

R. 6463

T 281

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

" REGULACION DE LA LIPOLISIS EN EL TEJIDO ADIPOSEO
DURANTE EL AYUNO".

Tesis para aspirar al grado
de Doctor en Farmacia.

Sevilla Noviembre de 1979.

REGULACION DE LA LIPOLISIS EN EL TEJIDO ADIPOSEO
DURANTE EL AYUNO.

por

GUADALUPE RUIZ ALVAREZ

El Catedrático director:

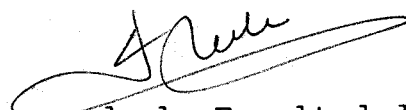
R. Goberna Ortiz



Catedrático-director del
Departamento de Bioquímica
de la Facultad de Medicina
de la Universidad de
Sevilla.

El Catedrático Ponente:

J. de la Rubia Pacheco



Decano de la Facultad de
Farmacia de la Universidad
de Sevilla.

El co-director

F. Sobrino

Trabajo presentado como Tesis para optar
al grado de Doctor en Farmacia.

Universidad de Sevilla

Facultad de Farmacia



CATEDRA DE BIOQUIMICA
FACULTAD DE MEDICINA
SEVILLA-9

PROF. RAIMUNDO GOBERNA

D. RAIMUNDO GOBERNA ORTIZ, Catedrático de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla.

CERTIFICA: Que el trabajo titulado "Regulación de la lipólisis en el tejido adiposo durante el ayuno", realizado por la licenciada Guadalupe Ruiz Alvarez para optar al grado de Doctor, ha sido llevado a cabo bajo mi dirección y la co-dirección del Dr. Francisco Sobrino Beneyto.

Sevilla, 12 de Noviembre 1979



R. Goberna

Prof. Dr. R. Goberna

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

A Juan Antonio

AGRADECIMIENTOS.

Al Prof. Goberna y al Dr. Sobrino que con su estímulo, apoyo y colaboración han hecho posible la realización de este trabajo.

A B. Roca y J. Jimenez, internos de la Cátedra, por su eficaz colaboración y dedicación.

A mis compañeros de la Cátedra de Bioquímica:

E. Pintado

J.C. Prieto

M. Lucas

M.T. Herrera

C. Osuna

E. Arilla

S. Ortiz

J.M. Guerrero

por su ayuda en todo momento.

A Mary Carmen que mecanografió todo el trabajo.

INDICE.

INTRODUCCION.

1. Metabolismo del tejido adiposo.....	2
1.1. Captación	5
1.2. Lipogénesis	7
1.3. Esterificación	8
1.4. Almacenamiento	11
1.5. Lipólisis	12
1.6. Liberación	12
2. Lipólisis	13
3. cAMP: su relación con la lipólisis	20
4. Proteínas quinasas dependientes de cAMP	23
4.1. Estructura y características de las proteínas quinasas	24
4.2. Mecanismo de activación	27
5. Conexión de la lipólisis con otras rutas metabólicas.	30
5.1. Ciclo glucosa/ácidos grasos libres	30
5.2. Relación entre el metabolismo del glucógeno en el tejido adiposo y la lipólisis.....	31
6. Regulación hormonal de la lipólisis	36
6.1. Hormonas lipolíticas	36
6.2. Posibles mecanismos de acción de los agentes que modifican la respuesta del tejido adiposo a las hormonas lipolíticas	39
6.3. Hormonas permisivas	42
6.4. Hormonas antilipolíticas	46
6.4.1. Insulina	46
6.4.2. Prostaglandinas	51

7. Regulación no hormonal de la lipólisis	54
7.1. Influencia de la glucosa	55
7.2. Moduladores de la acción hormonal: regulación "feedback"	57
7.2.1. Ácidos grasos	58
7.2.2. Adenosina	59
8. Regulación de la lipólisis durante el ayuno	62
OBJETIVOS	66
MATERIAL Y METODOS.	
1. Animales de experimentación	68
2. Diseño experimental	68
3. Aislamiento e incubación de adipocitos	70
3.1. Purificación de la albúmina bovina	70
3.2. Medio de incubación	71
3.3. Técnica	72
3.4. Incubación de adipocitos aislados	73
4. Determinación de glicerol	77
4.1. Fundamento	77
4.2. Reactivos	78
4.3. Preparación de la curva standard	78
4.4. Técnica	79
5. Determinación cuantitativa del cAMP por proteína enlazante	82
5.1. Fundamento del radioanálisis por "proteína enlazante"	82

5.2.	Preparación del cAMP	85
5.2.1.	cAMP no radiactivo	85
5.2.2.	cAMP radiactivo.....	86
5.3.	Obtención y purificación de la proteína quinasa	87
5.3.1.	Preparación del extracto de músculo ...	87
5.3.2.	Precipitación ácida	88
5.3.3.	Precipitación con sulfato amónico	88
5.3.4.	Purificación cromatográfica en DEAE-II.	89
5.3.5.	Determinación de la capacidad enlazante de los eluidos	93
5.4.	Aislamiento de la proteína inhibidora de la proteína quinasa	95
5.5.	Técnica del radioensayo por "proteína enlazante".....	98
5.5.1.	Procedimiento	99
5.5.2.	Separación del complejo cAMP-proteína..	100
6.	Determinación de la actividad de la proteína quinasa dependiente de cAMP en el tejido adiposo ..	103
6.1.	Fundamento	103
6.2.	Reactivos	104
6.2.1.	ATP-P ³²	104
6.2.2.	Mezcla de reacción	104
6.2.3.	Buffer de homogenización	105
6.3.	Incubación de tejido graso y preparación de extractos	106
6.4.	Técnica para la determinación de la activi- dad de la proteína quinasa de tejido adiposo.	107

RESULTADOS.

1. Acción de la adrenalina sobre los niveles de cAMP y sobre la lipólisis en adipocitos aislados de ratas alimentadas y durante el ayuno..... 114
2. Estudio de las concentraciones óptimas de ATP-P³², ATP y del tiempo de incubación para la determinación de la actividad de la proteína quinasa de tejido adiposo 122
3. Modificaciones inducidas por el ayuno en los niveles de cAMP y en la actividad de la proteína quinasa en homogenados de tejido adiposo 129
4. Determinación de la constante de Michaelis de la proteína quinasa para el ATP en tejido graso de animales alimentados y durante el ayuno..... 136
5. Estudio de la actividad de la proteína quinasa y la lipólisis de tejido graso de animales alimentados, con diferentes concentraciones de adrenalina 142
6. Estudio del tiempo de incubación del tejido adiposo en presencia de adrenalina 147
7. Acción de la adrenalina sobre los niveles de cAMP, la actividad de la proteína quinasa y la lipólisis en el tejido adiposo en el grupo control y durante el ayuno..... 151
8. Acción de la glucosa sobre los niveles de cAMP, la actividad de la proteína quinasa y la lipólisis en el tejido adiposo de animales alimentados y durante el ayuno..... 159

9. Acción de la adrenalina sobre los niveles de cAMP, la actividad de la proteína quinasa y la lipólisis en tejido graso incubado en presencia de glucosa, en animales alimentados y durante el ayuno.....	165
10. Acción de la iodoacetamida y la oligomicina sobre los niveles de cAMP, la actividad de la proteína quinasa y la lipólisis de tejido graso incubado en presencia de glucosa y adrenalina en animales alimentados	178
11. Acción de la oligomicina y la iodoacetamida sobre los niveles de cAMP, la actividad de la proteína quinasa y la lipólisis de tejido graso de animales sometidos a 48 horas de ayuno incubado en presencia de glucosa y adrenalina	185
DISCUSION	199
CONCLUSIONES	219
BIBLIOGRAFIA	223

ABREVIATURAS.

ACTH: hormona adrenocorticotropa.

ADP: adenosina di-fosfato.

ATP: adenosina tri-fosfato.

ATP-P³²: ATP marcado en posición γ con P³².

cAMP: 3'-5'-adenosin monofosfato.

cAMP-(H³): cAMP tritiado.

db-cAMP: dibutiril-cAMP.

DEAE-celulosa: dietiaminoetil celulosa.

DG: diglicerido.

EDTA: etilendiaminotetracetato sódico.

MD: monoglicerido.

NAD⁺: nicotinamida-adenina-dicucleotido oxidado.

NADH+H: nicotinamida-adenina-dinucleotido reducido.

PK: proteína quinasa.

TCA: ácido tricloroacético.

TG: triglicérido.

Tris-HCl: trihidroximetil-aminometano clorhidrato.

TSH: hormona tirotrópica.

VIP: péptido intestinal vasoactivo.

1º INTRODUCCION.

1. METABOLISMO DEL TEJIDO ADIPOSO.

Los triglicéridos acumulados en el tejido adiposo, constituyen la fuente principal de energía en los mamíferos. El tejido adiposo puede captar de la circulación o sintetizar ácidos grasos, almacenarlos en forma de triglicéridos y liberarlos a la sangre, dependiendo de la situación metabólica del animal.

El adipocito posee una dotación enzimática que le permite: hidrolizar intracelularmente los triglicéridos que circulan por la sangre a través de la lipoproteína lipasa y captar los ácidos grasos procedentes de esta hidrólisis; sintetizar ácidos grasos a partir de otros sustratos metabólicos; reesterificar los ácidos grasos procedentes de la hidrólisis de TG con α -glicerofosfato para sintetizar triglicéridos y almacenarlos; hidrolizar los triglicéridos intracelulares, lipólisis, y al aumentar los ácidos grasos en el citoplasma facilitar su liberación a la circulación (fig. 1 y 2).

Los triglicéridos están sintetizándose e hidrolizándose constantemente en el adipocito, pero sus velocidades respectivas cambian en función de la situación metabólica del animal, aumentando la velocidad de síntesis en animales alimentados y en estados postprandiales, e

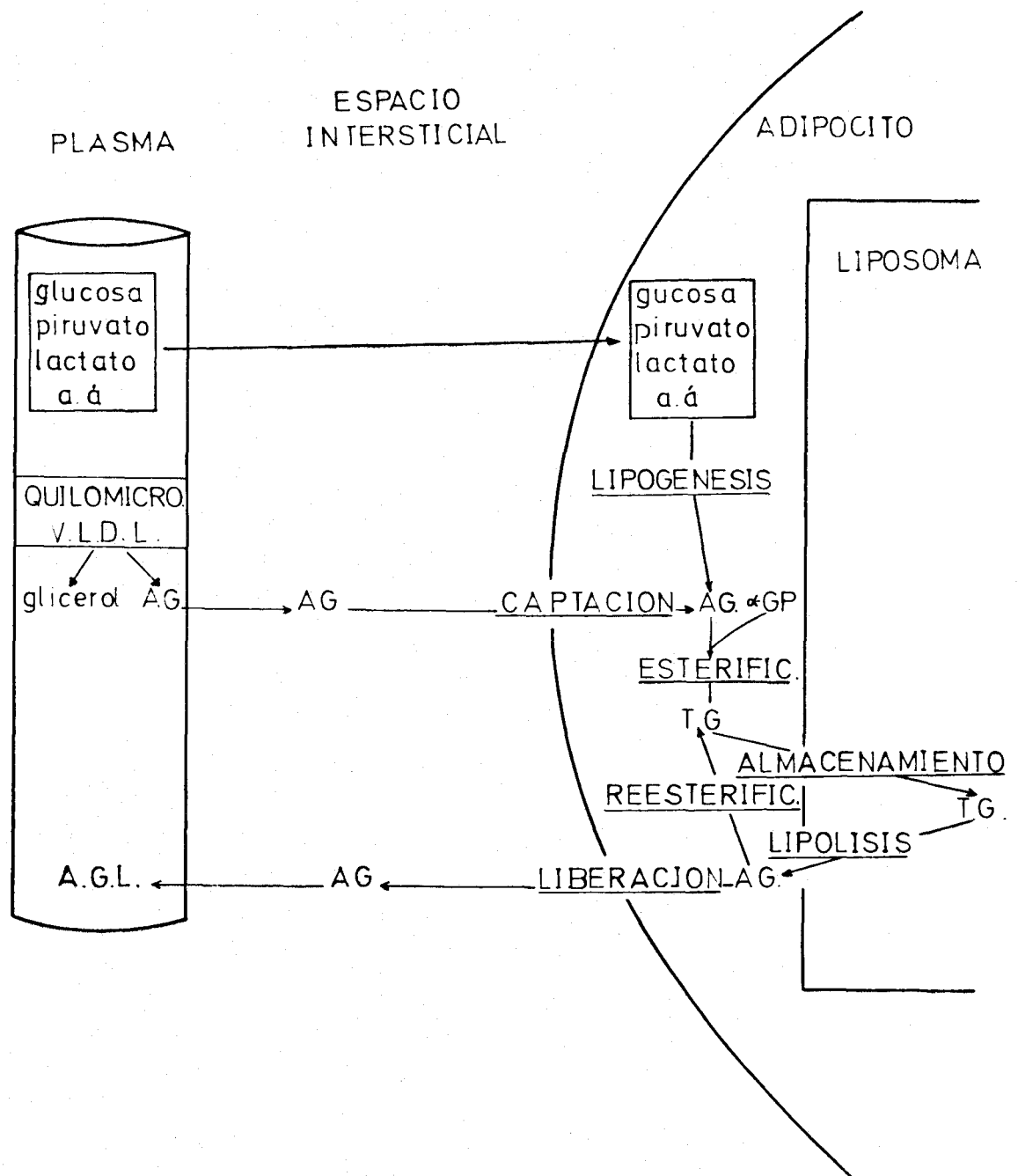


Fig. 1. Etapas del metabolismo lipolítico en el tejido adiposo.

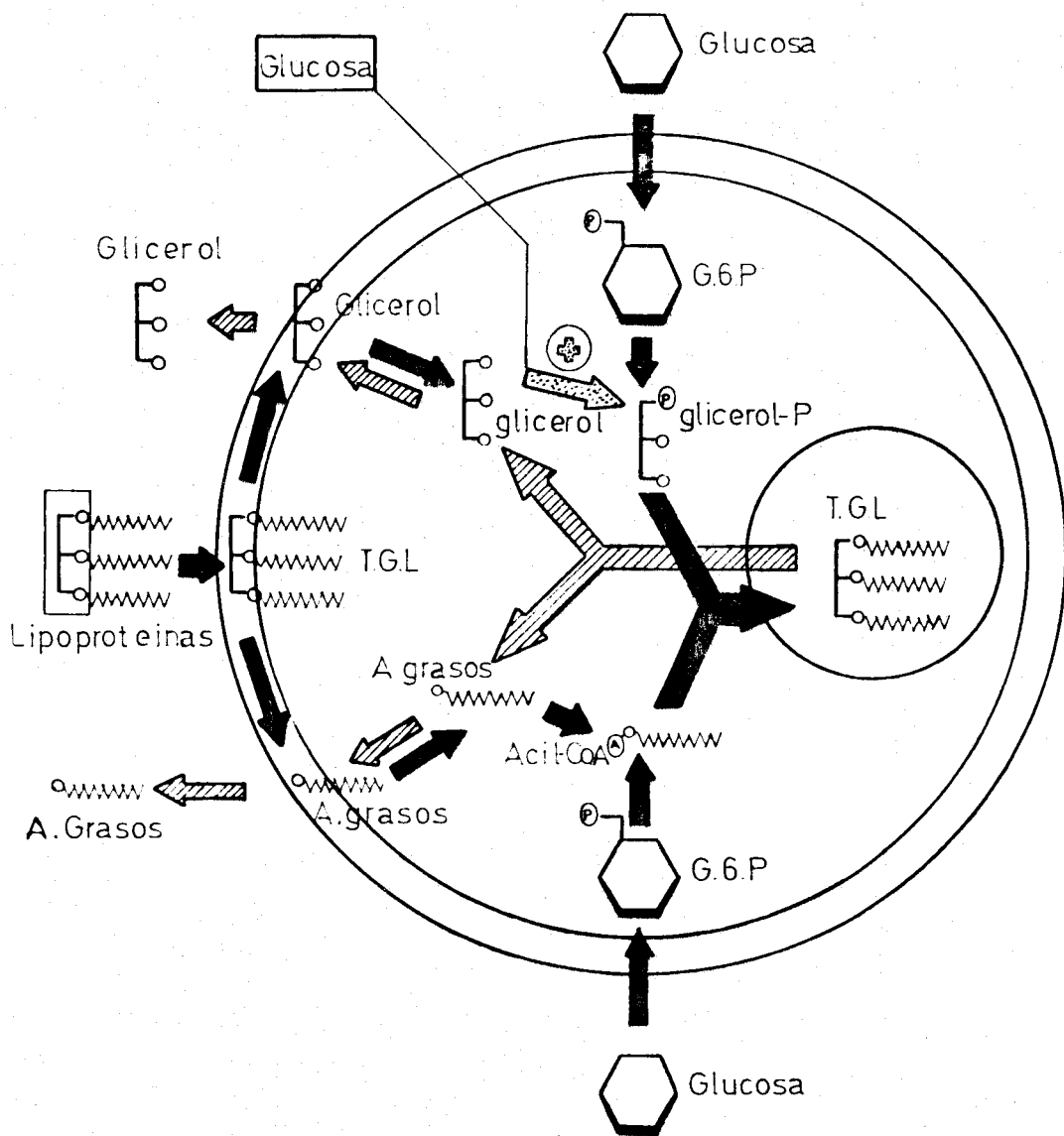


Fig. 2. Esquema del metabolismo del tejido adiposo. Las flechas negras representan las vías encargadas de la formación y acúmulo de los triglicéridos y las flechas a trazos las correspondientes a su movilización (Herrera y col., 1970).

incrementándose la velocidad de hidrólisis en animales en situación de ayuno. Las reservas de triglicéridos de los adipocitos aumentan o disminuyen dependiendo del equilibrio momentáneo de ambas rutas metabólicas.

Dada la enorme importancia que los ácidos grasos tienen como sustratos metabólicos para todos los tejidos, la función del tejido adiposo adquiere especial relieve, y en consecuencia, las velocidades de síntesis e hidrólisis de los triglicéridos están sometidas a un estricto control hormonal y nervioso para adaptarlas a las diversas situaciones nutricias y metabólicas por las que atraviesan los seres vivos.

Describiremos a continuación los distintos procesos que configuran el metabolismo del tejido adiposo así como su regulación.

1.1. Captación.

Los triglicéridos procedentes de la absorción intestinal de las grasas pueden circular por la sangre en forma de quilomicrones. Aunque no se conoce con exactitud la distribución cuantitativa de estos quilomicrones en los distintos tejidos, la cual depende a su vez de las circunstancias alimenticias y hormonales del individuo, parece bien establecido que una pequeña fracción de los mismos es captada por el hígado (Robison, 1970). Otros

tejidos, entre los que hemos de destacar al tejido adiposo y al corazón, están también capacitados para utilizar quilomicrones.

La hidrólisis de los triglicéridos que llegan en forma de lipoproteínas (quilomicrones y proteínas de baja densidad) al tejido adiposo y a otros tejidos, está catalizada por la enzima lipoproteína lipasa. Se ha detectado actividad de esta enzima en todos los tejidos que utilizan ácidos grasos como en el tejido adiposo, en miocardio (Korn y col. 1955) y en glándula mamaria (Robison, 1963).

La lipoproteína lipasa es una enzima extracelular que ejerce su acción catalítica a nivel del endotelio capilar. El adipocito sintetiza y almacena la lipoproteína lipasa, liberándola al lecho vascular en determinadas circunstancias. Por acción de la enzima los triglicéridos liberan ácidos grasos que pueden ser arrastrados por el flujo sanguíneo o son captados por el tejido adiposo para su posterior reesterificación.

La captación de los ácidos grasos por el tejido adiposo es un proceso pasivo determinado por la concentración de ácidos grasos en la sangre en cada momento. Esta concentración sanguínea a su vez está controlada por la cantidad de quilomicrones que llegan al tejido adiposo a través de la sangre y por la actividad de la enzima

lipoproteína lipasa.

La actividad de la enzima lipoproteína lipasa se correlaciona directamente con la variación de la velocidad de captación de los ácidos grasos por el tejido adiposo. Durante el ayuno disminuyen los quilomicrones procedentes del tubo digestivo y del hígado, el contenido en triglicéridos de la sangre cae a valores bajos disminuyendo la actividad del enzima lipoproteína lipasa y la captación de los ácidos grasos resulta frenada (Hollenberg 1959; Person y col., 1970).

1.2. Lipogénesis.

El tejido adiposo puede sintetizar ácidos grasos a partir de sustratos como glucosa, piruvato, lactato, oxalacetato, α -cetoglutarato, e incluso de algunos aminoácidos como glutámico, alanina y aspártico. De todos ellos la glucosa es el principal sustrato para el adipocito, pues de su degradación, glucólisis y glucooxidación se obtiene energía en forma de ATP, acetil-CoA y coenzimas reducidos, productos todos necesarios para la síntesis de los ácidos grasos.

Sin embargo, cuando se administra "in vivo" a un animal un sustrato marcado y potencialmente lipogénico, este puede incorporarse a los ácidos grasos del adipocito

bien por lipogénesis, o bien por captación de los ácidos grasos previamente sintetizados en el hígado. Se ha comprobado que el porcentaje de ácidos grasos captados es siempre mayor que los que aporta la lipogénesis de tejido adiposo, sea cual fuere la especie estudiada. Estos datos sugieren que en el hombre y en otros mamíferos la lipogénesis en el adipocito es una actividad secundaria y de poco significado en circunstancias fisiológicas.

1.3. Esterificación.

Los ácidos grasos libres captados o sintetizados son esterificados con α -glicerofosfato como paso previo para su almacenamiento.

Para la esterificación se precisan como sustratos básicos α -glicerofosfato y ácidos grasos activados, formando ésteres con el CoA.

Es bien conocido que la glucosa es la fuente principal del glicerofosfato utilizado en la esterificación en el tejido adiposo. El α -glicerofosfato se obtiene en la glucolisis mediante la formación y reducción de la dihidroxiacetonafosfato, catalizada por la glicerofosfato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ .

Otra fuente de α -glicerofosfato es el glicerol, mediante fosforilización con un resto fosfato del ATP,

reacción catalizada por la enzima gliceroquinasa.

Aunque se conoce desde 1937 la presencia de gliceroquinasa en hígado, riñón y en otros tejidos, Wiclard y Suyter en 1957, llegan a la conclusión de que el tejido adiposo carece de este enzima. Posteriormente, Robison y Newsholme (1967) describen la presencia de gliceroquinasa en el tejido adiposo, pero se admite generalmente que su actividad es tan baja que este tejido no fosforila el glicerol.

El adipocito dispone de otra posible ruta para obtener

α -glicerofosfato a partir de sustratos como aminoácidos y piruvato. A esta vía metabólica se la ha denominado gliceroneogénesis y se ha demostrado que en determinadas circunstancias puede contribuir en una proporción considerable a la formación de glicerol de glicéridos (Gorin y col., 1969).

Gorin y col. (1969) encontraron que la incorporación de piruvato a glicerol estaba aumentada durante el ayuno y en la diabetes mellitus, sugiriendo que esta vía podría proporcionar un mecanismo auxiliar para controlar la hidrólisis excesiva de triglicéridos bajo condiciones de lipólisis rápida y de escasez de glucosa.

Posteriormente, Sharago y col. (1978) no encuentran incrementada la gliceroneogénesis en el tejido adiposo durante el ayuno si no hay glucosa en el medio. Sus

resultados sugieren que esta vía de formación de

α -glicerofosfato, sobre todo a partir de lactato, puede tener un papel importante en la reesterificación de los ácidos grasos en animales alimentados.

La activación de los ácidos grasos, formando acilCoA, la cataliza la enzima acil-tioquinasa de cadena larga, presente en los microsomas del adipocito.

Una α -glicerofosfato-acil-transferasa une primero una molécula, y después otra, de acilCoA al α -glicerofosfato.

La fosfátido hidrolasa rompe el enlace ester del grupo fosfato en posición 3 liberando un diglicérido. Sobre este diglicérido actúa una diacil-glicerol-acil-transferasa, incorporando una tercera molécula de acilCoA y transformándolo en un triglicérido.

Las variaciones en la concentración de ácidos grasos y de α -glicerofosfato en el adipocito, regulan la velocidad de reesterificación. La concentración de

α -glicerofosfato es a su vez controlada por el transporte de glucosa a través de la membrana del adipocito. Sin embargo hay otros factores que pueden influenciar la concentración de α -glicerofosfato, como son la concentración de dihidroxiacetona fosfato y la relación $\text{NAD}^+/\text{NADH}+\text{H}$ (Denton y Randle, 1963). Ambos factores pueden variar independientemente del grado de

actividad glucolítica (Halperin y Denton, 1969).

1.4. Almacenamiento.

Los triglicéridos son compuestos que debido a sus dos propiedades, alto nivel reductor e hidrofobia, permiten almacenar gran cantidad de energía en muy poco espacio físico.

El adipocito es una célula especializada en el almacenamiento de triglicéridos. Para ello su morfología celular ha evolucionado hasta el extremo de convertirse en una gran gota de grasa en una de cuyos polos se localizan el núcleo, las mitocondrias y demás organelas citoplasmáticas. Los triglicéridos se sintetizan en los microsomas y posteriormente se transfieren al liposoma donde se almacenan.

La síntesis, almacenamiento e hidrólisis de triglicéridos ocurren simultánea y constantemente. Cuando predomina la síntesis, aumentan los triglicéridos almacenados, mientras que cuando predomina la hidrólisis disminuyen las reservas de triglicéridos.

Siempre que aumenta la captación, lipogénesis y reesterificación, o disminuye la hidrólisis, se produce un incremento en los triglicéridos almacenados.

1.5. Lipolisis.

La hidrólisis de los triglicéridos almacenados en el tejido adiposo, así como su regulación local y hormonal serán descritas en el apartado 2.

1.6. Liberación.

La salida de los ácidos grasos endógenos al torrente circulatorio, igual que su captación, es un fenómeno pasivo que solo depende del gradiente de concentración establecido entre el citoplasma del adipocito y el plasma sanguíneo. Una vez en el plasma, los ácidos grasos se unen a moléculas de albúmina que los transportan a los demás tejidos para su oxidación.

La liberación de los ácidos grasos del adipocito depende del grado de lipolisis y de la reesterificación de los ácidos grasos. El incremento en la hidrólisis de los triglicéridos, o la disminución de la reesterificación, producen un aumento en el depósito de ácidos grasos del tejido adiposo provocando su liberación.

2. LIPOLISIS.

En los mamíferos, la grasa de reserva se acumula en el tejido adiposo en forma de triglicéridos. La lipolisis es el proceso por el cual los triglicéridos almacenados se hidrolizan, produciendo ácidos grasos y glicerol. Esta hidrólisis se realiza dentro del adipocito y es catalizada por una enzima denominada "lipasa sensible a las hormonas".

Estudios "in vitro" han confirmado que en presencia de hormonas lipolíticas el tejido adiposo libera ácidos grasos libres y glicerol al medio de incubación (Gordon y col., 1958; White y col., 1958). No existe liberación de triglicéridos al medio y se asume generalmente que aún en el caso que la hubiese resultaría insignificante en relación con los ácidos grasos liberados.

Debido a su insolubilidad en el plasma, los ácidos grasos de cadena larga, liberados durante la hidrólisis de los triglicéridos, son transportados unidos a moléculas de albúmina. El transporte de estos ácidos a través de la membrana citoplasmática no es un proceso dependiente de energía y no parece estar influenciado por factores metabólicos u hormonales. Sin embargo, en sistemas "in vitro" el transporte depende de la presencia de albúmina en el medio de incubación.

La liberación de los ácidos grasos del tejido adiposo depende del grado de lipólisis, si bien éste no es el único proceso a considerar, ya que la reesterificación de los ácidos grasos para formar nuevamente triglicéridos juega un papel importante en la regulación de la movilización de los ácidos grasos. Si la lipólisis tiene lugar en ausencia de esterificación, cada molécula de glicerol liberado debería de ir acompañada de tres moléculas de ácidos grasos. Sin embargo, estudios realizados "in vitro" han demostrado que hay una liberación mayor de glicerol que de ácidos grasos, ya que estos últimos son reesterificados de nuevo para formar triglicéridos en el tejido adiposo (Steinberg, 1963).

Estudios en los que se utilizó glucosa marcada en todos sus carbonos y se midió su incorporación a glicerol de glicéridos, y la liberación de ácidos grasos y glicerol, sirvieron para poner de manifiesto que lipólisis y esterificación tienen lugar de forma simultánea y por tanto que el ciclo triglicéridos/ácidos grasos opera en el tejido adiposo (fig. 3).

La hidrólisis de los triglicéridos (TG) se realiza en tres etapas en las que se forman como productos intermedios diglicéridos (DG) y monoglicéridos (MG).

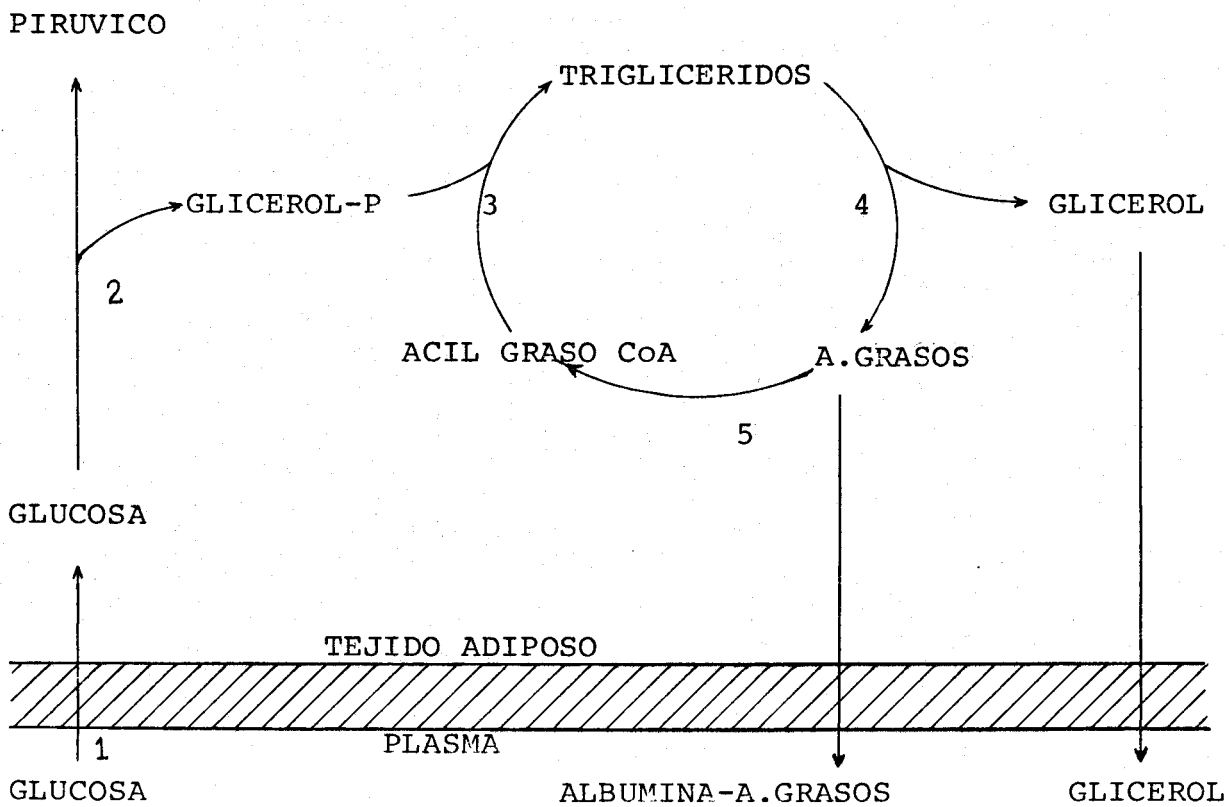
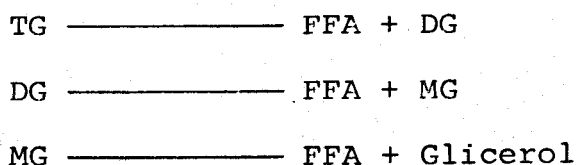


Fig. (3) Ciclo triglicéridos/ácidos grasos en el tejido adiposo. (1) Transporte de glucosa a través de la membrana. (2) Glucólisis (3). Esterificación (4). Lipólisis (5). Activación de los ácidos grasos.



La lipasa que cataliza esta hidrólisis es un sistema enzimático formado por tres enzimas distintas: lipasa de triglicéridos, de diglicéridos y de monoglicéridos. La actividad de las dos últimas es de 10 a 100 veces superior a la primera, indicando que la lipasa de triglicéridos es la enzima que regula todo el proceso (Vaughan y col., 1964; Gorin y Shafrir, 1964).

La lipasa de triglicéridos sensible a hormonas fue caracterizada en tejido adiposo de ratas por Rizak (1961, 1964). La enzima se encuentra en la fracción soluble de homogenizados de adipocitos y se ha purificado, solo parcialmente en dos formas, una forma rica en lípidos y de alto peso molecular ($\approx 10^7$) (Huttunen y col., 1970 a,b), y otra forma de peso molecular inferior ($\approx 10^5$) (Pittman y col., 1972). La enzima es activada por la proteína-quinasa-dependiente de cAMP del tejido adiposo. Esta última cataliza la fosforilación de la lipasa b inactiva transformandola en su forma activa.

Se ha demostrado que el cAMP en presencia de Mg-ATP incrementa la actividad de la lipasa de homogenados crudos en 30-50%. Esta activación se debe a la presencia de niveles adecuados de proteína quinasa en los

homogenados (Hales y col., 1968; Tsai y col., 1970). Este efecto se hace más manifiesto tras la adición de proteína quinasa de músculo (Corbin y col., 1970). La activación de la enzima parcialmente purificada requiere la adición de proteína quinasa dependiente de cAMP exógena, cAMP y Mg-ATP. En estas condiciones se ha observado que la activación del enzima se produce paralelamente a la incorporación de fosfato a la proteína (Huttunen y Steinberg, 1971; Schwartz y Junglas, 1971; Pittman y col., 1972). Estos resultados apoyan la idea de que la activación de la lipasa, como las modificaciones de otros enzimas catalizadas por la proteína quinasa, tiene lugar por la unión covalente de un grupo fosfato al enzima. En la fig. (4) representamos el mecanismo de activación.

Se ha pensado en la posibilidad de que, al igual que ocurre en el sistema de la fosforilasa, la proteína quinasa no actúe directamente sobre la lipasa, sino sobre un enzima intermedio (lipasa-quinasa) semejante a la fosforilasa quinasa. Sin embargo, esta teoría ha sido descartada al comprobar que la activación era similar en las fracciones purificadas y en las no purificadas (Huttunen y Steinberg, 1971). Además, se ha demostrado que en fracciones de tejido adiposo humano y de rata (Khoo y col., 1973, 1974), la activación se inhibe tras la adición del inhibidor de la proteína quinasa y se

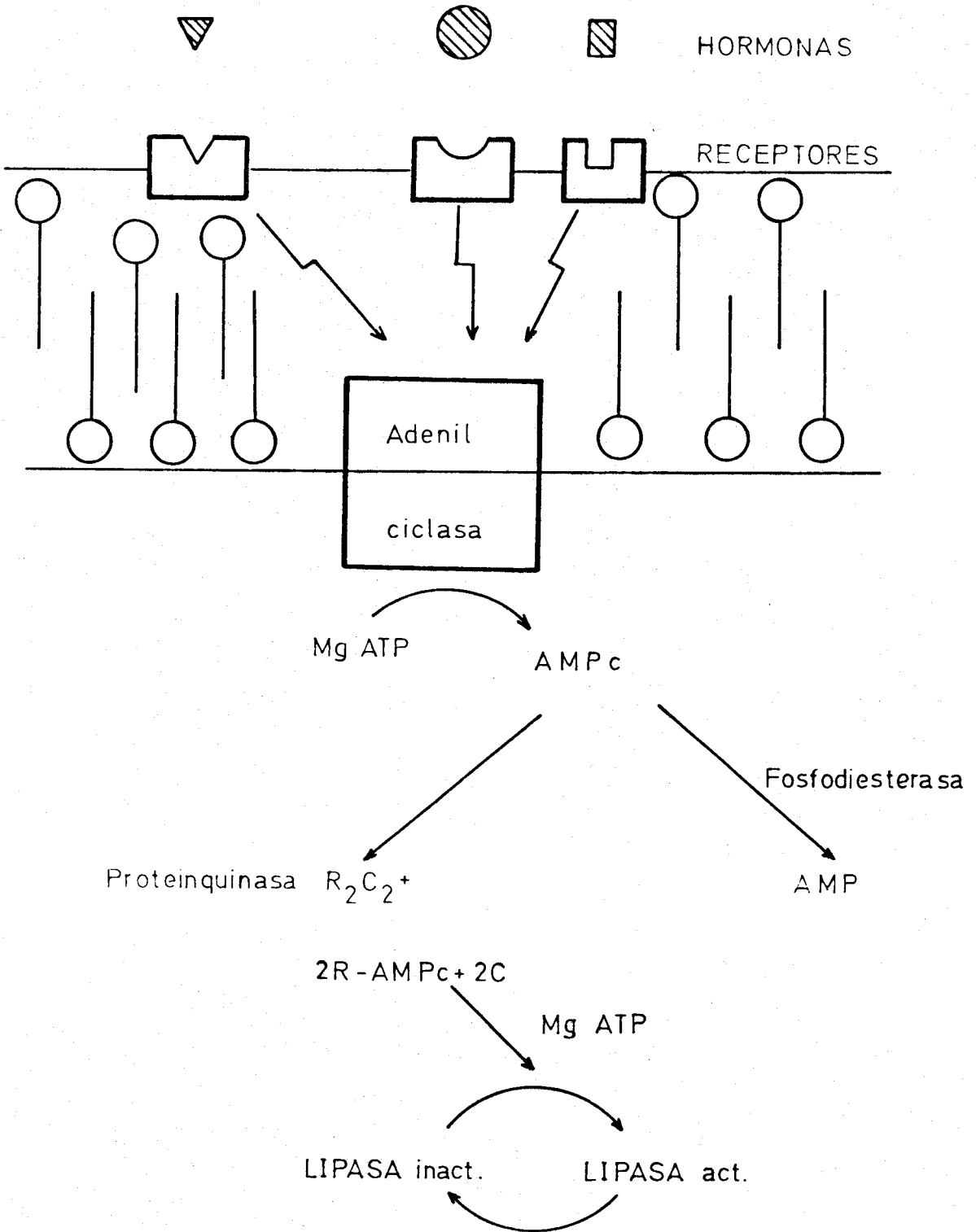


Fig. 4. Mecanismo de activación de la lipasa de triglicéridos por diferentes hormonas lipolíticas.

recupera tras la adición de proteína quinasa exógena.

Para proporcionar una efectiva regulación de la movilización de los ácidos grasos, el sistema de la lipasa debe tener un mecanismo rápido de desactivación. Al igual que la activación se lleva a cabo mediante una rápida fosforilación, parece lógico pensar que el mecanismo de inactivación sea la defosforilación. Tsai y col. (1972, 1973), han descrito el sistema de inactivación de la lipasa dependiente de ácido ascórbico y Mg-ATP, pero este mecanismo es irreversible, y por tanto no tendría un papel importante en la regulación rápida de la lipólisis.

Khoo y Steinberg (1974), observaron que la lipasa del tejido adiposo de pollo, en presencia de proteína quinasa, presentaba un grado de activación mucho mayor que la de tejido adiposo de rata y humano, lo que permitía estudiar el sistema de activación-inactivación en circunstancias más favorables. Estudios en este sistema, han permitido demostrar que la enzima puede ser repetidamente activada e inactivada y parece razonable pensar que una lipasa fosfatasa pudiera ser responsable de la inactivación.

3. cAMP: SU RELACION CON LA LIPOLISIS.

Siguiendo los trabajos de Butcher y Sutherland, se ha comprobado que la acción de la mayor parte de los agentes que modifican la lipolisis está directamente condicionada a un aumento o disminución en los niveles intracelulares de cAMP.

Parece bien establecido que el cAMP tiene un papel central en la regulación de la lipolisis ya que: 1) la cafeína y otros inhibidores de la fosfodiesterasa potencian los efectos de las hormonas lipolíticas (Vaughan y Steinberg, 1963); 2) el glucagón y la ACTH, hormonas que se sabe actúan a través del cAMP como su segundo mensajero en el hígado y en la corteza adrenal, estimulan la lipolisis en el tejido adiposo (Steinberg y col., 1959; Hagen, 1961; Hollenberg y col., 1961); 3) la fosforilasa y la glucógeno sintetasa, que son reguladas por el cAMP en otros tejidos, son reguladas por las hormonas lipolíticas en el tejido adiposo (Vaughan y col., 1959; Vaughan, 1960; Junglas, 1966); 4) la estimulación de la lipolisis va acompañada de un incremento en los niveles de cAMP (Butcher y col., 1965).

No se conoce, sin embargo, si el cAMP es el único regulador de la lipolisis (Fain y Shepherd, 1976, 1977).

La relación entre los niveles de cAMP y el grado de

lipólisis en los adipocitos presenta bastantes problemas. Mientras los niveles de cAMP en el adipocito presentan niveles máximos a los pocos minutos después de la adición de una hormona lipolítica y después caen hasta los niveles basales, el grado de lipólisis (medido como glicerol liberado al medio de incubación) se mantiene estable por una hora o más (Schwabe y Ebert , 1972; Schimmel, 1974). Por otra parte, la estimulación repetida del tejido adiposo con drogas lipolíticas produce niveles de cAMP significativamente disminuidos mientras que la respuesta lipolítica permanece inalterada (Schimmel, 1974). Se ha señalado, que estos niveles de cAMP, excesivamente altos observados tras la adición de concentraciones altas de hormonas lipolíticas no son fisiológicamente necesarios para el estímulo de la lipólisis (Fain, 1973; Schimmel, 1974; Fain y Shepherd, 1976; Hjemdahl y Fredholm, 1976). En adipocitos aislados, la relación entre el incremento inducido en la lipólisis y en los niveles de cAMP por las catecolaminas no es lineal. Numerosos investigadores han observado que con concentraciones de hormonas lipolíticas que producen un 25% de incremento en los niveles de cAMP se obtiene una respuesta lipolítica semimáxima. La lipólisis máxima se consigue con concentraciones de hormonas que duplican el contenido de cAMP intracelular. Hjemdahl y Fredholm (1976) han comprobado que incrementos en los niveles de cAMP por encima de estos valores

producen muy pocos cambios en la lipólisis.

La razón de que la relación cAMP-lipólisis no sea lineal puede deberse según Fain (1973) a que el cAMP intracelular esté compartimentalizado. La naturaleza de estos compartimentos no se conoce, pero el hecho de que algunos autores hayan observado la existencia de cAMP en una forma libre y en otra forma ligada, apoya la hipótesis de la compartimentalización del cAMP (Shwach y Hilz, 1977; Teresaki y Brooker, 1977). Parece razonable pensar que la mayor parte de la forma ligada del cAMP representa al nucleótido asociado a la subunidad reguladora de la proteína quinasa (Hofman y col., 1977). Si se acepta esta idea, habría que pensar que las variaciones en los niveles de cAMP en su forma ligada reflejarían mucho mejor las alteraciones en la lipólisis que los niveles de cAMP total. Así, Teresaki y Brooker (1977) han observado que el cAMP total y el libre pueden variar en un rango mucho más amplio que el cAMP ligado.

El cAMP ligado a la subunidad reguladora de la proteína quinasa de tejido adiposo, o la estimulación de la proteína quinasa, deben de ser un parámetro importante a tener en cuenta en el estudio de los niveles totales de cAMP y su relación con la lipólisis, como se ha demostrado en otros sistemas.

4. PROTEINAS QUINASAS DEPENDIENTES DE cAMP.

Al estudiar los mecanismos por los que el cAMP estimula la glucogenolisis, Walsh y Krebs en 1968, identificaron una enzima que actuaba catalizando la fosforilación y concomitante activación de la fosforilasa quinasa. Esta enzima que actúa como una "pirofosforilasa quinasa" muestra una completa dependencia del cAMP para su actividad. Se descubrió entonces un nuevo eslabón de la cadena, ya en parte conocida, y en los años siguientes se estudió el mecanismo molecular de esta catálisis así como el papel del cAMP.

De una manera sencilla las proteínas quinasas dependientes de cAMP se pueden definir como los "receptores intracelulares del cAMP". Constituyen la única reacción, conocida hasta ahora, mediante la cual el nucleótido cíclico se hace metabólicamente activo.

Desde el punto de vista químico, estas enzimas, que deberán ser considerados como proteínas quinasas, ya que actúan también fosforilando otras proteínas, catalizan la transferencia de un grupo γ -fosfato del ATP a grupos hidroxilos de restos de serina y treonina de determinadas proteínas. Su actividad es regulada por adenosín-monofosfato cíclico por lo que se las ha denominado proteínas quinasas dependientes de cAMP. El término

dependiente de cAMP hay que tomarlo en el sentido de hacer notar que en presencia del nucleótido cíclico alcanzan su actividad máxima, ya que se conoce que la mayoría de estas enzimas presentan una cierta actividad basal aún en ausencia de cAMP.

Las proteínas quinasas se encuentran ampliamente distribuidas en una gran variedad de tejidos (Kuo y Greengard, 1969). La distribución subcelular de estas enzimas varía según los tejidos: en el hígado y en la glándula mamaria el 90% de la actividad corresponde al citosol, mientras que en el cerebro y en la pituitaria anterior se ha detectado una mayor actividad ligada a organelas, especialmente a mitocondrias y microsomas.

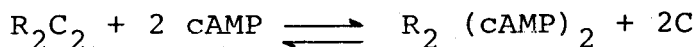
4.1. Estructura y características de las proteínas quinasas.

Desde su descubrimiento las proteínas quinasas han sido ampliamente caracterizadas y purificadas habiéndose identificado dos isoenzimas en la mayoría de los tejidos estudiados.

La proporción de cada isoenzima varía de tejido a tejido y en el mismo tejido de especie a especie (Corbin y col., 1975). Actualmente se acepta que la enzima purificada, de cualquier tipo, está compuesta de dos subunidades reguladoras (R) y dos subunidades catalíticas (C), su estructura, por tanto, corresponde a un tetrámero R_2C_2

como representamos en la fig. (5) (Erlichman y col., 1973; Rosen y Erlichman, 1975; Hofman y col., 1975).

Las subunidades R y C son diferentes. En ausencia del cAMP el holoenzima R_2C_2 es inactivo; la unión del cAMP a la subunidad reguladora provoca la disociación de las subunidades con la activación consecuente de la subunidad catalítica C (Kumon y col., 1972; Tao y col., 1970; Reimann y col., 1971; Erlichman y col., 1971; Gill y Garren, 1971). La activación del enzima por el cAMP se puede ilustrar mediante la siguiente ecuación:



Las enzimas purificadas presentan pesos moleculares comprendidos entre 152.000 a 174.000. El peso de las cadenas aisladas de la subunidad reguladora va desde 42.000 a 55.000 y el de las subunidades catalíticas de 38.000 a 42.000.

Basandose en su distinto comportamiento al ser sometidas a una cromatografía de DEAE-celulosa se han identificado dos isoenzimas de la proteína quinasa que se denominan proteína quinasa tipo I y tipo II. Los dos tipos de enzimas difieren principalmente en sus subunidades reguladoras. Sin embargo, los holoenzimas de ambos tipos presentan tamaños similares, ligan dos moles de cAMP y responden al cAMP disociándose en subunidades. Algunos autores han sugerido que cada isoenzima tiene una función

PROTEINA KINASA Dependiente de cAMP

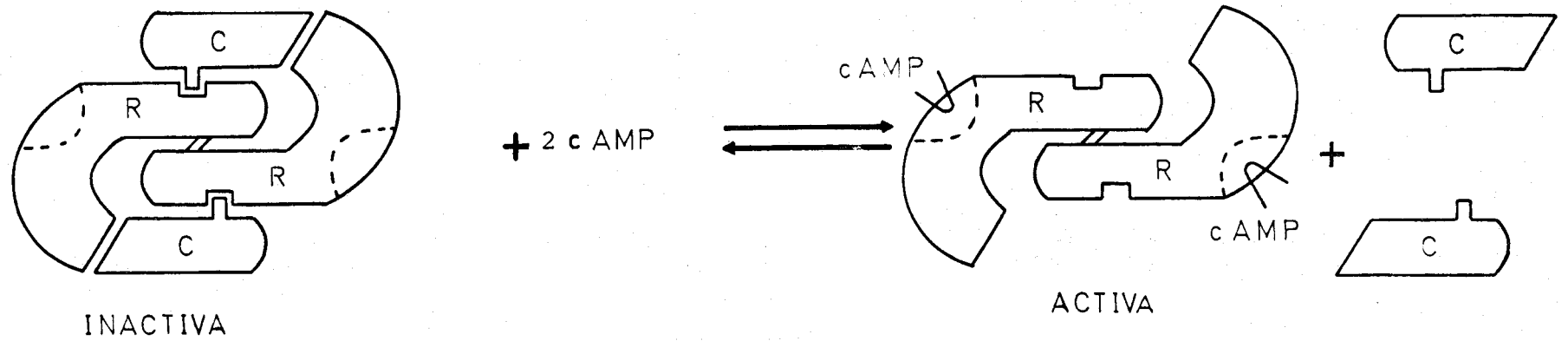
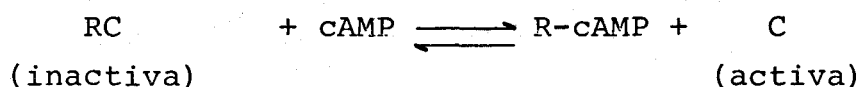


Fig. 5. Estructura de la proteína quinasa dependiente de cAMP, en su forma inactiva y en su forma activa.

intracelular diferente y pueden tener una regulación hormonal diferente (Hofman, 1978).

4.2. Mecanismo de activación.

En 1971, Bronstrom, propuso como explicación de la acción del cAMP sobre la proteína quinasa, la ecuación siguiente:

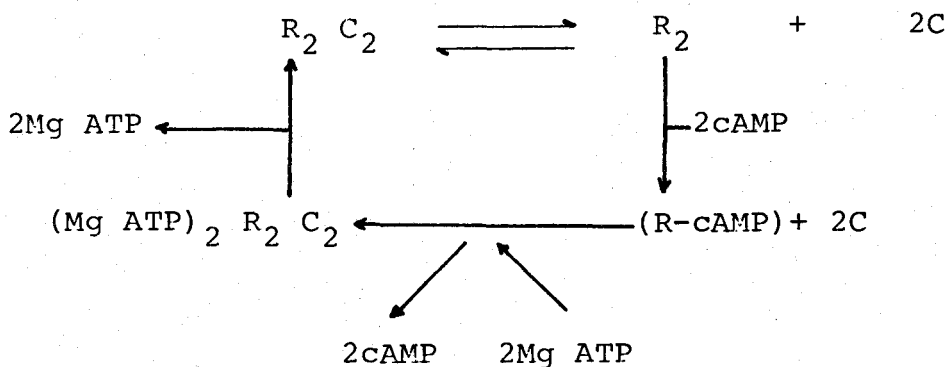


Este mecanismo de activación "in vitro" para la proteína quinasa, se estableció en la mayoría de los tejidos estudiados (Rubin y col., 1972; Walsh y Krebs, 1973). El enlace del cAMP a la proteína quinasa inactiva (RC), produce la disociación del enzima en la subunidad R, para la formación del complejo R-cAMP y la subunidad catalítica C. Posteriormente, se han propuesto modelos de activación e inactivación del enzima más complejos. Ogez y Segel (1976) han introducido un modelo para la activación de la proteína quinasa, procedente de músculo de conejo, que se puede resumir mediante la siguiente ecuación:



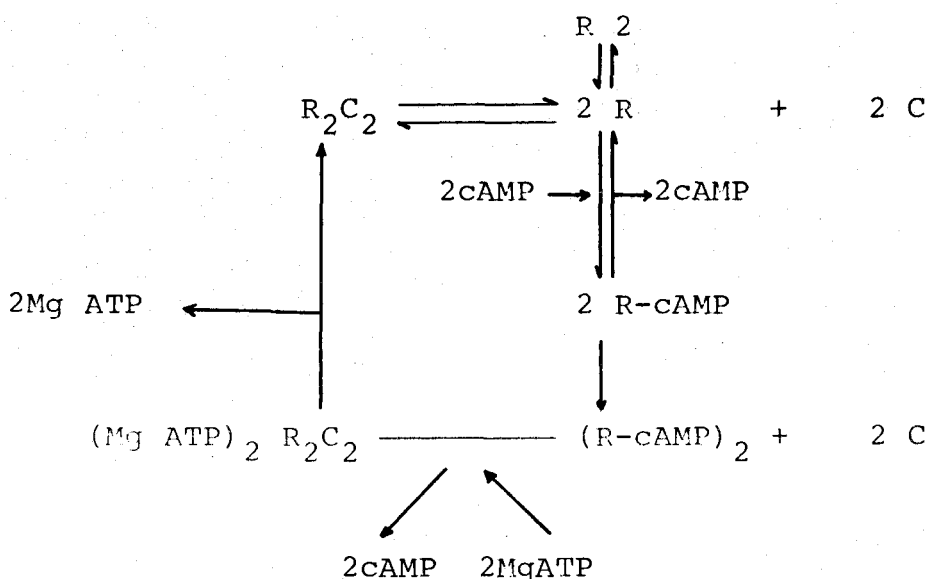
Según este modelo, el holoenzima de la proteína quinasa se disocia primero en sus subunidades y luego el cAMP se une a la subunidad reguladora impidiendo la reasociación de las dos subunidades del enzima. Un aspecto criticable

de este modelo de activación, es que asume que la subunidad reguladora R libre se une de nuevo fácilmente a la catalítica pero no la subunidad R ligada al cAMP. Basándose en estudios anteriores y en los obtenidos en su propio laboratorio, Hofmann (1978) ha propuesto un mecanismo de activación e inactivación que resumimos en el siguiente esquema:



Este esquema ha sido posteriormente ampliado, basándose en el estudio de la constante de disociación del complejo R-cAMP y del coeficiente de Hill. Los resultados de estos estudios indican que la K_d y el coeficiente de Hill para la unión del cAMP a la subunidad reguladora dependen de la concentración de la subunidad reguladora añadida. Schwechheimer y Hofmann (1977), han observado un incremento en la K_d y en el coeficiente de Hill a medida que se incrementa la concentración de la subunidad reguladora. Estos resultados apoyan la idea de la existencia de un equilibrio entre dos subunidades R- monómeras y una subunidad R- dímera, en el que el

monómero tiene una afinidad más alta por el cAMP que el dímero. El aumento en el coeficiente de Hill (aumento de la cooperatividad positiva) puede indicar que la subunidad reguladora, una vez que el cAMP se ha unido, forma un dímero $(R-cAMP)_2$. El esquema anterior puede ser ampliado y escrito mediante las reacciones siguiente:



En este modelo, la actividad de la proteína quinasa es regulada principalmente por el cAMP, sin embargo, puede ser también modulada por factores que afectan el equilibrio de la reacción (1) y (2), tales como sales y proteínas básicas, por la concentración de las subunidades presentes y por las concentraciones relativas de R y C.

5. CONEXION DE LA LIPOLISIS CON OTRAS RUTAS METABOLICAS.

5.1. Ciclo glucosa/ácidos grasos libres.

En condiciones tales como el ayuno, el stress o la actividad muscular prolongada se produce un incremento en los niveles plasmáticos de ácidos grasos libres, proporcionando una fuente de energía alternativa a la glucosa y una señal para que los tejidos oxiden estos ácidos grasos. Randle y col. (1963), han propuesto que en los mamíferos opera un ciclo denominado ciclo glucosa/ácidos grasos libres, mediante el cual un incremento en los niveles plasmáticos de ácidos grasos libres produce una disminución en la utilización de la glucosa por los tejidos particularmente por el músculo y el corazón.

Otro aspecto de este ciclo glucosa/ácidos grasos libres se refiere a que si los niveles plasmáticos de glucosa están disminuidos, el tejido adiposo movilizará los ácidos grasos produciendo un incremento en los niveles plasmáticos de ácidos grasos y por tanto un incremento de su oxidación en el músculo, disminuyendo así la utilización de glucosa, con lo que ésta aumenta sus niveles plasmáticos. A su vez, este incremento de la glucemia estimula la utilización de glucosa por el tejido adiposo disminuyendo la movilización de los

ácidos grasos, por los que su concentración plasmática disminuye así como su utilización por el músculo. Al mismo tiempo, desaparece la inhibición en la utilización de la glucosa y su concentración en el plasma volverá a disminuir (fig. 6). Esta sería una breve descripción de los mecanismos que controlan los niveles de glucosa y de ácidos grasos libres en ausencia de hormonas en sangre.

Las hormonas lipolíticas o antilipolíticas modifican estos mecanismos de control; por ejemplo, una elevación de la glucosa plasmática incrementará la concentración de insulina en el plasma, que a su vez disminuirá la movilización de los ácidos grasos (debido a sus efectos sobre la reesterificación y la lipólisis), e incrementará la utilización de la glucosa por el músculo (fig. 7). En esencia el ciclo proporciona un mecanismo para mantener los niveles de glucosa en sangre a expensas de variaciones en los niveles plasmáticos de ácidos grasos libres.

5.2. Relación entre el metabolismo del glucógeno en el tejido adiposo y la lipólisis.

La presencia de apreciables cantidades de glucógeno en el tejido adiposo de animales ayunados y realimentados fué propuesta por von Gierke en 1906 y posteriormente

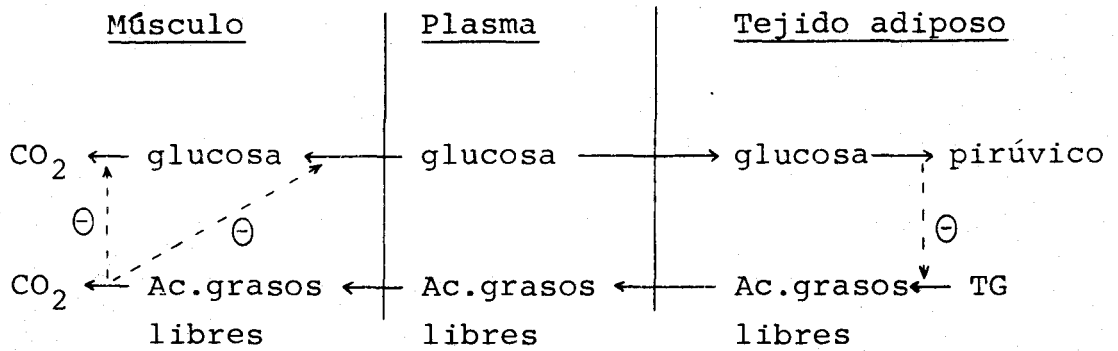


Fig. (6) Ciclo glucosa/ácidos grasos.

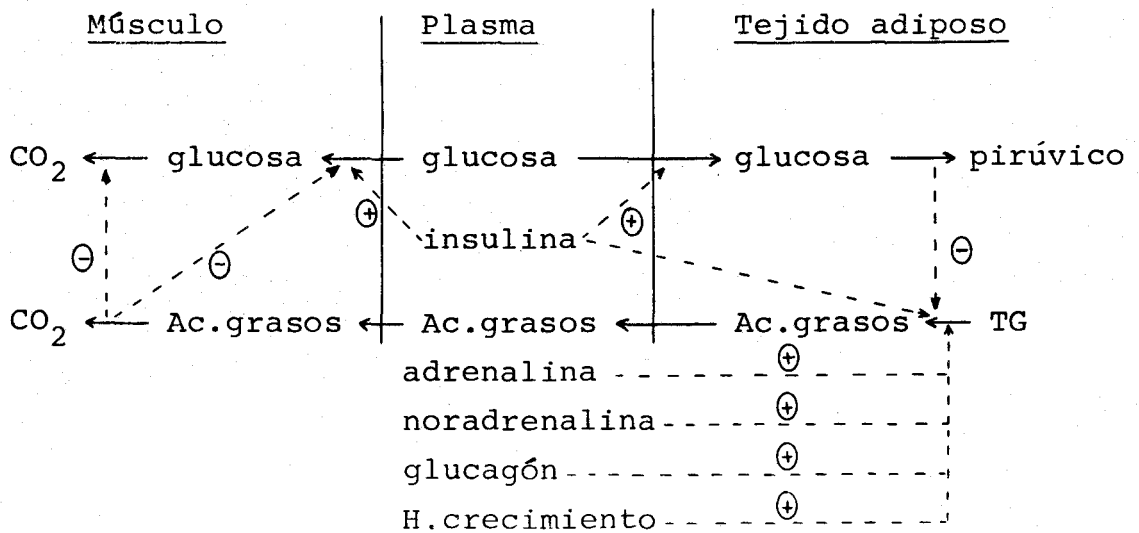


Fig.(7) Efectos de las hormonas sobre el ciclo glucosa/ácidos grasos.

confirmada y estudiada por Wertheimer y Shapiro (1948, 1965). Estos autores demostraron el estado dinámico de los depósitos del glucógeno del tejido adiposo y establecieron algunos de los factores hormonales y nutricionales implicados en su regulación. En ratas sometidas a 24 y 48 horas de ayuno, se observó una disminución drástica en el glucógeno almacenado (0'2 ó 0'5 mg/g de peso de tejido), hasta valores que representan el 10% de los controles. Tras la realimentación se observó una subida en los niveles de glucógeno almacenado por encima de los valores encontrados en los animales control (5-30 mg/g de peso de tejido).

El significado fisiológico del metabolismo del glucógeno en el tejido adiposo no es del todo conocido, pero no hay duda de que los sistemas de la glucógeno sintetasa y de la fosforilasa, presentes en el tejido adiposo, están reguladas por las mismas hormonas que controlan la lipólisis.

Se ha demostrado que la glucógeno sintetasa del tejido adiposo está regulada por la insulina (Junglas, 1966) y que la adrenalina activa a la fosforilasa (Khoo y col., 1973). Se conoce también, que el cAMP, al igual que en otros tejidos, regula las enzimas que intervienen en el metabolismo del glucógeno del tejido adiposo (Yunis y col. 1962; De Lange y col., 1968). Así pues, el tejido adiposo

contiene tres sistemas enzimáticos, bien caracterizados, regulados por el cAMP y puede ser un modelo muy útil para estudiar la posible conexión entre sistemas regulados por el cAMP en un mismo tipo de célula.

Wertheimer y sus colaboradores, han estudiado la relación existente entre la síntesis y degradación del glucógeno con la principal función del tejido adiposo, es decir, el depósito y la movilización de los triglicéridos.

Dichos autores han observado que existe una buena correlación entre los niveles de glucógeno del tejido adiposo y los triglicéridos almacenados en él, sugiriendo que la glucosa procedente de la degradación del glucógeno es utilizada en la síntesis de ácidos grasos. Cuando la ingestión de nutrientes excede a la capacidad del tejido adiposo para depositarlos como triglicéridos, se pueden convertir en glucógeno constituyendo una forma de reservar los nutrientes hasta que posteriormente puedan ser convertidos en grasas. Sin embargo, mediante estudios en los que se midió la incorporación de glucosa marcada a glucógeno, se ha comprobado que el porcentaje de glucosa incorporada a glucógeno, aún en animales ayunados y realimentados, es pequeño con relación al hallado en tejido hepático (Gutman y col., 1967).

Otra hipótesis considera el glucógeno del tejido adiposo como una fuente de α -glicerofosfato, necesario para la

reesterificación de los ácidos grasos liberados durante la lipólisis. En condiciones basales existe un equilibrio entre el grado de lipólisis y de reesterificación. En presencia de hormonas lipolíticas hay un balance en favor de la lipólisis, aunque ambos procesos son estimulados por la mayoría de las hormonas lipolíticas (Vaughan y Steinberg, 1963). Parece posible que exista durante la estimulación hormonal una gran tendencia a utilizar α -glicerofosfato procedente del glucógeno, ya que la fosforilasa y la lipasa están simultáneamente activadas. Sin embargo, el glucógeno almacenado es insuficiente y solo proporciona una fuente inmediata de α -glicerofosfato durante un tiempo muy corto (Steinberg, 1976).

El problema está aún sin aclarar por lo que investigaciones futuras en este campo serán muy útiles. Es posible pensar que la relación entre ambas vías fuera esencial en los organismos inferiores y que se haya ido perdiendo a medida que se avanza en la escala animal. En este sentido, hay que señalar que el tejido adiposo de los insectos realiza funciones que en los animales superiores están divididas entre el hígado y el tejido adiposo (Tietz, 1965).

6. REGULACION HORMONAL DE LA LIPOLISIS.

Una gran cantidad de hormonas pueden modificar la lipolisis, actuando directa o indirectamente sobre la lipasa de triglicéridos. Jeanrenaud (1968), ha clasificado las hormonas según la acción que tengan sobre la lipolisis en cuatro grupos:

1. Hormonas lipolíticas de acción rápida: activan la lipolisis en pocos minutos. Se incluyen en este grupo las catecolaminas (adrenalina y noradrenalina), el glucagón, ACTH y algunos péptidos intestinales como la secretina y el VIP.
2. Hormonas lipolíticas de acción lenta: activan la lipolisis tras algunas horas de actuación. A este grupo pertenece la hormona de crecimiento (GH).
3. Hormonas antilipolíticas: reducen la velocidad de la lipolisis. A este grupo pertenece la insulina.
4. Hormonas permisivas: actúan facilitando la acción lipolítica de otras hormonas. Se incluyen en este grupo los glucocorticoides y las hormonas tiroideas.

6.1. Hormonas lipolíticas.

Una gran cantidad de hormonas actúan "in vitro" modificando la lipolisis del tejido adiposo de rata. Los primeros trabajos demostraron que el tejido adiposo

era sensible a las catecolaminas (Gordon y Cherkes, 1958; White y Engel, 1958), a la ACTH y a la hormona de crecimiento (Raben y Hollenberg, 1958; White y Engel, 1959) al glucagón (Steinberg y col., 1959) y a diversas hormonas pituitarias (Steinberg y Vaughan, 1965; Robison y col., 1971). En un principio la acción lipolítica de la hormona de crecimiento parecía ponerse de manifiesto solo a concentraciones muy altas; posteriormente Fain y col. (1965), demostraron que la acción lipolítica de la hormona de crecimiento era efectiva a concentraciones bajas en presencia de glucocorticoides. Más recientemente se ha demostrado la acción lipolítica de algunas hormonas intestinales como la secretina y el péptido vasoactivo intestinal (Butcher y Carlson, 1970).

Sin duda alguna, las catecolaminas representan al principal agente lipolítico "in vitro" en la mayoría de los mamíferos (Rudman y col., 1963; Laugslow y Hales, 1971). En adipocitos aislados, concentraciones de adrenalina y noradrenalina comprendidas entre 0'5 y 5 $\mu\text{g/ml}$, estimulan al máximo la lipólisis, medida como glicerol liberado. Sin embargo, los niveles de adrenalina circulante, aún en condiciones de stress, nunca pasan de 0'001 $\mu\text{g/ml}$, concentración que es mucho menor de la requerida para estimular la lipólisis "in vitro" (Callingham, 1967). Estos resultados sugieren que la

adrenalina liberada localmente, como neurotransmisor del sistema nervioso simpático, debe ser más importante como agente lipolítico que las catecolaminas de origen adrenal.

El glucagón es conocido como un potente agente hiperglucémico, produciendo una activación de la fosforilasa hepática y activando la degradación del glucógeno e incrementando la glucosa en sangre. La hipótesis de que el glucagón y la insulina ejercen acciones metabólicas opuestas, llevó a estudiar la actividad lipolítica del glucagón.

"In vitro", y a concentraciones bajas, el glucagón produce un incremento en el glicerol liberado por los adipocitos de rata (Birbaumer y Rodbell, 1969; Fradsen y Moody, 1973). El glucagón no parece tener una acción lipolítica en adipocitos humanos (Burns y col., 1972; Kather y Simon, 1977). Sin embargo, la respuesta del tejido adiposo al glucagón disminuye con la edad del animal (Mangniello y Vaughan, 1972; Cooper y Gregerman, 1976). Estos resultados sugieren que las diferencias encontradas en la respuesta del tejido humano al glucagón, al menos en parte, pueden ser debidas a la utilización de tejido adiposo de adultos (Kather y Simon, 1979).

6.2. Posibles mecanismos de acción de los agentes que modifican la respuesta del tejido adiposo a las hormonas lipolíticas.

Existe suficiente información para concluir que las hormonas lipolíticas (catecolaminas, glucagón, ACTH, etc) actúan activando la lipasa de triglicéridos del tejido adiposo a través del sistema de la adenilato ciclasa y la proteína quinasa, como describimos en el apartado (2.). Sin embargo, en el caso de las hormonas que hemos clasificado como permisivas y anti-lipolíticas, o ante cualquier agente que pueda afectar la lipólisis, es interesante conocer los posibles lugares donde teóricamente podrían ejercer su efecto. Basándose en el estudio de los distintos sistemas implicados, Steinberg (1976) ha propuesto una clasificación que exponemos a continuación:

1. Modificaciones en la reesterificación de los ácidos grasos libres.

Se puede aumentar la reesterificación de los ácidos grasos, para formar de nuevo triglicéridos, sin afectar la actividad de la lipasa y sin disminuir la liberación de glicerol. Así, en presencia de glucosa se ha observado una disminución en la movilización de los ácidos grasos (al incrementar la reesterificación), sin haber disminución en el glicerol liberado.

2. Modificaciones en el grado de formación y degradación del cAMP.

a. Actuando sobre la interacción hormona-receptor.

a₁. Agentes que compiten directamente con la hormona en la unión al receptor.

a₂. Agentes que modifican el lugar de unión del receptor a la hormona.

a₃. Agentes que modifican el número de receptores disponibles para unirse a la hormona.

b) Actuando sobre la interacción receptor-adenil ciclasa.

c) Actuando sobre el grado de formación del cAMP.

c₁. Agentes que interaccionan directamente con la adenilato ciclasa.

c₂. Agentes que modifican la concentración de inhibidores de la adenil-ciclasa.

c₃. Agentes que inducen la liberación de inhibidores de la adenil-ciclasa.

d) Actuando sobre el grado de degradación del cAMP.

Agentes que actúan activando o inhibiendo la actividad de la fosfodiesterasa.

3. Modificaciones en el grado de estimulación de la proteína quinasa.

a. Actuando sobre la distribución intracelular de cAMP.

- b. Actuando sobre la disociación del complejo RC de la proteína quinasa, para liberar la subunidad catalítica (C).
- c. Actuando directamente sobre la subunidad catalítica libre (C).

El tejido adiposo, como otros muchos tejidos, posee una proteína estable al calor que es inhibidora de la proteína quinasa (se une a la subunidad catalítica C).
- d. Actuando sobre la fosforilación de la lipasa inactiva.
 - d₁. Agentes que modifican la concentración de ATP, o de otros factores implicados en la reacción de fosforilación.
 - d₂. Agentes que modifican a la lipasa, o a su capacidad para actuar como aceptor.
- 4. Modificando el grado de inactivación de la lipasa por la fosfatasa lipasa.
 - a. Actuando sobre la actividad de la fosfatasa lipasa.
- 5. Modificando directamente la actividad de la lipasa de triglicéridos.
 - a. Agentes que pueden modificar directamente la actividad catalítica del enzima.

- b. Agentes que inducen la liberación de efectores endógenos o inhibidores de la lipasa.

6.3. Hormonas permisivas.

En 1952, Ingle introdujo por vez primera el concepto de "hormonas de acción permisivas" al estudiar la acción de los esteroides adrenocorticales. La idea más elemental es que el glucocorticoide, o en general la hormona permisiva, debe estar presente en tal cantidad que permita mantener el sistema-sensible-a-hormonas en el estado de respuesta apropiado, y que no permita la acción directa de la hormona permisiva sobre el sistema en cuestión. Así, la respuesta lipolítica del tejido adiposo, "in vivo" o "in vitro", a la adrenalina (o a otras hormonas lipolíticas) disminuye tras la adrenalectomía y se restaura tras la administración de corticosteroides (Shafir y col., 1959; Schotz y col., 1959). Sin embargo, la administración de corticosteroides en condiciones basales tiene muy poco o ningún efecto sobre los niveles de ácidos grasos libres, ni tampoco produce una estimulación aguda de la lipólisis "in vitro". No obstante, los ácidos grasos libres pueden aparecer incrementados debido a una disminución en la reesterificación (Fain y col., 1963).

La combinación de dexametasona y hormona de crecimiento aumenta la lipólisis "in vitro" solo después de un periodo de varias horas, y el efecto se bloquea con actinomicina D. Esto sugiere más el efecto de una inducción en la síntesis de proteínas, que una acción directa sobre la lipasa de triglicéridos sensible a hormonas (Fain y col., 1963; Goodman, 1968). Así, parece probable que la administración de hormonas esteroideas en animales adrenalectomizados permita restaurar los niveles normales de la proteína, o de las proteínas implicadas en la respuesta lipolítica, y cuya síntesis estaba inhibida por acción de la adrenalectomía. Entre las proteínas candidatas se incluirían según Steinberg (1976) los receptores de membrana del sistema de la adenil ciclasa, el sistema de la proteína quinasa, o la misma lipasa de triglicéridos.

El efecto se bloquea por inhibidores del RNA y de la síntesis de proteínas, tales como actinomicina, puromicina, ciclohexamida, luz ultravioleta y rayos X (Fain y col., 1965; Fain, 1967; Caldwell y Fain, 1970; Moskowitz y Fain, 1970; Fain y col., 1971). Estos inhibidores no bloquean la lipólisis inducida por las hormonas lipolíticas de acción rápida. Los estudios con los inhibidores antes citados sugieren que la síntesis de RNA y proteínas están implicadas en la

estimulación de la lipólisis por la hormona de crecimiento y los glucocorticoides.

El efecto permisivo de los esteroides adrenales con respecto a procesos dependientes del cAMP, se pone de manifiesto en otros sistemas diferentes que incluyen gluconeogénesis en el músculo cardíaco y esquelético, y la acción de la vasopresina sobre el transporte de sodio (Exton y col., 1972). El hecho de que la respuesta a una gran cantidad de hormonas en tejidos diferentes se vería afectado, hace menos probable que se piense en los receptores de membrana como proteínas implicadas en el efecto permisivo de los glucocorticoides. Brodie y col. (1966) observaron una disminución en la sensibilidad del sistema adenilciclase de tejido adiposo de ratas adrenalectomizadas, y Moskowitz y Fain (1970) obtuvieron una estimulación en la formación de cAMP en adipocitos incubados con dexametasona.

Recientemente, Gorin y Goodman (1974) han encontrado una disminución (20-30%) en la actividad de la proteína quinasa del tejido adiposo de ratas hipofisectomizadas. Es evidente, que el problema del lugar preciso donde los glucocorticoides ejercen su acción permisiva está aún en estudio. Si además valoramos que los esteroides potencialmente inducen la síntesis de gran cantidad

de proteínas diferentes, es posible que existan varios lugares de acción.

Las hormonas tiroideas tienen también un papel permisivo en la respuesta lipolítica y el pretratamiento con T_3 incrementa la lipólisis (Debous y Schwartz, 1961). La incubación "in vitro" con T_3 no incrementa la lipólisis, si bien se ha observado un incremento en la lipólisis estimulada por adrenalina cuando ambas hormonas están presentes simultáneamente en el medio de incubación (Vaughan, 1967; Goodman, 1970).

El lugar preciso donde las hormonas tiroideas ejercen su acción no se conoce, parece que la actividad de la fosfodiesterasa está implicada pero es posible que, como en el caso de los glucocorticoides, puedan estar afectados más de un sistema enzimático.

La hipofisectomía disminuye la sensibilidad del tejido adiposo a las hormonas lipolíticas. El tratamiento de los animales hipofisectomizados con hormona tiroidea (Goodman y Knobil, 1959), con glucocorticoides (Shafrir y col., 1970) o con hormona de crecimiento (Goodman y Knobil, 1964) restaura la respuesta lipolítica, indicando que la pérdida de la función tiroidea y adrenal deben estar implicadas.

Goodman (1968) ha sugerido un papel independiente para la hormona de crecimiento al comprobar que la

incubación de tejido de animales hipofisectomizados con hormona de crecimiento restaura la respuesta lipolítica del tejido a la teofilina pero no a la adrenalina.

6.4. Hormonas antilipolíticas.

6.4.1. Insulina.

El tejido adiposo presenta una gran sensibilidad al efecto antilipolítico de la insulina, que se pone de manifiesto por el hecho de que dosis muy bajas de insulina, que no son capaces de producir cambios apreciables en los niveles de glucosa en sangre, producen una disminución significativa en los niveles plasmáticos de ácidos grasos libres (Zierler y Ravinowitz, 1964). Los efectos de la insulina sobre la liberación de ácidos grasos son bastante complejos; al estimular la captación de glucosa por el tejido adiposo, disminuye la movilización de los ácidos grasos debido a un estímulo en la reesterificación de éstos. Este efecto se lleva a cabo sin alterar el estado de actividad de la lipasa de triglicéridos sensible a hormonas. Ya que el glicerol liberado, en la lipólisis de los triglicéridos, se reutiliza en una proporción muy pequeña (Wieland y Suyter, 1957;

Junglas y Ball, 1963; Steinberg y Vanghan, 1965; Herrera y col, 1970), sería lógico pensar que la insulina actuaría inhibiendo la liberación de los ácidos grasos libres pero no la liberación de glicerol. Sin embargo, numerosos investigadores han observado que la insulina produce una inhibición en el glicerol liberado en presencia de catecolaminas, por lo que se piensa que la insulina actúa inhibiendo la lipólisis así como estimulando la reesterificación. Steinberg y col.(1975), sugieren que el efecto antilipolítico de la insulina está asociado a un cambio en el estado de activación de la lipasa de triglicéridos. La activación de la lipasa mediada por la proteína quinasa en adipocitos incubados previamente con adrenalina es mayor que la observada en adipocitos no sometidos previamente a la acción de las catecolaminas. La incubación del tejido en presencia de adrenalina conduce a la conversión de la lipasa b (inactiva) en lipasa a (activa) y por tanto los adipocitos preparados de estos tejidos, solo pueden presentar pequeñas activaciones adicionales cuando son incubados con ATP-Mg y cAMP. Si ambas hormonas, adrenalina e insulina, están presentes durante el tiempo de incubación, la lipasa de los adipocitos aislados presenta un grado de activación mayor que el característico en condiciones basales. Además, Corbin

y col. (1975), han demostrado que la insulina inhibe la activación de la proteína quinasa (rotura de un holoenzima RC, inactivo, en la subunidad C, activa) estimulada por la adrenalina. Los resultados de estos autores sugieren que la acción de la insulina, suprimiendo la lipólisis estimulada por la adrenalina, está ligada a la inactivación de la proteína quinasa, lo que a su vez bloquearía la conversión de la lipasa inactiva en su forma activa.

El efecto antilipolítico de la insulina puede deberse a una inhibición en la formación del cAMP o a un incremento en su degradación. Se han presentado resultados en favor de ambas consideraciones, sin embargo, no está aún aclarado que estos efectos sean responsables de la acción antilipolítica de la insulina en todas las circunstancias estudiadas.

Se ha demostrado, que bajo determinadas circunstancias, los niveles de cAMP producido por el tejido adiposo, incubado en presencia de adrenalina más insulina, son mucho menores que los observados cuando se incubaba el tejido en presencia de adrenalina sola (Butcher y col., 1966). Estas diferencias observadas parecen indicar que el efecto antilipolítico de la insulina podría ser atribuido a su capacidad para inhibir la activación del sistema de la adenil-ciclasa por la adrenalina. Sin embargo, estos experimentos se realizaron con

concentraciones muy altas de adrenalina, concentraciones muy superiores a las necesarios para producir la máxima estimulación de la lipólisis. Por tanto, aunque la insulina disminuyó significativamente los niveles de cAMP, la lipólisis no resultaba disminuida debido a que los niveles de cAMP, aunque disminuidos eran aún suficientes para seguir produciendo la estimulación de la lipólisis. Con concentraciones de adrenalina inferiores, el efecto antilipolítico de la insulina era evidente, pero no tenía ningún efecto sobre la acumulación de cAMP. Estudios en diversos laboratorios han demostrado que en determinadas circunstancias, se pone de manifiesto el efecto antilipolítico de la insulina sin que se observen cambios significativos en los niveles de cAMP (Khoo y col., 1973; Jarett y col., 1973; Kono y Barhan, 1973). Así, Kono y col., usando una concentración semimáxima de adrenalina ($0.5 \mu\text{M}$) observó que la insulina ($0.4 \mu\text{M}$) inhibía el glicerol liberado en presencia de adrenalina en un 80%.

La adrenalina sola, incrementaba los niveles de cAMP de 8.5 a 27.1 pmoles/mg prot.; mientras que en presencia de adrenalina e insulina los niveles de cAMP pasaron de 8.5 a 20.2 pmoles/mg prot. El nivel de cAMP producido en presencia de ambas hormonas era excesivamente alto y difícilmente relacionable con la liberación de glicerol observada. Una explicación a estos resultados sería, según Steinberg, que la efectividad para estimular la lipólisis

de una determinada concentración de cAMP disminuye en presencia de insulina.

Soderling y col. (1973) han demostrado que en presencia de concentraciones altas de adrenalina (por encima de las necesarias para producir la máxima estimulación de la lipólisis), la insulina disminuye los niveles de cAMP y disminuye la proporción de la proteína quinasa inactiva que se convierte en la forma activa. Sin embargo, en estas condiciones, no se observa el efecto antilipolítico que Butcher y col. (1966) describen en sus trabajos.

Usando concentraciones de adrenalina inferiores, Corbin y col. (1975) observaron que concentraciones altas de insulina (1 mU/ml) inhibían significativamente la actividad de la proteína quinasa y la liberación de glicerol pero no se producían cambios significativos en los niveles de cAMP. Los autores sugieren que los cambios en los niveles de cAMP, demasiado pequeños para ser medidos por los métodos usuales, serían los responsables de estos resultados. Es posible igualmente que bajo estas condiciones experimentales, el efecto de la insulina no dependa de cambios en los niveles de cAMP.

Se ha sugerido que los cambios inducidos por la insulina en el medio iónico intracelular pueden jugar un papel importante en el estudio del mecanismo de la acción antilipolítica de la insulina (Walaas y col., 1973; Kissebah y col., 1974). Otra posibilidad sería que la

insulina induzca la liberación de un "segundo mensajero" que sería el responsable de la activación de la proteína quinasa por el cAMP (Larner, 1972). Finalmente, podría ser que la insulina actuara induciendo cambios en los distintos compartimentos del cAMP celular (Kuo y Derenzo, 1969).

6.4.2. Prostaglandinas.

La gran potencia de las prostaglandinas como agentes antilipolíticos, tanto "in vivo" como "in vitro", fué inicialmente estudiada por Steinberg y col. (1963,1964), y posteriormente confirmada por otros investigadores (Bergstrom y col., 1964; Bergstrom y Carlson, 1965; Steinberg y Pittman, 1966 ; Butcher y Sutherland, 1967; Fain, 1967).

El efecto lipolítico de concentraciones de adrenalina del orden de μM se bloquea en presencia de concentraciones nanomolares de PGE, el agente antilipolítico por excelencia. La acción de las prostaglandinas, como agentes antilipolíticos, se pone de manifiesto no solo con las catecolaminas sino también con las demás hormonas lipolíticas estudiadas (ACTH, glucagón y TSH).

Steinberg y Vaughan (1967) comprobaron que las prostaglandinas no bloqueaban los efectos lipolíticos del dibutiril cAMP, si bien, bloqueaban los efectos de la teofilina a

bajas concentraciones. A la vista de sus resultados, estos autores propusieron que el lugar de acción de las prostaglandinas era a nivel de la adenil ciclasa.

Butcher y Sutherland (1967), demostraron que la PGE, disminuía los niveles de cAMP inducidos por la adrenalina en tejido adiposo de rata. Posteriormente, los mismos autores observaron que la PGE₁ sola, incrementaba los niveles de cAMP en el tejido adiposo. Este efecto no se observaba cuando las experiencias se realizaron con adipocitos aislados, sugiriendo que algún otro componente del tejido adiposo debía de ser el responsable del incremento en los niveles de cAMP.

El significado fisiológico del efecto antilipolítico de las prostaglandinas no está aún aclarado. Se sabe que son efectivas cuando se administran "in vivo", pero no está claro, si en condiciones fisiológicas se alcanzan concentraciones suficientes para actuar regulando la lipólisis. Es posible que tengan un papel fisiológico como "hormonas intracelulares". El tejido adiposo, como la mayoría de los tejidos, contiene los elementos necesarios para la biosíntesis de prostaglandinas (Shaw y Ramwel, 1968; Dalton y Hope, 1974). Además, se ha comprobado que la formación y liberación de las prostaglandinas del tejido adiposo están incrementadas durante la estimulación de la lipólisis (Shaw y Ramwel, 1968).

Existe la posibilidad de que las prostaglandinas puedan actuar modificando la respuesta hormonal; tendiendo a disminuir la lipolisis, inducida por las hormonas lipolíticas.

7. REGULACION NO HORMONAL DE LA LIPOLISIS.

La respuesta lipolítica a factores extracelulares, tales como hormonas y metabolitos, dependen de factores endógenos del tejido adiposo. Se ha demostrado que el tamaño de los adipocitos así como la edad pueden influir modificando sus respuestas fisiológicas. La respuesta a estímulos lipolíticos, según la edad y el tamaño de los adipocitos, puede ser además afectadas por el estado de nutrición del animal. El estudio de los efectos de tales diferencias es muy confuso por la dificultad que representa el determinar cual de ellas es más importante en una determinada situación.

Estudios con adipocitos humanos y de rata, han demostrado que los adipocitos grandes presentan una lipolisis basal mayor. Igualmente, se ha observado grados mayores de lipolisis inducida por hormonas (Zinger y Shapiro, 1971; Jacobsson y Smith, 1972; Hansen y col., 1974). Con la edad, hay una pérdida de sensibilidad del tejido adiposo a una gran cantidad de hormonas (Manganiello y Vaughan, 1972; Miller y Allen, 1973).

Fredholm (1971) ha observado que bajas concentraciones de ácido láctico, son capaces de inhibir la liberación de ácidos grasos libres del tejido adiposo de rata. Sin embargo, el efecto principal parece ser sobre la reeste-

rificación más bien que sobre la lipólisis. También se ha descrito una acción antilipolítica de los cuerpos cetónicos "in vitro" pero a concentraciones tan altas que carece de importancia fisiológica.

7.1. Influencia de la glucosa.

El papel de la glucosa como mediador de la lipólisis, ha sido y continua siendo muy discutido. Se ha demostrado que la liberación de ácidos grasos libres, desde el tejido adiposo, incubado en presencia de hormonas lipolíticas, disminuye en presencia de glucosa (Jeanrenaud, 1968). En estas condiciones, la glucosa incrementa el glicerol liberado (Bally y col., 1967). La disminución en los niveles de ácidos grasos, se considera secundaria al incremento en la reesterificación producido por la glucosa (Steinberg y col., 1960; Junglas y Ball, 1963). El incremento producido por la glucosa en la liberación del glicerol en presencia de adrenalina, podría ser reflejo de un incremento en la lipólisis debido a la disminución de los ácidos grasos libres, ya que estos últimos son inhibidores de la lipólisis (Ball y col., 1965).

Contrariamente a estos resultados, Ho (1971), ha observado que la glucosa aumenta la lipólisis inducida por hormonas sin disminuir los niveles de ácidos grasos

libres. Además el pirúvico, el glutámico y el aspártico tienen un efecto semejante al de la glucosa. Estos resultados parecen indicar que el incremento en la lipólisis, producido por estos metabolitos, sea debido a un incremento del metabolismo energético.

La estimulación de la lipólisis en adipocitos humanos (Giudicelli y col., 1977) y de rata (Fassina y col., 1967, 1972, 1973, 1974), requiere una continua fuente de energía. El ATP es necesario no solo para la síntesis de cAMP sino también para la activación de triglicérido lipasa. Angel y col. (1971), han demostrado que la estimulación de la lipólisis con adrenalina, ACTH y db-cAMP produce una caída en los niveles de ATP del tejido adiposo. La adición de glucosa al medio de incubación inhibe la caída en los niveles de ATP producida por las hormonas o factores lipolíticos. Es posible que la glucosa estimule la síntesis de ATP, produciendo α -glicerofosfato por una glucólisis activada y eliminando el acúmulo de ácidos grasos, pero puede tener un papel adicional sobre la lipólisis por mecanismo distintos (Hall y Ball, 1970; Smith, 1974).

7.2. Moduladores de la acción hormonal: regulación "feedback".

Es bien conocido que después de la adición de un estímulo lipolítico, el contenido de cAMP en los adipocitos sube rápidamente en pocos minutos para después caer progresivamente, pudiendo llegar a los valores basales aún en presencia del estímulo. Además, se produce una respuesta muy débil tras la repetida adición de estímulos lipolíticos.

Ho y Sutherland (1971), han comprobado que cuando el adipocito se somete a un estímulo lipolítico, el 50% del contenido de ATP de la célula se transforma en cAMP.

Debido al gran gasto de energía que lleva consigo esta transferencia de información, se ha sugerido que la célula debe tener un sistema regulador "feedback" que inhiba la formación de más cAMP tras la estimulación inicial de la lipólisis.

La rápida subida y posterior caída en los niveles de cAMP en presencia de estímulos lipolíticos, puede ser explicada por la activación de la fosfodiesterasa, por dichos estímulos; si bien los cambios en la actividad de la fosfodiesterasa parecen ser secundarios a la subida en los niveles de cAMP (Pawlson y col., 1974), o por la presencia de un inhibidor como analizaremos a continuación.

7.2.1. Acidos grasos.

Una segunda hipótesis para explicar la respuesta de los niveles de cAMP a los estímulos lipolíticos, es que los ácidos grasos, que son producidos durante la lipólisis, pueden actuar como reguladores "feedback".

Es bien conocido que la acumulación de ácidos grasos actúa inhibiendo la lipólisis cuando el tejido adiposo se incuba "in vitro" (Rodbell, 1965; Angel y col., 1971), y disminuyen el contenido en el ATP celular (Angel y col., 1971 b).

Recientemente, Fain y Shepherd (1975), han demostrado que el efecto de los ácidos grasos es debido a la inhibición de la adenil ciclasa, que a su vez produce una disminución en los niveles de cAMP, tras la adición del estímulo lipolítico. En adipocitos humanos, la adición de ácidos grasos libres inhiben el incremento en los niveles de cAMP sin afectar la actividad de la adenil ciclasa. En adipocitos de pollo, donde el incremento en los niveles de cAMP ante un estímulo lipolítico se mantienen altos durante un tiempo más largo que en los adipocitos procedentes de rata la adición de ácidos grasos no produce inhibición en los niveles de cAMP (Malgieri y col., 1975).

Por tanto, la acumulación intracelular de los ácidos

grasos, por encima de un umbral, a través de sus efectos sobre el ATP y la síntesis de cAMP serían la causa de la disminución "in vitro" de la lipólisis, pero no explicarían la disociación entre el contenido de cAMP y la estimulación de la lipólisis. Este mecanismo de control no tendría importancia fisiológica "in vivo"; ya que los ácidos grasos no se acumulan en una proporción significativa para afectar la lipólisis.

7.2.2. Adenosina.

El papel de la adenosina como factor regulador "feedback" se ha estudiado ampliamente. En presencia de hormonas lipolíticas, la adenosina inhibe la actividad de la adenil ciclasa, disminuyendo el acúmulo de cAMP y tiene una ligera inhibición sobre la lipólisis en adipocitos de rata (Fain y col., 1972), sin embargo, no es efectiva en adipocitos humanos (Burns, 1975). Estos resultados sugieren que la adenosina debe tener una acción adicional que la permita mantener estimulada la lipólisis a pesar de disminuir los niveles de cAMP.

Schwabe y Ebert (1972), han demostrado que los niveles de cAMP y el grado de lipólisis en presencia de catecolaminas, aumentan cuando la concentración de células en el medio disminuye. Este efecto parece estar relacionado con la liberación de adenosina por los adipocitos.

Estos resultados estan de acuerdo con trabajos posteriores que encuentran un incremento en la lipolisis basal y en los niveles de cAMP cuando la concentración de células en el medio disminuye, ya que en estas circunstancias la acumulación de adenosina en el medio debe ser menor. La adición al medio de la enzima que rompe la adenosina, adenosina desaminasa, incrementa la lipolisis basal y los niveles de cAMP (Fain y Weiser, 1975).

La estimulación de la lipolisis, después de la caída de los niveles de cAMP que ocurre tras la adición de los estímulos lipolíticos, podría deberse a una acción de la adenosina que actúa inhibiendo el acúmulo de cAMP pero tiene una acción mucho más débil sobre la lipolisis. Sin embargo, Schwabe (1973, 1975), ha demostrado que la liberación de adenosina no se estimula en presencia de hormonas lipolíticas, lo cual pone en duda su supuesto papel como regulador "feedback".

Finalmente, Ho y Shutherland (1971), han estudiado un compuesto al que llamaron regulador "feedback", que se acumula durante la estimulación de la lipolisis. Este regulador "feedback", inhibe la estimulación de la adenilato ciclasa por diferentes hormonas (Ho y col., 1975), también a la fosfodiesterasa y activa a la proteína quinasa (Ho y col., 1975). Hasta ahora, la naturaleza exacta de este regulador y su efecto sobre la lipolisis

estimuladas por hormonas, es desconocido.

El compuesto no se ha identificado pero del estudio de sus propiedades se puede decir que no parece ser ni prostaglandinas ni ácidos grasos ni adenosina.

8. REGULACION DE LA LIPOLISIS DURANTE EL AYUNO.

El ayuno es una situación fisiológica en la que se ha demostrado que hay un incremento en la movilización de los ácidos grasos. Este efecto se podría explicar por una lipólisis y disminución en la reesterificación de los ácidos grasos como consecuencia de la disminución en los niveles de insulina circulantes observados durante el ayuno (Cahill y col., 1966). Sin embargo se ha demostrado un incremento en los niveles de glicerol del plasma durante el ayuno (Carlson y Oró, 1963), así como un incremento en los niveles de glicerol liberados al medio de incubación de tejido graso de animales sometidos a ayuno (Vaughan, 1962), indicando que hay un aumento de la lipólisis.

Parece bien establecido que las principales hormonas que controlan la lipólisis durante los periodos de ayuno son: hormona de crecimiento, insulina y glucagón.

Roth y col. (1963), demostraron que la secreción de la hormona de crecimiento estaba aumentada durante el ayuno y disminuida durante la realimentación. Estos resultados están de acuerdo con trabajos anteriores que habían encontrado una elevación en los niveles plasmáticos de glicerol y de ácidos grasos en sujetos tratados con hormona de crecimiento purificada (Raben y Hollenberg, 1959).

"In vitro", la acción lipolítica de la hormona de crecimiento fue más difícil de demostrar comprobándose que era necesaria la presencia de glucocorticoides para que la hormona estimulase la lipólisis (Fain, 1967).

La secreción de insulina disminuye significativamente con el ayuno tanto "in vivo" como "in vitro" (Goberna, 1978). Los niveles de insulina circulante disminuyen en un 80% después de 48 h de ayuno, en el hombre y en la rata, mientras que la glucosa en sangre disminuye en un 30%. Se cree que la caída en los niveles circulantes de insulina durante el ayuno es el factor responsable del aumento en la movilización de los ácidos grasos del tejido adiposo observada en ratas ayunadas.

El efecto antilipolítico de la insulina estará disminuido durante el ayuno y, quizás lo más importante, disminuirá la captación de glucosa por el adipocito y por tanto la reesterificación de los ácidos grasos está disminuida provocando un incremento en el flujo de ácidos grasos que salen del adipocito (Cahllil y col., 1966). En periodos cortos de ayuno (1 día) hay un incremento en la liberación de ácidos grasos sin cambios en la lipólisis, mientras que en periodos de ayuno más largos (2 ó 3 días) la lipólisis basal está estimulada (Scow y Chernick, 1970). Lawrence (1966), ha demostrado un incremento en los niveles circulantes de glucagón durante el ayuno.

Teniendo en cuenta el papel activador del glucagón sobre la glucogenolisis y sobre la lipolisis, se puede pensar que el papel fisiológico del glucagón durante el ayuno sería en primer lugar activar la movilización del glucógeno hepático y en segundo lugar movilizar los ácidos grasos reforzando la acción lipolítica de otras hormonas, como la hormonas de crecimiento.

En resumen, un incremento en los niveles de glucagón y hormona de crecimiento y una disminución en los niveles de insulina son los tres factores implicados en el control de la lipolisis durante el ayuno.

2º OBJETIVOS.

Se ha demostrado (Angel y col., 1971), que los ácidos grasos libres añadidos al medio de incubación producen una caída en los niveles intracelulares de ATP en el adipocito, así como una inhibición en el grado de lipólisis inducido por hormonas. Se conoce también que durante el ayuno hay una acumulación intracelular de ácidos grasos en el tejido adiposo.

Nuestros objetivos se resúmen en los siguientes puntos:

- 1°.- Utilizando el ayuno como modelo experimental, intentamos verificar si estos ácidos grasos libres intracelulares producen la inhibición de la lipólisis inducida por adrenalina.
- 2°.- Si la inhibición en el grado de lipólisis se correlaciona con los niveles de cAMP y la actividad de la proteína quinasa.
- 3°.- Estudiar el efecto de la glucosa a concentraciones fisiológicas en la regulación de la lipólisis.
- 4°.- Utilizando inhibidores de la glucólisis y de la fosforilación oxidativa, estudiar el papel de la glucosa como sustrato energético.

3º MATERIAL Y METODOS.

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

Para la realización del presente trabajo, se han utilizado ratas wistar, machos, de pesos comprendidos entre 180-200 g, correspondiente a 2-3 meses de edad. Los animales se dividieron en cuatro grupos. El primer grupo estaba formado por ratas alimentadas que nos sirvieron como controles en todas las experiencias realizadas, mientras que en el 2°, 3° y 4° los animales fueron sometidos a un ayuno total con agua "ad libitum" durante 24, 48 y 96 h respectivamente.

2. DISEÑO EXPERIMENTAL.

Nuestro trabajo lo podemos considerar formado por tres grupos de experiencias, como esquematizamos en la pág().

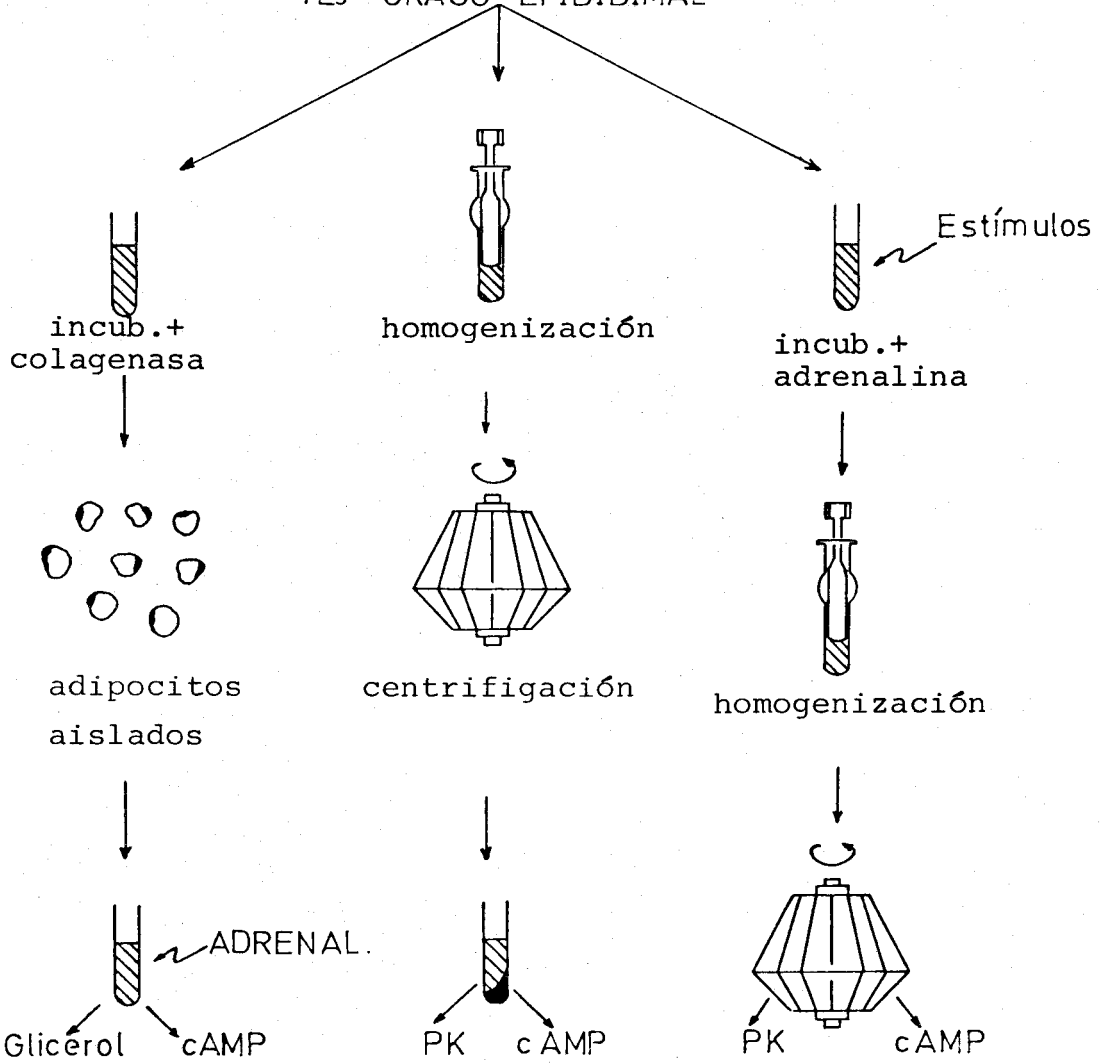
Un primer grupo, en el que estudiamos la lipólisis estimulada por hormonas durante el ayuno en adipocitos aislados.

Un segundo grupo, en el que estudiamos la actividad de la enzima proteína quinasa dependiente de cAMP en homogenados de tejido graso durante el ayuno.

Un tercer grupo, en el que estudiamos la regulación hormonal de la actividad de la proteína quinasa durante el ayuno y su implicación en la lipólisis.



TEJ GRASO EPIDIDIMAL



3. AISLAMIENTO E INCUBACION DE ADIPOCITOS.

El aislamiento de las células del epidídimo de rata se realizó de acuerdo con la técnica descrita por Rodbell en 1964.

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico inyectado intraperitonealmente a la dosis de 4mg/100 g de peso. Los epidídimos grasos se disecaron por encima de la vena epididimal, ya que las porciones terminales del tejido son más activas metabólicamente.

3.1. Purificación de la albúmina bovina.

Hemos utilizado para los medios de incubación, albúmina bovina (Behringwerke) que purificamos previamente con el fin de eliminar los posibles ácidos grasos de cadena larga y otras impurezas, siguiendo el método de Chen y col (1967).

Partimos de 10 g de albúmina bovina que se disolvieron en 100 ml de agua destilada y desionizada con la ayuda de un agitador magnético. Esta disolución se llevó a pH 3 con ClH 1 N, comprobándolo con papel indicador. A la solución ácida de albúmina se le añadió 5 g de carbón vegetal activo (Norit A, Amend Brug Chemical Co), agitándose la mezcla en cámara fría a 5°C durante una hora. Este proceso permite que los ácidos grasos queden adheridos al carbón activo y posteriormente, este se eliminó por

centrifugación. Se realizó una centrifugación inicial de una hora a 20.000 r.p.m. a 4°C y el sobrenadante se volvió a centrifugar por segunda vez en las mismas condiciones. El sobrenadante final, libre de carbón activo, se recogió y dializó en cámara fría, frente a 4000 ml de solución salina (ClNa 0'9 %), durante 24 h. Este proceso permite la eliminación de ácido clorhídrico y demás impurezas que acompañan a la albúmina. Al final se comprobó el pH, que debe ser neutro, comprobándose así la total eliminación del ácido. La solución final se liofilizó, se pulverizó con la ayuda de un mortero y se guardó a 4°C.

3.2. Medio de incubación.

Se utilizó como medio de incubación la solución salina de Krebs-Ringer-Bicarbonato. Las sales componentes de ésta solución se prepararon en soluciones concentradas que se conservaron en frío (4°C), tomándose cada día las cantidades para preparar la solución de Krebs.

<u>Reactivos</u>	<u>Volumen</u>	<u>Molaridad final</u>
ClNa (0'9%)	100 ml	118 mM
ClK (1'15%)	4 ml	5 mM
Cl ₂ Ca (1'22%)	3 ml	2'5 mM
PO ₄ H ₂ K (2'11%)	1 ml	1'18 mM
SO ₄ Mg (3'8%)	1 ml	1'18 mM
CO ₃ HNa (1'3%)	21 ml	23'26 mM

Después de añadidos y mezclados todos los componentes referidos en la tabla anterior, la solución final obtenida se gaseó durante 10 min con carbógeno (O₂/CO₂ 95/5), ajustándose el pH que debe quedar siempre entre 7'35-7'45.

3.3. Técnica.

Dos o tres ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico inyectado intraperitonealmente. Se les practicó una laparotomía a lo largo de la línea alba. Rápidamente se disecaron los epidídimos grasos y se colocaron en un único vial de plástico, conteniendo 5 ml de Krebs-Ringer-Bicarbonato, albúmina bovina al 1'25 % y 1 mg/ml de colagenasa. El tejido troceado finalmente se incubó durante 45 min en baño a 37-38°C, con agitación constante.

El tejido adiposo digerido, más el medio de incubación

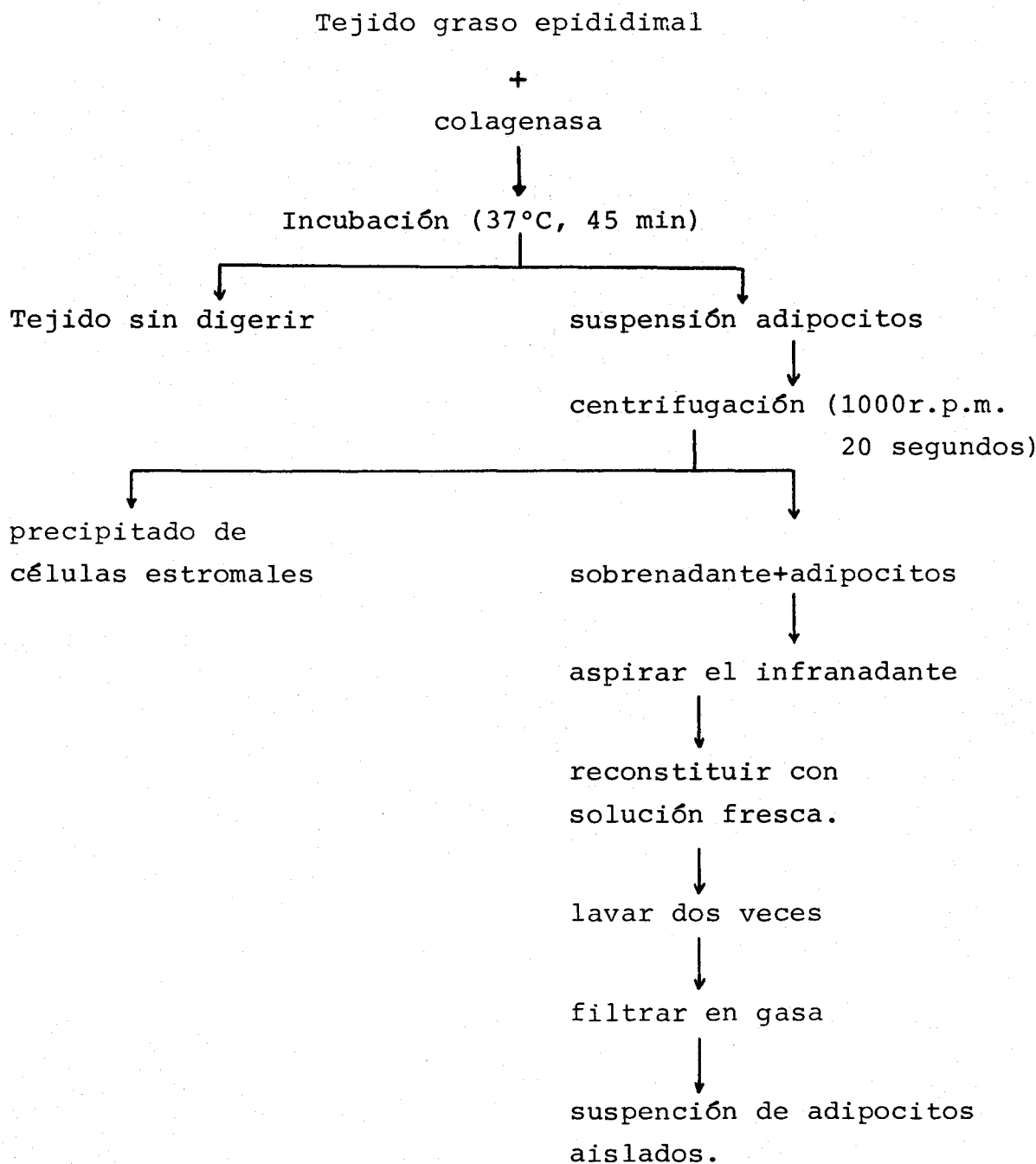
se pasaron a través de una jeringa de plástico con una gasa en el fondo. El filtrado se recogió en una jeringa con el fondo obturado y se centrifugó unos 15 a 20 segundos, hasta alcanzar las 1000 r.p.m. Como resultado de esta nueva centrifugación los adipocitos quedaron flotando en la superficie mientras que las células estromales sedimentaron. El infranadante se eliminó y los adipocitos se lavaron dos veces con medio de incubación fresco y se resuspendieron finalmente en 5 ml de Krebs-Ringer-Bicarbonato, transfiriéndolos a un vial de plástico donde se mantienen agitándose lentamente hasta el momento de ser incubados.

Se tomaron alícuotas de 500 μ l de la suspensión de los adipocitos que tras ser digeridos con NaOH 0'2N se utilizaron para determinar las proteínas según la técnica de Lowry (1950).

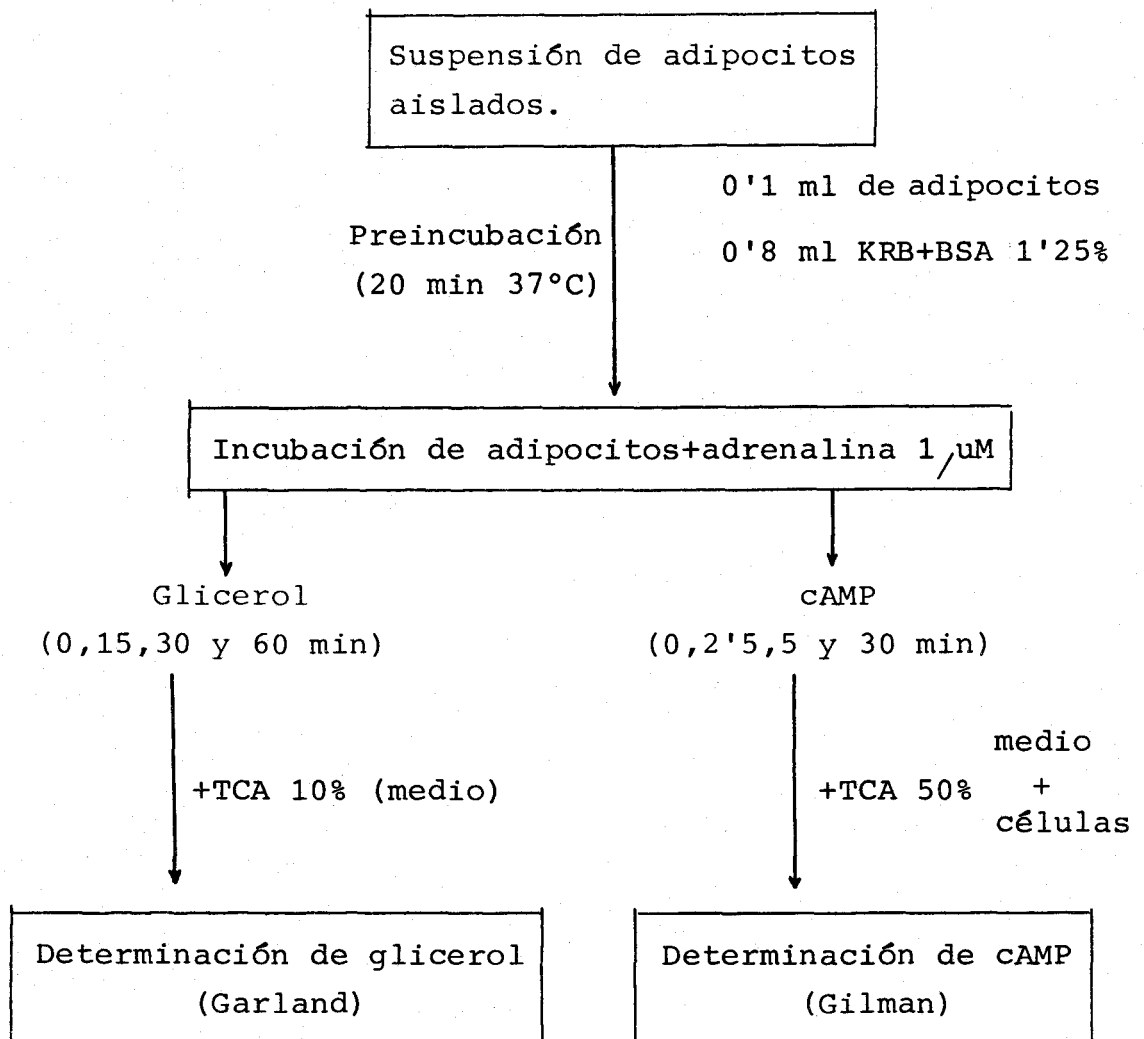
3.4. Incubación de adipocitos aislados.

0'1 ml de la suspensión de adipocitos aislados se preincubaron en un vial de plástico, conteniendo 0'8 ml de Krebs-Ringer-Bicarbonato y albúmina bovina purificada al 1'25%, durante 20 min en un baño a 37°C con agitación constante. Acabada la preincubación se les añadió a todos los viales 100 μ l de una solución de adrenalina preparada para obtener una concentración de adrenalina

1 μ M en el medio de incubación. Los tiempos de incubación en presencia de adrenalina fueron: 0, 5, 15, 30 y 60 min para los viales en los cuales determinamos el glicerol liberado al medio, mientras que en los que determinamos el cAMP los tiempos de incubación fueron: 0, 2'5, 5, 10 y 30 min. La reacción se detuvo añadiendo ácido tricloroacético al 10 % en los viales destinados a la determinación de glicerol y al 50 % en los viales que se determinó el cAMP procedente del medio más las células. Los viales conteniendo ácido tricloroacético se agitaron vigorosamente y se centrifugaron a 3000 r.p.m. para eliminar el precipitado formado por las proteínas. El ácido tricloroacético se eliminó de la solución por tratamiento con éter saturado con agua. Se lavaron tres veces con tres volúmenes de éter y el residuo de éter se eliminó por calentamiento a 60°C durante 15 min. Las muestras se guardaron a -20°C hasta el día de su determinación.

ESQUEMA DE OBTENCION DE ADIPOCITOS.

ESQUEMA DE LA INCUBACION DE ADIPOCITOS.

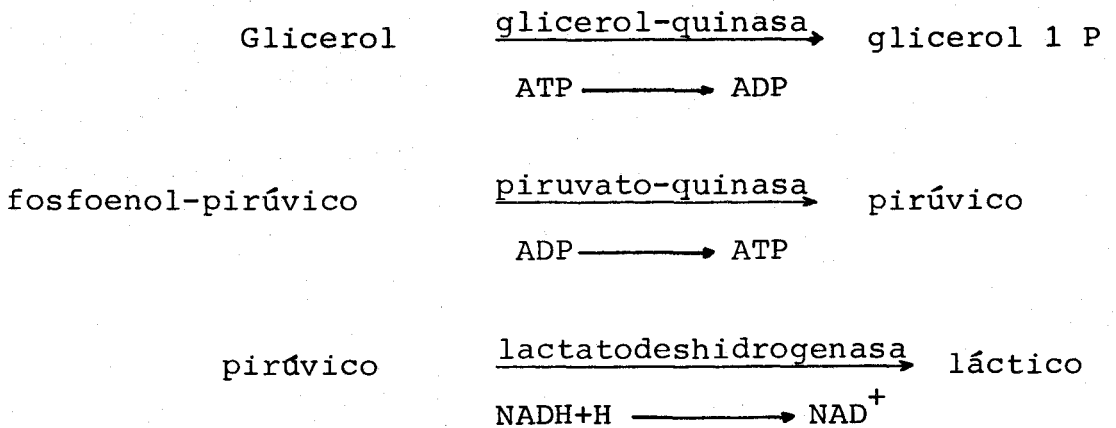


4. DETERMINACION DE GLICEROL.

Como medida de la actividad lipolítica de la adrenalina sobre los adipocitos, hemos determinado el glicerol liberado al medio de incubación siguiendo la técnica descrita por Garland y Randle en 1962.

4.1. Fundamento.

El método se basa en el acoplamiento de las tres reacciones enzimáticas siguientes:



Tenemos por tanto, que en el acoplamiento de estas tres reacciones 1 mol de NADH+H se oxidará a NAD^+ por cada mol de glicerol presente en el medio. El cálculo de la concentración del glicerol está en función del coeficiente de extinción del NADH+H que a 366 nm es de $3.3 \text{ cm}^2 / \mu\text{mol} \cdot 10^9$.

$$\mu\text{moles de glicerol} = \frac{\Delta E \cdot V}{d \cdot \epsilon}$$

Siendo V el volumen final en ml en cada cubeta, d, el paso de luz en cm, ϵ el coeficiente de extinción del NADH+H y ΔE la variación en la densidad óptica.

4.2. Reactivos.

- Buffer compuesto de: hidrocloreuro de trietanolamina 0'1 M a pH 7'6, sulfato magnésico 6 mM, cloruro potásico 2 mM y fosfoenolpirúvico 1 mM. Esta mezcla se preparó y guardó, en alícuotas de 10 ml, a -20°C hasta el día del ensayo.
- ATP 75 mM.
- NADH+H 3 mM.
- Piruvato kinasa 10 mg/ml.
- Lactato deshidrogenasa 5 mg/ml.
- Glicero kinasa 1 mg/ml.

4.3. Preparación de la curva standard.

Partimos de una solución de glicerol 2 M preparado en agua destilada desionizada y a partir de ella preparamos por diluciones los puntos de la curva standard.

0'1 ml (2 M) + 9'9 ml de H ₂ O	20 mM
0'1 ml (20M) + 9'9 ml de H ₂ O	200 / μ M
2 ml (200 / μ M) + 2 ml de H ₂ O	100 / μ M
2 ml (100 / μ M) + 2 ml de H ₂ O	50 / μ M
2 ml (50 / μ M) + 2 ml de H ₂ O	25 / μ M
1'6 ml (25 / μ M) + 2 ml de H ₂ O	10 / μ M
2 ml (10 / μ M) + 2 ml de H ₂ O	5 / μ M

Para la realización de la curva standard como representamos en la fig. (8), tomamos las concentraciones comprendidas entre 100 / μ M y 5 / μ M, rango que nos permitió calcular con bastante sensibilidad los niveles de glicerol, en el medio de incubación, tanto de adipocitos aislados como de tejido troceado en condiciones basales o sometidas a diferentes estímulos.

4.4. Técnica.

A 10 ml de buffer de hidrocioruro de trietanolamina conteniendo sulfato magnésico (6 mM), cloruro potásico (2 mM) y fosfoenolpirúvico (1 mM) se les añadió:

250 / μ l de ATP.

50 / μ l de piruvato quinasa.

50 / μ l de lactato-deshidrogenasa.

1'5 ml de NADH+H.

A 250 / μ l de cada una de las muestras a determinar, o de las distintas concentraciones para la realización de la

curva standard, se les añadió 250 μ l de la mezcla de reacción anterior. El ensayo se realizó siempre en frío. Después de agitar las cubetas por inversión se leyó la extinción E_1 en un espectrofotómetro Beckman (P-25) a 340 nm. A continuación se les añadió a todas las cubetas 5 μ l de una solución de glicero-quinasa diluida 1:1 con agua destilada y desionizada. Se agitaron las cubetas por inversión y se esperó 30 min, tiempo en el que comprobamos que la reacción enzimática se había estabilizado. Se volvió a medir la extinción de las muestras E_2 y la diferencia entre E_1 y E_2 nos dió el ΔE que nos sirve para el cálculo de la concentración de glicerol en nmoles/ml.

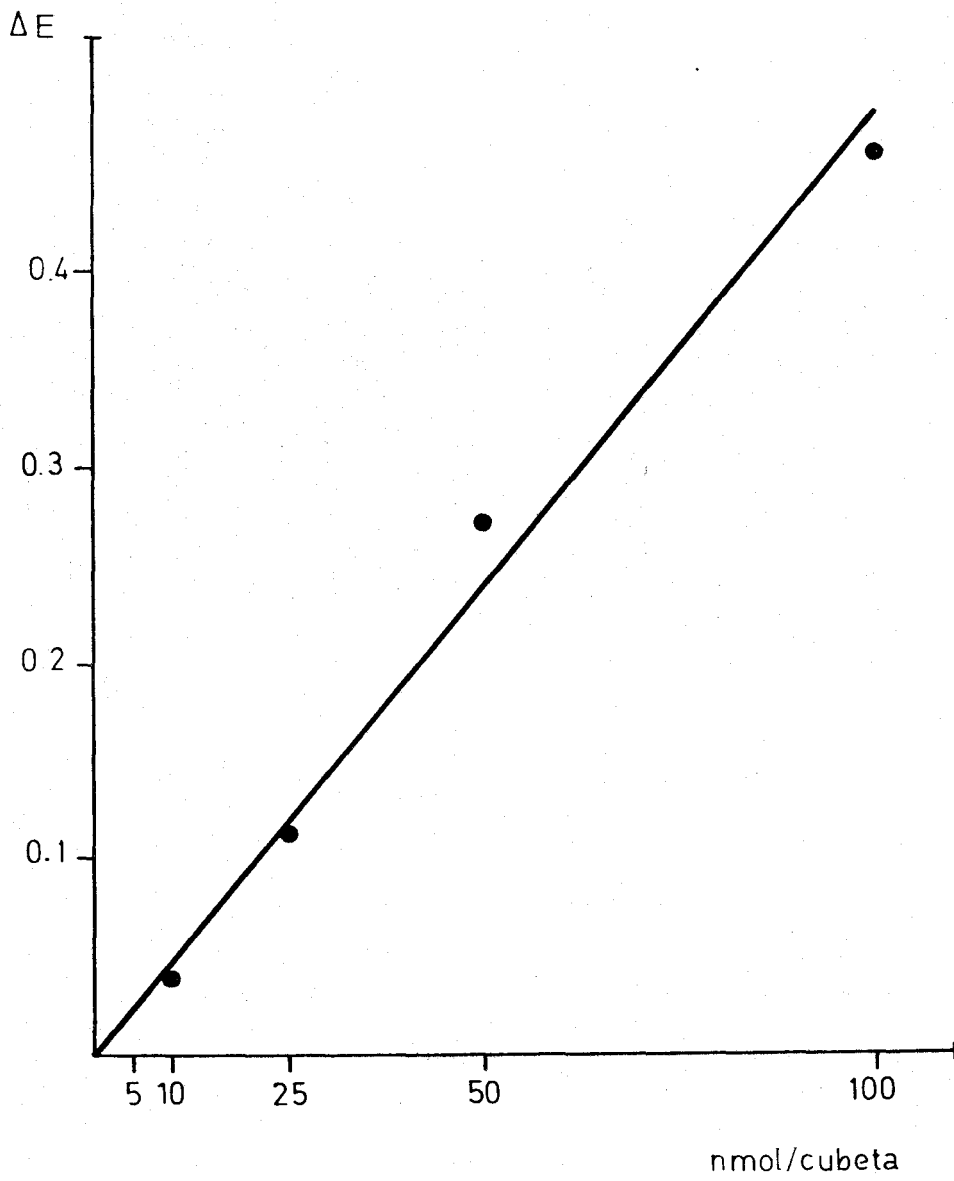


Fig.8. Curva standard de glicerol.

5. DETERMINACION CUANTITATIVA DEL cAMP POR PROTEINA ENLAZANTE.

La técnica que utilizamos se basa en los trabajos de Gilman (1970), con algunas modificaciones de Cooper (1972) para lograr una mayor sensibilidad. La separación del complejo proteína-quinasa -cAMP, se realizó utilizando carbón activo, siguiendo la técnica de Brown (1971).

Este método recibe el nombre de "proteína enlazante" por referencia a la proteína quinasa, dependiente de cAMP, o bien "radioanálisis a saturación" por las condiciones en que transcurre la reacción.

5.1. Fundamento del radioanálisis por "proteína enlazante".

Esta técnica fué descrita por primera vez por Gilman en 1970, aprovechando el descubrimiento de Walsh (1968), de unas proteínas musculares (trabajos posteriores las encontraron en casi todos los tejidos), aislables por los métodos clásicos de precipitación de proteínas y que para su actividad biológica necesitan la presencia de adenosín-monofosfato cíclico (fosforilasas-quinasas dependientes de cAMP) en el que mantienen una alta afinidad específica.

Así mismo el descubrimiento de una proteína estable al calor que inhibe la acción catalítica del enzima anterior

(Appleman, 1966) que se denomina "inhibidor de la proteína quinasa" y que aumenta (Walsh, 1971) la estabilidad del complejo "proteína-cAMP", vino a dar un nuevo ímpetu a este método.

Fundamentalmente la reacción consiste en una competición entre el cAMP, no radiactivo, y el cAMP (H^3) por enlazar la subunidad reguladora (R) de la proteína quinasa. Más propiamente habría que referirse a un efecto de dilución entre estas dos formas del nucleótido. A saber: la diferencia en la concentración de un cAMP no radiactivo y otro tritiado, que a volúmenes iguales especifica una variación en la masa de sustancia, y por tanto en el número de moléculas lo que implica una desigual probabilidad estadística de interaccionar con la proteína quinasa del medio de incubación y enlazarse a sus "locus" activos.

Es una reacción a "saturación", lo que quiere decir:

- a) La concentración de la proteína quinasa es inferior a la necesaria para enlazar el AMP-c total presente en la reacción: sus "locus" de unión están saturados.
- b) En el equilibrio permanece nucleótido libre (en ambas formas).

En el equilibrio coexisten todos los componentes.

- (AMP-c) = (A): concentración del nucleótido sin marcar.

Posee concentraciones variables en la curva patrón.

- (AMP-c- H^3) = (A*): concentración constante del nucleótido tritiado. A todos los tubos del radioensayo se les pone igual cantidad.

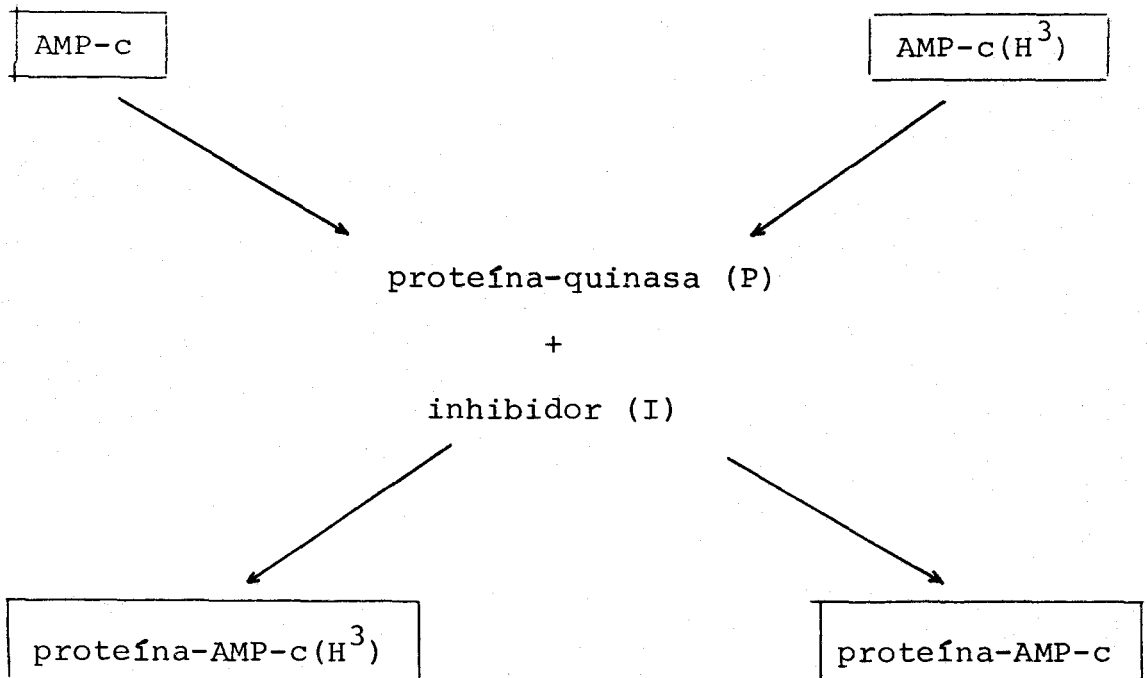
- (P): concentración constante de proteína quinasa.

- (I): concentración constante del inhibidor.

- (P-AMP-c) = (P-A): concentración del complejo no radiactivo.

- (P-AMP-c*) = (P-A*): concentración del complejo radiactivo.

En esquema la reacción sería:



5.2. Preparación del cAMP.

Las dos formas de adenosín-monofosfato cíclico que utilizamos, se prepararon según los procedimientos siguientes:

5.2.1. cAMP no radiactivo. Espectrofotometría.

Se parte de una preparación comercial monohidratada (3'-5' adenosín monofosfato cíclico H₂O. Boehringer). Se disolvió en una solución de fosfato potásico 5 mM pH 6'5 preparada con agua bidestilada y desionizada.

La concentración se calculó por espectrofotometría de acuerdo con el valor del coeficiente de extinción

$$\epsilon = 14'650 \text{ a pH } 6'5 \text{ y } 259 \text{ nm.}$$

Se pesó cuidadosamente 0'00939 g de cAMP que se disolvieron en 500 ml de fosfato potásico 50 mM pH 6'5, determinándose, por triplicado, la absorbancia, de una misma muestra (A).

Al existir una relación directa entre la concentración y la absorbancia, la nueva concentración se calculó de acuerdo con la expresión:

$$\frac{1 \text{ mM}}{14'650} = \frac{e}{A}$$

Obtenemos una solución concentrada que denominamos "solución P" de la que se preparan por diluciones

sucesivas con fosfato potásico 50 mM pH 6'5, las diferentes concentraciones patrón de cAMP para la curva standard.

5.2.2. cAMP radiactivo.

Comercialmente se suministra como (8-H³)-3'-5'-adenosín monofosfato cíclico (sal amónica) en solución de alcohol etílico (50:50). Para evitar la posible interferencia del etanol sobre las proteínas, se evaporó a sequedad en atmósfera de N₂.

Queremos obtener una concentración final de 0'1 pm/1,ul.

$$\text{Actividad específica: } \frac{38 \text{ Ci}}{\text{mmol}} = \frac{38 \text{ } \mu\text{Ci}}{\text{nmol}}$$

Como hay 250,ulCi/vial y cada 38,ulCi están en 1 nmol, tendremos un total de 6'578947 nmoles por vial (6578'9 pmoles/vial).

Al extracto seco de un vial, se le añadió 65'79 ml de tampón fosfato potásico 50 mM pH 6'5, para obtener una concentración final aproximada de 0'1 pmol/,ul. Se hicieron alícuotas de 0'5 ml y se congelaron a -20°C hasta su utilización.

5.3. Obtención y purificación de la proteína quinasa.

Este enzima necesita para su activación la presencia de cAMP. Su identificación puede realizarse a partir de dos métodos:

- a) Su capacidad para catalizar la fosforilización de una proteína (sustrato) con ATP radiactivo.
- b) Su capacidad para unirse al cAMP.

En nuestro trabajo hemos obtenido la proteína-quinasa de músculo de conejo para realizar la totalidad de las determinaciones cuantitativas de cAMP.

En la pg.(92) esquematizamos su obtención.

5.3.1. Preparación del extracto de músculo.

Se tomó un conejo de 2 kg, después de desangrarle se le extrajeron los músculos de las extremidades y del dorso. Se trocearon y trituraron en un homogenizador comercial en 2'5 volúmenes de solución EDTA 4 mM a pH 7, a intervalos cortos de tiempo, para evitar el calentamiento de la mezcla y recubriendo el vaso homogenizador con hielo. Todas las operaciones se realizaron a 4°C en cámara fría.

El homogenado se centrifugó a 10.000xg durante 30 min a 2°C, recogándose el sobrenadante.

5.3.2. Precipitación ácida.

La solución sobrenadante anterior se llevó a pH 6'1 por adición de unas gotas de ácido acético 1 N. Se formó lentamente un precipitado (que contiene los enzimas fosforilasa b y la glucógeno sintetasa) el cual se separó por centrifugación a 10.000rpm durante 30 min. Se recogió la solución sobrenadante y se llevó a pH 5'5 por adición de ácido acético 1N. Se centrifugó a 10.000 r.p.m. durante 30 min, desechando el precipitado.

5.3.3. Precipitación con sulfato amónico.

La solución sobrenadante se ajustó a pH 6'8 por adición cuidadosa de una solución tampón de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}/\text{PO}_4\text{HK}_2$ 1 N pH 7'2 fría. Se añadió sulfato amónico (32'5/100 ml de solución proteica). Se agitó durante 2 h y al cabo de este tiempo se centrifugó durante 60 min a 10.000 r.p.m. y se recogió el precipitado desechando el sobrenadante. El precipitado se redisolvió en unos 50 ml de solución tampón Tris-ClH 5 mM pH 7'5 y se dializó durante 48 h en 20 volúmenes de igual solución tampón, en membrana de celofán, con tres cambios de solución tampón.

La solución proteica se centrifugó a 40.000 r.p.m. durante 1 h y el precipitado se desechó recogiendo el sobrenadante que se sometió a cromatografía.

5.3.4. Purificación cromatográfica en DEAE-II.

A. Preparación de la resina.

La DEAE-celulosa (dietilaminoetil celulosa) es una resina aniónica débil. Contiene el grupo amino ($\text{Et}_2\text{-NH}^+\text{-CH}_2\text{-C}_2\text{H}_5\text{O-celulosa}$) cargado positivamente a pH 7. Antes de su uso la resina se sometió a los siguientes tratamientos, según la técnica de Devenyi y col (1974).

- a) 54 g de celulosa se agitaron durante 15 min con 5 volúmenes de NaOH 0'5 N a temperatura ambiente. Se dejaron sedimentar sacando las partículas coloidales del sobrenadante alcalino.
- b) Se lavó la resina varias veces con agua bidestilada hasta que el pH descendía a la neutralidad. Estas dos fases constituyen el pretratamiento.
- c) La resina DEAE-celulosa se resuspendió en tres volúmenes de solución tampón Tris-ClH 5 mM a pH 7'5 EDTA 2 mM. Se agitó durante 15 min a temperatura ambiente y se decantó el sobrenadante para eliminar las partículas finas. Esta operación se realizó dos veces y la resina queda así preparada para el llenado de la columna.

B. Columna cromatográfica.

Para que el empaquetamiento de las partículas sea lo más homogéneo posible, se llenó la columna (30x3'9 c.c.) hasta la mitad de su altura con solución tampón Tris-ClH 5 mM pH 7'5 EDTA 2 mM. Sobre ella se añadió lentamente la suspensión de DEAE-celulosa tratada. Una vez formado el lecho cromatográfico hasta la altura deseada, se vació la columna de eluyente hasta la superficie de la resina y se añadió unos ml de una solución de albúmina bovina al 20 %, con el fin de saturar el vidrio de la columna e impedir la adhesión al mismo de la proteína quinasa.

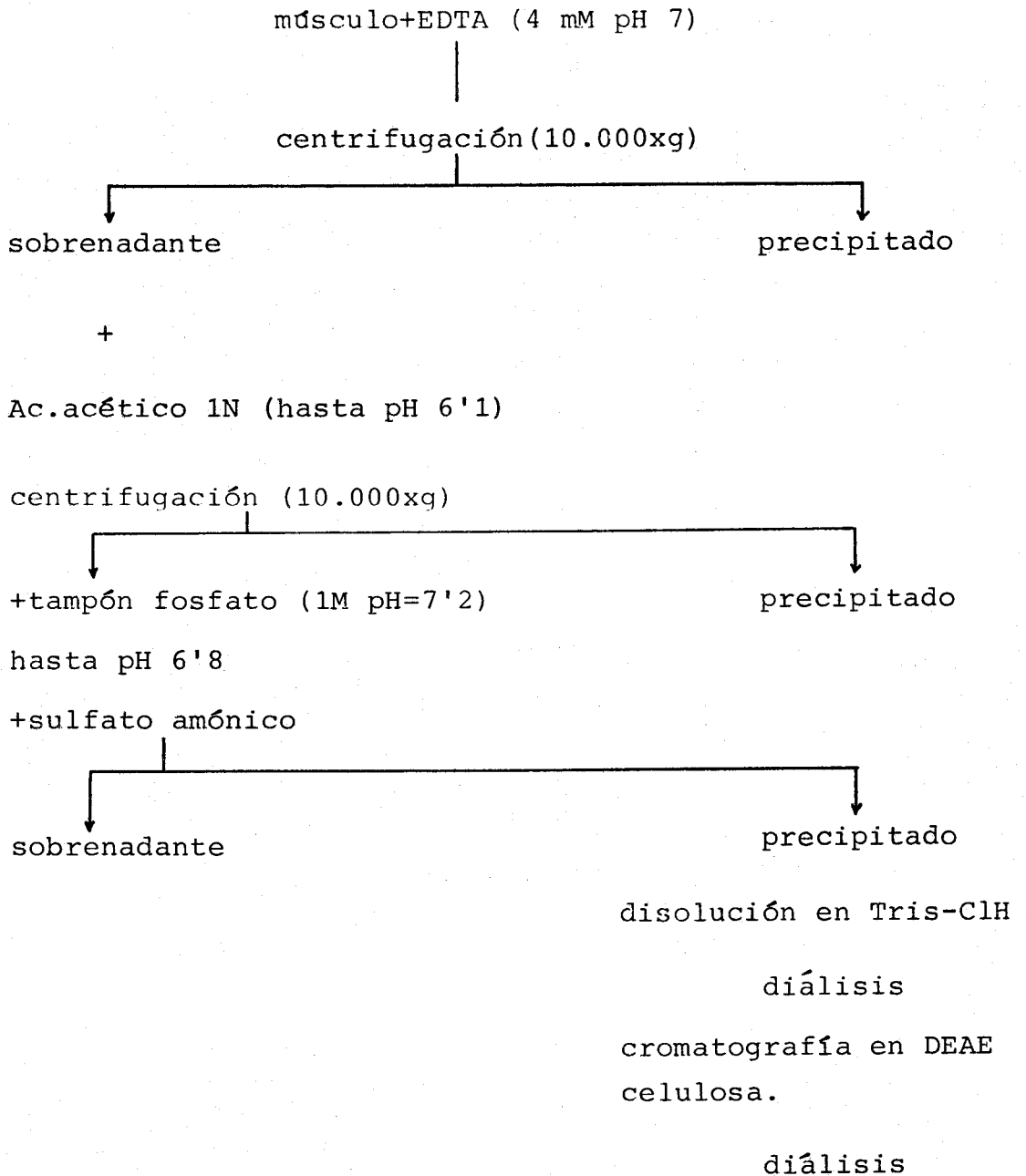
El flujo se reguló a 0'5 ml/min. El llenado empaquetado de la columna debe realizarse lentamente, evitando la formación de burbujas de aire y discos de separación que rompan la homogeneidad interior de la resina.

Una vez preparada la columna, se añadió lentamente la solución proteica, con cuidado de no remover la resina. Se dejó fluir lentamente, recogiendo fracciones de 15ml con la ayuda de un colector de fracciones, con una velocidad de flujo de 0'5 ml/h. Se recogieron de 115 a 120 fracciones.

La columna cromatográfica estaba conectada a un doble sistema para producir un gradiente de concentración de la solución tampón Tris-ClH pH 7'5 desde 5 mM a 500 mM.

Este doble sistema se compone de dos matraces conectados: el primero con una concentración 5 mM y el segundo que fluye hacia el primero con una concentración doble de la máxima buscada (1 M) y ambos con igual volumen. El primer matraz, en conexión con la columna aumenta su concentración de forma gradual hasta una concentración final de 500 mM. Este sistema, productor de un gradiente de concentración, se hizo funcionar hacia la fracción n° 20.

PURIFICACION DE LA PROTEINA QUINASA DEPENDIENTE DEL CAMP.



5.3.5. Determinación de la capacidad enlazante de los eluidos.

La capacidad de unión para el cAMP de las fracciones recogidas en la cromatografía se realizó incubando durante 90 min a 0°C los siguientes componentes:

- 50 μ l de solución tampón fosfato potásico:
($\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}/\text{PO}_4\text{K}_2$) 200 mM pH 6'5 + teofilina (8 mM) +
+ mercaptoetanol (6 mM) + albúmina bovina 2 %.
- 10 μ l (1 nmol) de cAMP (H^3), preparado según hemos descrito anteriormente.
- 100 μ l de las alícuotas de cada fracción cromatografía.

Se agitaron brevemente en un mixer magnético y se incubaron a 2°C hasta alcanzar el equilibrio.

En aquellas fracciones donde hay proteína quinasa, se formó un complejo con el cAMP (H^3), el cAMP radiactivo no unido se separó utilizando carbón activado.

El perfil cromatográfico obtenido se muestra en la fig.n° (9). Se pueden ver en él la aparición de dos zonas de actividad enlazante que denominamos zona DEAE-I y zona DEAE-II. Se reunieron todos los tubos con mayor actividad enlazante, haciendo dos depósitos separados de proteínas DEAE-I y DEAE-II que se fraccionaron a -20°C hasta su utilización.

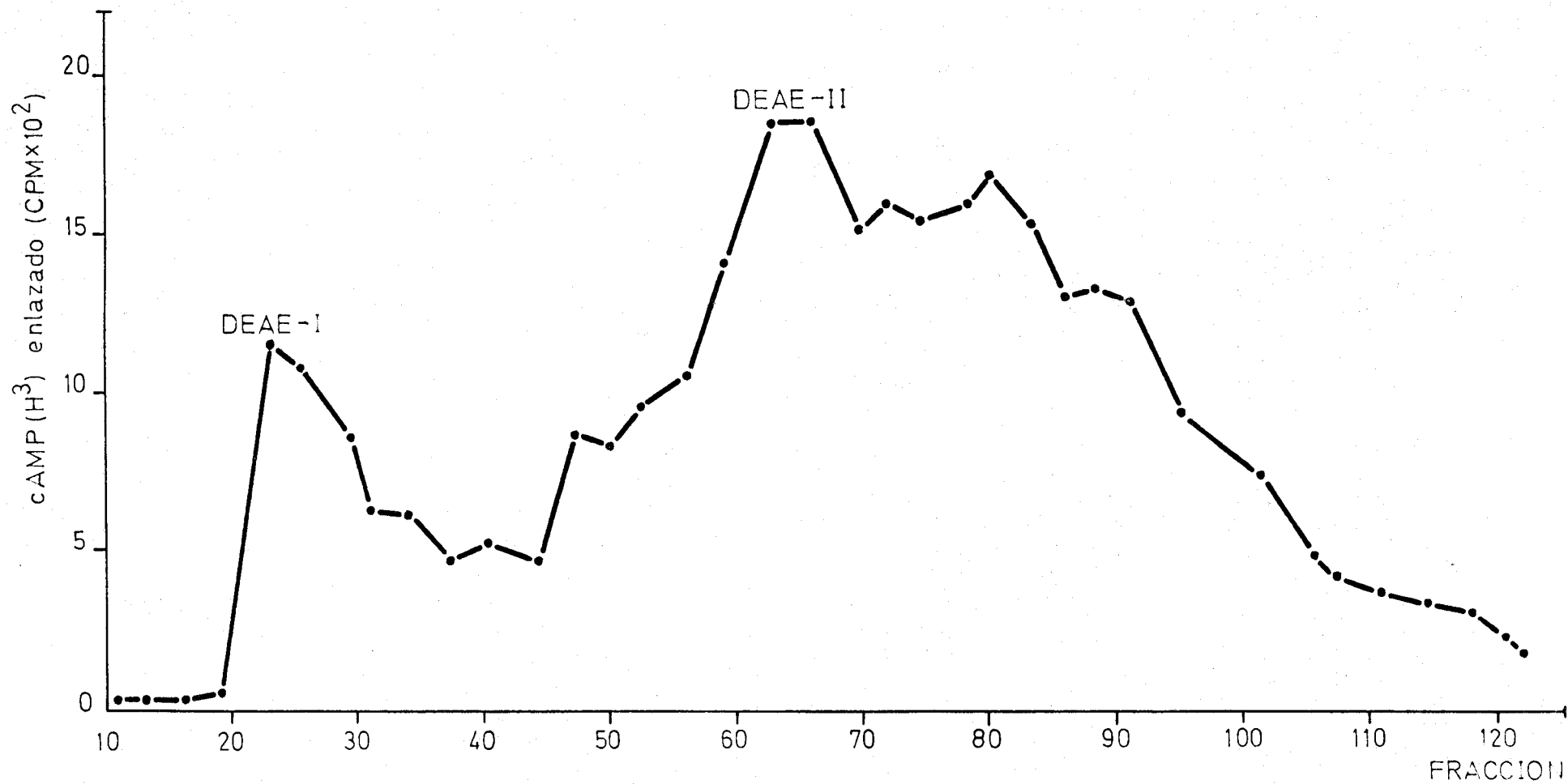


Fig.9. Cromatografía en DEAE de la proteína quinasa.

5.4. Aislamiento de la proteína inhibidora de la proteína quinasa.

La preparación del inhibidor se realizó según la técnica descrita por Appleman y col en 1966, con algunas modificaciones de Gilman (1970). Su obtención está muy favorecida por ser un compuesto estable al calor. El esquema general de su obtención lo representamos en la pag. (97).

La obtención del extracto de músculo de conejo y su posterior precipitación en medio ácido hasta conseguir una solución con un pH entre 5'9-6'1, se realizaron en iguales condiciones que para la obtención de la proteína quinasa.

Partimos de la solución del sobrenadante ácido (6'1) y se realizaron los procesos siguientes:

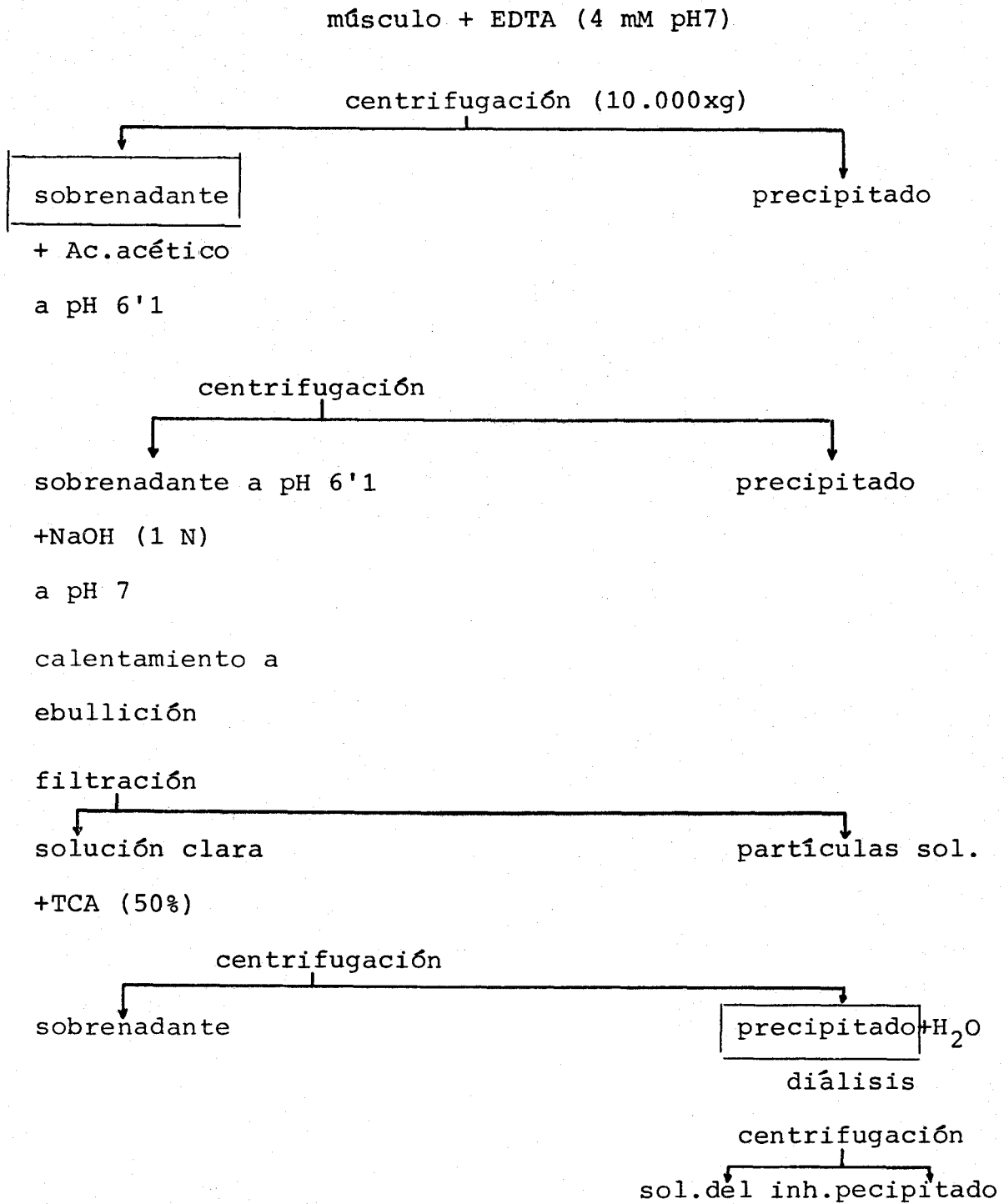
- 1°.- Se añadió al sobrenadante lentamente y con agitación NaOH (1 N) hasta llevar el pH a la neutralidad.
- 2°.- La solución neutra a pH 7 se calentó hasta ebullición durante 20 min con agitación vigorosa. La suspensión obtenida se enfrió en baño de hielo a 10°C y se filtró a través de papel de filtro.
- 3°.- Al líquido filtrado se añadió una solución de ácido tricloroacético (50%). Se obtenía un precipitado blanco que se separaba por centrifugación a 10.000rpm durante 30 min.

4°.- El precipitado se disolvió en agua, ajustando el pH 7 con NaOH 0'1 N.

5°.- La solución obtenida se dializó en celofán frente a agua bidestilada durante 48 h con cuatro cambios de agua. Aparece un precipitado que se eliminó por centrifugación a 40.000 r.p.m. durante 1 h.

La solución clara obtenida se utilizó como proteína inhibidora en las determinaciones de cAMP. Se dividió en alícuotas de 500 μ l que se guardaron a -20°C hasta su utilización.

PURIFICACION DE UNA PROTEINA INHIBIDORA DE LA PROTEINA
QUINASA.



5.5. Técnica del radioensayo por "proteína enlazante".

Los compuestos de la reacción son los siguientes:

- 1) Tampón fosfato ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}/\text{PO}_4\text{HK}_2$) 0'2 M pH 6'5 más:
 - a) Teofilina (8 mM). Para inhibir a la posible fosfodiesterasa del cAMP, que pudiera encontrarse en la preparación de la proteína, o en las muestras.
 - b) Mercaptoetanol (6 mM). Actúa como reductor de los enlaces S-S de la proteína quinasa.
 - c) EDTA (5 mM). Como quelante del Mg^{2+} .
 - d) Albúmina sérica bovina (2%).
- 2) Proteína-quinasa dependiente de cAMP aislada de músculo de conejo.
- 3) Proteína inhibidora de la proteína quinasa aislada de músculo de conejo.
- 4) Adenosín-monofosfato cíclico no radiactivo o cAMP patrón y cAMP radiactivo.

-cAMP patrón.

A partir de la solución concentrada preparada por espectrofotometría (5.2.1) y por sucesivas diluciones con el medio de incubación conseguimos las distintas concentraciones de cAMP, para la realización de la curva standard:

Sol. 1:	800 pmol/ml	16 pmoles/20 μ l
Sol. 2:	400 pmol/ml	8 pmoles/20 μ l
Sol. 3:	200 pmol/ml	4 pmoles/20 μ l
Sol. 4:	100 pmol/ml	2 pmoles/20 μ l
Sol. 5:	50 pmol/ml	0'5 pmoles/20 μ l
Sol. 6:	25 pmol/ml	0'250 pmoles/20 μ l
Sol. 7:	12'5 pmol/ml	0'125 pmoles/20 μ l

5.5.1. Procedimiento.

A. Preincubación:

En tubos de vidrio, en agua hielo (0-4°C) se pipetea las siguientes soluciones:

- 50 μ l de solución tampón.
- 20 μ l de las soluciones de cAMP patrón, o de las muestras a determinar.
- 20 μ l de la solución de proteína quinasa a la dilución apropiada.
- 10 μ l de la solución de la proteína inhibidora.

Se agitó brevemente en agitador. Se dejó reaccionar durante 60 min a 0-4°C. En estos tubos la única variante la constituye la concentración de cAMP. Se utilizaron dos tubos control a los que denominamos:

"cero": con iguales componentes pero sin cAMP.

"blanco": únicamente con solución tampón.

Durante esta fase de preincubación se pone en contacto con el tampón apropiado, a la proteína quinasa, el inhibidor y el cAMP no radiactivo. La razón de no añadir enseguida el cAMP radiactivo es la siguiente: la concentración del nucleótido no radiactivo en los puntos primeros de la curva standard, y, en algunas muestras es inferior a la de cAMP radiactivo. De esta manera se permite que el cAMP no radiactivo, ocupe sin ninguna competición todos los "locus" activos de la proteína quinasa.

B. Incubación.

A continuación se añadió a cada tubo, incluidos el cero y el blanco, 10 μ l de cAMP (H^3) (1 pmol/tubo). Se incubó en baño agua-hielo durante 90 min. En la fig.nº (10) representamos una curva standard de cAMP obtenida en nuestras experiencias.

5.5.2. Separación del complejo cAMP-proteína.

Transcurrido el tiempo de incubación se añadió a cada tubo 100 μ l de una suspensión fría, de carbón (2'6%), activado con albúmina sérica bovina al 2%.

Se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 15 min del sobrenadante se tomaron alícuotas de 100 μ l que se disolvieron en 10 ml de líquido de centelleo (PCS) midiéndose su radiactividad en un contador de centelleo líquido.

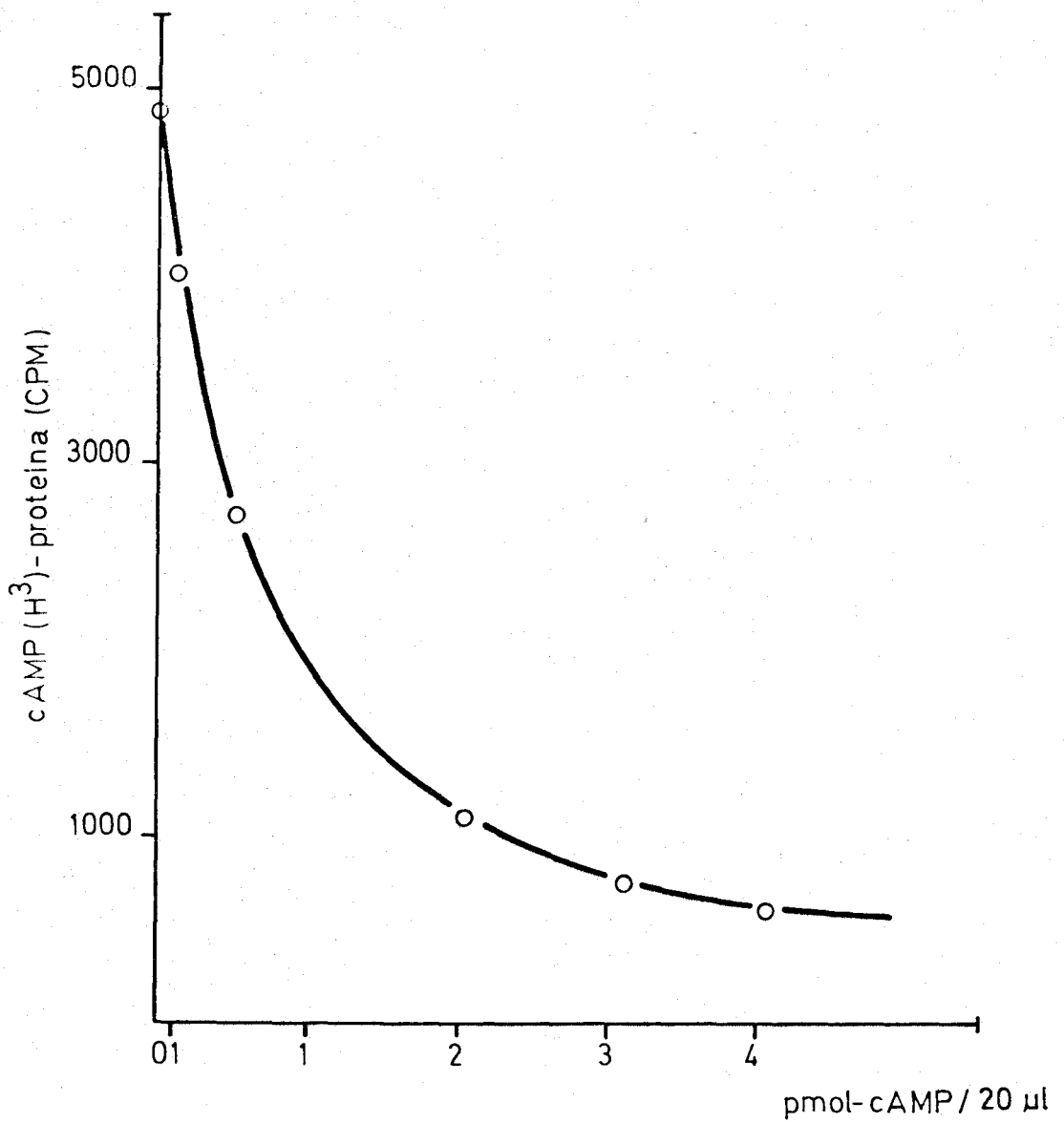


Fig.10. Curva standard de cAMP.

La suspensión de carbón activado con albúmina se preparó 15 a 20 min antes de su utilización. Las partículas de carbón tienen una estructura interna recorrida por infinidad de canales microscópicos, donde pueden penetrar y adsorberse numerosas sustancias. Si se saturan esos canalillos carbonados con sustancias de determinado Pm, seleccionamos e impedimos la adsorción del carbón para otras con Pm superiores. A este proceso de saturación del carbón con albúmina o dextrano (sustancias más usadas), se le llama activación. Las moléculas pequeñas como el cAMP son adsorbidas por el carbón, pero los complejos macromoleculares, como la proteína quinasa ligada al cAMP, permanecen en solución. Se obtiene así una buena separación entre las formas libre y ligada del cAMP.

6. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA PROTEINA QUINASA
DEPENDIENTE DE cAMP EN EL TEJIDO ADIPOSO.

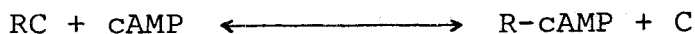
6.1. Fundamento.

La mayoría de los tejidos contienen proteína quinasa que son estimuladas por el cAMP y catalizan la transferencia de un grupo fosfato del ATP a diversas proteínas. La incorporación de fosfato a la proteína puede ser registrada por la transferencia de P^{32} desde (γ - P^{32}) ATP en presencia de magnesio. La proteína fosforilada es separada, de su presursor radiactivo, por adsorción en filtros Whatman (2'5 cm GF/C).

Los sustratos de la proteína quinasa pueden ser: fosforilasa quinasa del músculo, glucógeno sintetasa, protamina, caseína e histonas. Una mezcla de hitonas resulta ser el sustrato ideal por varias razones:

- I. Se obtiene de fuentes comerciales.
- II. Tiene muy poca contaminación de proteína quinasa.
- III. Incorpora una cantidad apropiada de fosfato.
- IV. Es estable.
- V. Su fosforilación es estimulada por el cAMP en gran proporción.

El mecanismo de activación de la proteína quinasa fué propuesto por Bronstrom en 1971.



El enlace del cAMP a la proteína quinasa inactiva (RC) produce la disociación del enzima en la subunidad reguladora (R), para formar el complejo R-cAMP, y la subunidad catalítica activa (C). La subunidad catalítica activa (C), cataliza la fosforilación de la histona según la reacción siguiente:



6.2. Reactivos.

6.2.1. ATP-P³².

Se suministra comercialmente como 5'-($\gamma\text{-P}^{32}$)-adenosín trifosfato (sal amónica) en etanol acuoso, con una actividad específica de 18'2 Ci/nmol (Amersham). Se utilizó como trazador del siguiente modo:

Se preparó una solución de ATP frío 2 mM en acetato magnésico 20 mM. Se hizo una dilución 1/10 del trazador en la solución anterior. Quedó así una solución de ATP-P³² 2 mM conteniendo 0'1 mCi/ml que se guardó congelado a -20°C hasta su uso.

6.2.2. Mezcla de reacción.

Se preparó un buffer fosfato potásico 25 mM pH 6'8 conteniendo:

- Acetato magnésico 10 mM.
- Teofilina 12 mM. Para inhibir la posible fosfodiesterasa del cAMP.
- Histona (tipo II-A, Sigma Chemical Company) 10 mg/ml.
- Mercaptoetanol 12 mM. Actúa como reductor de los enlaces S-S de la proteína-quinasa.

Esta solución se separó en dos partes iguales; una que denominamos mezcla de reacción (-cAMP) y otra a la que se le añadió adenosín-monofosfato cíclico (Boehringer) hasta conseguir una concentración de 6 μ M y que denominamos mezcla de reacción (+cAMP).

6.2.3. Buffer de homogenización.

Para la homogenización del tejido graso se utilizó un buffer fosfato potásico 25 mM, pH 6'5, al que se le adicionó:

- Teofilina 8 mM.
- EDTA 10 mM. Como quelante de Ca^{2+} .
- ClNa 0'5 M para estabilizar la reacción de disociación de las subunidades de la proteína-quinasa.

6.3. Incubación de tejido graso y preparación de extractos.

Se utilizaron ratas wistar albino macho de pesos comprendidos entre 180-200 g. Se anestesiaron con pentobarbital sódico inyectado intraperitonealmente. Se les practicó una laparatomía a lo largo de la línea alba, disecándose rápidamente los epidídimos que se colocaron en salino. Una vez pesados, se dividieron en trozos de aproximadamente 5 mg que se repartieron en viales de plástico conteniendo 5 ml de una solución de Krebs-Ringer-fosfato, pH 7'4 y 1 mg/ml de albúmina bovina purificada. La proporción de grasa epidídimal fué siempre de 200 mg por ml de buffer.

Los viales se preincubaron durante 15 min en baño a 37°C y con agitación constante. Transcurrido este tiempo, los trozos de tejido fueron transferidos a otros viales conteniendo buffer, recientemente preparado, más el estímulo a estudiar en cada caso y se incubaron durante otros 10 min. Acabada la incubación, se tomaron alícuotas de 1 ml para determinar el glicerol liberado al medio de incubación por acción de las hormonas estudiadas. Los trozos de tejido se extrajeron del buffer de incubación, se secaron levemente en papel Whatman n°1 y se homogenizaron con 1 ml/g de tejido de buffer de homogenización a 4°C. La solución obtenida se centrifugó durante 10 min a 10.000 r.p.m. y 4°C. Del infranadante

obtenido se tomaron alícuotas para la determinación de la actividad de la proteína-quinasa (Walsh y Krebs, 1971), la determinación de los niveles de cAMP (Gilman, 1970) y la determinación de las proteínas (Lowry, 1950).

6.4. Técnica para la determinación de la actividad de la proteína-quinasa en extractos de tejido adiposo.

Los componentes de la reacción son:

- MR(+ cAMP): buffer fosfato potásico 25 mM, pH 6'8, sulfato magnésico 10 mM. teofilina 12 mM mercaptoetanol 12 mM, histona 10 mg/ml y cAMP 6 μ M.
- MR(-cAMP): Igual que el anterior pero sin cAMP.
- FNa 40 mM: Como inhibidor de las posibles ATP-asas presentes en el extracto.
- γ -P³²-ATP 2 mM y aproximadamente 100 c.p.m./pmol.
- Extracto conteniendo la enzima proteína-quinasa.

Se pipetea los componentes de la reacción, según el siguiente esquema:

	+cAMP	-cAMP	blanco	A.T.
MR (+cAMP)	50 μ l	-	-	-
MR (-cAMP)	-	50 μ l	65 μ l	65 μ l
FNa	5 μ l	5 μ l	-	-
γ -P ³² ATP	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l
Enzima	10 μ l	10 μ l	-	-

La reacción se inició al añadir la enzima y tiene lugar durante 10 min en baño a 30°C. Al finalizar se toman alícuotas de 50 μ l de cada tubo y se pipetea en filtros Whatman (2'5 cm 6 F/C) que se sumergen en ácido tricloroacético al 10 %. Los filtros se lavan tres veces, durante 15 min, agitándose mediante agitador rotativo ATOM-85, con ácido tricloroacético pasándose luego a un baño con etanol absoluto durante 5 min y finalmente en éter saturado con agua durante otros 5 min. Se elimina el éter a temperatura ambiente o en estufa a 40°C.

Los filtros secos se introducen en viales, se les añade 10 ml de líquido de centelleo y se cuenta en un contador beta.

4º RESULTADOS.

Los resultados correspondientes a la experiencias realizadas se describen en las páginas siguientes, clasificados sistemáticamente en apartados. Cada uno de ellos comprenden una breve descripción comentada junto con las correspondientes tablas (valores medios y desviaciones standard) y figuras. El desarrollo es el siguiente:

1. Acción de la adrenalina sobre los niveles de cAMP y la lipólisis en adipocitos aislados de ratas alimentadas y durante el ayuno.
2. Estudio de la radiactividad específica, de la concentración de ATP y del tiempo de incubación óptimo para la determinación de la actividad de la proteína quinasa de tejido adiposo.
3. Modificaciones inducidas por el ayuno en los niveles de cAMP y en la actividad de la proteína quinasa en homogenados de tejido adiposo.
4. Determinación de la K_a de la proteína quinasa para el ATP, en tejido graso de animales alimentados y durante el ayuno.

5. Estudio de la actividad de la proteína quinasa y la lipólisis de tejido graso de animales alimentados con diferentes concentraciones de adrenalina.
6. Estudio del tiempo óptimo de incubación del tejido adiposo en presencia de adrenalina.
7. Acción de la adrenalina sobre los niveles de cAMP, la actividad de la proteína quinasa y la lipólisis en el tejido adiposo en el grupo control y durante el ayuno.
8. Acción de la glucosa sobre los niveles de cAMP, la actividad de la proteína quinasa y la lipólisis en el tejido adiposo de animales alimentados y durante el ayuno.
9. Acción de la adrenalina sobre los niveles de cAMP, la actividad de la proteína quinasa y la lipólisis en tejido graso incubado en presencia de glucosa, en animales alimentados y durante el ayuno.
10. Acción de la iodoacetamida y la oligomicina sobre los niveles de cAMP, la actividad de la proteína quinasa y la lipólisis de tejido graso incubado en presencia de glucosa y adrenalina en animales alimentados.

11. Acción de la oligomicina y la iodoacetamida sobre los niveles de cAMP, la actividad de la proteína quinasa y la lipólisis de tejido graso de animales sometidos a 48 h de ayuno incubado en presencia de glucosa y adrenalina.

1. ACCION DE LA ADRENALINA SOBRE LOS NIVELES DE cAMP Y
SOBRE LA LIPOLISIS EN ADIPOCITOS AISLADOS DE RATAS
ALIMENTADAS Y DURANTE EL AYUNO.

Adipocitos aislados de ratas alimentadas o sometidas a ayuno durante 48 ó 96 h se incubaron a diferentes tiempos en presencia de adrenalina $1 \mu\text{M}$. En el medio de incubación y en células adiposas se determinaron los niveles de cAMP. El grado de lipólisis de los adipocitos aislados se determinó midiendo el glicerol liberado al medio en condiciones basales y en presencia de adrenalina $1 \mu\text{M}$ a diferentes tiempos de incubación.

En la tabla (1) y figura (11) se representan los niveles de cAMP (fmol/mg proteína) producidos por los adipocitos de ratas alimentadas y durante el ayuno a distintos tiempos de incubación, en presencia de adrenalina.

En los animales alimentados, los niveles máximos de cAMP se alcanzaron entre los 2'5 y los 5 min de incubación, observándose una disminución significativa a los 10 min, que se mantiene a los 30 min de incubación. Existe una disminución en los niveles de cAMP a los 5 min de incubación en el grupo de animales sometidos a 48 y 96 h de ayuno, con respecto a los controles.

Se observa también una disminución en las ayunadas de 96 h frente a las sometidas a 48 h de ayuno. En el grupo de animales sometidos a 48 h de ayuno, los niveles máximos de estimulación se observaron a los 10 min de incubación.

En la figura (12) se observa un retraso en la aparición de los niveles máximos de cAMP con respecto al grupo de animales alimentados.

En la tabla (2) y figura (13) se representan los niveles de glicerol ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ proteína) liberados al medio en presencia de adrenalina $1 \mu\text{M}$, en los animales alimentados y durante el ayuno, a distintos tiempos de incubación. Se observa que a los 30 y 60 min hay una disminución significativa en los niveles de cAMP en los adipocitos de ratas ayunadas 48 h ($p < 0.0025$ en ambos casos) con respecto a los alimentados. A los 60 min hay diferencias en la liberación de glicerol en las ratas ayunadas 48 y 96 h, frente a las ayunadas 24 h. No se observaron diferencias significativas en los valores basales, a los 2'5 y 30 min en ninguno de los tres grupos estudiados.

En la figura (14) se representa la disminución porcentual de los niveles de glicerol liberados al medio después de 60 min de incubación con adrenalina durante el ayuno y frente a los alimentados. Se observa que la actividad lipolítica de la adrenalina $1 \mu\text{M}$ en los adipocitos de rata, disminuye secuencialmente con el ayuno.

TABLA N° 1

Efecto de la adrenalina ($1 \mu\text{M}$) sobre la producción de cAMP en adipocitos aislados de ratas alimentadas y sometidas a 48 y 96 h de ayuno. Todas las incubaciones se realizaron en presencia de teofilina (1mM). Los resultados se expresan en fmol/mg prot.

<u>Tiempo (min)</u>	<u>alimentadas</u>	<u>48 h ayuno</u>	<u>96 h ayuno</u>
0	0'13 \pm 0'01 n=4	0'39 \pm 0'03 n=6	0'26 \pm 0'01 n=6
2'5	7'84 \pm 1'15 n=5	6'92 \pm 0'30 n=5	5'61 \pm 0'27 n=6
5	9'43 \pm 0'72 n=5	7'04 \pm 0'64 n=5	5'62 \pm 0'22 n=6
10	7'51 \pm 0'59 n=5	9'27 \pm 0'49 n=5	7'26 \pm 0'87 n=6
30	6'24 \pm 1'40 n=5	7'26 \pm 0'35 n=5	5'59 \pm 0'80 n=6

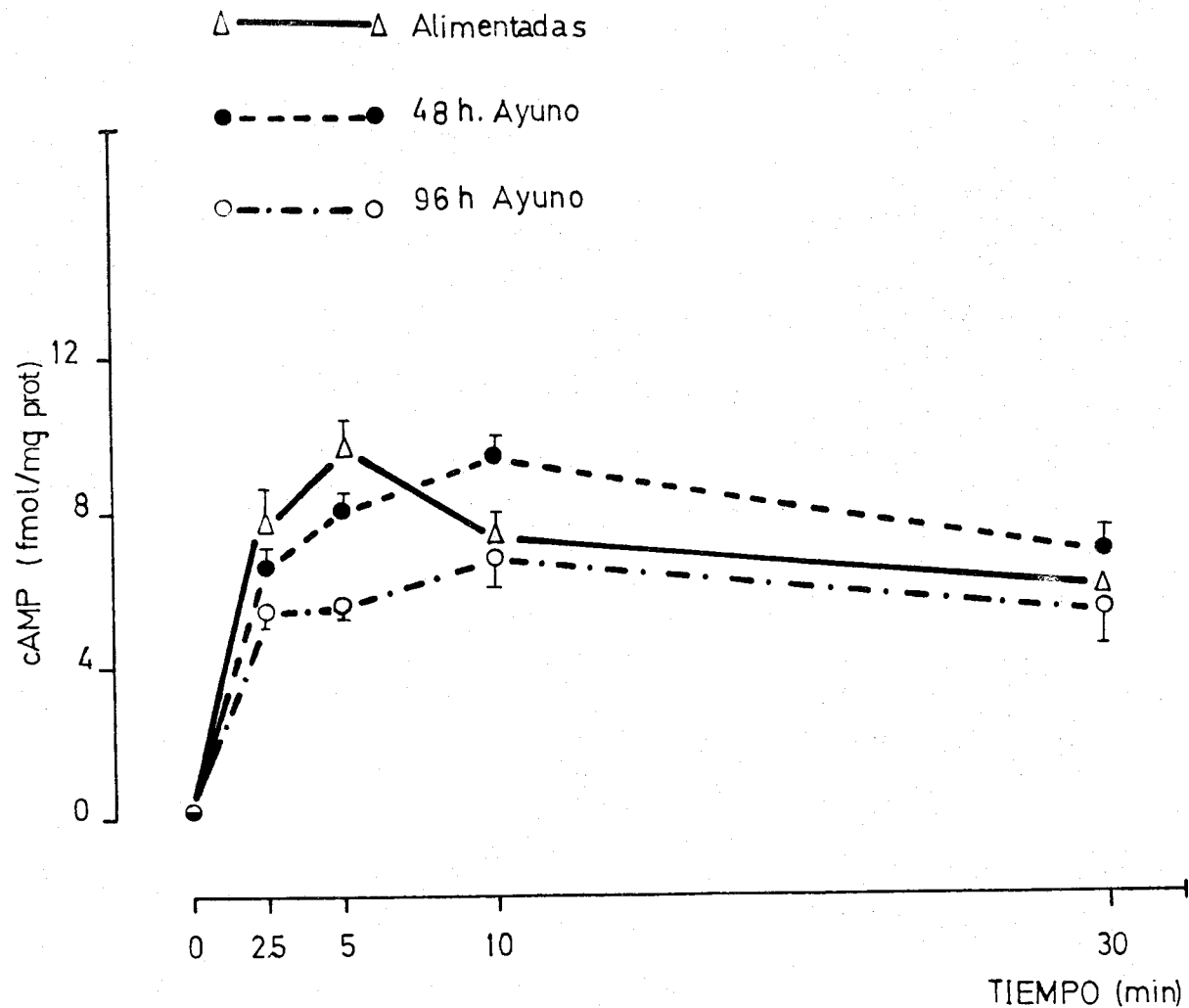


Fig.11. Efecto de la adrenalina ($1 \mu\text{M}$) sobre la producción de cAMP en adipocitos aislados de ratas alimentadas y sometidas a 48 y 96 horas de ayuno.

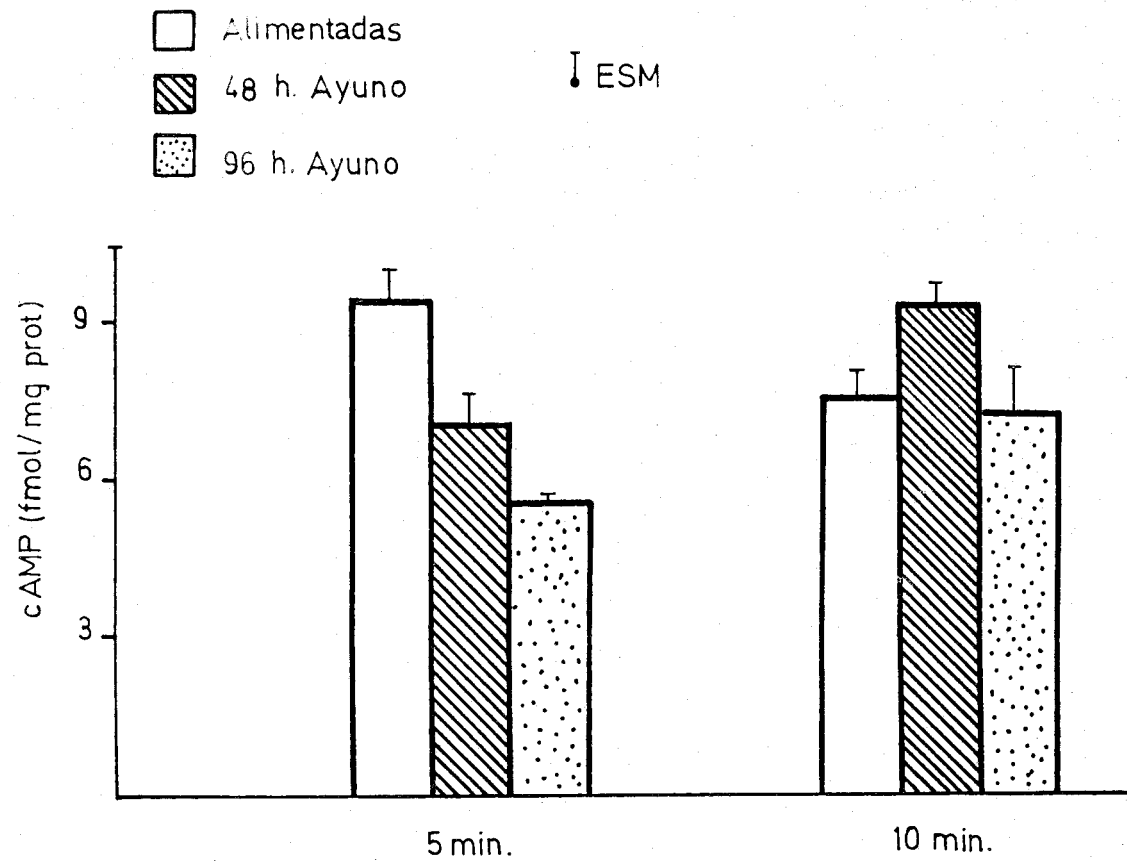


Fig.12. Niveles de cAMP en adipocitos aislados de ratas alimentadas y sometidas a 48 y 96 horas de ayuno, incubados durante 5 y 10 min en presencia de adrenalina 1 μ M.

TABLA N° 2

Efecto de la adrenalina ($1\mu\text{M}$) sobre la lipólisis de adipocitos aislados de ratas alimentadas y sometidas a 24, 48 y 96 h de ayuno. Todas las incubaciones se realizaron en presencia de teofilina (1 mM). Los resultados se expresan en $\mu\text{g}/\text{mg}$ prot.

<u>Tiempo (min)</u>	<u>alimentadas</u>	<u>24 h ayuno</u>	<u>48 h ayuno</u>	<u>96 h ayuno</u>
0	0'27 \pm 0'30 n=4	0'27 \pm 0'04 n=6	0'26 \pm 0'10 n=6	0'18 \pm 0'20 n=6
15	0'59 \pm 0'05 n=4	0'60 \pm 0'03 n=5	0'47 \pm 0'05 n=6	0'47 \pm 0'04 n=6
30	1'22 \pm 0'08 n=4	0'75 \pm 0'03 n=5	0'75 \pm 0'06 n=6	0'67 \pm 0'06 n=6
60	2'10 \pm 0'20 n=4	1'32 \pm 0'06 n=5	0'80 \pm 0'07 n=6	0'80 \pm 0'03 n=6

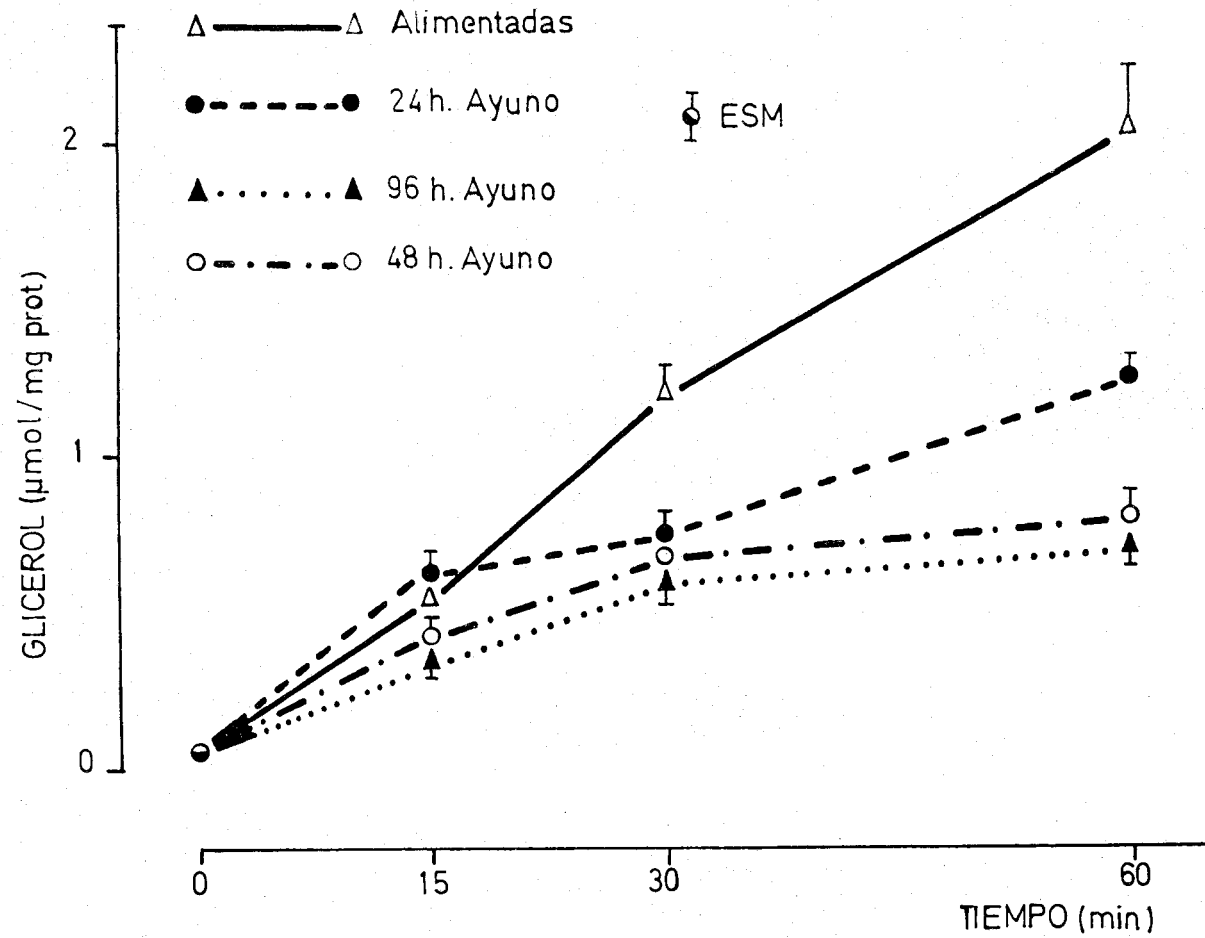


Fig.13. Efecto de la adrenalina $1 \mu\text{M}$ sobre la lipólisis de adipocitos aislados de ratas alimentadas y sometidas a 24, 48 y 96 horas de ayuno.

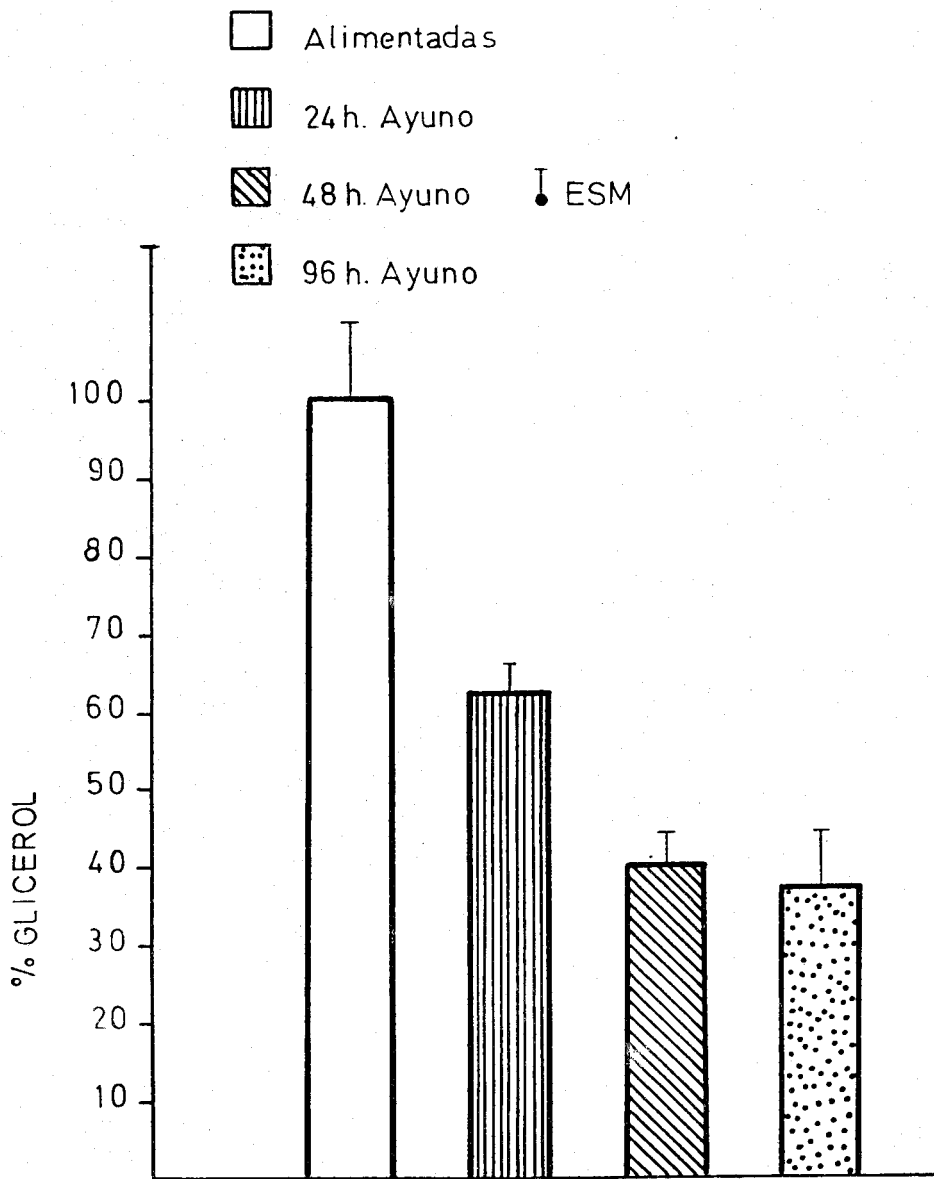


Fig.14. % de glicerol liberado al medio de incubación por efecto de la adrenalina ($1 \mu\text{M}$) a las 24, 48 y 96 horas de ayuno.

2. ESTUDIO DE LAS CONCENTRACIONES OPTIMAS DE ATP-P³², ATP Y DEL TIEMPO DE INCUBACION PARA LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA PROTEINA QUINASA DE TEJIDO ADIPOSO.

En la tabla (3) y figura (15) representamos los datos obtenidos al estudiar la radiactividad específica para la determinación de la actividad de la proteína quinasa de tejido adiposo. En ordenadas, la actividad específica de la proteína quinasa y en abscisas la actividad específica del ATP-P³².

Existe una buena correlación lineal entre la actividad específica de la PK y en la actividad específica del ATP-P³² en ausencia como en presencia de cAMP. La relación -cAMP/+cAMP se mantiene constante en todos los casos. De las concentraciones de ATP-P³² ensayadas, se eligió la de 5'8 nCi/nmol con lo que se consigue una concentración que sin ser excesivamente alta, permite obtener amplias diferencias entre la actividad de la proteína quinasa en ausencia y en presencia de cAMP.

Para el estudio de la concentración óptima de ATP(frío), se utilizaron concentraciones comprendidas entre 0'04 a 5 mM, determinándose la actividad de la proteína quinasa en ausencia y en presencia de cAMP, tabla (4), figura (16). Se observa un incremento en la actividad de la proteína quinasa proporcional a la concentración

de ATP márgenes comprendidos entre 0'04 a 2 mM.

Para concentraciones de ATP 2 mM o mayores, la actividad de la proteína quinasa se mantiene constante. En nuestras experiencias se utilizó ATP 2 mM, que es una concentración saturante y permite además obtener diferencias en la actividad de la proteína quinasa en ausencia y en presencia de cAMP en un rango suficientemente amplio. En la tabla (5) y figura (17), representamos los datos obtenidos al estudiar la proteína quinasa en ausencia y en presencia de cAMP a distintos tiempos de incubación.

En ordenadas se representa la actividad específica de la proteína quinasa y en abscisas los tiempos de incubación estudiado. Se observa una linealidad durante los diez primeros minutos de la incubación. Se aligió como tiempo de incubación los 10 min ya que permite la máxima actividad específica de la proteína quinasa en ausencia y en presencia de cAMP.

TABLA N° 3

Estudio de la radiactividad específica óptima para la determinación de la proteína quinasa de tejido graso, en ausencia y en presencia de cAMP.

<u>(nCi/nm)</u>	Act.Esp.PK <u>(+cAMP)</u>	Act.Esp.PK <u>(-cAMP)</u>	PK <u>(-cAMP/+cAMP)</u>
2'9	330	150	0'54
5'8	364	164	0'54
11'6	418	178	0'42
17'6	423	144	0'34

TABLA N° 4

Estudio de la concentración óptima de ATP para la determinación de la proteína quinasa de tejido graso, en ausencia y en presencia de cAMP.

<u>ATP (mM)</u>	Act.Esp. PK <u>(+cAMP)</u>	Act.Esp. PK <u>(-cAMP)</u>
0'05	22'1	6'5
0'235	56'6	26'5
0'500	80'8	40'8
1	135'1	74'4
2	181'8	99'0
5	203'0	129'0

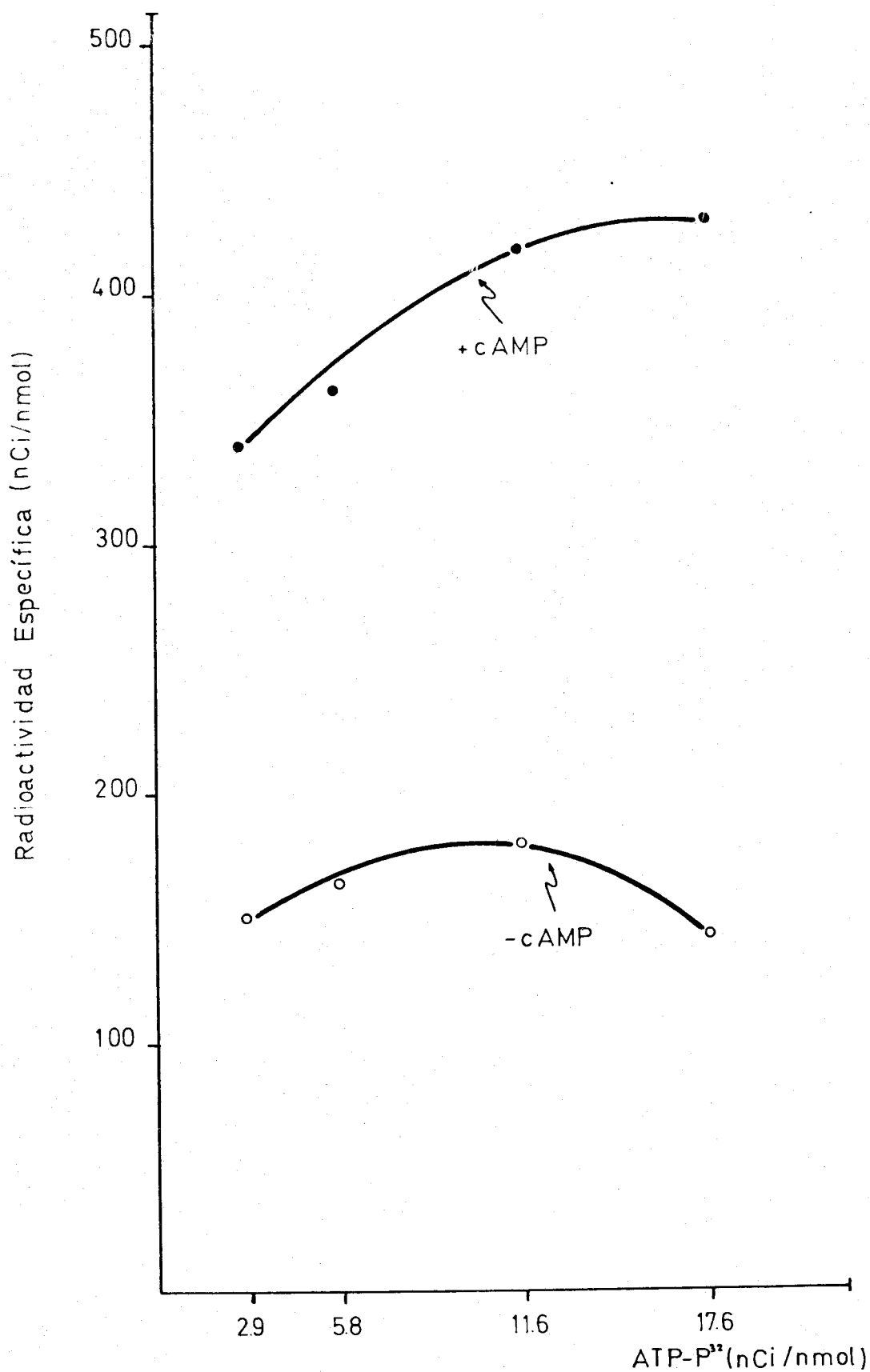


Fig.15. Estudio de la radioactividad específica óptima para la determinación de la proteína quinasa de tejido graso.

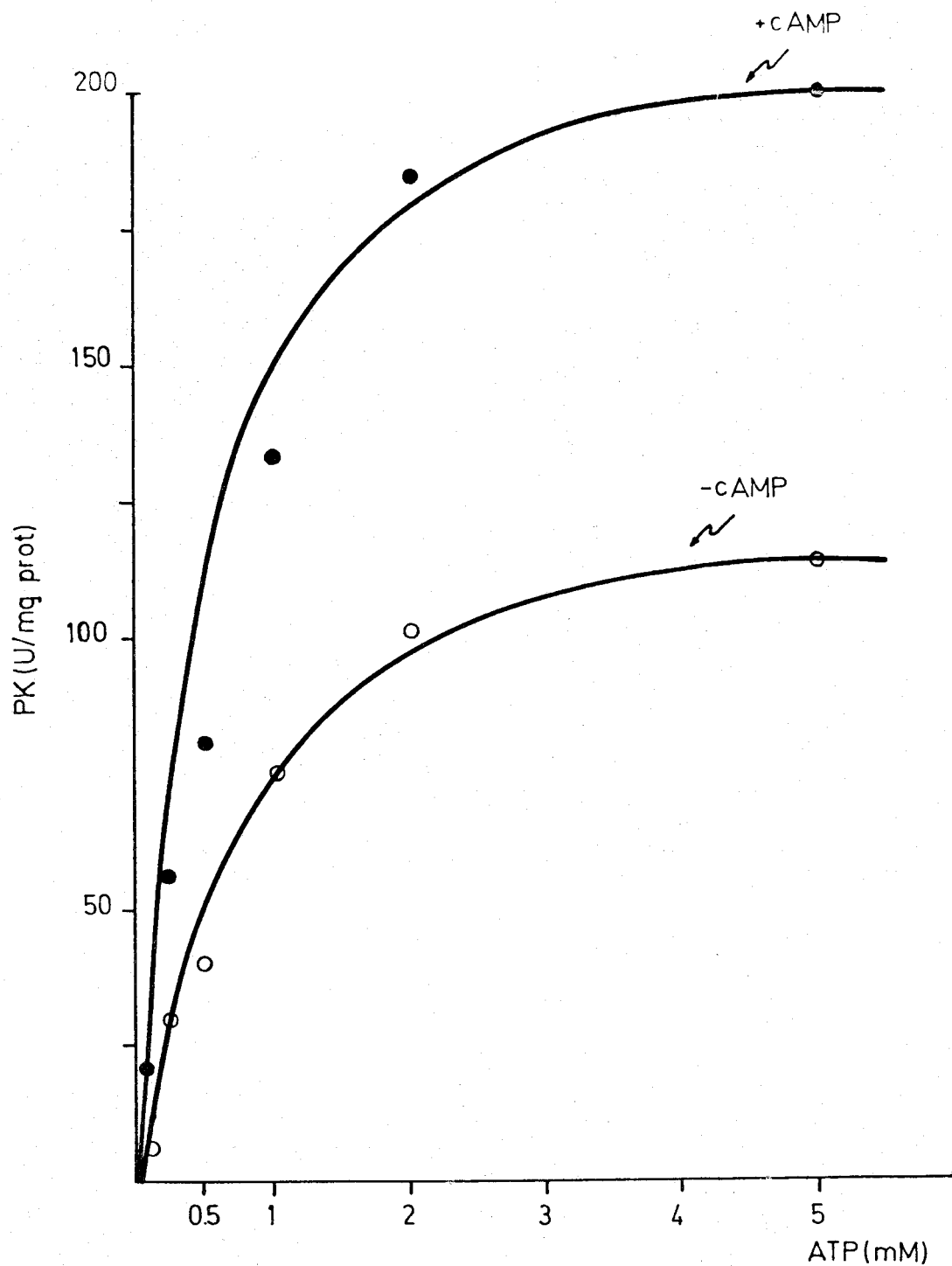


Fig.16. Estudio de la concentración óptima de ATP para la determinación de la proteína quinasa de tejido graso, en ausencia y en presencia de cAMP.

TABLA N° 5

Estudio del tiempo óptimo para la determinación de la proteína quinasa de tejido adiposo, en ausencia y en presencia de cAMP.

<u>Tiempo (min)</u>	<u>Act.Esp.PK (+cAMP)</u>	<u>Act.Esp.PK (-cAMP)</u>	<u>PK (-cAMP/+cAMP)</u>
5	2647	753	0'30
10	2168	654	0'30
15	1666	620	0'47
30	1263	1263	0'48

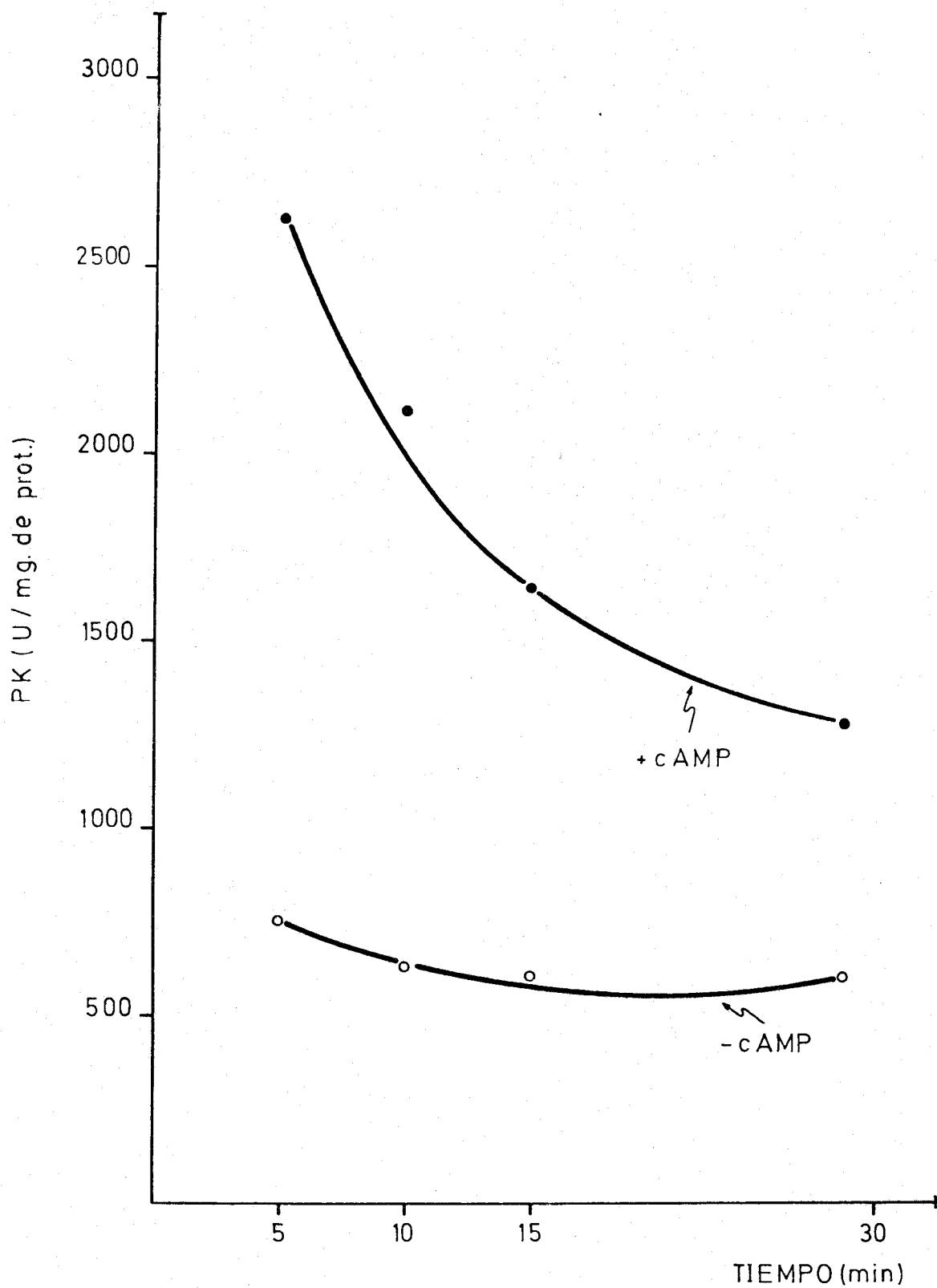


Fig.17. Estudio del tiempo óptimo de incubación para la determinación de la proteína quinasa de tejido graso, en ausencia y en presencia de cAMP.

3. MODIFICACIONES INDUCIDAS POR EL AYUNO EN LOS NIVELES DE CAMP Y EN LA ACTIVIDAD DE LA PROTEINA QUINASA EN HOMOGENADOS DE TEJIDO ADIPOSEO.

Se estudiaron los niveles de cAMP y la actividad de la proteína quinasa en homogenados de tejido adiposo de ratas alimentadas (control) y sometidas a 24, 48 y 96 h de ayuno. Una vez extraído el tejido adiposo se homogenizó con buffer fosfato 25 mM conteniendo además teofilina y ClNa 0'5 M para impedir la reasociación de las dos subunidades de la proteína quinasa durante este breve tiempo de manipulación del tejido. El homogenado se centrifugó obteniéndose un infranadante en el cual se determinaron los niveles de cAMP y la actividad de la proteína quinasa en condiciones que pueden ser consideradas muy semejantes a las de "in vivo".

En la tabla (6) y figura (18) representamos las modificaciones en los niveles de cAMP de tejido graso en controles y durante el ayuno.

En ordenadas se representan los niveles de cAMP (pmoles/mg proteína) y en abscisas las horas de ayuno.

En el grupo de ratas alimentadas (control) la media de 6 experiencias realizadas fue de $37'71 \pm 4'48$ pmoles/mg de proteína. A las 24 h de ayuno, los valores disminuyeron significativamente con respecto a los controles ($p < 0'05$).

A las 48 h de ayuno los niveles de cAMP aumentaron significativamente con respecto a los controles y a 24 h de ayuno ($p < 0'025$ y $p < 0'0005$ respectivamente). A las 96 h de ayuno los niveles de cAMP aumentaron significativamente con respecto a los controles, a las 24 y 48 h de ayuno ($p < 0'0005$, $p < 0'0005$ y $p < 0'05$ respectivamente).

Excepto para las 24 h de ayuno, en las cuales los cambios metabólicos para adaptarse a esta nueva situación, deben ser los responsables de esta caída en los niveles de cAMP, se puede afirmar que el ayuno produce un aumento significativo en los niveles intracelulares de cAMP del tejido adiposo.

En la tabla (7) y figura (19) representamos las modificaciones producidas por el ayuno en la actividad de la proteína quinasa del tejido graso. Se representa en ordenadas la actividad de la proteína quinasa expresada como cociente (-cAMP/+cAMP) y en abscisas las horas de ayuno.

En el grupo control, la media de 6 experiencias realizadas fue de $0'426 \pm 0'01$. A las 24 h de ayuno, la actividad de la proteína quinasa disminuyó significativamente con respecto a los controles ($p < 0'005$). A las 48 y 96 h de ayuno, la actividad de la proteína quinasa aumentó significativamente con respecto a los controles

($p < 0'005$ en ambos casos). No se observaron diferencias significativas en la actividad de la proteína quinasa del tejido adiposo entre los animales sometidos a 48 y 96 h de ayuno.

Se puede observar que las modificaciones en la actividad de la proteína quinasa inducida por el ayuno guardan una buena correlación en los niveles de cAMP en igual situación metabólica. En la figura (20) representamos la correlación entre los niveles de cAMP y la actividad de la proteína quinasa en el grupo control y durante los distintos días de ayuno. Se representa en ordenadas la actividad de la proteína quinasa como cociente $-cAMP/+cAMP$ u en abscisas los niveles de cAMP en pmol/mg de proteína. Se obtiene una recta cuya ecuación es $y = 0'002 x + 0'77$ y su coeficiente de correlación es de 0'90.

TABLA N° 6

Modificaciones de los niveles de cAMP en homogenados de tejido adiposo, inducido por el ayuno.

<u>Ayuno (horas)</u>	<u>n</u>	<u>Niveles de cAMP</u> <u>pmoles de cAMP/mg prot</u>	<u>P <</u>
0	6	37'71 \pm 4'48	-
24	6	26'18 \pm 2'29	0'05
48	5	52'48 \pm 6'38	0'025
96	5	69'86 \pm 8'64	0'0005

TABLA N° 7

Modificaciones en la actividad de la proteína quinasa de tejido adiposo inducidas por el ayuno.

<u>Ayuno (horas)</u>	<u>n</u>	<u>PK</u> <u>(-cAMP/+cAMP)</u>	<u>P <</u>
0	6	0'42 \pm 0'01	-
24	6	0'34 \pm 0'02	0'005
48	5	0'51 \pm 0'03	0'005
96	5	0'53 \pm 0'04	0'005

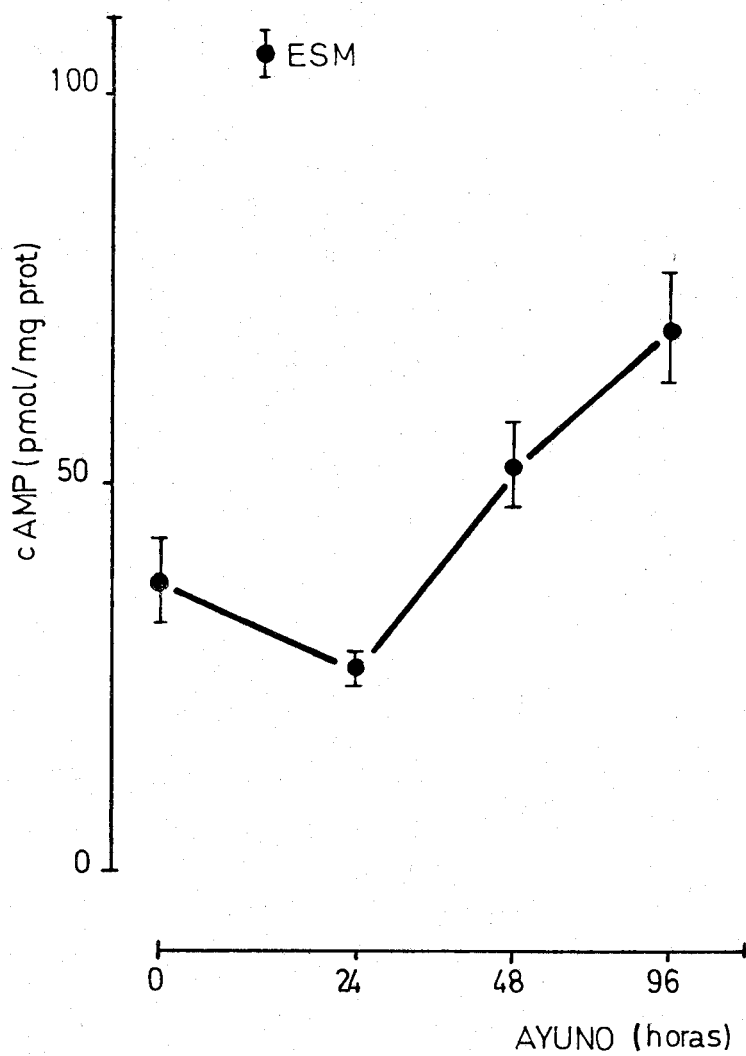


Fig.18. Modificaciones de los niveles de cAMP en homogenados de tejido adiposo inducidas por el ayuno.

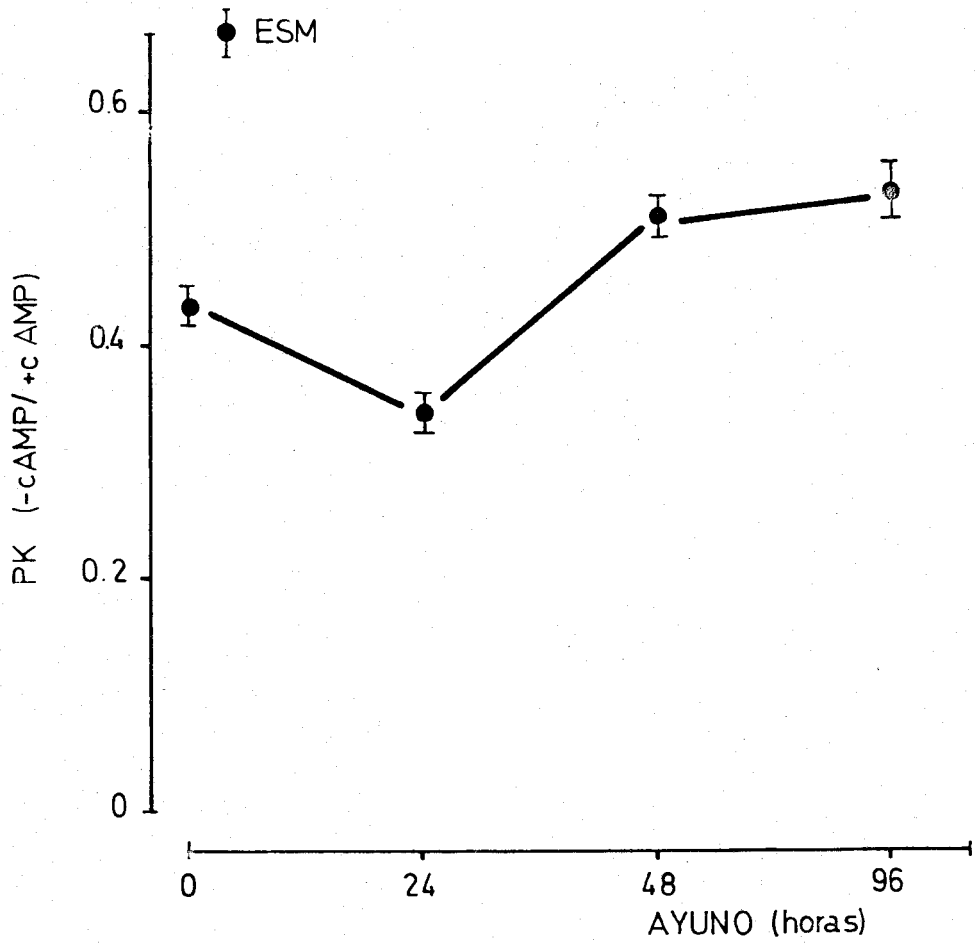


Fig.19. Modificaciones en la actividad de la proteína quinasa de tejido adiposo, inducidas por el ayuno.

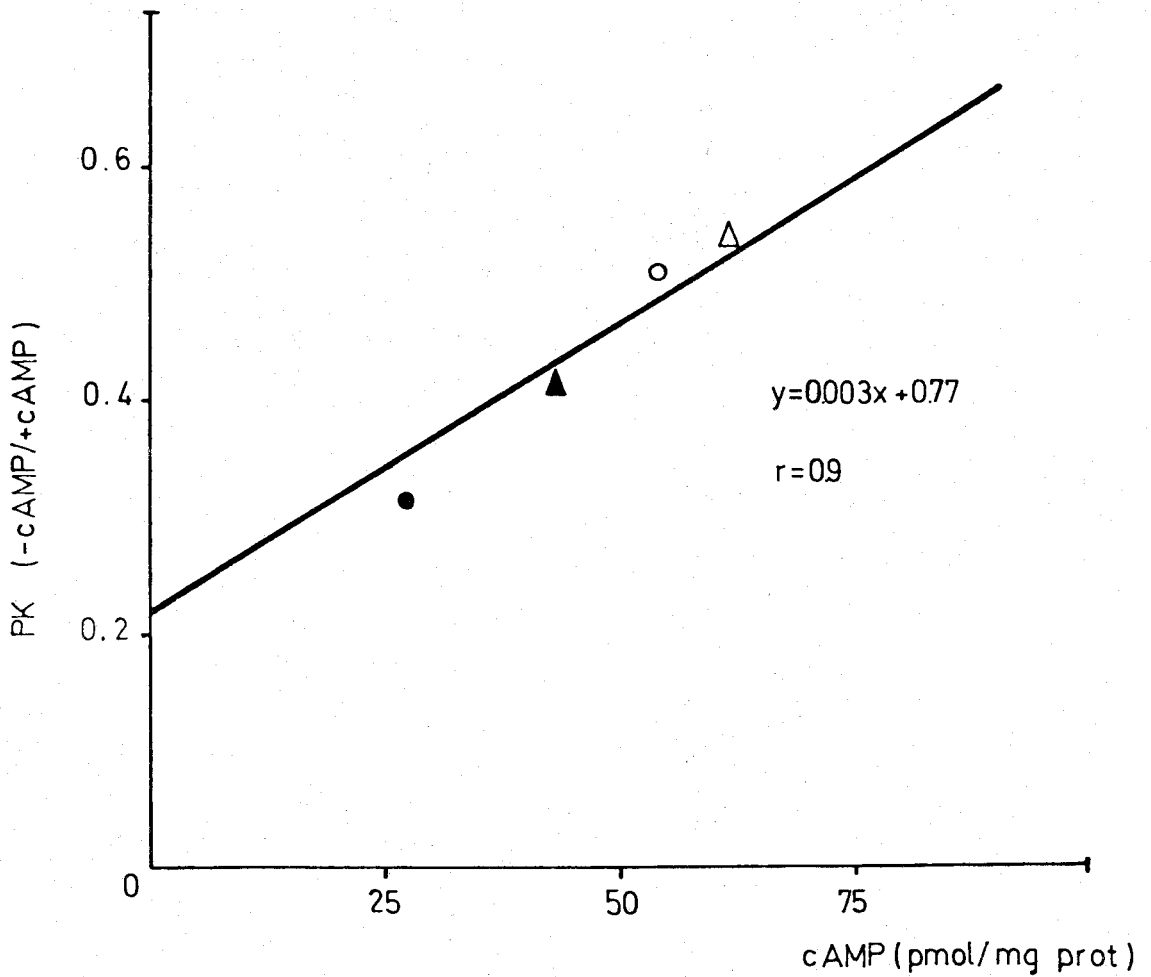


Fig.20. Correlación entre los niveles de cAMP y la actividad de la proteína quinasa de tejido adiposo en el grupo control y durante el ayuno.

4. DETERMINACION DE LA CONSTANTE DE MICHAELIS DE LA PROTEINA QUINASA PARA EL ATP EN TEJIDO GRASO DE ANIMALES ALIMENTADOS Y DURANTE EL AYUNO.

El tejido graso epididimal de animales alimentados y sometidos a 48 y 96 h de ayuno se homogenizó, se centrifugó a 10.000 rpm a 4 °C y durante 10 min y en el infranadante se determinó la incorporación de P^{32} a la histona por min y por mg de proteína en presencia de concentraciones crecientes de ATP frío.

La representación de Lineweaver-Burk de los valores inversos de las velocidades ($1/V = 1/U/mg \text{ prot}$) y de las concentraciones de sustrato ($1/S = 1/ATP(mM)$) da lugar a una recta de la cual se puede calcular la K_m del enzima a partir del coeficiente de regresión de la recta. En las tablas (8, 9 y 10) y en las figuras (21 y 22), se representan los datos obtenidos en estas experiencias.

En el tejido graso de los animales alimentados, la K_m del enzima para el ATP fue de $0'7 \cdot 10^{-3}$ M en los animales alimentados la K_m aumentó a $1'17 \cdot 10^{-3}$ M a las 24 h y a $1'6 \cdot 10^{-3}$ M a las 48 h. De nuestros resultados podemos decir que durante el ayuno hay una disminución en la afinidad de la proteína quinasa para el ATP.

TABLA N° 8

Determinación de la K_m de la proteína quinasa para el ATP en homogenados de tejido graso de animales alimentados.

<u>ATP (mM)</u>	<u>1/S</u> <u>(mM⁻¹)</u>	<u>1/V</u> <u>(U/mg prot)⁻¹x10⁻³</u>
4'70	0'21	4'9
2'35	0'42	5'5
1'12	0'89	7'4
0'47	2'10	12'3
0'235	4'25	17'6

Ecuación de la recta.

$$y = 0'00321 x + 0'0045$$

$$R = 0'99$$

$$K_m = 0'712 \text{ mM}$$

TABLA N° 9

Determinación de la K_m de la proteína quinasa para el ATP en homogenado de tejido graso procedentes de ratas sometidas a 24 h de ayuno.

<u>ATP (mM)</u>	<u>V (U/mg prot)</u>	<u>1/S (mM⁻¹)</u>	<u>1/V (U/mg prot)⁻¹ x 10³</u>
4'7	383	0'21	2'6
2'3	277	0'42	3'6
1'12	236	0'89	4'2
0'47	130	2'10	7'0
0'235	75	4'25	13'0

Ecuación de la recta.

$$y = 0'0025 x + 0'00213$$

$$R = 0'997$$

$$K_m = 1'2 \text{ mM.}$$

TABLA N° 10

Determinación de la K_m de la proteína quinasa para el ATP en homogenado de tejido graso procedentes de ratas sometidas a 48 h de ayuno.

<u>ATP (mM)</u>	<u>V (U/mg prot)</u>	<u>1/S (mM⁻¹)</u>	<u>1/V (U/mg prot)⁻¹.10³</u>
4'7	205	0'21	4'8
2'3	143	0'42	6'9
1'12	121	0'89	8'2
0'47	55	2'10	18'1
0'235	34	4'25	29'4

Ecuación de la recta.

$$y = 0'006134 x + 0'00382$$

$$R = 0'8856$$

$$K_m = 1'6 \text{ mM.}$$

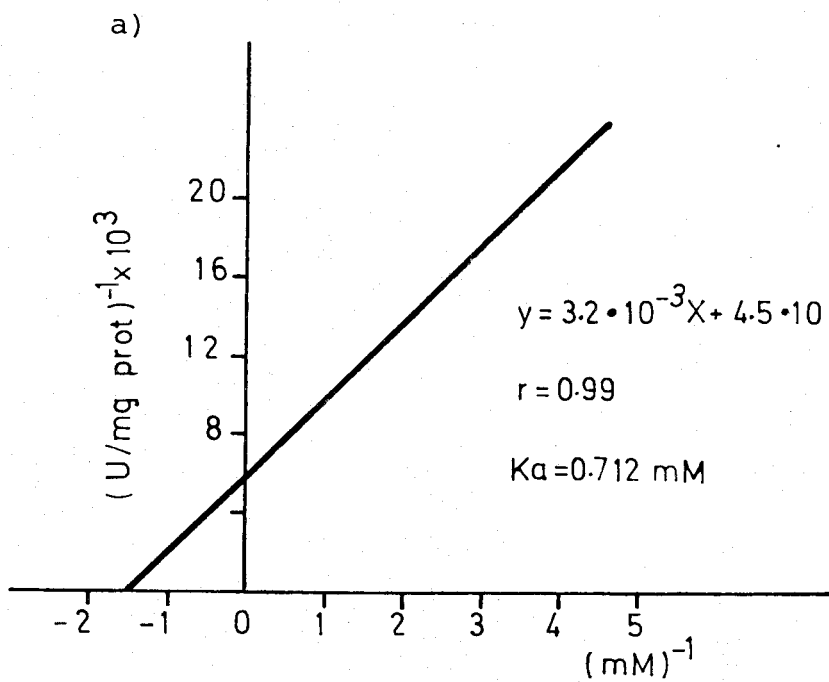
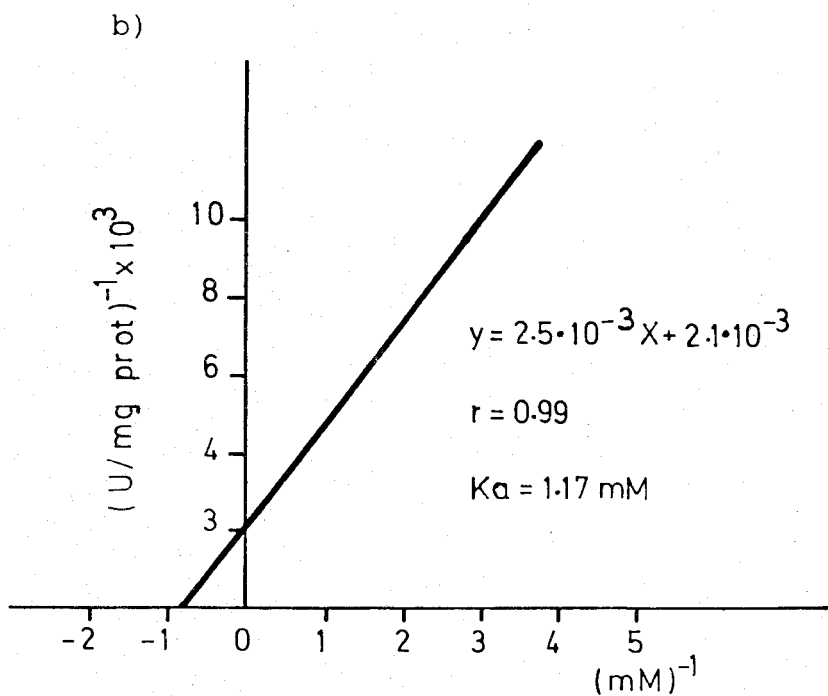


Fig.21. Determinación de la K_m de la proteína quinasa para el ATP en homogenados de tejido adiposo de ratas alimentadas (a) y sometidas a 24 h de ayuno (b).



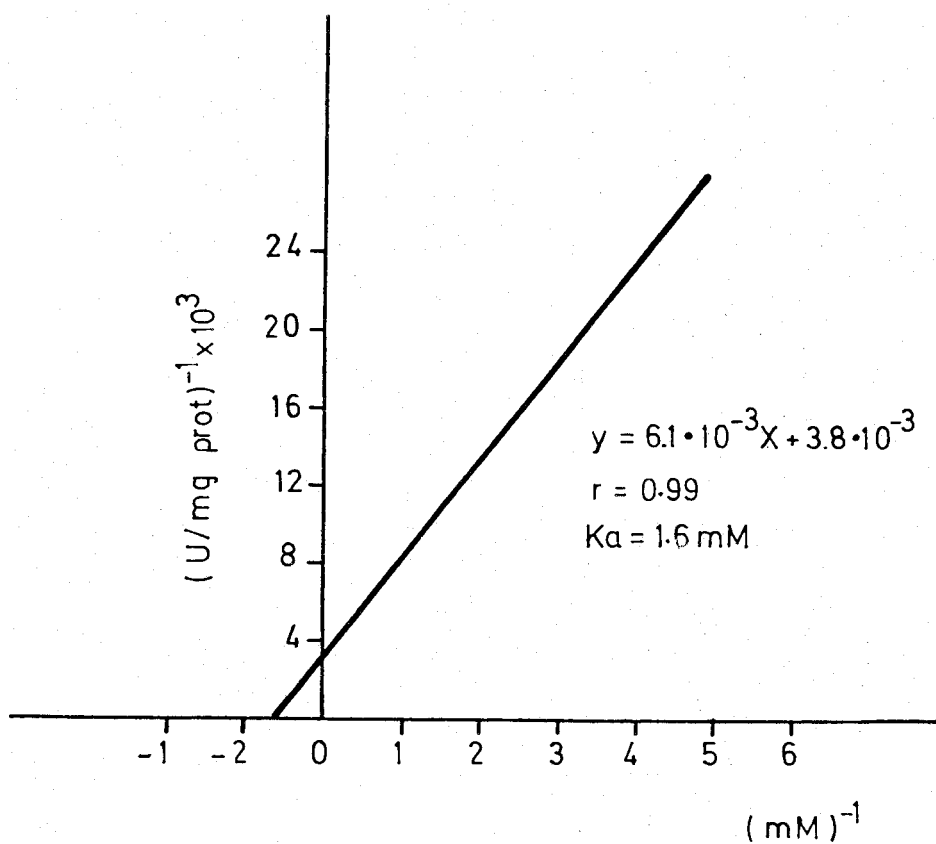


Fig.22. Determinación de la K_m de la proteína quinasa para el ATP en homogenados de tejido graso de ratas sometidas a 48 h de ayuno.

5. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE LA PROTEINA QUINASA Y LA LIPOLISIS DE TEJIDO GRASO DE ANIMALES ALIMENTADOS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ADRENALINA.

Se estudió la actividad de la proteína quinasa de tejido graso incubado en presencia de distintas concentraciones de adrenalina. Los datos obtenidos se representan en la tabla (11) y figura (23). En ordenadas se representa la actividad de la proteína quinasa como cociente -cAMP/+cAMP y en abscisas las concentraciones de adrenalina ensayadas. Se observa que la actividad de la proteína quinasa se va incrementando a medida que aumenta la concentración de adrenalina. Se alcanza su máximo efecto a partir de concentraciones de adrenalina 11 μ M.

Para estudiar la actividad lipolítica de las distintas concentraciones de adrenalina ensayadas, se midió el glicerol liberado al medio de incubación. Los datos obtenidos en estas experiencias se representan en la tabla (12) y figura (24).

En ordenadas se representa el glicerol liberado en nmoles/mg de proteína, y en abscisas las concentraciones de adrenalina ensayadas. Se observa que la adrenalina 1 μ M produce una elevación de los niveles de glicerol tres veces mayor que los niveles basales. Con adrenalina 5 μ M se obtiene la máxima liberación del glicerol que se mantiene con adrenalina 11 y 50 μ M.

De los resultados obtenidos podemos afirmar que pequeñas variaciones en la actividad de la proteína quinasa, o más bien en los niveles de cAMP producen un gran incremento de la lipólisis en el tejido adiposo.

TABLA N° 11

Actividad de la proteína quinasa de tejido adiposo incubado con diferentes concentraciones de adrenalina.

<u>Adrenalina (μM)</u>	<u>n</u>	PK <u>(-cAMP/+cAMP)</u>
0	4	0'36 \pm 0'01
1	4	0'50 \pm 0'03
5	4	0'64 \pm 0'02
11	6	0'70 \pm 0'02
50	4	0'69 \pm 0'004

TABLA N° 12

Niveles de glicerol liberados al medio de incubación por el tejido adiposo en presencia de diferentes concentraciones de adrenalina.

<u>Adrenalina (μM)</u>	<u>n</u>	Glicerol <u>(nmoles/mg prot)</u>
0	3	21'6 \pm 0'8
1	3	64'7 \pm 9'5
5	3	90'0 \pm 2'5
11	3	91'3 \pm 3'3
50	3	82'0 \pm 2'2

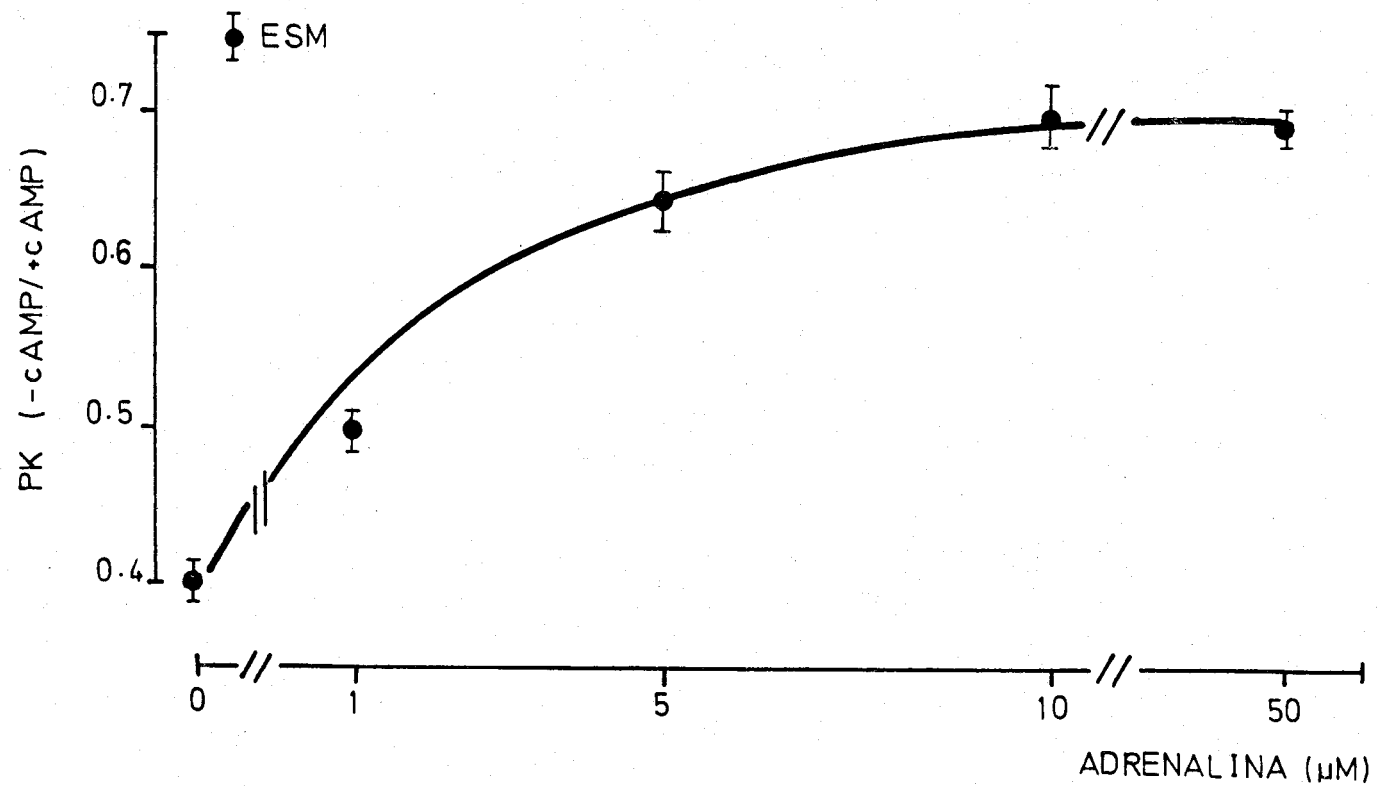


Fig.23. Actividad de la proteína quinasa de tejido adiposo incubado con diferentes concentraciones de adrenalina.

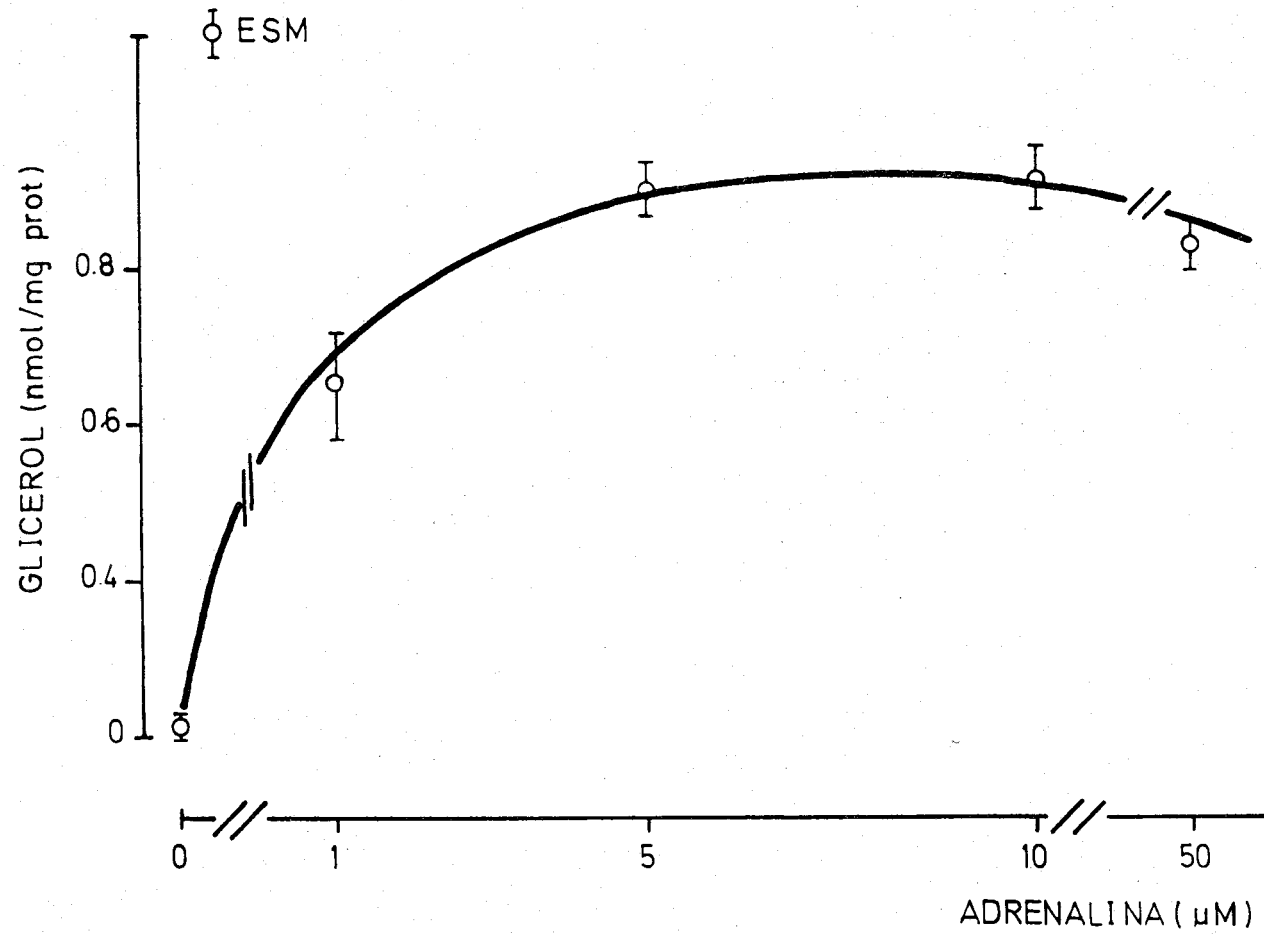


Fig.24. Niveles de glicerol liberado al medio de incubación por el tejido adiposo en presencia de diferentes concentraciones de adrenalina.

6. ESTUDIO DEL TIEMPO DE INCUBACION DEL TEJIDO ADIPOSEO EN PRESENCIA DE ADRENALINA.

Se incubó el tejido graso en presencia de adrenalina $11 \mu\text{M}$ durante 5, 10, 15 y 30 min. Al tiempo 0 que nos sirvió como control, se le añadió la adrenalina deteniéndose la reacción en el mismo momento. En homogenados del tejido incubado se determinó la actividad de la proteína quinasa y en alícuotas del medio de incubación se determinó el glicerol liberado (como índice de la lipólisis) en cada uno de los tiempos estudiados. Los resultados obtenidos se representan en las tablas (13) y (14) y en las figuras (25) y (26).

Se puede observar que la actividad de la proteína quinasa (-cAMP/+cAMP) aumenta con el tiempo de incubación, alcanzando su máxima actividad ($0'70 \pm 0'025$) a los 10 min. A los 15 min la actividad de la proteína quinasa disminuye ($0'55 \pm 0'08$) manteniéndose en este valor hasta los 30 min de incubación.

El glicerol liberado al medio de incubación aumenta con el tiempo. Por encima de los 10 min, cuando la actividad de la proteína quinasa es ya considerablemente baja, el glicerol liberado al medio por adición de la adrenalina sigue aumentando hasta los 30 min.

TABLA N°13

Actividad de la proteína quinasa de tejido adiposo a diferentes tiempos de incubación con adrenalina.

<u>Tiempo (min)</u>	<u>n</u>	PK <u>(-cAMP/+cAMP)</u>
0	3	0'36 ± 0'01
5	3	0'55 ± 0'02
10	3	0'70 ± 0'02
15	3	0'55 ± 0'08
30	3	0'50 ± 0'01

TABLA N°14

Niveles de glicerol liberados al medio de incubación por el tejido adiposo a diferentes tiempos de incubación con adrenalina.

<u>Tiempo (min)</u>	<u>n</u>	Glicerol <u>(nmoles/mg prot)</u>
0	3	21'6 ± 0'8
5	3	27'3 ± 0'4
10	3	91'3 ± 3'3
15	3	158'0 ± 1'6
30	3	189'0 ± 1'2

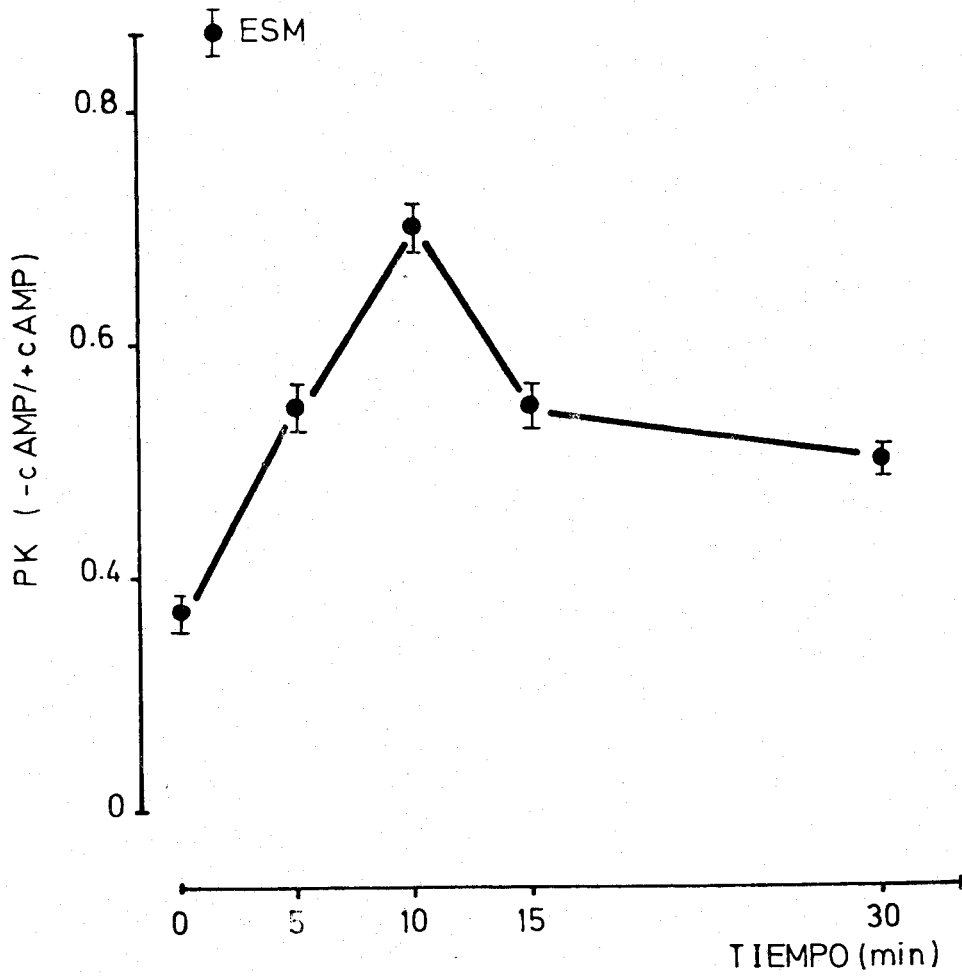


Fig.25. Actividad de la proteína quinasa de tejido adiposo a diferentes tiempos de incubación con adrenalina.

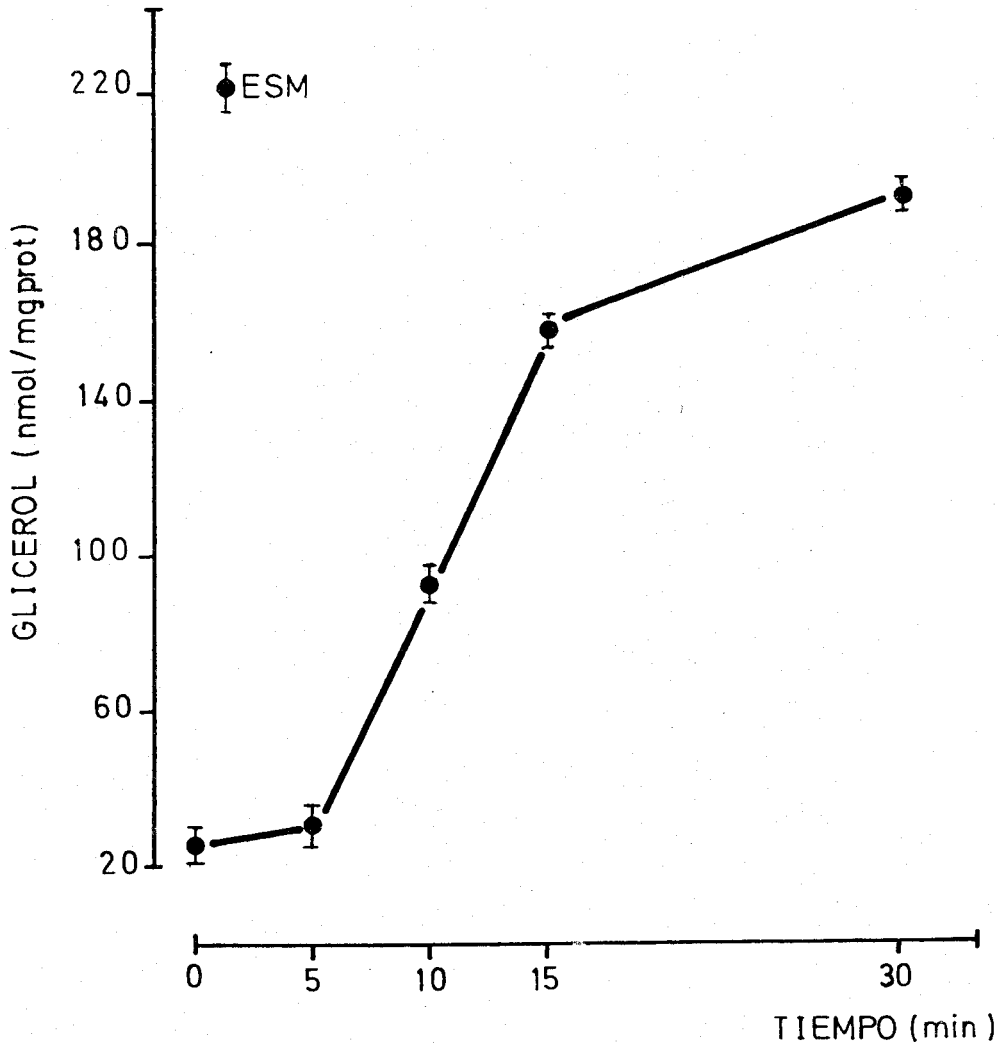


Fig.26. Niveles de glicerol liberados al medio de incubación por el tejido adiposo a diferentes tiempos de incubación con adrenalina.

7. ACCION DE LA ADRENALINA SOBRE LOS NIVELES DE cAMP, LA ACTIVIDAD DE LA PROTEINA QUINASA Y LA LIPOLISIS EN EL TEJIDO ADIPOSO EN EL GRUPO CONTROL Y DURANTE EL AYUNO.

El tejido adiposo de animales alimentados (control) y sometidos a 24, 48 y 96 h de ayuno, se incubó durante 10 min en ausencia y en presencia de adrenalina 11 μ M.

En el medio de incubación se determinó el glicerol liberado, como índice lipolítico. El tejido graso se homogenizó, centrifugó y en el infranadante obtenido se determinó el cAMP y la actividad de la proteína quinasa.

En la tabla (15) y figura (27) se representan los datos obtenidos al estudiar la acción de la adrenalina sobre los niveles de cAMP. En ordenadas se representa los niveles de cAMP en pmol/mg de proteína y en abscisas las horas de ayuno. En los animales alimentados, la adrenalina incrementó significativamente ($p < 0.01$) los niveles de cAMP con respecto a su control (incubado sin adrenalina). En el tejido graso de animales sometidos a 24, 48 y 96 h de ayuno, la adrenalina no incrementó significativamente los niveles de cAMP con respecto a sus correspondientes controles.

En la tabla (16) y figura (28) se representa la acción de la adrenalina sobre la actividad de la proteína quinasa de animales alimentados y durante el ayuno. En ordenadas se representa la actividad de la proteína

TABLA N° 15

Acción de la adrenalina (11 μ M) sobre los niveles de cAMP de tejido graso en el grupo control y durante el ayuno.

<u>Ayuno (horas)</u>	<u>n</u>	cAMP	cAMP	<u>P <</u>
		niveles basales <u>pmoles/mg prot</u>	niveles con adrenalina <u>pmoles/mg prot</u>	
0	6	86'3 \pm 9'8	181'5 \pm 12'4	0'01
24	4	91'6 \pm 6'7	110'2 \pm 13'9	N.S.
48	4	105'8 \pm 9'5	132'9 \pm 21'1	N.S.
96	4	91'2 \pm 7'4	109'9 \pm 15'1	N.S.

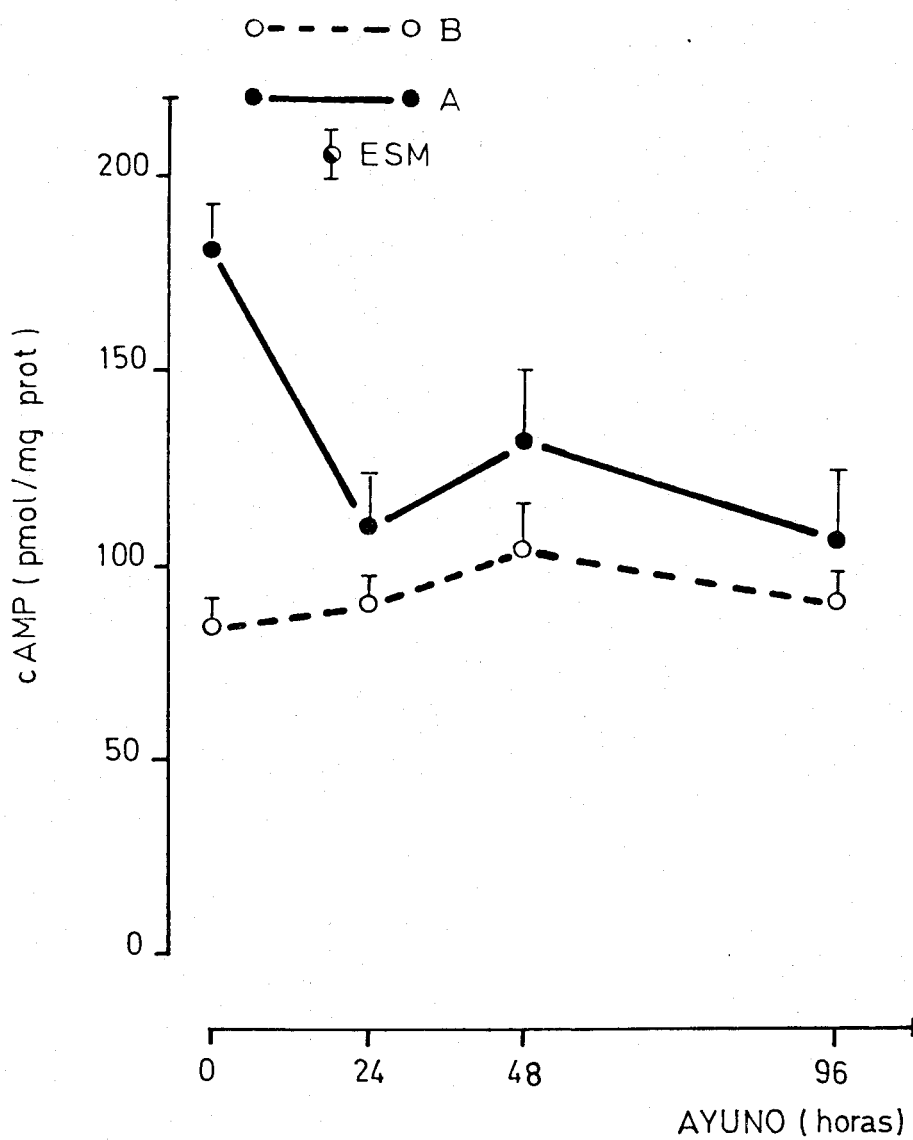


Fig.27. Acción de la adrenalina ($11 \mu\text{M}$) sobre los niveles de cAMP de tejido graso en el grupo control y durante el ayuno.
 B: niveles basales de cAMP.
 A: niveles de cAMP inducidos por adrenalina.

TABLA N° 16

Acción de la adrenalina (11 μ M) sobre la actividad de la proteína quinasa de tejido graso en el grupo control y durante el ayuno.

<u>Ayuno (horas)</u>	<u>n</u>	<u>PK</u> <u>(-cAMP/+cAMP)</u>	<u>PK+adrenalina</u> <u>(-cAMP/+cAMP)</u>	<u>P <</u>
0	6	0'48 \pm 0'02	0'75 \pm 0'03	0'0005
24	4	0'51 \pm 0'06	0'59 \pm 0'09	N.S.
48	4	0'51 \pm 0'07	0'56 \pm 0'05	N.S.
96	4	0'41 \pm 0'02	0'39 \pm 0'04	N.S.

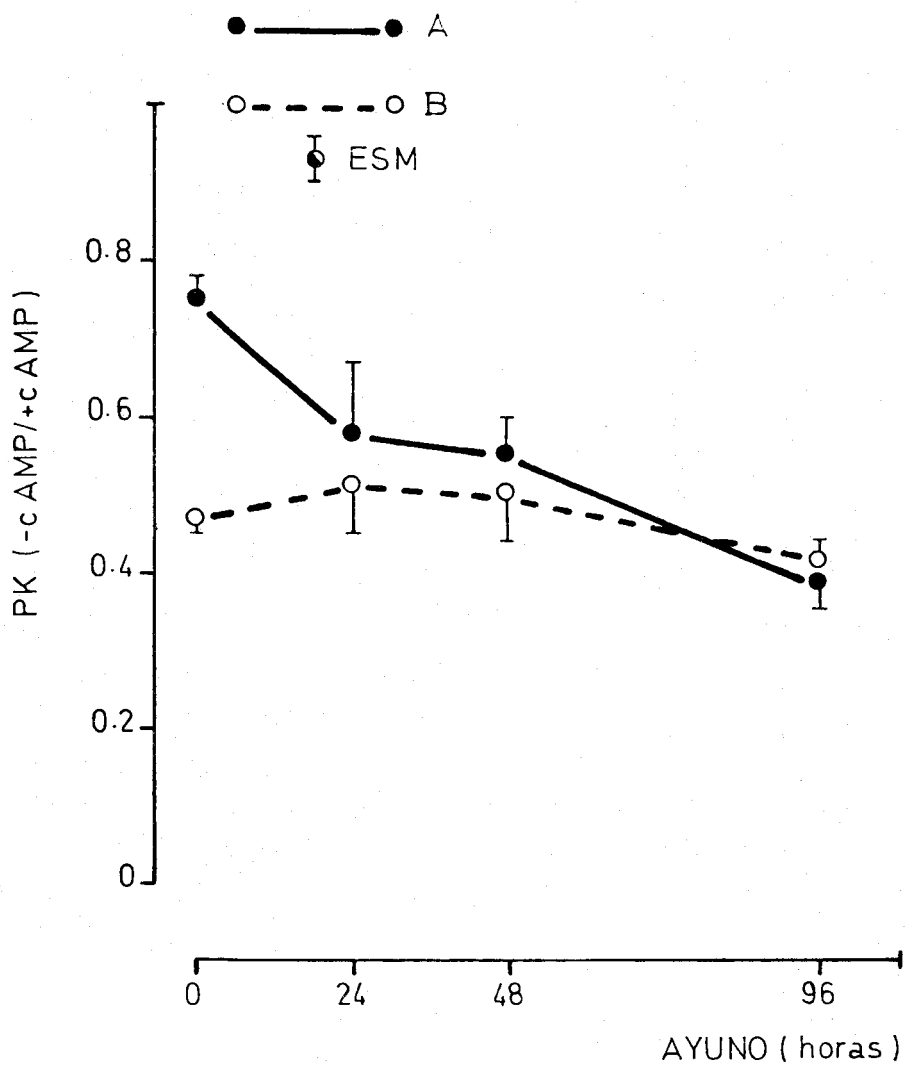


Fig.28. Acción de la adrenalina ($11 \mu\text{M}$) sobre la actividad de la proteína quinasa de tejido adiposo en el grupo control y durante el ayuno.

B: actividad basal de la proteína quinasa.

A: actividad de la proteína quinasa inducida por adrenalina.

quinasa como cociente $-cAMP/+cAMP$ y en abscisas las horas de ayuno. La adrenalina aumentó significativamente el cociente $-cAMP/+cAMP$ en el grupo de animales alimentados pasando de $0'48 \pm 0'02$ (actividad en condiciones basales) a $0'75 \pm 0'03$ ($p < 0'0005$). En los grupos de animales sometidos a 24, 48 y 96 h de ayuno, la estimulación de la adrenalina, quedó totalmente bloqueada, no existiendo diferencias significativas con respecto a sus correspondientes controles en los distintos días de ayuno estudiados.

En la tabla (17) y figura (29) se representa la acción lipolítica de la adrenalina con respecto a sus controles (tejido incubado sin adrenalina) en animales alimentados, y sometidos a ayuno. En ordenadas se representa el glicerol liberado al medio de incubación en nmol/mg de proteína y en abscisas las horas de ayuno.

En el grupo de animales alimentados, la adrenalina aumentó significativamente el glicerol liberado al medio pasando de $6'65 \pm 1'75$ a $29'62 \pm 0'82$ nmoles/mg de proteína ($p < 0'0005$). En los grupos de animales sometidos a 24, 48 y 96 h de ayuno, la adrenalina no aumentó significativamente el glicerol liberado al medio de incubación.

TABLA N° 17

Acción de la adrenalina (11 μ M) sobre los niveles de glicerol liberados al medio de incubación por el tejido adiposo en el grupo control y durante el ayuno. Los resultados se expresan en nmol/mg prot.

<u>Horas ayuno</u>	<u>n</u>	<u>glicerol</u>	<u>glicerol + adrenalina</u>	<u>P <</u>
0	5	6'6 \pm 1'7	29'6 \pm 0'8	0'0005
24	4	3'4 \pm 0'8	5'4 \pm 1'7	N.S.
48	4	8'7 \pm 3'2	10'7 \pm 1'0	N.S.
96	4	5'3 \pm 0'7	6'5 \pm 0'5	N.S.

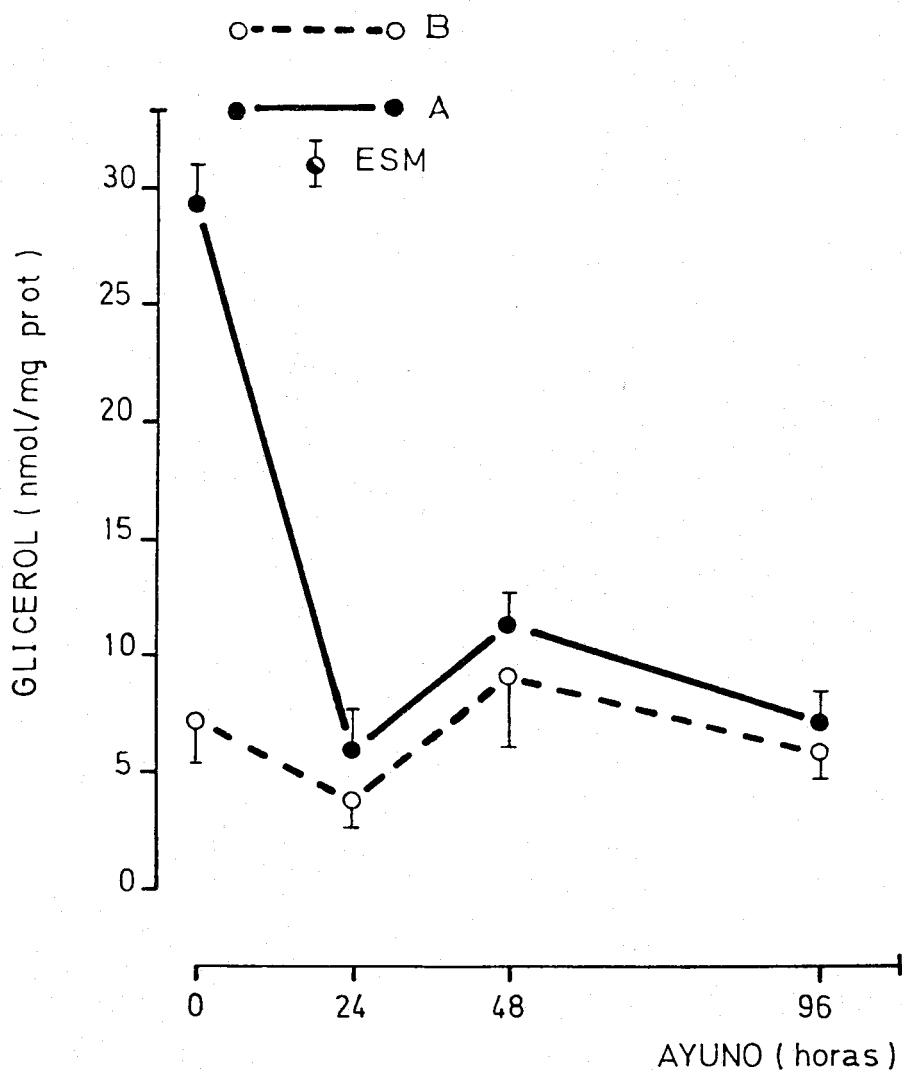


Fig.29. Acción de la adrenalina ($11 \mu\text{M}$) sobre los niveles de glicerol liberado al medio de incubación por el tejido adiposo en el grupo control y durante el ayuno.
 B: niveles basales de glicerol.
 A: niveles de glicerol inducido por adrenalina.

8. ACCION DE LA GLUCOSA SOBRE LOS NIVELES DE cAMP, LA ACTIVIDAD DE LA PROTEINA QUINASA Y LA LIPOLISIS EN EL TEJIDO ADIPOSO DE ANIMALES ALIMENTADOS Y DURANTE EL AYUNO.

Se estudió el efecto de la glucosa sobre los niveles de cAMP, la actividad proteína quinasa y la lipólisis, incubando el tejido graso de animales alimentados y sometidos a 24, 48 y 96 h de ayuno, en ausencia y en presencia de glucosa 5 mM. En la tabla (18) representamos los valores obtenidos en todos los parámetros estudiados. En la figura (30) se representa en ordenadas los niveles de cAMP en pmol/mg de proteína y en abscisas las horas de ayuno.

La glucosa no aumentó significativamente los niveles de cAMP ni en el grupo de animales alimentados ni en los sometidos a 24 y 48 h de ayuno. En el grupo de animales ayunados durante 96 h, la glucosa aumentó significativamente los niveles de cAMP con respecto a sus controles pasando de $91'2 \pm 7'4$ a $142'0 \pm 9'9$ ($p < 0'025$).

En la figura (31) se representa el efecto de la glucosa sobre la actividad de la proteína quinasa (-cAMP/+cAMP) de tejido graso procedente de animales alimentados y sometidos a ayuno. No se observaron diferencias significativas en el grupo de animales alimentados ni en los ayunados 24 y 48 h. A las 96 h de ayuno la glucosa produce un aumento significativo en la actividad de la

proteína quinasa ($p < 0'025$).

En la figura (32) se representa el efecto de la glucosa sobre la liberación de glicerol al medio de incubación por el tejido adiposo de animales alimentados y sometidos a ayuno. Se observa que la glucosa aumenta significativamente el glicerol liberado al medio, en animales alimentados ($p < 0'01$) y en los sometidos a ayuno de 24 h ($p < 0'0005$), 48 h ($p < 0'0005$) y 96 h ($p < 0'0005$).

TABLA N° 18

Acción de la glucosa (5 mM) sobre el cAMP, la actividad proteínica quinasa y la lipólisis (glicerol liberado al medio de incubación) del tejido adiposo en el grupo control y durante el ayuno.

SIN GLUCOSA				
<u>Horas ayuno</u>	<u>cAMP (pmol/mg prot)</u>	<u>Act.PK (-cAMP/+cAMP)</u>	<u>glicerol (nmol/mg prot)</u>	
0	86'8 ± 9'8	0'48 ± 0'01	6'6 ± 1'7	
24	91'6 ± 6'6	0'51 ± 0'07	3'4 ± 0'8	
48	105'8 ± 9'5	0'51 ± 0'07	8'7 ± 3'2	
96	91'2 ± 7'4	0'41 ± 0'02	5'3 ± 0'7	
CON GLUCOSA				
0	114'8 ± 15'8	0'43 ± 0'02	17'9 ± 2'7	p < 0'01
24	107'9 ± 13'0	0'36 ± 0'01	21'6 ± 3'3	p < 0'0005
48	125'8 ± 10'2	0'45 ± 0'02	32'5 ± 2'7	p < 0'0005
96	142'0 ± 9'9	0'49 ± 0'02	38'5 ± 5'4	p < 0'005

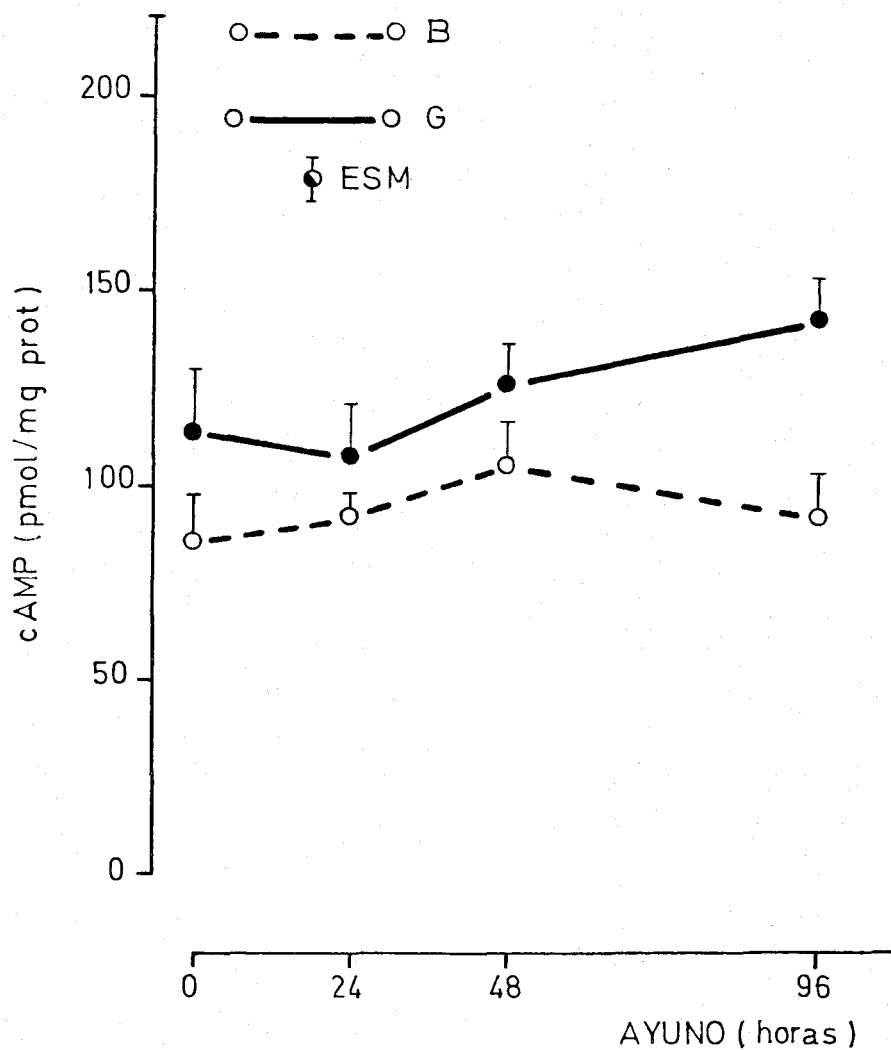


Fig.30. Acción de la glucosa (5 mM) sobre los niveles de cAMP del tejido adiposo en ratas alimentadas y durante el ayuno.

B: niveles basales de cAMP.

G: niveles de cAMP en presencia de glucosa.

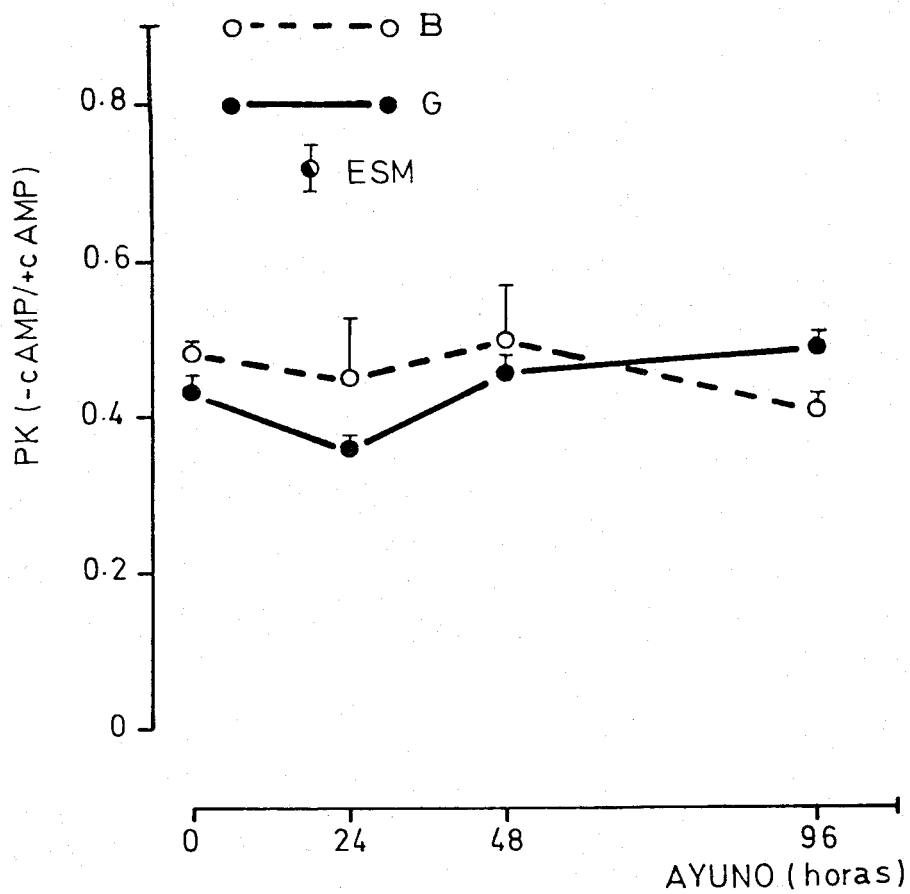


Fig.31. Acción de la glucosa (5 mM) sobre la actividad de la proteína quinasa de tejido adiposo en ratas alimentadas y durante el ayuno.

B: actividad basal de la proteína quinasa.
 G: actividad de la proteína quinasa en presencia de glucosa.

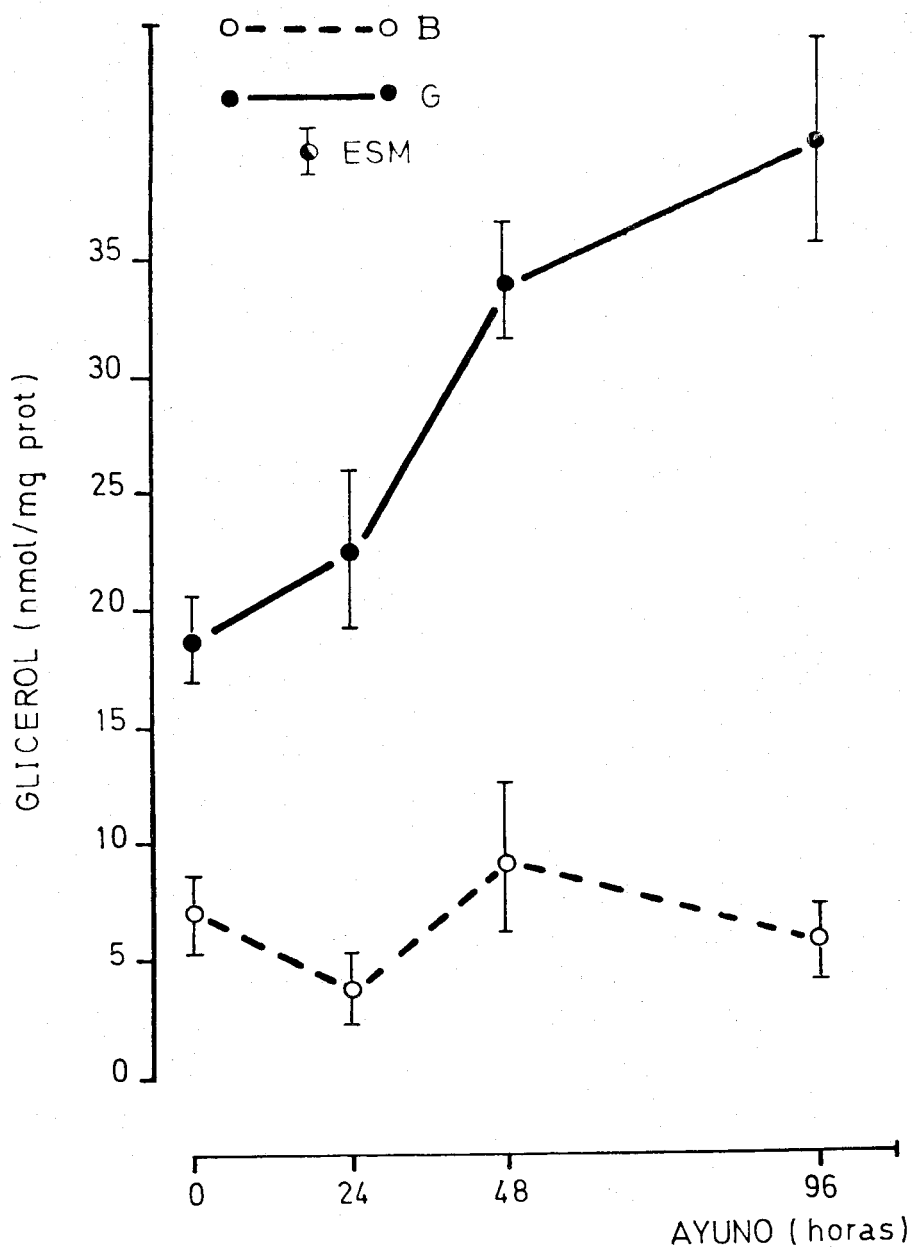


Fig.32. Acción de la glucosa (5 mM) sobre los niveles de glicerol liberados al medio de incubación por el tejido adiposo en el grupos de ratas alimentadas y durante el ayuno.
 B: niveles basales de glicerol liberado.
 G: niveles de glicerol liberado en presencia de glucosa.

9. ACCION DE LA ADRENALINA SOBRE LOS NIVELES DE cAMP, LA ACTIVIDAD DE LA PROTEINA QUINASA Y LA LIPOLISIS EN TEJIDO GRASO INCUBADO EN PRESENCIA DE GLUCOSA, EN ANIMALES ALIMENTADOS Y DURANTE EL AYUNO.

El tejido graso de animales alimentados y sometidos a 24, 48 y 96 h de ayuno, se preincubó durante 15 min en presencia de glucosa (5 mM). Posteriormente se incubó durante 10 min con glucosa (5 mM), en ausencia y en presencia de adrenalina (11 μ M). En el medio de incubación se determinó el glicerol liberado, como índice lipolítico. El tejido se homogenizó, se centrifugó y en el infranadante obtenido se determinaron los niveles de cAMP y la actividad de la proteína quinasa.

Las experiencias en las que el tejido graso se preincubó e incubó en presencia sólo de glucosa, en el grupo de animales alimentados y en los distintos días de ayuno, nos sirvieron como controles.

En la tabla (19) y figura (33) se representan los niveles de cAMP (pmoles/mg prot) inducidos por la acción de la adrenalina y glucosa frente a los obtenidos en sus controles respectivos, en el grupo de animales alimentados y durante el ayuno.

Se observa que la adrenalina produce un incremento significativo con respecto a sus controles en los niveles de cAMP, en el grupo de animales alimentados (de 114 \pm 15'8

a 175 ± 17.1 , ($p < 0.05$) y en los sometidos a 48 h de ayuno (de 125 ± 10.3 a 228 ± 19 , ($p < 0.0005$) y a 96 h de ayuno (de 142 ± 9.9 a 271 ± 32.0 ($p < 0.0005$).

La adrenalina no provocó diferencias significativas en los niveles de cAMP en el grupo de animales sometidos a 24 h de ayuno con respecto a sus controles.

En la tabla (20) y figura (34) se representa la actividad de la proteína quinasa (-cAMP/+cAMP) en presencia de glucosa y adrenalina frente a sus controles respectivos, en los animales alimentados y durante el ayuno. Se observa que la adrenalina aumenta significativamente la actividad de la proteína quinasa en los animales alimentados (de 0.43 ± 0.02 a 0.56 ± 0.02 ($p < 0.0005$), ayunados 24h (de 0.36 ± 0.01 a 0.48 ± 0.02 ($p < 0.0005$), ayunados 48 h (de 0.45 ± 0.02 a 0.63 ± 0.02 ($p < 0.0005$) y en los ayunados 96 h (de 0.49 ± 0.02 a 0.61 ± 0.01 , ($p < 0.0005$).

En las tablas (21 y 22) se recogen los datos obtenidos al estudiar la actividad específica de la proteína quinasa de tejido adiposo incubado con glucosa y adrenalina frente a la obtenida en los grupos controles respectivos. La actividad específica del enzima en ausencia y en presencia de cAMP exógeno se expresa como U/mg de proteína.

Se observa que en presencia de cAMP exógeno, la actividad específica del enzima, incubada con adrenalina, no varía significativamente con respecto a sus controles ,
figura (35).

En ausencia de cAMP exógeno, la adrenalina aumenta significativamente la actividad específica de la proteína quinasa con respecto a sus controles, en los naimales alimentados y en los sometidos a 24 y 48 h de ayuno,
figura (36).

En la tabla (23) y figura (37) se representa la lipólisis en el tejido adiposo incubado con adrenalina frente a sus controles, en los animales alimentados y durante el ayuno. La adrenalina aumenta significativamente el glicerol liberado al medio en el grupo de animales alimentados y tras un ayuno de 24 y 48 h. En el grupo de animales sometidos a 96 h de ayuno la adrenalina no produce diferencias significativas.

TABLA N° 19

Acción de la adrenalina (11 μ M) sobre los niveles de cAMP de tejido graso incubado con glucosa (5 mM), en el grupo control y durante el ayuno. Los resultados se expresan en pmol/mg prot.

<u>Horas ayuno</u>	<u>n</u>	<u>cAMP</u> <u>+ glucosa</u>	<u>cAMP</u> <u>+glucosa+adrenalina</u>	<u>P<</u>
0	6	114'5 \pm 15'8	175'8 \pm 17'1	0'05
24	8	107'9 \pm 13'5	147'8 \pm 22'0	N.S.
48	8	125'3 \pm 10'3	228'3 \pm 19'0	0'0005
96	8	142'0 \pm 9'9	237'0 \pm 32'0	0'0005

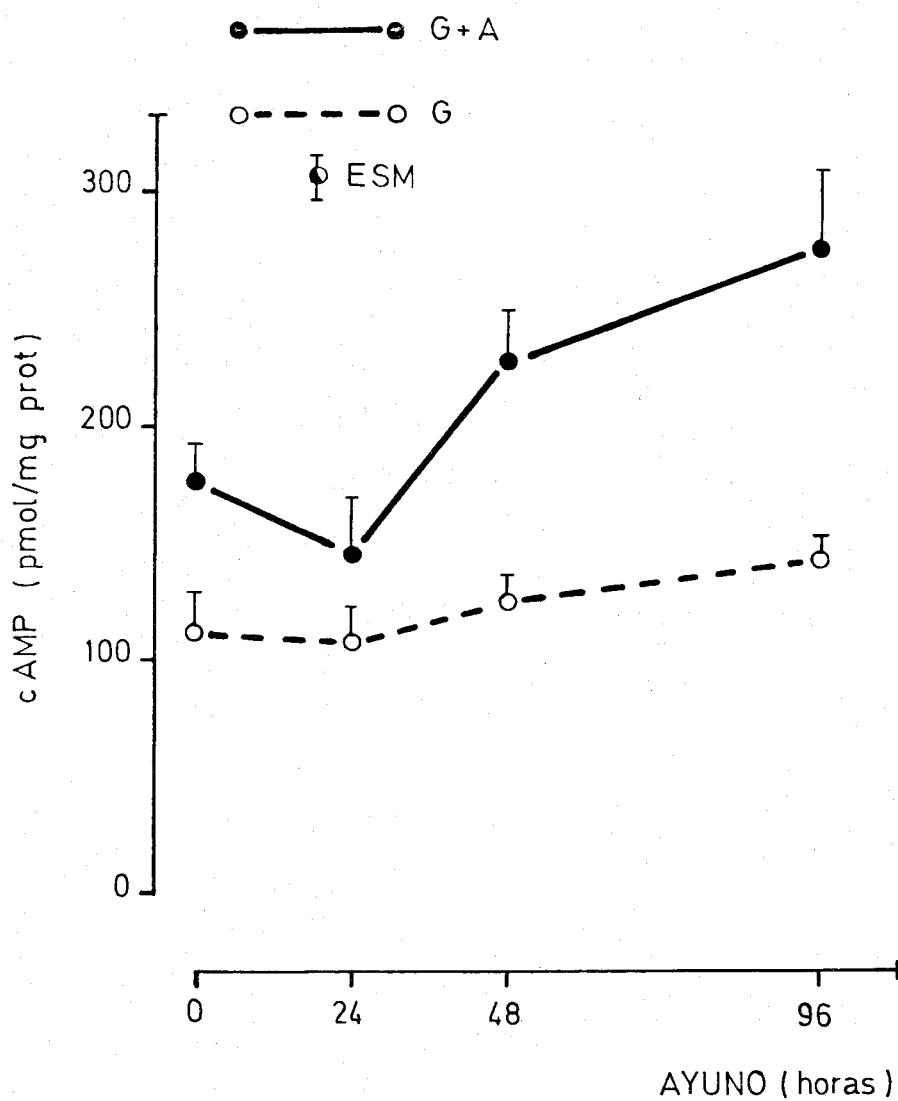


Fig.33. Acción de la adrenalina ($11 \mu\text{M}$) sobre los niveles de cAMP de tejido graso incubado con glucosa (5 mM), en el grupo de ratas alimentadas y durante el ayuno.

G: niveles de cAMP en presencia de glucosa.

G + A: niveles de cAMP en presencia de glucosa y adrenalina.

TABLA N° 20

Acción de la adrenalina (11 μ M) sobre la actividad de la proteína quinasa de tejido graso incubado con glucosa (5 mM) en el grupo control y durante el ayuno.

<u>Horas ayuno</u>	<u>n</u>	PK + glucosa <u>(-cAMP/+cAMP)</u>	PK +glucosa+adrenalina <u>(-cAMP/+cAMP)</u>	<u>P <</u>
0	6	0'43 \pm 0'02	0'56 \pm 0'02	0'0005
24	4	0'36 \pm 0'01	0'48 \pm 0'02	0'0005
48	6	0'45 \pm 0'02	0'63 \pm 0'02	0'0005
96	4	0'49 \pm 0'02	0'61 \pm 0'008	0'0005

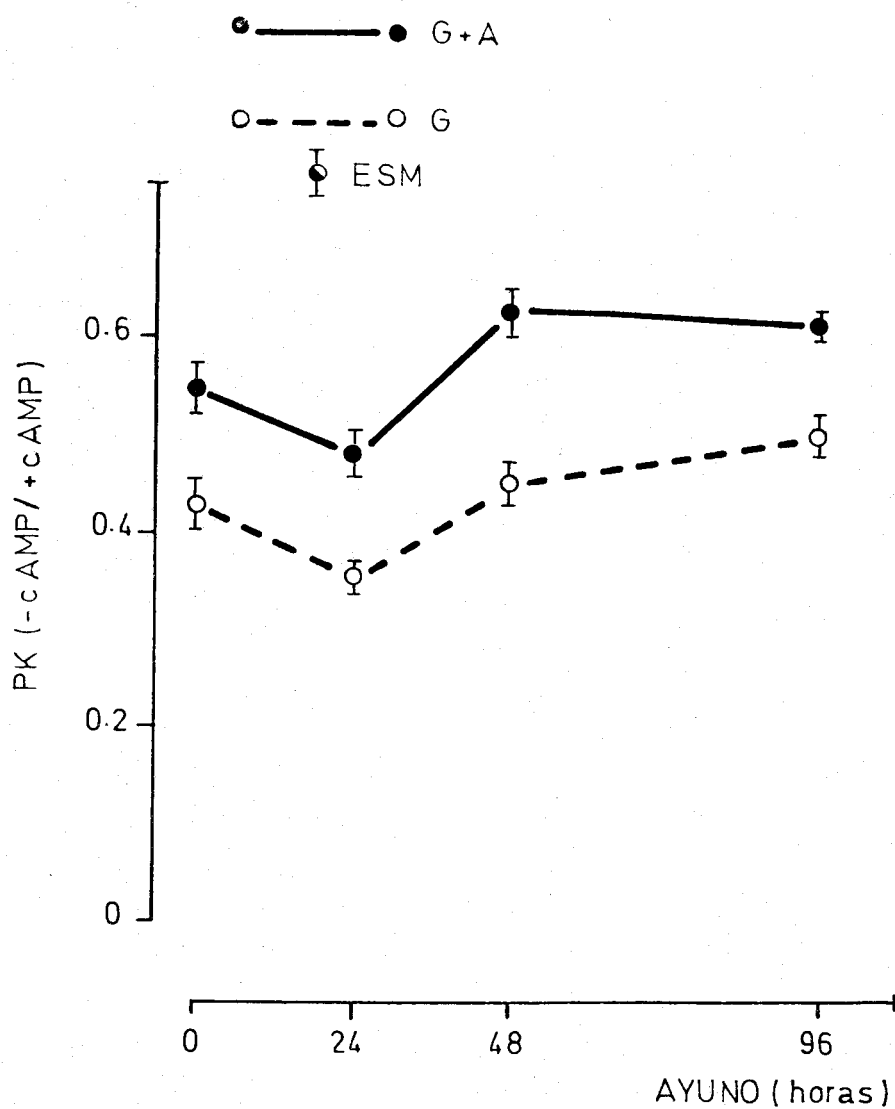


Fig.34. Acción de la adrenalina ($11 \mu\text{M}$) sobre la actividad de la proteína quinasa de tejido adiposo incubado con glucosa (5 mM), en el grupo control y durante el ayuno.

G: actividad de la proteína quinasa en presencia de glucosa.

G + A: actividad de la proteína quinasa en presencia de glucosa y adrenalina.

TABLA N° 21

Acción de la adrenalina (11 μ M) sobre la actividad específica de la proteína quinasa (+cAMP) de tejido graso incubado con glucosa (5 mM) en el grupo control y durante el ayuno. Los resultados se expresan en U/mg prot.

<u>Ayuno (horas)</u>	<u>n</u>	<u>PK(+cAMP) + glucosa</u>	<u>PK (+cAMP) +glucosa+adrenalina</u>	<u>P <</u>
0	6	265'3 \pm 15'5	255'1 \pm 19'6	N.S.
24	4	305'0 \pm 15'6	332'5 \pm 30'2	N.S.
48	6	382'2 \pm 20'0	370'4 \pm 18'5	N.S.
96	6	307'5 \pm 50'0	308'2 \pm 40'2	N.S.

TABLA N° 22

Acción de la adrenalina (11 μ M) sobre la actividad específica de la proteína quinasa (-cAMP) de tejido graso incubado con glucosa (5 mM) en el grupo control y durante el ayuno. Los resultados se expresan en U/mg prot.

<u>Ayuno (horas)</u>	<u>n</u>	<u>PK (-cAMP) + glucosa</u>	<u>PK (-cAMP) +glucosa+adrenalina</u>	<u>P <</u>
0	6	112'0 \pm 6'7	146'0 \pm 12'0	0'0125
24	4	109'7 \pm 6'8	163'5 \pm 14'7	0'005
48	6	175'5 \pm 14'8	231'8 \pm 11'1	0'005
96	4	154'0 \pm 30'0	181'5 \pm 33'0	N.S.

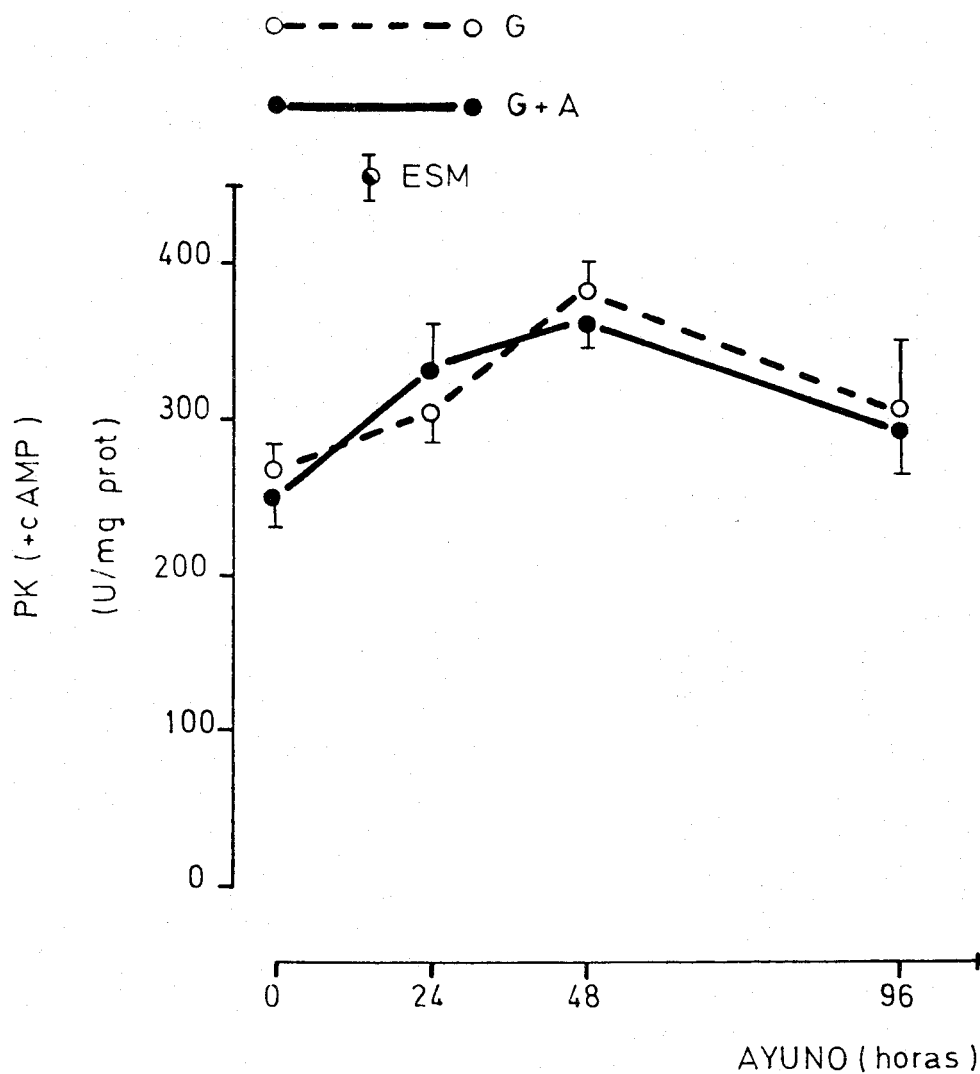


Fig.35. Acción de la adrenalina ($11 \mu\text{M}$) sobre la actividad específica de la proteína quinasa (+ cAMP), de tejido graso incubado con glucosa (5 mM) en ratas alimentadas y durante el ayuno.

G: actividad específica de la proteína quinasa en presencia de glucosa.

G+A: actividad específica de la proteína quinasa en presencia de glucosa y adrenalina.

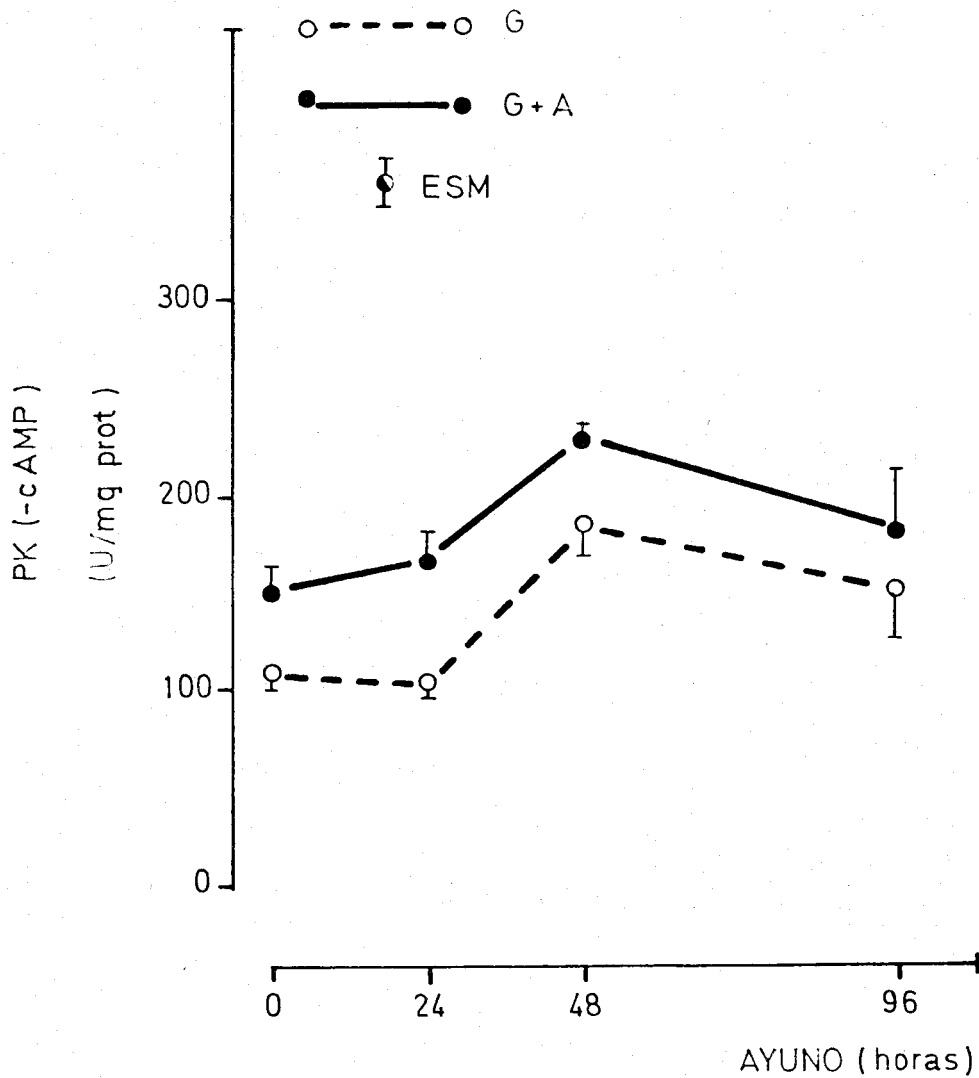


Fig.36. Acción de la adrenalina ($11 \mu\text{M}$) sobre la actividad específica de la proteína quinasa (-cAMP) de tejido graso incubado con glucosa (5 mM), en ratas alimentadas y durante el ayuno.

G: actividad específica de la proteína quinasa en presencia de glucosa.

G+A: actividad específica de la proteína quinasa en presencia de glucosa y adrenalina.

TABLA N°23

Acción de la adrenalina (11 μ M) sobre los niveles de glicerol liberados al medio por el tejido adiposo incubado en presencia de glucosa (5 mM) en el grupo control y durante el ayuno. Los resultados se expresan en nmol/mg prot.

<u>Ayuno (horas)</u>	<u>n</u>	<u>glicerol + glucosa</u>	<u>glicerol +glucosa+adrenalina</u>	<u>P<</u>
0	6	17'9 \pm 2'7	38'0 \pm 3'6	0'0005
24	4	21'6 \pm 3'3	49'7 \pm 11'7	0'05
48	6	32'5 \pm 2'7	91'8 \pm 4'8	0'0005
96	4	38'5 \pm 5'4	42'7 \pm 3'9	N.S.

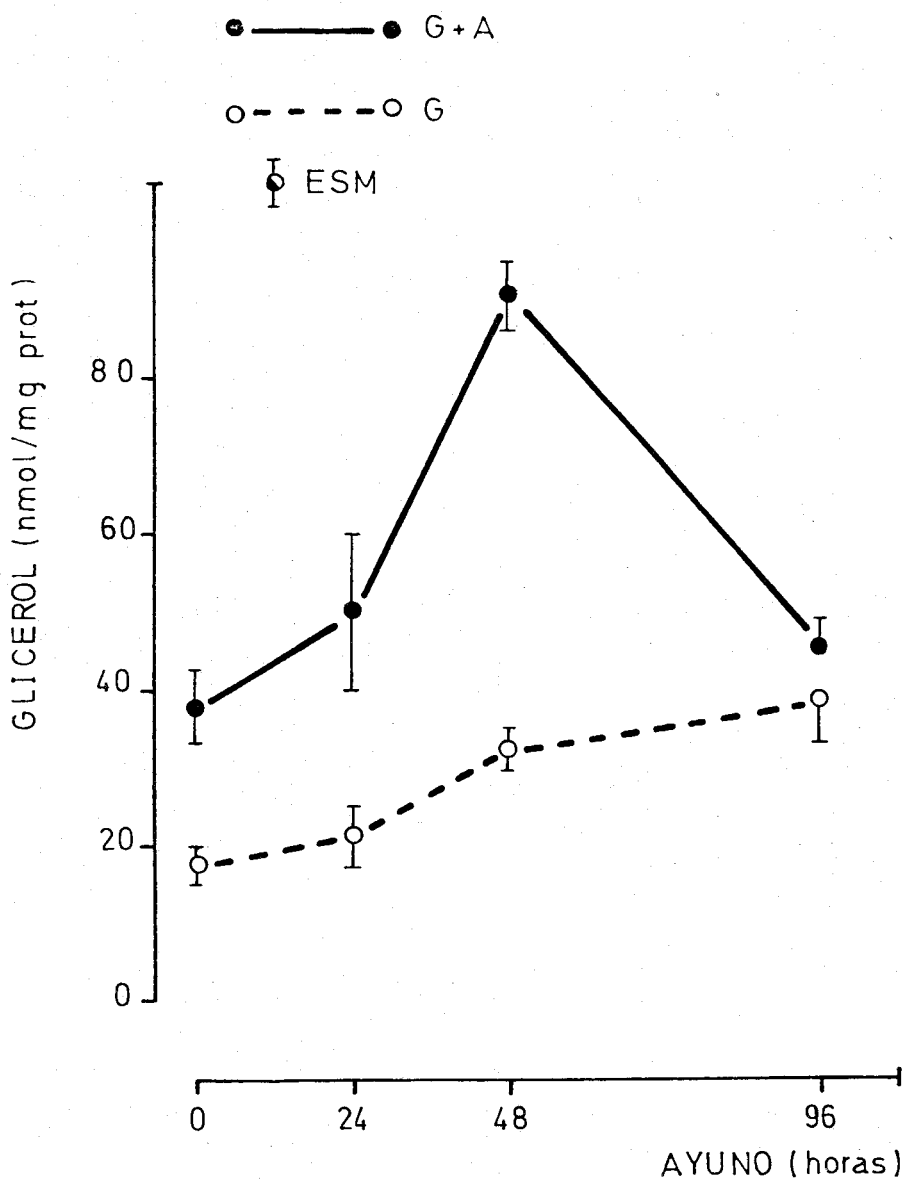


Fig.37. Acción de la adrenalina ($11 \mu\text{M}$) sobre los niveles de glicerol liberado al medio por el tejido adiposo incubado en presencia de glucosa (5 mM), en el grupo control y durante el ayuno.

G: niveles de glicerol liberados en presencia de glucosa.

G+A: niveles de glicerol liberados en presencia de glicerol y adrenalina.

10. ACCION DE LA IODOACETAMIDA Y LA OLIGOMICINA SOBRE LOS NIVELES DE cAMP, LA ACTIVIDAD DE LA PROTEINA QUINASA Y LA LIPOLISIS DE TEJIDO GRASO INCUBADO EN PRESENCIA DE GLUCOSA Y ADRENALINA EN ANIMALES ALIMENTADOS.

El tejido graso epididimal de animales alimentados se preincubó durante 15 min en presencia de glucosa 5 mM y de iodoacetamida 1 mM o de oligomicina 40 $\mu\text{g/ml}$ y se incubó durante 10 min en presencia de adrenalina 11 μM y glucosa más iodoacetamida u oligomicina.

Paralelamente a estas experiencias se realizaron otras en las que el tejido se preincubó en presencia de glucosa 5 mM y se incubó con adrenalina, sirviendo como controles. En el medio de incubación se determinó el glicerol liberado como índice lipolítico. El tejido se homogenizó, se centrifugó y en el infranadante obtenido se determinaron los niveles de cAMP y la actividad de la proteína quinasa.

En la tabla (24) y figura (38) se representan los niveles de cAMP (pmoles/mg de proteína) en el grupo control y los producidos en presencia de iodoacetamida y en presencia de oligomicina. Se observó que la iodoacetamida produce una disminución significativa en los niveles de cAMP con respecto a los controles (de 175 ± 13.2 a 56 ± 5.3 , $p < 0.0005$). La oligomicina también disminuyó significativamente los niveles de cAMP

con respecto a los controles ($175 \pm 13'2$ a $84 \pm 6'2$, $p < 0'0005$). Si se compara entre si el efecto de la iodoacetamida y oligomicina, se puede observar que la iodoacetamida produce una disminución significativa en los niveles de cAMP con respecto a los producidos en presencia de oligomicina ($84 \pm 6'3$ a $56 \pm 5'3$ $p < 0'0005$).

En la tabla (25) y figura (39) representamos la actividad de la proteína quinasa en forma de cociente -cAMP/+cAMP, en el grupo control y en presencia de iodoacetamida u oligomicina. Tanto la iodoacetamida como la oligomicina provocaron una disminución significativa con respecto a los controles en la actividad de la proteína quinasa ($p < 0'05$ en ambos casos).

En la tabla (26) y figura (40) se representa la acción de la iodoacetamida y la oligomicina sobre la lipólisis. Se puede observar que la iodoacetamida disminuye significativamente el glicerol liberado al medio ($p < 0'025$) con respecto a los controles. La oligomicina produce una disminución de la lipólisis con respecto a los controles, más significativa que la anterior ($p < 0'0005$).

Si se comparan ambos efectos entre si, se puede observar que la oligomicina disminuye significativamente ($p < 0'005$) los niveles de glicerol liberados con respecto a los obtenidos en presencia de iodoacetamida.

TABLA N° 24

Acción de la iodoacetamida (1 mM) y la oligomicina (40 μ g/ml) sobre los niveles de cAMP de tejido adiposo incubado en presencia de glucosa (5mM) y adrenalina (11 μ M), en animales alimentados. Los resultados se expresan en pmol/mg prot.

	<u>cAMP</u>	<u>n</u>	<u>P<</u>
G + A	175'2 \pm 13'2	6	-
G + A + Iod.	56'2 \pm 5'3	5	0'0005
G + A + Olig.	84'1 \pm 6'1	4	0'0005

TABLA N° 25

Acción de la iodoacetamida (1mM) y la oligomicina sobre la actividad de la proteína quinasa (-cAMP/+cAMP) de tejido graso incubado en presencia de glucosa (5mM) y adrenalina (11 μ M), en animales alimentados.

	<u>PK</u> <u>(-cAMP/+cAMP)</u>	<u>n</u>	<u>P<</u>
G + A	0'62 \pm 0'03	6	-
G + A + Iod.	0'53 \pm 0'03	5	0'05
G + A + Olig.	0'54 \pm 0'03	4	0'05

G: glucosa; A: adrenalina; Iod: iodoacetamida;

Olig: oligomicina.

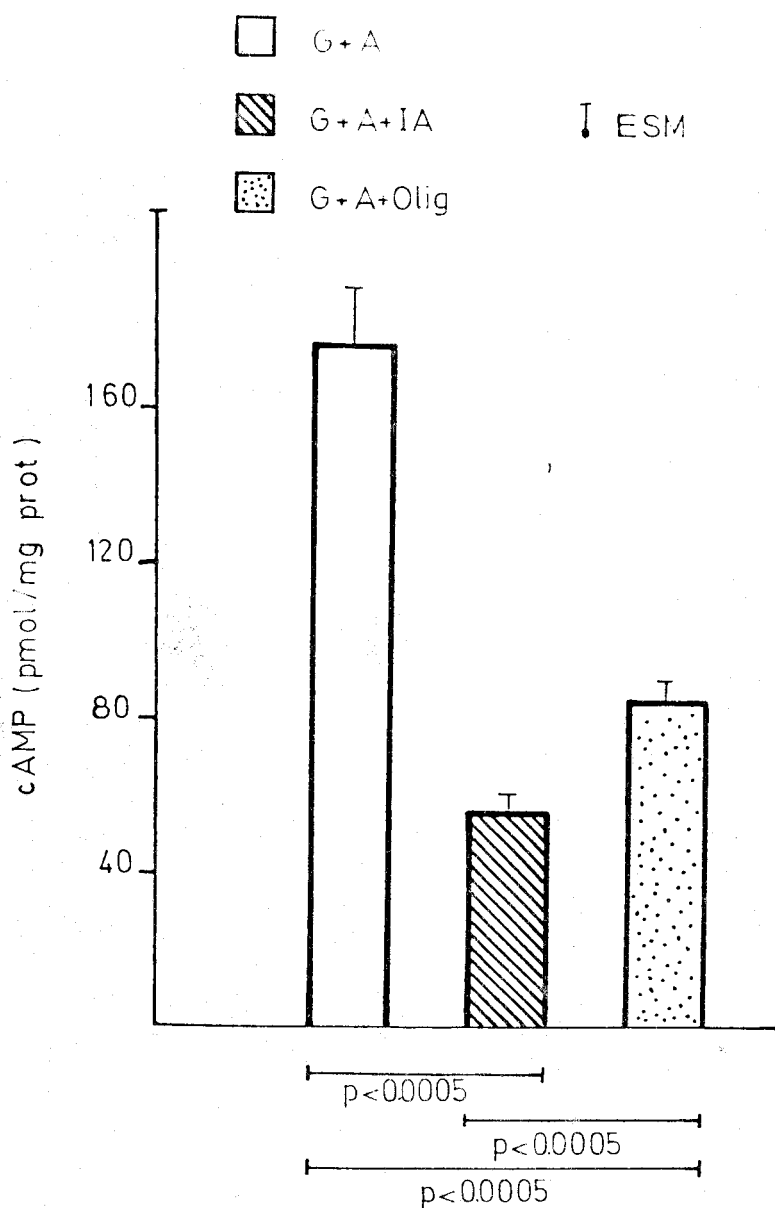


Fig.38. Acción de la iodoacetamida y oligomicina sobre los niveles de cAMP de tejido adiposo incubado en presencia de glucosa (5 mM) y adrenalina (11 μ M), en ratas alimentadas.
 G: glucosa; A: adrenalina; Iod: iodoacetamida; Oli: oligomicina.

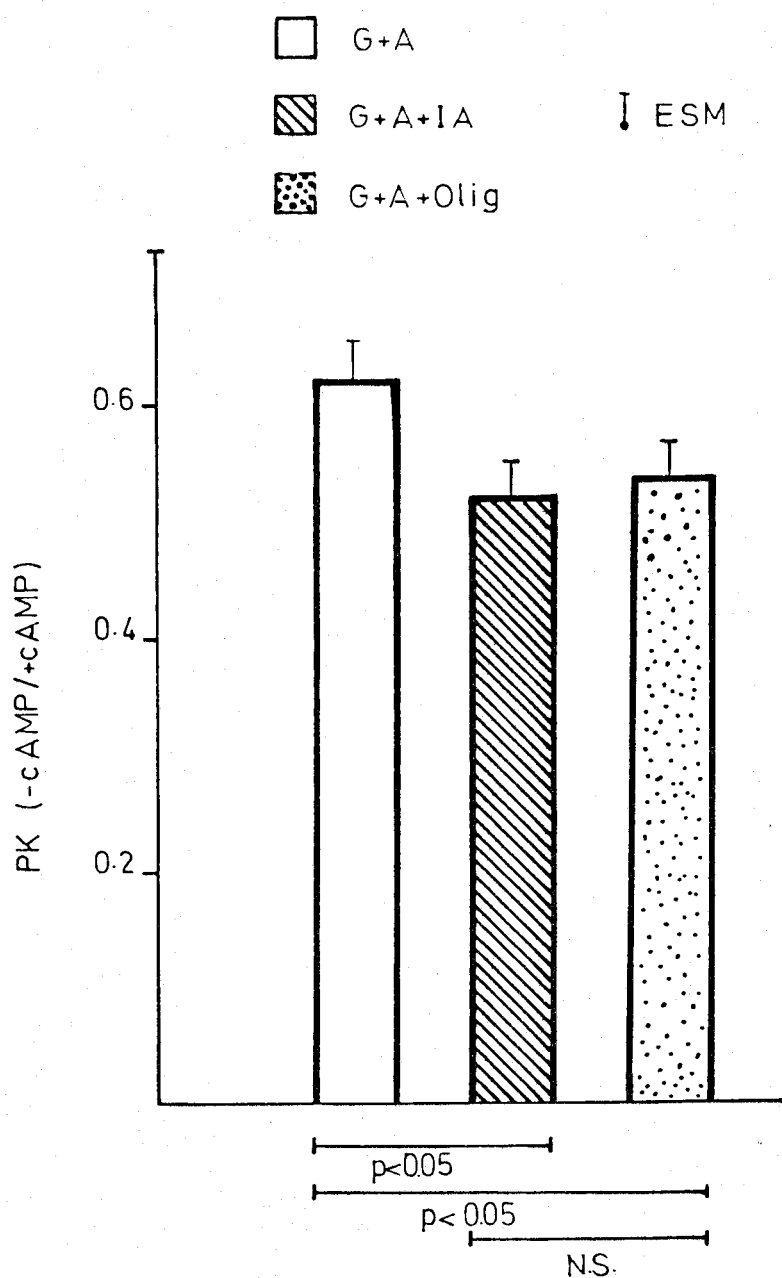


Fig.39. Acción de la iodoacetamida y la oligomicina sobre la actividad de la PK (-cAMP/+cAMP) de tejido graso incubado en presencia de glucosa (5 mM) y adrenalina (11 μ M), en ratas alimentadas.

G: glucosa; A: adrenalina; Iod: iodoacetamida; Olig: oligomicina.

TABLA N° 26

Acción de la iodoacetamida (1 mM) y la oligomicina (40 μ g/ml) sobre el grado de lipólisis (glicerol liberado al medio) del tejido adiposo incubado en presencia de glucosa (5 mM) y adrenalina (11 μ M), en grupos control. Los resultados se expresan en nmol/mg prot.

	<u>glicerol</u>	<u>n</u>	<u>P<</u>
G + A	41'0 \pm 2'1	6	-
G + A + Iod.	34'2 \pm 2'5	5	0'025
G + A + Olig.	22'8 \pm 2'1	4	0'0005

G: glucosa; A: adrenalina; Iod: iodoacetamida;

Olig: oligomicina.

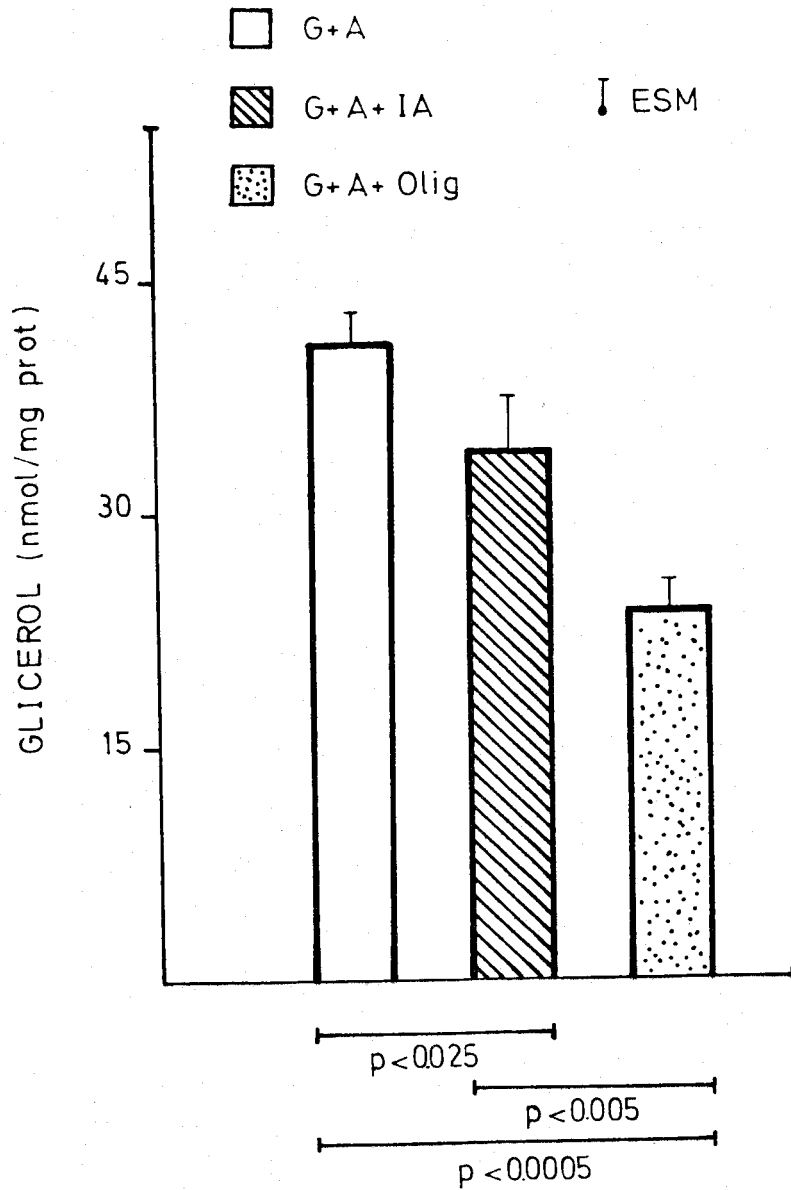


Fig. 40. Acción de la iodoacetamida y oligomicina sobre el grado de lipólisis (glicerol liberado) del tejido adiposo incubado en presencia de glucosa (5 mM) y adrenalina (11 μ M), en ratas alimentadas.

G: glucosa; A: adrenalina; Iod: iodoacetamida; Olig: oligomicina.

11. ACCION DE LA OLIGOMICINA Y LA IODOACETAMIDA SOBRE LOS NIVELES DE cAMP, LA ACTIVIDAD DE LA PROTEINA QUINASA Y LA LIPOLISIS DE TEJIDO GRASO DE ANIMALES SOMETIDOS A 48 H DE AYUNO INCUBADO EN PRESENCIA DE GLUCOSA Y ADRENALINA.

El tejido graso epididimal de animales sometidos a 48 h de ayuno, se preincubó durante 15 min en presencia de glucosa 5 mM y de iodoacetamida, 1 mM o de oligomicina 40 µg/ml y se incubó durante 10 min en presencia de adrenalina 11 µM, más glucosa, iodoacetamida y oligomicina. Paralelamente a estas experiencias, se realizaron otras en las que el tejido graso de animales sometidos a 48 h de ayuno se preincubó en presencia de glucosa 5 mM y se incubó con adrenalina más glucosa, sirviendo como control.

En la tabla (27) y figura (41) se representan los niveles de cAMP (pmol/mg de proteína) en el grupo control y los producidos en presencia de iodoacetamida y en presencia de oligomicina. Se observó que la iodoacetamida produce una disminución significativa en los niveles de cAMP con respecto a los controles (de 218 ± 8.9 a 126 ± 10.5 pmoles/mg de proteína, $p < 0.0005$).

La oligomicina también disminuyó significativamente los niveles de cAMP con respecto a los controles (de 218 ± 8.9 a 185 ± 8.6 pmoles/mg de proteína $p < 0.0025$). Si se

compara entre sí el efecto de la iodoacetamida y la oligomicina, se observa que la iodoacetamida produce una disminución significativa ($p < 0'01$) en los niveles de cAMP con respecto a los producidos en presencia de oligomicina.

En la tabla (28) y figura (42) representamos la actividad de la proteína quinasa (-cAMP/+cAMP) en el grupo control y en presencia de iodoacetamida y oligomicina. La iodoacetamida produce una disminución significativa en la actividad de la enzima con respecto a los controles ($p < 0'0005$) y con la actividad de la proteína quinasa en presencia de oligomicina ($p < 0'0025$). La oligomicina a su vez disminuyó levemente la actividad de la proteína quinasa con respecto a los controles ($p < 0'05$).

En la tabla (29) y figura (43) se representa la acción de la iodoacetamida y oligomicina sobre la lipólisis. Se observa que la oligomicina disminuye significativamente los niveles de glicerol liberado con respecto a los controles ($p < 0'0005$) y con respecto a los producidos en presencia de iodoacetamida ($p < 0'005$). La iodoacetamida a su vez disminuye significativamente los niveles de glicerol liberado al medio de incubación con respecto a los controles ($p < 0'0125$).

En las tablas (30, 31 y 32) resumimos los datos obtenidos al estudiar la acción de la iodoacetamida 1 mM y de la

oligomicina 40 $\mu\text{g/ml}$ sobre los niveles de cAMP, la actividad de la proteína quinasa y la lipólisis de tejido graso incubado en presencia de adrenalina 11 μM y glucosa 5 mM, en animales alimentados y sometidos a 48 h de ayuno.

En las figuras (44 y 45) se representa el efecto inhibitorio de la iodoacetamida y de la oligomicina sobre los niveles de cAMP, la actividad de la proteína quinasa y la lipólisis en animales alimentados y en los ayunados durante 48 h. Los resultados se expresan en % de los controles (valores obtenidos en experiencias realizadas sin iodoacetamida o sin oligomicina). Se observa que la inhibición producida por la iodoacetamida sobre los niveles de cAMP en el grupo de animales alimentados, es significativamente mayor que en el grupo de animales sometidos a ayuno. La inhibición producida sobre la actividad de la proteína quinasa y la lipólisis fue semejante en el grupo de animales alimentados y en los sometidos a ayuno.

La inhibición producida por la oligomicina sobre los niveles de cAMP y la lipólisis fue significativamente mayor en el grupo de animales alimentados que en los sometidos a 48 h de ayuno. Sobre la actividad de la proteína quinasa, la oligomicina produjo una inhibición semejante en el grupo de animales alimentados y en los sometidos a ayuno.

TABLA N° 27

Acción de la iodoacetamida (1mM) y de la oligomicina (40 μ g/ml) sobre los niveles de cAMP de tejido adiposo incubado en presencia de glucosa (5mM) y adrenalina (11 μ M) de animales sometidos a 48 h de ayuno. Los resultados se expresan en pmol/mg prot.

	<u>cAMP</u>	<u>n</u>	<u>P</u>
G + A	218 \pm 8'9	5	-
G + A + Iod.	126 \pm 10'5	5	0'0005
G + A + Olig.	185 \pm 8'6	5	0'01

TABLA N° 28

Acción de la iodoacetamida (1mM) y de la oligomicina (40 μ g/ml) sobre la actividad de la proteína quinasa de tejido adiposo incubado en presencia de glucosa (5mM) y adrenalina (11 μ M) de animales sometidos a 48 h de ayuno.

	<u>PK</u> <u>(-cAMP/+cAMP)</u>	<u>n</u>	<u>P</u>
G + A	0'69 \pm 0'01	5	-
G + A + Iod.	0'48 \pm 0'03	5	0'0005
G + A + Olig.	0'64 \pm 0'02	5	0'05

G: glucosa; A: adrenalina; Iod: iodoacetamida;

Olig: oligomicina.

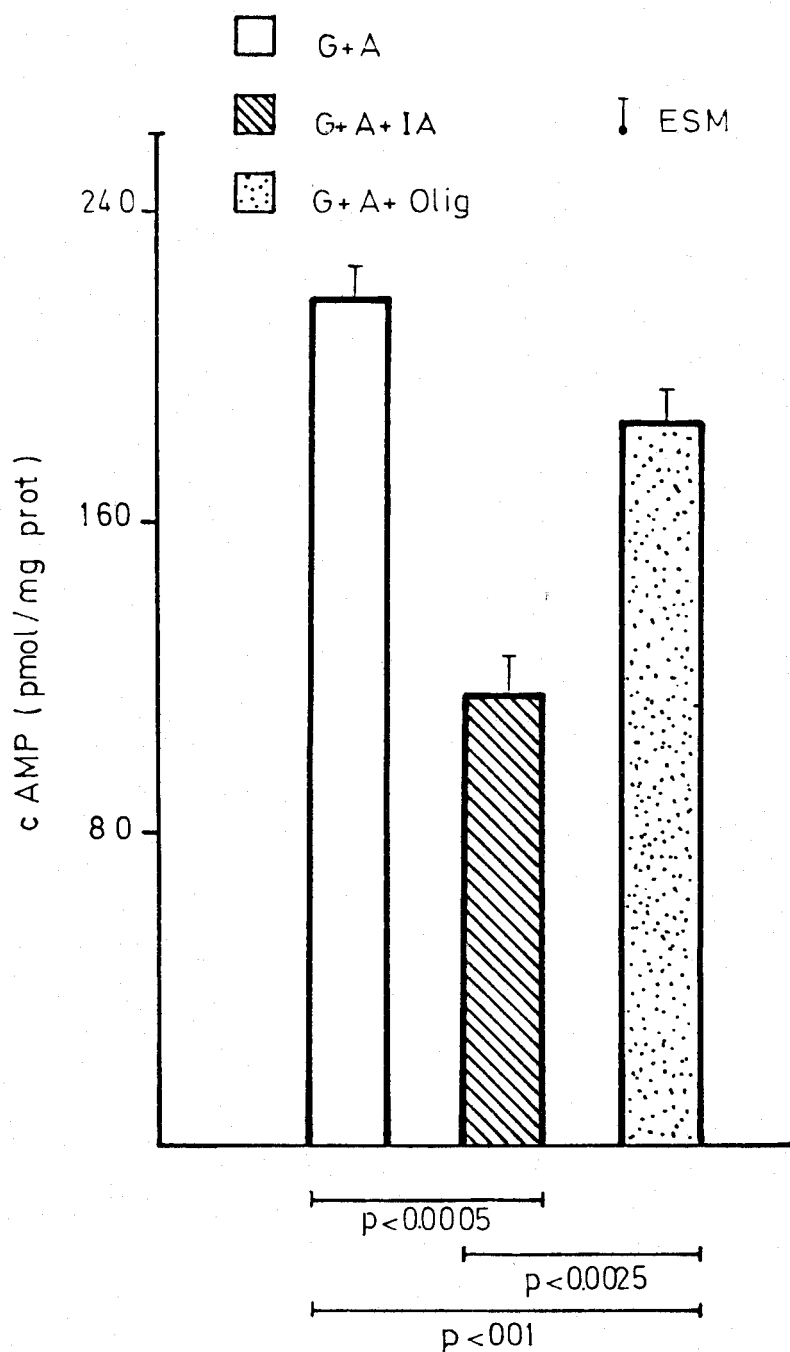


Fig.41. Acción de la iodoacetamida y la oligomicina sobre los niveles de cAMP de tejido adiposo incubado en presencia de glucosa (5 mM) y adrenalina (11 μ M), de ratas sometidas a 48 h de ayuno.
 G: glucosa; A: adrenalina; Iod: iodoacetamida; Olig: oligomicina.

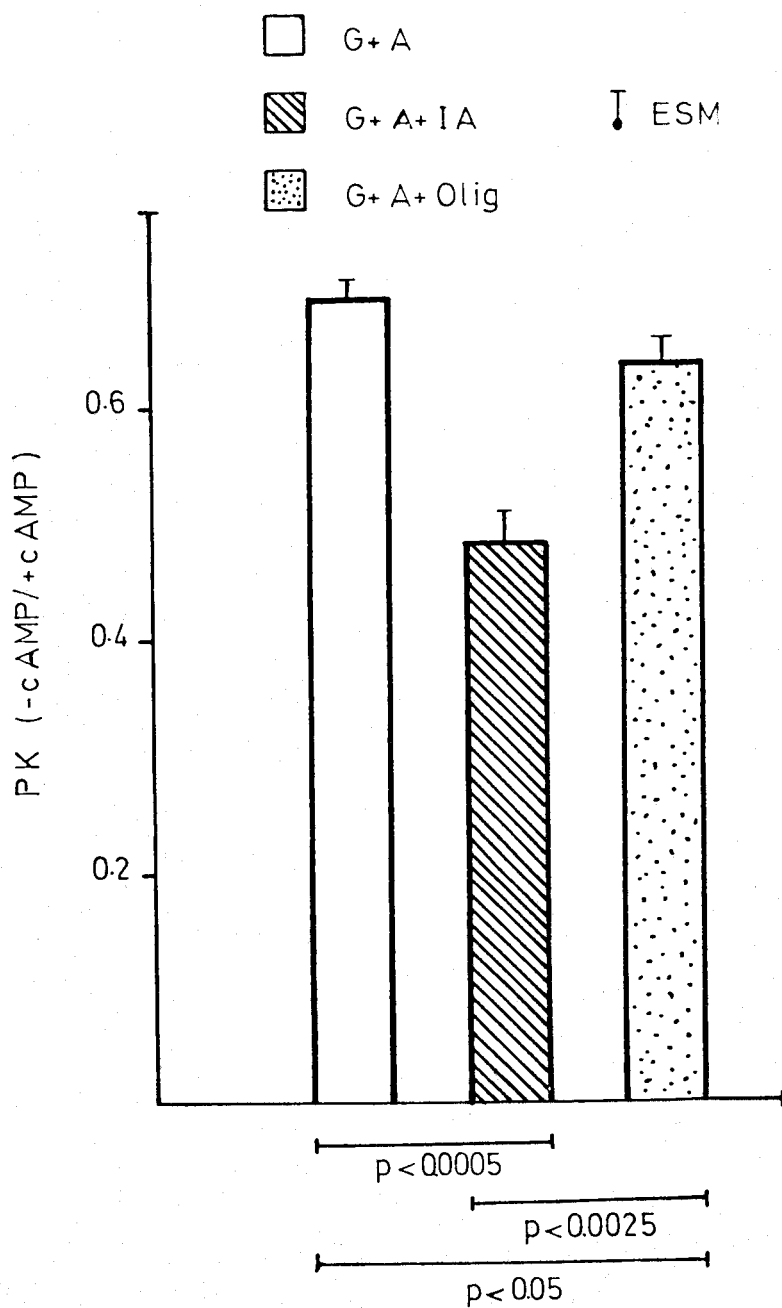


Fig.42. Acción de la iodoacetamida y la oligomicina sobre la actividad de la PK (-cAMP/+cAMP) de tejido adiposo incubado en presencia de glucosa (5 mM) y adrenalina (11 μ M) de ratas sometidas a 48 h de ayuno.

G: glucosa; A: adrenalina; Iod: iodoacetamida; Olig: oligomicina.

TABLA N°29

Acción de la iodoacetamida (1 mM) y de la oligomicina (40 μ g/ml) sobre el grado de lipólisis (glicerol liberado al medio) de tejido graso incubado en presencia de glucosa (5 mM) y adrenalina (11 μ M), de animales sometidos a 48 h de ayuno. Los resultados se expresan en nmol/mg prot.

	<u>glicerol</u>	<u>n</u>	<u>P<</u>
G + A	106'7 \pm 6'1	6	-
G + A + Iod.	81'3 \pm 5'0	6	0'005
G + A + Olig.	62'3 \pm 3'5	6	0'0005

G: glucosa; A: adrenalina; Iod: iodoacetamida;

Olig: oligomicina.

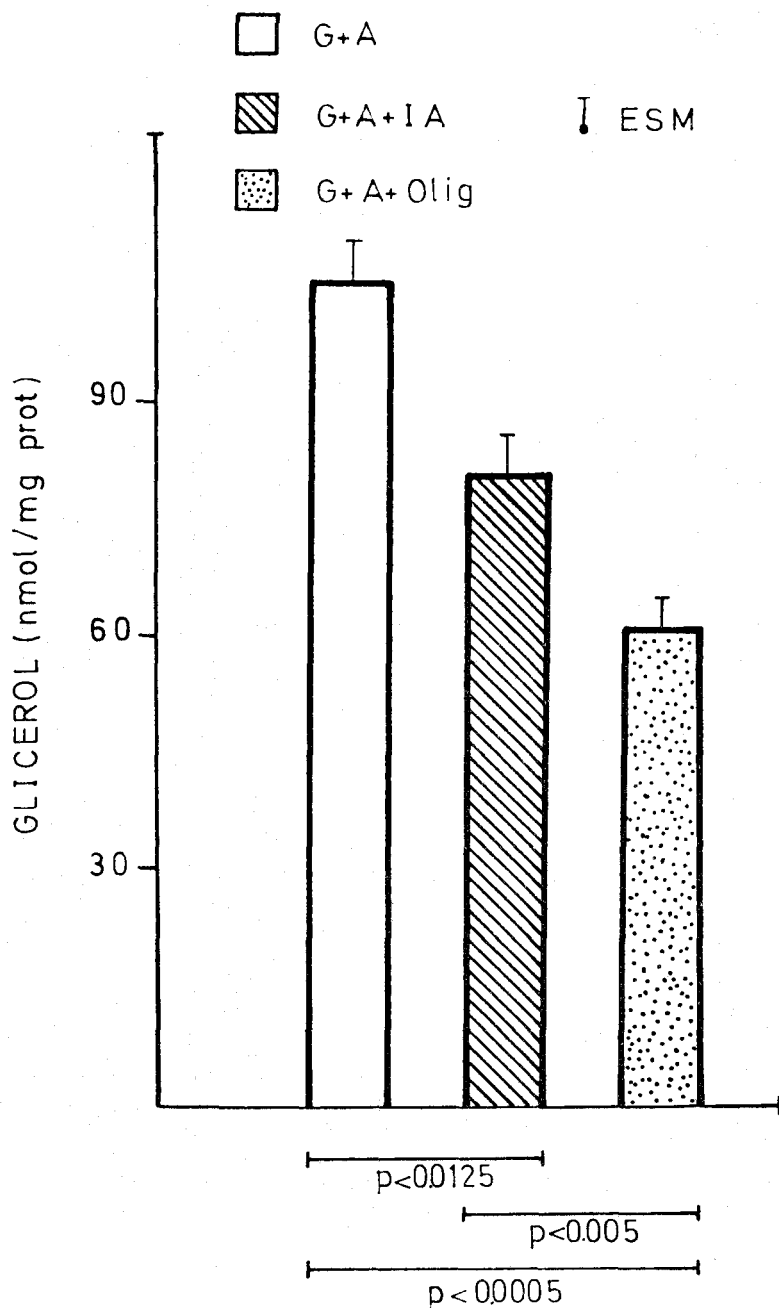


Fig.43. Acción de la iodoacetamida y la oligomicina sobre el grado de lipólisis (glicerol liberado) de tejido graso incubado en presencia de glucosa (5 mM) y adrenalina (11 μ M), de ratas sometidas a 48 h de ayuno.

G: glucosa; A: adrenalina; Iod: iodoacetamida; Olig: oligomicina.

TABLA N° 30

Acción de la iodoacetamida (1mM) y la oligomicina (40 $\mu\text{g/ml}$) sobre los niveles de cAMP producidos en presencia de glucosa (5 mM) y adrenalina (11 μM) por tejido graso de animales alimentados y sometidos a 48 h de ayuno. Los resultados se expresan en pmol/mg prot.

	<u>cAMP</u>	<u>% del control</u>
Alimentados	175'2 \pm 13'2	100
Alimentados + iodoacetamida (1mM).....	56'2 \pm 5'3	32 \pm 3'0
Alimentados + oligomicina (40 $\mu\text{g/ml}$)...	84'1 \pm 6'7	49 \pm 3'8
48 h de ayuno	218'0 \pm 8'9	100
48 h de ayuno + iodoacetamida (1mM).....	126'0 \pm 10'5	58 \pm 4'8
48 h de ayuno + oligomicina (40 $\mu\text{g/ml}$)...	185'0 \pm 8'6	95 \pm 4'6

TABLA N° 31

Acción de la iodoacetamida (1 mM) y la oligomicina (40 μ g/ml) sobre la actividad de la proteína quinasa expresada como cociente -cAMP/+cAMP, de tejido adiposo de animales alimentados y sometidos a 48 h de ayuno, incubado en presencia de glucosa (5 mM) y adrenalina (11 μ M). Los resultados se expresan como cociente -cAMP/+cAMP.

	<u>PK</u>	<u>% del control</u>
Alimentados	0'62 \pm 0'03	100
Alimentados + iodoacetamida (1mM)	0'53 \pm 0'03	84'8 \pm 4'8
Alimentados + oligomicina (40 μ g/ml)	0'54 \pm 0'03	86'5 \pm 4.8
48 h de ayuno	0'69 \pm 0'01	100
48 h de ayuno + iodoacetamida (1mM)	0'48 \pm 0'03	70 \pm 4'3
48 h de ayuno + oligomicina (40 μ g/ml)	0'64 \pm 0'02	91 \pm 2'8

TABLA N° 32

Acción de la iodoacetamida (1 mM) y de la oligomicina (40 $\mu\text{g/ml}$) sobre la lipólisis inducida en presencia de glucosa (5mM) y adrenalina (11 μM) de tejido graso de animales alimentados y sometidos a 48 h de ayuno. Los resultados se expresan en nmol/mg prot.

	<u>glicerol</u>	<u>% del control</u>
Alimentados	41'08 \pm 2'0	100
Alimentados + iodocetamida (1mM).....	34'27 \pm 2'4	84 \pm 5'8
Alimentados + oligomicina (40 $\mu\text{g/ml}$)....	22'87 \pm 2'1	45 \pm 5'1
48 h de ayuno	106'70 \pm 6'1	100
48 h de ayuno + iodoacetamida (1mM).....	81'32 \pm 5'0	77 \pm 4'6
48 h de ayuno + oligomicina (40 $\mu\text{g/ml}$)....	62'33 \pm 3'5	58 \pm 3'2

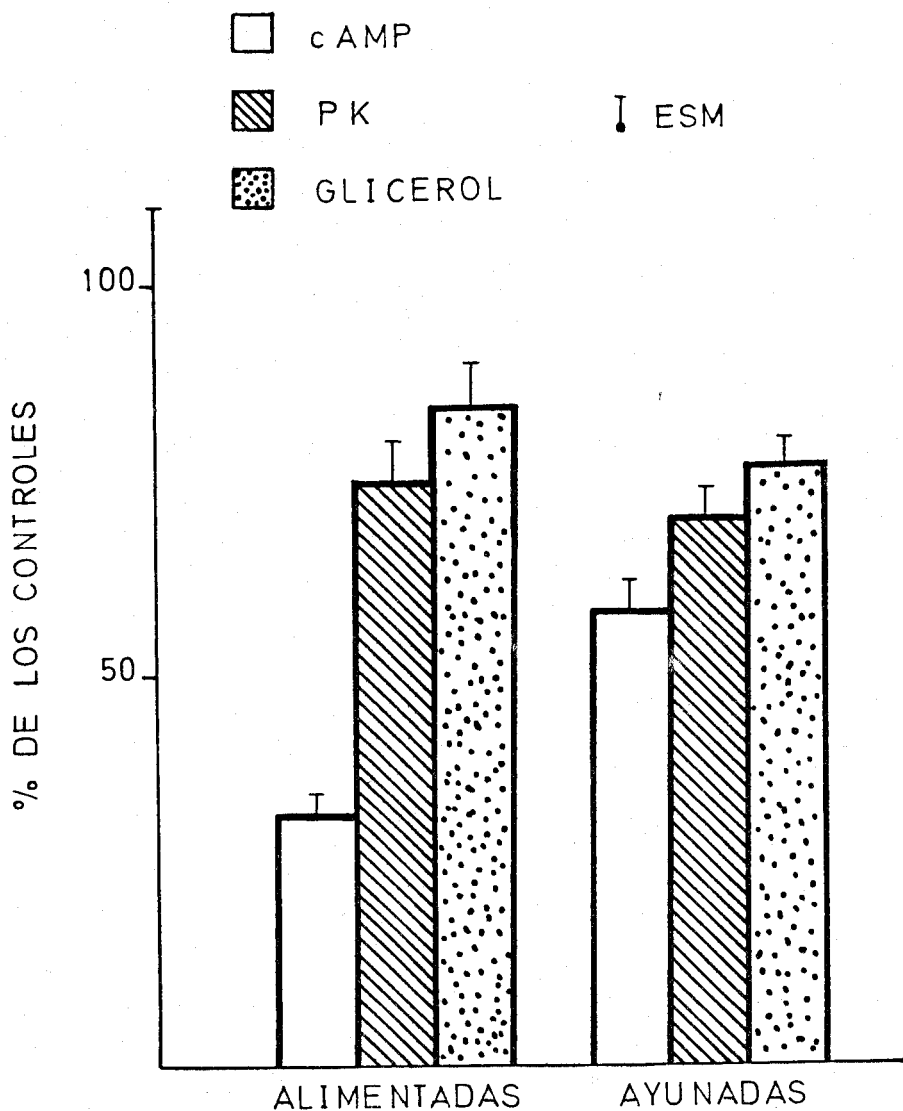


Fig.44. Inhibición producida por la iodoacetamida (1mM) sobre los niveles de cAMP (A, A'), sobre la actividad de la PK (B, B') y sobre la lipólisis (C,C') en tejido graso incubado con glucosa (5 mM) y adrenalina (11 μ M) con respecto a los controles respectivos, en ratas alimentadas (A,B,C) y ayunadas 48 horas(A',B',C').

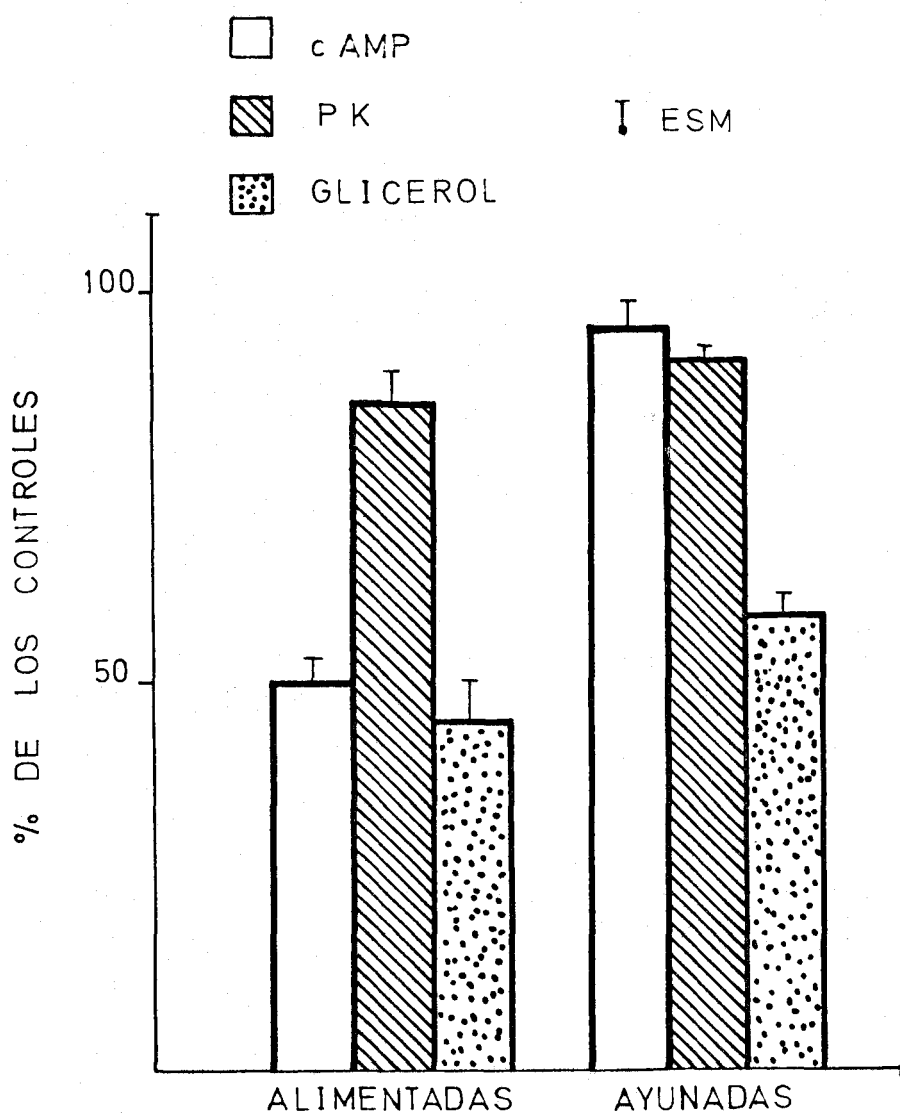


Fig.45. Inhibición producida por la oligomicina ($40 \mu\text{g/ml}$) sobre los niveles de cAMP (A,A'), la actividad de la PK (B,B') y la lipólisis (C,C') de tejido graso incubado con glucosa (5 mM) y adrenalina ($11 \mu\text{M}$) con respecto a sus controles, en ratas alimentadas (A,B,C) y ayunadas 48 horas (A'B'C').

5º DISCUSSION.

Metodología

Antes de discutir el significado fisiológico de los datos presentados en este trabajo, deseamos justificar brevemente el material y las técnicas empleadas.

Hemos utilizado en este estudio dos tipos de preparaciones: adipocitos y tejido adiposo intacto.

Existe hoy día evidencia experimental de la capacidad metabólica y de la integridad funcional de las células aisladas con colagenasa según la técnica de Rodbell (1964), tanto desde un punto de vista bioquímico (liberación de metabolitos, captación de glucosa, producción de CO_2 etc) como desde un punto de vista histológico. Así mismo, la utilización de cortes de tejido se acepta como preparación válida para estudios del metabolismo intermediario (Winegrad y Renold, 1958).

Las etapas implicadas en la activación de la lipólisis por adrenalina se pueden describir brevemente como una activación de la adenil ciclasa (medida como un incremento en los niveles de cAMP), seguida de la consiguiente liberación de la subunidad catalítica de la proteína quinasa que activa a la lipasa de los triglicéridos, la cual a su vez actúa sobre estos, desdoblándolos en glicerol y ácidos grasos libres. Siguiendo estas etapas, en nuestro trabajo hemos determinado los niveles de cAMP, la actividad de la proteína quinasa y los niveles de glicerol liberado,

como índice lipolítico.

La determinación del cAMP se realizó de acuerdo con la técnica de Gilman (1970). La elección de dicha técnica se realizó en base a su alta sensibilidad (pudiéndose medir concentraciones entre 1 y 4 nM) así como por su relativa facilidad de realización frente a otros métodos, tales como el radioinmunoanálisis descrito originariamente por Steiner en 1969 y modificado posteriormente por este mismo autor en 1972. En la actualidad se utiliza una modificación de la técnica del radioinmunoanálisis que presenta un grado de sensibilidad semejante al método de la "proteína enlazante", si bien, tiene el inconveniente de que exige una previa succinilación de las muestras (Delaage y col., 1978).

Las modificaciones introducidas por Brown (1970) y Cooper (1972) en la técnica original de Gilman y que han sido utilizadas en nuestro trabajo, son dos fundamentalmente: en primer lugar que la separación del nucleótido del unido a la proteína quinasa, Brown la realiza con carbón activado, en lugar de usar filtros de pequeño poro, consiguiendo una mayor rapidez y reproductibilidad; en segundo lugar, la realización de una preincubación del enzima con el cAMP antes de añadir el cAMP(H^3). De esta forma se permite que el cAMP no tritiado ocupe sin ninguna competición todos los "locus" activos de la proteína quinasa que por su concentración en el medio pueda enlazar.

Este procedimiento es original de Hales (1967) para la determinación de la insulina y fue también utilizado por Cooper en la determinación de cAMP.

La alta sensibilidad del método utilizado se debe a la utilización de una proteína quinasa muy purificada (cromatografía en DEAE-celulosa) frente al enzima de glándulas adrenales sin purificar, utilizada en otros métodos de "proteína enlazante" (Brown, 1970).

La determinación de la actividad de la proteína quinasa del tejido adiposo se realizó según la técnica descrita por Soderling, Corbin y Park en 1973, sin modificaciones importantes. Es de resaltar la necesidad de utilizar una alta concentración de sal (ClNa 0'5M) para evitar la reasociación de las dos subunidades de la proteína quinasa durante el proceso de la homogenización. De esta forma se consigue conocer la actividad del enzima en determinados estados de activación.

Hemos seleccionado los diez minutos como tiempo óptimo de incubación, para la determinación de la actividad de la proteína quinasa, tras la verificación experimental de que es este tiempo donde se consigue la actividad máxima del enzima, al mismo tiempo que la relación tiempo/efecto presenta linealidad.

Para la determinación de los niveles de glicerol se ha seleccionado la técnica de Garland (espectrofotométrica) ya que su sensibilidad, aunque menor que la del método

de Wieland (fluorométrico), está dentro del rango de las concentraciones obtenidas en nuestras preparaciones.

Adipocitos.

Los niveles de cAMP encontrados en adipocitos aislados de grasa epididimal, e incubados en ausencia de glucosa son concordantes con los descritos por otros autores (Schwabe y Ebert, 1972; Kono y Barham, 1973). La adrenalina provoca un rápido incremento en los niveles de cAMP, consiguiéndose la estimulación máxima a los cinco minutos de incubación. Estos datos están de acuerdo con trabajos previos (Manganiello y Vaughan, 1971; Schwabe y Ebert, 1972; Fain, 1973; Ho y col., 1975; Fredhom y Hjemdahl, 1976).

Con relación a estudios realizados en cortes de tejido adiposo, encontramos una más pronta aparición del nivel máximo de acumulación de los niveles de cAMP en el adipocito que en el tejido. Estos resultados pueden ser debidos a un efecto protector de los tejidos intersticiales y a una menor difusión de las hormonas en el caso del tejido intacto. En los adipocitos de ratas sometidas a 48 horas de ayuno, se observa un retraso en la aparición de los niveles máximos de cAMP estimulados por adrenalina, por efecto del ayuno con respecto a los controles. La máxima estimulación aparece tras 10 min. de incubación

con la hormona lipolítica. Con periodos de ayuno mayores (96 h), se observa una disminución en los niveles cAMP con respecto a los controles, manteniendose constante desde los 2'5 a los 30 minutos de incubación.

Es de destacar que si tomamos los 5 minutos como tiempo único de incubación (en el cual hay una actividad máxima de la adenil ciclasa) se observa una gradual disminución en los niveles de cAMP en los adipocitos de ratas ayunadas durante 48 y 96 horas. Dato que concuerda con los resultados obtenidos en los estudios realizados en cortes de tejido y que se discuten en el epigrafe siguiente.

En nuestro trabajo consideramos como índice lipolítico al glicerol liberado al medio de incubación, ya que aunque se ha demostrado (Herrera y col., 1970) que este alcohol es de nuevo reutilizado en la síntesis de nuevos triglicéridos, este valor no sobrepasa el 10%.

En presencia de adrenalina, se ha observado un incremento lineal en la liberación de glicerol a lo largo del tiempo. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por otros autores que utilizaron en sus estudios cortes de tejido (Schimmel, 1974) o adipocitos aislados (Manganiello y col., 1971; Desai y col., 1973). Como sugirieron Birnbaumer y Rodbell (1969) la acción lipolítica de las catecolaminas sobre los adipocitos, se interpreta como una acumulación del cAMP producido por la estimulación de sistema de la adenil ciclasa.

Como ya habia sido señalado por otros autores (Fain, 1973; Schimmel, 1974; Fain y Shepherd, 1976; Hjimdahl y Fredholm, 1976), en nuestros resultados se puede observar que no existe una correlación lineal a lo largo del tiempo entre los niveles de cAMP y la lipólisis estimulada por adrenalina. Los niveles de cAMP, excesivamente altos, observados tras la adición de adrenalina no parecen ser fisiológicamente necesarios para el estímulo de la lipólisis. La razón de esta ausencia de linealidad en la relación cAMP - lipólisis puede deberse según Fain (1973) a la existencia de diferentes compartimentos celulares para el cAMP, aunque la naturaleza de estos compartimentos no se conoce. Algunos autores han observado la existencia de cAMP en una forma libre y en otra forma ligada que representaría al nucleótido cíclico asociado a la subunidad reguladora de la proteína quinasa (Hofman y col., 1977). Si aceptamos esta idea, habria que pensar que las variaciones en los niveles de cAMP ligado a la subunidad reguladora de la proteína quinasa deben reflejar mucho mejor las alteraciones en la lipólisis que los niveles de cAMP total.

Por efecto del ayuno, se observa una pérdida progresiva de la sensibilidad del adipocito a la actividad lipolítica de la adrenalina. Estos resultados concuerdan con los que se obtienen en experiencias realizadas en trozos de tejido, por tanto el significado fisiológico

de ellos sera discutido conjuntamente.

Tejido adiposo intacto.

En homogenados de tejido adiposo, no incubado, hemos observado que el ayuno produce un incremento significativo en los niveles intracelulares de cAMP en el tejido adiposo. Este incremento se correlaciona bien con la elevación en los niveles plasmáticos de cAMP observada durante el ayuno (Mjos y col., 1977; Sobrino y col., 1979) y apoyan la idea del estado dinámico que existe entre los niveles tisulares y extracelulares del cAMP (Broadus y col., 1971). Esta elevación en los niveles plasmáticos de cAMP no ha sido encontrada por otros autores (Trurunsky, 1973; Turpin y col., 1978).

La disminución que se observa en los niveles de cAMP en el tejido adiposo de ratas sometidas a 24 h de ayuno, se repite a lo largo de todas las experiencias realizadas y pensamos puede deberse a los rápidos cambios del organismo para adaptarse a esta nueva situación metabólica.

La actividad de la proteína quinasa durante los diferentes días de ayuno estudiados, presenta una buena correlación con los niveles de cAMP. La estimulación producida en la actividad de la proteína quinasa se produce en respuesta al incremento en los niveles intracelulares

de cAMP inducidos por el ayuno.

El incremento en los niveles intracelulares de cAMP en el tejido adiposo durante el ayuno, ha sido ampliamente estudiado (Freedland y col., 1966; Jefferson y col., 1968; Selawry y col., 1973). De acuerdo con estos autores se puede sugerir que el incremento intracelular de los niveles de cAMP, observado durante el ayuno, se produce a consecuencia del aumento de los niveles de glucagón (Lawrence, 1966) y la adrenalina, así como la disminución en los niveles de insulina (Unger, 1971) en igual situación metabólica. De estas hormonas, se conoce que el glucagón y la adrenalina activan la adenil ciclasa del adipocito (Butcher y Baird, 1968), produciendo un incremento en la síntesis de cAMP. Por otra parte, Pank y Reddy (1971) han demostrado, que durante el ayuno, hay un incremento en la sensibilidad de la adenil ciclasa al glucagón.

En el tejido adiposo de animales alimentados, e incubado en ausencia de glucosa, se observa que la capacidad de respuesta a la acción lipolítica de la adrenalina permanece intacta. La concentración de glicerol liberado al medio en estas condiciones, se correlaciona con un incremento en los niveles intracelulares de cAMP y con la activación de la proteína quinasa. Corroboramos que el mecanismo de la acción hormonal de la adrenalina se realiza a través de un sistema de activaciones sucesivas

que implican el sistema de la adenil ciclasa, proteína quinasa y de la triglicérido lipasa.

Por otra parte, se observa que el ayuno bloquea la respuesta del tejido adiposo a la acción lipolítica de la adrenalina. Esta inhibición también se pone de manifiesto en los niveles de cAMP así como en la actividad de la proteína quinasa. Se ha sugerido (Ho, 1970; Angel y col., 1971; Burns y col., 1975, 1978) que el acúmulo de ácidos grasos libres intracelulares pueden actuar inhibiendo la lipólisis estimulada por catecolaminas, aunque el lugar donde estos ejercen su acción no está aún aclarado.

La ausencia de glucosa en el medio de incubación, darían lugar a una inhibición en la reesterificación de los ácidos grasos libres intracelulares. El acúmulo de ácidos grasos libres en el adipocito podría ser responsable del bloqueo, observado durante el ayuno, a la acción lipolítica de la adrenalina.

Con concentraciones fisiológicas de glucosa en el medio de incubación, se observó que durante el ayuno hay un incremento en la sensibilidad del tejido adiposo a la acción lipolítica de la adrenalina. El glicerol liberado al medio de incubación, en estas condiciones, presenta una buena correlación con los niveles intracelulares de cAMP y con el estado de activación de la proteína

quinasa. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Zapf y col. (1977), aunque estos autores no determinan en su trabajo los niveles de cAMP ni la actividad de la proteína quinasa.

El incremento en la sensibilidad del tejido adiposo a la adrenalina, observado durante el ayuno, podría explicar la disminución en la capacidad de reesterificación de los adipocitos procedentes de ratas ayunadas, observada por Vaughan (1962) así como el incremento en la movilización de los ácidos grasos libres y la elevación de estos en el plasma que se produce durante el ayuno.

Se ha comprobado (Vaughan, 1960) que la adrenalina estimula la captación de glucosa por el tejido adiposo incubado "in vitro" y que el incremento en la captación de glucosa va acompañado de un incremento en los ácidos grasos liberados. Parece razonable pensar, que durante el ayuno, la capacidad del tejido adiposo para captar la glucosa disponible en el medio de incubación sea mayor que la del tejido de los animales alimentados.

El que con concentraciones fisiológicas de glucosa en el medio de incubación, la adrenalina provoque una mayor lipólisis en el tejido adiposo de ratas ayunadas que en las alimentadas, está de acuerdo el papel fisiológico del tejido adiposo: movilizar las grasas

para proporcionar energía de acuerdo con el estado de nutrición del animal.

Se puede concluir de nuestro estudio que el tejido adiposo o los adipocitos procedentes de ratas sometidas a ayuno, necesitan niveles adecuados de glucosa para responder a la acción de las hormonas lipolíticas. Sin embargo, el papel de la glucosa como mediador de la lipólisis no está aún claro, pudiendo actuar como precursor de α -glicerofosfato o proporcionando, mediante su metabolismo, energía en forma de ATP que se requiere en las etapas de activación de la lipólisis.

Es bien conocido que la glucosa inhibe la liberación de los ácidos grasos del tejido adiposo incubado "in vitro" (Gordon y Kerkes, 1958; Raben y Hollenberg, 1959). Además, la liberación de los ácidos grasos libres observada en presencia de adrenalina, disminuye en presencia de glucosa (Gordon y Kerkes, 1959). Se cree que esta disminución en la liberación de los ácidos grasos es debida a un incremento en la reesterificación de los ácidos grasos en el tejido adiposo, como consecuencia de un incremento en la formación de α -glicerofosfato procedente de la glucosa (Bally y col., 1960; Wertheimer y Shafrir, 1960). En estas condiciones la glucosa incrementa la lipólisis inducida por la adrenalina ya que disminuye los ácidos grasos liberados que son

inhibidores de la lipólisis (Ball y col., 1965).

En nuestras experiencias la adición de glucosa sola al medio de incubación provocó un incremento significativo en los niveles de glicerol liberado por el tejido adiposo tanto en los animales alimentados como en los ayunados. La glucosa no provocó ninguna variación significativa en los niveles de cAMP ni en la actividad de la proteína quinasa, lo que nos lleva a sugerir que su acción sobre la lipólisis tiene lugar por un proceso independiente a la activación de la adenil ciclasa.

Es de destacar que el efecto estimulador de la glucosa sobre los niveles de glicerol es más señalado a lo largo del ayuno. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Chikayuki y col. (1971), que sugieren que la glucosa produce un incremento de la lipólisis en el tejido adiposo de ratas alimentadas y ayunadas.

Hepp y col. (1968), demostraron que las catecolaminas producen una disminución en los niveles de ATP del adipocito. Este hecho fue posteriormente confirmado por otros autores (Halperin y Denton, 1969; Angel y col., 1969; Bihler y Jeanrenaud, 1970). Este efecto, junto con la observación de que las catecolaminas disminuyen la incorporación de P^{32} al ATP (Halperin y Denton, 1969), indican que en presencia de hormonas lipolíticas el metabolismo energético del adipocito está alterado.

Las implicaciones de estos resultados son importantes, puesto que no solamente ofrecen un posible mecanismo que explica como los agentes lipolíticos afectan a procesos biosintéticos y de transporte dependientes de energía sino que ponen de manifiesto la integridad metabólica de las preparaciones "in vitro" del tejido expuesto a la acción de agentes lipolíticos.

La relación entre el metabolismo energético y la lipólisis ha sido ampliamente estudiada (Fassina, 1966; Bjorntorp, 1967; Reed y Fain, 1968; Kuo y Greengard, 1969; Fassina y col., 1972). Los resultados de estos autores ponen de manifiesto que las alteraciones en el metabolismo energético del adipocito interfieren con los procesos lipolíticos a diferentes niveles. Es bien conocido que el ATP es necesario a dos niveles distintos en el proceso activador de la lipólisis: para la formación del cAMP y para la activación de la lipasa de triglicéridos (Fassina y col., 1967, 1972, 1974). Se sabe que la glucosa en su degradación a través de la glucólisis y del ciclo de Krebs proporciona energía directamente utilizable en forma de ATP y sustratos metabólicos a la cadena respiratoria. Por tanto, la inhibición de la glucólisis produce también una disminución en la síntesis de ATP (Fassina, 1966; Reed y Fain, 1968). La influencia de las dos vías metabólicas, glucólisis y fosforilación oxidativa,

en las etapas de la activación de la lipólisis, antes y después de la síntesis de cAMP no está aún suficientemente clara, figura (46).

Mediante la utilización de inhibidores de la glucólisis y de la fosforilación oxidativa, Hollenberg y Patten (1970), sugieren que el ATP implicado en la activación de la lipasa está más afectado por aquellos procesos que inhiben la fosforilación oxidativa. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos posteriormente por Fassina y col. (1973) que proponen que el ATP producido en la glucólisis es más importante para la síntesis de cAMP, mientras que el ATP procedente de la fosforilación oxidativa es más necesario para las últimas etapas de la lipólisis (activación de la lipasa de triglicéridos).

Angel y col. (1971), han demostrado que los niveles de ATP disminuidos en presencia de agentes lipolíticos se correlacionan inversamente con el acúmulo de ácidos grasos libres. Además observaron que la glucosa que posee un efecto protector del descenso de los niveles de ATP producido por agentes lipolíticos, actúa también disminuyendo el acúmulo ácidos grasos intracelulares. Estos autores sugieren que la caída en los niveles de ATP del adipocito producido tras la acción de las hormonas lipolíticas es el resultado de un acúmulo de ácidos grasos libres intracelulares, que inhibirían

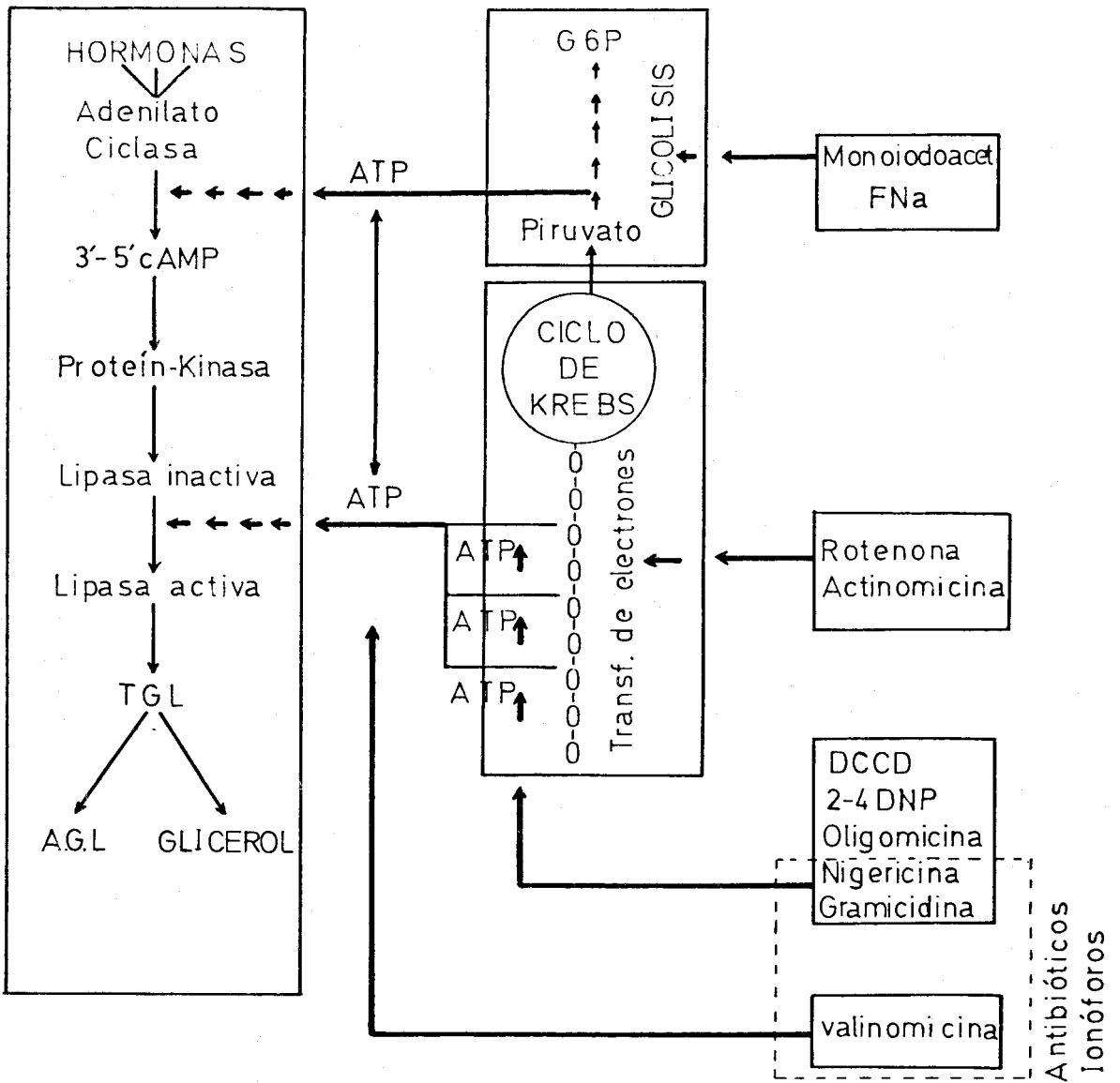


Fig.46. Diferentes grupos de inhibidores metabólicos, de la glucolisis y de la fosforilación oxidativa.

la síntesis de cAMP, actuando como desacopladores de la fosforilación oxidativa. Sin embargo, los autores no explican el punto donde los ácidos grasos libres ejercerían tal inhibición.

En nuestras experiencias se observa que la iodoacetamida (inhibidor de la glucólisis) así como la oligomicina (inhibidor de la fosforilación oxidativa) inhiben tanto los niveles de cAMP como la lipólisis, estimulada por adrenalina, en el tejido adiposo de ratas alimentadas y ayunadas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Fassina y col. (1972) en tejido adiposo de animales alimentados.

Comparando entre sí el efecto de ambos inhibidores se observa que la iodoacetamida produce una inhibición más potente que la oligomicina sobre los niveles de cAMP en el tejido de las ratas alimentadas y en el de las ayunadas. Sin embargo, la inhibición producida por la oligomicina sobre la lipólisis era mayor que la producida por la iodoacetamida, en ambas situaciones metabólicas.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores (Hollenberg y Patten, 1970, 1970; Fassina y col., 1972) que postulan que el ATP producido por el metabolismo de la glucosa en el adipocito es el factor determinante para la síntesis de cAMP, mientras

que no parece tener un papel tan importante en la activación de la lipasa de triglicéridos.

La hipótesis de estos autores de que no solo es importante la magnitud total de la disminución de los niveles de cAMP, sino el mecanismo implicado en esta disminución (inhibición de la glucólisis o de la fosforilación oxidativa) les lleva a admitir la existencia de diferentes compartimentos de ATP, anatómicos o funcionales, en el adipocito.

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo, demuestran que la iodoacetamida, inhibe la lipólisis estimulada por adrenalina así como los niveles intracelulares de cAMP. Trabajos previos han demostrado que existe también una disminución en los niveles de ATP del adipocito (Giudicelli y col., 1976). Por tanto se debe pensar que los inhibidores de la glucólisis actúan inhibiendo la lipólisis estimulada por hormonas lipolíticas interfiriendo con la síntesis de cAMP. Sin embargo, la caída en los niveles de ATP, observada en presencia de inhibidores de la glucólisis, puede ser la consecuencia de una acción desacopladora ejercida por el incremento en el acúmulo intracelular de ácidos grasos (Angel y col., 1971). El incremento en los ácidos grasos intracelulares sería el resultado de la lipólisis estimulada por la adrenalina y la disminución

en la reesterificación por la inhibición de la glucólisis. Este hecho es además apoyado por los datos obtenidos al estudiar la acción de la glucosa en ausencia de agentes lipolíticos en los que se observa un incremento en la lipólisis sin cambios en los niveles de CAMP ni en la actividad de la proteína quinasa.

Los resultados obtenidos en presencia de iodoacetamida podrían ser también explicados de acuerdo a esta hipótesis. Los niveles de CAMP disminuidos en presencia del inhibidor pueden ser debidos al efecto desacoplador de los ácidos grasos libres acumulados en el adipocito por falta de α -glicerofosfato. El que la inhibición de la iodoacetamida no sea tan manifiesta sobre la lipólisis puede deberse a que los niveles de CAMP aunque disminuidos, puede ser suficientes para provocar la activación de la proteína quinasa y la lipólisis.

Sin embargo, Giudicelli y col. (1976) han demostrado que, en ausencia de agentes lipolíticos, la omisión de glucosa produce una disminución en los niveles intracelulares de ATP, sugiriendo que la caída en los niveles de ATP parece estar más relacionada con una disminución en la capacidad energética del adipocito debida a la inhibición de la glucólisis que al efecto desacoplador de los ácidos grasos.

De nuestros resultados se puede deducir la importancia

de la presencia de glucosa para la respuesta del tejido adiposo a las hormonas lipolíticas. La necesidad de concentraciones fisiológicas de glucosa es aún más manifiesta durante el ayuno. Hay que considerar, por tanto, que la glucosa además de su papel en la regulación de la lipogénesis (Flatt, 1970) sea, al menos "in vitro", un factor importante en el control de la lipólisis inducida por catecolaminas.

6º CONCLUSIONES.

1. La adrenalina provocó una rápida subida en los niveles de cAMP, en adipocitos aislados procedentes de ratas alimentadas.
2. En presencia de adrenalina, se observó, un incremento lineal en la liberación de glicerol a lo largo del tiempo estudiado en adipocitos procedentes de ratas alimentadas.
3. No existe una correlación lineal a lo largo del tiempo entre la producción de cAMP y la lipólisis en presencia de adrenalina.
4. Se observó un retraso en la aparición de los niveles máximos de cAMP estimulados con adrenalina tras periodos cortos de ayuno (48 h) pero no tras periodos largos de deprivación alimenticia (96 h).
5. Por efecto del ayuno, se observó una pérdida progresiva de la sensibilidad de los adipocitos a la actividad lipolítica de la adrenalina.
6. En homogenados de tejido adiposo, el ayuno produce un incremento de los niveles intracelulares de cAMP que a su vez presentan una buena correlación con el incremento de la actividad de la proteína quinasa en igual

situación metabólica.

7. En el tejido adiposo de animales alimentados, incubado en ausencia de glucosa, se observó que la capacidad de respuesta a la acción lipolítica de la adrenalina permanece intacta. La concentración de glicerol liberado al medio en estas condiciones, se correlaciona con un incremento en los niveles intracelulares de cAMP y con la activación de la proteína quinasa.
8. El ayuno bloqueó la respuesta del tejido adiposo a la acción lipolítica de la adrenalina. Esta inhibición también se pone de manifiesto en los niveles de cAMP así como en la actividad de la proteína quinasa.
9. Con concentraciones fisiológicas de glucosa en el medio de incubación, el ayuno produce un incremento en la sensibilidad del tejido adiposo a la acción lipolítica de la adrenalina. Los niveles de glicerol liberado en estas condiciones, presentan una buena correlación con los niveles intracelulares de cAMP y con el grado de activación de la proteína quinasa.
10. La glucosa, por si sola, produce un aumento en los niveles de glicerol sin dar lugar a variaciones en los

niveles de cAMP ni en la actividad de la proteína quinasa. El efecto lipolítico de la glucosa parece ser debido a su papel aumentando la reesterificación de los ácidos grasos libres.

11. La iodoacetamida y la oligomicina producen una inhibición en los niveles de cAMP en la actividad de la proteína quinasa y en la lipólisis de tejido adiposo procedente de animales alimentados y ayunados.

12. Al comparar entre si el efecto de ambos inhibidores, se observó que la iodoacetamida tiene un efecto inhibidor sobre los niveles de cAMP más potente que la oligomicina. Sin embargo el efecto de la oligomicina sobre la lipólisis es más potente que el de la iodoacetamida.

7º BIBLIOGRAFIA.

ALLEN, D.O. & BECK, R:

Alterations in lipolysis, adenylate cyclase, and adenosine 3', 5'-monophosphate levels in isolated fat cells following adrenalectomy.

Endocrinology. 91: 504, 1972.

ANGEL, A., DESAI, K., HALPERIN, ML:

ATP metabolism in adipose cells: effects of norepinephrine (N), ACTH and dibutyryl 3', 5'-cyclic AMP (DBC).

Clin. Res. 17: 657, 1969.

ANGEL, A., DESAI, K., HALPERIN, ML:

Free fatty acids and ATP levels in adipocytes during lipolysis.

Metabolism. 20: 87, 1971.

ANGEL, A., DESAI, K., HALPERIN, ML:

Intracellular accumulation of free fatty acids in isolated white adipose cells.

J.Lipid.Res. 12: 104, 1971.

ANGEL, A., DESAI, K., HALPERIN, ML:

Reduction in adipocyte ATP by lipolytic agents: relation to intracellular free fatty acid accumulation.

J. of Lipid. Res. 12: 203, 1971.

APPLEMAN, M., KEMP, R:

Puromycin: a potent metabolic effect independent of protein synthesis.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 24: 564, 1966.

ARMSTRONG, K.J., STOUFFER, J.E., VANINWEGEN, R.G.,
THOMPSON, W.J. AND ROBISON, G.A.:

Effects of thyroid hormone deficiency on cyclic adenosin
3',5'-monophosphate and control of lipolysis in fat
cells.

J. Biol. Chem. 243: 1705, 1975.

BALLY, P.R., KAPPELER, H., FROESCH, E.R. y LABHART, A:
Effect of glucose on spontaneous limitation of lipolysis
in isolated adipose tissue: a potential regulatory
mechanism.

Ann. N.Y.Acad. Sci. 131: 143, 1965.

BALLY, E.G., MARTIN, D.B., COOPER, O.:

Studies on the metabolism of adipose tissue. The effect
on insulin on glucose utilization as measured by the
manometric determination of carbon dioxide output.

J.Biol.Chem. 234: 774, 1967.

BERGSTROM, S., CARLSON, L.A., ORO, L.:

Effect of prostaglandins on catecholamine induced changes
in the free fatty acids of plasma and in blood pressure
in the dog.

Act Physiol. Scand. 60: 170, 1964.

BERGSTROM, S., CARLSON, L.A.:

Inhibitory action of prostaglandin E₁ on the mobilization
of free fatty acids and glycerol from human adipose
tissue in vitro.

Act Physiol. Scand. 63: 195, 1965.

BIHLER, C., JEANRENAUD, B.:

ATP content of isolated fat cells, effects of insulin, ouabain and lipolytic agents.

Biochem. Biophys. Acta. 202: 496, 1970.

BIRNBAUMER, L., RODBELL, M.:

Adenyl cyclase in fat cells, Hormone receptors.

J. Biol. Chem. 244: 3477, 1969.

BJORNTORP, P.:

The effect of insulin in vitro of human adipose tissue from normal and diabetic subjects.

Acta Med. Scand. 181: 389, 1967.

BJORNTORP, P., OSTMAN, J:

Human adipose tissue dynamics and regulation.

Advan. Metab. Disorders. 5: 277, 1971.

BROADUS, A.E., KAMINSKY, N.I., NORTHARTT, R.C., HARDMAM, J.G., SUTHERLAND, E.W., LIDDLE, G.W.:

Effects of glucagon on adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate in human plasma and urine.

J.Clin.Invest. 49: 2237, 1970.

BRODIE, B.B., MAICKEL, R.P. y STERN, D.N.

Autonomic nervous system and adipose tissue.

Handb. Physiol. Sect. 5: 583, 1965.

BRODIE, B.B., DAVIES, J.I., HYNIE, S., KRISHNA, G. WEISS, B:
Interrelationships of catecholamines with other endocrine systems.

Pharm. Rev. 18: 273, 1966.

BROSTROM, C.O., CORBIN, J.D., KING, C.A., KREBS, E.G.:
Interaction of the subunits of adenosine 3', 5'-mono-
phosphate-dependent protein kinase of muscle.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA. 68: 2444, 1971.

BROWN, B.L., EKINS, R.P.:
A saturation assay for cyclic adenosine monophosphate.
Clin.Sci. 38: 27, 1970.

BURNS, T.W., LANGLEY, P.E., ROBISON, A.:
Studies on the role of cyclic AMP in human lipolysis.
Advan. in cyclic Res. 1: 63, 1972.

BURNS, T.W., LANGLEY, P.E., ROBISON, G.A.:
Site of free-fatty-acid inhibition of lipolysis by
human adipocytes.
Metabolism. 24: 265, 1975.

BURNS, T.W., LANGLEY, P.E., TERRY, B.E., ROBISON, G.A.:
The role of free fatty acids in the regulation of
lipolysis by human adipose tissue cells.
Metabolism. 27: 1755, 1978.

BUTCHER, R.W., SNEYD, J.G.T., PARK, C.R., SUTHERLAND, E.W.:
Effect of insulin on adenosine 3',5'-monophosphate in
the rat epididymal fat pad.
J.Biol.Chem. 241: 1651, 1966.

BUCHER, R.W. y SUTHERLAND, E.W.:
The effects of the catcholamines, adrenergic blocking
agents, prostaglandin E₁, and insulin on cyclic AMP
levels in the rat epididymal fat pad in vitro.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 139: 849, 1967.

BUTCHER, R.W. y BAIRD, C.E.:

The regulation of cyclic AMP and lipolysis in adipose tissue by hormones and other agents.

Adv.Exp.Med.Biol. 4: 5, 1968.

BUTCHER, R.W., BAIRD, C.E., SUTHERLAND, E.W.:

Effect of lipolytic and antilipolytic substances on adenosine 3',5'-monophosphate levels in isolated fat cells.

J.Biol.Chem. 243: 1705, 1968.

BUTCHER, R.W. y CARLSON, L.A.:

Effects of secretion on fat mobilizing lipolysis and cyclic AMP levels in rat adipose tissue.

Acta Physiol.Scand. 79: 559, 1970.

CAHILL, G.F.Jr., HERRERA, M.G., HORGAN, A.P., SOELANER, I.S., STEINKE, J., REICHARD, G.A.Jr., KIPNIS, D.M.:

Hormone-fuel interrelationships during fasting.

J.Clin.Invest. 45: 1751, 1966.

CALAWELL, A.B. y FAIN, J.N.:

Inhibition of cycloheximide and dactinomycin of the activation of lipolysis due to growth hormone in white fat cells.

Horm.Metab.Res. 2: 1, 1970.

CALLINGHAM, B.A.:

Hormones in blood.

Gray, C.H. y Bacharach, A.L.

Eds. Academic.Press. London. 519, 1967.

CARLSON, L.A. y ORO, L.:

Studies on the relationship between the concentration of plasma free fatty acid and glycerol in vivo.

Metabolism. 12: 132, 1963.

CHEN, R.F.:

Removal of fatty acids from serum albumin by charcoal treatment.

J.Biol.Chem. 242: 173, 1967.

CHIKAYUKI, N. y OKADA, K.:

Effect of glucose on lipolysis and on release of lipolytic products in isolated adipocytes.

American J. of Physiol. 228: 92, 1975.

CHRIST, E.J. y NUGTEREN, D.H.:

The biosynthesis and possible function of prostaglandins in adipose tissue.

Biochim. Biophys. Acta. 218: 296, 1970.

COOPER, R.M.:

Concentration of adenosine 3',5'-monophosphate-cyclic in mouse pancreatic islets measured by a protein-binding radioassay.

J.Biochem. 134: 599, 1972.

COOPER, B. y GREGERMAN, R.I.:

Human fat cell adenylate cyclase. Enzyme characterization and guanine nucleotide effects on epinephrine responsiveness in cell membranes.

Biochem.Biophys. Acta. 445: 246, 1976.

CORBIN, J.D., REIMANN, E.M., WALSH, D.A., KREBS, E.G.:
Activation of adipose tissue lipase by skeletal muscle
cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-stimulated protein
kinase.

J.Biol. Chem. 245: 4849, 1970.

CORBIN, J.A., STANLEY, L.K., SODERLING, T.R., PARK, Ch:
Hormonal regulation of adenosine 3',5'-monophosphate-
dependent protein kinase.

Advan. in Cyclic Nucl. Res. 5: 265, 1975.

DALTON, C. y HOPE, H.R.:

Cyclic AMP regulation of prostaglandin biosynthesis in
fat cells.

Prostaglandins. 6: 227, 1974.

DEBONS, A.F. y SCHWARTZ, I.L.:

Dependence of the lipolytic action of epinephrine in
vitro upon thyroid hormone.

J.Lipid.Res. 2: 86, 1961.

DELAAGE, M.A., ROUX, D., CAILLA, H.L.:

Molecular biology and pharmacology of cyclic nucleotides.
Folco, G. y Paoletti.

Eds. Elsevier, North holland. Amsterdam. 150, 1978.

DELANGE, R.J., KEMP, R.G., RILEY, W.D., COOPER, R.A.,
KREBS, E.G.:

Activation of skeletal muscle phosphorylase kinase by
adenosine triphosphate and adenosine 3',5'-monophosphate.

J.Biol. Chem. 243: 2200, 1968.

DENTON, R.M. y RANDLE, R.J.:

Measurement of concentrations of metabolites in adipose tissue and effects of insulin, alloxan diabetes and adrenaline.

J.Biochem. 100: 407, 1963.

DESAI, K.S.? LI, K.C., ANGEL, A.:

Bimodal effect of insulin on hormona-stimulated lipolysis: relation to intracelular 3',5'-cyclic adenylic acid and free fatty acid levels.

J.Lipid.Res. 14: 647, 1973.

DEVENYI, T. y GERSELY, J.:

Amino acids peptides and proteinas.

Ed.Elsevier Sc. Publish Co. 1974.

ERLICHMAN, J., HIRSCH, A.M. y ROSEN, O.M.:

Interconversion of cyclic nucleotide-activates and cyclic nucleotide-independent forms of a protein kinase from beef heart.

Prot. Ntl. Acad. Sci. 68: 731, 1971.

ERLICHMAN, J., RUBIN, C.S., ROSEN, O.M.:

Physical properties of a purified cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase from bovine heart muscle.

J.Biol. Chem. 248: 7607, 1973.

EXTON, J.H., FRIEDMANN, N., WONG, E., BRINEAUX, J.P.,
CORBIN, J.D., PARK, C.R.:

Interaction of glucocorticoids with glucagon and epinephrine in the control of gluconeogenesis and glycogenolysis in liver and of lipolysis in adipose tissue.

J.Biol.Chem. 247: 3570, 1972.

FAIN, J.N:

Effect of puromycin on incubated adipose tissue and its response to dexamethasone, insulin, and epinephrine.

Biochim.Biophys.Acta. 84: 636, 1965.

FAIN, J.N.:

Effects of dexamethasone and 2-deoxy-D-glucose on fructose and glucose metabolism by incubated adipose tissue.

J.Biol.Chem. 239: 958, 1966.

FAIN, J.N.:

Adrenergic blockade of hormone-induced lipolysis in isolated fat cells.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 139: 879, 1967.

FAIN, J.N.:

Inhibition of lipolytic action of growth hormone and glucocorticoid by ultraviolet and X-radiation.

Science. 157: 1062, 1967.

FAIN, J.N.:

Inhibition of cyclic cAMP accumulation in fat cells by adenosine.

Mol.Pharmacol. 9: 595, 1972.

FAIN, J.N.:

Biochemical aspects of drug and hormone action on adipose tissue.

Pharmacol Rev. 25: 67, 1973.

FAIN, J.N., SCOW, R.O., CHERNICK, S.S.:

Effects of glucocorticoids on metabolism on adipose tissue in vitro.

J. Biol. Chem. 238: 54, 1963.

FAIN, J.N., KOVACEV, V.P., SCOW, R.O.:

Effects of growth hormone and dexamethasone on lipolysis and metabolism in isolated fat cells of the rat.

J. Biol. Chem. 240: 3522, 1965.

FAIN, J.N., GALTON, D.J., KOVACEV, V.P.:

Effect of drugs on the lipolytic action of hormones in isolated fat cells.

Mol. Pharmacol. 2: 237, 1966.

FAIN, J.N. y SAPERSTEIN, R.:

The involvement of RNA synthesis and cyclic AMP in the activation of fat cell lipolysis by growth hormone and glucocorticoids.

En: adipose tissue: regulation and metabolic functions, Ed. by B. Jeanrenaud y D. Hepp. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 20, 1970.

FAIN, J.N., PSYCHOYOS, S., CZERNIN, A.J., FROST, S., CASH, W.D.:

Indomethacin, lipolysis and cyclic AMP accumulation in white fat cells.

Endocrinology. 93: 632, 1971.

FAIN, J.N. y SHEPHERD, R.E.:

Free fatty acids as feed-back regulators of adenylate cyclase and cyclic 3',5'-AMP accumulation in rat fat cells.

J. Biol. Chem. 250: 6586, 1975.

FAIN, J.N. y SHEPHERD, R.E.:

Hormonal regulation of lipolysis: role of cyclic nucleotides, adenosine and free fatty acids.

En: proc 7th midwest regional conf on Endocrinol and metabolism. Plenum press. 1976.

FAIN, J.N. y SHEPHERD, R.E.:

Hormonal regulation of lipolysis: role of cyclic nucleotides, adenosine and free fatty acids.

J. Lipid. Res. 17: 377, 1977.

FASSINA, G.:

Oligomycin, rotenone and 2,4-dinitrophenol as inhibitors of the norepinephrine-stimulated lipolysis in rat epididymal fat.

Life Sci. 5: 2151, 1966.

FASSINA, G., MARAGNO, I., DORIGO, P.:

Metabolic inhibitors and catecholamine-stimulated lipolysis.

Biochem. Pharmacol. 16: 1439, 1967.

FASSINA, G., DORIGO, P., BADETTI, R., VISCO, L.:

Effect of oxidative phosphorylation inhibitors on cyclic AMP synthesis in rat adipose tissue.

Biochem. Pharmacol. 21: 1633, 1972.

FASSINA, G., DORIGO, P., PERINI, G., TOTH, E.:

Effect of glycolysis inhibitors on cyclic AMP synthesis in rat adipose tissue.

Biochem. Pharmacol. 21: 2295, 1972.

FASSINA , G., DORIGO, P., GAION, R.M.:

Hormone-induced lipolysis and the metabolic pathways providing energy to the cell: a possible role of ATP as a rate-limiting factor.

Biochem. Pharmacol. 105: 121, 1974.

FLATT, J.P.:

Conversion of carbohydrate to fat in adipose tissue: an energy-yielding and, therefore, self-limiting process.

J.Lipid.Res. 11: 131, 1970.

FRANSEN, E.K. y MOODY, A.J.:

Lipolytic action of a newly isolated vasoactive intestinal polypeptide.

Horm.Metab.Res. 5: 196, 1973.

FREDHOLM, B.B.:

Release of prostaglandin-like material from canine subcutaneous adipose tissue by nerve stimulation.

Acta Physiol.Scand. 79: 18, 1971.

FREDHOLM, B.B. y HJEMDAHL, P.:

Inhibition of adenosina 3',5'-cyclic monophosphate accumulation and lipolysis by acidosis in isolated rat fat cell.

Acta Physiol.Scand. 96: 160, 1976.

FREEDLAND, R.A., CUNLIFFE, T.L. y ZINKL, J.G.:

The effect of insulin on enzyme adaptations to diets and hormones.

J.Biol.Chem. 241: 5448, 1966.

GARLAND, P.B. y RANDLE, P.J.:

A rapid enzymatic assay for glycerol.

Nature. 196: 987, 1962.

GARLAND, P.B. y HALES, C.N.:

Substrate mobilization and energy provision in man.

Biochemical Society Symposium.

London: The Biochemical Society. 43: 97, 1978.

GILL, G.N. y GARREN, L.D.:

Role of the receptor in the mechanism of action of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate.

Proc.Nat.Acad.Sci, USA. 68: 786, 1971.

GILMAN, A.C.:

A protein binding assay for adenosine 3',5'-cyclic monophosphate.

Proc.Nat.Acad.Sci. USA. 67: 305, 1970.

GIUDICELLI, Y., NORDMANN, R. y NORDMANN, J.:

Action of aldehydes on lipolysis and glucosa metabolism in rat adipose tissue.

Life Sciences. 12: 35, 1971.

GIUDICELLI, Y., PECQUERY, R., PROVIN, D., AGLI, B.,

NORDMANN, R.:

Regulation of lipolysis and cyclic AMP synthesis through energy supply in isolated human fat cells.

Biochim. et Biophys. Acta . 486: 385, 1977.

GOBERNA, R.:

¿Cómo se segrega la insulina?.

Investigación y Ciencia. 21: 92, 1978.

GOODMAN, H.M.:

Effects of growth hormone on the lipolytic response of adipose tissue to theophylline.

Endocrinology. 82: 1027, 1968.

GOODMAN, H.M.:

Permissive effects of hormones on lipolysis.

Endocrinology. 86: 1064, 1970.

GOODMAN, H.M. y KNOBIL, E.:

Effect of adrenergic blocking agents on fatty acid mobilization during fasting.

Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 102, 493, 1959.

GOODMAN, H.M., KNOBIL, E.:

Hypophysectomy and the lipolytic action of epinephrine in vitro.

Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 115: 849, 1964.

GORDON, R.S., CHERKES, A. y GRENDEL, F.:

Production of unesterified fatty acids from isolated rat adipose tissue incubated in vitro.

Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 97: 150, 1958.

GORIN, E. y SHAFRIR, E.:

Lipolytic activity in adipose tissue homogenates toward tri-, di-, and monoglyceride substrates.

Biochim.Biophys.Acta. 84: 24, 1964.

GORIN, E., TAL-OR, Z. y SHAFRIR, E.:

Glyceroneogenesis in adipose tissue of fasted, diabetic and triamcinolone treated rats.

Eur.J.Biochem. 8: 370, 1969.

GORIN, E., GOODMAN, H.M.:

Protein kinase in adipose tissue: effect of hypophysectomy.

Horm.Metab.Res. 6: 146, 1974.

GUTMAN, A., SCHRAMM, H., SHAFRIR, E.:

Adipose tissue glycogen.

Israel J. Med.Sci. 3: 427, 1967.

HAGEN, J.M.:

Effect of glucagon on the metabolism of adipose tissue.

J.Biol.Chem. 236: 1023, 1961.

HALES, C.N.:

Extracellular anions and the metabolism of adipose tissue in vitro.

J.Biochem. 105: 27, 1967.

HALES, C.N., CHALMERS, T.M., PERRY, M.C., WADE, D.R.:

Investigations of the hormonal control of lipolysis.

En: Protein and polypeptide hormones. Edit. M.Margoulies.

Excerpta Medica. 2, 1968.

HALL, C.L., BALL, E.G.:

Factors effecting lipolysis rates in rat adipose tissue.

Biochim.Biophys. Acta. 210: 209, 1970.

HALPERIN, M.L. y DENTON, R.M.:

Regulation of glycolysis and L-glycerol 3-phosphate concentration in rat epididymal adipose tissue in vitro.

Biochem.J. 113: 207, 1969.

HANSEN, F.M., NIELSEN, J.M. y GLIEMANN, J.:

The influence of body weight and cell size on lipogenesis and lipolysis of isolated rat fat cells.

Eur.J.Clin.Invest. 4: 411, 1974.

HEPP, D., CHALLONER, D.R., WILLIAMN, R.M.:

Respiration in isolated fat cells and the effects of epinephrine.

J.Biol.Chem. 243: 2321, 1968.

HERRERA, E. y LAMAS, L.:

Utilization of glycerol by rat adipose tissue in vitro.

Biochem. J. 120: 433, 1970.

HJEMDAHL, P. y FREDHOLM, B.B.:

Cyclic AMP-dependent and independent inhibition of lipolysis by adenosine and decreased pH.

Acta Physiol.Scand. 96: 170, 1976.

HO, R.J.:

Dependence of hormone-stimulated lipolysis on ATP and cyclic levels in fat cells in adipose tissue. Regulation and metabolic function. Editors. Jeanrenaud, B. y Hepp, D. New York, Academic Press. 1970.

HO, R.J.:

Effect of glucose on lipolysis and energy metabolism. Life Sci. 9: 137, 1970.

HO, R.J., SUTHERLAND, E.W.:

Formation and release of a hormone antagonist by rat adipocytes.

J.Biol.Chem. 246: 6822, 1971.

HO, R.I., SUTHERLAND, E.W.:

cAMP-mediated feedback regulation in target cells.

Advan. in cyclic nucl. res. 5: 533, 1975.

HO, R.J., RUSSEL, T.R., ASAKAWA, T., SUTHERLAND, E.W.:
Cellular levels of feed-back regulator of adenylate
cyclase and the effect of epinephrine and insulin.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA. 72: 4739, 1975.

HOFMANN, F.:

Interaction of subunits of cAMP dependent protein kinase.
Molecular Biology and Pharmacology of cyclic Nucleotides.
Eds. G.Folco y R.Paoletty. p.129, 1978.

HOFMAN, F., BEAVO, F.A., BECHTEL, P.J. y KREBS, E.G.:
Comparison of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent
protein kinases from rabbit skeletal and bovine heart
muscle.

J.Biol. Chem. 250: 7795, 1975.

HOFMAN, F., BECHTEL, P.J., KREBS, E.G.:

Concentrations of cyclic AMP-dependent protein kinase
subunits in various tissues.

J.Biol.Chem. 252: 1441, 1977.

HOLLENBERG, C.H.:

Effect of nutrition on activity and release of lipase
from rat adipose tissue.

Amer.J.Physiol. 197: 667, 1959.

HOLLENBERG, C.H., RABEN, M.S., ASTWOOD, E.B.:

The lipolytic response to corticotropin.

Endocrinology. 68: 589, 1961.

HOLLENBERG, C.H., PATTEN, R.L.:

Relation of fat cell ATP content to lipolysis induced
by dibutyryl 3',5'-cyclic AMP.

Metabolism. 19: 856, 1970.

HUTTUNEN, J.K., ELLINGBOE, J., PITTMAN, R.C., STEINBERG, D.:
Partial purification and characterization of hormone-sensitive lipase from rat adipose tissue.

Biochim.Biophys. Acta. 218: 333, 1970.

HUTTUNEN, J.K., AQUINO, A.A., STEINBERG, D.:

A purified triglyceride lipase lipoprotein in nature, from adipose tissue.

Biochim.Biophys. Acta. 224: 295, 1970.

HUTTUMEN, J.K. y STEINBERG, D.:

Activation and phosphorylation of purified adipose tissue hormone-sensitive lipase by cyclic AMP-dependent protein kinase.

Biochim.Biophys. Acta. 239: 411, 1971.

ILLIANO, G. y CUATRECASAS, P.:

Endogenous prostaglandins modulate lipolytic processes in adipose tissue.

Nature New Biol. 234: 72, 1971.

IILLIANO, G. y CUATRECASAS, P.:

Modulation of adenylate cyclase activity in liver and fat cell membranes by insulin.

Science. 175: 906, 1972.

INGLE, D.A.:

The role of the adrenal cortex in homeostasis.

J.Endocrinol. 8: XXIII, 1952.

JACOBSSON, B. y SMITH, V.:

Effect of cell size on lipolysis and antilipolytic action of insulin in human fat cells.

J.Lipid.Res. 13: 651, 1972.

JARETT, L., STEINER, A., SMITH, R.M., KIPNIS, D.M.:
The involvement of cyclic AMP in the hormone regulation
of protein synthesis in rat adipocytes.
Endocrinology. 90: 1277, 1972.

JEANRENAUD, B.:
Adipose tissue dynamics and regulation revisited.
Ergeb.Physiol.Biol.Chem.Exp.Pharmakol. 60: 57, 1968.

JEFFERSON, L.S., EXTON, J.H., BUTCHER, R.W., SUTHERLAND,
E.W., PARK, C.R.:
Role of adenosine 3',5'-monophosphate in the effects of
insulin and anti-insulin serum on liver metabolism.
J.Biol.Chem. 243: 1031, 1968.

JUNGLAS, R.:
Role of cyclic 3',5'-AMP in the response of adipose
tissue to insulin.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA.56: 757, 1966.

JUNGLAS, R.L., BALL. E.G.:
Studies on the metabolism of adipose tissue. The effects
of insulin and epinephrine on free fatty acid and glyce-
rol production in the presence and absence of glucose.
Biochemistry. 2: 383, 1963.

KATHER, H. y SIMON, B.:
Catecholamine-sensitive adenylate cyclase of human fat
cell ghosts.
Clin.Chim.Acta. 73: 497, 1977.

KATHER, H. y SIMON, B.:
Adenylate cyclase of human fat cell ghosts.
Febs.Letters. 100: 145, 1979.

KHOO, J.C., STEINBERG, D., THOMPSON, B., MAYER, S.E.:
Hormonal regulation of adipocyte enzymes. The effects
of epinephrine and insulin on the control of lipase
phosphorylase kinase, phosphorylase, and glycogen
synthase.

J.Biol.Chem. 248: 3823, 1973.

KHOO, J.C., AQUINO, A.A., STEINBERG, D.:
The mechanism of activation of hormone-sensitive lipase
in human adipose tissue.

J.Clin.Invest. 53: 1124, 1974.

KHOO, J.C. y STEINBERG, D.:
Reversible protein kinase activation of hormone-sensitive
lipase from chicken adipose tissue.

J.Lipid.Res. 15: 602, 1974.

KISSEBAH, A.H., VYDELINGUM, N., TULLOCH, B.R., HOPO-GILL,
H., FRASER, T.R.:

The role of calcium in insulin action. Purification and
properties of enzymes regulating lipolysis in human
adipose tissue: effects of cyclic-AMP and calcium ions.

Horm.Metab.Res. 6: 247, 1974.

KONO, T. y BARHAM, F.W.:

Effects of insulin on the levels of adenosine 3',5'-
monophosphate and lipolysis in isolated rat epididymal
fat cells.

J.Biol.Chem. 248: 7417, 1973.

KORN, E.D.:

Clarring factor, a heparin-activated lipoprotein lipase.
Isolation and characterization of the enzyme from normal
rat heart.

J.Biol.Chem. 215: 1, 1955.

KREBS, E.G.:

Protein kinases.

Curr.Top.Cell.Regul. 5: 99, 1972.

KUMON, A., NISHIYAMA, K., YAMAMURA, M. y NISHIZUKA, Y.:
Multiplicity of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent
protein kinases from rat liver and mode of action of
nucleoside 3',5'-monophosphate.

J.Biol.Chem. 247: 3726, 1972.

KUO, J.F., De RENZO, C.E.:

A comparison of the effects of lipolytic and antilipo-
lytic agents on adenosine 3',5'-monophosphate levels
in adipose cells as determined by prior labelling
with adenine-8¹⁴C.

J.Biol.Chem. 244: 2252, 1969.

KUO, J.F. y GREENGARD, P.:

Cyclic nucleotide-dependent protein kinases.

J.Biol.Chem. 245: 4067, 1969.

LANGSLOW, D.R. y HALES, C.N.:

Physiology and biochemistry of the domestic fowl.

Eds: Bell, D.J. y Freeman, B.M.

Acad.Press. London. 1:521, 1971.

LARNER, J.:

Insulin and glycogen synthase.

Diabetes. 21: 428, 1972.

LAWRENCE, A.M.:

Radioimmunoassayable glucagon levels in man: effects of starvation, hypoglycemia, and glucose administration. Proc.Natl.Acad.Sci. 55: 316, 1966.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.:
Protein measurement with the folin phenol reagent.

J.Biol.Chem. 193: 265, 1951.

MAHLER, R., STAFFORD, W.S., TARRANT, M.E. y ASHMORE, J.:
The effect of insulin on lipolysis.

Diabetes. 13: 297, 1964.

MALGIERI, J.A., SHEPHERD, R.E., FAIN, J.N.:

Lack of feedback regulation of cyclic 3',5'-AMP accumulation by free fatty acids in chicken fat cells.

J.Biol.Chem. 250: 6593, 1975.

MANGANIELLO, V.C., MURAD, F., VAUGHAN, M.:

Effects of lipolytic and antilipolytic agents on 3',5'-adenosine monophosphate in fat cells.

J.Biol.Chem. 246: 2195, 1971.

MANGANIELLO, V.C. y VAUGHAN, M.:

Effects of lipolytic and antilipolytic agents on cyclic 3',5'-adenosine monophosphate in fat cells.

J.Biol.Chem. 7: 2195, 1971.

MANGANIELLO, V. y VAUGHAN, M.:

Prostaglandin E₁ effects on cAMP concentration and phosphodiesterase activity in fibroblasts.

Proc.Natl.Acad.Sci. USA. 69: 269, 1972.

MANGANIELLO, V. y VAUGHAN, M.:

An effect of insulin on cyclic adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase activity in fat cells.

J.Biol.Chem. 248: 7164, 1973.

MILLER, E.A. y ALLEN, D.O.:

Hormone-stimulated lipolysis in isolated fat cells from young and old rats.

J.Lipid.Res. 14: 331, 1973.

MJOS, O.D., VIK-MO, H., HENDEN, T., WANG, H.:

Cyclic nucleotide plasma levels in fed and fasting rats.

Scan.J.Clin.Lab.Invest. 37: 429, 1977.

MOSKOWITZ, J. y FAIN, I.N.:

Stimulation by growth hormone and dexamethasone of labeled cyclic adenosine 3',5'-monophosphate accumulation by white fat cells.

J.Biol.Chem. 245: 1101, 1970.

PAUK, G.L. y REDDY, W.J.:

Citado por Selawry y col.(1973).

Diabetes. 20: 129, 1971.

PAWLSON, L.G., LOWELL-SMITH, C.J., MANGANIELLO, V.C., VAUGHAN, M:

Effects of epinephrine, adrenocorticotrophic hormone, and theophylline on adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase activity in fat cells.

Proc.Natl.Acad.Sci. USA. 71: 1639, 1974.

PERSSON, B., HOOD, B., ANGERVALL, G.:

Effects of prolonged fasts on lipoprotein lipase activity eluted from human adipose tissue.

Acta.Med.Scand. 188: 225, 1970.

PITTMAN, R.C., GOLANTY, E., STEINBERG, D.:

A second form of hormone-sensitive lipase from rat adipose tissue homogenates.

Biochim.Biophys.Acta. 270: 81, 1972.

RABEN, M.S., MOLLENBERG, C.H.:

Effect of growth hormone on plasma fatty acids.

J.Clin.Invest. 38: 484, 1959.

RABEN, M.S., HOLLEBERG, C.H.:

Lipolytic response to corticotropin.

Endocrinology. 68: 589, 1960.

RANDLE, P.J., GARLAND, P.B., NEWSHOLME, E.A., HALES, C.N.:

The glucose fatty acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus.

Lancet. 785, 1963.

REED, N. y FAIN, J.N.:

Stimulation of respiration in brown fat cells by epinephrine, dibutyryl-3',5'-adenosine monophosphate, and m-chloro (carbonyl cyanide)phenylhydrazine.

J.Biol.Chem. 243: 2843, 1968.

REIMANN, E.M., WALSH, D.A. y KREBS, E.G.:

Purification and properties of rabbit skeletal muscle adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase.

J.Biol.Chem. 246: 1986, 1971.

RESHEF, L. y SHAPIRO, B.:

Effect of epinephrine, cortisone and growth hormones on release of unesterified fatty acids by adipose tissue in vitro.

Metabolism. 9: 551, 1960.

RIZACH, M.A.:

An epinephrine sensitive lipolytic activity in adipose tissue.

J.Biol.Chem. 236: 657, 1961.

RIZACH, M.A.:

Activation of an epinephrine-sensitive lipolytic activity from adipose tissue by adenosine 3'5'-phosphate.

J.Biol.Chem. 239: 392, 1964.

ROBISON, G.A.:

Adenyl cyclase as an adrenergic receptor.

Ann.N.Y.Acad.Sci. 139: 703, 1967.

ROBISON, G.A., BUTCHER, R.W., SUTHERLAND, E.W.:

Cyclic AMP.

Acad.Pres. New York. 1971.

ROBISON, D.S.:

The function of the plasma triglycerides in fatty acid transport.

En: comprehensive biochemistry. Edited by: Florin, M. y Stotz, E.H.

Elsevier, New York. 51, 1970.

ROBISON, D.S.:

The role of clearing-factor lipase in the removal of triglyceride fatty from the plasma.

Biochem.J. 128: 9, 1973.

RODBELL, M.:

Metabolism of isolated fat cells. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis.

J.Biol.Chem. 239: 375, 1964.

RODBELL, M.:

Modulation of lipolysis in adipose tissue by fatty acid concentration in fat cell.

Ann.N.Y.Acad.Aci. 131: 302, 1965.

ROSEN, O.M. y ERLICHMANN, J.:

Reversible autophosphorylation of a cyclic 3',5'-AMP-dependent protein kinase from bovine cardiac muscle.

J.Biol.Chem. 250: 7788, 1975.

ROTH, J., GLICK, S.M., YALOW, R.S., BERSON, S.A.:

Hypoglycemia: a potent stimulus to secretion of growth hormone.

Science. 140: 987, 1963.

RUBIN, C.S., ERLICHMANN, J., ROSEN, O.M.:

Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase of human erythrocyte membranes.

J.Biol.Chem. 247: 6135, 1972.

RUDMAN, D., BROWN, S.J., MALKIN, M.F.:

Adipokinetic action of adrenocorticotropin, thyroid-stimulating hormone, vasopressin, and β -melanocyte-stimulating hormones, fraction H, epinephrine and norepinephrine in the rabbit, guinea pig, hamster, rat, pig and dog.

Endocrinology. 72: 527, 1963.

SCOW, R.O. y CHERNICK, S.S.:

Action of pituitary and adrenal hormones in the development of diabetic ketosis.

Pro.Cong. IDF., Buenos Aires. 1970.

SCHIMMEL, R.J.:

Responses of adipose tissue to sequential lipolytic stimuli.

Endocrinology. 94: 1372, 1974.

SCHOTZ, M.C. MASSON, G.M.C., PAGE, I.H.:

ACTH in vitro on release of nonesterified fatty acids from adipose tissues of adrenalectomized rats.

Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 101: 159, 1959.

SCHWABE, V.:

Sensitive determination for adenylate cyclase activity by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate protein binding assay.

Arch.Pharmacol. 286: 83, 1975.

SCHWABE, U. y EBERT, R.:

Different effects of lipolytic hormones and phosphodiesterase inhibitors on cyclic 3',5'-AMP levels in isolated fat cells.

Arch.Pharmacol. 274: 287, 1972.

SCHWABE, V. y EBERT, R.:

Adenosine release from fat cells: effect on cyclic AMP levels and hormone actions.

Cycl.Nucl.Res. 5: 569, 1975.

SCHWACH, G. y HILZ, H.:

Protein-bound adenosine 3',5'-monophosphate in liver of glucagon treated rats.

Eur.J.Biochem. 76: 269, 1977.

SCHWECHHEINMER, K. y HOFMANN, F.:

Interaction of subunits of cAMP dependent protein kinase.

J.Biol.Chem. 1977.

SELAWRY, H., GUTMAN, R., FINK, G., RECENT, L.:

The effect of starvation on tissue adenosine 3',5'-monophosphate levels.

Biochem.Biophys.Res.Commun. 51:198, 1973.

SHAFRIR, E., SUSSMAN, K.E., STEINBERG, D.:

Mobilization of lipids in epinephrine-treated, adrenalectomized and hypophysectomized animals.

Fed. Prol. 18: 321, 1959.

SHAFRIR, E., BIALE, Y.:

Effect of experimental hypertriglyceridaemia on tissue and serum lipoprotein lipase activity.

Eur.J.Clin.Invest. 1: 19, 1970.

SHAW, J.E. y RAMWELL, P.W.:

Release of prostaglandin from rat epididymal fat pad on nervous and hormonal stimulation.

J.Biol.Chem. 243: 1498, 1968.

SHRAGO, E., SPENNETA, T., SHAHIDSALESS, F.M., ELSON, Ch.:

Glyceroneogenesis in rat and guinea pig adipose tissue during the fed and fasted states.

Metabolism. 27:563, 1978.

SMITH, E.B.:

The relationship between plasma and tissue lipids in human atherosclerosis.

Adv.Lipid.Res. 12: 1, 1974.

SOBRINO, F., PINTADO, E., PRIETO, J.C., RUIZ, G.,

GOBERNA, R.:

Plasma-cAMP concentration in fasting rats.

Horm.Metab.Res. 11: 183, 1979.

SODERLING, T.R., CORBIN, J.D., PARK, C.R.:

Regulation of adenosine 3',5',-monophosphate-dependent protein kinase.

J.Biol.Chem. 248: 1822, 1973.

STEINBERG, D.:

A new technique for counting aqueous solutions in the liquid scintillation spectrometer.

Adv. Tracer Meth. 1: 93, 1963.

STEINBERG, D.:

Interconvertible enzymes in adipose tissue regulated by cyclic AMP-dependent protein kinase.

Adv.Cycl.Nucl.Res. 7: 157, 1976.

STEINBERG, D., SHAFRIR, E., VAUGHAN, M.:

Direct effect of glucagon on release of unesterified fatty acids (UFA) from adipose tissue.

Clin.Res. 7: 250, 1959.

STEINBERG, D., VAUGHAN, J., MARGOLIS, S.:

Control of fatty acid release from adipose tissue through control of the rate triglyceride synthesis.

J.Biol.Chem. 235: 38, 1960.

STEINBERG, D., VAUGHAN, M.:

Release of free fatty acids from adipose tissue in vitro in relation to rates of triglyceride synthesis and degradation.

En: Handbook of physiology, section 5.A.E. Renold y G.F. Camill, Jr.

Editors. Amer.Physiol.Soc. Washington, 335, 1965.

STEINBERG, D., PITTMAN, R.:

Depression of plasma FFA levels in unanesthetized dogs by single intravenous doses of prostaglandin E.

Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 123: 192, 1966.

STEINBERG, D., VAUGHAN, M.:

In vitro and in vivo effects of prostaglandins on free fatty acid metabolism.

En: Proc.2nd Nobel Symp. Prostaglandins, edited by S.Bergstrom y B.Samuelsson. Almqvist & Wiksell, Stockholm. 190, 1967.

STEINBERG, D., MAYER, S.E., KHOO, F.C., MILLER, E.A., MILLER, R.E., FREDHOLM, B., EICHNER, R.:

Hormonal regulation of lipase, phosphorylase, and glycogen synthase in adipose tissue.

Adv.Cyclic.Nucl.Res. 5: 549, 1975.

STEINER, A.L., KIPNIS, D.M., UTIGER, R., PARKER, C.:
Radioimmunoassay for measurement of adenosine 3',5'-
monophosphate.

Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 64: 367, 1969.

STEINER, A.L., WEHMANN, R.E. y PARKER, C.W., KIPNIS, D.M.:
Radioimmunoassay for the measurement of cyclic
nucleotides.

Adv.Cycl.Nucl.Res. 2: 51, 1972.

TAO, M., SALAS, M.L. y LIPMANN, F:

Mechanism of activation by adenosine 3',5'-monophosphate
of a protein phosphokinase from rabbit reticulocytes.

Proc.Natl.Acad.Sci. 67: 408, 1970.

TERASAKI, W.L. y BROOKER, G.:

Cardiac adenosine 3',5'-monophosphate. Free and bound
forms in the isolated rat atrium.

J.Biol.Chem. 252: 1041, 1977.

TIETZ, A.:

Metabolic pathways in the insect fat body.

En: Handbook of physiology, adipose tissue.

Edited by A.E. Renold y G.F. Camill, Jr.

Amer.Physiol.Soc.Washintong, 45, 1965.

TSAI, S., BELFRAGE, P., VAUGHAN, M:

Activation of hormone-sensitive lipase in extracts of
adipose tissue.

J.Lipid.Res. 2: 466, 1970.

TSAI, S. y VAUGHAN, M.:

Inactivation of hormone-sensitive lipase extracts of
adipose tissue.

J.Biol.Chem. 247: 6253, 1972.

TSAI, S., FALES, M.M., VAUGHAN, M.:

Inactivation of hormone-sensitive lipase from adipose tissue with adenosine triphosphate, magnesium, and ascorbic acid.

J.Biol.Chem. 248: 5278, 1973.

TURINSKY, J.:

Study on plasma cyclic nucleotide concentration in fasting rats.

Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 142: 1189, 1973.

TURPIN, B.P., AUSTIN, M.W., SOLOMON, S.S.:

Urinary and plasma cyclic AMP levels during short term starvation in obese man: response to glucagon stimulation.

Horm.Metab.Res. 10: 36, 1978.

UELAND, P.M. y DOSKELAND, S.O.:

An adenosine 3',5'-monophosphate-adenosine binding protein from mouse liver.

J.Biol.Chem. 252: 677, 1977.

UNGER, R.M.:

Glucagon and the insulin: glucagon ratio in diabetes and other catabolic illnesses.

Diabetes. 20: 834, 1971.

VAUGHAN, M.:

Effects of hormones on phosphorilase activity in adipose tissue.

J.Biol.Chem. 235: 3049, 1960.

VAUGHAN, M.:

The production and release of glycerol by adipose tissue incubated in vitro.

J.Biol.Chem. 237: 3354, 1962.

VAUGHAN, M.:

An in vitro effect of triiodothyronine on rat adipose tissue.

J.Clin.Invest. 46: 1482, 1967.

VAUGHAN, M., STEINBERG, D., SHAFRIR, E.:

The effect of epinephrine, glucagon and ACTH on phosphorilase activity in adipose tissue.

J.Clin.Invest. 38: 1051, 1959.

VAUGHAN, M. y STEINBERG, D.:

Effect of hormones on lipolysis and esterification of free fatty acids during incubation of adipose tissue in vitro.

J.Lipid.Res. 4: 193, 1963.

VAUGHAN, M., BERGER, J., STEINBERG, D.:

Hormone-sensitive lipase and monoglyceride lipase activities in adipose tissue.

J.Biol.Chem. 239: 401, 1964.

WALAAS, O., WALAAS, E., GRONN EROD, O.:

Hormonal regulation of cyclic AMP-dependent protein kinase of rat diaphragm by epinephrine and insulin.

Eur.J.Biochem. 40: 465, 1973.

WALSH, D.A.:

Protein kinases.

Curr.Top.Cell.Regul. 5: 99, 1971.

WALSH, D.A., PERKINS, J.P. y KREBS, E.G.:

An adenosine 3',5'-monophosphate dependent protein kinase from rabbit skeletal muscle.

J.Biol.Chem. 243: 3763, 1968.

WALSM, D.A. y KREBS, E.G.:

Purification and characterization of a protein inhibitor of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinases.

J.Biol.Chem. 246: 1971, 1977.

WALSH, D.A. y KREBS, E.G.:

Protein kinases: aspects of their regulation and diversity.

Rec.Prog.Horm.Res. 29: 329, 1973.

WERTHEIMER, E., SHAPIRO, B.:

The physiology of adipose tissue.

Physiol.Rev. 28: 451, 1948.

WERTHEIMER, E., SHAFRIR, E.:

Factors effecting fat mobilization from adipose tissue.

Amer.J.Clin.Nutr. 8: 705, 1960.

WERTHEIMER, E., SHAPIRO, B.:

Glycogen metabolism in adipose tissue.

En: Handbook of physiology, adipose tissue.

Ed. Renold y G.F.Camill, Jr.

Amer.Physiol.Soc. 313, 1965.

WHYTE, H.M., GRAHAM. I.A.D. de WOLFE, M.S:

Body fat, blood pressure and serum cholesterol of Australian men.

Aust.Ann.Med. 7: 328, 1958.

WIELAND, O.:

Eine enzymatische methode zur bestimmung von glycerin.
Biochem.Z. 329: 313, 1957.

WIELAND, O.:

Glycerol.

En: bergmeyer, H-U (ed):

Meth.Enz.Anal. New York, Academic. 211, 1963.

WIELAND, O. y SUYTER, M.:

Glycerokinase: isolierung und eigenschaften des enzys.
Biochem.Z. 237: 320, 1957.

WINEGRAD, A.I. y RENOLD, A.E.:

Studies on rat adipose tissue in vitro.
J.Biol.Chem. 233: 267, 1958.

YUNIS, A.A. FISCHER, E.H., KREBS, E.G.:

Comparative studies on glycogen phosphorylase. Purification and properties of rabbit heart phosphorilase.
J.Biol.Chem. 237: 2809, 1962.

ZAPP, F., WALDOUGEL, M., FROESCH, E.R.:

Increased sensitivity of rat adipose tissue to the lipolytic action of epinephrine during fasting and its reversal during re-feeding.
Febs Letters. 76: 135, 1977.

ZIERLER, K.L., RABINOWITZ, D.:

Effect of very small concentrations of insulin on forearm metabolism. Persistence of its action in potassium and free fatty acid without its effects of glucose.
J.Clin.Invest. 43: 950, 1964.

ZINDER, O. y SHAPIRO, B.:

Effect of cell size on epinephrine and ACTH-induced
fatty acid release from isolated fat cells.

J.Lipid.Res. 12: 91, 1971.

FACULTAD DE FARMACIA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes
en el día de la fecha para conferir el Doctorado de
D. GUADALUPE RUIZ ALVAREZ

titulada REGULACION DE LA LIPOLISIS EN EL
TEJIDO ADIPOSEO DURANTE EL AYUNO

se acordó otorgarle la calificación de Sobresaliente
cum Laude

Sevilla, _____ de _____ de 1.9____

El Vocal,

B. Cabezas

El Presidente,

[Signature]

El Vocal,

[Signature]

El Secretario,

[Signature]

El Vocal,

[Signature]

El Doctorado,

Guadalupe Ruiz