

Instituto Español de Fisiología y Bioquímica  
Sección de Fisiología Comparada. Madrid.  
(Jefe : Prof. J. Lucas Gallego)

## Actividad de las lipasas y movilización de la grasa

por

R. Cosín, R. Muñoz y J. Lucas-Gallego

(Recibido para publicar el 10 de noviembre de 1964)

La actividad de la lipasa puede ser demostrada en el plasma, sangre, hígado y páncreas. Últimamente se han descrito por GEORGE y IYPE (11) en el corazón y tejido adiposo.

El aumento de actividad de la lipasa después de extirpar las suprarrenales, ha sido un hecho señalado hace años por COSÍN (5). Con estos experimentos se confirmaba la idea de ser un enzima adaptativo a las necesidades metabólicas y de ser inducido por muchos sustratos presentes en la sangre. Estas ideas han sido rechazadas por muchos autores que consideran que la activación es consecuencia de las alteraciones físico-químicas del medio, consecuencia de la falta de gluco y minero-corticoides como RUBINSTEIN y col. (21).

En la sangre, después de la administración de heparina, aparece un enzima llamado factor de aclaramiento, identificado también como lipo-protein-lipasa por HAHN (13, 14), que hidroliza triglicéridos de ciertas lipoproteínas de los quilomicrones. Hidroliza también las emulsiones de muchos aceites de la mis-

ma manera que los di y monoglicéridos, así como los ésteres metílicos (1, 10).

Sin embargo, varios investigadores no han visto un aumento de lipasas en el plasma de ratas y perros después de administrar heparina o incluso sostienen (17) que hay una disminución de actividad.

Estos resultados divergentes pueden guardar relación con la existencia de distintas esterases en el plasma (alíesterasas). Fraccionando con butanol un extracto se obtienen dos lipasas, una que actúa sobre triglicéridos de cadena corta y otra sobre los triglicéridos insaturados (19). Esta complejidad de los sustratos, las variaciones de actividad enzimática a consecuencia de cambios de tonicidad del medio o del potencial dieléctrico, hacen pensar en la existencia de varios enzimas estrechamente relacionados o de un multienzima capaz de reaccionar en estas circunstancias y con muy poca especificidad de sustrato.

La separación más precisa de los enzimas lipolíticos ha sido demostrada partiendo de las ideas de CORI (4) y de

RIZACK (16) de la activación lipolítica al fraccionar un homogenato y desintegrar las células, permitiendo diferenciar una lipo-protein-lipasa que flota al centrifugar a causa de su alta cantidad en triglicéridos y que necesita como cofactor una lipoproteína del plasma, la cual desintegraría los triglicéridos exógenos durante la asimilación, y otra que reside en la porción pobre en grasa del homogenato y es tres a cinco veces más activa que la anterior y actúa sobre los triglicéridos liberadores de la grasa de depósito, siendo sensible a la adrenalina que moviliza la grasa (23). Es por esta circunstancia que nos proponemos en este estudio determinar la actividad enzimática durante todo el curso que sigue la movilización de la grasa.

### Material y métodos

Los perros eran sometidos a ayuno de 72 horas, luego se realimentaban con una dieta rica en hidratos de carbono y a las cuatro horas se tomaban muestras de sangre, grasa del mesenterio y tejido hepático. En el mismo animal se tomaban otras tres muestras en condiciones normales de alimentación. Otras muestras eran tomadas después de las 72 horas de ayuno.

Las muestras eran homogeneizadas en un Potter, empleando solución de Ringer-Krebs.

En una parte alicuota se determinaba la lipasa por el método manométrico de RONA LASNITZKI (20).

En general la liberación de  $\text{CO}_2$  es una función de la cantidad de ácido graso que se libera en los manómetros de Warburg durante la reacción. En general, no se observa consumo de  $\text{CO}_2$  con los sustratos que hemos empleado, pero si se emplean sustratos con ácidos insaturados hay que corregir resultados por el consumo de  $\text{O}_2$  que presentan los insaturados (linoleico, etc.).

También en el suero viejo hay que

tener en cuenta que el volumen de gas carbónico liberado por mol de ácido graso está algo reducido, por lo cual conviene compararlos con los valores de un suero o plasma que no haya perdido  $\text{CO}_2$ .

El rendimiento en carbónico era alrededor de un 50 % del valor teórico (22,4 litros de  $\text{CO}_2$ /mol ácido graso) a este respecto es igual si el ácido graso es el butírico, el caproico o el palmítico. Los resultados se expresan en micromoles de ácido butírico consumido por hora y miligramos de proteína tisular.

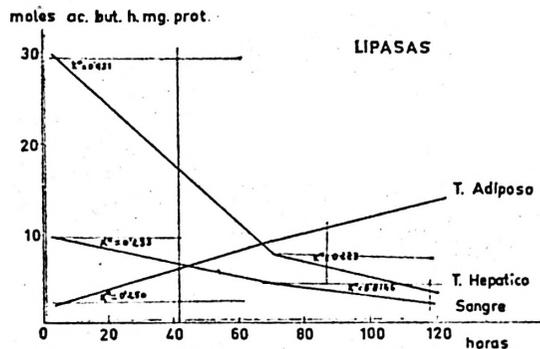
*Sustrato:* Se utilizaba una emulsión de tributirina o en otros casos trioleína, en Ringer (0,2 c.c. de tributirina en 50 c.c. de Puffer).

Para la *determinación de ácidos grasos libres* se sigue el método de DOLE (8): Se extrae la grasa con una mezcla a partes iguales de heptano y alcohol isopropílico. El residuo se lava con agua varias veces y se titula con NaOH N/10 en presencia de fenolftaleína.

La *determinación de ésteres de ácidos grasos* se hace según el método de SNYDER y STEPHENS (22) y CARLSON y WADSTRON (2). Se toman 0,5 c.c. de homogenato y se pone en contacto durante una hora con el reactivo A-B. (Reactivo A: NaOH 2,5 % en etanol de 95 %. Reactivo B: Hidroxilamina 2,5 % en etanol de 95 %). Se añade reactivo C (30 % de solución madre de Fe reactivo en 95 % de etanol preparada 5 minutos antes de su uso). Se agita y se centrifuga. Se transfiere el sobrenadante claro y se lee la D.O. frente a un blanco.

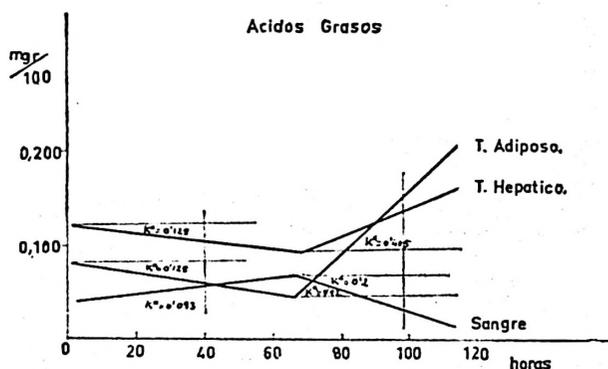
### Resultado

Los valores de la actividad enzimática de las lipasas se ha representado en la gráfica I, en micromoles de ácido butírico liberado por hora y miligramo. Las determinaciones se hacían simultáneamente con las de los ácidos grasos libres y ésteres de ácidos grasos en la sangre, hígado y tejido adiposo.



Gráf. I.

Los valores encontrados de ácidos grasos libres en la sangre, hígado y tejido adiposo en ayunas corresponden a los valores medios encontrados en perros en ayunas durante 72 horas. Los valores se representan en la gráfica II. Los perros realimentados corresponden a los anteriores sometidos a una dieta rica en hidratos de carbono, cuyos valores se encuentran en la gráfica a partir de 70 hasta las 120 horas.

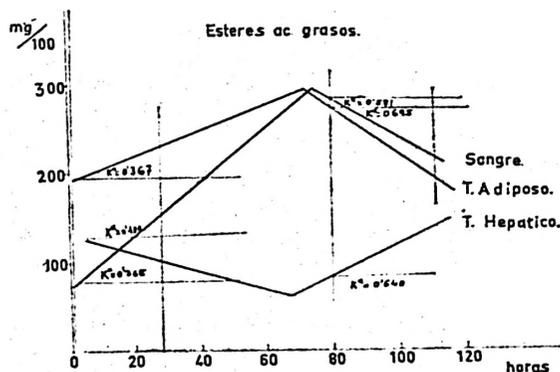


Gráf. 2.

Las determinaciones de ésteres de ácidos grasos se realizaron siguiendo el mismo esquema, simultáneamente a las de ácidos grasos y se representan en la gráfica III.

En el ayuno prolongado hasta 72 horas se mantiene a un nivel relativamente alto la resíntesis de triglicéridos — como

se ve en la gráfica III. La lipemia se aumenta durante el ayuno y aún hay una buena reesterificación de triglicéridos en el tejido adiposo y disminuye en el hígado. Es muy verosímil que el glicerofosfato aceptador de los ácidos grasos se suministre por azúcares fosforilados casi exclusivamente en el tejido adiposo. Para el hígado se ha descrito una glicerolquinasa capaz de fosforilar la glicerina, que sería otra vía de síntesis de glicerofosfatos.



Gráf. 3

La lipólisis (gráfica I) es alta en el tejido adiposo durante la realimentación, mientras que la reesterificación está disminuida (gráfica III). A la inversa, encontramos en el hígado que con una buena reesterificación aparece una lipólisis disminuida.

La velocidad de movilización se midió por el descenso exponencial de la pendiente de la recta y el tiempo en abscisas.

La velocidad de recuperación se hacía viendo en los perros realimentados el aumento exponencial de la pendiente de la recta y el tiempo en abscisas, es decir, que la velocidad de recuperación de los valores normales se definiría por el coeficiente angular de la pendiente de la recta y la línea de tiempo en abscisas. La actividad lipolítica es alta en el tejido adiposo, tanto en ayunas como después de realimentado, llega a alcanzar una

cifra de  $15 \mu$  moles de ácido butírico liberado por miligramo de proteína, con un valor de  $K_a = 0,250$  hasta las 120 horas. El nivel de la actividad lipolítica de la sangre se mantiene dentro de límites discretos entre 3 y  $10 \mu$  moles de ácido butírico por mgr. de proteína y unos coeficientes de  $K_a = 0,233$  y  $K_a = 0,014$ .

La variación más marcada es el descenso de la actividad lipolítica del tejido hepático por el ayuno  $K_a = 0,931$  y la recuperación de la actividad lipolítica durante la realimentación con valor de  $K_a = 0,223$ .

El balance de los ácidos grasos (gráfica II) tiene su mayor significación en la recuperación por realimentación sobre todo en el tejido hepático  $K_a = 0,128$  y  $K_a = 0,405$  y para el tejido adiposo de  $K_a = 0,128$  y  $K_a = 0,920$ , los valores de la sangre se mantienen dentro de valores de  $K_a = 0,093$  y  $K_a = 0,200$ .

En cuanto a los ésteres de ácidos grasos (gráfica III), en la sangre se encuentra una curva casi simétrica con valores aproximados en ambas fases de  $K_a = 0,765$  para la primera y de  $K_a = 0,581$  para la segunda. El valor extremo corresponde al tejido adiposo que en la primera fase tiene un valor de  $K_a = 0,367$  y de  $K_a = 0,695$  y el tejido hepático de  $K_a = 0,434$  y  $K_a = 0,640$ .

### Discusión

La actividad lipolítica se ha estudiado en tres órganos simultáneamente y en el mismo animal para hacer experiencias uniformes y evitar en lo posible influencias del medio sobre el enzima. Los tres órganos son fundamentales en el transporte de la grasa y en las interconversiones entre grasas y ácidos grasos, de tal manera que la liberación de ácidos grasos, su transporte y reesterificación estaría encomendada a estos tres órganos, actuando a modo más o menos medi-

tado una constelación de factores endocrinos y electrolíticos de tal manera que existiría un balance entre la glucosa dependiente, esterificación de ácidos y la velocidad de escisión de triglicéridos a ácidos grasos.

Las concentraciones de ácidos grasos y triglicéridos varían significativamente, tanto en la grasa como en el hígado (gráfica II y III). En la sangre los valores son menos significativos, consecuencia de que la sangre tiene una función eminentemente transportadora, casi exclusiva.

El aumento de movilización de triglicéridos va acompañado de la elevación de la cantidad de ácidos grasos en la sangre (gráfica II). De tal manera que podemos considerar que a falta de un trastorno metabólico definido, una alteración en los niveles de ácidos grasos libres del plasma puede emplearse como una medida de la movilización de la grasa.

Según el concepto ya ampliamente admitido de DESNUELLE y colaboradores (6-7), simultáneamente con la lipólisis, es posible que exista una reesterificación según GORI y SHAFRIR (9) de los ácidos grasos con objeto de evitar de un lado las acciones tóxicas y evitar una lipólisis completa del tejido adiposo. Es más, esta reesterificación debe hacerse a una gran velocidad para evitar las acciones tóxicas aún cuando en algunos órganos, como el corazón, pueden utilizarse para fines energéticos.

Actualmente se admite que el glicero-fosfato, (12-15), es un aceptor para los ácidos grasos lo mismo que los diglicéridos, (18) e incluso los monoglicéridos. Es muy posible, como dicen CLARK y HUBSCHER (3), que la actividad enzimática esté condicionada a la tasa de ácidos grasos disponible en un momento dado en el depósito energético de la sangre o del tejido adiposo que es la reserva en glicero-fosfato, de tal manera que al faltar aceptor para los ácidos grasos la misma lipasa pondría en libertad monoglicéridos que acoplarían a los ácidos grasos libres

esa sería una explicación de los altos valores de actividad enzimática encontrados en el animal realimentado.

### Resumen

Se determina la actividad lipasa y los niveles de ácidos grasos libres y esterificados, en sangre, hígado y tejido adiposo, de perros mantenidos en ayuno durante 72 horas y realimentados luego con una dieta rica en hidratos de carbono.

La actividad lipasa era poco variable en sangre y mucho más alta en hígado y tejido adiposo. El ayuno disminuye esta actividad en hígado y continúa disminuyendo después de realimentación. En tejido adiposo, en cambio, aumenta en ambos períodos.

El nivel de ácidos grasos libres en hígado y tejido adiposo disminuye durante las 72 horas de ayuno y aumenta en las 50 horas siguientes. Estas variaciones son mayores en el tejido adiposo. El nivel de ácidos grasos esterificados aumenta durante el ayuno en sangre y tejido adiposo, para disminuir luego por realimentación. En hígado, estas variaciones son de signo contrario, pero poco relevantes.

### Summary

#### Activity of the lipases and mobilisation of the fat.

Using the method of RONA and LASNITZKI and the Warburg technique, the lypolysis can be studied simultaneously with the esters of fatty acids in the blood, liver and adipose tissue.

It has been possible to follow the mobility of fat and its reesterification in the liver and adipose tissue, simultaneously with the reesterification of the blood as real transporter.

Mobility speed has been measured by the falling indication of the descent in the straight line of the graph, esters of fatty acid, and time in hours.

Recovery speed has been ascertained by the exponent increase in the figures,

depending on the straight line in the same experimental conditions, using dogs that had been fasting for 72 hours and who were then fed with food rich in carbohydrates, the final determination being carried out on an animal that was only fed again after 120 hours.

The lipolytic activity is expressed in micromoles of butiric acid, freed from substratum tributirine for an hour, and per milligran of protein.

### Bibliografía

- (1) ARTO, M. C. y REALE, L. : *Boll. Soc. Ital. Biol.*, **10**, 883, 1935.
- (2) CARLSON, L. A. y WADSTRON : *Cl. Chim. Acta*, **2**, 9, 1957.
- (3) CLARK, B. y HUBSCHER : *Biochem. Biophys. Acta*, **70**, 1, 1963.
- (4) CORY, C. F. y O. H. GAEMLER (editor) : *Enzymes units of Biological structure and funtion*. Acad. Press. N. Y. 573, 1963.
- (5) COSÍN, R. : Tesis doctoral. Madrid 1942.
- (6) DESNUELLE, P. : *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **33**, 909, 1951.
- (7) DESNUELLE, P., NAUDET, M. y ROUVIER, J. : *Biochem. Biophys. Acta*, **2**, 561, 1948.
- (8) DOLE, V. P. : *J. Chim. Invest.*, **35**, 150, 1956.
- (9) ÉRELA GORIN y ÉLEAZAR SHAFRIR : *Bioch. Biophys. Acta*, **70**, 109, 1963.
- (10) FRAZER, A., C. y SAMMONS, H. G. : *Biochem. J.*, **39**, 122, 1945.
- (11) GEORGE, J. C. y THOMAS IYPE : *Am. J. Physiol.*, **204**, 1, 165, 1963.
- (12) GEORGE, J. C. y THOMAS IYPE : *Am. J. Physiol.*, **204**, 1, 1963.
- (13) HAHN, P. F. : *Science*, **98**, 19, 1943.
- (14) HAHN, P. F. : *Biochem. Anal.* VII, 145, 1957.
- (15) JOHN, C., SCOTT, L. J. FINKELSTEIN y JOHN SPITZER : *Amer. J. Physiol.*, **203**, 3, 482, 1962.
- (16) MARTIN, A. RIZACK : *J. Biol. Chem.*, **236**, 661, 1961.
- (17) OVERBEECK, E. A. y VAN DER VIES ; *Biochem. J.*, **60**, 665, 1955.

- (18) PETER GOLDMAN y ROY VAGELOS : *J. Biol. Chem.*, **237**, 10, 1961.
- (19) ROBER LORY y AARON, M. ALTSCHUL : *Bioch. Bioph. Rev.*, **7**, 5, 375, 1962.
- (20) RONA, LASNITZKI : *Biochem. Zeitz*, **152**, 1, 1924.
- (21) RUBINSTEIN, D., CHIU, S., NAYLOR, J. y BECK, J. C. : *Am. J. Physiol.*, **206**, 149, 1964.
- (22) SNYDER, F. y STEPHENS, N. : *Clin. Chem.*, **7**, 267, 1959.
- (23) STETEN, D. y STETEN, M. R. : *Physiol. Rev.*, **40**, 505, 1960.