

CONTRIBUCIONES ORIGINALES

EFFECTOS DEL 3'5' MONOFOSFATO CICLICO DE ADENOSINA, TRIFOSFATO DE ADENOSINA, NORADRENALINA Y GLUCAGON, SOBRE LA LIPOLISIS BASAL *IN VITRO* EN EL TEJIDO ADIPOSO EPIDIDIMAL DE LA RATA

ROBERTO LLAMAS *

Las enzimas lipolíticas existentes en el tejido adiposo son activadas por el 3'5' monofosfato cíclico de adenosina (MCA), directamente por la proteinquinasa dependiente del nucleótido. El MCA in vitro favorece, en efecto, la lipólisis en el tejido adiposo epididimal de la rata. El MCA se sintetiza en el organismo a partir del trifosfato de adenosina (ATP) por acciones catalíticas de la adenilciclase, enzima existente en todos los elementos celulares.

En el presente estudio se encontró que el ATP, por sí mismo, no modifica la lipólisis basal in vitro, seguramente porque en tales condiciones no es transformado en MCA. Por lo contrario, los efectos lipolíticos propios de la adrenalina y del glucagón aumentan sensiblemente cuando se les agrega ATP. Tanto el glucagón como las catecolaminas favorecen la síntesis o la actividad de la adenilciclase, por lo cual el aumento en la lipólisis provocado por el trifosfato de adenosina se explica por la transformación de éste en monofosfato cíclico por influencia de la adenilciclase activada o formada previamente por la catecolamina y por el glucagón.

Se deduce de lo anterior que la presencia o ausencia de concentraciones normales de ATP en la célula adiposa puede ser factor limitante o regulador de la lipólisis basal, conjuntamente con la presencia o ausencia de las hormonas de efectos lipolíticos.

Los ácidos grasos no esterificados y el glicerol existentes en el plasma sanguíneo proceden fundamentalmente de la hidrólisis de los triglicéridos que integran al tejido adiposo. La lipólisis es influida por diversos factores, entre los cuales son de particular importancia los hormonales. Las catecolaminas, adrenalina y noradrenalina, la estimulan tanto *in vivo* como *in vitro*, en la rata como en el hombre.¹⁻⁴ Las hormonas tiroideas ejercen efecto semejante, y en la tirotoxicosis humana o cuando se administran dichas hormonas, se eleva el contenido de ácidos grasos no esterificados

en el plasma sanguíneo.⁵⁻⁸ El peso de la grasa epididimal de la rata desciende notablemente en los animales tratados con triyodotironina; este descenso es proporcionalmente muy superior a la baja de peso corporal originado por la hormona.⁹

La acción lipolítica de las catecolaminas disminuye en el hipotiroidismo y se eleva en la tirotoxicosis.¹⁰⁻¹² Se acepta que en el hipotiroidismo se abate el efecto estimulante de las catecolaminas sobre la formación y actividad de la adenilciclase, lo que conduce a menor síntesis del 3'5' monofosfato cíclico de adenosina (MCA), agente que estimula en forma directa a la lipólisis al favorecer la actividad de las enzimas lipolíticas.

* Académico titular, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México.

ticas, entre ellas la trigliceridasa hormonosensible.¹³ Además, los adipocitos de ratas hipotiroideas no responden a las acciones lipolíticas de la adrenalina y del glucagón, porque en estos animales aumenta la actividad de la fosfodiesterasa, enzima que hace perder al monofosfato el carácter cíclico indispensable para su actividad.¹⁴

Las hormonas glucocorticoides carecen de efectos directos sobre la lipólisis *in vitro*, pero aumentan la originada por la adrenalina, debido a que la estimulan la formación de la proteinoquinasa dependiente del MCA, cuya presencia es necesaria para que se ejerzan las acciones del nucleótido sobre la lipólisis.⁴ Relaciones semejantes existen entre el monofosfato cíclico y los efectos lipolíticos de la somatotropina¹⁵ y del glucagón.⁴

El monofosfato cíclico de adenosina se encuentra tanto en organismos pluricelulares como unicelulares. Es biosintetizado a partir del trifosfato de adenosina (ATP) por efecto de la adenilciclase, enzima existente en todos los tejidos del organismo como integrante de las membranas celulares o de estructuras de tipo membranoso como lo es el retículo endoplásmico. Las hormonas lipolíticas favorecen la síntesis *de novo* o la actividad de la adenilciclase. La disponibilidad de ATP, en un momento dado, puede ser factor limitante para la biosíntesis del monofosfato cíclico, cuya actividad sobre las enzimas lipolíticas se vería así modificada o regulada.

En el presente trabajo se ha investigado el efecto lipolítico, *in vitro*, sobre adipocitos aislados del tejido adiposo epididimal de la rata, del monofosfato cíclico de adenosina, del ATP, y de las hormonas lipolíticas noradrenalina y glucagón, solas o con adición de ATP, para tratar de saber si el ATP, por sí mismo, es capaz de elevar la actividad lipolítica basal, y si el mismo ATP modifica la de las hormonas en estudio.

Cuadro 1 Efectos del MCA (2 micromolas) sobre la lipólisis basal, *in vitro*, del tejido adiposo epididimal de la rata. Miliequivalentes de ácido palmítico por gramo de grasa

Muestras normales	Con MCA	Con ATP
1. 0.038	0.045	0.043
2. 0.038	0.046	0.040
3. 0.042	0.053	0.040
4. 0.038	0.043	0.035
5. 0.040	0.049	0.040
6. 0.038	0.043	0.037
7. 0.043	0.056	0.042
8. 0.039	0.048	0.038
Prom.	Prom.	Prom.
0.039 ± 0.002	0.048 ± 0.005	0.040 ± 0.003

Cuadro 2 Efectos de la adrenalina (20 microgramos) y de la adrenalina más ATP (2 micromolas) sobre la lipólisis basal *in vitro*, del tejido adiposo epididimal de la rata. Miliequivalentes de ácido palmítico por gramo de grasa

Muestras normales	Noradrenalina	Noradrenalina más ATP
1. 0.043	0.051	0.054
2. 0.039	0.048	0.053
3. 0.040	0.047	0.051
4. 0.039	0.047	0.050
5. 0.038	0.045	0.050
6. 0.041	0.046	0.049
7. 0.039	0.045	0.054
8. 0.038	0.043	0.050
Prom.	Prom.	Prom.
0.040 ± 0.002	0.048 ± 0.003	0.051 ± 0.002

Material y métodos

Se utilizaron ratas blancas machos, de ocho a diez semanas de edad, con peso entre 190 y 230 gramos, procedentes de la granja del Instituto de Biología (UNAM). Se les mantuvo en jaulas individuales con alimentación *ad libitum* a base de Purina y de agua natural. Después de anestesia con éter dietílico fueron muertas por fractura cervical. El tejido adiposo epididimal fue removido y pesado; se incubó luego durante sesenta minutos en amortiguador de bicarbonato con albúmina (Sigma Chem. Co.) al 4 por ciento con colagenasa bacteriana (Sigma Chem. Co.) para separar adipocitos según el procedimiento de Rodbell.¹⁶ Las suspensiones de células grasas fueron incubadas durante dos horas con agitación continua en incubador Dubnoff a 38°C., previa adición, en las muestras indicadas, de MCA (Sigma Chem. Co.), ATP (Nutr. Biochem. Co.), noradrenalina (Sigma Chem. Co.), glucagón cristalino (Sigma Chem. Co.) a las concentraciones respectivas de 2.0 micromolas, 2.0 micromolas, 20 microgramos y 20 microgramos, en volumen total de cuatro ml. por matraz. La suspensión de células grasas en cada experimento correspondió a 0.30 g. de tejido adiposo.

La lipólisis se apreció cuantificando la liberación de ácidos grasos no esterificados según el procedimiento de Dole.¹⁷

Con las modalidades seguidas en este trabajo, se encontró que la cantidad de ácidos grasos libres por gramo de grasa, expresada en miliequivalentes de ácido palmítico, varió en condiciones normales de 0.038 a 0.043. En ocasiones fue necesario reunir la grasa epididimal de dos o tres animales. En todos los casos se prepararon muestras incubadas y sin incubar, por duplicado y aun por triplicado, para medir en ellas la

acidez existente y eliminar, por diferencia, factores de error.

Resultados

Estos se presentan en los cuadros 1, 2 y 3.

Discusión

En el tejido adiposo existen diversas enzimas lipolíticas, como son la trigliceridasa hormonosensible; hidrolasas de di y monoglicéridos; hidrolasas de ésteres del colesterol y otra lipasa hormonosensible cuya característica importante es la de actuar en medio ácido. Todas ellas son activadas por la proteinoquinasa dependiente del monofosfato cíclico de adenosina.^{18,19}

Se encontró que el MCA estimula la lipólisis basal en el tejido adiposo en forma directa; el aumento de actividad llegó a 23 por ciento.

El monofosfato cíclico de adenosina es biosintetizado a partir del ATP por efecto de la adenilciclase; tanto el trifosfato de adenosina como la enzima son integrantes de todos los elementos celulares; esta última se localiza sobre todo en las membranas de las células y en las estructuras de tipo membranoso. Es posible, por lo tanto, que la adición de ATP a preparados de adipocitos *in vitro*, pudiera intensificar la lipólisis por formación de nuevas moléculas de MCA. En los experimentos aquí presentados no pudo demostrarse tal efecto, probablemente porque no se produjo activación o formación de la adenilciclase.

El efecto lipolítico de la noradrenalina se manifestó por aumento de 20 por ciento sobre la cifra basal; el glucagón lo elevó en 13 por ciento.

Tanto la actividad lipolítica de la noradrenalina como la del glucagón aumentan en presencia de ATP.

Cuadro 3 Efectos del glucagón cristalino y del glucagón más ATP (20 microgramos y 2 micromolas respectivamente) sobre la lipólisis basal *in vitro* en el tejido adiposo epididimal de la rata. Miliequivalentes de ácido palmítico por gramo de grasa

Muestras normales	Glucagón	Glucagón más ATP
1. 0.041	0.048	0.051
2. 0.038	0.044	0.050
3. 0.040	0.047	0.051
4. 0.038	0.042	0.048
5. 0.038	0.044	0.050
6. 0.040	0.045	0.051
7. 0.039	0.043	0.046
8. 0.038	0.043	0.047
Prom.	Prom.	Prom.
0.039 ± 0.003	0.044 ± 0.004	0.049 ± 0.002

La primera se eleva de 20 a 27.5 por ciento, y la del glucagón de 13 a 25 por ciento. Es probable que la presencia de las hormonas estimule la formación o la actividad de la adenilciclase y en tales condiciones, el ATP presente pueda dar lugar a la formación del monofosfato cíclico de adenosina.

Por lo tanto, la presencia o ausencia de concentraciones normales de ATP en la célula grasa puede ser factor que regule la lipólisis basal, conjuntamente con la presencia o ausencia de las hormonas de efectos lipolíticos.

REFERENCIAS

1. Klainer, L. M.; Chi, Y. M.; Freidberg, S. L.; Rall, T. W., y Sutherland, E. V.: *Adenylcyclase. IV. The effect of neurohormones on the formation of adenosine 3'5' phosphate by preparations from brain and other tissues*. J. Biol. Chem. 237:1239, 1962.
2. Hamosh, M.; Hamosh, P.; Bar-Maor, J. A., y Cohen, H.: *Fatty acid metabolism by human adipose tissue*. J. Clin. Invest. 42:1648, 1951.
3. Bjorntrop, P.: *The fatty acid release and lipolysis of human adipose tissue in vitro*. Metabolism 13:1318, 1964.
4. Lambert, S. W. M.; Timmermans, H. A. T.; Kramer-Blankes, M., y Birkenhager, J. C.: *The mechanism of the potentiating effect of glucocorticoids on catecholamine induced lipolysis*. Metabolism 24:681, 1975.
5. Rich, C.; Bierman, E. C., y Schwarz, I. L.: *Plasma non esterified fatty acids in hyperthyroid states*. J. Clin. Invest. 38:275, 1959.
6. Tibbling, G.: *Glycerol turnover in hyperthyroidism*. Clin. Chim. Acta 24:121, 1969.
7. Jacobsen, B. B.: *Blood lipids during treatment of hyperthyroidism*. Acta Endocrinol. 72:443, 1973.
8. Rosenquist, V.; Efendic, S.; Jereb, B., y Ostman, J.: *Influence of the hypothyroid state on lipolysis in human adipose tissue in vitro*. Acta. Med. Scand. 189:381, 1971.
9. Llamas, R.: *Efectos comparativos de la 3,3',5' triiodotironina sobre la actividad de la glucosa-6-fosfatasa en el hígado y en el tejido adiposo epididimal de la rata. Modificaciones del peso corporal y del peso de la grasa epididimal originadas por la hormona*. GAC. MÉD. MÉX. 113:533, 1977.
10. Deykin, D., y Vaughan, M.: *Release of free fatty acids by adipose tissue from rats treated with triiodothyronine and propylthiouracil*. J. Lipid. Res. 4:200, 1963.
11. Goodman, H. M., y Bray, G. A.: *Role of thyroid hormones on lipolysis*. Amer. J. Physiol. 210:1053, 1966.
12. Gilbert, C. H., y Galton, D. J.: *The effect of catecholamines and fasting of cyclic AMP and release of glycerol from human adipose tissue*. Horm. Metab. Res. 6:229, 1974.
13. Griel, V., y Rosenquist, U.: *Inhibition of the noradrenaline induced adenyl cyclase stimulation by augmented alpha adrenergic response in subcutaneous adipose tissue from hypothyroid subjects*. Acta Med. Scand. 194:129, 1973.
14. Van Inwegwn, R. G.; Robinson, A. G., y Thompson, W. S.: *Cyclic nucleotide phosphodiesterase and thyroid hormones*. J. Biol. Chem. 250:2452, 1975.
15. Fain, J. M.; Dodd, A., y Novak, L.: *Relationship of protein synthesis and cyclic AMP to lipolytic action of growth hormone and glucocorticoids*. Metabolism 20:109, 1971.
16. Rodbell, M.: *Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis*. J. Biol. Chem. 233:239, 1964.
17. Dole, V. P.: *A relation between non-esterified fatty acids in plasma and the metabolism of glucose*. J. Clin. Invest. 35:150, 1956.
18. Khoo, J. C.; Steinberg, D.; Huang, J. J., y Vagelos, P. R.: *Tryglyceride, diglyceride, monoglyceride and cholesterol ester hydrolases in chicken adipose tissue activated by adenosine 3'5' monophosphate dependent protein kinase. Chromatographic resolution and immunochemical differentiation from lipoprotein lipase*. J. Biol. Chem. 251:2882, 1976.
19. Hjemdhal, P., y Fredholm, B. B.: *Cyclic AMP dependent and independent inhibition of lipolysis by adenosine and decreased pH*. Acta Physiol. Scand. 96:170, 1976.

LA HIPOTESIS EN INVESTIGACION CLINICA

En la historia de la ciencia se encuentran numerosos casos de teorías que fueron útiles temporalmente para la explicación de los hechos, por tener cierta base experimental, y que han sido reemplazadas más tarde al adquirirse nuevos conocimientos. Un buen ejemplo de esto es la hipótesis formulada por Semmelweis en 1847, sobre la etiología de la fiebre puerperal, según la cual, el padecimiento era debido a la "materia cadavérica" o a la "materia pútrida de los organismos vivos", transmitida a las mujeres en trabajo de parto por las manos de los médicos y los estudiantes de medicina. Semmelweis obtuvo evidencia en apoyo de su hipótesis al comprobar que la mortalidad por fiebre puerperal descendió del 10 por ciento al uno por ciento, una vez que se ordenó al personal médico lavarse las manos en solución de cloruro de cal, antes de examinar a las parturientas. La hipótesis del genial cuanto desventurado Semmelweis poseía cierto fundamento teórico y, sobre todo, tenía validez práctica. De haber sido universalmente aceptada, hubiera salvado la vida de muchos miles de mujeres; pero nunca pudo haber tenido comprobación absoluta; y fue sustituida años más tarde por la teoría microbiana de Pasteur. [Sepúlveda, B.: *Aspectos esenciales de la metodología en la investigación clínica. La hipótesis*. GAC. MÉD. MÉX. 100:725, 1970.]