

Influencia del cortisol y de los inhibidores de la biosíntesis de proteínas (puromicina) sobre la actividad lipolítica, *in vitro*, del 3'5' monofosfato cíclico de adenosina

ROBERTO LLAMAS*

Ha sido demostrado que la actividad lipolítica de la adrenalina aumenta sensiblemente cuando los adipocitos aislados del tejido graso epididimal de la rata se preincubaban con dexametasona, un potente glucocorticoesteroide de estructura modificada; al mismo tiempo, en el medio se eleva la concentración de la proteinquinasa dependiente del 3'5' monofosfato cíclico de adenosina, a la que se debe, en forma directa, el aumento en la lipólisis.

En el presente trabajo se ha encontrado que la preincubación de los adipocitos con cortisol incrementa a su vez la actividad lipolítica del monofosfato cíclico de adenosina. Este incremento no se produce cuando al cortisol se agrega, durante la preincubación, puromicina, un inhibidor de la biosíntesis de proteínas, cuya acción es la de inhibir la formación de la proteinquinasa.

La puromicina no impide, por otra parte, que se manifieste el efecto lipolítico del monofosfato cíclico ejercido por la proteinquinasa preexistente. El cortisol posee, a las concentraciones utilizadas en este trabajo, actividad lipolítica *in vitro* de moderada magnitud, muy inferior a la ejercida en forma directa por el nucleótido.

Las hormonas que estimulan la lipólisis, a la cabeza de las cuales se halla la epinefrina,¹ actúan en este sentido porque inducen la formación del 3'5' monofosfato cíclico de adenosina, (MCA), al activar al sistema enzimático adenilciclasa, al que se debe la síntesis del monofosfato a partir del trifosfato de adenosina (ATP). Los efectos lipolíticos del MCA se ejercen en realidad por la proteinquinasa que de él depende, y se explican por la activación sobre la función o síntesis de las enzimas lipolíticas que la quinasa produce. Estas enzimas son, entre otras, la trigliceridasa hormonosensible,

di y monogliceridasas y las hidrolasas de ésteres del colesterol.²⁻⁴

Ha sido demostrado que los glucocorticoesteroides naturales, como el cortisol y los de estructura modificada, como la dexametasona, treinta veces más potente que aquel, incrementan la actividad lipolítica de la adrenalina en células grasas, porque favorecen la síntesis previa de la proteinquinasa, sin que disminuya la actividad fosfodiesterásica en los mismos adipocitos.⁵

Si bien los glucocorticoesteroides estimulan, como se ha visto, la biosíntesis de la proteinquinasa, existe evidencia experimental, por lo contrario, de que los efectos fisiológicos de estas hormonas no son mediados por el monofosfato cíclico de adenosina, según se deduce de muy diversas investigaciones,⁶⁻¹¹

* Académico titular. Departamento de Biología Experimental. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México.

porque no son capaces de estimular a la adenilciclasa y no pueden formar, por tal motivo, MCA a partir del ATP. Se acepta, por lo tanto, que el MCA no es el segundo mensajero necesario para que se manifiesten las acciones de los glucocorticoesteroides, particularmente en lo que a inducción de actividades enzimáticas se refiere. Por otra parte, la estimulación de la lipólisis originada por la adrenalina no se manifiesta si en el medio no existen concentraciones fisiológicas de glucocorticoesteroides,^{12,13} y se ha señalado que la actividad lipolítica propia de estas hormonas esteroidales queda bloqueada por efecto de los inhibidores de la biosíntesis del ácido ribonucleico o de las proteínas, como son la actinomicina D, la puromicina y la cicloheximida, lo que indica que tal actividad lipolítica se debe a la formación previa de la proteinquinasa, cuya síntesis es impedida por dichos inhibidores.¹⁴

En el presente trabajo se han estudiado los cambios en la lipólisis basal producidos por la incubación prolongada de adipocitos aislados del tejido graso epididimal de la rata sin la adición de sustancia alguna, y las modificaciones en la misma lipólisis originadas por cortisol, cortisol más MCA y cortisol más puromicina y MCA, con la finalidad de aclarar, por estos experimentos, si la actividad que ejerce el MCA se abate cuando la formación previa de la proteinquinasa dependiente del nucleótido, estimulada por el cortisol, es bloqueada por los inhibidores de la biosíntesis de proteínas.

Otro aspecto del estudio es ver si estos inhibidores son capaces o no de oponerse al efecto directo del monofosfato cíclico sobre la lipólisis estimulada por la proteinquinasa preexistente en el medio.

Material y métodos

El tejido adiposo epididimal se obtuvo de ratas blancas de 200 a 250 gramos de peso, provenientes del criadero del Instituto de Biología (UNAM) alimentadas *ad libitum* con Purina y agua natural. Después de ser removido y pesado, se le fraccionó e incubó durante dos horas en el incubador Dubnoff a 38°C y agitación constante, con buffer de bicarbonato y albúmina (albúmina bovina, fracción V. Nutricional Biochemicals Corp.) y colagenasa bacteriana (Sigma Chem. Co.) con la finalidad de separar las células grasas.¹⁵ Las suspensiones de adipocitos se preincubaron e incubaron posteriormente en el mismo aparato y a la misma temperatura, con adición de las sustancias señaladas con anterioridad, en la forma que se indica a continuación:

1o. Adipocitos incubados durante cuatro horas, sin adición de sustancia alguna.

2o. Adipocitos incubados durante cuatro horas, previa adición de 5.0 microgramos de succinato de cortisol (Hydrocortisone 21-sodium succinate. Sigma Chem. Co.) equivalentes a 3.7 microgramos del esteroide puro.

3o. Adipocitos incubados durante cuatro horas, previo agregado al medio de dos micromolas de 3'5' monofosfato cíclico de adenosina (Sigma Chem. Co.)

4o. Adipocitos preincubados durante tres horas con 5.0 microgramos de succinato de cortisol. Adición posterior de dos micromolas de MCA e incubación durante sesenta minutos.

5o. Adipocitos preincubados durante tres horas, previa adición de 5.0 microgramos de succinato de cortisol y de un miligramo de dihidroclorhidrato de puromicina (Sigma Chem. Co.). Adición posterior de dos micromolas de monofosfato cíclico de adenosina e incubación durante sesenta minutos.

El volumen final en cada matraz de incubación fue de 4 ml. En cada experimento se utilizó suspensión de adipocitos equivalente a 0.40 g. de grasa epididimal.

La lipólisis originada en cada uno de estos sistemas se cuantificó midiendo la concentración de ácidos grasos liberados, mediante el procedimiento de Trout y col.¹⁶, modificación del de Dolc.¹⁷

Resultados

Los resultados se puntualizan en los cuadros 1 a 3.

Cuadro 1. Contenido de ácidos grasos libres en adipocitos aislados del tejido graso epididimal de la rata. Cambios producidos por la incubación a 38°C durante cuatro horas.
(Millequivalentes de ácido palmítico por gramo de grasa).

Adipocitos sin incubar		Adipocitos incubados	
	0.028		0.036
	0.028		0.038
	0.027		0.038
	0.030		0.037
	0.029		0.038
	0.030		0.035
	0.031		0.040
	0.026		0.038
	0.032		0.037
	0.028		0.033
Promedio	0.028	Promedio	0.037
Desviación de la media ±	0.0020	Desviación de la media ±	0.0020

Cuadro 2. Modificaciones de la lipólisis en adipocitos aislados del tejido graso epididimal de la rata producidas por la adición de 5.0 microgramos de succinato de cortisol y por dos micromolas de 3'5' monofosfato cíclico de adenosina, después de cuatro horas de incubación a 38°C.

(Miliequivalentes de ácido palmítico por gramo de grasa).

Adipocitos más cortisol		Adipocitos más MCA	
0.039		0.052	
0.038		0.049	
0.039		0.050	
0.043		0.052	
0.044		0.048	
0.043		0.050	
0.042		0.045	
0.038		0.050	
0.043		0.046	
0.044		0.052	
Promedio	0.041	Promedio	0.049
Desviación de la media	± 0.0025	Desviación de la media	± 0.0025

Comentarios

Puede verse que la incubación de los adipocitos durante tiempo prolongado (cuatro horas) estimula por sí sola a la lipólisis, ya que se produce aumento en la concentración de los ácidos grasos libres, que va de 0.028 a 0.037 miliequivalentes de ácido palmítico por gramo de grasa, lo que representa elevación de 35 por ciento.

Por lo que se refiere a la lipólisis estimulada por los glucocorticosteroides, es de señalarse que se ha demostrado que estas hormonas actúan en forma positiva cuando sus efectos se estudian *in vivo*,¹² pero los resultados son contradictorios cuando se investigan *in vitro*.¹⁸⁻²⁰ En este trabajo se ha encontrado que concentraciones de cortisol de 3.7 microgramos en volumen total de 4 ml. en cada experimento, hacen aumentar de 0.037 a 0.041 los miliequivalentes de ácido palmítico por gramo de grasa, lo que representa incremento del once por ciento.

En forma comparativa, la estimulación de la lipólisis producida por el monofosfato cíclico de adenosina (dos micromolas en volumen de 4 ml.) es mucho más notable que la ejercida por el cortisol. Los miliequivalentes de ácido palmítico por gramo de grasa ascendieron de 0.037 a 0.049, lo que representa aumento de 32 por ciento.

Se ha demostrado que la actividad lipolítica de la adrenalina aumenta, como ya se dijo antes, al ser incubada previamente con dexametasona, debido a la síntesis de la proteinquinasa inducida por

Cuadro 3. Cambios en la lipólisis en adipocitos aislados del tejido adiposo epididimal de la rata.

Preincubación con cortisol durante tres horas e incubación posterior durante sesenta minutos con 3'5' monofosfato cíclico de adenosina.

Preincubación con cortisol y puromicina durante tres horas e incubación posterior con MCA durante sesenta minutos.

(Miliequivalentes de ácido palmítico por gramo de grasa).

Preincubación con cortisol. Incubación con MCA	Preincubación con cortisol y puromicina. Incubación con MCA
0.078	0.042
0.074	0.042
0.075	0.046
0.070	0.040
0.069	0.043
0.074	0.045
0.077	0.042
0.074	0.044
0.076	0.046
0.074	0.045
Promedio	0.074
Desviación de la media	± 0.0028
Promedio	0.043
Desviación de la media	± 0.0020

el glucocorticosteroide.⁵ En el presente estudio se ha encontrado que el efecto lipolítico del monofosfato cíclico de adenosina se incrementa también en forma notable al ser preincubados los adipocitos con cortisol, lo que es atribuible a la formación de la proteinquinasa estimulada por la hormona. En estas condiciones se obtuvo la máxima lipólisis, que ascendió de 0.037 miliequivalentes de ácido palmítico por gramo de grasa a 0.074, lo que representa aumento de cien por ciento.

Se encontró, además, que el aumento de actividad lipolítica producido por la preincubación con cortisol e incubación posterior con MCA es impedido si durante la preincubación se añade un miligramo de puromicina al medio. En estas condiciones se inhibe la formación de la proteinquinasa inducida por el glucocorticosteroide, lo que se traduce por descenso de la actividad lipolítica de 0.074 miliequivalentes de ácido palmítico por gramo de grasa a 0.044, es decir, a actividad lipolítica algo más baja que la ejercida en forma directa por el MCA.

Parece importante señalar, finalmente, que la presencia de la puromicina no impide el efecto lipolítico del monofosfato cíclico ejercido por intermedio de la proteinquinasa previamente existente.

REFERENCIAS

1. Mersham, H. J.; Brown, L. J.; Underwood, M. C. y Stanton, H. C.: *Catecholamine induced lipolysis in swine*. Comp. Biochem. Physiol. B. Comp. Biochim. 47: 263, 1974.
2. Khoo, J. C.; Alegría, A. A. y Steinberg, D.: *The mechanism of activation of hormone sensitive lipase in human adipose tissue*. J. Clin. Invest. 53: 1124, 1974.
3. Khoo, J. C.; Steinberg, D.; Huang, J. J. y Vagelos, P. R.: *Triglyceride, diglyceride, monoglyceride, and cholesterol ester hydrolases in chicken adipose tissue activated by adenosine 3'5' monophosphate dependent protein kinase. Resolution and immunochemical differentiation from lipoprotein lipase*. J. Biol. Chem. 251: 2882, 1976.
4. Pittman, R. C.; Khoo, J. C. y Steinberg, D.: *Cholesterol esterase in rat adipose tissue and its activation by cyclic adenosine 3'5' monophosphate-dependent kinase*. J. Biol. Chem. 250: 4505, 1975.
5. Lamberts, S. W. J.; Timmermans, H. A. T.; Kramer-Blankestijn, M. y Birkenhager, J. C.: *The mechanism of the potentiating effect of glucocorticoids on catecholamine-induced lipolysis*. Metabolism 24: 681, 1975.
6. Major, P. W. y Kilpatrick, R.: *Cyclic AMP and hormone action*. J. Endocrinol. 54: 593, 1972.
7. Granner, D. K.; Chase, L. R. y Aurbach, G. D.: *Tyrosine aminotransferase: enzyme induction independent of adenosine 3'5' monophosphate*. Science 162: 1018, 1968.
8. Barnett, C. A. y Wicks, W. D.: *Regulation of phosphoenol-pyruvate, carboxykinase and tyrosine transaminase in hepatoma cell cultures. I. Effects of glucocorticoids, 6N202 dibutyryl adenosine 3'5' monophosphate and insulin in Reuber H35 cells*. J. Biol. Chem. 245: 7201, 1971.
9. Schwartz, A. L.: *Influence of glucagon, 6N20 dibutyryl adenosine on the arginine synthetase system in perinatal rat liver*. Biochem. J. 126: 89, 1972.
10. Grillo, M. A.; Fossa, T. y Coghe, M.: *Effect of dietary and hormonal factors on L serine dehydratase activities of chicken liver and kidney*. Enzymologia 39: 248, 1970.
11. Soifer, D. y Hechter, O.: *Adenyl cyclase activity in rat liver nuclei*. Biochim. Biophys. Acta. 230: 539, 1971.
12. Goodman, H. M. y Knobil, J. E.: *Some endocrine factors in regulation of fatty acid mobilization during fasting*. Amer. J. Physiol. 201: 1, 1961.
13. Fain, J. N.; Scow, R. O. y Chernick, S. S.: *Effects of glucocorticoids on metabolism of adipose tissue in vitro*. J. Biol. Chem. 238: 54, 1963.
14. Fain, J. N.: *Studies on the role of RNA and protein synthesis in the lipolytic action of growth hormone on isolated fat cells*. Adv. Enzyme Regul. 5: 39, 1967.
15. Rodbell, M.: *Metabolism of isolated fat cells. I. Effects on glucose metabolism and lipolysis*. J. Biol. Chem. 239: 375, 1964.
16. Trout, D. L.; Estes, E. H. y Friedberg, S. J.: *Titration of free fatty acids of plasma: a study of current methods and a new modifications*. J. Lipid Research 1: 199, 1960.
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. Fain, J. N.; Kovacev, V. P. y Scow, R. O.: *Effect of growth hormone and dexamethasone on lipolysis and metabolism in isolated fat cells on the rat*. J. Biol. Chem. 240: 3522, 1965.
19. Reshef, L. y Shapiro, B.: *Effect of epinephrine, cortisone and growth hormone on release of unesterified fatty acids by adipose tissue in vitro*. Metabolism 9: 551, 1961.
20. Goodman, H. M.: *Permissive effects of hormones on lipolysis*. Endocrinology 86: 1064, 1970.