

Efecto lipolítico de la serotonina *in vitro*

A. Martínez-Conde, P. Mayor de la Torre y J. Tamarit-Torres

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Complutense. Madrid-3.

(Recibido el 28 de julio de 1983)

A. MARTINEZ-CONDE, P. MAYOR DE LA TORRE and J. TAMARIT-TORRES. *Lipolytic Effect of Serotonin in vitro*. Rev. esp. Fisiol., 40, 213-220, 1984.

The lipolytic action of serotonin on isolated adipocytes from the adipose tissue of rats has been studied. The adipocytes were incubated in serotonin 10^{-6} M. Changes both in concentration and composition of the free intra and extracellular fatty acids as well as diacylglycerides through liquid gas chromatography were evaluated at different intervals.

A lower concentration of free fatty acids and diacylglycerides is produced during the first minutes of incubation as well as a subsequent increase in the concentration of both, which becomes greatest after 20-30 minutes.

The composition of both lipidic fractions (FFA and DAG) into fatty acids at 5, 10, 20 and 30 minutes, is related to the composition of the triacylglycerides (TAG), since during the esterification process a decline in the DAG of linoleic and palmitoleic acid is observed, both acids arranging themselves preferably in the TAG 2 position. Whereas the inverse process occurs during lipolysis; i. e. an increase in the proportion of the acids in the 2 position.

In the FFA fraction, a higher proportion of fatty acids, preferential by arranged in positions 1 + 3 of the TAG's is observed. Similarly a decrease is observed in the extracellular concentration of FFA in the presence of serotonin with respect to the controls, a fact which has been described by other authors.

An analysis of the present data leads us to revise the possible role of «Cahill's cycle» (simultaneous activation of the DAG-acyl-transferase and the HSL-TAG-lipase) in the action of serotonin and other hormones.

Key words: Lipolysis, Serotonin, Adipose tissue, Fatty acids, Diacylglycerides.

La serotonina, al igual que la epinefrina, glucagón y ACTH, estimula, en tejido adiposo, la actividad glucógeno-fosforilasa (20). Sin embargo, mientras que la epinefrina, glucagón y ACTH causan dicha activación con una movili-

zación paralela de los ácidos grasos libres, en el caso de la serotonina esta movilización sólo se logra a concentraciones muy elevadas (9). Así, por ejemplo, a una concentración de serotonina del orden de 10^{-3} M se produce un

importante incremento en la actividad fosforilasa, mientras que su efecto lipolítico es muy pequeño (3, 19, 20, 22).

Por otra parte, varios autores (1, 8, 9, 21), pusieron de manifiesto que las hormonas lipolíticas causan un incremento en la esterificación, resultados que están en contradicción con los obtenidos por otros (10, 12, 17, 18), quienes mediante la utilización de ácidos grasos libres marcados isotópicamente o de sus Acil-CoA demuestran que las hormonas lipolíticas producen una inhibición en la esterificación, es decir, una disminución en la incorporación de ácidos grasos en tejidos estimulados con estas hormonas. Sin embargo, la validez de estos resultados ha sido puesta en duda por LEBOEUF (11) ya que según este autor los modelos experimentales utilizados no permiten la elaboración de tales conclusiones, no encontrándose modificaciones sustanciales en los modelos utilizados con posterioridad al análisis de Leboeuf.

En el presente trabajo se ha estudiado el efecto de la serotonina sobre los niveles de ácidos grasos libres y diacilglicéridos en adipocitos aislados de rata, aportando nuevos datos que demuestran que la serotonina ejerce una acción similar a la encontrada por otros autores (8, 9, 21) para el caso de epinefrina y otras hormonas.

Material y métodos

Aislamiento de adipocitos. Se utilizaron ratas Wistar de 250-300 g de peso, que fueron sacrificadas por decapitación y extraído el tejido graso de ambos epidídimos para proceder al aislamiento de adipocitos mediante la técnica modificada de RODBELL (14). Los adipocitos fueron lavados tres veces y se procedió al análisis microscópico de su estado utilizando Tripan azul.

Incubación. Se realizó en tubos de plástico de 1,4 ml, en los que se depositaron 0,2 ml de adipocitos, 0,05 ml de una disolución de serotonina 3,7 $\mu\text{g/ml}$ (0,05 ml de Krebs-Ringer-Hepes en los controles) y 1 ml de albúmina 5 % en Krebs-Ringer-Hepes. La albúmina fue de la fracción V de Sigma, esencialmente libre de ácidos grasos ($< 0.005\%$). Los tubos fueron introducidos en un baño metabólico termostático Kottermann (mod. Heron) a 37° C con agitación de 60 golpes/min y fueron retirados a distintos tiempos.

Separación de adipocitos del medio de incubación. Al término de la incubación los tubos fueron introducidos en centrífuga Beckman (mod. B) y, tras centrifugar a 20.000 rpm durante 1 min, se obtuvieron los adipocitos en el sobrenadante y el medio de incubación en la fase inferior conteniendo la albúmina ligada a los ácidos grasos libres extracelulares. Los tubos se introdujeron en un contador de tubos Beckman con un rotor acoplado, lo que permitió recoger ambas fracciones.

Concentración extracelular de ácidos grasos libres. Fueron extraídos desde el medio de incubación mediante la técnica de DOLE y MEINERTZ (6) e inyectados en una columna de cromatografía gas-líquido sin previa metilación, utilizando la técnica de OTTENSTEIN y SUPINA modificada (13).

Concentración intracelular de ácidos grasos libres, diacilglicéridos y triacilglicéridos. Los lípidos de los adipocitos, recogidos en la fase sobrenadante, fueron extraídos utilizando la técnica de FOLCH *et al.* (7) previa sonicación y, a continuación, fueron fraccionados por cromatografía en capa fina, tras lo cual se analizaron las fracciones triacilglicéridos, diacilglicéridos y ácidos grasos libres por cromatografía gas-líquido.

Análisis de la distribución posicional de los ácidos grasos en los triacilglicéridos. Para realizar el análisis de la distribución posicional de los ácidos grasos en los triacilglicéridos se partió de 20 mg de tejido adiposo epididimal de rata cuyos lípidos totales fueron extraídos por homogeneización con 20 ml de cloroformo-metanol (2:1). Los lípidos fueron fraccionados por cromatografía en capa fina y la fracción de triacilglicéridos, tras ser redisoluelta en cloroformo, lavada tres veces con agua destilada (v/v) y desecada con Na_2SO_4 fue llevada a sequedad bajo atmósfera de nitrógeno en tubos de extracción. A continuación se añadieron 2,5 ml de Krebs-Hepes (pH 7,4) y tras sonicar 5 min se incubó con 0,04 ml de disolución de alfalipasa de *Rhizopus arrizus* (Boehringer Mannheim) durante 30 min a 37° C en baño con agitación. Una vez extraídos los lípidos totales, mediante la técnica de FOLCH *et al.* (7) se procedió al fraccionamiento de los mismos por cromatografía en capa fina, recogiendo las fracciones de ácidos grasos libres y monoacilglicéridos para su análisis por cromatografía gas-líquido (13).

Resultados

En adipocitos control, incubados sin hormona, se observa (tabla I) un descenso continuo en la concentración de ácidos grasos libres totales entre los 5 y 30 min de incubación, mientras que en adipocitos incubados con serotonina (10^{-6} M) se observa una menor concentración de ácidos grasos libres intracelulares a los 5 y 10 min. Sin embargo, tanto a los 20 como a los 30 min se produce una inversión del proceso haciéndose máximo el efecto lipolítico a los 20 min de incubación.

Las concentraciones de diacilglicéridos en adipocitos control, muestran un continuo descenso entre los 5 y 30 min,

mientras que los incubados con serotonina (10^{-6} M) muestran un descenso más acusado que los controles a los 20 y 30 min, siendo máxima la concentración intracelular de diacilglicéridos a los 20 min (tabla I).

Las concentraciones de los ácidos grasos liberados al medio de incubación es inferior en presencia de serotonina respecto a los controles, a todos los tiempos (tabla I).

La variación en la proporción de los distintos ácidos grasos componentes de los diacilglicéridos, (tabla II), permite observar que los ácidos linoleico (18:2) y palmitoleico (16:1) presentan mayor descenso porcentual durante la esterificación (controles 10, 20 y 30 min, e incubaciones con hormona 5 y 10 min), siendo estos ácidos preferentemente dispuestos en la posición 2 de los triacilglicéridos.

Los ácidos palmítico (16:0), esteárico (18:0) y oleico (18:1), dispuestos preferentemente en las posiciones 1 y 3 de los triacilglicéridos sufren, por el contrario, un incremento porcentual en dichos tiempos, siendo el ácido esteárico (18:0) el que se encuentra más incrementado y el que mayor preferencia presenta por las posiciones 1 y 3.

En adipocitos incubados con serotonina a los 20 y 30 min, coincidiendo con el proceso lipolítico, se produce un cambio en el orden de descenso relativo.

La comparación de las composiciones obtenidas para la fracción de ácidos grasos libres y las posiciones 1 + 3 de los triacilglicéridos muestra una gran similitud entre las mismas (tabla III).

Por incubación de los triacilglicéridos de tejido adiposo epididimal con alfalipasa de *Rhizopus arrizus* se obtiene la distribución posicional de los ácidos grasos (tabla IV). Se observa que, de dichos ácidos, el esteárico (18:0) es el que mayor preferencia posee por las posiciones 1 + 3, mientras que el linoleico es el que menor lo presenta por

Tabla I. *Ácidos grasos liberados al medio (AGL medio), ácidos grasos libres totales (AGL totales) y ácidos grasos esterificados en forma de diacilglicéridos (AG en DAG).* Controles (C) y con serotonina (S). Valores expresados como μg de ácido graso/g de tejido adiposo ($n = 4$). $\bar{X} \pm \text{E.S.}$

Tiempos min	AGL medio		AGL totales		AG en DAG	
	C	S	C	S	C	S
5	927,6 $\pm 35,4$	824,7 $\pm 28,3$	1689,4 $\pm 195,1$	1374,8 $\pm 101,2$	11439,8 $\pm 227,2$	9586,5 $\pm 296,1$
10	977,7 $\pm 49,9$	865,5 $\pm 35,3$	1315,7 $\pm 84,7$	1170,7 $\pm 36,5$	9749,9 $\pm 398,1$	7987,2 $\pm 246,3$
20	979,8 $\pm 29,6$	912,6 $\pm 52,3$	1264,8 $\pm 54,3$	1509,6 $\pm 55,8$	8428,3 $\pm 375,2$	10689,3 $\pm 195,3$
30	998,9 $\pm 65,4$	887,5 $\pm 17,5$	1299,9 $\pm 86,4$	1465,7 $\pm 162,2$	8318,0 $\pm 184,2$	10327,3 $\pm 286,6$

Tabla II. *Composición en ácidos grasos de los diacilglicéridos en incubación de adipocitos aislados controles (C) y con serotonina (S).* Valores expresados como % molar. ($n = 4$). $\bar{X} \pm \text{E.S.}$

Ácidos	5 min		10 min		20 min		30 min	
	C	S	C	S	C	S	C	S
16 : 0	24,56 $\pm 0,86$	25,16 $\pm 0,61$	25,64 $\pm 0,59$	25,79 $\pm 0,46$	25,41 $\pm 0,81$	23,98 $\pm 0,39$	25,59 $\pm 0,39$	23,90 $\pm 0,47$
16 : 1	8,57 $\pm 0,78$	7,39 $\pm 0,60$	8,47 $\pm 0,51$	6,68 $\pm 0,54$	8,02 $\pm 0,58$	9,90 $\pm 0,51$	7,34 $\pm 0,47$	9,25 $\pm 0,49$
18 : 0	5,88 $\pm 0,67$	7,99 $\pm 0,44$	6,60 $\pm 0,39$	8,93 $\pm 0,38$	8,42 $\pm 0,46$	5,46 $\pm 0,37$	8,86 $\pm 0,70$	5,45 $\pm 0,35$
18 : 1	33,14 $\pm 0,82$	34,62 $\pm 0,64$	34,27 $\pm 0,49$	35,92 $\pm 0,57$	34,37 $\pm 0,54$	32,86 $\pm 0,61$	35,54 $\pm 0,62$	33,21 $\pm 0,56$
18 : 2	27,96 $\pm 0,33$	24,85 $\pm 0,93$	25,02 $\pm 0,89$	22,77 $\pm 0,98$	23,77 $\pm 0,72$	27,81 $\pm 0,75$	22,67 $\pm 0,65$	28,18 $\pm 0,88$

estas posiciones y el que mayor lo hace por la 2, estando este grado preferencial en estrecha relación con los puntos de fusión para cada ácido. Así se observa que cuanto mayor es el punto de fusión mayor es la tendencia del ácido por ocupar las posiciones (1 + 3), (18:0;

punto fusión = 69, 6° C, % Molar en las posiciones 1 + 3 = 92,18 %), mientras que cuanto menor es el punto de fusión mayor es la tendencia para ocupar la posición 2, (18:2, punto fusión = -5,0° C, % Molar en la posición 2 = 46,56).

Tabla III. Composición de los ácidos grasos libres en el interior de los adipocitos durante su incubación. Controles (C) y con serotonina (S). Valores expresados como % molar. (n = 4). $\bar{X} \pm E.S.$

Ácidos	5 min		10 min		20 min		30 min	
	C	S	C	S	C	S	C	S
16 : 0	30,15 $\pm 0,75$	30,73 $\pm 1,04$	28,74 $\pm 1,32$	28,79 $\pm 0,52$	29,65 $\pm 0,93$	30,62 $\pm 0,68$	28,47 $\pm 0,36$	29,36 $\pm 1,46$
16 : 1	8,43 $\pm 0,40$	9,35 $\pm 0,41$	10,26 $\pm 0,19$	10,08 $\pm 0,30$	8,84 $\pm 0,24$	9,84 $\pm 0,31$	9,38 $\pm 0,54$	8,90 $\pm 0,15$
18 : 0	7,74 $\pm 0,27$	9,09 $\pm 0,69$	7,83 $\pm 0,10$	7,41 $\pm 0,45$	8,15 $\pm 0,47$	8,23 $\pm 0,25$	8,59 $\pm 0,47$	8,74 $\pm 0,31$
18 : 1	29,19 $\pm 1,09$	28,76 $\pm 0,77$	30,45 $\pm 0,39$	30,68 $\pm 1,29$	28,74 $\pm 0,71$	29,46 $\pm 0,73$	31,02 $\pm 1,22$	29,22 $\pm 0,82$
18 : 2	24,49 $\pm 0,42$	22,07 $\pm 0,74$	22,71 $\pm 1,16$	23,05 $\pm 0,92$	24,62 $\pm 1,63$	21,83 $\pm 1,63$	22,52 $\pm 0,84$	23,77 $\pm 0,62$

Tabla IV. Distribución posicional de los ácidos grasos en la molécula de triacilglicéridos y punto de fusión de cada ácido.

Ácido graso	% Molar en posiciones 1 + 3	% Molar en posición 2	Punto de fusión °C
18 : 0	92,18	7,82	+69,6
16 : 0	78,72	21,28	+63,1
14 : 0	72,58	27,42	+53,9
18 : 1	67,27	32,43	+13,4
16 : 1	62,07	37,93	- 0,5
18 : 2	53,44	46,56	- 5,0

Discusión

Las modificaciones en la concentración de ácidos grasos libres y diacilglicéridos en adipocitos incubados con serotonina ponen de manifiesto que dicha sustancia causa una activación sucesiva de la esterificación, (descenso paralelo de las concentraciones de ácidos libres y diacilglicéridos), y de la lipólisis, (incremento simultáneo de las concentraciones de ácidos grasos libres y diacilglicéridos), lo cual está de acuerdo con los datos encontrados en otros autores (16) que durante los primeros minutos de incubación con epinefrina observan una esterificación seguida de una posterior activación de la lipólisis, así como que por estimulación de la lipólisis con

ACTH (15) se obtiene un incremento en la concentración de diacilglicéridos.

Este hecho conduce a la controversia suscitada por los resultados obtenidos por diversos autores (1, 8, 9, 21) que encuentran una estimulación del proceso de esterificación promovido por hormonas hasta entonces consideradas únicamente como lipolíticas, discusión aún no zanjada por resultados obtenidos posteriormente (17, 18), puesto que conservan aún el fundamento técnico que ya había sido criticado por LEBOEUF (11).

La liberación selectiva de ácidos grasos preferentemente dispuestos en las posiciones 1 + 3 de los triacilglicéridos no parece radicar en una especificidad en el proceso de transporte de los áci-

dos grasos libres producidos durante la lipólisis, sino en mecanismos enzimáticos.

La posibilidad de funcionamiento simultáneo de los mecanismos de esterificación y lipólisis ha sido criticada (2) como contraria a la «lógica de economía celular». Sin embargo, ya se había propuesto la posibilidad apuntada (4) asignándose al ciclo de lipólisis-esterificación (ciclo de Cahill) un carácter termogénico, alcanzando una peculiar significación en el tejido adiposo pardo de los animales hibernantes.

La correlación entre posicionalidad y punto de fusión de los ácidos grasos esterificados en triacilglicéridos del tejido induce a pensar que el «ciclo de Cahill» tenga no sólo un carácter termogénico sino que también represente una forma de conservación de los ácidos grasos de menor punto de fusión cuyo objetivo fuese mantener la liquidez de la gota grasa, necesaria para la acción interfásica de la HSL (lipasa tisular).

Los resultados obtenidos en cuanto a variaciones en la composición de los diacilglicéridos durante los procesos de esterificación y de lipólisis tendrían su explicación en la preferencia de la diacilglicerol-acil-transferasa por los 1,2-diacilglicéridos ricos en ácidos grasos de cadena larga e insaturada (5), y muestran cómo la activación del ciclo de Cahill (acción simultánea de HSL y DAG-acil-transferasa) por las hormonas adipocinéticas no debe estar sujeta necesariamente a la «lógica de economía celular», por cuanto introduce modificaciones cualitativas en la estructura de los triacilglicéridos almacenados en tejido.

Resumen

Se estudia la acción lipolítica de la serotonina sobre adipocitos aislados de tejido adiposo epididimal de rata.

Los adipocitos se incuban con serotonina (10^{-6}

M) y se valoran, a distintos tiempos, las modificaciones tanto en las concentraciones como en la composición de los ácidos grasos libres extra e intracelulares así como de los diacilglicéridos mediante cromatografía gas-líquido.

Se produce un descenso en las concentraciones de ácidos grasos libres (AGL) y diacilglicéridos (DAG) durante los primeros minutos de incubación, y un posterior incremento en la concentración de ambos que se hace máximo a los 20-30 minutos.

La composición en ácidos grasos de ambas fracciones lipídicas (AGL y DAG) a 5, 10, 20 y 30 min está relacionada con la composición de los triacilglicéridos (TAG), observándose que durante el proceso de esterificación se produce un descenso en los DAG de linoleico y palmitoleico, que son a su vez los ácidos que se disponen preferentemente en la posición de 2 de los TAG. Durante la lipólisis se produce el proceso inverso, es decir, un incremento en la proporción de los ácidos dispuestos en la posición 2.

En la fracción de AGL se observa una mayor proporción de los ácidos grasos dispuestos preferentemente en las posiciones 1 + 3 de los TAG, así como una disminución en la concentración extracelular en presencia de serotonina con respecto a los controles.

El análisis de los datos obtenidos lleva a revisar el posible papel del «ciclo de Cahill» (activación simultánea de DAG-acil-transferasa y HSL-TAG lipasa) en la acción de la serotonina y otras hormonas.

Bibliografía

1. BALL, E. G. y JUNGAS, R. L.: *Biochem.*, 2, 586-592, 1963.
2. BELL, R. M. y COLEMAN, R. A.: *Ann. Rev. Biochem.*, 49, 459-487, 1980.
3. BIECK, P., STOCK, K. y WESTERMANN, E.: *Life Sci.*, 5, 2157-2163, 1966.
4. CAHILL, G. F. Jr.: En «Fat as a tissue» (K. Rodahl and B. Issekutz, Jr., eds.). McGraw-Hill Book Co., Nueva York, 1964, pp. 169-183.
5. COLEMAN, R. y BELL, R. M.: *J. Biol. Chem.*, 251, 4537-4543, 1976.
6. DOLE, V. P. y MEINERTZ, H.: *J. Biol. Chem.*, 235, 2595-2599, 1960.
7. FOLCH, J., LEES, M. y SLOANE STANLEY, G. H.: *J. Biol. Chem.*, 226, 497-509, 1957.
8. GORIN, E. y SHAFRIR, E.: *Biochim. Biophys. Acta*, 70, 109-117, 1963.

9. JUNGAS, R. L. y BALL, E. G.: *Biochem*, 2, 383-388, 1963.
10. KERPEL, S., SHAFRIR, E. y SHAPIRO, B.: *Biochim. Biophys. Acta*, 46, 495-504, 1961.
11. LEBOEUF, B.: En «Handbook of Physiology», Section V. (A. E. Renold y G. F. Cahill, eds.). Am. Physiol. Soc. Washington 1965. p. 39.
12. LYNN, W. S., McLOED, R. M. y BROWN, R. H.: *J. Biol. Chem.*, 235, 1904-1911, 1960.
13. OTTENSTEIN, M. y SUPINA, W. R.: *J. Chrom.*, 91, 119-126, 1974.
14. RODBELL, M.: *J. Biol. Chem.*, 239, 375-380, 1964.
15. SCOW, R. O.: En «Handbook of Physiology», Section V. (A. E. Renold y G. F. Cahill, eds.) Am. Physiol. Soc. Washington 1965. p. 452.
16. SHAFRIR, E. y KERPEL, S.: Bull. Israel Res. Council, 10A, N.º 1 1961. Citado por D. Steinberg en «Fat as a tissue» (K. Rodahl and B. Issekutz, Jr., eds.). McGraw-Hill Book Co., Nueva York, 1964, p. 143.
17. SOORANNA, S. R. y SAGGERSON, E. D.: *FEBS Letters*, 95, 85-87, 1978.
18. SOORANNA, S. R. y SAGGERSON, E. D.: *FEBS Letters*, 64, 36-39, 1976.
19. STEINBERG, D.: En «Fat as a tissue». (K. Rodahl y Issekutz, Jr., eds.) McGraw-Hill Book Co., Nueva York, 1964, p. 169.
20. VAUGHAN, M. J.: *J. Biol. Chem.*, 235, 3049-3053, 1960.
21. VAUGHAN, M. J. y STEINBERG, D.: *J. Lipid Res.*, 4, 193-199, 1963.
22. VAUGHAN, M. J. y BARCHAS, E.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 152, 298-303, 1966.

