O Piruvato Melhora a Energética Mitocondrial num Modelo Animal *Ex-Vivo* de Isquemia Miocárdica Global [6]

PEDRO MONTEIRO[1,2], ANA DUARTE[3], ANTÓNIO MORENO[3], LINO GONÇALVES[1,2], LUÍS A. PROVIDÊNCIA[1,2]

[1] Unidade de Investigação Básica em Cardiologia – Serviço de Cardiologia, Hospitais da Universidade de Coimbra, Coimbra
[2] Clínica de Cardiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Coimbra
[3] Centro de Neurociências e Biologia Celular de Coimbra, Coimbra

Rev Port Cardiol 2003;22 (1): 79-88

RESUMO

O piruvato é um substracto energético com reconhecidas propriedades cardioprotectoras. Sabe-se hoje que isso se deve não só à sua actividade antioxidante, mas também ao facto de reduzir a acidose intracelular, modular a cinética intracitosólica do cálcio e melhorar a contractilidade cardiomiocitária. Porém, só recentemente é que se começou a compreender a importância das mitocôndrias cardíacas para a ocorrência destas alterações benéficas, sendo que os mecanismos concretos de actuação do piruvato a nível mitocondrial estão ainda largamente por esclarecer.

Com o objectivo de estudar o efeito do piruvato na função mitocondrial de corações isquémicos utilizou-se um modelo animal de perfusão *ex-vivo* com um sistema de Langendorff, seguido de isquemia na presença ou ausência de piruvato. Avaliou-se o potencial eléctrico da membrana mitocondrial, o consumo de oxigénio (O_2) pela cadeia respiratória (e o respectivo índice de controlo respiratório) e as cargas energéticas geradas com diversos substratos energéticos.

Verificou-se que o piruvato actua no sistema oxidativo, melhorando de forma não significativa o consumo de O_2 durante a isquemia (elevação do índice de controlo respiratório – ICR), mas sobretudo ao nível do sistema fosforilativo, encurtando de forma significativa o ciclo fosforilativo (*Lag phase*) e melhorando a produção de ATP (aumento da carga energética), o que permitiu

ABSTRACT

Pyruvate Improves Mitochondrial Bioenergetics in an Ex-vivo Animal Model of Myocardial Ischemia

Pyruvate is an energy substrate with known cardioprotective activity. We know now that this is due not only to its antioxidant activity, but also to its reduction of intracellular acidosis, modulation of intracytosolic calcium and improvement of cardiomyocyte contractility. However, the role of cardiac mitochondria in such positive effects has only recently begun to be understood and the exact mechanisms of the effect of pyruvate on mitochondria are still largely unknown. Aiming to study the effect of pyruvate on cardiac mitochondrial function during acute ischemia, we used an *ex-vivo* animal model, perfused in a Langendorff system and then subjected to ischemia in the presence and absence of pyruvate. We evaluated the mitochondrial membrane electrical potential, the respiratory chain O_2 consumption (and respiratory control ratio) and the energy charges generated with different energy substrates.

We conclude that pyruvate has some effect on the mitochondrial oxidative system (by non-significantly improving the respiratory control ratio), but its main action is on the phosphorylation system, significantly decreasing the time taken to complete a phosphorylation cycle (lag phase) and improving ATP production (increase in energy charge), thus allowing better maintenance of mitochondrial membrane structure, with consequent improvement of

Recebido para publicação: Setembro de 2002 • Aceite para publicação: Outubro de 2002
Received for publication: September 2002 • Accepted for publication: October 2002

assegurar uma maior integridade das estruturas membranares mitocondriais, com manutenção do potencial eléctrico após o ciclo fosforilativo. Estes achados permitem compreender melhor os mecanismos inerentes aos efeitos citoprotectores do piruvato em portadores de cardiopatia isquémica, demonstrando claramente a importância das mitocôndrias cardíacas neste processo.

Palavras-Chave
Isquemia; Piruvato; Mitocôndria

the electrical potential after a phosphorylation cycle. These findings have enabled better understanding of the mechanisms behind pyruvate cytoprotection in ischemic cardiomyopathy, clearly highlighting the essential role of cardiac mitochondria in this process.

Key words
Ischemia; Pyruvate; Mitochondria

INTRODUÇÃO

Sabe-se hoje que o miocárdio depende largamente da oxidação de nutrientes extraídos da circulação coronária, por forma a assegurar a produção de energia, essencial para a manutenção da sua actividade contráctil. Apesar de poder utilizar diversos substractos metabólicos, incluindo ácidos gordos, glicose, piruvato, lactato e aminoácidos, alterações no fornecimento dos substratos podem induzir importantes alterações na função e energética cardíacas [1, 2]. Foi já demonstrado que o piruvato melhora a contractilidade cardíaca, quer em corações isolados [2, 3] quer em corações *in situ* [4], mesmo quando estão disponíveis outros substratos energéticos. Corações perfundidos com piruvato dispõem de mais energia livre, decorrente da hidrólise de ATP, a qual pode ser usada para a eficaz realização das actividades contrácteis dos cardiomiócito [2, 4]. Tais actividades requerem uma correcta cinética do cálcio sarcoplasmático; em cardiomiócitos isolados superfundidos com piruvato, ocorre um aumento das correntes transitórias de cálcio e uma melhoria do encurtamento das células cardíacas, em comparação com preparações tratadas com lactato ou acetato [5]. Estes achados parecem demonstrar a existência de uma relação entre o piruvato, a melhoria da energética citosólica, do transporte sarcoplasmático de cálcio e da função contráctil do miocárdio [6]. Uma primeira análise destes dados parece levar à conclusão de que os efeitos benéficos do piruvato se devem exclusivamente às suas acções a nível citosólico; aliás, o também já demonstrado efeito anti-oxidante e protector da indução da transição de permeabilidade mitocondrial do piru-

INTRODUCTION

It is known that the myocardium depends to a large extent on the oxidation of nutrients obtained from coronary circulation to produce the energy required to maintain its contractile activity. Although different metabolic substrates can be used, including fatty acids, glucose, pyruvate, lactate and amino acids, changes in the substrate supply can cause significant alterations in cardiac function and energetics [1, 2]. It has been demonstrated that pyruvate improves cardiac contractility, in both isolated [2, 3] and *in situ* [4] hearts, even when other energy substrates are available. Hearts perfused with pyruvate have more free energy available resulting from the hydrolysis of ATP, which can be used for the efficient performance of cardiomyocyte contractile activity [2, 4]. This requires a proper sarcoplasmic calcium kinetics; in isolated cardiomyocytes superfused with pyruvate, there is an increase in calcium transients and an improvement in cardiac cell shortening, compared to preparations treated with lactate or acetate [5]. These findings would appear to demonstrate the existence of a relation between pyruvate and improvement in cytosolic energetics, sarcoplasmic calcium transport and myocardial contractile function [6]. Initial analysis of these data would seem to point to the conclusion that the beneficial effects of pyruvate are due exclusively to its activity at the cytosolic level. Furthermore, the demonstrated antioxidant effect of pyruvate and the protection it affords against induction of the mitochondrial permeability transition [7-9] have also generally been attributed to its cytosolic effects (scavenging for free oxygen radicals, especially

vato [7-9], tem também sido habitualmente maioritariamente atribuído aos seus efeitos citosólicos (actividade *scavanger* de radicais livres de oxigénio – especialmente ao nível do NADH [7] e melhoria do pH citosólico [8]; é também colocada – mas não demonstrada – a hipótese de o piruvato, enquanto bom substracto energético para a cadeia respiratória mitocondrial poder, dessa forma, manter um adequado potencial eléctrico mitocondrial e impedir a transição de permeabilidade) [8]. Porém, a importância das mitocôndrias na acção cardioprotectora do piruvato é claramente demonstrada pelo facto de, na presença de α-ciano-3-hidroxicinamato, um inibidor da captação mitocondrial do piruvato, as acções benéficas previamente referidas terem sido severamente limitadas [6].

Porém, a dúvida persiste: como é que o piruvato influencia a função mitocondrial em situações de stress miocárdico?

Com o objectivo de estudar melhor os mecanismos de acção do piruvato a nível da função mitocondrial cardíaca, foi utilizado um modelo animal *ex-vivo* de isquemia miocárdica global, precedida de perfusão num sistema de Langendorff.

MATERIAL E MÉTODOS

Este protocolo experimental foi desenvolvido de acordo com o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, publicado pelos *US National Institutes of Health* (NIH publication No. 85-23, revised 1996).

Grupos experimentais

Vinte e seis ratos Wistar de ambos os sexos foram distribuídos por três grupos: Controlo (n=10) – não submetido a isquemia; Isquémico (n=10) – submetido a perfusão e isquemia, na ausência de piruvato; Piruvato (n=6) – submetido a perfusão e isquemia, ambas na presença de piruvato 10 mM.

Montagem do sistema de perfusão ex-vivo

Os ratos Wistar foram mortos por inalação de CO_2. O coração foi rapidamente extraído da cavidade torácica e foi suspenso pela porção superior da aorta torácica ascendente na extremidade do sistema de perfusão do tipo Langendorff. Cada coração foi posteriormente perfundido com um meio de Krebs modificado (NaCl 118 mM, KCl 4,7 mM, KH_2PO_4 1,2 mM, $NaHCO_3$ 25 mM, $MgSO_4$ 1,2 mM, Na_2EDTA

NADH [7], and improving cytosolic pH) [8]. It has also been suggested, though not demonstrated, that pyruvate, as a good energy substrate for the mitochondrial respiratory chain, may in this way maintain an adequate mitochondrial electrical potential and prevent the permeability transition [8]. However, the importance of the mitochondria in the cardioprotective activity of pyruvate is clearly demonstrated by the fact that in the presence of -cyano-3-hydroxycinnamate, an inhibitor of mitochondrial pyruvate uptake, the beneficial effects described above are considerably reduced [6].

Nevertheless, the question remains: how does pyruvate affect mitochondrial function in situations of myocardial stress?

With the aim of acquiring a better understanding of the mechanisms behind pyruvate activity in cardiac mitochondrial function, an *ex-vivo* animal model was used, perfused by the Langendorff method and then subjected to global myocardial ischemia.

METHODS

The experimental protocol was conducted in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, published by the US National Institutes of Health (NIH publication No. 85-23, revised 1996).

Experimental Groups

Twenty-six Wistar rats of both genders were divided into three groups: control (n=10) – not subjected to ischemia; ischemic (n=10) – subjected to perfusion and ischemia, without pyruvate; pyruvate (n=6) – subjected to perfusion and ischemia, both in the presence of 10 mM pyruvate.

Setup of the ex-vivo perfusion system

The Wistar rats were sacrificed by CO_2 inhalation. The heart was rapidly extracted from the chest cavity and suspended by the upper part of the ascending thoracic aorta to the end of the Langendorff perfusion system. Each heart was then perfused with a modified Krebs medium (118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH_2PO_4, 25 mM $NaHCO_3$, 1.2 mM $MgSO_4$, 0.5 mM Na_2EDTA, 10 mM glucose and 3 mM $CaCl_2$), containing O_2 in solution and maintained at a temperature of 37 ºC, for a varying period (180 minutes for the control group and 60 minutes for the other two groups). Pyruvate (10 mM) was added to this solution in

0,5 mM, Glicose 10 mM e $CaCl_2$ 3 mM), contendo O_2 em solução e mantido à temperatura de 37ºC, por um período variável (180 minutos para o grupo controlo e 60 minutos para os restantes grupos). A esta solução foi adicionado piruvato (10 mM), no respectivo grupo experimental. Com excepção do grupo controlo, todos os corações de rato foram submetidos de seguida a 120 minutos de isquemia a 37ºC numa solução idêntica à do período de perfusão, mas sem glicose e O_2.

Preparação de material biológico

Isolamento de mitocôndrias de coração de rato:

No final dos 180 minutos, a fracção mitocondrial foi isolada a partir do coração de rato de acordo com o método descrito por Rickwood e colaboradores [10].

Métodos laboratoriais utilizados

Determinação do potencial transmembranar mitocondrial

O potencial eléctrico transmembranar ($\Delta\Psi$) foi avaliado através do registo permanente da distribuição do catião lipofílico tetrafenilfosfónio (TPP+) através da membrana mitocondrial. Este registo foi obtido graças à utilização de um eléctrodo selectivo para TPP^+.

As reacções realizaram-se a 25ºC, numa câmara de reacção aberta, termoestável, em 1 mL de meio de reacção (sacarose 130 mM, KCl 50 mM, KH_2PO_4 2 mM, Ácido (N-[2-hidroxietil] piperazina – N' – [2-etanosulfónico]) (HEPES) 5 mM, EDTA 50 µM, pH 7.2), suplementado por 3 µM de TPP^+ e a suspensão mitocondrial. Os cálculos do $\Delta\Psi$ mitocondrial foram executados de acordo com a seguinte equação (a 25ºC): $\Delta\Psi$ (mV)=59 log (v/V) – 59 log ($10^{\Delta E/59}$ – 1), onde v, V e ΔE representam, respectivamente, o volume mitocondrial, o volume do meio de incubação e a deflexão do potencial do eléctrodo desde a linha basal. Para o volume mitocondrial usou-se o valor de 1,1 µl/mg de proteína.

Avaliação da actividade respiratória mitocondrial

Os ensaios decorreram à temperatura de 25ºC, numa câmara de reacção fechada, termostatizada e com a capacidade de 1 mL. O consumo de O_2 foi avaliado polarograficamente com um eléctrodo de O_2 (*Yellow Springs Instruments, Co.*) de tipo Clark, ligado a um registador.

the appropriate experimental group. With the exception of the control group, all the rat hearts were then subjected to 120 minutes of ischemia at 37ºC in a solution similar to that used in the perfusion period but without glucose or O_2.

Preparation of the biological material

Isolation of rat heart mitochondria:

After 180 minutes, the mitochondrial fraction was isolated from the rat hearts using the method described by Rickwood et al. [10].

Laboratory methods

Determination of mitochondrial membrane potential

The membrane electrical potential ($\Delta\Psi$) was measured via the continuous recording of the distribution of the lipophilic cation tetraphenylphosphonium (TPP^+) through the mitochondrial membrane. The recording was obtained using an electrode selective for TPP^+.

Reactions were carried out at 25ºC, in a thermostable open reaction chamber, in 1 mL of the reaction medium (130 mM sucrose, 50 mM KCl, 2 mM KH_2PO_4, 5 mM N-[2-hydroxyethyl] piperzine-N'-[2-ethanesulfonic acid] (HEPES), 50 M EDTA, pH 7.2), supplemented by 3 µM TPP^+ and the mitochondrial suspension. Mitochondrial $\Delta\Psi$ was calculated using the following equation (at 25ºC): $\Delta\Psi$ (mV)=59 log (v/V)-59 log ($10^{\Delta E/59}$-1), where v, V and E represent, respectively, the mitochondrial volume, the incubation medium volume and the electrode potential deflection from the base line. For the mitochondrial volume, the value used was 1.1 µl/mg of protein.

Assessment of mitochondrial respiratory activity

Reactions took place at 25ºC, in a thermostatically-controlled closed reaction chamber with a capacity of 1 mL. O_2 consumption was measured polarographically with a Clark O_2 electrode (Yellow Springs Instruments Co.), coupled to a Kipp & Zonen recorder.

The reactions began with the addition of the mitochondrial suspension to the above reaction medium. The addition of the respiratory substrate (10 mM glutamate + 5 mM malate, 5 mM succinate or 5 mM ascorbate + 0.25 mM N,N,N',N'-tetramethylphenylenediamine [TMPD]) induced an increase in O_2 consumption by the mitochondrial fraction. Respiratory state 3 (characterized by greater and

dor Kipp & Zonen.

As reacções iniciaram-se com a adição da suspensão mitocondrial ao meio de reacção atrás referido. A adição do substrato respiratório [glutamato 10 mM + malato 5 mM, succinato 5 mM ou ascorbato 5 mM + N,N,N',N'-Tetrametil-P-Fenilenodiamina (TMPD) 0,25 mM] induziu um aumento do consumo de O_2 por parte da fracção mitocondrial. O estado respiratório 3 (caracterizado por um maior e mais rápido consumo de O_2) foi posteriormente despoletado pela adição de 250 nmol de ADP (62,5 nmol se o substrato usado foi o Ascorbato/TMPD). Após o consumo de todo o ADP adicionado, a reacção volta a apresentar uma velocidade mais reduzida, o estado respiratório 4.

O índice de controlo respiratório (ICR) foi avaliado como o quociente entre a velocidade respiratória na presença de ADP (estado 3) e após o consumo do ADP adicionado (estado 4).

Avaliação da carga energética

Os nucleótidos de adenina (ATP, ADP e AMP) foram extraídos utilizando um procedimento de extracção acídica e separados por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), fase reversa. As cargas energéticas foram calculadas de acordo com a fórmula: ([ATP]+0,5*[ADP]/([ATP]+[ADP]+[AMP])).

Avaliação dos resultados e estatística

Os resultados deste trabalho são apresentados como percentagem do controlo, para o número de experiências indicadas.

O tratamento estatístico dos resultados foi realizado utilizando o teste t de *Student* não emparelhado. O nível de significância utilizado foi o de $p<0,05$.

RESULTADOS

Os resultados obtidos mostram que a fosforilação oxidativa é muito sensível à isquemia, a qual afecta drasticamente o acoplamento mitocondrial, tal como fica demonstrado pelo decréscimo do índice de controlo respiratório (ICR), quando comparado com o valor obtido para as mitocôndrias do grupo controlo (2,68 *vs* 1,51±0,13 - 100% *vs* 56,3±4,9%; p=0,001). O piruvato (10 mM) permitiu a obtenção de uma melhoria, embora não significativa, dos valores de ICR, relativamente ao grupo isquémico (1,9±0,27 - 70,9±10,1%; p=ns) – *Fig. 1*. Para todos os grupos experimentais, os valores do ICR foram obtidos para os ensaios em que se utilizou o glutamato/malato como substrato

more rapid O_2 consumption) was then triggered by the addition of 250 nmol of ADP (62.5 nmol when the substrate used was ascorbate/TMPD). Once all the added ADP had been consumed, the reaction velocity decreases (respiratory state 4).

The respiratory control ratio (RCR) was calculated as the ratio between respiratory velocity in the presence of ADP (state 3) and that following consumption of the added ADP (state 4).

Assessment of the energy charge

The adenine nucleotides (ATP, ADP and AMP) were extracted using an acidic extraction procedure and separated by reverse-phase high-pressure liquid chromatography (HPLC). The energy charges were calculated using the formula ([ATP]+0,5*[ADP]/([ATP]+[ADP]+[AMP])).

Assessment of results and statistical analysis

The results of this study are presented as percentages of the control, for the number of experiments indicated.

Statistical analysis of the results was carried out using the Student's-test for non-paired data. A value of $p<0.05$ was considered statistically significant.

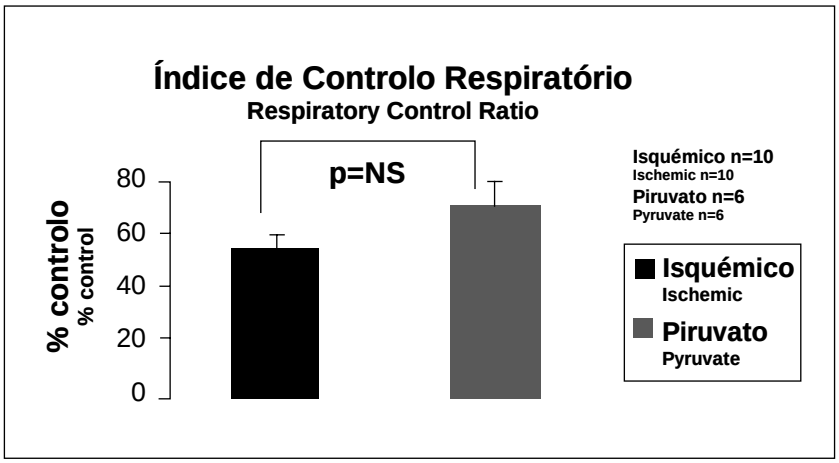
RESULTS

The results obtained showed that oxidative phosphorylation is extremely sensitive to ischemia, which dramatically affects mitochondrial coupling, as demonstrated by the decrease in the respiratory control ratio (RCR) compared to the value obtained for the control group mitochondria (2.68 vs. 1.51±0.13 – 100% vs. 56.3±4.9%; p=0.001). The presence of pyruvate (10 mM) led to an improvement, although not significant, in RCR values in comparison with the ischemic group (1.9±0.27 – 70.9±10.1%; p=NS) (*Fig. 1*). In all the experimental groups, the RCR values were obtained using glutamate/malate as the energy substrate.

While testing glutamate/malate as the energy substrate for complex I of the mitochondrial respiratory chain, it was found that the electrical potential values obtained at the end of the phosphorylation cycle ($\Delta\Psi$) decreased significantly in the presence of ischemia compared with those of the control group (206.5

Fig. 1 Comparação dos valores de ICR em mitocôndrias cardíacas de rato (submetidas a isquemia na ausência ou presença de Piruvato 10 mM), obtidos utilizando como substrato energético o Glutamato/Malato. Os valores são apresentados como % do controlo.

Fig. 1 Comparison of RCR values in rat heart mitochondria (subjected to ischemia in the absence and presence of pyruvate 10 mM), obtained using glutamate/malate as the energy substrate. Values are presented as % of control.



energético.

Ao testar o glutamato/malato como substrato energético para o complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, verificou-se que os valores do potencial eléctrico obtido após a conclusão do ciclo fosforilativo ($\Delta\Psi$) diminuíram de uma forma significativa na presença da isquemia, quando comparados com os do grupo controlo (206,5 *vs* 174,6±3,6 mV - 100% *vs* 84,6±1,7%; p<0,001). Na presença de piruvato, ocorreu uma melhoria significativa nos valores do potencial eléctrico no final do ciclo fosforilativo, relativamente ao grupo isquémico, (193,7±2,8 mV *vs* 174,6±3,6 mV – 93,8±1,4%; vs. 174.6±3.6 mV – 100% vs. 84.6±1.7%; p<0.001). In the presence of pyruvate, there was a significant improvement in the electrical potential values at the end of the phosphorylation cycle compared to the ischemic group (193.7±2.8 mV vs. 174.6±3.6 mV – 93.8±1.4% vs. 84.6± 1.7%; p=0.003) (*Fig. 2A*). Similar results were observed (*Figs. 2B and C*) when the electrical potential generated after phosphorylation was compared in the ischemic and pyruvate groups, using as energy substrate succinate – 197.0±3.9 mV vs. 176.3± 3.8 mV – 93.4±1.8% vs. 83.6±1.8%; p=0.003) and ascorbate/TMPD (substrate for complex IV – 196.0±2.6 mV vs. 178.6±4.5

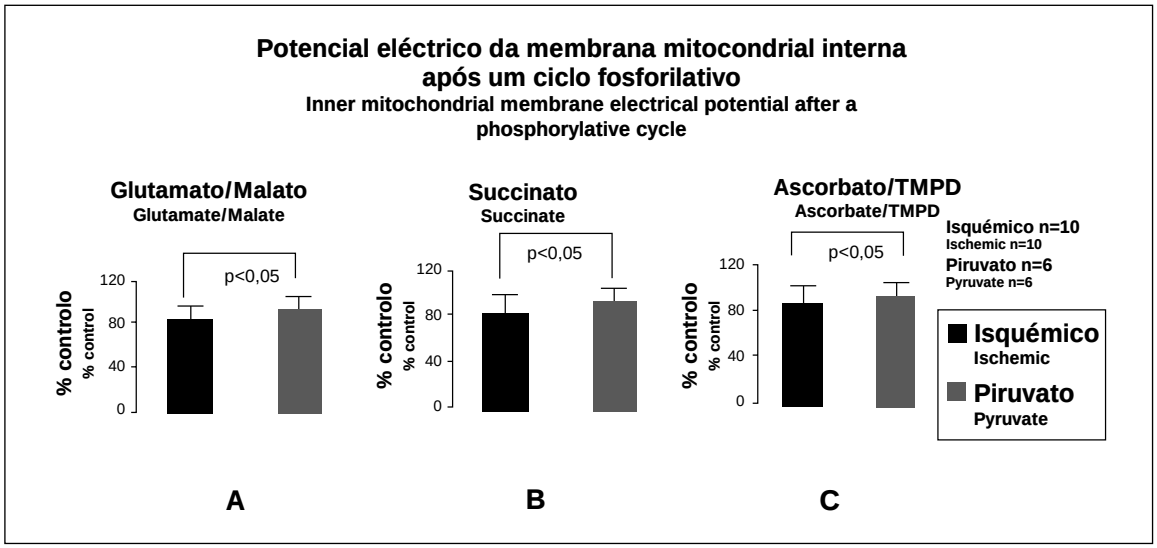


Fig. 2 Comparação dos potenciais eléctricos após um ciclo fosforilativo ($\Delta\Psi$) dos grupos experimentais isquémico e Piruvato 10 mM, obtidos após a adição do substrato energético ao meio de reacção contendo mitocôndrias cardíacas de rato. A - Glutamato/Malato; B - Succinato e C - Ascorbato/TMPD. Os valores são apresentados como % do controlo.

Fig. 2 Comparison of electrical potentials after a phosphorylation cycle ($\Delta\Psi$) between the experimental groups (ischemic and pyruvate 10 mM), obtained after addition of the energy substrate to the reaction medium containing rat heart mitochondria. A - Glutamate/Malate; B - Succinate; C - Ascorbate/TMPD. Values are presented as % of control.

vs 84,6±1,7; p=0,003) – *Fig. 2A*. Resultados semelhantes foram também observados (*Figs. 2B e C*) quando se comparou o potencial eléctrico após fosforilação, desenvolvido pelos grupos isquémico e piruvato, utilizando como substratos energéticos o succinato – 197,0±3,9 mV *vs* 176,3±3,8 mV – 93,4±1,8% *vs* 83,6±1,8%; p=0,003) e o ascorbato/TMPD (substracto do complexo IV da mesma cadeia – 196,0±2,6 mV *vs* 178,6±4,5 mV – 95,4±1,3% *vs* 86,9±2,2%; p=0,01).

Outro dos parâmetros avaliados foi o intervalo de tempo necessário para a fosforilação de uma quantidade fixa de ADP (250 nmol) – a denominada *Lag phase*. Quanto menor este valor, mais rapidamente se completa o ciclo fosforilativo. Neste estudo observou-se um aumento da *Lag phase* no grupo isquémico quando comparado com o controlo, usando como substrato o glutamato/malato (59,1 *vs* 127,2±19 segundos – 100% *vs* 215,3±32,2%; p=0,001), bem como o succinato (66,5 *vs* 275,7±46 segundos – 100% *vs* 414,9±69,2%; p=0,0001) e o ascorbato/TMPD (31,5 *vs* 62,4±11,6 segundos - 100% vs.198,1±6,7%; p=0,001). Quando comparado com o grupo isquémico isolado (*Fig. 3A, B e C*), o piruvato permitiu reduzir de uma forma não significativa o valor da *Lag phase*, quando se utilizou como substrato o succinato (173±13,4 segundos – 260,3±20,1%; p=ns), e com significado

mV – 95.4± 1.3% vs. 86.9±2.2%; p=0.01).

Another parameter assessed was the time interval, known as the lag phase, needed for phosphorylation of a fixed quantity of ADP (250 nmol). The lower this value the faster the phosphorylation cycle is completed. In this study, an increase in the lag phase was seen in the ischemic group compared to the control, using glutamate/malate as the substrate (59.1 vs. 127.2±19 seconds – 100% vs. 215.3± 32.2%; p=0.001), as well as with succinate (66.5 vs. 275.7±46 seconds – 100% vs. 414.9±69.2%; p=0.0001) and ascorbate/TMPD (31.5 vs. 62.4±11.6 seconds – 100% vs. 198.1±6.7%; p=0.001). When compared with the group subjected to ischemia (*Fig. 3A, B and C*), pyruvate led to a non-significant reduction in the lag phase when succinate was used as the substrate (173±13.4 seconds – 260.3±20.1%; p=NS), and to statistically significant reductions when glutamate/malate (72±2.2 seconds – 121.9±3.7%; p=0.04) and ascorbate/TMPD (271.3 seconds – 85.7±4.1%; p=0.01) were used.

As already stated, we also assessed the energy charge ([ATP]+0.5*[ADP]/([ATP]+[ADP]+[AMP])) generated for each of the above energy substrates. Once again, the experimental group subjected to ischemia presented a lower energy charge than the control

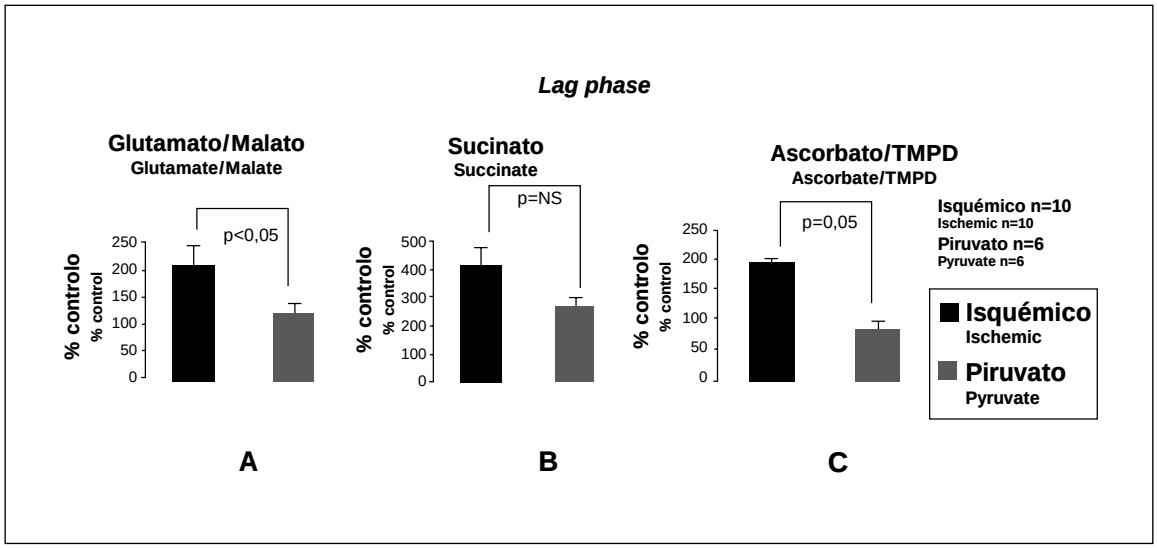


Fig. 3 Comparação dos valores de Lag phase fosforilativa dos grupos experimentais isquémico e Piruvato 10 mM, após a adição de 250 nmol de ADP ao meio contendo mitocôndrias cardíacas de rato e o substrato energético. A - Glutamato/Malato; B - Succinato; C - Ascorbato/TMPD. Os valores são apresentados como % do controlo.

Fig. 3 Comparison of the phosphorylation lag phase values of the experimental groups (ischemic and pyruvate 10 mM), after addition of 250 nmol of ADP to the medium containing rat heart mitochondria and the energy substrate. A - Glutamate/Malate; B - Succinate; C - Ascorbate/TMPD. Values are presented as % of control.

estatístico quando se usou o glutamato/malato (72±2,2 segundos – 121,9±3,7%; p=0,04) e o ascorbato/TMPD (27±1,3 segundos – 85,7± 4,1%; p=0,01).

Como foi já referido, procedeu-se também à avaliação da carga energética ([ATP]+0,5* [ADP]/([ATP]+[ADP]+[AMP])) gerada para cada um dos substratos energéticos atrás citados. Também aqui o grupo experimental submetido a isquemia isolada apresentou uma carga energética inferior à do grupo controlo para todos os complexos enzimáticos avaliados, tendo esta diferença atingido significado estatístico para o glutamato/malato (0,965 vs. 0,94±0,01 – 100% *vs* 97,4±1%; p=0,04), mas não para o succinato (0,79 *vs* 0,64±0,04 – 100% *vs* 81±5,1%; p=ns) ou o ascorbato/ TMPD (0,7 *vs* 0,59±0,03 – 100% *vs* 84,3±5,7%; p=ns). No que respeita ao grupo experimental que recebeu o piruvato, as suas cargas energéticas revelaram-se significativamente superiores às do grupo isquémico (*Fig. 4A, B e C*), para todos os substratos avaliados (glutamato/malato: 0,98±0 - 101,6±0% – p=0,04; succinato: 0,97±0,005 - 122,7±0,6% – p=0,04; ascorbato/TMPD: 0,82±0,003 – 117,1±0,4% – p=0,006).

DISCUSSÃO

Ficou pela primeira vez demonstrado que o piruvato, na concentração utilizada neste estudo (10 mM), tem um efeito benéfico global no metabolismo mitocondrial cardíaco durante a isquemia, tanto ao nível dos sistemas oxidativo como fosforilativo. Relativamente ao sistema de fosforilação, o impacto positivo foi sobretudo visível em corações com carga energética tratados com piruvato que mostraram uma subida substancial nos níveis de ATP comparativamente aos submetidos a isquemia na ausência de qualquer fármaco anti-isquémico. Assim, a melhoria reportada na energética celular [6] mostrou ser devida a um aumento na produção mitocondrial de ATP. Isto foi corroborado

group for all the enzyme complexes used, the difference being statistically significant for glutamate/malate (0.965 vs. 0.94±0.01 – 100% vs. 97.4±1%; p=0.04), but not for succinate (0.79 vs. 0.64±0.04 – 100% vs. 81±5.1%; p=NS) or ascorbate/TMPD (0.7 vs. 0.59±0.03 – 100% vs. 84.3±5.7%; p=NS). With regard to the experimental group to which pyruvate was added, the energy charges were significantly higher than those of the ischemic group (*Fig. 4 A, B and C*), for all the substrates assessed (glutamate/malate: 0.98±0 – 101.6±0% – p=0.04; succinate: 0.97±0.005 - 122.7±0.6% – p=0.04; ascorbate/TMPD: 0.82±0.003 – 117.1±0.4% – p=0.006).

DISCUSSION

It has been shown for the first time that pyruvate, in the concentration used in this study (10 mM), has an overall beneficial effect on cardiac mitochondrial metabolism during ischemia, in both the oxidative and phosphorylative systems. Regarding the phosphorylation system, the positive impact was mainly seen in energy charge-hearts treated with pyruvate showed a substantial rise in ATP levels compared to those subjected to ischemia in the absence of any anti-ischemic drug. Thus, the reported improvement in cellular energetics [6] was shown to be due to an increase in mitochondrial production of ATP. This was corrobo-

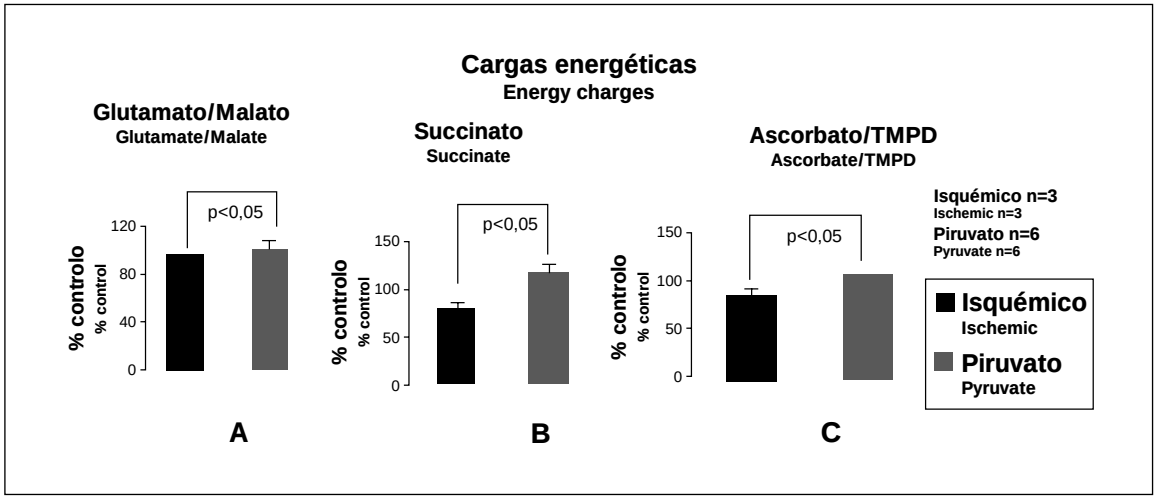


Fig. 4 Comparação dos valores de carga energética (obtidos por HPLC) dos grupos experimentais isquémico e Piruvato 10 mM, após a adição de 250 nmol de ADP ao meio contendo mitocôndrias cardíacas de rato e o substrato energético. A - Glutamato/Malato; B – Succinato; C - Ascorbato/TMPD. Os valores são apresentados em % do controlo.

Fig. 4 Comparison of energy charge values (obtained by HPLC) of the experimental groups (ischemic and pyruvate 10 mM), after addition of 250 nmol of ADP to the medium containing rat heart mitochondria and the energy substrate. A - Glutamate/Malate; B - Succinate; C - Ascorbate/TMPD. Values are presented as % of control.

tudo (10 mM), tem um efeito globalmente benéfico sobre o metabolismo mitocondrial cardíaco durante a isquemia, quer ao nível do sistema oxidativo, quer do fosforilativo. No que respeita ao sistema fosforilativo, o impacto positivo fez-se sentir sobretudo ao nível das cargas energéticas, revelando os corações tratados com piruvato uma elevação substancial dos níveis de ATP, quando comparados com aqueles que foram submetidos a isquemia na ausência de qualquer fármaco anti-isquémico. Fica assim demonstrado que a já reportada melhoria dos níveis energéticos celulares [6] se deve a um aumento da produção mitocondrial de ATP, o que é corroborado pelo facto de também relativamente à *Lag phase*, parâmetro que avalia a rapidez do ciclo fosforilativo, os resultados terem sido positivos, verificando-se uma significativa aceleração da fosforilação do ADP nos corações perfundidos com piruvato.

É também de ressaltar o facto de ficar demonstrado que, nos corações submetidos a isquemia na presença de piruvato, ocorreu uma maior recuperação do potencial eléctrico mitocondrial após o ciclo fosforilativo, traduzida por uma menor diferença entre o potencial eléctrico máximo e o obtido após a fosforilação do ADP. Isto significa que, ao contrário do grupo isquémico, o grupo tratado com piruvato foi capaz de manter o equilíbrio electroquímico, indispensável para a sustentação do potencial eléctrico membranar, sem que tal tenha ocorrido à custa de um exagerado consumo de ATP, pois as cargas energéticas no final do ciclo fosforilativo foram claramente superiores no grupo piruvato. Estes dados corroboram a hipótese de as actividades antioxidante e protectora da indução da transição de permeabilidade exibidas pelo piruvato [7-9] se dever, fundamentalmente, a uma melhoria da fosforilação oxidativa mitocondrial (com menor produção de espécies reactivas de oxigénio) [6], de onde decorre a capacidade de manter um mais adequado potencial eléctrico mitocondrial (pois menos oxigénio foi consumido em vias não produtoras de ATP, gerando-se, assim, mais ATP, o que tornou possível a manutenção dos gradientes eléctricos transmembranares).

Estes achados levam-nos a confirmar a hipótese anteriormente levantada [6], segundo a qual a cardioprotecção induzida pelo piruvato no contexto de isquemia miocárdica se deve essencialmente ao seu impacto positivo no metabolismo mitocondrial, e não, como até recentemente se propunha [5, 7, 8], a acções essen-

rated by the fact that the results regarding the lag phase, a measure of the speed of the phosphorylation cycle, were also positive, with a significant acceleration of ADP phosphorylation in the hearts perfused with pyruvate.

It should also be noted that the present study demonstrates that in hearts subjected to ischemia in the presence of pyruvate there is a greater recovery of mitochondrial electrical potential after the phosphorylation cycle, reflected in a smaller difference between the maximum electrical potential and that obtained after ADP phosphorylation. This means that, in contrast to the ischemic group, the group treated with pyruvate was able to maintain the electrochemical equilibrium, which is essential to sustain the membrane electrical potential, without inducing excessive consumption of ATP, since the energy charges at the end of the phosphorylation cycle were noticeably higher in the pyruvate group. These data support the hypothesis that the antioxidant activity of pyruvate, and the protection that it offers against the permeability transition [7-9], is basically due to an improvement in mitochondrial oxidative phosphorylation (with lower production of reactive oxygen species) [6]. This enables a more adequate mitochondrial electrical potential to be maintained (since less oxygen was consumed in pathways that do not produce ATP, thus generating more ATP and making it possible to maintain transmembrane electrical gradients).

These findings allow us to confirm the hypothesis previously presented [6], according to which the cardioprotection offered by pyruvate in myocardial ischemia is basically due to its positive effect on mitochondrial metabolism, and not, as had been until recently suggested [5, 7, 8], essentially due to its cytosolic activity. If confirmed in future clinical studies, this will open up new perspectives in the treatment of ischemic heart disease, a major cause of mortality and morbidity in Western societies.

CONCLUSIONS

By promoting a more efficient consumption of O_2, pyruvate leads to the production of greater quantities of energy (ATP) and preserves the membrane electrical potential.

The increased ATP production, in the presence of a reduced supply of O_2, demonstrates that pyruvate appears to act as a pharmacological pre-conditioning agent, triggering in the

cialmente citosólicas. Estes factos, a comprovarem-se em futuros estudos clínicos, permitiriam abrir novas perspectivas no tratamento da cardiopatia isquémica, uma importante causa de mortalidade e de morbilidade nas sociedades ocidentais.

CONCLUSÕES

Ao promover um mais eficiente consumo de O_2, o piruvato induz a produção de maiores quantidades de energia (na forma de ATP) e preserva o potencial eléctrico membranar.

A ocorrência de um aumento da produção de ATP, num contexto de reduzida oferta de O_2, revela que o piruvato parece actuar como um pré-condicionante farmacológico, desenvolvendo no miocárdio os mecanismos necessários para a sua protecção e sobrevivência em condições de isquemia.

Estes resultados permitem, pela primeira vez, comprovar claramente que o efeito cardioprotector do piruvato é, em grande parte, mediado por efeitos positivos ao nível da função mitocondrial.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi parcialmente financiado pela Procardio.

myocardium the necessary mechanisms for its protection and survival in ischemic conditions.

These results clearly prove for the first time that the cardioprotective effect of pyruvate is, to a large extent, mediated by its positive effects on mitochondrial function.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was partly funded by Procardio.

Pedido de separatas para:
Address for reprints:

LINO GONÇALVES
Serviço de Cardiologia
Hospitais da Universidade de Coimbra
Praceta Prof. Mota Pinto
3000 COIMBRA
Tel.: 239 400 400 (Extensão 13038) – Fax: 239 837 081
E-mail: lgoncalv@ci.uc.pt

BIBLIOGRAFIA / REFERENCES

1. Burkoff D, Weiss RG, Schulman SP, Kalil-Filho R, Wannenburg T, Gerstenblith G. Influence of metabolic substrate on rat heart function and metabolism at different coronary flows. Am J Physiol 1991;261:H741-H750.

2. Mallet RT, Bünger R. Energetic modulation of cardiac inotropism and sarcoplasmic reticular Ca2+ intake. Biochim Biophys Acta 1994;1224:22-32.

3. Zweier JL, Jacobus WE. Substrate-induced alterations of high energy phosphate metabolism and contractile function in the perfused heart. J Biol Chem 1987;262:8015-21.

4. Zhou Z, Lasley RD, Hegge JO, Bünger R, Mentzer RM. Myocardial stunning: a therapeutic conundrum. J Thorac Cardiovasc Surg 1995;110:1391-401.

5. Martin BJ, Valdivia HH, Bünger R, Lasley RD, Mentzer Jr. RM. Pyruvate augments calcium transients and cell shortening in rat ventricular myocytes. Am J Physiol 1998;274:H8-H17.

6. Mallet RT, Sun J. Mitochondrial metabolism of pyruvate is required for its enhancement of cardiac function and energetics. Cardiovasc Res 1999;42:149-61.

7. Bassenge E, Sommer O, Schwemmer M, Bünger R. Antioxidant pyruvate inhibits cardiac formation of reactive oxygen species through changes in redox state. Am J Physiol Circ Physiol 2000;279:H2431-H2438.

8. Kerr PM, Suleiman MS, Halestrap AP. Reversal of permeability transition during recovery of hearts from ischemia and its enhancement by pyruvate. Am J Physiol 1999;276:H496-H502.

9. Bindoli A, Brazon E, Rogobello MP. Inhibitory effect of pyruvate on release of glutathione and swelling of rat heart mitochondria. Cardiovasc Res 1995;30:821-4.

10. Rickwood D, Wilson MT, Darley-Usmar VM. Isolation and characteristics of intact mitochondria – Isolation of mitochondria from mammalian cells. In: Darley-Usmar VM, Rickwood D and Wilson MT, eds. Mitochondria: a practical approach. Oxford, England: IRL Press 1987;4-5.