



ARTICULOS

PROTEINAS QUINASAS-DEPENDIENTES DEL cAMP Y LIPOLISIS

FRANCISCO SOBRINO

Sevilla



Introducción

Los triglicéridos (TG), ésteres de los ácidos grasos y del glicerol, constituyen sustancias de reserva en los organismos animales que se almacenan principalmente en las células del tejido adiposo (adipocitos). En una situación de escasez energética se rompen (lipólisis) en sus dos constituyentes, liberando a los ácidos grasos libres (FFA), los cuales en el proceso de la β -oxidación dan lugar a la energía biológicamente utilizable en forma de ATP (adenosin trifosfato). Tanto la síntesis de los TG como su degradación son procesos que están íntimamente interrelacionados con otras vías metabólicas, tales como la glucosis, el ciclo de Krebs o el transporte de la glucosa a través de las membranas. Existe una modulación de todos estos procesos por factores de tipo hormonal (insulina, glucasa, adrenalina, etc.), los cuales actúan sobre los enzimas implicados en ellos. Algunas de éstas relaciones están esquematizadas en la figura 1.

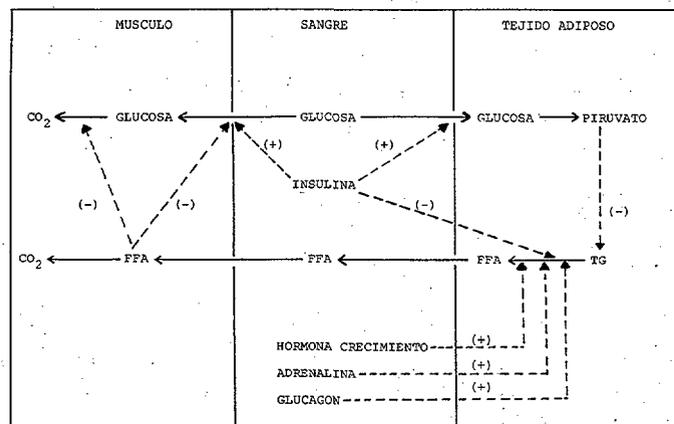
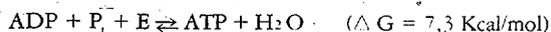


FIG. 1. (De «Regulation in Metabolism». E.A. Newsholme y C. Start. Ed. John Wiley and Sons. 1973)

Los FFA una vez liberados son oxidados en la mitocondria para rendir Acetil-CoA: la energía química contenida en los enlaces de ésta molécula es «extraída» en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (o ciclo de Krebs) en forma de equivalentes de reducción, los cuales son de nuevo oxidados en la cadena respiratoria (1). Esta molécula (acetil-CoA) constituye el nexo de unión entre el catabolismo de los azúcares y el de las grasas. En una situación de abundancia energética, por ejemplo, por haber ingerido un exceso de azúcares, estos proporcionan un exceso de Acetil CoA, parte del cual se distribuye hacia el ciclo de Krebs para ser oxidado, pero otra parte proporciona el sustrato para la síntesis de FFA (que posteriormente se almacenarán en forma de lípidos) (2).

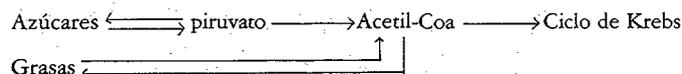
Para poder determinar experimentalmente el incremento o degradación de las moléculas que participan en una vía metabólica es necesario seleccionar un estado (bien creado artificialmente o bien aprovechando una si-

(1) La energía química desprendida en el proceso de transformación electrónica a través de los enzimas de la cadena respiratoria se almacena en forma de ATP, según la siguiente ecuación:



El enlace del grupo fosfato (P_i) con el adenosin difosfato (ADP) constituye un enlace rico en energía. El ATP se distribuye hacia aquellas reacciones endergónicas, verificándose en este caso su hidrólisis, desprendiendo la energía captada (reacción hacia la izquierda).

(2) En cambio las grasas, cuando se metabolizan, no pueden suministrar sustratos que sean utilizables para la síntesis de azúcares (que se almacenarían fundamentalmente en forma de glucógeno hepático) y ello es debido a que las células animales no disponen del equipo enzimático necesario para convertir el Acetil-CoA en piruvato, según la siguiente reacción:



Explica por qué en la dieta de las personas obesas se recomienda la no ingestión de azúcares, ya que impediría la oxidación de las grasas, al proporcionar otra fuente energética adicional.



tuación patológica) del animal de experimentación; es decir, hay que «orientar» el proceso objeto de estudio. En los estudios sobre lipólisis (degradación de lípidos) se pueden utilizar como modelo experimental a animales en ayunas. La razón es la siguiente: el ayuno produce un estado hipoglucémico (disminución de los niveles de glucosa en plasma). El hígado dispondrá en muy pequeña medida de glucosa para su degradación (vía glucolítica), y el organismo tendrá que poner en marcha otros mecanismos que suministren energía en forma de ATP. Lo consigue por la oxidación principalmente de las grasas, de las proteínas y del metabolismo de los cuerpos cetónicos. Conseguimos pues que el metabolismo lipídico esté orientado en el sentido de su catabolismo (degradación).

Hoy en día se tiene evidencia cierta, tanto por estudios «in vivo» como «in vitro» (con enzimas y sustratos aislados) de que existe una regulación eficaz del proceso de la lipólisis tanto por factores exógenos a la célula grasa, hormonas, como por una autoregulación ejercida por las propias concentraciones intracelulares de los FFA sobre las lipasas de triglicérido. En la Figura 2, se señalan los parámetros que participan en esta ruta metabólica.

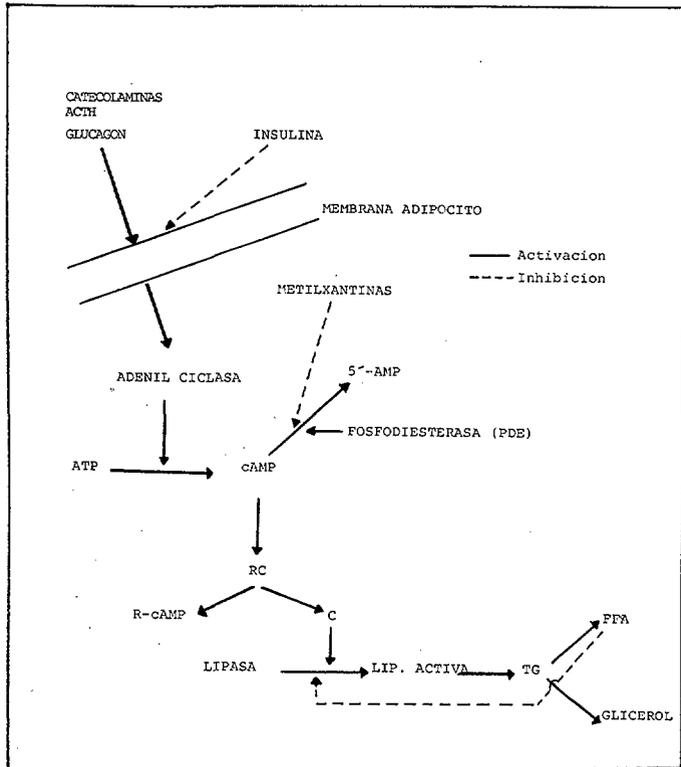


FIG. 2

El mecanismo descrito es el siguiente: una hormona (H) activa al enzima (biocatalizador) adenil ciclasa, localizado en la membrana celular (3), la cual cataliza la rotura hidrolítica del ATP para producir cAMP (3'-5' adenosin monofosfato cíclico). La concentración de este metabolito está también regulada por el enzima fosfodiesterasa (PDE) que lo transforma en 5'-AMP, ya inactivo. El cAMP activa a una proteína quinasa, constituida por dos

(3) El proceso es más complejo: la hormona (H) se une con un receptor (R) de membrana, específico, y posiblemente el complejo HR sea el que active al sistema de la adenilciclasa.

subunidades RC (R: reguladora; C: catalítica), según la siguiente reacción:



La subunidad catalítica (C) actúa sobre otro sistema enzimático, el de las lipasas, activándolo por fosforilación, que cataliza la rotura de los triglicéridos en glicerol y FFA, fenómeno que constituye la lipólisis. De esta manera, la concentración de glicerol liberado al medio (exterior de las células: puede ser el plasma o el medio de incubación cuando el experimento se hace en un tubo de ensayo) es un índice del grado de lipólisis. Para caracterizar las relaciones que se establecen en este proceso, es necesario disponer de técnicas analíticas lo suficientemente precisas como para determinar las pequeñas variaciones de estos metabolitos en el curso de la reacción.

Vamos a señalar a vía de ejemplo la determinación experimental de tres moléculas relacionadas con la lipólisis: el 3'-5'-adenosin monofosfato cíclico (cAMP), y el glicerol y la actividad enzimática de la proteína quinasa.

2. Técnicas analíticas

2.1. Concentración de cAMP

Esta molécula (un nucleótido cíclico) fue descubierta en 1956 (4). Se encuentra en los puntos de control de las más importantes rutas metabólicas. Su mecanismo de acción se ejerce a través de la activación de unos enzimas: las proteínas quinasa, según la ecuación 1. Su determinación analítica se realiza, entre otras, por la técnica de radioanálisis o «proteína enlazante» (5), por la cual se pueden medir concentraciones de 10^{-10} moles/ml.

Consiste dicha técnica en hacer reaccionar los siguientes constituyentes, en diferentes tubos de ensayo:

- diferentes concentraciones (conocidas) de cAMP.
- una concentración constante de cAMP [H^3], tritiado, que emite una radiación β , detectable en un contador de centelleo líquido.
- una concentración constante de proteína quinasa, purificada.

Se verifica la reacción esquematizada en la Figura 3.

(4) Esta molécula fue aislada por E.W. Sutherland y su equipo como un «factor estable al calor», en sus estudios sobre la acción del glucagón en el metabolismo del glucogeno hepático. Simultáneamente otro equipo (Dr. Lipkin) había aislado un nuevo componente a partir de la hidólisis alcalina del ATP. Ambos recurrieron, independientemente, al Dr. Heppel, solicitándole algún enzima que pudiera catalizar la rotura de sus compuestos. Se intercambiaron sus productos y comprobaron que tenían idénticas propiedades. El análisis químico muestra que está formada esta molécula por una adenina, una ribosa y un grupo fosfato (enlazado de forma cíclica a los carbonos 3' y 5' de la ribosa), en la proporción 1:1:1.

(5) El profesor Gustavo Bueno ha analizado la técnica que se describe, como ilustración de un análisis gnoseológico en el campo de las ciencias naturales, en el *Estatuto gnoseológico de las ciencias humanas*, tomo II, pág. 790 y sgs. (1977).

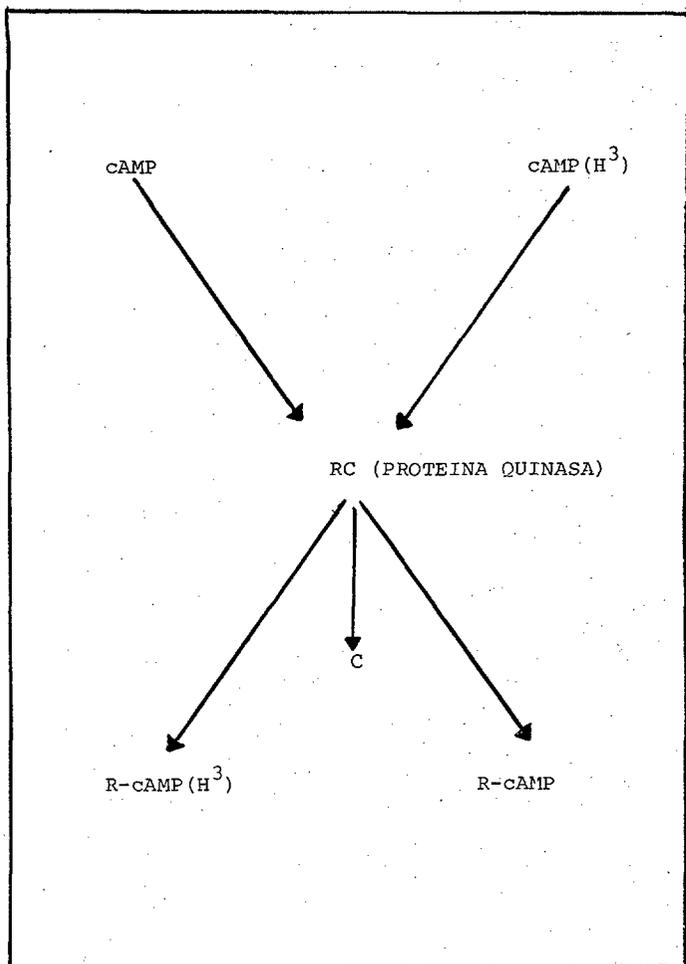


FIG. 3

Las dos formas del nucleótido tienden a unirse a la subunidad R (la subunidad C no juega aquí ninguna función) de la proteína quinasa (RC) con la que forman un complejo estable. En los tubos donde haya más cantidad de cAMP (variable), más cantidad de complejo R-cAMP se formará, y menos cAMP [H³]-R (que es lo que mide el contador β), ya que, por estudios previos, se ha calculado la concentración óptima de proteína quinasa en el sentido de que siempre se halle saturada por las dos formas del cAMP. Es obvio que en este análisis se presupone un idéntico comportamiento de las dos formas, radiactiva y no radiactiva del nucleótido. Cabría argumentar en contra de esta asunción lo siguiente: a) el Peso molecular del cAMP [H³] tiene dos unidades más que el cAMP, y b) ¿no puede alterar el enlace con la proteína quinasa la radiación β emitida por el cAMP [H³]? Habría pues un diferente comportamiento de la forma tritjada ante la proteína quinasa. Se puede responder que, con respecto al punto a), la posición del átomo de tritio [H³] en la adenina no altera la conformación espacial del grupo fosfato en disposición cíclica; de gran importancia ya que cuando el 3'-5 AMP cíclico pasa a 5'-AMP pierde su característica capacidad para desdoblarse a RC, de lo que se deduce que el grupo P_i ciclado juega un papel principal. Y con respecto a b), que la energía de la radiación β no es suficiente para alterar la estructura cuaternaria de los enzimas (proteínas).

La reacción se realiza a 4° C durante 90 minutos, en un medio que tiene los siguientes componentes:

1. Solución amortiguadora de fosfato pH 6,5, con el fin de asegurar la invarianza del pH durante la reacción. Este valor de pH se ha seleccionado en estudios previos, donde se ha encontrado que la máxima capacidad de unión se produce a este valor.

2. EDTA (ácido etilendiamintetracético), con el fin de captar a los iones Ca²⁺, que activan a la fosfodiesterasa (PDE), y que por lo tanto activan la destrucción del cAMP.

3. Teofilina, potente inhibidor de la PDE.

4. Inhibidor (I) que inhibe a la forma C de la proteína quinasa y estabiliza a la forma R-cAMP.

5. Y los componentes indicados en la Figura 3.

La reacción se puede detener, al tiempo indicado, por dos procedimientos (entre otros):

A. Filtración en filtros Millipore: las moléculas proteicas no lo pueden atravesar, pero sí las moléculas pequeñas (cAMP). Se consigue que los complejos cAMP [H³]-R queden retenidos en el filtro. De esta forma separamos a las formas libres del cAMP de las que están unidas al enzima. Medimos la radioactividad de los filtros (su equivalente: cAMP [H³]-R) y representamos en un diagrama de coordenadas cartesianas las cpm (cuentas por minuto) de cada filtro, frente a las diferentes concentraciones del cAMP (conocidas).

B. Separación con carbón activo. Unos determinados tipos de carbón (Norit A, por ejemplo), tienen una estructura microscópica formada por numerosos «canales» de diferentes diámetros. Por absorción pueden penetrar en ellos diferentes tipos de moléculas, en concordancia con su tamaño y peso molecular. Si previamente «tapamos» los canales grandes con moléculas específicas (por ejemplo, con albúmina, o con polímeros sintéticos del tipo del dextrano), podemos seleccionar las moléculas que vayan a entrar en los canales pequeños, y de esta forma realizar separaciones de moléculas de diferentes tamaños (obviamente esto es indispensable) que se encuentren juntas en el medio de la incubación: las moléculas pequeñas (en este ejemplo, pero podía ser al contrario), cAMP, quedan retenidas en los «canales» pequeños del carbón, y las grandes moléculas del tipo de cAMP-R y cAMP [H³]-R permanecen en la solución. Una simple centrifugación nos permite separar el carbón que queda en el fondo, del resto de la solución clara. Se forma una alícuota de ella, que junto con una preparación específica (líquido de centelleo) nos suministra un determinado n° de cuentas por minuto.

Por ambos métodos de separación, la radioactividad obtenida (en forma de cpm) se representa en un eje de coordenadas frente a su correspondiente concentración de cAMP (Figura 4). Se obtiene una parábola. Esta curva es experimental, en el sentido de que para cada análisis de concentraciones del cAMP es preciso realizar una, y referir a ella las cpm obtenidas para los «tubos problema». Estas cpm «problema» se interpolan en esa curva y se obtienen unas concentraciones del cAMP. Es sencillo entender a partir de la Figura 3 que al aumentar las cantidades de cAMP (no radioactivo): abscisa de la Figura 4,

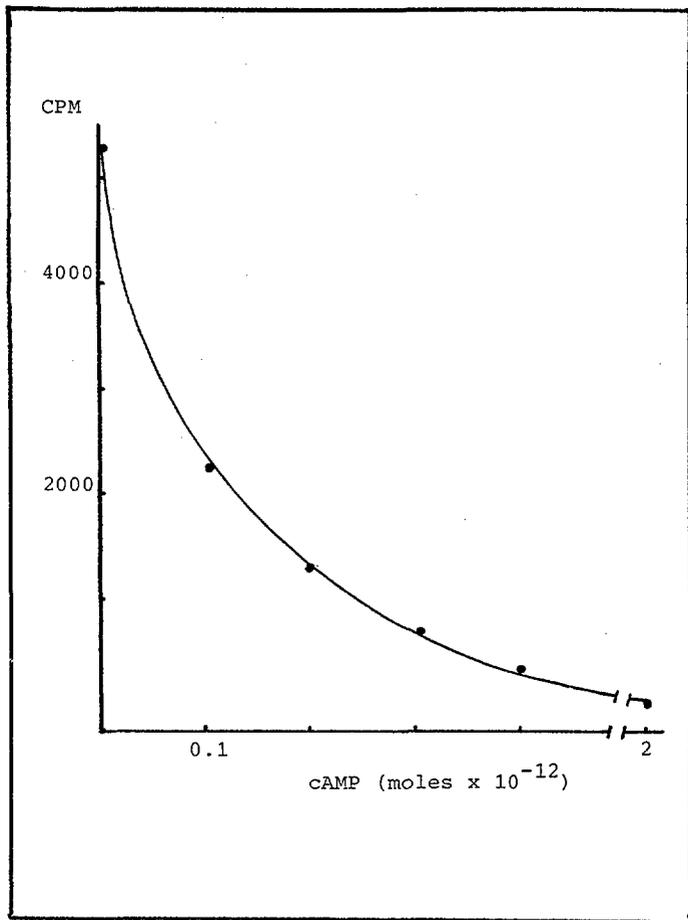


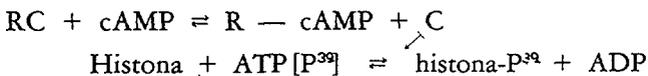
FIG. 4

deben de disminuir las cpm correspondientes al cAMP [$H^3 - R$]. Al ser la cantidad de proteína quinasa constante, cuanto mayor sea la concentración del cAMP (no radioactivo), más posibilidad habrá de interactuar con la proteína quinasa, y más se formará del complejo R-cAMP, y tanto menos del R-cAMP [H^3] (que es la especie que nos suministra los impulsos radioactivos). Habitualmente el cálculo de las concentraciones de cAMP se realiza en un computador, en el que se introduce la ecuación de la parábola y los coeficientes experimentales correspondientes: la integración de cada valor de y (cpm) nos suministra el correspondiente de x (concentración de cAMP).

2.2. Actividad enzimática de la proteína quinasa

Este enzima en la forma R_2C_2 (brevemente escribiremos RC) se encuentra en condiciones de inactividad, ya que la subunidad catalítica (C), se encuentra bloqueada por la subunidad reguladora (R). En presencia de cAMP, se separarán ambas unidades (según la reacción 1) quedando la subunidad C en condiciones de catalizar la fosforilación (cesión de una molécula de Fosfato, P) del ATP a otra proteína (sustrato). Mientras que en la técnica de determinación del cAMP medimos la formación de un complejo R-cAMP, aquí nos interesa medir la actividad de la subunidad C, es decir, su capacidad para catalizar la fosforilación de otros sustratos.

Las reacciones que tienen lugar en esta determinación son las siguientes:



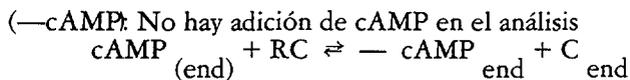
Histona: componente protéico susceptible de ser fosforilado (también se pueden utilizar otras proteínas tales como la fosforilasa, caseína, protamina, lipasas, etc.). ATP— P^{32} : componente dador de P. Posee el grupo fosfato (en posición γ) radioactivo (P^{32}) que emite una radiación β . Histona— P^{32} : componente que se mide al final de la reacción por la radiación β que emite. Si hay muchas cpm: se ha fosforilado mucha histona, luego la actividad enzimática de la proteína quinasa es grande.

La reacción se realiza en una solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5, que contiene Mg^{+2} (dando lugar al $Mg-ATP^{-2}$, que es la forma activa del ATP), teofilina (inhibidor de los enzimas fosfodiesterasas) y FNa (inhibidor de los enzimas ATP-asas, que rompen al ATP). Además en unos tubos añadiremos cAMP (exógeno), en concentración suficiente para activar todas las formas RC (se denominan: + cAMP), y en otros no (seran los: -cAMP).

La reacción anterior es dependiente de la concentración de cAMP, existiendo una relación lineal ente ella y la actividad de la proteína quinasa: Esto se observa bien cuando a una preparación del enzima vamos añadiendo cAMP: la actividad enzimática va incrementando en igual proporción. Sin embargo cuando se trabaja con extractos biológicos, en los cuales se miden ambos factores (cAMP y actividad de C), esta proporcionalidad que se postula entre ambos hay que demostrarla experimentalmente (6).

En muestras biológicas (7), las cuales proceden de diferentes condiciones metabólicas, o que previamente han estado sometidas a estímulos variados (incubación con o sin glucosa, por ejemplo), los niveles del cAMP endógeno varían. En estos casos la actividad del enzima se expresa como la relación $(-cAMP)/(+cAMP)$, equivalente a la actividad enzimática de la muestra con relación al total de proteína quinasa.

Las ecuaciones a que hace referencia dicha relación vienen dadas por los siguientes términos:



$cAMP_{(end)}$ es la concentración del nucleótido que se halla en el extracto de donde procede el enzima. Así pues, se puede decir que $C_{(end)}$ será la subunidad C liberada en condiciones nativas.

(6) A veces se encuentra que un aumento de cAMP en una muestra biológica, no va seguido de una activación del enzima. Hay que pensar, si la analítica está bien realizada, en la aparición de algún otro componente del tipo de un inhibidor para el enzima.

(7) Este enzima se encuentra principalmente en el citoplasma celular (también se ha descrito en otros orgánulos celulares). Se necesita pues romper la célula. Habitualmente se homogeniza mecánicamente entre un cilindro y un émbolo. Se centrifuga para eliminar membranas, núcleos, etc., y el líquido sobrenadante, es la materia (el extracto) de donde se toman muestras para medir la actividad del enzima.

(+cAMP): Se adiciona una alta concentración de cAMP, que denominamos exógeno: $cAMP_{exo}$, el cual va a producir la total disociación de la forma RC del enzima

$$cAMP_{exo} + cAMP_{end} + RC \rightleftharpoons R \frac{-cAMP}{(end + exo)} + C_{end} + C_{exo}$$

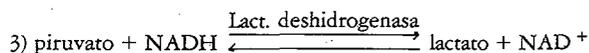
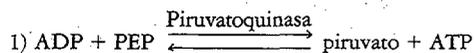
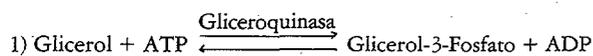
con relación a C, se observa que aparece un nuevo componente: C_{exo} , procedente del RC que permanecía intacto. Significa que hay más subunidad C y que por tanto mayor será la fosforilación de la histona (8).

Por tanto el cociente $(-cAMP)/(+cAMP)$ es equivalente al $C_{end}/C_{end} + C_{exo}$, evidentemente siempre inferior o igual a la unidad.

Dependiendo del grado de actividad de la proteína quinasa, se pondrá en marcha la secuencia de reacciones, que en el caso de la lipólisis, implica la fosforilación de la lipasa, y la consiguiente rotura de los triglicéridos. Se puede entonces predecir que a altos niveles de cAMP (endógeno), corresponden un cociente alto de la actividad proteína quinasa, por una parte, y por otra altos niveles de glicerol, como índice final de la lipólisis (ver figura 2). Si seguimos el proceso «hacia arriba» (Fig. 2), podemos establecer que si en una muestra biológica encontramos elevada la relación $(-cAMP)/(+cAMP)$, como causa de la adición de cierto efector, hay que suponer que dicha sustancia ha desencadenado la activación del sistema de adenilciclasa, la cual ha producido un aumento en los niveles de cAMP, a partir del ATP.

2.3. Concentración de glicerol

La determinación de glicerol se fundamenta en tres reacciones que tienen lugar de modo consecutivo:



Nomenclatura: —Entre paréntesis los enzimas que catalizan la reacción, —ADP: adenosindifosfato, —PEP: fosfoenolpiruvato, —NADH y NAD: nicotinamin adenin dinucleotido, reducido y oxidado respectivamente.

En las reacciones se puede observar que uno de los productos de la reacción anterior es el sustrato de la reacción siguiente. Constituyen reacciones acopladas. Partimos de un hecho esencial en esta técnica: el diferente poder de absorción de la luz a 380 nm (longitud de onda) que poseen el NADH y el NAD.

(8) El grado de actividad de un enzima depende, entre otros factores, de la cantidad de enzima.

El primero de ellos produce una gran absorción de la luz a esa longitud de onda, mientras que el NAD tiene una absorción prácticamente nula. Se mide en un espectrofotómetro la disminución de la absorción de la luz, es decir, el paso de NADH a NAD.

A la muestra (9) de la que deseamos medir los niveles de glicerol, le añadimos ATP, PEP, NADH y los dos últimos enzimas (reacc. 2 y 3), en un medio apropiado. Se determina la absorbancia, que será grande ya que aún faltan constituyentes para que la oxidación del NADH pueda realizarse. ¿Cuál es el constituyente que falta y que va a desencadenar las reacciones?. Respuesta: la adición de glicerokinasa va a catalizar la fosforilación del glicerol (a glicerol 3-P) y a producir ADP, que será a su vez sustrato de la 2ª reacción; y el producto de ella, el piruvato, se reducirá a láctico, haciendo que el NADH pase a NAD, y por tanto que la absorbancia disminuya. Esta disminución es directamente proporcional a la concentración inicial de glicerol. Simultáneamente se establece una recta patrón (Δ Absorbancias en ordenadas, frente a concentraciones conocidas de glicerol en abscisas) (10). Por interpolación en esta recta de los Δ absorbancias correspondientes a las muestras «problema», calculamos la concentración de glicerol en ellas.

La utilización de estas técnicas (herramientas de trabajo) de uso corriente en los laboratorios (talleres) de bioquímica (11) van de hecho acompañadas de estudios teóricos, de comentarios sobre los resultados obtenidos, sobre su validez y conexión con otros datos. Son un momento de una actividad más amplia, que configura a la categoría de la Bioquímica. Por medio de ella nos acercamos a unos mecanismos moleculares que tienen lugar en nosotros mismos, aunque al igual que a Soudain, el personaje de Molière, muchas veces no lo sepamos.

(9) Como el glicerol abandona la célula una vez producido, su medida no se puede realizar en el mismo extracto (señalado en la nota 7), que el cAMP o la proteína quinasa. Se determina en el medio donde han estado incubadas las células grasas o los trozos de tejido graso (o en el plasma sanguíneo, si deseamos conocer sus niveles circulantes).

(10) Δ Absorbancias: diferencia de la absorbancia al inicio de la reacción (NADH únicamente) y del final de la reacción (NADH + NAD⁺) La absorbancia de la luz sigue la ley de Beer: $A = \epsilon c l$, siendo proporcional a la concentración (C) de la sustancia. En este caso proporcional a la concentración de NADH.

(11) No me cabe duda de que lo que aquí se ha descrito no pertenece al grupo de «grandes ciencias» según la terminología usada por Faustino Cordón (EL BASILISCO, nº 3, pág. 5, nota 6), que escribe: «...Su conocimiento profundo corresponde a las grandes ciencias (teóricas, ya no meramente descriptivas) que se ocupan de los verdaderos niveles de integración». Me permito preguntar: ¿grandes ciencias con respecto a qué?. Las «pequeñas ciencias», las descriptivas, ¿qué son? ¿Las que descubren los falsos niveles de integración o las que no descubren niveles?. La Ciencia Teológica, ¿en qué grupo está?; lo pregunto por eso del «conocimiento profundo». Quizá, ese párrafo, como metáfora literaria puede tener sin duda un gran valor, pero su operatividad en cuanto a la clasificación de las ciencias es más bien escasa.

BIBLIOGRAFIA

- *Bioquímica*. A.L. Lehninger. Ed. Omega, 1973.
- *Bioquímica*. L. Strayer. Ed. Reverté, 1976.

- *Cyclic AMP*. G.A. Robinson, R.W. Butcher y E.W. Sutherland. Ed. Academic Press, 1971.
- *Regulation in metabolism*. E.A. Newsholme y C. Start. Ed. John Wiley & Sons, 1977.