación el citrato acumulado es capaz de inhibir la fosfofructokinasa, y que eso lleva a una síntesis incrementada del glucógeno. En efecto, se ha sugerido que una inhibición de la FFK puede llevar a una acumulación de glucógeno, probablemente por alguno de los siguientes mecanismos: 1) por acción de masas, dado que se acumulan hexosafosfatos que son precursores en la biosíntesis del glucógeno, o 2) a través de una activación de la glucógeno sintetasa por efecto de la glucosa-6-fosfato acumulada (49). En el caso de los animales diabéticos o ayunados, en los cuales existen niveles incrementados de glucógeno cardíaco, se acepta que ocurre un mecanismo de este tipo.

Pero en la rata intoxicada con FAc existen algunas dificultades para aceptar esta interpretación. En primer lugar, se observa en la fig. 1 la correlación en el tiempo entre las curvas de citrato y de glucógeno, se puede ver que el citrato alcanza niveles máximos varias horas antes de que comience a reaccumularse el glucógeno. De ocurrir el mecanismo mencionado más arriba, cabría esperar que la curva de glucógeno acompañase a la de citrato. O dicho de otra manera si los niveles de AMP, Pi, etc. son tales que pueden contrarrestar

el efecto inhibitorio del citrato durante las primeras 6 horas de la intoxicación, también deberían hacerlo más adelante, puesto que los niveles de citrato no aumentan en forma muy sustancial después de la 4a hora. Este razonamiento nos lleva a considerar la posibilidad de que en esta segunda etapa de la intoxicación se produzca una modificación en el estado energético del tejido, o sea en la relación $ATP/AMP + Pi$, que haga posible la inhibición de la FFK por el citrato. Una manera de que esto ocurra sería a través de un mecanismo como el postulado por Williamson, que hemos descrito anteriormente (40).

Existen por supuesto otras posibilidades para explicar lo que ocurre con el glucógeno cardíaco en los animales intoxicados. Una de ellas se pone de manifiesto al observar la correlación temporal entre la curva de glucógeno y la de glucemia (ver fig.1). En este caso las modificaciones son perfectamente paralelas, y si bien esto no implica que la acumulación de glucógeno cardíaco esté causada por la hiperglucemia, sugiere que esta posibilidad debe ser tomada en cuenta. Como dejamos mas arriba, se sabe que en los animales diabéticos o ayunados se produce una acumulación de glucógeno cardíaco, así como una inhibición de la FFK y de la fosforilación y consumo de glucosa en este mismo tejido (50). Este fenómeno no se produce en animales previamente adrenalectomizados o hipofisectomizados (51). Experimentos

llevados a cabo con corazones perfundidos sugirieron que en la génesis de esta inhibición de la glucólisis pueden jugar un papel importante los ácidos grasos libres y/o los cuerpos cetónicos (acetoacetato, hidroxibutirato, etc.), que aparecen en la sangre de los animales diabéticos o ayunados (52). Más aún, tanto la administración de ácidos grasos o cuerpos cetónicos en la dieta de los animales, como la perfusión de corazones con estas sustancias, provocaban un aumento en el contenido de citrato del miocardio, por cuya razón se postuló que la inhibición de la glucólisis y la acumulación de glucógeno pueden estar mediadas por esta acumulación de citrato. De acuerdo con esta hipótesis, uno de los papeles fisiológicos del citrato sería el de impedir el consumo de glucosa por el músculo y otros tejidos durante el ayuno. Sin embargo, existe alguna evidencia de que, tanto los ácidos grasos libres o los cuerpos cetónicos, como algunas hormonas corticosteroides pueden tener un efecto directo sobre el glucógeno cardíaco y/o la glucólisis, es decir, no necesariamente mediado por el citrato intracelular. En efecto, se vio que los ácidos grasos o los cuerpos cetónicos como tales, o sus acil coenzima A derivados son capaces de inhibir directamente algunas enzimas de la glucólisis, tal como lo hace el citrato con la FFK (53,54). De ser cierta alguna de estas últimas posibilidades, se podría explicar sobre esta base lo que sucede en las ratas intoxicadas con FAc, puesto que existe correlación

entre el aumento en el glucógeno del miocardio y la hiperglucemia, pero no entre el glucógeno y el citrato (ver fig.1). Conviene aclarar que los autores que estudiaron en detalle la diabetes fluoroacética demostraron que la hiperglucemia va acompañada por una notable cetonemia (12,14). Si bien los niveles sanguíneos de ácidos grasos libres no fueron estudiados, se sabe que usualmente aumentan en forma paralela con los de los cuerpos cetónicos (55).

Otra manera de explicar los fenómenos observados, en lo que respecta a las modificaciones en los niveles de glucógeno cardíaco, deriva de la relativa dificultad que parece tener el citrato para atravesar la membrana mitocondrial (56). Se sabe que la FFK se encuentra en el compartimento soluble de la célula (57), mientras el citrato es generado en el interior de las mitocondrias. Para que exista un efecto inhibitorio el citrato debería atravesar la pared mitocondrial. Si existe una barrera de permeabilidad, podría suceder que el proceso de pasaje implique una demora más o menos considerable. Esta podría ser una posibilidad aceptable para explicar la falta de correlación temporal entre la acumulación de citrato y la de glucógeno. Sin embargo, experimentos realizados recientemente indicaron que las mitocondrias cardíacas poseen un sistema de transporte específico para el citrato, el cual es fácilmente expulsado de dichas partículas si en el medio externo se encuentra algún anión

capaz de ser intercambiado, en particular el 1-malato (58). En animales tratados con FAc se mencionó que el citrato cardíaco se distribuye preferentemente en la fracción soluble de las células, 1 hora después de la intoxicación, si bien el autor trabajó con dosis mayores que las nuestras y no describió la metodología empleada para efectuar esas mediciones (40).

Por otra parte, conviene recordar que una descarga de catecolaminas en las terminales nerviosas adrenérgicas del miocardio sería también capaz de producir una activación transitoria de la FFK y la fosforilasa (59). Esto podría proporcionar otra explicación alternativa de los fenómenos observados.

Objetivos generales y plan de trabajo

Como dijimos anteriormente, es importante establecer cómo se comporta el metabolismo anaerobio del miocardio durante la intoxicación, y en qué medida resulta afectado por el citrato acumulado, o por cualquier otro factor que pueda derivar de la acción del tóxico. Los resultados descritos en la sección precedente sugieren sobre esto diversas posibilidades, algunas de ellas de gran importancia toxicológica. Por ejemplo, pudiera suceder que no sólo el citrato, sino también la hiperglucemia, la cetonemia o algún otro factor conectado con el síndrome diabético tengan un efecto

inhibitorio sobre la velocidad del flujo glucolítico, como lo tienen en el caso de la diabetes común. Por otra parte, la posibilidad de que el citrato acumulado reactive la aconitasa y restituya el funcionamiento del metabolismo aerobio, lo que, como vimos, es compatible con nuestros resultados anteriores, es de enorme importancia no sólo desde un punto de vista teórico, sino fundamentalmente por las implicaciones terapéuticas que tendría en caso de ser verificada.

En consecuencia, en el presente trabajo nos propusimos ensayar cada una de las posibilidades que se han mencionado, de forma de establecer el peso que pueden tener en el desarrollo del proceso. Es decir, en líneas generales intentamos verificar si, como lo sugiere el comportamiento del glucógeno en el corazón intoxicado, existe inicialmente una activación de la FFK o una aceleración en el flujo glucolítico, que desaparece en una etapa posterior del proceso; y además estudiar el mecanismo de dichos fenómenos. Por ejemplo, determinar que importancia tiene sobre los hechos estudiados otras alteraciones que provoca el tóxico: como la hiperglucemia y la cetonemia o una supuesta descarga de catecolaminas cardíacas; verificar el papel que puede jugar la distribución del citrato intracelular; tratar de caracterizar el "estado energético" del tejido durante el curso de la intoxicación, de modo de apreciar la medida en que pueda tener lugar la hipotética reactivación del ciclo y, en fin, medir todos

los factores - o la mayor cantidad posible de ellos - que intervengan en la regulación de la FFK y el flujo glucolítico "in vivo", y tratar de correlacionar todos los datos a la luz de los conocimientos sobre las propiedades regulatorias de dicha enzima.

El plan de trabajo propuesto abarco dos etapas. En la primera de ellas se siguió trabajando con el glucógeno cardíaco como indicador, mientras se efectuaba la adquisición del material y la puesta a punto de las técnicas que iban a ser utilizadas posteriormente. Los experimentos que se plantearon fueron los siguientes:

- Verificar si se produce la brusca glucogenólisis inicial, después de la administración del tóxico, en animales previamente reserpinizados.
- Ver si dicha glucogenólisis se produce también en animales aloxan diabéticos.
- Ver si la acumulación tardía de glucógeno cardíaco se puede obtener también en animales previamente adrenalectomizados.

Para una etapa posterior se propusieron los siguientes experimentos:

- Medir el citrato cardíaco en distintas fracciones subcelulares a distintos tiempos después de la administración del tóxico, de modo de verificar si en algún momento se encuentra acumulado en las mitocondrias.

- Medir los niveles cardíacos de AMP, ADP, ATP y fósforo inorgánico, a distintos tiempos después de la intoxicación. Verificar si los datos son compatibles con la hipótesis de que el citrato es capaz de reactivar "in vivo" el ciclo de Krebs, y por lo tanto el metabolismo aerobio del tejido.
- Medir asimismo los niveles de hexosa-fosfatos durante la intoxicación, en particular los de fructosa-6-fosfato y fructosa difosfato, de manera de tener una indicación acerca del funcionamiento "in vivo" de la fosfofructokinasa cardíaca.
- Correlacionar los datos obtenidos "in vivo" con las propiedades de la FFK "in vitro", y en caso necesario realizar experimentos adicionales "in vitro" utilizando las concentraciones medidas de citrato, AMP, ATP, etc. a distintos tiempos después de la intoxicación.

PARTE EXPERIMENTAL

MATERIALES

- a) Sustancias químicas - Las siguientes sustancias se adquirieron en Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., U.S.A.:
- Acido monofluoroacético (sal sodica); adenosina 5 monofosfato (sal monosódica), adenosina 5 difosfato (sal disódica), adenosina 5 trifosfato (sal disódica); D-glucosa-6-fosfato (sal disódica); D-fructosa-6-fosfato (sal disódica); D-fructosa-1,6-difosfato (sal tetrasódica), ácido fosfoenolpirúvico (sal de triciclohexilamonio), NADH (sal disódica), NADP (sal monosódica); aloxano (monohidrato).

Todas las demas sustancias utilizadas era de grado analítico.

- b) Enzimas - Se adquirieron en Sigma preparaciones comerciales de: fosfoglucosa isomerasa (PGI), miokinasa (MK), hexokinasa (HK), piruvato kinasa (PK) y lactato deshidrogenasa (LDH). A su vez, las preparaciones de aldolasa, triosa-fosfatoisomerasa (TIM) y glicerofosfato deshidrogenasa (GDH) fueron compradas a D. F. Boehringer und Soehne, G.m.b.H., Alemania, mientras que la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) fue adquirida a Calbiochem, U.S.A.
- c) Animales - A lo largo de todo el estudio se utilizaron ratas albinas machos. El peso fue de 120-140 g para los experimentos con animales adrenalectomizados, y de 220-280 g para todos los demas ensayos.

METODOS

Tratamiento de los animales

- a) Animales normales - Después de un ayuno de 24 horas los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (intraperitoneal, 50 mg/kg), y se dividieron en dos grupos. Al grupo de intoxicados se le inyectó FAc por vía intraperitoneal, dosis 6 mg/kg, disuelto en solución fisiológica de ClNa. Al grupo control se le inyectó una cantidad equivalente de solución fisiológica.

A distintos tiempos después de la administración del tóxico los animales fueron sacrificados mediante el procedimiento indicado más adelante. Durante las primeras 6 horas de la intoxicación los animales se mantuvieron inconcientes aplicando dosis adicionales de pentobarbital sódico cuando era necesario, de modo de evitar las convulsiones características producidas por el FAc.

Los controles siguieron el mismo tratamiento. En los experimentos de 12 y 18 horas los animales fueron anestesiados con una dosis adicional de pentobarbital media hora antes de ser sacrificados.

- b) Animales diabéticos - La diabetes se indujo con aloxana, siguiendo la técnica desarrollada por Kass y colaboradores (85). Sólo se utilizaron soluciones de aloxana recientemente preparadas y neutralizadas inmediatamente

antes de ser inyectadas. El desarrollo de la diabetes fue controlado mediante la determinación de glucemia en muestras de sangre extraídas de la cola de los animales, 24 horas después de la administración de aloxana. A los animales hiperglucémicos (prácticamente el 100%), se les administró protamina zinc insulina diariamente, en un dosaje de 12 U/kg, durante un período de 7 días. Este tratamiento fue empleado para permitir la desintoxicación del organismo, puesto que la aloxana, además de su efecto destructor sobre las células β pancreáticas, es un tóxico de carácter general (60). La glucemia fue determinada nuevamente 48 horas después de suspender la terapia insulínica, y las ratas cuya glucemia era más del doble de la normal fueron utilizadas para los ensayos. La intoxicación de estos animales se realizó en forma enteramente análoga a la que hemos descrito para las ratas normales, salvo que parte de ellos no fueron ayunados durante las 24 horas previas a la administración del tóxico por las razones que se explicarán más adelante. A estos animales se les permitió libre acceso a la comida.

- c) Animales adrenalectomizados - La adrenalectomía se practicó en nuestro laboratorio, mediante una incisión en la zona dorsal. Se utilizaron animales de 120-140 g de peso, dado que la ausencia de depósitos adiposos en

la zona perirenal permitía una mayor seguridad en la extirpación de las glándulas. Los animales adrenalectomizados fueron mantenidos durante 3 días con libre acceso al alimento, pero suministrándoles solución fisiológica de ClNa como líquido para beber. En estas condiciones los animales no experimentaron pérdida de peso ni comportamiento anómalo alguno. La comida les fue retirada 24 horas antes de dar comienzo a los experimentos. El tratamiento fue similar al descrito para los animales normales, excepto el hecho de que la dosis de pentobarbital sódico fue de 30 mg/kg, y la de FAc 1.5 mg/kg, dado que estos animales son más susceptibles a los efectos de dichas sustancias.

- d) Animales reserpinizados - En esta serie de experimentos los animales fueron tratados con una dosis de 5 mg/kg de reserpina, disuelta en propilen glicol, por via i.p., 24 horas antes de ser intoxicados. En todo lo demas se procedió en forma análoga a la descrita para animales normales.

Procedimientos para la toma de muestra de tejidos

- a) Animales diabeticos, adrenalectomizados y reserpinizados

En estos casos se procedió de la siguiente manera: A los tiempos indicados después de la administración del tóxico se extrajeron muestras de sangre, -previa apertura

del abdomen-, de la vena cava inferior, que fueron transferidas a tubos heparinizados para el posterior análisis de azúcares. Inmediatamente después se extrajo el corazón, se escurrió sobre un trozo de papel de filtro, y se dividió en dos porciones. Una de ellas fue introducida en un tubo previamente trada conteniendo HOK 33%, rápidamente pesada y transferida luego a un baño de agua a 100°C, para el análisis de glucógeno. La otra porción de tejido cardíaco fue rápidamente desmenuzada en frío, pesada y transferida a un tubo homogeneizador tipo Potter conteniendo ácido tricloroacético 12,5%. Se homogeneizó en frío, se ajustó el volumen con ácido tricloroacético frío y se centrifugó durante 10 minutos a 3000 rpm. El citrato se determinó sobre una parte alícuota del sobrenadante.

b) Procedimiento para la determinación de metabolitos

lábiles - Diversos autores han señalado que en un tejido con alto consumo de energía como el corazón, la determinación de metabolitos lábil es como los hexosa fosfatos o los nucleótidos de adenina da resultados inexactos, a menos que se adopten severas precauciones para evitar transformaciones metabólicas durante la toma de muestra de tejido (61).

De acuerdo con las indicaciones de dichos autores, se empleó el siguiente procedimiento para evitar al máximo

la anoxia del tejido durante el tratamiento previo a las determinaciones químicas. A los tiempos indicados después de la intoxicación las ratas anestesiadas fueron colocadas sobre una pequeña mesa de operaciones, sujetadas con una banda elástica, y se les practicó una canulización de la tráquea por donde se les comenzó a insuflar aire rítmicamente mediante una perilla. Inmediatamente fue abierto el tórax y el corazón se congeló instantáneamente "in situ" utilizando pinzas (tipo Wolleberger) previamente sumergidas en nitrógeno líquido (61). Sólo fueron utilizadas las porciones de tejido que habían quedado comprimidas entre las paredes de la pinza, o sea que se habían congelado instantáneamente. Este tejido fue pulverizado en un mortero, manteniéndolo siempre sumergido bajo nitrógeno líquido, luego transferido a un recipiente de homogeneización previamente tarado con una cantidad de ClO_4H 6%, pesado rápidamente y homogeneizado en un homogeneizador tipo Potter con émbolo de Teflon. Después de ajustar el volumen, se transfirió a un tubo de centrífuga y se centrifugó en frío a 3000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue neutralizado con CO_3K_2 5 M utilizando azul de bromotimol como indicador. Tras una nueva centrifugación en frío para separar el ClO_4K formado, el sobrenadante fue inmediatamente congelado y conservado a -50°C hasta el momento de realizarse las

determinaciones químicas.

- c) Medición de la distribución del citrato - Para realizar estos experimentos se pensó en utilizar un método de preparación de las mitocondrias cardíacas que implicase un mínimo de daño de dichas partículas, para tener una cierta garantía de que sus propiedades de permeabilidad no iban a resultar modificadas por los procedimientos empleados. En este sentido, nos pareció adecuado el método descrito por Tyler y Gonze (63), dado que la utilización de proteinasa bacteriana permite que la homogeneización mecánica pueda realizarse en condiciones mucho más suaves que en los métodos convencionales. Según los autores, las mitocondrias obtenidas por este método son de superior calidad, en virtud de que mantienen intactas todas sus propiedades. Sin embargo, la obtención de las mitocondrias purificadas implica una serie de pasos de centrifugación fraccionada, lavados, etc., lo cual hace pensar como probable que el citrato, o parte de él, aun en caso de estar originalmente retenido en el interior de dichas partículas, puede difundir durante los procedimientos. Para evitar al máximo esta posibilidad, pensamos en determinar el citrato en el sobrenadante de 8000 g (libre de mitocondrias), obtenido rápidamente después de homogeneizar el tejido siguiendo las indicaciones de Tyler y Gonze. Esta es la forma mas rápida de separar las

mitocondrias de la fracción soluble (poco mas de 10 minutos), si bien tampoco puede ofrecer absolutas garantías acerca de que los resultados reflejen la realidad en el interior del tejido.

El procedimiento fue el siguiente: una vez sacrificados los animales, el corazón fue extraído rápidamente, enfriado, pesado, cortado en trozos y lavado con 10 vol de medio MSE frío (manitol 0.225 M, sacarosa 0.075 M y EDTA 0.05 M, pH 7.4). Luego el tejido se transfirió a un recipiente homogeneizador, se agregaron 5 ml de MSE conteniendo 10 mg de proteinasa (Nagarse), y se homogeneizó durante 30 segundos haciendo bajar y subir 3 veces el émbolo de Teflon. Inmediatamente se llevó el volumen a 40 ml con MSE frío, y se continuó la homogeneización durante 30 segundos adicionales. En este punto se separó el homogenato en dos porciones, una de las cuales fue rápidamente centrifugada a 0°C durante 10 minutos a 8000 g. Los volúmenes de homogenato total y de sobrenadante de 8000 g fueron medidos, y las determinaciones de citrato se efectuaron sobre alícuotas de cada una de estas fracciones, previa desproteneización con ClO_4H utilizando la técnica que se indica más adelante. Se calculó de esta manera la proporción del citrato total que se recuperaba en el sobrenadante libre de mitocondrias.

d) Experimentos con FFK "in vitro" - La FFK de corazón de rata fue purificada siguiendo el método descrito por Pogson y Randle (64), mediante el pasaje del homogenato del tejido preparado con buffer Tris 50 mM-EDTA 2mM, pH 8.0, a través de una columna de DEAE celulosa. Esta preparación estaba libre de NADH oxidasa y prácticamente libre de ATPasa. Debido a que la enzima purificada es relativamente inestable en solución, se preparaba todos los días antes de comenzar los experimentos. La actividad específica de los preparados oscilaba alrededor de 1 U/mg de proteína.

La actividad total en los extractos se midió enzimáticamente por conversión de FDP glicerofosfato, utilizando aldolasa, TIM y GDH como enzimas auxiliares (65). La desaparición de NADH en función del tiempo se midió a 340 m μ ; la temperatura de los ensayos se fijó en 37°C. La mezcla de reacción contenía: Tris 50 mM, Cl₂Mg 5 mM, ATP 2 mM, ClK 125 mM, NADH 0.1 mM, 20 μ g aldolasa, 10 μ g GDH y 10 μ g TIM, pH final 7.5. Después de agregar el extracto enzimático (usualmente 20 μ l), se dejaba transcurrir 2 minutos para alcanzar equilibrio térmico, y luego se iniciaba la reacción por el agregado de F-6-P, concentración final 2 mM. Se tomaban lecturas cada 15 segundos durante un período de 2-3 minutos. La velocidad siempre era lineal durante este lapso. Se

definió 1 unidad como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1.0 μmol de FDP/min a 37°C.

En nuestros experimentos, nos interesaba medir la actividad relativa de la PFK al colocarla en medios en los cuales las concentraciones de los sustratos y demás metabolitos reproducen las halladas en el tejido, a distintos tiempos después de la intoxicación con FAc. En este caso fue necesario dializar las enzimas auxiliares, porque las preparaciones comerciales contienen sulfato de amonio concentrado, el cual es capaz de antagonizar los efectos inhibitorios del ATP sobre la PFK (64). Una mezcla de 2 mg de aldolasa, 0.4 mg de TIM y 0.4 mg de GDH, fue dializada contra buffer EDTA 0.001 M, pH 6.0 durante 4 horas, renovándose 3 veces el buffer. De esta manera la mayor parte del sulfato de amonio es eliminado (66).

En la realización de estos experimentos se utilizaron 3 mezclas de reacción, basadas en las concentraciones de metabolitos calculadas a partir de los datos que obtuvimos en los animales controles, y en los intoxicados de 8 hora y 18 horas. Como puede verse en la Tabla 8 en estos tiempos se obtuvieron las condiciones extremas de predominio de activadores e inhibidores, respectivamente. En los demás tiempos las condiciones fueron intermedias, de modo que obviamente no era necesario

preparar mezclas de reacción para todos los casos.

Para calcular las concentraciones intracelulares se adoptó arbitrariamente el valor de espacio de manitol utilizado por Kraupp y col.(67), suponiendo además que dicho valor es constante a lo largo de la intoxicación. El agua total del tejido, por otra parte, fue medida por nosotros y resultó constante a lo largo de todo el proceso (68).

Las mezclas de reacción se preparaban agregando las cantidades adecuadas de las siguientes soluciones:
ATP 30 mM; ADP 10 mM; AMP 10 mM; citrato de sodio 125 mM; fosfato de potasio 0.2 M; glucosa-6-fosfato 25 mM; como para que la concentración final de cada reactivo fuera la expresada en la Tabla 1. A su vez, en todos los ensayos se agregaban Cl_2Mg , concentración final 5 mM, ClK 125 mM, Tris 0.3 M y NADH 1 mM. El volumen se ajustaba a 1.0 ml. El pH de los ensayos se modificó dentro de cierto rango por previo ajuste con soluciones concentradas de $HONa$ o ClH , pero como el agregado del extracto de FFK y de enzimas auxiliares producía modificaciones en el pH de las mezclas, los valores exactos se determinaban en cada cubeta al final de cada reacción.

Una vez preparadas las mezclas de reacción, se agregaba la cantidad adecuada de FFK (200-400 μ l) y de

enzimas auxiliares, se dejaba transcurrir un período de 5 minutos para equilibración del sistema, y luego se iniciaba la reacción por el agregado de la cantidad apropiada de solución 25 mM de fructosa-6-fosfato. Se tomaban lecturas cada 5 segundos durante 2-3 minutos, utilizando para los cálculos de actividad la parte lineal de la curva de velocidad en función del tiempo. Para verificar que la cantidad de enzimas auxiliares que se habían agregado era adecuada, se repitieron algunos ensayos agregando doble cantidad de las mismas, y verificando que la velocidad de la reacción medida era la misma (69).

La actividad de la FFK en estos ensayos se expresó refiriéndola a la actividad total de la enzima que se había agregado en cada ensayo, tal como se había determinado por el método que describimos más arriba. De modo que los resultados se expresaron como μ moles de FDP formada por minuto/unidades de FFK agregadas.

La exactitud de las concentraciones finales de los sustratos y otros metabolitos fue verificada mediante determinaciones utilizando las técnicas que describimos más adelante.

Métodos de análisis utilizados

La glucosa en sangre fue determinada con reactivo arseno-molíbico, siguiendo el método de Somogyi-Nelson

(70). El glucógeno cardíaco fue estimado por el método de Krisman (71), después de precipitarlo con etanol de la solución de HOK 33%. Para las mediciones de citrato se utilizó el método de la pentabromoacetona descrito por Natelson y colaboradores (72). Sin embargo, en los experimentos en que se midió la distribución del citrato fue necesario recurrir a otra técnica, ya que la sacarosa presente en estos casos interfería en el procedimiento. Después de desproteínizar el homogenato y el sobrenadante de 8000 g con ClO_4H , concentración final 6%, se centrifugó 10 minutos a 3000 rpm, se neutralizó con CO_3K_2 5 M, se centrifugó nuevamente para eliminar el ClO_4K formado, y se determinó el citrato en el sobrenadante utilizando aconitasa y isocitrato deshidrogenasa, midiendo la reducción de NADP a 340 μm (73). La aconitasa fue preparada en nuestro laboratorio a partir de corazón de rata, de acuerdo con el método de Siebert (74).

Los niveles de G-6-P, F-6-P y ATP fueron estimados sucesivamente en el mismo ensayo mediante el agregado de G-6-PDH, PHI y glucosa-HK. Se midió la reducción de NADP producida en cada caso (75). Una parte de las mediciones de ATP se efectuaron por el procedimiento de la luciferasa (76). La luminiscencia producida se midió en un espectrofotómetro Beckman DU. Ambos métodos para determinar ATP produjeron resultados concordantes.

El contenido de FDP se midió mediante el agregado de aldolasa, TIM y GDH, determinándose espectrofotométricamente la oxidación de NADH producida (77). Similarmente se determinaron los niveles de AMP y ADP agregando LDH, PK, MK y fosfoenolpiruvato (78).

El contenido de fosfato inorgánico en tejido se determinó por el procedimiento de Martin y Doty (79). Se puso especial énfasis en evitar interferencias debidas a la hidrólisis de la creatina fosfato, para lo cual se trabajó con la máxima rapidez. La formación del fosfomolibdato y su extracción en isobutanol-benceno se llevó a cabo inmediatamente después de terminada la desproteinización de las muestras, todo en frío. En estas condiciones la creatina fosfato interfiere en grado mínimo. Por otra parte, el fosfato inorgánico en suero se determinó por el método de Fiske y Subbarow (80).

Análisis estadístico de los resultados

Para evaluar la significatividad de los resultados se aplicó la prueba de t de Student (99) considerandose estadísticamente significativas aquellas diferencias que arrojaron un $p = 0.05$ o menor.

RESULTADOS

Animales aloxan-diabéticos y adrenalectomizados

En la Tabla 1 se han expresado los niveles de glucógeno y citrato cardíacos, así como los de glucosa sanguínea, en animales aloxan-diabéticos antes y después de la administración de FAc. Se trabajó con animales ayunados y sin ayunar, debido a que, como ha sido exhaustivamente demostrado por otros autores, en estas condiciones se producen notables cambios en los niveles sanguíneos de cuerpos cetónicos y ácidos grasos libres (81), así como en la glucemia de estos animales. Pese a ello, no se notaron apreciables diferencias en lo que respecta al efecto glucogenolítico producido por el FAc corto tiempo después de su administración.

En el caso de las animales adrenalectomizados, los resultados pueden observarse en las fig. 2, 3 y 4. Si bien fue necesario utilizar una dosis menor de FAc, dado que estos animales son más sensibles al tóxico y no sobreviven una dosis como la que utilizaríamos con las ratas normales, se puede ver que aún con esta dosis se obtiene una notable degradación del glucógeno cardíaco. Pero lo que es más interesante es que también en este caso se produce una recuperación de los niveles de glucógeno en una etapa posterior de la intoxicación. Los niveles de citrato por su parte siguen una curva similar a la observada en animales normales, pero con la glucemia no sucede lo mismo. En este caso no se produce

una hiperglucemia en la segunda etapa de la intoxicación. Es interesante notar también que la fase de recuperación del glucógeno se produce entre la cuarta y la sexta hora, en tanto que en los animales normales este fenómeno se producía entre las 12 y las 18 horas. Esta diferencia podría deberse a la distinta dosis utilizada.

Animales reserpinizados

La rápida degradación de glucógeno cardíaco producida por el FAc también se observa en animales reserpinizados 24 horas antes de la administración del tóxico, tal como se puede apreciar en la Tabla 2. Se ha demostrado que la dosis de reserpina utilizada es suficiente para vaciar totalmente los depósitos de noradrenalina endógena en el miocardio (82).

Medidas de distribución de citrato

En la Tabla 3 se han expresado los datos obtenidos en las mediciones de la concentración de citrato en homogenato total y en sobrenadante de 8000 g. Se ve que entre un 65% y un 70% del citrato presente en el tejido puede ser recuperado en el sobrenadante libre de mitocondrias. Estos resultados son compatibles con datos informados previamente (40), si bien en ese caso se utilizó una dosis de FAc 3 veces mayor que la que usamos nosotros, y no se describió la metodología empleada.

TABLA 1

GLUCOGENO Y CITRATO CARDIACOS Y GLUCOSA SANGUINEA EN
RATAS ALOXAN-DIABETICAS 90 MINUTOS DESPUES DE FAc

		Glucógeno mg/g tejido húmedo	Citrato μg/g tejido húmedo	Glucosa en sangre mg/100 ml
Ayunados	Control	8.5 ± 0.3	120 ± 11	195 ± 10
	FAc	0.2 ± 0.04*	1165 ± 93*	195 ± 17
No Ayunados	Control	8.1 ± 0.3	123 ± 27	270 ± 10
	FAc	0.6 ± 0.05*	841 ± 90*	379 ± 40

* P < 0.001

Los datos se expresan como promedios de 5 determinaciones ± error standard del promedio. La diabetes fue inducida con aloxana de acuerdo con el metodo de Kass y col. (15). Los animales ayunados fueron privados del alimento 24 horas antes de ser sacrificados. La dosis de FAc fue de 6 mg/kg.

TABLA 2

GLUCOGENO Y CITRATO CARDIACOS EN RATAS
RESERPINIZADAS TRATADAS CON FAc.

		Glucógeno mg/g tejido húmedo	Citrato µg/g tejido húmedo
Controles	(5)	8.8 ± 2.7	136.8 ± 42.8
Intoxicados	(10)	0.4 ± 0.15*	957.7 ± 207.8*

* P < 0.001

Se inyectó reserpina 5 mg/kg, 24 horas antes de la administración del FAc (6 mg/kg). Los números entre paréntesis indican la cantidad de animales en cada grupo. Los valores son promedios ± desviación standard de promedio.

TABLA 3

CONTENIDO DE CITRATO EN HOMOGENATO TOTAL Y EN SOBRENADANTE
DE 8000 g DE CORAZON DE RATAS INTOXICADAS CON FAc

	Homogenato total $\mu\text{g/g}$ tejido humedo	Sobrenadante 8000g $\mu\text{g/g}$ tejido humedo	% Citrato en sobrenadante
Controles	264 \pm 33	213 \pm 37	80.5
FAc $\frac{1}{2}$ hora	602 \pm 124	406 \pm 26	67.4
FAc 1 hora	906 \pm 89	635 \pm 25	70.0

La dosis de FAc fue 6 mg/kg - Los valores son promedios de
4 experimentos \pm error standard del promedio.

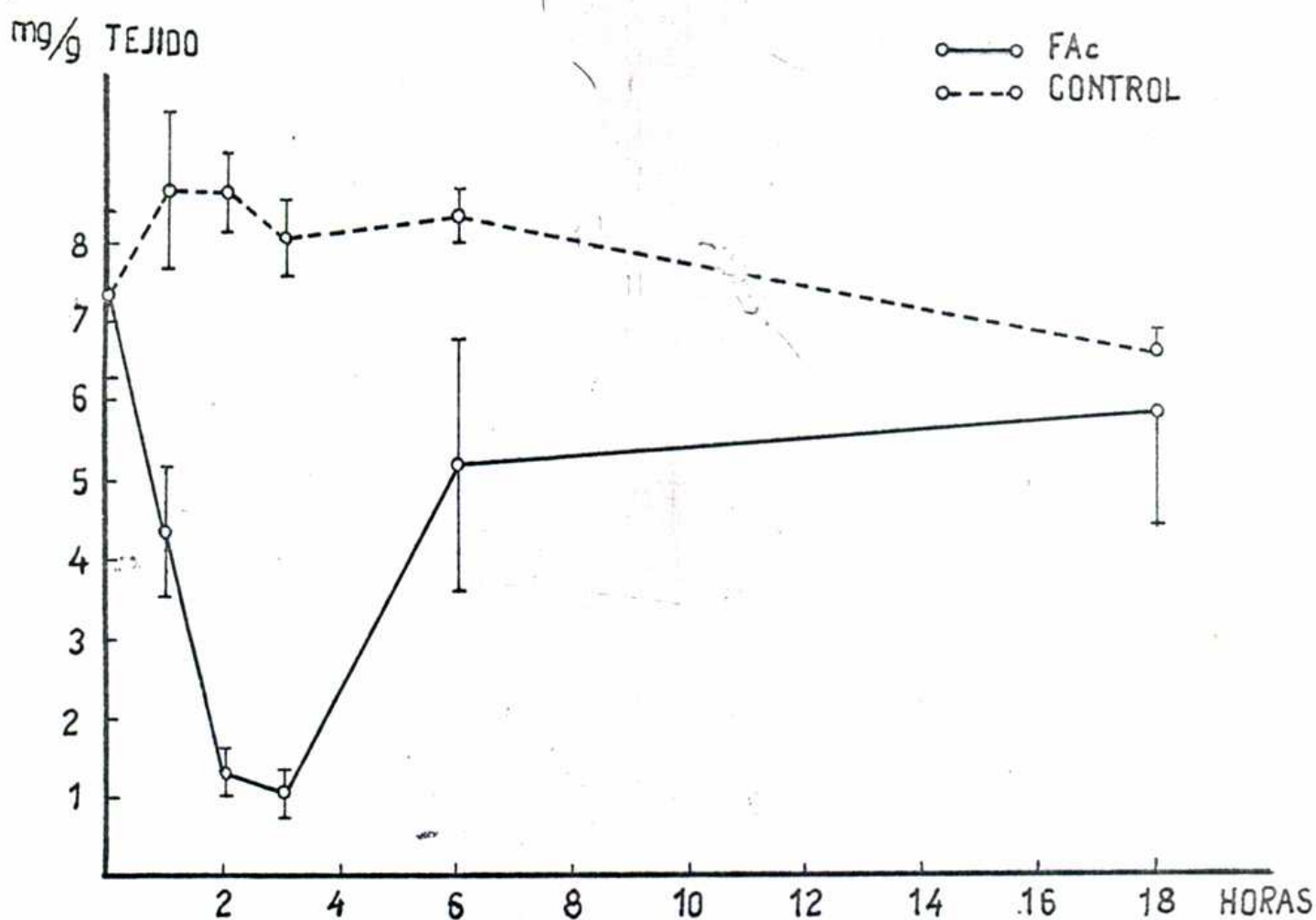


FIG. 2 .- Contenido de glucógeno cardíaco en ratas adrenalectomizadas a distintos tiempos después de la intoxicación con fluoroacetato (1.5 mg/Kg, i.p.). Los animales fueron tratados 4 días después de la extirpación de las glándulas. Durante dicho período fueron mantenidos administrándoseles ClNa fisiológico como líquido para beber, y se les permitió libre acceso al alimento, pero fueron ayunados por 24 horas antes de comenzar los experimentos. Cada punto es el valor medio de 4 a 6 determinaciones; las barras verticales indican la desviación standard del promedio. Sólo los datos de glucógeno a 1 hora ($p < 0.05$) y a 2 y 3 horas ($p < 0.001$) después de inyectar fluoroacetato difirieron de los controles en forma estadísticamente significativa.

$\mu\text{g/g}$ TEJIDO

○—○ FAc
○---○ CONTROL

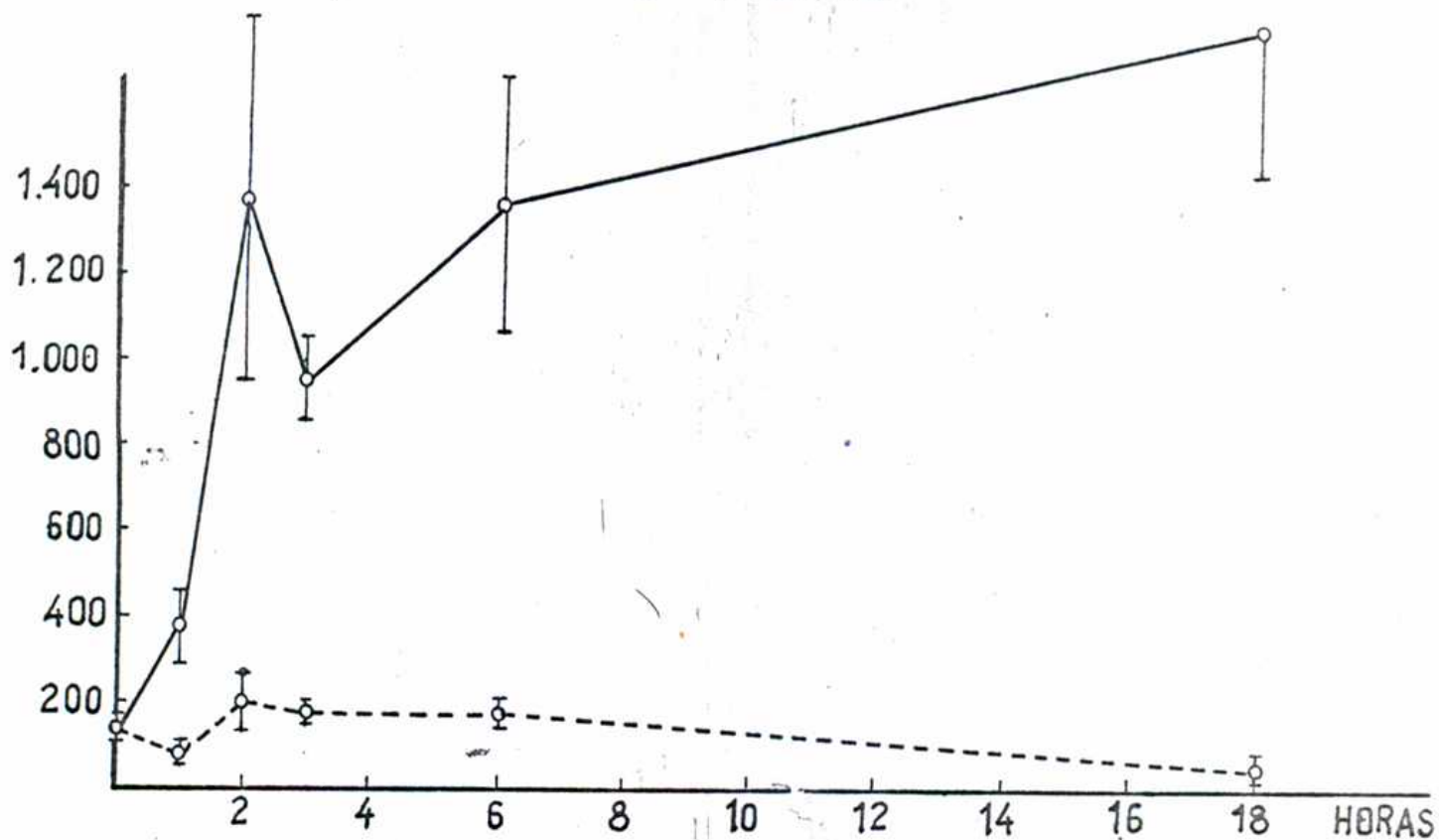


FIG. 3 .- Contenido de citrato cardíaco en ratas adrenalectomizadas, a distintos tiempos después de la administración de fluoroacetato (1.5 mg/Kg, i.p.). Las condiciones fueron idénticas a las descritas en la Fig. 2. Cada punto es el valor medio de 4 a 6 determinaciones; las barras verticales indican la desviación standard del promedio. Todos los valores correspondientes a animales intoxicados difirieron de los controles en forma estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

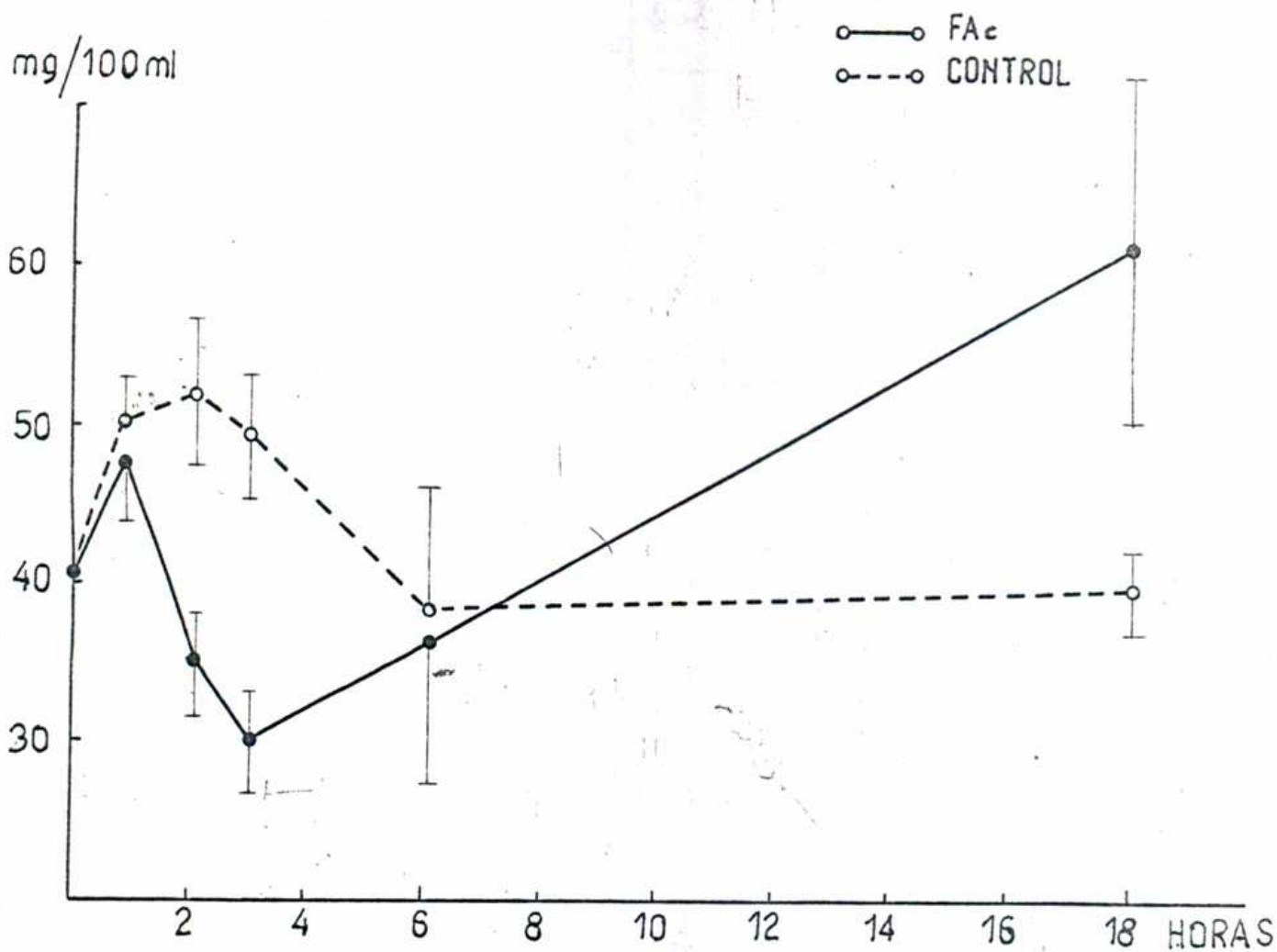


FIG. 4 .- Niveles de azúcar reductor en sangre de ratas adrenalectomizadas a distintos tiempos después de la administración de fluoroacetato (1.5 mg/Kg, i.p.). Las condiciones fueron idénticas a las descritas en la Fig. 2. Cada punto es el valor medio de 4 a 6 determinaciones; las barras verticales indican la desviación standard del promedio. Los datos correspondientes a 2 y 3 horas después de la administración del tóxico fueron significativamente menores que los respectivos controles ($p < 0.05$). A otros tiempos no hubo diferencias significativas ($p > 0.2$).

Determinación de varios fosfatos de "alta energía" y
fósforo inorgánico

En la Tablas 4 y 5 se pueden apreciar los valores obtenidos en las determinaciones de AMP, ADP, ATP y fósforo inorgánico. Los mismos datos han sido graficados en las figs. 5 y 6, expresándolos como porcentaje de los respectivos controles.

Los valores normales de nucleótidos de adenina que hemos obtenido guardan estrecha coincidencia con los informados previamente por otros autores (83, 84). Lo mismo sucede con los datos de fósforo inorgánico (86).

En los animales tratados con FAc, el ATP cardíaco disminuye considerablemente desde una fase temprana de la intoxicación. Media hora después de la administración del tóxico se registran niveles del orden de 65% de los normales, y durante las primeras 6 horas de la intoxicación apenas se producen pequeñas alteraciones adicionales, pero a las 12 y las 18 horas el contenido de ATP es aún menor: alrededor de un 45% de los valores normales. Los niveles de AMP, por otra parte, se elevan considerablemente durante las primeras 3 horas, para descender luego a valores que no difieren significativamente de los normales. En el caso del ADP sucede algo parecido: los valores se elevan durante la primera hora de la intoxicación, pero descienden más adelante. A partir de la sexta

hora el contenido de ADP en los corazones intoxicados es significativamente menor que en los controles.

En lo que respecta al fósforo inorgánico, se acumula rápidamente después de la administración del tóxico. Hacia la cuarta hora los valores son aproximadamente 4 veces más altos que en los corazones normales. Posteriormente se produce un descenso considerable, pero los valores siguen siendo significativamente más altos que en los controles. A las 18 horas el fósforo inorgánico en los corazones intoxicados duplica al de los normales.

Como se puede observar en la fig. 6, el fosfato inorgánico del suero se eleva constantemente durante todo el período en estudio.

Determinación de hexosa fosfatos

Los niveles de fructosa-6-fosfato y de fructosa-difosfato en los animales normales fueron tomados como indicadores para verificar que la técnica de extracción de muestra y preparación del tejido utilizada por nosotros era adecuada. De esta forma, fuimos modificando sucesivamente el procedimiento hasta que los valores normales de F-6-P, FDP y la relación FDP/F-6-P estuvieron en plena concordancia con los informados previamente por otros autores (67). También los niveles de G-6-P en los controles coincidieron con los determinados anteriormente (67).

TABLA 4

NIVELES CARDIACOS DE NUCLEOTIDOS DE
ADENINA DURANTE LA INTOXICACION

Tiempo hs	N	ATP	ADP	AMP
		μmol/g tejido humedo		
0	10	4.25 ± 0.22	0.69 ± 0.040	0.139 ± 0.011
½	9	2.86 ± 0.13**	0.81 ± 0.067	0.236 ± 0.019***
1	10	2.27 ± 0.21***	0.90 ± 0.058**	0.230 ± 0.025***
2	7	2.42 ± 0.28**	0.63 ± 0.034	0.220 ± 0.067
3	5	2.58 ± 0.21**	0.65 ± 0.077	0.176 ± 0.065
4	7	2.70 ± 0.43*	0.56 ± 0.058	0.125 ± 0.020
6	8	2.74 ± 0.58**	0.54 ± 0.045*	0.117 ± 0.024
12	9	1.56 ± 0.11***	0.49 ± 0.063**	0.102 ± 0.016
18	10	1.97 ± 0.12***	0.33 ± 0.053***	0.113 ± 0.011

* P < 0.05

** P < 0.01

*** P < 0.001

La columna N indica el número de animales en cada grupo. Los valores están expresados como promedio ± error standard del promedio. La significatividad estadística se calculó en cada caso por comparación con el grupo control (0 hs).

TABLA 5

NIVELES DE FOSFORO INORGANICO EN CORAZON
Y EN SUERO DURANTE LA INTOXICACION

Tiempo hs	N	Pi cardíaco μmol/g tejido húmedo	Pi suero μmol/ml
0	10	2.81 ± 0.17	1.82 ± 0.17
½	9	4.99 ± 0.70 ^{***}	2.20 ± 0.48
1	10	7.16 ± 0.36 ^{***}	2.16 ± 0.17
2	7	7.21 ± 0.41 ^{***}	2.34 ± 0.10 [*]
3	5	8.66 ± 0.28 ^{***}	3.54 ± 0.33 ^{***}
4	7	10.98 ± 1.25 ^{***}	3.71 ± 0.31 ^{***}
6	8	9.49 ± 0.37 ^{***}	3.03 ± 0.37 ^{**}
12	9	7.50 ± 0.60 ^{***}	4.18 ± 0.19 ^{***}
18	10	5.71 ± 0.29 ^{***}	5.04 ± 0.62 ^{***}

* P < 0.05

** P < 0.01

*** P < 0.001

La columna N indica el número de animales en cada grupo. Los valores están expresados como promedio ± error standard del promedio. La significatividad estadística se calculó en cada caso por comparación con el grupo control (0 hs).

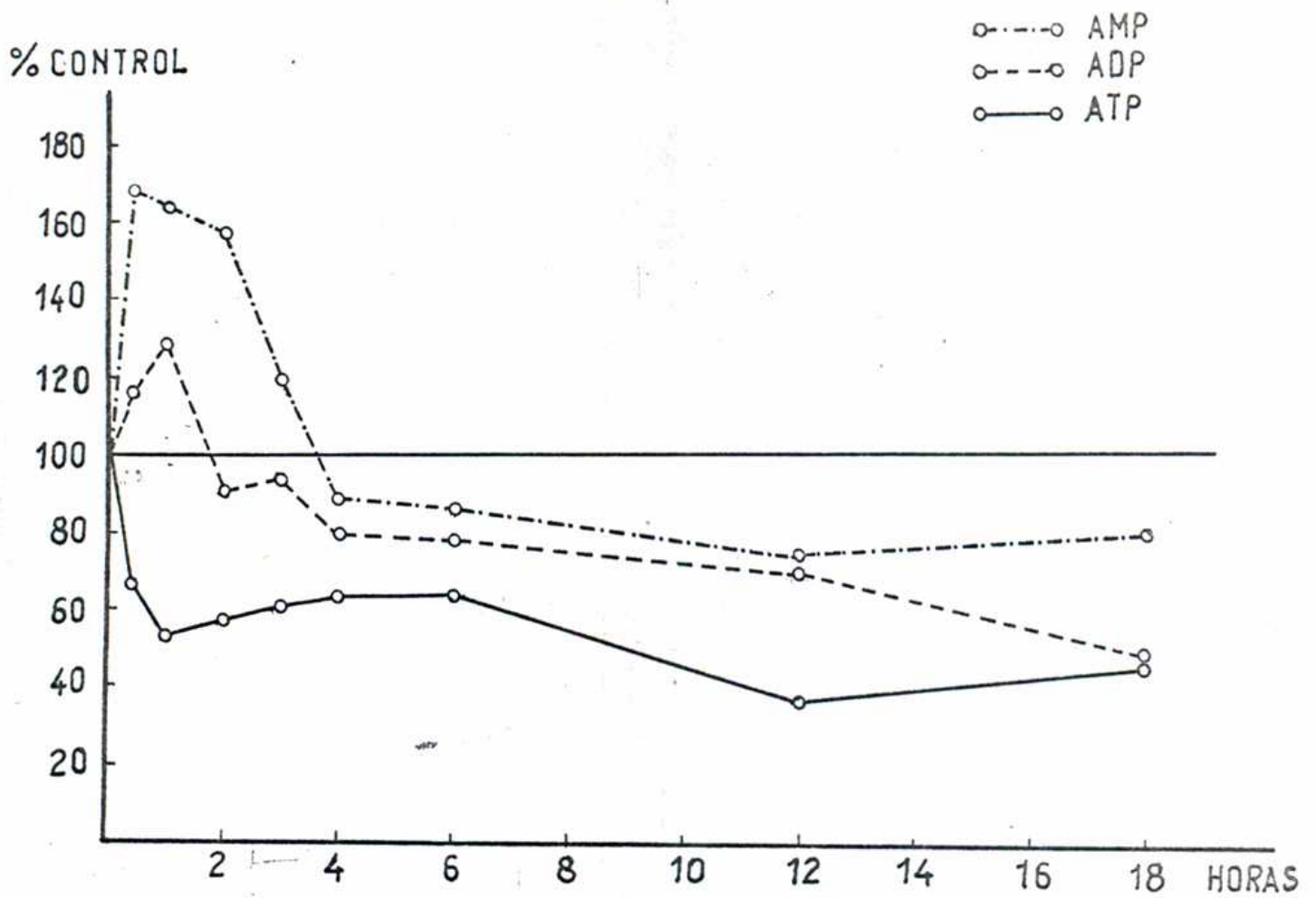


FIG. 5 .- Alteraciones en los niveles cardíacos de AMP, ADP y ATP a distintos tiempos después de la intoxicación con fluoroacetato (6 mg/Kg, i.p.) en ratas. Los datos han sido expresados como porcentajes de los respectivos valores controles. Cada punto corresponde al valor medio de 5 a 10 determinaciones. La significación estadística de las diferencias se describe en la Tabla 4.-

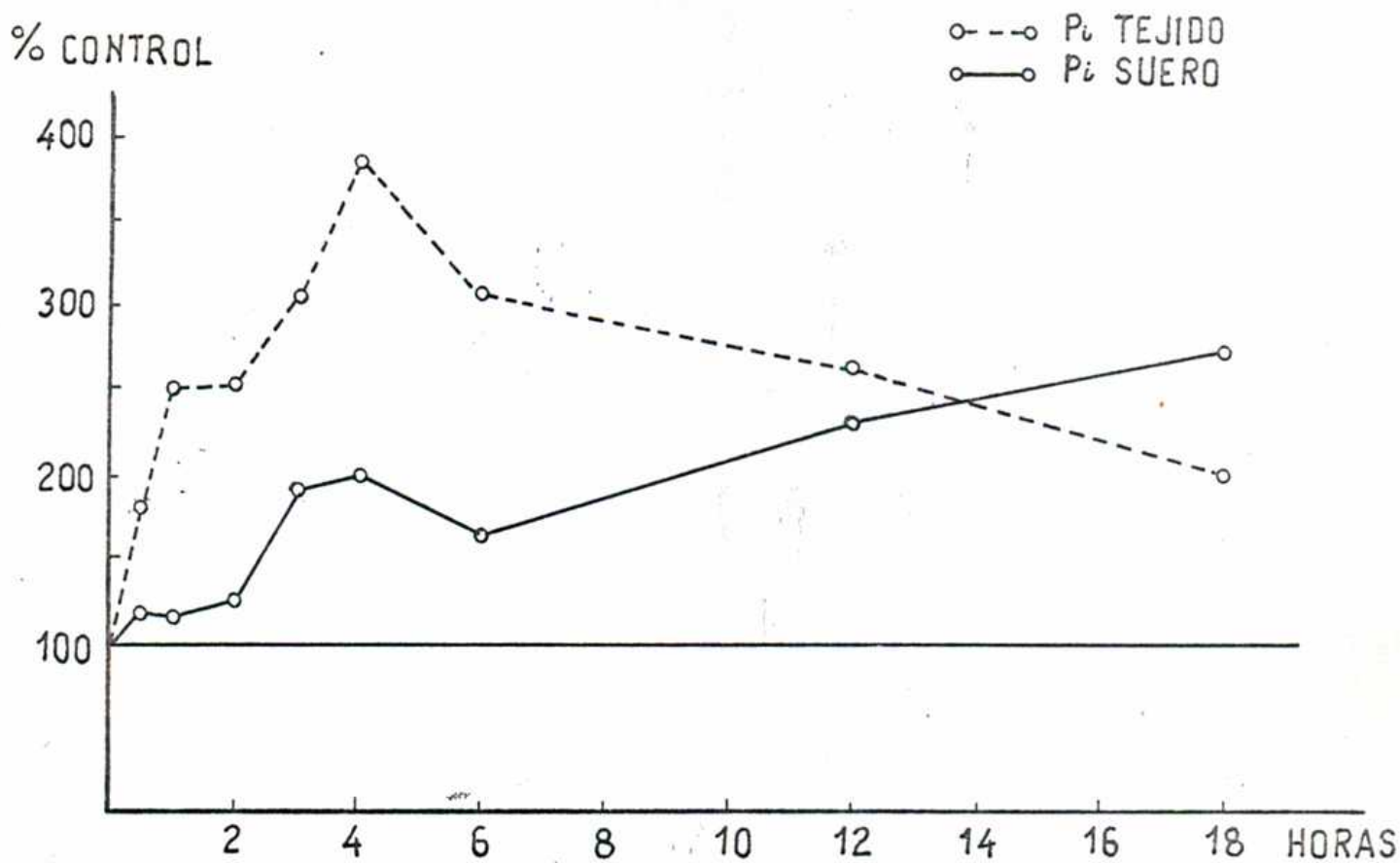


FIG. 6 .- Fósforo inorgánico en tejido cardíaco y en suero a distintos tiempos después de la intoxicación con fluoroacetato (6 mg/Kg, i.p.) en ratas. Los datos han sido expresados como porcentajes de los respectivos valores controles. Cada punto corresponde al valor medio de 5 a 10 determinaciones. La significación estadística de las diferencias se puede observar en la Tabla 5.-

Las alteraciones producidas en el contenido cardíaco de estos compuestos durante la intoxicación se pueden observar en la figs. 7 y 8 y en la Tabla 6. Durante la primera hora se produce un aumento significativo de G6P y F6P. Mas adelante los niveles de F6P descienden a valores similares a los de los controles, en tanto que los de G6P permanecen elevados, pero las diferencias son de escasa significatividad estadística, exceptuando los datos de 6 horas después de FAc.

En lo que respecta a los niveles de FDP, no difieren significativamente de los de los corazones normales en ningún momento.

La relación entre FDP y F6P, por otra parte, que ha sido tomada como parámetro indicador de la actividad "in vivo" de la fosfofructokinasa (67), tampoco presenta diferencias significativas con respecto a los valores normales durante todo el curso de la intoxicación.

Medidas de la actividad de la fosfofructokinasa "in vitro"

Los resultados de estos experimentos se pueden apreciar en la fig. 10. Tal como había sido observado previamente en el caso de la enzima extraída de musculo de rana, ratón y conejo, así como la de corazón de oveja (69, 87), pudimos comprobar que también la FFK de corazón de rata es extremadamente sensible a las variaciones de pH. Así se puede observar que en la mezcla de reacción correspondiente

a los controles, un desplazamiento de pH de 7.10 a 7.20 produce una actividad enzimática 25 veces mayor. En las mezclas de reacción correspondientes a animales intoxicados se observa un fenómeno similar, si bien de mucho menor magnitud, pero a valores de pH sensiblemente más bajos. Por lo tanto, encontramos que en el rango de pH que va desde 6.80 hasta 7.10 la actividad de la FFK es mucho mayor en las mezclas de reacción que reproducen las condiciones de los animales intoxicados que en la mezcla "control". A su vez, y tal como podía esperarse sobre la base de los datos mencionados en la Tabla 8, se puede ver que la actividad en la mezcla de reacción correspondiente a FAc - 18 horas es mucho menor que la que existe en la mezcla correspondiente a FAc - 1 hora. A valores de pH superiores a 7.30, la enzima está inhibida en las mezclas correspondientes a animales intoxicados comparada con los controles. A valores de pH inferiores a 6.60 la actividad es muy baja, y es igual en todas las mezclas de reacción, cualquiera sea las concentraciones de ATP, AMP, fósforo inorgánico, citrato, etc.

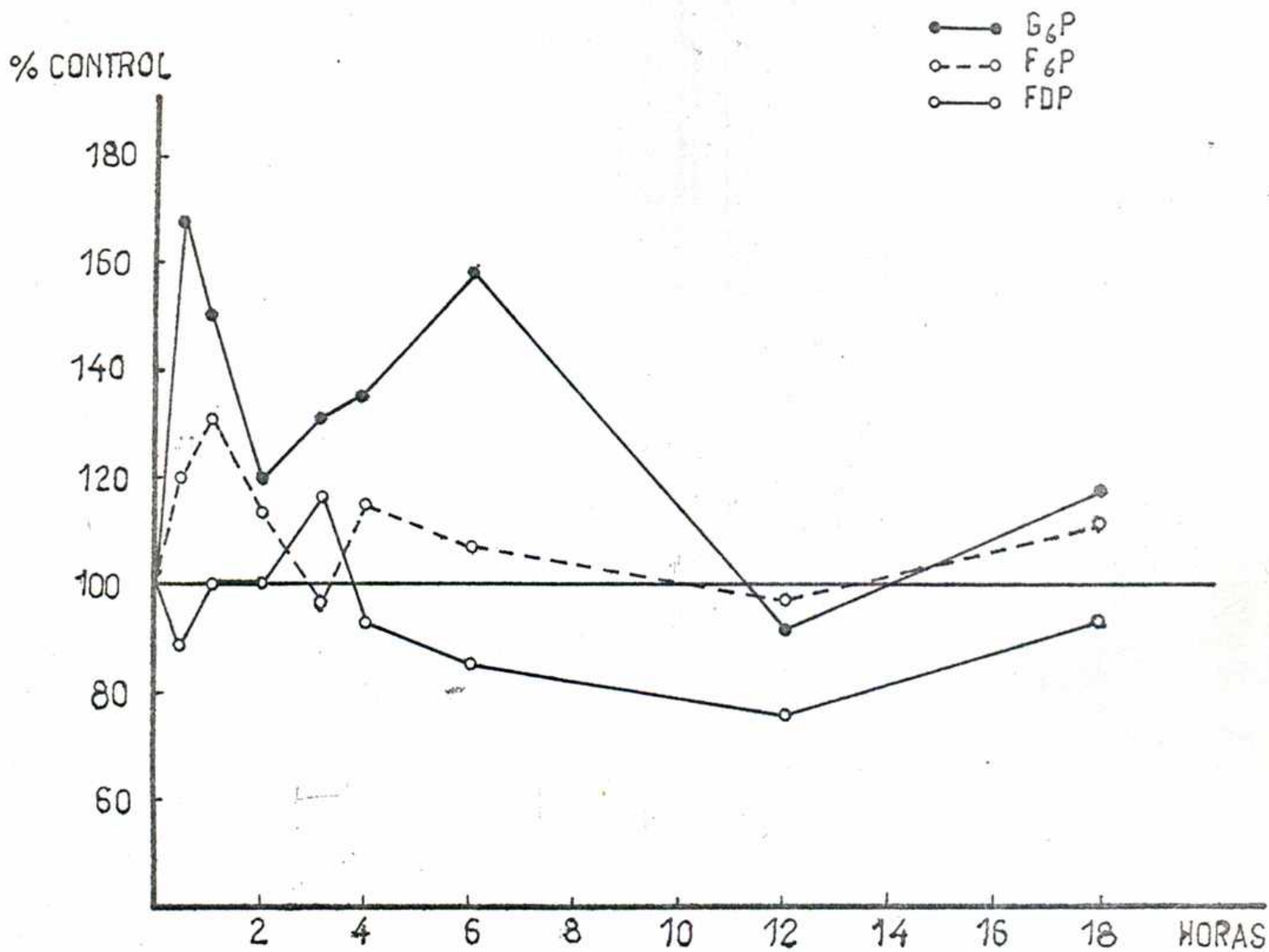


FIG. 7 .- Niveles cardíacos de glucosa-6-fosfato (G₆P), fructosa-6-fosfato (F₆P) y fructosa difosfato (FDP) en función del tiempo después de la administración de fluoracetato (6 mg/Kg, i.p.), en ratas. Los resultados han sido expresados como porcentajes de los respectivos valores controles. Cada punto corresponde al valor medio resultante de 4 a 9 determinaciones. La significatividad estadística de las diferencias se describe en la Tabla 6.-

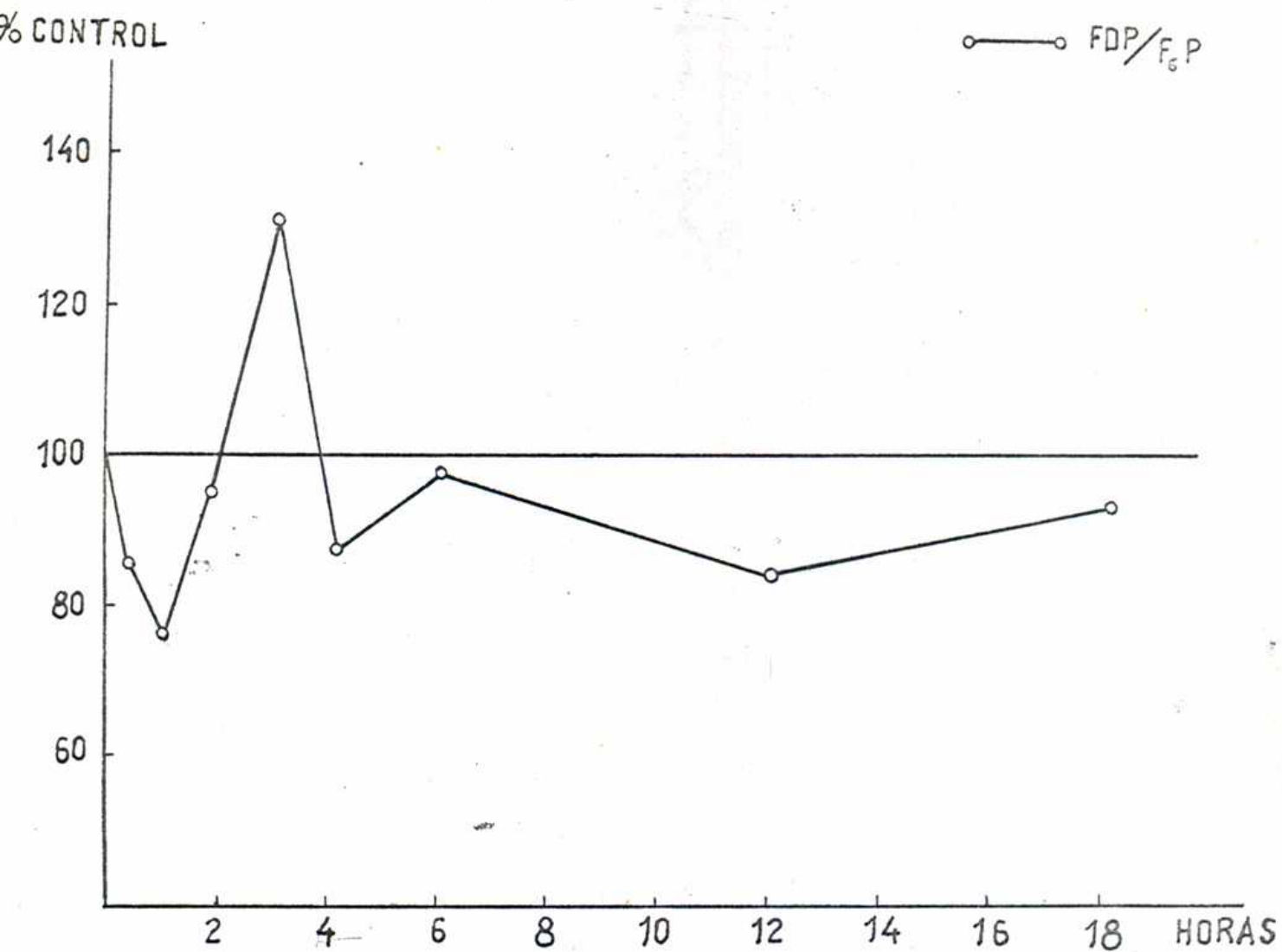


FIG. 8 .- Variación en la relación de concentraciones de fructosa difosfato y fructosa-6-fosfato, en tejido cardíaco, durante la intoxicación con fluoroacetato (6 mg/Kg, i.p.) en ratas. Las condiciones son idénticas a las descritas en la fig. 7. Ninguna de las diferencias observadas con respecto a los controles tuvo significatividad estadística.

TABLA 6

CONTENIDOS CARDIACOS DE HEXOSA FOSFATOS Y CITRATO DURANTE LA INTOXICACION

Tiempo hr	N	G6P	F6P	FDP	FDP/F6P	Citrato
μmol/g tejido húmedo						
0	13	0.326 ± 0.041	0.091 ± 0.008	0.013 ± 0.002	0.127	0.96 ± 0.10
½	5	0.538 ± 0.058*	0.109 ± 0.035	0.011 ± 0.002	0.109	2.66 ± 0.32***
1	9	0.495 ± 0.029**	0.120 ± 0.009*	0.013 ± 0.002	0.098	5.33 ± 0.27***
2	7	0.384 ± 0.073	0.102 ± 0.016	0.013 ± 0.002	0.122	6.32 ± 0.38***
3	8	0.423 ± 0.025	0.087 ± 0.006	0.015 ± 0.002	0.169	9.77 ± 1.10***
4	5	0.438 ± 0.044	0.106 ± 0.019	0.012 ± 0.002	0.113	9½45 ± 1.28***
6	7	0.497 ± 0.063	0.097 ± 0.016	0.011 ± 0.004	0.126	10.23 ± 0.60***
12	4	0.298 ± 0.012	0.087 ± 0.012	0.010 ± 0.001	0.114	11.45 ± 0.45***
18	9	0.403 ± 0.045	0.100 ± 0.010	0.012 ± 0.004	0.121	12.54 ± 0.29***

* P < 0.05

** P < 0.01

*** P < 0.001

Los datos están expresados como promedio ± error standard del promedio. La columna N indica el número de animales en cada grupo. Los valores de FDP/F6P son medias geométricas: $\sqrt{x_1 \times 2 \dots \times x_n}$. La significatividad de las diferencias en este caso se calculó sobre la base de un "test de t" realizado sobre los logaritmos de los valores individuales de la relación FDP/F6P (67).

TABLA 7

COMPOSICION DE LOS MEDIOS DE ENSAYO DE LA FOSFOFRUCTOKINASA
"IN VITRO"

Metabolitos	Concentraciones finales en el medio (mM)		
	Control	FAc 1 hr	FAc 18 hs
G6P	0.55	0.85	0.70
F6P	0.16	0.21	0.17
AMP	0.24	0.39	0.19
ADP	1.18	1.53	0.57
ATP	7.30	3.70	3.40
Pi	4.85	12.20	9.80
Citrato	1.66	9.20	21.50

Todos los medios de reacción contenían Tris 150 mM, Cl_2Mg 5 mM, ClK 125 mM y NADH 0.1 mM, junto con la cantidad adecuada de enzimas auxiliares dializadas (20-40 μ l) y preparación de FFK (200-400 μ l). El volumen final era 1.0 ml. El pH del buffer Tris se modificó en el intervalo de 6.0 a 8.0, pero los valores exactos del pH de reacción se tomaron en cada cubeta al finalizar las mediciones.

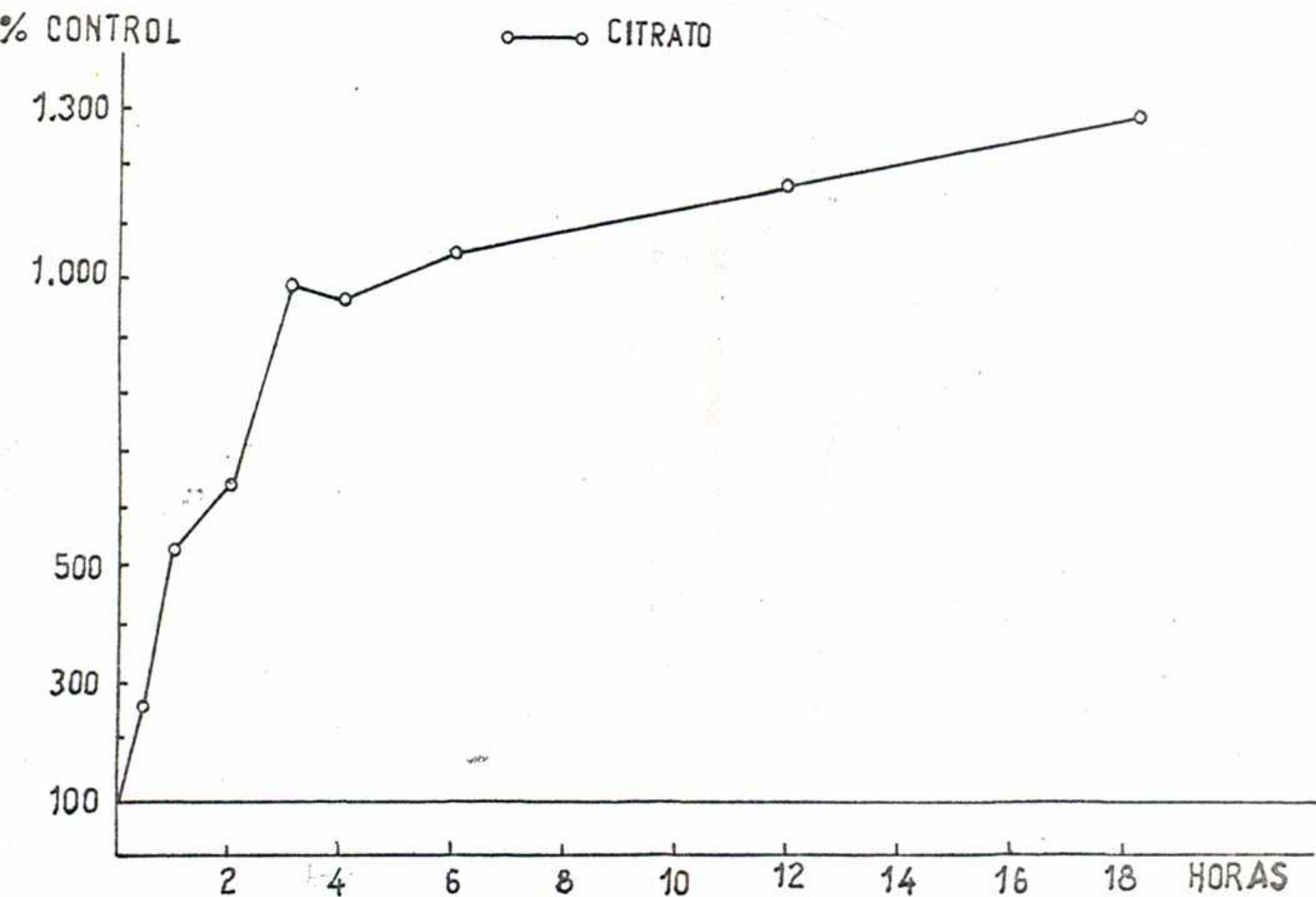


FIG. 9 .- Niveles de citrato cardíaco durante la intoxicación con fluoroacetato (6 mg/Kg, i.p.) en ratas. Los resultados han sido expresados como porcentajes de los respectivos valores controles. Cada punto corresponde al valor medio resultante de 4 a 9 determinaciones. En todos los casos, las diferencias con respecto a los controles fueron estadísticamente significativas ($p < 0.001$).-

TABLA 8

RELACION ENTRE CONCENTRACIONES DE ACTIVADORES E
INHIBIDORES DE LA FOSFOFRUCTOKINASA CARDIACA A
DISTINTOS TIEMPOS DESPUES DE FAc

Tiempo horas	$R = \frac{(AFP)(ADP)(FDP)(F6P)(Pi)}{(ATP)(Cittrato)} \times (10^{-5})$
0	7.8
0.5	15.0
1	19.1
2	8.7
3	5.1
4	3.8
6	2.3
12	1.8
18	0.9

μ mol FDP/min
unidad de FFK

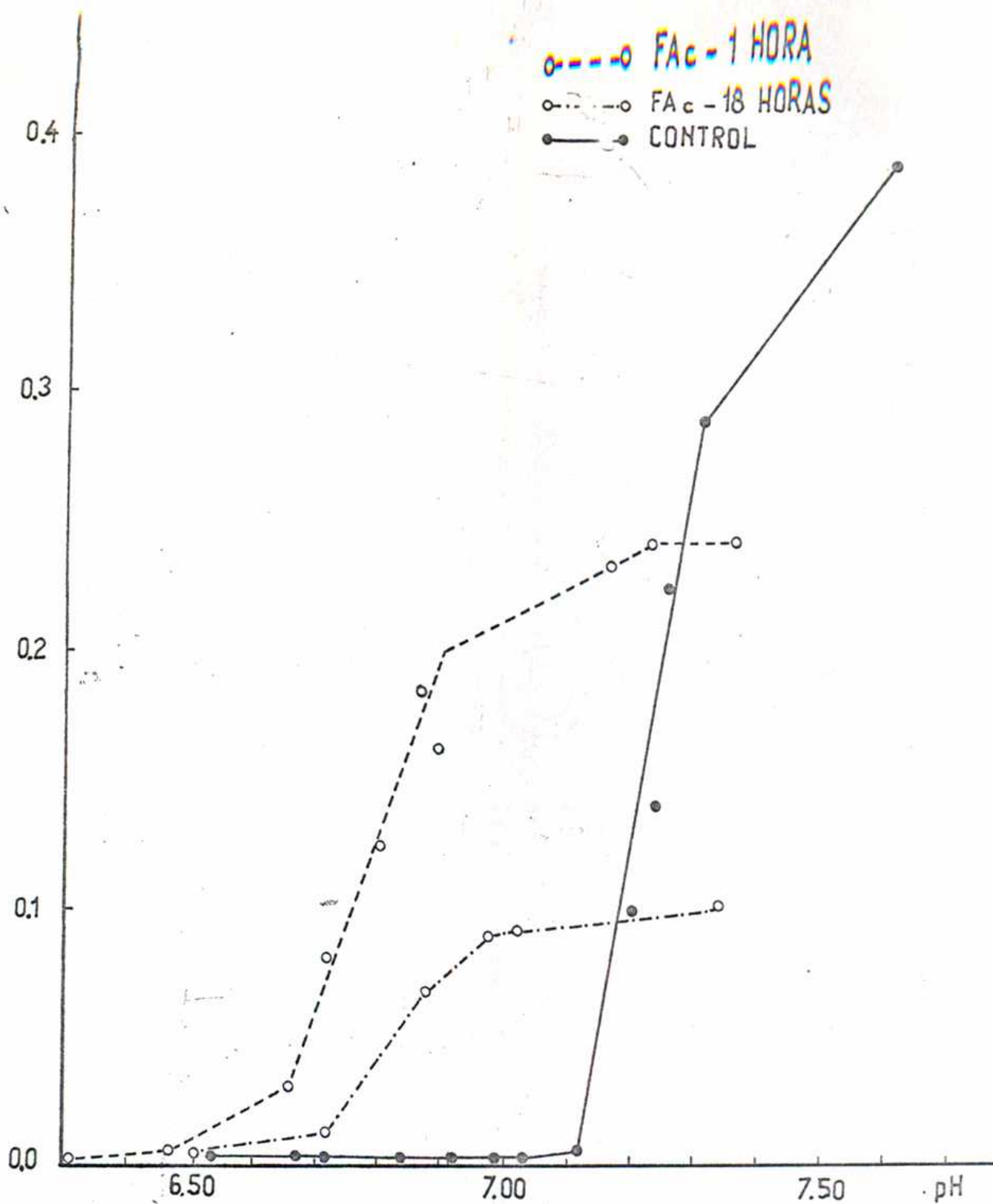


FIG. 10 .- Actividad in vitro de la fosfofructokinasa purificada a partir de corazón de rata, en medios de reacción que reproducen las concentraciones de metabolitos calculadas a partir de los niveles tisulares determinados in vivo. Los resultados se expresan como "actividad relativa", es decir, la actividad en el medio en ensayo referida a la actividad de una cantidad equivalente de enzima medida bajo condiciones óptimas. El pH de los medios se modificó independientemente. La composición de las mezclas de reacción se describe en la Tabla 7.

DISCUSION

La brusca degradación del glucógeno cardíaco producida inmediatamente despues de la administración de FAc, sugería que, similarmente con lo que ocurre cuando el órgano se somete a anoxia o isquemia, el tóxico producía una aceleración del flujo glucolítico debido a la degradación de ATP y la acumulación de AMP, fósforo inorgánico, etc. (46). Una posibilidad alternativa sería que dicha glucogenólisis hubiese sido causada por una brusca descarga de catecolaminas de las terminales nerviosas adrenérgicas (59). En este caso dicho fenómeno no debería observarse en animales pretratados con reserpina, donde los depósitos de catecolaminas endógenas han sido vaciados (82). Nuestros resultados muestran que en las ratas reserpinizadas se produce una glucogenólisis cardíaca tan intensa como la que se había visto en animales normales, despues de la intoxicación con FAc. Esto sugiere que las catecolaminas cardíacas no intervienen en el proceso mencionado.

Si por lo tanto suponemos que la glucogenólisis observada está relacionada con las alteraciones producidas en los niveles de los fosfatos de alta energía, etc., como consecuencia del bloqueo del metabolismo aerobio, tendremos que explicar por qué razon varias horas más tarde el glucógeno cardíaco vuelve a acumularse hasta alcanzar a las 18 horas los valores

normales. Si es que, como sucede habitualmente, estas variaciones en los niveles de glucógeno reflejan modificaciones en la velocidad del flujo glucolítico, entonces cabría considerar la hipótesis según la cual el citrato acumulado en el tejido intoxicado es capaz de inhibir la glucólisis a nivel de la FFK (37). Sin embargo, como dijimos anteriormente, existen dificultades para aceptar esta suposición, ya que los niveles de citrato están muy elevados casi desde el principio, y a partir de la 4a hora sólo se observan muy pequeños aumentos adicionales (ver fig. 9). El glucógeno, por otra parte, comienza a acumularse después de la 12a hora, o sea que existe una falta de correlación en el tiempo entre la acumulación de citrato y la de glucógeno. Sin embargo se presenta una buena correlación entre la acumulación de glucógeno y la elevación de los niveles de glucosa sanguínea, que anuncian la aparición del síndrome conocido como "diabetes fluoroacética" (12). Este síndrome tiene todas las características de la diabetes común, con hiperglucemia y cetonemia, etc. Ahora bien, se sabe que en las ratas diabéticas se producen acumulaciones de glucógeno cardíaco, que han sido atribuidas a la presencia en la sangre de cuerpos cetónicos y/o ácidos grasos libres (50). Estas sustancias podrían actuar ya sea indirectamente, a través de aumentos en los niveles de citrato intracelular (52), o bien directamente, a través de efectos inhibitorios sobre las enzimas del flujo

glucolítico (53, 54). En caso de ser cierta esta última posibilidad, podría explicar lo que sucede con el glucógeno cardíaco en las ratas intoxicadas con FAc. Es decir, la cetonemia que aparece después de la 12a hora, agregada a los niveles elevados de citrato, podría conducir a una inhibición de la glucólisis y/o la glucogenólisis cardíaca, acumulándose glucógeno como consecuencia.

Ha sido demostrado que la adrenalectomía suprime la acumulación de glucógeno cardíaco en los animales diabéticos, probablemente porque suprime la cetonemia (51). Por lo tanto, si fuera cierto que la acumulación de glucógeno observada en la segunda etapa de la intoxicación con fluoroacetato es causada por la cetonemia que se desarrolla simultáneamente, entonces la adrenalectomía también debería suprimir en este caso la elevación en los niveles de glucógeno. Por consiguiente, nosotros reproducimos las determinaciones de glucógeno, y citrato cardíacos, y de glucemia en ratas adrenalectomizadas tratadas con FAc. En este caso no se observó hiperglucemia en la segunda etapa de la intoxicación, aunque la acumulación de citrato fue casi tan notoria como en los animales normales tratados con FAc. El glucógeno cardíaco, por otra parte, varía en forma cualitativamente similar en ambos grupos de animales, indicando que la eliminación de la hiperglucemia y de la cetonemia concomitante no es suficiente para impedir que el glucógeno se

acumule en la etapa tardía de la intoxicación.

Otros experimentos llevados a cabo con ratas aloxan-diabéticas condujeron a resultados compatibles con los enunciados precedentemente. En este caso el fluoracetato fue administrado a ratas en las cuales la cetonemia había sido previamente inducida mediante el aloxano. Esta cetonemia no fue capaz de contrarrestar la glucogenólisis producida tempranamente por el tóxico. No se observaron diferencias entre los animales alimentados a discreción y los ayunados por 24 horas, a pesar que estas condiciones producen notables modificaciones en los niveles de cuerpos cetónicos sanguíneos (81). Cabe hacer la salvedad, sin embargo, de que en este caso las condiciones experimentales no son estrictamente comparables con los que se obtienen en los animales intactos tratados con FAc, ya que en estos experimentos se estudiaron efectos tempranos (1-2 horas) mientras que en los animales normales la diabetes fluoroacética aparece en una etapa tardía (12-18 horas). Obviamente, podrían existir otros factores que alterasen los resultados al comparar distintas etapas de la intoxicación. Sin embargo, el conjunto de los datos obtenidos con animales adrenalectomizados y aloxan-diabéticos indica que el síndrome cetonémico e hiperglucémico y la acumulación de glucógeno cardíaco que se produce simultáneamente no guardan una relación de causa-efecto.

Otra posibilidad que fue tenida en cuenta en esta etapa

de los estudios fue la de que los fenómenos observados pudieran deberse a una escasa permeabilidad de la membrana mitocondrial para el citrato. Puesto que las enzimas de la glucólisis, y en particular la FFK, se hallan en la fracción soluble de la célula, en tanto que el citrato se genera en el interior de las mitocondrias, para que este último ejerza su acción regulatoria es necesario que atraviese previamente la pared mitocondrial. Si, como han indicado algunos autores (56), la pared mitocondrial es relativamente impermeable para el citrato, entonces podría producirse una demora considerable antes de que dicho anión alcance en el citoplasma una concentración inhibitoria. Esto podría tal vez explicar por que la acumulación de glucógeno en el corazón intoxicado (siempre suponiendo que esta refleja una inhibición de flujo glucolítico) se produce en una etapa tardía de la intoxicación, varias horas después de los incrementos en el contenido de citrato. Para determinar si esta hipótesis es cierta intentamos medir la distribución del citrato entre las distintas fracciones subcelulares, a distintos tiempos después de la intoxicación. Lamentablemente, si bien nuestros resultados parecen indicar que no existe impedimento para la difusión del citrato, dado que un 70% del mismo se recuperó en el sobrenadante libre de mitocondrias, estos datos no se pueden considerar concluyentes, puesto que el citrato podría haber sido expulsado

de las mitocondrias durante el proceso de homogeneización, centrifugación, etc. Sin embargo, existen diversos hechos que indican como poco probable que el citrato se mantenga dentro de la mitocondrias. Recientemente se ha encontrado que las mitocondrias cardíacas poseen un sistema de transporte para el citrato, el cual atraviesa fácilmente la membrana mitocondrial cuando existe en el medio algun anión capaz de ser intercambiado, particularmente el l-malato (58). Por otra parte, debe tenerse en cuenta el aporte de energía que sería necesario para mantener el citrato acumulado en las mitocondrias. Von Kirfff (88) indicó que la particion de diversos aniones, entre ellos el citrato, entre el interior y el exterior de las mitocondrias depende del estado metabólico de las mismas. Teniendo en cuenta las alteraciones que produce la intoxicación con FAc, parece poco probable que las mitocondrias estén en condiciones favorables como para mantener tal gradiente de concentración.

En la etapa siguiente de los estudios, restaba averiguar si las modificaciones producidas por el tóxico en los niveles de nucleótidos de adenina, fósforo inorgánico, etc., podían dar cuenta de los hechos. Sobre todo era particularmente importante establecer si bajo nuestras condiciones experimentales podría tener lugar un mecanismo como el propuesto por Williamson (40), al que nos hemos referido anteriormente. De ser así, debía esperarse un descenso inicial

del ATP seguido por una recuperación posterior, la cual debería ir acompañada por una inhibición de la FFK, la que debería reflejarse en modificaciones en los niveles de F6P, FDP y sobre todo en la relación FDP/F6P (67).

Sin embargo, encontramos que el ATP no sólo desciende rápidamente después de la administración del tóxico, sino que continúa descendiendo, aunque mucho más lentamente, durante todo el resto del período experimental. A su vez, los niveles de ADP y AMP aumentan inicialmente y descienden más tarde, pero esto último no puede ser atribuido a una refosforilación de los nucleótidos, puesto que el ATP no aumenta, sino que probablemente se deba a la acción de las nucleótido fosfatasas, que son muy activas en este tejido (89). De modo que el proceso de degradación de los fosfatos de alta energía parece ser irreversible a lo largo de la intoxicación. A la misma conclusión se llega cuando se analizan los niveles de fósforo inorgánico cardíaco. Si bien hay un aumento hasta la 4a hora y una disminución posterior, posiblemente ese descenso se deba a que el fosfato escapa al exterior de las células. En apoyo de esto, encontramos que el fósforo inorgánico de suero aumenta continuamente a lo largo de la intoxicación.

De acuerdo con estos resultados, no cabe esperar que en el corazón intoxicado "in vivo" ocurra una reactivación de la aconitasa por efecto del citrato acumulado. Al menos

podemos afirmar que, si dicha reactivación ocurre -cosa que no podemos descartar con nuestros datos- ello no se traduce en restitución de los niveles de fosfatos de alta energía del tejido. En este punto conviene aclarar que nuestras condiciones experimentales difieren considerablemente de las utilizadas por Williamson, ya que dicho autor trabajó con corazones perfundidos y con dosis de FAc mucho mayores que las utilizadas por nosotros (40). Restaría averiguar si en ese caso puede tener lugar el mecanismo propuesto. Sin embargo, algunos de los experimentos utilizados por Williamson para elaborar su hipótesis podrían interpretarse de maneras alternativas. Por ejemplo, el hecho de que la administración de piruvato haya provocado un aumento de la fuerza contráctil del corazón intoxicado junto con una "aparente" reactivación del ciclo de Krebs, a juzgar por los niveles incrementados de los intermediarios del ciclo, podría deberse a una transaminación del piruvato con glutamato, para dar lugar a α -cetoglutarato (90). En tal caso, la reactivación del ciclo no se debería a una desinhibición de la aconitasa por el citrato, sino a la provisión de un intermediario que se halla más allá del sitio de bloqueo.

Los resultados de las determinaciones de hexosa-fosfatos fueron bastante sorprendentes. Si bien hubo un aumento significativo en el contenido de F6P durante la primera hora de la intoxicación, en los demás tiempos no se observaron

diferencias entre los intoxicados y los controles. En el caso de la FDP, en ningún momento hubo diferencias significativas con respecto a los controles, como tampoco las hubo en el caso de la relación FDP/F6P. Todo esto parece indicar que, a pesar de las variaciones en los niveles de ATP, ADP, fósforo inorgánico, citrato, etc., la actividad de la FFK no fue alterada por la intoxicación, comparada con los respectivos controles. Los niveles de G6P, por otra parte, estuvieron elevados durante las primeras horas de la intoxicación, si bien fueron muy variables, de modo que solo los datos de 0,5, 1 y 6 horas tuvieron significatividad estadística. La elevación inicial de G6P y F6P no causó extrañeza, si se tiene en cuenta que simultáneamente se está produciendo la rápida glucogenólisis que hemos mencionado (46).

El hecho de que la FFK no se haya activado en presencia de una brusca degradación del ATP y acumulación de AMP, fósforo inorgánico, etc., parecería indicar, en primera instancia, que el citrato es capaz de bloquear completamente los efectos activadores de dichas alteraciones. Sin embargo, cuando se analizan los datos con mas detalle resulta difícil aceptar esta interpretación. Durante las 2 primeras horas después de la administración del tóxico, se producen sustanciales acumulaciones de AMP, ADP y fósforo inorgánico, al mismo tiempo que descienden los niveles de ATP (ver fig.5 y 6). Si bien el citrato aumenta durante este período, los niveles no son

todavía muy elevados, sobre todo durante la primera hora (ver fig. 9). A partir de la 4a hora, sin embargo, el AMP y el ADP han bajado por debajo de los valores controles, y el fósforo inorgánico comienza a descender, en tanto que el citrato continúa acumulándose en grandes cantidades. Esto parece indicar que no existe una adecuada correlación en el tiempo entre las distintas alteraciones producidas por el tóxico, como para aceptar la hipótesis mencionada más arriba.

Con el objeto de visualizar más fácilmente lo que acabamos de decir, hemos buscado una manera de expresar numéricamente los fenómenos enunciados. A tal efecto, calculamos para cada tiempo un factor resultante de dividir el producto de las concentraciones de todos los activadores de la enzima medidos en el presente trabajo (AMP, ADP, fósforo inorgánico, F6P, FDP), por el de los inhibidores de la misma (ATP y citrato). Estos datos han sido expresados en la Tabla 8. Por supuesto este tipo de cálculo no pretende reflejar con precisión la realidad y sólo tiene un valor indicativo, pero aun así nos resulta útil para apoyar nuestro razonamiento. Como vemos en la Tabla 8, este factor es 3 veces mayor en los animales intoxicados 1 hora después de administrar el tóxico que en los respectivos controles. A partir de la 3a hora, el factor comienza a ser menor que el control, y a las 18 horas alcanza un valor mínimo, siendo 6 veces menor que el control y 18 veces menor que el valor obtenido después de 1 hora de

intoxicación. Como se comprende, el hecho de que la relación entre las concentraciones de activadores e inhibidores de la enzima varíe a tal extremo sin que se observen alteraciones en la actividad de la misma resulta por lo menos sospechoso, y parece indicar que pueden existir otros factores que no han sido tenidos en cuenta y que afectan críticamente el comportamiento en la enzima.

Para estudiar este problema con más detalle, pensamos en purificar la fosfofructokinasa cardíaca y trabajar "in vitro", con la esperanza de encontrar alguna clave que nos permitiera interpretar los fenómenos observados. Al plantear un experimento de esta naturaleza, se presenta una dificultad inicial, que consiste en establecer el método a seguir para analizar los efectos de cada uno de los factores que intervienen en la regulación de la enzima. Sin embargo, en este caso particular los efectos de cada uno de los metabolitos que hemos visto han sido exhaustivamente estudiados. Lo que nos interesa entonces es averiguar qué sucede con la actividad enzimática cuando se pasa de un medio en el cual las concentraciones de sustratos y metabolitos son las de los corazones normales, a otro medio en el cual dichas concentraciones son las que hemos medido en los corazones intoxicados. Es decir, se trata de averiguar cual es el efecto combinado de todas las alteraciones en los niveles de metabolitos

Producidas por la intoxicación, sobre la actividad de la FFK. Este tipo de enfoque ya fue utilizado previamente por otros investigadores, con el fin de determinar si los efectos medidos en los experimentos cinéticos, en los cuales se utilizan por el general bajas concentraciones de efectores, se reproducían al medir las actividad enzimática en presencia de diversos metabolitos, en concentraciones fisiológicas (64, 91).

En este punto conviene mencionar que, además de los efectos regulatorios ejercidos por el ATP, el AMP, el Pi y otros intermediarios metabólicos sobre la actividad de la FFK, se ha sugerido recientemente que la concentración de iones hidrógeno puede actuar efectivamente regulando la velocidad de la reacción (87). En efecto, experimentos llevados a cabo "in vitro" permitieron demostrar que la actividad de la enzima es extraordinariamente sensible a cambios en el pH relativamente pequeños, y que bajo distintas condiciones de acidez pueden cambiar las potencias relativas de los distintos efectores (69). Sin embargo, no ha sido posible todavía obtener evidencia directa "in vivo", debido a la formidable dificultad técnica que implica la medición directa del pH intracelular (92), si bien existe evidencia indirecta que indica que este mecanismo puede tener real importancia fisiológica. Por ejemplo, utilizando músculo de rana aislado, se vio que existía una notable alteración en el comportamiento de enzimas de la glucólisis cuando se alteraba la proporción de CO₂ en la fase gaseosa, la cual es una

manera indirecta de modificar el pH intracelular (93). Similarmen-
te, trabajando con corazones de rata perfundidos, Scheuer y Berry (94) demostraron que al alcalinizar el flúido de perfusión se producían notorios incrementos en la actividad de la FFK "in vivo", a juzgar por el incremento de la relación (FDP)/(F6P), sin que se modificaran las concentraciones de los nucleótidos de adenina, Pi, etc. (94). Varios autores han sugerido que la acumulación de ácido láctico y la consiguiente acidificación intracelular determinan finalmente una inhibición de la glucólisis en el músculo anóxico (95). En resumen, parecen existir buenas razones para aceptar que el grado de acidificación en el tejido puede jugar un papel regulador sobre la velocidad del flujo glucolítico.

Los ensayos preliminares realizados con nuestro sistema experimental "in vitro" indicaban que la FFK de corazón de rata se comporta en forma similar a la enzima obtenida de otras fuentes, frente a cambios en el pH de reacción, es decir, los efectos de los activadores y/o inhibidores se modifican en forma muy notoria al cambiar ligeramente el pH del medio. En vista de esto, decidimos utilizar el pH como variable independiente, para tener una idea más completa acerca de los que podría esperarse que suceda "in vivo", si además de los cambios en los niveles de los intermediarios metabólicos producidos durante la intoxicación, ocurrieran simultáneamente cambios en el pH del tejido por efecto del tóxico. Lamentablemente,

la medición directa del pH intracelular escapaba a nuestras posibilidades experimentales.

Los resultados confirmaron que, no solamente existe un notorio efecto del pH sobre la actividad de la enzima de una mezcla de reacción dada, sino también que en mezclas de diferente composición el efecto del pH es distinto. Como se puede apreciar en la fig. 10, en la mezcla "control", donde la concentración de ATP es mucho mayor, un pequeño aumento del pH determina una espectacular incremento en la velocidad de la reacción, por encima de pH 7.1. En las mezclas correspondientes a corazones intoxicados, sin embargo, la enzima está menos inhibida a valores de pH neutros y ácidos, pero es menos activa en condiciones alcalinas. Estos resultados son compatibles con las hipótesis enunciadas por Hofer y Pette (87), según las cuales el comportamiento de la enzima frente al pH se debe a una brusca disminución de la afinidad del sitio regulatorio de la enzima por el ATP. Por otra parte en el sitio de sustrato la afinidad no parece depender en forma tan crítica del pH del medio. De todas formas, nuestros experimentos no permiten especular acerca del mecanismo de los fenómenos observados, pues son muchos los factores que cambian simultáneamente al pasar de una mezcla de reacción a otra.

En líneas generales, nuestros resultados indican que,

en el rango de pH 6.9 - 7.1, la enzima se activa notablemente al pasar del medio "control" a los medios de reacción correspondientes a animales intoxicados, a pesar de la espectacular acumulación de citrato. Aparentemente, por lo tanto, en esta zona de pH el efecto activador asociado con la menor concentración de ATP y la mayor concentración de AMP, Pi, etc., es cuantitativamente más importante que el efecto inhibitorio asociado con la acumulación de citrato. A valores de pH más alcalinos se obtiene el efecto opuesto, es decir, la enzima está inhibida en las mezclas "FAC" comparadas con la mezcla "control". Por otra parte, por debajo de pH 6.6 la enzima está igualmente inhibida en todos los medios de reacción, es decir, desaparecen los efectos activadores que se observan en las mezclas correspondientes a corazones intoxicados a valores de pH más altos.

No es fácil evaluar la significación fisiológica que pueden tener estos resultados. Obviamente, una indicación importante es que las posibles variaciones de pH intracelular deben ser tenidas en cuenta antes de extraer conclusiones definitivas acerca del papel regulador que pueden tener los distintos intermediarios metabólicos sobre la velocidad del flujo glucolítico. Esto es particularmente importante en el caso que estamos estudiando, puesto que, a nuestro juicio, cabe esperar que existan alteraciones en la acidez de los tejidos en los animales intoxicados con FAC.

Como dijimos en la Introducción, el efecto global más importante del FAc es el bloqueo del metabolismo aerobio, por cuya razón esta intoxicación tiene muchos puntos en común con la anoxia del tejido. En el caso de la anoxia se ha demostrado que se produce una considerable acidificación intracelular, que se ha atribuído a la gran acumulación de ácido láctico que existe en esas condiciones (96). La magnitud del cambio en el pH dependerá, por supuesto, del poder "buffer" del tejido. Pero, como punto de comparación, creemos útil mencionar que, en experimentos realizados con tejido cerebral se vio que después de una anoxia de 3 minutos la concentración intracelular del ácido láctico había subido a 22 mM/kg agua, en tanto que el pH intracelular, medido por la técnica de la distribución de CO₂, había descendido de 7.1 a 6.5 (97).

En el caso del corazón intoxicado con FAc, vemos que se acumulan cantidades equivalentes de ácido cítrico, y por lo tanto podría esperarse un descenso en el pH intracelular de magnitud comparable. Además, en el animal intoxicado se producen otras alteraciones fisiológicas, tales como la depresión respiratoria, que origina un aumento de la presión parcial de CO₂ en los tejidos, o la cetonemia, que también contribuye a acidificar el organismo (12). Todo esto hace pensar como muy probable que en los animales intoxicados exista una notoria acidificación del medio intracelular.

A la luz de estas consideraciones, y de los resultados obtenidos en nuestros ensayos "in vitro", creemos adecuado emitir una hipótesis para explicar el comportamiento de la FFK que hemos observado "in vivo" en el corazón intoxicado. Nuestros datos indican que, si la enzima se comportara en el tejido de la misma forma que lo hace "in vitro", cabría esperar una activación, más que una inhibición, por efecto del tóxico, si no cambiara el pH intracelular. Sin embargo, si como dijimos anteriormente, el pH desciende como consecuencia de la intoxicación, entonces el tejido iría pasando de un medio en el cual la enzima está inhibida por el ATP a un medio en el cual la enzima sigue inhibida por el efecto combinado del citrato y del pH ácido, a pesar de las condiciones de defosforilación de los nucleótidos de adenina, que normalmente producen activación de la FFK. Nuestros resultados sugieren incluso que la acidificación es mucho más efectiva que la acumulación de citrato (a pH neutro) para contrarrestar los efectos activadores del AMP, Pi, etc. Esto surge de comparar las curvas de "1 hora FAC" y "18 horas FAC" (ver fig. 10), en donde se puede apreciar que un aumento en la concentración de citrato de 9.2 mM a 21.5 mM sólo produce una inhibición del orden de un 50% en la actividad de la enzima a pH 6.9 - 7.1, en tanto que a pH 6.6 o menos la actividad está totalmente inhibida en ambos medios, y la diferente concentración de citrato no produce una notoria

alteración en el comportamiento del sistema.

Esto lo hemos verificado en ensayos separados en los cuales solo se modificó la concentración del citrato, manteniendo el resto de los componentes constante.

Resumiendo, entonces, nuestros resultados "in vitro" nos llevan a considerar la posibilidad de que la acidificación intracelular sea el principal factor responsable de la falta de activación de la FFK, y del flujo glucolítico, ante las condiciones de déficit de ATP y acumulación de AMP y Pi que se producen en el tejido intoxicado.

Es necesario aclarar, sin embargo, que esto es sólo una hipótesis que puede ser útil como base para investigaciones futuras. Ciertamente, en el medio intracelular las condiciones son mucho más complejas que en nuestro sistema "in vitro", en el cual sólo hemos tenido en cuenta aquellos intermediarios metabólicos que generalmente son considerados como los más importantes reguladores fisiológicos de la FFK. Pero existen otros efectores, como el 3,5 AMP cíclico, el ion NH_4^+ , el ion SO_4^- , etc., que se sabe modifican la actividad de la enzima "in vitro", y podrían por lo tanto tener importancia regulatoria "in vivo". Es muy poco lo que se sabe acerca de la concentración de estos efectores en los tejidos bajo distintas condiciones fisiológicas, muy particularmente en el caso del corazón intoxicado con FAc.

Otro punto de extrema importancia es que las propiedades

de la FFK varían al modificar la concentración de proteína enzimática (98). Si bien en nuestros ensayos utilizamos concentraciones de proteína más altas que las que se emplearon en la mayoría de los estudios previos, de todos modos el sistema dista mucho de asemejarse al medio intracelular.

Aun así, a pesar de todas estas deficiencias inherentes a los estudios "in vitro", creemos que la hipótesis que hemos mencionado merece ser tomada en cuenta y, si es posible, puesta a prueba experimental. Obviamente, un paso crítico es la medición directa del pH intracelular durante el curso de la intoxicación.

Si se confirmara que existe una acidificación del tejido por efecto del tóxico, tal como hemos postulado aquí, el hecho podría tener gran importancia toxicológica, no sólo por los efectos sobre la FFK y el flujo glucolítico que hemos mencionado, sino porque proporcionaría una clave adicional para entender los mecanismos del daño producido por este tóxico. Diversos autores han sugerido que la acidificación intracelular puede jugar un papel importante en el daño irreversible producido por la anoxia o la isquemia coronaria (99). A este respecto es interesante hacer notar que, como dijimos previamente (pag. 10), también en el caso de la intoxicación fluoroacética el daño parece ser irreversible respecto de la lesión bioquímica inicial (11), sin que hasta el momento se haya encontrado una explicación satisfactoria para ello.

A diferencia de lo que ocurre en otras circunstancias en este caso parecería que no existe una estrecha correlación entre la glucogenólisis y la glucólisis en el tejido. En efecto, la rápida degradación inicial del glucógeno cardíaco, que parece indicar una activación de la fosforilasa, probablemente por efecto de la acumulación de AMP y la caída del ATP (47), no está acompañada por una activación de la FFK, a juzgar por los datos que hemos mencionado anteriormente.


No se pudo explicar la causa de la acumulación de glucógeno que se produce en la etapa tardía de la intoxicación. Tal fenómeno podría implicar que se inhibe la fosforilasa, o que se activa la glucógeno sintetasa, o que ocurren ambos fenómenos. Es evidente que con nuestros datos no podemos discriminar entre estas posibilidades. De todas formas, creemos conveniente traer a consideración experimentos realizados recientemente por Schulze y colaboradores, quienes demostraron que en el miocardio isquémico se crean condiciones que facilitan la destrucción y pérdida de la fosforilasa, que difunde hacia el exterior del tejido (100). Esto podría tal vez ser la causa de la acumulaciones de glucógeno cardíaco que se producen como secuela de una anoxia crónica (101). Aparentemente, esto se debe a que la fosforilasa existe en la célula formando un complejo macromolecular con el glucógeno. Cuando este es completamente degradado, la fosforilasa se solubiliza y es capaz de difundir hacia el

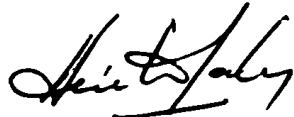
exterior del tejido. Tal fenómeno podría también ocurrir en los corazones intoxicados con fluoroacetato, donde a partir de la primera hora de la intoxicación los depósitos de glucógeno quedan totalmente vacíos (46). De ocurrir un mecanismo de esta naturaleza, podría explicarse la tardía acumulación de glucógeno en el tejido, que podría reaccionar de manera similar al corazón sometido a una anoxia crónica.

CONCLUSIONES

- En las condiciones de nuestros experimentos, se produce una disminución sostenida de las reservas energéticas del músculo cardíaco, más rápida en los momentos iniciales, más lenta después, pero aparentemente irreversible. Esto parece descartar la hipótesis de que el citrato acumulado es capaz de reactivar la aconitasa y restaurar el funcionamiento del ciclo de Krebs y de la fosforilación oxidativa.
- A pesar de que se alteran notablemente todos los factores que intervienen en la regulación de la fosfoructokinasa, la medición de los niveles de F6P y FDP sugiere que la actividad de dicha enzima no se altera "in vivo" durante el curso de la intoxicación.
- El estudio de la actividad de la fosfoructokinasa "in vitro", en presencia de concentraciones de sustratos y metabolitos simulando las halladas "in vivo", revela que, en el rango de pH fisiológico (6.9 - 7.1) la enzima se activa notablemente al pasar a los medios de reacción que reproducen las condiciones halladas en los animales intoxicados, aún en presencia de niveles de citrato 13 veces mayores que los normales.

- Sin embargo, al modificar el pH de los ensayos, se ve que, en medios más ácidos, la enzima tiene la misma actividad en los medios correspondientes a animales intoxicados que en los controles, independientemente de la concentración de ATP, AMP, citrato, etc. Se sugiere que la falta de activación de la FFK observada "in vivo", a pesar de la intensa degradación de ATP y la acumulación de AMP, ADP y Pi, podría deberse, más que al efecto inhibitor del citrato, a una acidificación intracelular que posiblemente acompañe el proceso de intoxicación.
- Las fluctuaciones en los niveles de glucógeno cardíaco observadas durante la intoxicación no parecen reflejar variaciones concomitantes en la velocidad del flujo glucolítico, a juzgar por la falta de activación de la FFK. Se sugiere que la degradación inicial de glucógeno podría deberse a una activación de la fosforilasa b por efecto del AMP y el fósforo inorgánico, junto con la caída del ATP. Según lo sugerido por otros autores, esta prolongada ausencia del glucógeno podría facilitar la destrucción y pérdida de la fosforilasa hacia el exterior del tejido. De ocurrir esto, podría explicarse la acumulación de glucógeno que se observa después de 12 horas de intoxicación.


DR. JOSE A. CASTRO


HECTOR M. GODOY

REFERENCIAS

1. F. Swarts (1896) Bull.Acad.roy.Med.Belg., [3], 31, 675.
2. E. Gryszkiewicz-Trochimowski, A. Sporzynaski y J. Wnuk
(1974) Rec.Trav.Chim., 66, 419.
3. M. B. Chenoweth (1949) Pharmacol.Rev., 1, 383.
4. J. S. C. Marais (1944) J.Vet.Sci.Animal Ind., 20, 67.
5. M. M. de Oliveira (1963) Experientia, 19, 586.
6. A. T. Bell, L. G. Newton, S. L. Everist, y J. Legg (1955)
Aust.Vet.J., 31, 249.
7. T. McEwan (1964) Experientia, 19, 586.
8. T. E. H. Aplin (1971) J.Agr.West.Aust., 4th Ser., 12, 154.
9. R. A. Paterson (1971) J.Mol.Cell Cardiol., 2, 193.
10. R. A. Peters (1957) Advances in Enzymol., 18, 113.
11. R. A. Peters (1963) Biochemical Lesions and Lethal
Synthesis, Pergamon Press, London.
12. F. L. Engel, K. Henson y B. T. Cole (1954) Am.J.Physiol.
179, 324.
13. E. F. Annison, K. J. Hill, D. B. Lindsay y R. A. Peters
(1960) J.Comp.Path.& Ther., 70, 145.
14. F. L. Engels, J. Fredericks y B. T. Cole (1957) Endocrinol.
60, 446.
15. G. R. Bartlett y E. S. G. Barron (19) J.Biol.Chem.,
170, 67.

16. C. Liebecq y R. A. Peters (1949) *Biochim.Biophys.Acta*,
3, 215.
17. G. Kalnitsky y E. S. G. Barron (1948) *Arch.Biochem.*, 19, 75.
18. C. Martius (1949) *Ann.*, 561, 227.
19. P. Buffa y R. A. Peters (1949) *Nature*, 163, 914.
20. C. Liebercq y R. A. Peters (1948) *Proc.Physiol.Soc.*,
Junio 26, 1948 - *J.Physiol.*, vol. 108.
21. A. B. Hastings, R. A. Peters and R. W. Warelin (1955)
Quart.J.Exptl.Physiol., 40, 258.
22. R. O. Brady (1955) *J.Biol.Chem.*, 217, 213.
23. H. A. Krebs (1949) *The tricarboxylic acid cycle Harvey Lect.*
24. H. A. Krebs (1967) *Biochemistry of Mitochondria*, Editores:
E.C. Slater, Z. Kaniuga, L. Nojtcza. *Acad.Press*,
London, pag. 105.
25. S. Gudbjarnason, R. O. Hayden, V. E. Wendt, T. B. Stock
y R. J. Bing (1962) *Circulation*, 26, 937.
26. R. E. Olson (1962) en *Handbook of Physiology*, Editores:
W. F. Hamilton y P. Dow, *Am.Physiological Society*,
Wash., U.S.A., vol.1, pag. 199.
27. G. Fawaz (1956) *Naunyn-Schniedeberg Aul.Exptl.Pathol.*
Pharmakol., 228, 377.
28. E. A. Newsholm y P. J. Randle (1964) *Biochem.J.*, 93, 678.
29. A. Nolleberger (1968) *Am.J.Cardiol.*, 22, 349.
30. M. M. Winbury (1956) *Am.J.Physiol.*, 187, 135.
31. W. C. Yang (1963) *Am.J.Physiol.*, 205, 781.

32. D. M. Regen, W. W. Davis, H. E. Morgan y C. R. Park
(1964) *J.Biol.Chem.*, 239, 43.
33. W. G. Austen, J. J. Greenberg y J. C. Piccinini (1965)
Surgery, 57, 839.
34. A. M. Weissler, F. A. Kruger, N. Baba, D. G. Scarpelli,
R. F. Leighton y J. K. Gallimore (1967) *J.Clin.Invest.*,
47, 403.
35. L. H. Opie (1971) *Cardiology*, 56, 2.
36. P. A. Majid, B. Sharma, M. K. Meeran (19) *Lancet*, 2, 937.
37. O. H. Lowry y J. V. Passonneau (1964) *J.Biol.Chem.*, 239, 31.
38. D. A. Clarke y W. F. Ricker (1950) *J.Pharmacol.*, 99, 118.
39. R. H. Bowman (1964) *Biochem.J.*, 93, 13 C.
40. J. R. Williamson (1967) *J.Biol.Chem.*, 242, 4476.
41. T. E. Mansour (1966) *Pharmacol.Rev.*, 18, 173.
42. P. B. Garland, P. J. Randle y E. A. Newsholme (1963)
Nature, 200, 169.
43. J. V. Passonneau y O. H. Lowry (1962) *Biochem.Biophys.*
Res.Comm., 9, 293.
44. J. R. Williamson, E. A. Jones y G. F. Azzone (1964)
Biochem.Biophys.Res.Comm., 17, 696.
45. J. F. Morrison y R. A. Peters (1954) *Biochem.J.*, 58, 473.
46. H. M. Godoy, E. V. Cignoli y J. A. Castro (1968) *Life*
Sciences, 7, 847.

47. H. E. Morgan y A. Parmeggiani (1964) en Control of Glycogen Metabolism, Editor: W. J. Whelan, Ciba Found.Symposia, Churchill, London, pag. 254.
48. E. Bueding (1964) op.cit.pag. 247.
49. P. B. Garland y P. J. Randle (1964) Biochem.J., 93, 678.
50. P. J. Randle, E. A. Newsholme y P. B. Garland (1964) Biochem.J., 93,652.
51. C. R. Park, H. E. Morgan, M. J. Henderson, D. M. Regen, E. Cadenas y R. L. Post (1961) Recent.Prog.Horm.Res., 17, 493.
52. P. B. Garland, E. A. Newsholme y P. J. Randle (1964) Biochem.J., 93, 665.
53. G. Weber, H. J. Convery, M. A. Lea y N. B. Stamm (1966)
54. M. A. Lea, H. J. Convery, N. B. Stamm y G. Weber (1967) Fed.Proc., 26, 564.
55. R. H. Bowman (1959) Am.J.Physiol., 197, 1017.
56. G. W. E. Plaut y K. A. Plaut (1962) J.Biol.Chem., 199. 141.
57. A. Lardy (1962) en The Enzymes, Editores: P. D. Boyer, H. Lardy y K. Myrback, Academic Press, N.Y., vol.6, pag.67.
58. J. B. Chapell (1964) Biochem.J., 90, 225.
59. J. R. Williamson (1964) J.Biol.Chem., 239, 2721.
60. J. L. Webb (1963) Enzyme and Metabolic Inhibidores, Academic Press, N. Y., vol. 3, pag. 368.

61. O. Kraupp, H. Niessner, B. Ploszczanski, L. Adler-Eastner, A. Springer y J. J. Chirikdjiau (1967) *Eur.J.Pharmac.* 1, 140.
62. A. Wollemberger, O. Ristau y G. Schoffa (1960) *Pfluger's Arch.*, 270, 399.
63. D. D. Tyler y J. Gonze (1967) en *Methods in Enzymology* Editor: R. W. Estabrook y M. E. Pullman, A. Press N.Y., vol.X, pag.75.
64. C. I. Pogson y P. J. Randle (1966) *Biochem.J.*, 100, 683.
65. H. Holzer, J. Haan y S. Schneider (1955) *Biochem.Z.*, 326, 457.
66. T. E. Mansour (1966) en *Methods in Enzymology*, Editor: W. A. Wood, Academic Press, N.Y., vol.IX, pag. 430.
67. O. Kraupp, L. Addler-Kastner, H. Niessner y B. Plank (1967) *Eur.J.Biochem.*, 2, 197.
68. E. V. Cignoli, H. M. Godoy y J. A. Castro, Resultados no publicados.
69. B. Trivedi y W. Danforth (1966) *J.Biol.Chem.*, 241, 4110.
70. G. T. Cori (1955) en *Methods in Enzymology*, vol.I, pag.211.
71. C. R. Krisman (1962) *Anal.Biochem.*, 4, 17.
72. S. Natelson, J. B. Pincus y J. K. Lugoboy (1963) *J.Biol.Chem.* 175, 745.
73. G. Siebert (1963) en *Methods of Enzymatic Analysis*, Editor: H. U. Bergmeyer, Acad.Press, N.Y. pag. 318.
74. G. Siebert, J. Dubuc, R. C. Warner y G. W. E. Plaut (1957) *J.Biol.Chem.*, 226, 965.

75. H. J. Hohorst (1963) en *Methods of Enzymatic Analysis*, pag. 134.
W. Lamprecht y I. Trautschold, *Ibid.* pag., 543.
76. B. L. Strehler (1963) en *Methods of Enzymatic Analysis*, pag. 559.
77. T. Bücher y H. S. Hohorst (1963) en *Methods of Enzymatic Analysis*, pag. 246.
78. H. Adam (1963) en *Methods of Enzymatic Analysis*, pag.573.
79. I. B. Martin y D. M. Doty (1949) *Anal.Chem.*, 21, 965.
80. C. H. Fiske y Y. Subbarow (1925) *J.Biol.Chem.*, 66, 375.
81. B. A. Illingworth y S. A. Russell (1951) *Endocrinol.*, 48, 423.
82. L. L. Iversen, J. Glowinski y J. Axelrod (1965) *J.Pharmacol. exp.Therap.*, 150, 173.
83. A. Fleckenstein, J. Janke y E. Gerlach (1959) *Arch.Exptl. Pathol.Pharmakol.*, 335, 243.
84. J. R. Williamson (1965) *J.Biol.Chem.*, 240, 2308.
85. E. H. Kass y B. A. Waisbren (1945) *Proc.Soc.Exptl.Biol.Med.*, 60, 303.
86. J. R. Williamson (1967) *J.Biol.Chem.*, 242, 4476.
87. H. W. Hofer y D. Pette (1968) *Hoppe-Seyler's physiol.Chem.*, 349, 1368.
88. R. W. Von Korff (1967) *Nature*, 214, 23.
89. H. P. Baer, G. I. Drummond y E. L. Duncan (1966) *Mol.Pharmacol.*, 2, 67.
90. D. E. Green, L. F. Leloir y V. Nocito (1945) *J.Biol.Chem.*, 161, 559.

91. J. V. Passonneau y O. H. Lowry (1962) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 7, 10.
92. W. J. Waddell y R. G. Bates (1969) *Physiol. Reviews*, 49, 185.
93. W. H. Danforth (1965) en *Control of Energy Metabolism*, Editores: B. Chance, R. W. Estabrook, J. R. Williamson, Academic Press, N.Y. pag. 287.
94. J. Scheuer y M. N. Berry (1967) *Am. J. Physiol.*, 218, 1143.
95. E. Ronzoni y M. Kerly (1933) *J. Biol. Chem.*, 103, 175.
96. E. Bittar (1964) en *Cell pH*, Editor: E. Bittar, Butterworth Washington.
97. A. F. Kaasik, L. Nilsson y B. K. Siesö (1970) *Acta Physiol. Scand.*, 78, 433.
98. E. C. Hulme y K. F. Tipton (1971) *FEBS Letters*, 12, 197.
99. M. A. Ricciutti (1972) *Am. J. Cardiol.*, 30, 492.
100. W. Schulze, E. G. Krause y A. Wolleberger (1971) *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2, 241.
101. J. Scheuer y J. W. Stetoski (1970) *Circul. Res.*, 27, 835.