UNIVERSITAT DE BARCELONA

Caracterització de les activitats triacilglicerol ester hidrolases en miòcits aïllats de cor de rata

Josep Ignasi Ramírez i Sunyer

Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència *Reconeixement- SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons*.

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia *Reconocimiento - SinObraDerivada 4.0. España de Creative* Commons.

This doctoral thesis is licensed under the *Creative Commons Attribution-NoDerivatives 4.0. Spain License.*

Tesi

-843/UB
RAM

FACULTAT DE BIOLOGIA, UNIVERSITAT DE BARCELONA

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

CARACTERITZACIO DE LES ACTIVITATS TRIACILGLICEROL ESTER HIDROLASES EN MIOCITS AILLATS DE COR DE RATA.

MEMORIA QUE PER OPTAR AL GRAU DE

DOCTOR EN BIOLOGIA, PRESENTA:

JOSEP IGNASI RAMÍREZ I SUNYER

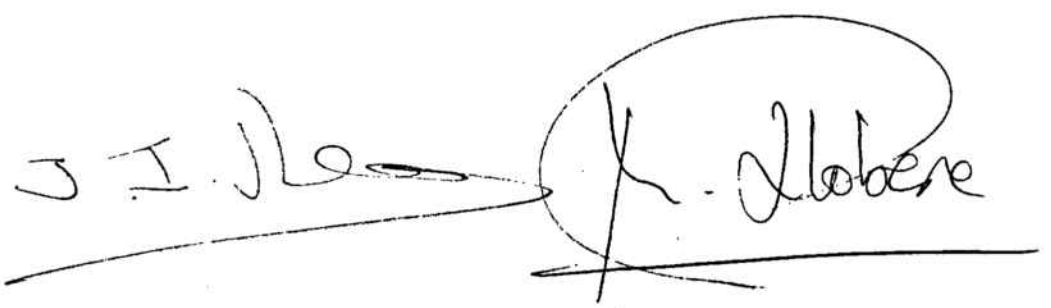
BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA
0700184524

Barcelona, Setembre 1985

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE BIOLOGIA
BIBLIOTECA

Vist i Plau

L'interessat: Del Director del Treball:



Josep Ignasi Ramírez i Sunyer

Dr. Miquel Llobera i Sande
Professor Titular de Bioquímica
i Biologia Molecular
Càtedra de Fisiologia General
Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona

Aquesta Tesi fou començada als laboratoris de la Càtedra de Fisiologia General de la Facultat deBiologia, Universitat de Barcelona sota la direcció del Dr. Miquel Llobera i Sande amb finançament, per beca al Dr. Emilio Herrera i Castillón, de la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica del Ministerio de Educación y Ciencia. Posteriorment fou continuada al laboratori del Dr. David L. Severson del Department of Pharmacology and Therapeutics, Faculty of Medicine, University of Calgary (Calgary, Alberta, Canadà), gràcies a beques d'Estada a l'Estranger de la Comissió Interdepartamental per la Recerca i Innovació Tecnològica de la Generalitat de Catalunya i, durant un curt període de temps, gràcies a una beca Studentship de la Alberta Heritage Foundation for Medical Research (Canadà). El treball realitzat a la Universitat de Calgary fou finançat per beques al Dr. Severson del Medical Research Council i la Alberta Heart Foundation.

Agraeixo al Dr. Llobera la seva dedicació a la direcció del treball, així com el seu interès i tot el que amb ell he après. Als Drs. Herrera i Morley D. Hollenberg el facilitat la meva estada a la Universitat de Calgary. Al Dr. Severson la supervisió del treball fet a Calgary, així com el seu constant estímul, suport i continuada discussió crítica del treball.

Voldria deixar escrit també el meu agraïment a totes aquelles persones sense quina col.laboració no hagués pogut reeixir. Als Drs. Michael C. Schotz i Osnat Ben-Zeev del Research Service del Veterans Administration Hospital Wadsworth Center (Los Angeles, Califòrnia, E.U.A.), per la seva inestimable cooperació en part d'aquesta Tesi. Als Drs. Kenji A. Kenno, Albert J. Kryski. Michael P. Walsh i al futur Dr. Philip K. Ngai del Cell Regulation Research Group, Faculty of Medicine, University of Calgary, per aportar la seva experiència en diferents moments del treball. A Thea Fletcher, Mariette Hee-Cheong i Brenda Hurley, del laboratori del Dr. Severson, pel seu ajut tècnic en multitud d'ocassions.

Vagi el meu agraïment també a tots aquells que, no menys directament, han fet possible que aquestes paraules foren escrites. Molt especialment a la Maria, per tantíssimes coses, però sobre tot, per estar al meu costat.

CONTINGUT

Plana

1.- INTRODUCCIO 1

1.1.- UTILITZACIO DE SUBSTRATS ENERGETICS PEL MUSCUL CARDIAC 2

1.2.- UTILITZACIO DE SUBSTRATS ENDOGENS 6

1.3.- REGULACIO DE LA LIPOLISI ENDOGENA 9

1.4.- UTILITZACIO DE MIOCITS AILLATS PER L'ESTUDI DEL METABOLISME CARDIAC 16

1.5.- ACTIVITATS TRIACILGLICEROL HIDROLASES EN COR I MIOCITS AILLATS 20

1.6.- CONTRIBUCIO DE LES DIFERENTS ACTIVITATS TRIACILGLICEROL HIDROLASES A LA LIPOLISI ENDOGENA 33

1.7.- OBJECTIUS 37

2.- MATERIALS I METODES 39

2.1.- MATERIALS 40

2.1.1.- Reactius i productes químics 40

2.1.2.- Aparells 41

2.1.3.- Animals 43

2.2.- METODES 43

2.2.1.- Aïllament de miòcits de cor de rata 43

2.2.2.- Processament de les mostres 50

2.2.3.- Valoració de les activitats triacilglicerol hidrolases 50

2.2.4.- Fraccionament subcel.lular 61

2.2.5.- Incubacions amb heparina 61

2.2.6.- Inactivació tèrmica 63

2.2.7.- Experiments amb immunoglobulines G anti-LPL 64

2.2.8.- Solubilització de les activitats TAGH 67

2.2.9.- Cromatografia d'afinitat en heparina-sefarosa 69

2.2.10.- Electroforesi en gels de poliacrilamida 72

2.2.11.- Transferència electroforètica a filtres de nitrocel.lulosa. Reconeixement immunològic de la LPL ("Immunoblotting") 74
2.2.12.- Incubacions de les cèl.lules amb isoproterenol 77
2.2.13.- Experiments amb rates diabètiques 78
2.2.14.- Altres mètodes 79
2.2.15.- Estadística 90

3.- RESULTATS I DISCUSSIO 92

3.1.- CARACTERITZACIO DE LES ACTIVITATS TRIACILGLICEROL HIDROLASES EN HOMOGENATS CEL.LULARS 93
3.1.1.- Efecte de les modificacions en la composició del sistema de valoració 93
3.1.2.- Efecte de la manipulació de la mostra 113
3.1.3.- Inactivació tèrmica i efecte d'anticossos anti-LPL 132

3.2.- RESOLUCIO DE LES DIFERENTS ACTIVITATS TRIACILGLICEROL HIDROLASES PER CROMATOGRAFIA D'AFINITAT EN HEPARINA-SEFAROSA ..140
3.2.1.- Solubilització de les activitats TAG hidrolases 140
3.2.2.- Perfil d'elució de les activitats TAG hidrolases de les columnes d'heparina-sefarosa 144
3.2.3.- Caracterització de les activitats TAGH eluïdes amb 1.2 M NaCl de les columnes d'heparina-sefarosa 153
3.2.4.- Caracterització de les activitats TAGH no retingudes per les columnes d'heparina-sefarosa 164

3.3.- EFECTE DE LES CATECOLAMINES I LA DIABETES EXPERIMENTAL SOBRE LES ACTIVITATS TRIACILGLICEROL HIDROLASES ALS CARDIOMIOCITS AILLATS 179

3.3.1.- Determinació i caracterització de l'activitat TAG hidrolasa neutre independent de sèrum en homogenats cel.lulars sense interferència de la LPL 179
3.3.2.- Efecte de la incubació de les cèl.-lules amb isoproterenol sobre les activitats TAG hidrolases 192
3.3.3.- Efecte de la diabetes experimental sobre les activitats TAG hidrolases als cardiomiòcits aïllats 206
4.- CONCLUSIONS I PERSPECTIVES 219
5.- BIBLIOGRAFIA 223

1.- I N T R O D U C C I O

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE BIOLOGIA
BIBLIOTECA

1.1.- UTILITZACIÓ DE SUBSTRATS ENERGÈTICS PEL MÚSCUL CARDÍAC

El cor obté, en condicions normals, l'energia que requereix pel seu constant bategar de l'oxidació aeròbica de diferents substrats energètics. La total dependència de l'oxigen quedà clarament reflectida en la relació lineal existent entre el producte del pic de la pressió sistòlica ventricular pel ritme cardíac (com a índex de treball), i el consum d'oxigen pel cor perfundit (Neely i col., 1967). Així, en cors de rata depolaritzats,i per tant en repós, per perfussió amb potassi 16 mM, el consum d'oxigen és d'uns 3 u mol/ min/ g teixit. Mentre que treballant pot arribar fins a un màxim de 30 u mol/ min/ g teixit (Williamson i Kobayashi, 1984). Per altre banda, en models experimentals d'isquèmia, en provocar-se aquesta per interrupció de la perfussió, el cor deixa ràpidament de bategar, tornant a fer-ho en reperfundir (Neely i col., 1973). Això és així doncs s'ha demostrat que, en cors perfundits, la producció aeròbica d'ATP a partir de la glucòlisi mai no pot aportar més del 7% del requeriment energètic total (Kobayashi i Neely, 1979). Consistent amb la impotància de la fofsforilació oxidativa per l'aport energètic hi és el fet de que les mitocòndries representen vora del 35% del volum total del múscul cardíac (Poche i Mönkemeier, 1962).

Si bé els primers treballs sobre utilització de substrats pel cor daten de primers de segle (Locke i Rosenheim, 1904; Knowlton i Starling, 1913), no fou fins mitjans de segle, amb els treballs de Miller i Olson (1952), que es comença a estudiar de forma més profunda i sistemàtica. En tot el treball fet especialment durant les dècades dels 60 i 70 es basa el que actualment co-

neixem i que ha estat àmpliament recollit i revisat (Evans, 1964; Neely i col., 1972b; Neely i Morgan, 1974; Vary i col., 1981; Drake-Holland, 1983).

Per l'estudi de la utilització de substrats energètics pel cor han estat emprats diferents models experimentals, com ara la perfussió Langendorff, on es canula l'aorta i es perfundeix en sentit retrògrad, o la perfussió del cor treballant on el perfundit segueix la circulació fisiològica (Neely i col., 1967). Mol més recentment han estat emprats els miòcits aillats (Frangakis i col., 1980; Montini i col., 1981). Donat que cada sistema condiciona la forma i quantitat de treball que pot desenvolupar-se, els requeriments energètics són diferents a cadascun i, per tant, els valors obtinguts d'utilització de substrats no són directament comparables. Tot i això, les conclusions a les que s'ha arribat utilitzant un o altre són semblants i complementàries.

Pel cor perfundit en absència d'altres substrats i hormones, treballant moderadament, l'oxidació de glucosa no representa més del 25% de l'oxigen consumit (Williamson i Krebs, 1961; Neely i Morgan, 1974; Rösen i col, 1984). En presència d'insulina augmenta la taxa d'oxidació de glucosa, utilitzant ara un 75% de l'oxigen consumit (Neely i col., 1976; Rösen i col., 1984). Igualment, l'increment de treball augmenta la taxa d'oxidació de glucosa i la seva participació en el consum total d'oxigen, que igualment augmenta (Kobayashi i Neely, 1979). La utilització de glucosa pel cor perfundit ve limitada pel seu transport a l'interior de les cèl.lules i les activitats de l'hexoquinasa, la fosfofructoquinasa i la gliceraldèhid-3-fosfat deshidrogenasa (Neely i Morgan, 1974). En condicions aeròbiques i moderat treball és el transport qui principalment restringueix la utilització de glucosa pel cor perfundit. Aquest obstacle però, és eliminat per concentracions fisiològiques d'insulina (Morgan i col., 1961). En presència d'aquesta

és l'activitat fosfofructoquinasa qui limita el flux glucolític (Kobayashi i Nrrly, 1979). L'augment de treball cardíac provoca un increment tant del transport com de l'activitat fosfofructoquinasa, essent en aquesta condició l'activitat gliceraldèhid-3-fosfat deshidrogenasa qui limita la via glucolítica (Kobayashi i Neely, 1979).

En qualsevol de les condicions esmentades, la presència de substrats alternatius, com àcids grassos, cossos cetònics, piruvat o lactat, inhibeixen la utilització de glucosa com a substrat energètic al produir-se una inhibició del transport d'aquest metabòlit, i de les activitats de la fosfofructoquinasa i piruvat deshidrogenasa (Randle i col., 1964). Les catecolamines (epinefrina) tant en presència com en absència d'acids grassos en el medi de perfussió, provoquen un aument de l'oxidació de glucosa (Kreisenberg, 1966a).

A l'igual que la glucosa, el lactat quan present com a únic substrat exogen, no participa més del 50% en el consum total d'oxigen si el treball és moderat (Williamson i col., 1962). Quan el cor és forçat a treballar al màxim, l'oxidació de lactat pot augmentar i participar en un 90% del consum d'oxigen (Taegtmeyer i col., 1980), si bé en aquestes condicions no pot mantenir-se un treball prolongat (Kobayashi i Neely, 1979). El pas a l'interior de les mitocòndries del NADH format és qui segurament està limitant la capacitat d'us de lactat, ja que si es perfundeix amb piruvat, aquest pot aportar del 85 al 90% de l'energia requerida fins i tot en condicions d'elevat treball (Kobayashi i Neely, 1979).

Fins i tot en presència de glucosa els àcids grassos no esterificats són utilitzats com a substrat energètic principal, doncs participen en 70% en el consum total d'oxigen (Bing, 1965). En augmentar el treball

igualment s'incrementa l'oxidació d'àcids grassos i la seva participació en el consum total d'oxigen (Neely i col.,1976). La presència de glucosa (Shipp i col., 1961) o de piruvat (Latipää i col., 1983) no inhibeixen l'oxidació d'àcids grassos, però si ho fan els cossos cetònics, que desvien la utilització dels àcids grassos cap a la seva esterificació i síntesi de triacilglicerols (Menahan i Hron, 1981). Quan el desenvolupament de treball ventricular és elevat, l'oxidació d'àcids grassos ve limitada, a més de per la seva concentració plasmàtica, per la velocitat de transferència a l'interior de les mitocòndries d'unitats acil-CoA (Oram i col., 1973). A treball moderat, quan el cicle de l'àcid cítric funciona més lent, és l'acúmul d'acetil-CoA i acetil-carnitina en el compartiment citosòlic el que provoca una manca d'assequibilitat de CoA-SH per l'activació dels àcids grassos , essent aquest el factor limitant de la seva utilització (Oram i col., 1975). Contràriament al que passa amb la glucosa, les catecolamines (epinefrina), no afecten a l'oxidació dels àcids grassos pel cor d'una forma directa (Kreisberg, 1966 a). Només ho farien "in vivo" estimulant la lipòlisi al teixit adipós i provocant un augment de l'assequibilitat de substrat.

La presència d'una elevada activitat lipoproteïna lipasa (Korn, 1955), capacita al cor per utilitzar triacilglicerols de quilomicrons (CM) i lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL) (Enser i col., 1967). No existeixen estudis fets de l'efecte d'aquestes lipoproteïnes sobre sobre la utilització d'altres substrats, ni tant sols dels àcids grassos no esterificats. Sí es coneix però, que la major part dels àcids grassos alliberats per l'acció de la LPL, són captats i oxidats pel cor (Tamboli i col., 1983).

Si bé normalment no són substrat utilitzat pel cor, en determinades situacions com el dejuni o la

diabetes on els seus nivells circulants estan elevats, els cossos cetònics poden també ésser utilitzats com a font d'energia. Si es presenten com a únic substrat, poden aportar fins el 90% de l'energia requerida pel cor perfundit, si aquella no és elevada, però no poden continuar aportant-la quan el cor és obligat a realitzar un treball elevat (Williamson i Krebs, 1961).

El cor pot oxidar aminoàcids, però el seu aport al consum total d'oxigen és molt baix (Buse i col., 1972). Només quan els nivells són 5-10 vegades els plasmàtics poden inhibir l'us de glucosa en cors perfundits, en cara són però substrat insuficient per aportar tota l'energia requerida (Ichihara i col., 1980). Per altre part, concentracions fisiològiques tant de piruvat com palmitat provoquen una dràstica inhibició de la decarboxilació oxidativa de la leucina (Buxton i col., 1984).

Per tant, com a substrats energètics, el cor pot utilitzar de forma majoritària glucosa i , especialment, àcids grassos es terificats i no esterificats. Si bé també lactat, piruvat, cossos cetònics i, en menor grau, aminoàcids, poden ésser font potencial d'energia. La velocitat a la que algun d'aquests substrats és utilitzat depen de (1) la concentració del substrat al plasma, (2) l'assequibilitat de substrats alternatius, (3) els nivells plasmàtics d'algunes hormones, (4) el grau d'activitat mecànica del cor i (5) la taxa de respiració (Neely i col., 1972b).

1.2.- UTILITZACIO DE SUBSTRATS ENDOGENS

El cor de rata té, en condicions normals, 12-35 u mol/g teixit de glucusa emmagatzemada en forma de glicogen (Evans, 1934; Merrick i Meyer, 1954; i molts altres després). Igualment conté reserves lipídiques en forma de triacilglicerols (TAG) (0.7-2.3 u mol/g teixit)

(Olson i Hoeschen, 1967; Denton i Randle, 1967; Crass, 1972a; i molts d'altres després). El glicogen es troba en forma de gràmuls citoplasmàtics i es localitza de forma majoritària als intersticis al voltant de les mitocòndries, al sarcoplasma interfibril.lar, a les àrees al voltant de les cisternes subsarcolemmals (Van der Vusse i REneman, 1983)= Els TAG es troben en forma de gotes principalment als canals del reticle sarcoplasmàtic, més o menys associats amb mitocòndries, i també al voltant dels nuclis, així com a vesícules lisosomals i al citoplasma (Mathur i Mokler, 1975; Stein i Stein, 1968; Wang i col., 1977; Wetzel i Scow, 1984).

Com ha estat comentat a l'apartat anterior, en determinades circumstàncies els substrats exògens no participen més que en un percentatge limitat al consum d'oxigen. Així, quan es perfundeix amb glucosa com a únic substrat i amb treball moderat o nul, l'oxidació d'aquesta glucosa no suposa més del 25% de l'oxigen consumit (veure apartat anterior). En aquestes condicions es produeix degradació del glicogen tissular, aportant aquest fins a 1/3 de tota la glucosa oxidada (Rösen i col., 1984). Malgrat tot continua essent insuficient per cobrir les necessitats energètiques de l'òrgan. També s'ha observat que en perfusions sense substrats exògens, es produeix una ràpida degradació de glicogen. Aquesta però, després de una hora de perfusió, no habia aportat més del 30% al consum d'oxigen total de l'òrgan (Shipp i col., 1964).

La degradació del glicogen corre a càrrec de la glicogen fosforilasa que allibera unitats de glucosa-1-fosfat, i de l'enzim desramificant. La glucosa-1-fosfat és transformada per la fosfoglucomutasa en la glucosa-6-fosfat, substrat per la via glucolítica. La modulació del flux a través de la via es produeix a nivell de la glicogen fosforilasa per processos dependents bé d'AMPc bé de Ca^{2+}-calmodulina (per revisió

veure Van der Vusse i Reneman, 1983).

La degradació de les reserves lipídiques en els cors perfundits amb o sense glucosa ha d'ésser, per tot el comentat anterirment, la principal font que cobreixi les necessitats energètiques d'aquests cors. Les primeres evidències les obtingueren Olson i Hoeschen (1967) i Denton i Randle (1967) de forma simultània i independent. Ambdós grups perfundiren cors pel sistema Langendorff en absència de substrats exògens. Observaren que després de 1 hora, moment en que els cors deixaren de bategar, el contingut de TAG tissular disminuí un 50-70%, sense que s'afectessin els de fosfolípids. Posteriorment es demostràque també el treball moderat, fins i tot en presència de glucosa, estimula la utilització de les reserves lipídiques endògenes arribant a aportar fis en 50% al consum d'oxigen (Neely i col., 1969).

Els triacilglicerols són hidrolitzats primer a diacilglicerols, després a monoacilglicerols i, finalment, a glicerol lliure, alliberant-se a cada pas una molècula d'àcid gras. Es creu que el pas limitant és la degradació del primer àcid gras donat que la relació entre els nivells tissulars de TAG:DAG:MAG està molt desplaçada cap els TAG (13:0.1:0.6, Neely i Morgan, 1974). Tampoc ha pogut trobar-se cap situació on es produeixi un acúmul dels metabòlits intermediàris (Severson, 1979a).

Aquest procés lipolític endogen ha estat estudiat tant mesurant decrements dels nivells tissulars de TAG, com alliberament de glicerol o d'àcids grassos al medi. Els àcids grassos són però menys utilitzats donat que una part important dels alliberats poden ésser oxidats produïnt-se, per tant, una subestimació de la taxa real de lipòlisi en mesurar només els seus nivells enel el perfundit. Es més utilitzat l'alliberament de glicerol, dons aquest és molt poc reutilitzat pel cor

(Scheuer i Olson, 1967; Tamboli i col., 1983). Probablement degut a la molt baixa activitat gliceroquinasa en aquest teixit (Robinson i Newsholme, 1967). Per altre banda, en cors de rata perfundits amb glucosa 5 mM i treballant moderadament s'ha trobat una relació esteiquiomètrica entre la disminució dels nivells tissulars de TAG i l'alliberament de glicerol (Hron i col., 1977). Altre desventatge addicional de la determinació dels nivells d'àcids grassos alliberats com a índex de lipòlisi, és el fet de que la relació entre les quantitats d'àcids grassos que són alliberats i la quantitat que són oxidats depen de diversos factors, i d'entre ells, de la quantitat de treball desenvolupat (Crass , 1972a).

1.3.- REGULACIO DE LA LIPOSISI ENDOGENA

Des de mitjans dels anys 60, quan es començà a conéixer la importància de la utilització dels TAG endògens pel cor, un elevat nombre d'investigadors es dedicà a l'estudi de la seva regulació i mecanismes. Fruît d'aquell treball ha estat una extensa literatura i l'aparició de revisions parcials del tema (Crass, 1977; Lech i col., 1977; Severson, 1979a; Hülsmann i col., 1984).

Un efecte estimulador de la lipòlisi per les catecolamines s'ha observat en cors perfundits tant mesurant alliberament de glicerol (Williamson, 1964; i molts altres després), com determinant variacions en el contingut tissular de TAG (Gartner i Vahouny, 1973; i d'altres). En estudis fets amb cors perfundits, havent marcat prèviament els lípids amb palmitat-C^{14}, es demostrà una disminució de la radioactivitat de TAG, i també de la quantitat total de TAG, com a conseqüència de la perfusió tant amb epinefrina, com norepinefrina (si bé aquesta fou menys potent), així com amb dibutiril-AMPc o teofil.lina; en cap cas s'afectaren ni els nivells ni la radioactivitat als fosfolípids (Crass, 1972b;

Crass i col., 1975). L'efecte lipolític de les catecolamines ve mitjançat pels receptors -adrenèrgics, com es despren de que l'agent -bloquejant propranolol reverteixi l'efecte estimulador de la lipòlisi de l'epinefrina (Jesmok i col., 1977). Igualment, l'agonista -específic isoproterenol, presentà la mateixa potència que l'epinefrina estimulant l'alliberament de glicerol (Jesmok i col., 1977). Es creu que el mecanisme d'acció dels agonistes -adrenèrgics és l'activació de l'adenilat ciclasa,a través d'unes proteïnes transductores que lliguen GTP (Smiegel i col., 1984), amb posterior augment dels nivells intracel.lilars d'AMPc (per revisiórecent veure Lefkowitz i col., 1984), qui activaria les proteïnes quinases depenents d'AMPc. De fet, s'ha trobat un augment del nivells d'AMPc i de la relació d'activitats -/+ AMPc de la proteïna quinasa depenent d'AMPc en cors perfundits amb isoproterenol (Largis i col., 1972; Jesmok i col., 1977; Hayes i col., 1979).

També el glucagó provoca un augment de l'alliberament de glicerol al medi de perfusió (Jesmok i col., 1977; Hülsmann i Stam, 1979a) i de la relació d'activitats -/+ de la preteïna quinasa depenent d'AMPc (Jesmok i col., 1977). Aquests fets han portat a postular que, de forma semblant al que passa al teixit adipós, la lipòlisi al cor es regularia principalment per mecanismens de fosforilació-defosforilació mitjançats per l'AMPc, a través de la proteïna quinasa depenent d'AMPc (Christian i col., 1969; Lech i col., 1977; Severson, 1979a). Tot i això, i al contrari del que s'esdevé al teixit adipós on els mecanismes estan força ben coneguts fins i tot a nivell molecular (per revisió recent veure Belfrage i col., 1984), la participació del AMPc en la regulació de lipòlisi cardíaca no està totalment establerta.

No s'ha descartat en cors perfundits, que l'efecte de les catecolamines i el glucagó sigui secundari

a l'efecte d'aquestes hormones sobre els requeriments energètics, doncs tant unes com l'altre tenen un clar efecte cronotròpic (estimulador del ritme de batec) i/o inotròpic (estimulador de la força de contracció) (Crass, 1972a; Jesmok i col., 1977). En aquest sentit s'ha observat en cors perfundits amb un medi lliure desubstrats o amb glucosa 5 mM, que un augment del treball cardíac provoca un augment de la lipòlisi endogena, (Crass i col., 1971). Els mateixos autors però, no descarten que l'augment de treball provoqui una descàrrega de catecolamines, i que siguin aquestes les que estimulin la lipòlisi directament (Crass, 1977). Existeixen però, altres casos descrits a la bibliografia on a un augment de treball li segueix una augmentada lipòlisi sense que s'alterin els nivells d'AMPc o la relació d'activitats -/+ de la proteïna quinasa depenent d'AMPc. Es el cas de la perfusió amb concentracions creixents de Ca^{2+} (Dhalla i col., 1977; Stam i col., 1980), o amb l'ionòfer de Ca^{2+} ouabaïna (Jesmok i col., 1977). Així doncs la resposta a les catecolamines o al glucagó podria ésser simplement secundària a un augment dels requeriments energètics com a conseqüència d'un augment del treball cardíac provocat per aquestes hormones.

Tot i que l'efecte lipolític de les catecolamines i el glucagó pogui ésser directe, no necessàriament hauria d'estar mitjançat per l'AMPc. S'ha suggerit que alguns dels efectes de les catecolamines podrien ésser mitjançats per altres factors diferents de l'AMPc. En aquest sentit, en cors depolaritzats per perfusió amb potassi 55 mM, l'isoproterenol no provoca cap variació dels nivells tissulars d'AMPc, però la glicogen fosforilasa s'activa, si bé menys del que ho fa quan els nivells d'AMPc augmenten (Largis i col., 1972). S'ha suggerit que el calci pot estar involucrat en la regulació de la glicogen fosforilasa per l'isoproterenol (Barovsky i Gross, 1981); molt recentment s'ha que en cors perfundits, l'isoproterenol estimula lacaptació

de calci (Gøtzsche, 1985). Pel que fa a la participació del Ca^{2+} en la resposta lipolítica a l'isoproterenol, Hron i col.laboradors (1977) observaren que en cors perfundits i trballant moderadament, la resposta rant a aquest agonista -adrenèrgic, com al glucagó , era depenent de la presència al medi de perfusió de concentracions de calci superiors a 1.2 mM, tot i que a qualsevol concentració es produïa una activació de la proteïna quinasa depenent d'AMPc.

No queda, doncs, clarament establert si la resposta a les catecolamines i al glucagó es produeix bé de forma directa i mitjançada per l'AMPc i la seva proteïna quinasa depenent, bé mitjançada per variacions en els nivells intracel.lulars de Ca^{2+}, o bé es secundària a l'increment de treball cardíac i mitjançada de forma no directa per algun altre factor. En aquest sentit cal comentar el possible pater dels nivells intracel.lulars de metabòlits i les seves variacions en funció del treball desenvolupat. Així, ja l'any 1973 Oram, Bennetch i Neely demostraren que en perfundir cors de rata amb concentracions creixents de palmitat-albúmina, es produïa un acúmul intacel.lular depenent de la dosi d'acil-CoA de cadena llarga, d'acil-carnirina de cadena llarga, d'acetil-CoA i d'acetil-carnitina. Els nivells d'aquests metabòlits, llevat dels d'acil-carnitina de cadena llarga, disminuïen en augmentar el treball cardíac. Per altre banda es coneix que les activitats TAG hidrolases de cor són inhibides per palmitoïl- o oleïl-CoA (Severson i Hurley, 1982). Així, una eliminació de possibles inhibidors podria ésser el mecanisme pel que el treball provoqués una estimulació de lipòlisi. D'acord amb aquesta hipòtesi, s'ha trobat que en cors treballant moderadament i quins triacilglicerols havien estat prèviament marcats amb palmitat-C^{14}, la perfusió amb palmitat 0.6 mM complexat amb albúmina 0.45 mM, tant en presència com en absència de glucosa 5 mM, la lipòlisi basal, mesurada com disminució de TAG-C^{14} i dels nivells tissulars de TAG, està

inhibida (Crass, 1972a; Murthy i col., 1983), així com també està bloquejada la resposta a l'epinefrina d'ambdós paràmetres; la resposta glicogenolítica no estava alterada però (Crass i col., 1975).

L'estimulació de la lipòlisi per catecolamines es també totalment inhibida per la presència d'elevades concentracions de cossos cetònics (15 mM de -hidroxibutirat o 5 mM d'acetoacetat) en el medi de perfusió contenint glucosa 5.5 mM (Hron i col., 1978). En aquest treball es trobà que l'efecte es produïa sense que s'alterés la relació d'activitats -/+ AMPc de la proteïna quinasa depenent d'AMPc, quina variació és paral.lela a la dels nivells d'AMPc (Keely i col., 1975).

Tant la hipòxia com la isquèmia provoquen alteracions de la lipòlisi endogena. La hipòxia s'aconsegueix experimentalment gassificant el medi de perfusió amb N_2/CO_2 en lloc de O_2/CO_2. Aquest canvi baixa la pressió parcial d'O_2 a uns 35-37 mm Hg (Crass i Pieper, 1975; Karwatowska-Kryńska i Beresewicz, 1983). La isquèmia s'obté per oclussió parcial o total de l'artèria coronària o, simplement, deixant de perfundir (Neely i col., 1973). Períodes llargs (més de 30 minuts) d'hipòxia provoquen una inhibició tant de la lipòlisi basal com de l'estimulació per epinefrina (Crass i Pieper, 1975). A temps més curts però (menys de 10 minuts), es produeix una estimulació transitòria de l'alliberament de glicerol (Karwatowska-Kryńska i Beresewicz, 1983), probablement induïda per una alliberació immediata de catecolamines per les terminals nervioses com a resposta a la hipòxia (Karwatowska-Kryńska i Beresewicz, 1983). Aquest alliberament immediat de catecolamines també s'ha observat en cors de rates amb isquèmia induïda (Abrahamsson i col., 1983). En cors de gos amb isquèmia induïda ha estat observada igualment una resposta bifàsica de la lipòlisi endògena: primer una disminució dels nivells tissulars de TAG amb pos-

terior increment (Jesmok i col., 1978). Tant en condicions hipòxiques com isquèmiques, en faltar oxigen, es produeix un ràpid acúmul tant d'acil-CoA com d'acil-carnitina als compartiments mitocondrial i citosòlic (Vary i col., 1981). L'acúmul d'aquests metabòlits és probablement la causa de la inhibició de la lipòlisi en ambdues situacions. Igualment fóra la causa d'un augment de la taxa de síntesi de TAG. El resultat final és l'acúmul dde triacilglicerols al teixit, que ja havia estat descrit com a conseqüència d'una manca d'oxigen (Wittels i Spann, 1968).

Es generalment acceptat que la insulina reverteix la estimulació de la lipòlisi al teixit adipós, induïda per catecolamines (Severson, 1979a; Belfrage i col., 1984). Molt pocs estudis s'han fet a cor. S'ha observat que en cors perfundits amb glucosa 5.5 mM, la insulina no afectà ni a la lipòlisi basal ni a l'estimulada per isoproterenol, glucagó o ouabaïna, a tots els casos mesurada com alliberament de glicerol al medi de perfusió (Jesmok i col., 1977). Contràriament, en cors perfundits amb glucosa 9 mM, altres observaren un efecte inhibidor de la insulina sobre la lipòlisi basal, mesurada com a descens en el contingut tissular de TAG (Murthy i col., 1983). Aquests autors no estudiaren l'efecte sobre la lipòlisi induïda per catecolamines o altres agents. Sí que observaren però, que l'efecte era depenent de la presència d'elevades concentracions de glucosa en el medi, donc si perfundien sense glucosa no observaven cap efecte de la insulina. Amb cors enriquits en TAG per prèvia alimentació dels animals amb àcid eurícic, s'ha observat que la insulina en absència de glucosa en el medi de perfusió, no afectava ni la lipòlisi basal ni l'estimulada per glucagó o catecolamines (Stam i Hülsmann, 1981). Els mateixos autors havien trobat que la insulina bloquejava l'estimulació de la lipòlisi per glucagó o catecolamines quan cors enriquits en TAG eren perfundits amb un medi contenint 9 mM de glucosa; lalipòlisi basal no

era afectada (Hülsmann i Stam, 1979b).

La diabetes mellitus provoca canvis importants en el metabolisme i la funció cardíaca. D'entre el canvis metabòlics destaca un important augment (2-3 vegades) en el contingut de triacilglicerols del teixit (Denton i Randle, 1967; i molts altres després). Aquest acúmul es dóna com a conseqüència d'un augment dels nivells plasmàtics tant d'àcids grassos no esterificats com de cossos cetònics, fet que provoca l'increment dels nivells tissulars d'acil-CoA i d'acil-carnitina (Feuvray i col.,1979). En estar elevats els nivells de cossos cetònics al plasma, el seu us preferencial com a substrat oxidatiu, deriva l'excés d'unitats acil-CoA cap a la seva esterificació (Menahan i Hron, 1981). Paral.lelament ha estat descrit un augment d'activitat (sn),3-glicerofosfat-acil transferasa (Murthy i Shipp, 1980). Per altre banda els resultats obtinguts per diferents laboratoris estudiant la lipòlisi en cors perfundits de rates diabètiques són, aparentment, contradictoris. Així, els primers treballs mostraven una lipòlisi clarament augmentada als cors de rates diabetiques (Garland i Randle, 1963; Kreisberg, 1966a). Treballs més recents trobaren que, pel contrari, estava inhibida (Poulson i Crass, 1982). Ara bé, això fou així quan perfundiren els cors de rates diabètiques amb un medi que contenia glucosa 28 mM i palmitat 1.2 mM (concentracions plasmàtiques normals dels animals diabètics). Quan perfundiren amb medi contenint glucosa 9 mM i palmitat 0.5 mM (condicions normals d'animals controls), llavors els cors de rates diabètiques degradaren més triacilglicerols que els de rates controls. Els primers treballs als que féiem referència, perfundien amb glucosa 5 mM amb o sense palmitat 0.5 mM.

Així doncs, "in vivo", les elevades concentracions de metabòlits circulants, a més de desviar la utilització d'àcids grassos cap la síntesi de triacilglicerols, també inhibirien la seva degradació. Resu

UNIVERSITAT DE BARCELONA FACULTAT DE BIOLOGIA

tat combinat d'ambdós factors és l'augment dels nivells tissulars de TAG que prèviament s'havia descrit.

En cors de rates diabètiques perfundits en absència de palmitat i amb baixes concentracions de glucosa (5-9 mM), ha estat descrita una estimulació de l'alliberament de glicerol per l'adrenalina (Rösen i col., 1981).

1.4.- UTILITZACIO DE MIOCITS AILLATS PER L'ESTUDI DEL METABOLISME CARDIAC

El cor està constituït per una àmplia varietat de tipus cel.lulars i, si bé als cardiomiòcits correpon la gran majoria del pes de l'òrgan, només representen el 12-25% del nombre total de cèl.lules (Dow i col., 1981). La resta el constitueixen principalment, cèl.lules endotelials i musculars llises, fibroblasts i adipòcits (Roy, 1975).

La presència d'adipòcits ha portat a criticar alguna vegada (Lech i col., 1977; Severson, 1979a) la conclusió de que la lipòlisi endògena es dongui realment i/o majoritàriament als miòcits. Així els adipòcits podrien ésser els principals responsables de l'alliberament endogen de glicerol i àcids grassos, quins porien ésser utilitzats pel miòcits per -oxidar-los. També podria pensar-se que és a nivell d'adipòcits cardíacs on es produeix la regula ı#o de la lipòlisi endògena. Aquesta hipòtesi està sustentada en algus experiments que indiques la participació significativa d'altres tipus cel.lulars diferents del miòcits en alguns resultats atribuïts en principi a aquestes cèl.lules. Beinlich i col.laboradors (1981) demostraren que l'activitat proteolítica neutre alcalina, prèviament involucrada en el recanvi protéic als cardiomiòcits, en realitat no era present en aquest tipus cel.lular. També ha estat demostrat que part de l'heterogeneitat dels lisosomes obtinguts en fraccionar homogenats de cor, prové de

la prèsencia de macròfecs, quins lisosomes tenen un perfil d'activitats hidrolàsiques completament diferent al dels miòcits (Welman i Peters, 1976).

La utilització de poblacions homogènies de cèl.lules aillades per a l'estudi d'aspectes del metabolisme intracel.lular obvia la possible participació d'altres tipus cel.lulars en els fenòmens estudiats. Per altre banda, l'ambient en que les cèl.lules es troben pot ésser fàcilment manipulat i controlat (pO_2, pH, temperatura, concentracions de substrats, ions, hormones, drogues, etc.).

Els primers intents d'aillament de miòcits de cor daten de finals dels 60 (Kono, 1969; Berry i col., 1970; Vahouny i col., 1970). En aquestes preparacions les cèl.lules es contreien espontàniament en absència de calci i eren intolerants a concentracions fisiològiques d'aquest catió. En els anys següents es descriviren diferents procediments per obtenir miòcits de cor d'animals adults que fossin resistenta a concentracions fisiològiques de calci (per revisió veure Farmer i col., 1983). Aquestes preparacions tolerants al calci no es contràuen espontàniament i estudis electrofisiològics mostren que presenten potencials de repós estables d'uns -80 mV i, després d'estimulació elèctica, generen un potencial d'acció de fins uns 30 mV; ambdós valors són similars als del teixit intacte (Powell i col., 1980).

En ésser quiescents, els miòcits aillats tolerants al calci presenten un consum d'O_2 de 14-19 n mol/min/mg prot. (Frangakis i col., 1980; Chen i col., 1983), molt inferior al de cors perfundits realitzant treball moderat, però equivalent al de cors perfundits que no realitzin cap treball. Diferents estudis sobre el seu metabolisme han mostrat que els miòcits aillats utilitzen també àcids grassos no esterificats, glucosa i lactat o piruvat, si bé els oxiden a taxes més baixes

que els cors perfundits i treballant (Frangakis i col., 1980; Montini i col., 1981; McDonough i Spitzer, 1983; Chen i col., 1983; Tamboli i col., 1983; Bihler i col., 1984). A diferència del cor perfundit, són incapaços d'utilitzar àcids grassos esterificats de VLDL (Tamboli i col., 1983). Els mateixos autors demostren que, a diferència del cor perfundit, el destí majoritari (73%) dels àcids grassos captats del medi es la incorporació a lípids (Tamboli i col., 1983).

Un aventatge addicional de les cèl.lules aillades tolerants al calci i quiescents, és la possibilitat d'estudiar l'efecte del Ca^{2+} independentmen de la contracció. Així s'ha demostrat que mentre que l'oxidació de glucosa i lactat és directament depenent de la presència de Ca^{2+} en el medi extracel.lular, la de palmitat no ho és (Montini i col., 1981).

Aquests tipus de preparacions són, per altre banda, sensibles a estimulació hormonal. Així, la insulina estimula l'oxidació de glucosa de forma dosi depenent (Frangakis i col., 1980). També,les catecolamines provoquen un augment dels nivells intracel.lulars d'AMPc (Powell i Twist, 1976) i de la relació d'activitats -/+ AMPc de la proteïna quinasa depenent d'AMPc soluble, així com de la relació d'activitats -/+ AMP de la glicogen fosforilasa (Buxton i Brunton, 1983).

Totes aquestes propietats fan dels miòcits aillats tolerants al Ca^{2+} i quiescents, un model experimental òptim per l'estudi de la lipòlisi endògena i la seva regulació. Per una banda pot demostrar-se el seu origen, i per altre, pot estudiar-se la seva regulació de forma directa, sense els possibles efectes de la contracció. Al nostre laboratori s'ha demostrat que als miòcits aillats de cor de rata, al llarg del temps d'incubació en condicions basals, en presència de glucosa 10 mM, disminueix el contingut de triacilglicerols

sense que s'alteri el de fosfolípids, la disminució dels nivells de TAG ve acompanyada d'un augment del glicerol del medi (Kryski, 1985; Kryski i col., 1985a). Les catecolamines (isoproterenol, epinefrina, norepinefrina) estimulen 2-4 vegades tant la disminució dels nivells de TAG, com l'alliberament de glicerol, mantenint-se una relació esteiquiomètrica entre ambdós paràmetres; l'efecte és probablement via receptors -adrenèrgics en tant que el propranolol bloqueja l'efecte de l'isoproterenol (Kryski, 1985; Kryski i col., 1985a). Aquesta estimulació semba ésser mitjançada per l'AMPc, doncs (i) les catecolamines provoques un augment dels nivells intracel.lulars d'AMPc, (ii) l'inhibidor de la fosfodiesterasa 3-metil-isobutilxantina estimula també la lipòlisi i potencia l'efecte d'una dosi submàxima d'isoproterenol, (iii) la forskolina (diterpè, activador directe de l'adenilat ciclasa) també estimula la lipòlisi, i (iv) anàlegs de l'AMPc mimetitzen l'efecte d'aquest (Kryski i col., 1985a). Per altre banda, a diferència del que s'observava amb cors perfundits, concentracions creixents de calci (0-3 mM) no afecten ni a la lipòlisi basal, ni a l'estimulada per l'isoproterenol (Kryski i col., 1985b), fet que indica que molt probablement, la dependència del calci que s'observa en la lipòlisi al cor perfundit és secundària a l'augment de la contractilitat provocat pel calci.

Els estudis fets amb miòcits de cors de rates diabètiques, indiques que, en presència de glucosa 11 mM, la mobilització dels TAG endògens és molt elevada (6 vegades la dels controls), no responen però, de forma significativa a l'estimulació amb isoproterenol o anàlegs de l'AMPc (Kenno i Severson, 1985), probablement degut a un acúmul d'àcids grassos i/o els seus derivats a l'interior de les cèl.lules.

En definitiva, utilitzant miòcits aillats ha pogut demostrar-se la mobilització dels TAG intracel.lulars i la seva resposta a les catecolamines en aquest

tipus cel.lular, eliminant-ser la possibilitat de que tals processos tinguessin el seu origen als cardioadipòcits. No pot descartar-se però, que en major o menor grau també participin de la producció de glicerol que s'observa als cors perfundits. Estudis molt acurarats calen per escatir aquesta possibilitat.

1.5.- ACTIVITATS TRIACILGLICEROL HIDROLASES EN COR I MIOCITS AILLATS

Triacilglicerol hidrolasa àcida

A finals dels 60 aparegueren els primers treballs on es descrivia l'existència d'activitat triacilglicerol hidrolasa (TAGH) amb pH òptim àcid en les fraccions lisosomals de fetge i ronyó (Mahadevar i Tapple, 1968). DES de llavors s'ha descrit la seva presència al teixit adipós, artèries, cervell, cos luti, cor,intestí, placenta, epiteli pigmentat de la retina, melsa, tiroïde, leucòcits, fibroblasts, macròfecs, i molts altres tipus cel.lulars. A partir de fetge i placenta ha estat purificada fins a homogeneïtat (per revisió sobre propietats bioquímiques, localització intracel.lular, purificació, i paper fisiològic veure Fowler i Brown, 1984).

En homogenats de cor es demostrà la seva localització lisosomal (Wang i col., 1977; Severson, 1979b). Aquesta activitat és inhibida per concentracions creixents de NaCl i $MgCl_2$ (Severson, 1979b), i estimulada per fosfatidilcolina (Severson i col., 1981). Si bé no és inhibida directament pel producte (àcids grassos lliures) si ho és pels seus derivats (Palmitoïl-CoA i palmitoïlcarnitina) (Severson i Hurley, 1982). Recentment Knauer i Weglicki (1983), han demostrat la seva existència als lisosomes de cardiomiòcits aillats de gat d'on l'ha purificada i han estudiat les seves propietats. Aquestes concorden amb el que ja havia estat descrit als homogenats de cor sencer.

La regulació de l'ctivitat TAGH àcida del cor ha estat estudiada molt recentment. Rösen i col.laboradors (1981) observaren una reducció del 70% en l'activitat TAGH àcida en cors de rates diabètiques. Més recentment, Stam i col.laboradors (1984), descriuen unn efecte similar. En el mateix treball també observen una lleugera disminució de l'activitat TAGH àcida en tractar animals amb glucocorticoides; un augment de l'activitat el troben en tractar animals amb T_3 i després d'un dejuni de 72 hores. Si bé mai demostrat definitivament, tots aquests canvis es creu que són degutas a variacions en les taxes de síntesi o degradació de l'enzim (Fowler i Brown, 1984). Algunes drogues també afecten l'activitat TAGH àcida. Així la cloroquina, un agent lisosomotròpic àmpliament utilitzat, provoca una inhibició total d'aquesta activitat (Severson, 1979b). També la clorpromazina (anestèssic local) la inhibeix (Beckman i col., 1982).

El paper fisiològic de la TAGH àcida, que també té activitat colesterol esterasa, fou posat clarament de manifest en demostrar-se que la malaltia de Wolman era deguda a una deficiència congènita de TAGH àcida. Els afectats moren a la infantesa i tenen uns nivells tissulars de TAG i èsters de colesterol unes 100 vegades superiors als normals (per revisió sobre aquesta malaltia veure Fredrickson i Ferrans, 1978). Així doncs, les TAGH àcides estan involucrades, en un major o menor grau, en la degradació endògena de lípids, potser especialment al fetge i ronyó que són els llocs on es produeixen els màxims acúmuls de lípids a la malaltia de Wolman (Fredrickson i Ferrans, 1978). Són les responsables de la degradació dels TAG i èsters de colesterol dee les lipoproteïnes de baixa densitat internalitzades després del seu reconeixement pels receptors específics de membrana (per revisió veure Brown i Goldstein, 1984). Específicament al cor, podrien estar involucrades en la degradació de la sarcolemma com a

conseqüència de malalties isquèmiques (Beckman i col., 1982).

Lipoproteïna Lipasa

Des de 1955 en que Korn (Korn, 1955a i b) caracteritzà per primer cop la lipoproteïna lipasa (LPL) i proposà el seu paper clau en la degradació dels lípids plasmàtics, molt treball ha estat fet amb aquest enzim donant peu a una molt extensa bibliografia recollida en un elevat nombre de revisions de les que, entre les més recents, destaquen les de Nilsson-Ehle, Garfinkel i Schotz (1980), Cryer (1981), Posner (1982), Kinnunen Virtanen i Vainio (1983), Olivecrona i Bengtsson (1984) i Smith i Pownall (1984).

S'ha demostrat la preseència deLPL en multitud de teixits i tipus cel.lulars. D'entre ells, el cor és un dels que te l'activitat específica més elevada. Només és superior al teixit adipós d'animals alimentats i a la glandula mamària (i llet) de femelles durant l'alletament (veure Cryer, 1981). A partir d'aquestes fonts i d'altres s'ha purificat parcialment o fins a homogeneitat electroforètica (veure Smith i Pownall, 1984). Amb aquestes preparacions purificades han estat estudiades les seves propietats moleculars, característiques cinètiques i la seva acció sobre les lipoproteïnes de molt baixa densitat i quilomicrons, els seus substrats fisiològics.

Concretament del cor ha estat purificada del de rata (Twu i col., 1975; Chung i Scanu, 1977), del de porc (Ehnholm i col., 1975), i del d'humans (Twu i col., 1976). Totes elles fins a un grau molt elevat de puresa aparent (85%). Com pot veure's a la taula 1.1, les activitats específiques i pesos moleculars aparents obtinguts per electroforesi en gel de poliacrilamida en presència de SDS no són concordants.

Taula 1.1 ACTIVITATS ESPECIFIQUES I PESOS MOLECULARS APARENTS DE LA LPL PURIFICADA DE COR

Procedència	Activitat especifica (umol/h/mg p)	Pes molecular aparent (kDa)	Referència
Rata	30.8	60	Twu i col.,1975
	646	34	Chung i Scanu,197
Porc	2400	73	Ehnholm icol.,197
Humans	35.3	60	Twu i col., 1976

El pH òptim per l'enzim purificat es de 8.0-8.5 i és a aquest pH al que normalment es valora la seva activitat. De totes formes, depenent de les condicions d'assaig, poden obtenir-se també diferents valors de pH òptim; més neutres (Hülsman i col., 1982) o, com ha estat demostrat amb la LPL purificada de la llet bovina, més bàsics (Bengtsson i Olivecrona, 1982).

A l'igual que per l'enzim purificat a partir de qualsevol altre teixit, la LPL de cor presenta una gran dependència de la presència de sèrum o Apo C-II per a la seva activitat. L'Apo C-I i l'Apo C-III inhibeixen en major o menor grau, l'activitat estimulada per Apo C-II (Twu i col., 1975, 1976; Chung i Scanu, 1977). El significat d'aquestes inhibicions és obscur, doncs si bé s'observa també amb LPL purificada de llet bovina (Holdsworth i col., 1985), en cors perfundits amb quilomicrons que contenien quantitats creixents d'Apo C-III$_3$ o Apo C-I, no s'observà cap efecte inhibidor d'aquestes Apos (Lukens i Borensztajn, 1978; Kotlar i Borensztajn, 1979).

Altre de les propietats més característiques de la LPL és la inhibició per elevades concentracions de NaCl (Korn, 1955a; i molts altres després). Els quatre treballs esmentats referents a la caracterització de

laLPL de cor també troben una gran sensibilitat al NaCl, produïnt-se inhibició a partir de 0.15 M, i arribant a ésser màxima entre 0.5-1.0M (Twu i col., 1975, 1976).El mecanisme pel que aquesta inhibició es produeix no està totalemnt elucidat. Primer es proposà que, en base a que el NaCl inhibia preferentment l'activitat mesurada en presència d'Apo C-II, l'elevada força iònica interferia amb la interacció LPL- Apo C-II (fielding i Fielding, 1976). Més recentment, en no observar cap efecte del NaCl sobre la dependència del sèrum o l'apo C-II, Posner i Morrison (1979) i Bengtsson i Olivecrona (1983) postularen que el principal efecte del NaCl, al meny el els seus sistemes, fóra el de interferir amb el lligam de l'enzim a la interfase lípid-aigua o bé afectaria directament al centre actiu de la molècula, en qualsevol cas, degut a canvis conformacionals.

Per la LPL purificada de cors humans i de rata, Twu i collaboradors (1975, 1976) trobarn que la protamina sulfat inhibia l'activitat. Aquesta inhibició també ha estat emprada per la caracterització de la LPL a d'altres teixits (Greten i col., 1968; Bensadoun i col., 1974; Lithell i Boberg, 1978; Llobera i col., 1979). De totes maneres, també s'ha descrit qué el que es dongui aquesta inhibició depen de les condicions particulars de l'assaig i de com hagi estat preparada la mostra. Així, Stam i Hülsman (1983) trobaren que, en sobrenadants postnuclears d'homogenats de cors de rata, la LPL era lleugerament estimulada per la presència de protamina sulfat a l'assig; en canvi, la LPL vascular alliberada per perfusió amb heparina bé tenia un comportament bifàsic (primer estimulació i després inhibició) bé era inhibida, segons es fes una preincubació de l'enzim amb la protamina o no.

Una de les propietats més interessants de la LPL és la seva interacció amb l'heparina. Ja al 1956 D.S. Robinson descrigué que la injecció intavenosaa d'heparina produïa l'aparició al plasma d'una activitat

lipolítica. Part d'aquesta activitat era la que E.D. Korn havia descrit i caracteritzat com la LPL (Korn, 1955 a i b). Laa interacció directa entre l'heparina i la LPL fou demostrada per Olivecrona i col.laboradors (1971) immobilitzant heparina a gels de sefasora 4B. L'us de gels de sefarosa amb heparina covalentment lligada ha estat la tècnica que posteriorment s'ha emprat més àmpliament per a la purificació de la LPL (per revisió recent veure Smith i Pownall, 1984). A part de l'afinitat entre ambdues molècules, l'heparina també ha estat descrit que pot afectar l'activitat de la LPL. Així, per la LPL purificada de cor, s'ha descrit un lleuger augment de l'activitat en incrementar la concentació d'heparina al sistema de valoració (Twu i col., 1975, 1976). Altres autors troben però, una estimulació considerable (chung i Scanu, 1977). Diversos estudis fets amb LPL purificada de llet bovina indiquen que l'heparina no tindria cap efecte per si mateixa sobre l'activitat de la LPL, i que les activacions o inhibicions que s'observen fóren degudes a d'altres causes com ara l'estabilització de l'enzim (Olivecrona i Bengtsson, 1984).

En el cor pot detectar-se activitat LPL a diferents compartiments. Vàries són les evidències de que es localitza funcionalment als endotelis capil.lars. Potser la més directa i elegant són els estudis de Pedersen i col.laboradors (1983) on, indirectament, visualitza la presència de LPL al llum capil.lar dels endotelis. En el mateix treball demostren que la perfusió prèvia amb heparina eliminava la LPL del llit vascular. Era jaconeguda que la perfusió amb heparina produïa la molt ràpida (menys de 10 segons) aparició d'activitat LPL al medi de perfusió (Pedersen i col., 1981). La funcionalitat d'aquesta LPL vascular havia estat ja apuntada al 1976 quan Enser i col.laboradors demostraren que la perfusió amb heparina reduïa la taxa d'utilització de quilomicrons pel cor a la mitat. Per altre banda, s'ha observat que en un dejuni de 48

hores l'activitat total de la LPL al cor està augmentada (Hollenberg, 1960; Borensztajn i col., 1970), especialment ho està la fracció alliberable amb heparina (Hollenberg, 1960; Borensztajn i Robinson, 1970). Paral.lelament està incrementada la utilització de quilomicrons pels cors perfundits de rates dejunades de 48 hores (Borensztajn i Robinson, 1970). Contràriament al dejuni, una intubació amb carbohidrats redueix ràpidament l'activitat LPL alliberable amb heparina, produïnt-se una reducció paral.lela de la utilització de triacilglicerols de quilomicrons pels cors perfundits d'aquests animals (Pedersen i Schotz, 1980). Igualment la perfusió amb anticossos anti-LPL inhibeix la captació de triacilglicerols de quilomicrons pel cor de rata perfundit (Schotz i col., 1977). Tots aquests i d'altres treballs són els que han portat a considerar actualment que la LPL exerceix la seva funció de hidròlisi dels TAG de les lipoproteïnes riques en TAG, al llum capil.lar dels endotelis.

De totes formes, fins i tot perfusions prolongades amb heparina no alliberen tota l'activitat LPL present al teixit. Es més, en animals alimentats, la major part de l'activitat total (60-70%) no és alliberable per heparina (Hollenberg, 1960; Borensztajn i Robinson, 1970; Pedersen i Schotz, 1980). Aquesta activitat residual es localitza parcialment a l'espai intersticial (Jensen i col., 1980; Hülmann i col., 1982) i també a l'interior de les cèl.lules parenquimals (miòcits) (Bagby oi col., 1977; Chohan i Cryer, 1978; Vahouny i col., 1980; Palmer i Kane, 1983b). En cors de rates nounates ha estat demostrada la presència de LPL tant a cèl.lules musculars com mesenquimals (Henson i col., 1977; Chajek i col., 1977).

La LPL de cardiomiòcits de rates adultes presenta propietat ssimilars a la LPL alliberable amb heparina. Es estimulada per sèrum (Bagby i col., 1977; Chohan i Cryer, 1978; Vahouny i col., 1980), inhibida

inhibida per NaCl i protamina sulfat (Bagby i col., 1977) i per anticossos anti- LPL de cor (Vahouny i col., 1980). De la LPL de cèl.lules mesenquimals de cors neonatals s'ha descrit activació per l'Apo C-II i inhibició per Apo C-I i C-III, així com lligam als gels d'heparina-sefarosa (Henson i col., 1977). A l'interior dels cardiomiòcits la LPL presenta activitat específica relativa màxima en la fracció microsomal (Chohan io Cryer, 1979). En cor sencer però, existeix certa discrepància sobre la localització subcel.lular de la LPL residual, doncs alguns troben que és majoritàriament soluble (Ben-Zeev i col., 198la; Severson i col., 1981), mentre qie d'altres la troben també majoritàriament microsomal (Wang i col., 1977).

Aquesta LPL es creu que no és funcional, al menys en el mateix sentit que la vascular, doncs cardiomiòcits aillats incubats amb VLDL són incapaços d'utilitzar-les (Tamboli i col., 1983; Rajaram i col., 1980). Generalment es considera que tant la LPL vascular com la intersticial tenen el seu origen, als cors de rates adultes, en l'interior de les cèl.lules miocàrdiques (Nilsson-Ehle i col., 1980). Aquesta idea s'originà a partir dels experiments realitzats pel grup dels Stein a Jerusalem (Chajek i col., 1975a i b) i pel de Borensztajn a Chicago (Borensztajn i col., 1975) de forma simultània i independent. Ambdós grups, treballant amb l'inhibidor de la formació microtubular, coltxicina, observaren que en cors perfunditss d'animals prèviament injectats amb la droga, i en augmentar el temps transcorregut des de l'administració sd'aquesta, es produïa un augment de la LPL residual i un descens paral.lel de la LPL vascular, alliberable amb heparina. Així doncs, el sentit fisiològic de la LPL intracel.lular fóra el de precursor de l'activitat vascular. Concordant amb aquesta idea està el fet de que la LPL residual té menor afinitat que la LPL vascular pels triacilglicerols tant d'emulsions artificials, com de quilomicrons (Ben-Zeev i col., 198la i b).

Donada la importància d'aquest enzim en el metabolisme de les lipoproteïnes plasmàtiques, la seva regulació ha estat àmpliament estudiada. Especialment al teixit adipós, però també al cor. Hem comentat ja que l'activitat de la LPL al corr total augmenta amb un dejuni de 48 hores, augment atribuït especialment a la fracció alliberable amb heparina (Hollenberg, 1960); també havíem comentat que a l'administració intragàstrica d'una solució de carbohidrats li seguia una ràpida disminució dels nivells totals d'activitat LPL, especialment de l'alliberable amb heparina (Pedersen i Schotz, 1980). Contràriament, l'administració intragàstrica de greixos (oli de girasol, d'oliva i mantega) produeix un augment d'activitat de 10-12 vegades, de la LPL alliberable amb heparina (Pedersen i col., 1981). Aquest efecte de la dieta greixosa pot venir mitjançat pels glucocorticoïdes, doncs la hidrocortisona mimetitza l'efecte i l'adrenalectomia prèvia preven l'efecte de l'administració dels greixos (Pedersen i col., 1981). Tant la disminució produïda per las glucosa de l'activitat alliberable per heparina, com l'augment induït pels greixos, sñ conseqüència d'alteracions en la quantitat total d'enzim present als capil.lars (Kronquist i col., 1980).

A part d'aquestes alteracions en l'activitat de la LPL vascular com a fruit de canvis d'estat alimentari, en animals dejunats s'observen variacions circadiàries de l'activitat total dee l'enzim (Kotlar i Borensztajn, 1977). Si bé no hi han proves directes que ho relacioni, és interessant el paral.lelismen d'aquestes variacions amb els ritmes dels nivells plasmàtics de glucocorticoïdes (Bellinger i col., 1975).

Altres hormones també afecten l'activitat de la LPL cardíaca. Així, Borensztajn i col.laboradors (1973) mostren que la injecció de glucagó 3 hores abans del sacrifici dels animals, provocava un augment de l'ac-

tivitat total al múscul cardíac. Igualment Stam i Hülsmann (1984) observen en cors perfundits que després de 2-4 hores de perfusió amb glucagó, l'activitat de la LPL alliberable amb heparina augmentava. Aquesta activació però, no es produeix a mb temps de perfusió inferiora a una hora (Stam i Hülsmann,1983), la qual cosa suggereix que l'acció deu exercir-se a nivell de la síntesi de l'enzim.

Tant l'administració "in vivo" d'insulina, com la perfusió d'aquesta hormona per temps llargs no provoquen cap efecte ni sobre l'activitat total ni sobre l'alliberable amb heparina (Borensztajn i col., 1972; Stam i Hülsmann, 1984). Ara bé, en cèl.lules mesenquimals en cultiu de cors nounats s'ha observat el requeriment de la presència continuada d'insulina pel manteniment de l'activitat LPL (Friedman i col., 1978). També en rates amb diabetes dolça induïda per estreptozotocina s'observa una disminució de l'activitat total al cor (O'Looney i col., 1983; Nakai i col., 1984; Nomura i col., 1984), que es produeix de forma paral.lela en la fracció alliberable per heparina i en la residual (O'Looney i col:, 1983). Altres autors però, no troben que l'activitat residual estigui disminuïda (Murthy i col., 1983) i altres, fins i tot, la troben augmentada (Stam i col., 1984). Sigui com sigui, la metabolització de quilomicrons (Kreisberg, 1966b) i VLDL (O'Looney i col., 1983) està disminuïda a la mitat als cors de rate sdiabètiques. Aquestes alteracions poden ésser revertides amb insulina, i sembla que de forma depenent de la síntesi proteica (O'Looney i col., 1983).

També les catecolamines afecten a l'activitat de la LPL de forma semblant a com ho fa el glucagó. Així, Alousi i Mallow (1964) observaren que amb l'administració crònica d'epinefrina (durant 3-4 setmanes), l'activitat LPL cardíaca augmentava dues vegades respecte als controls, però quan una dosi simple era injectada, no s'obsevava cap efecte. En el mateix sentit, amb cors

perfundits de rata Stam i Hülsmann (1983,1984) observen que només a temps superiors a 1 hora la norepinefrina augmenta l'activitat alliberable amb heparina. Aquest efecte era bloquejat per propranolol, la qual cosa suggereix que l'acció de les catecolamines podria ésser via receptors -adrenèrgics.

L'efecte del glucagó i les catecolamines suggereix que l'AMPc podria estar involucrat en l'acció d'auqestes hormones. En aquest sentit, Friedman i col.laboradors (1983) observen que l'addició de dibutiril-AMPc, de 3-isobutil-1-metilxantina o de toxina colèrica (tots tres agents provoquen augment dels nivells intracel.lulars d'AMPc) ocasionava un increment d'activitat LPL en cèl.lules mesenquimals en cultiu de cors nounats. El mateix grup, injectant toxina colèrica a l'animal sencer, observen un augment de l'activitat alliberable amb heparina de la LPL de cor (Knobler i col., 1984). De totes formes, els efectes que observen es produeixen a temps molt més llargs dels requerits pels efectes de lesc catecolamines i el glucagó.

Triacilglicerol hidrolasa neutre

Des de que aparegueren els primers treballs on es caracteritzà la lipasa sensible a les hormones (LSH) del teixit adipós (Vaughan i col., 1964), i de forma paral.lela a l'estudi de la regulació d'aquest enzim, s'ha estat intentant demostrar la presència d'una activitat similar al cor. El problema sempre ha residit en que mai ha estat suficientment avaluada la participació de la LPL o d'altres lipases (especialment less MAG hidrolases) en l'activitatt mesurada. Ell primer treball fou el realitzat per Björntorp i Furman (1962) que observaren la presència d'una activitat lipolítica al cor de rata, resistent al NaCl i a la protamina sulfat, amb pH òptim de 7.0 - 7.4 i insensible a la presència de sèrum. Aquests treball però, fou realitzat utilitzant Ediol com a substrat

(emulsió lipídica comercial amb un elevat grau de monoacilglicerols). Treballs posteriors demostraren que en realitat aquelles propietats corresponien a una activitat monoacilglicerol hidrolasa (Yamamoto i Drummond, 1967), independent de la lipoproteïna lipasa, però inactiva sobre triacilglicerols. Altres investigadors també suggeriren que els mono- i diacilglicerols eren hidrolitzats per entitats moleculars diferents als corsd de rata (Biale i col., 1968;Buchet i col., 1974).

L'us d'emulsions de triacilglicerols, generalment trioleïlglicerol, com a substrat minimitza la participació d'altres lipases en l'activitat mesurada. Amb aquestes condicions es descrigué la presència al cor de rata d'una activitat TAGH neutre (pH òptim 7 - 7.5) lleugerament estimulada per protamina sulfat i només molt lleugerament estimulada per sèrum (Hamid i col., 1973). El mateix grup, aprofondint en l'estudi de les poliamines i el seu efecte activador d'aquesta activitat, obsrvaren que aquesta era principalment particulada (precipitable a 10^5x g) i que podia ésser solubilitzada amb Lubrol. Aquesta activitat era estimulada tant en forma particulada com solubilitzada, per protamina sulfat (5 i 11 vegades respectivament) i per sèrum (10 i 20 vegades), l'efecte del sèrum i de la protaminas sulfat era additiu (estimulació de 18 i 38 vegades respectivament) (Jesmok i col., 1976). Amb els seus resultats, aquests autorn nno poden concloure en quin grau l'activitat que mesuren en absència de sèrum és deguda a l'activitat residual de la LPL.

Basat en la seva observació de que l'activitat lipàsica mesurada a pH 8.5 en presència de sèrum era exlusivament soluble, Severson (1979b) caracteritzà una activitat TAGH neutre (pHo 7.5) en les fraccions particulades i soluble obtingudes per centrifugació diferencial d'homogenats de cor de rata. Observà que a totes elles l'activitat TAGH neutra era estimulada per $MgCl_2$ i $CaCl_2$, i tenia un comportament bifàsic amb

el NaCl i la cloroquina. No observà cap efecte consistent de la incubació prèvia de la mostra amb ATP-Mg^{2+}, AMPc i proteïna quinasa. En aquest treball es conclou que aquesta activitat pertany a una entitat molecular diferent de la LPL en base a les seves propietats i distribució subcel.lular. Ara bé, no es determinàs si l'activitat particulada i mesurada a pH 7.5 era o no estimulada per sèrum, i per altre banda, altres autors han trobat una distribució subcel.lular similar de les activitats mesurades a pH 7.5 (±) sèrum (Wang i col., 1977). En un treball posterior el mateix autor reforça la seva conclusió en observar que la perfusió de cors amb heparina reduïa l'activitat mesurada a pH 8.5 en presència de sèrum, sense que s'alterés la valorada a pH 7.5 i en absència de sèrum (Severson i col., 1981).

Contràriament a tots els treballs comentats anteriorment on, de forma insuficient, es conclou l'existència d'una activitat TAGH neutra diferenciada de la LPL, Stam i Hülsmann a Rotterdam, treballant amb sobrenadants postnuclears (SPN) de cors de rata prèviament perfundits amb heparina per alliberar la LPL vascular, han presentat en els darrers anys (Hülsmann i col., 1982; Stam i Hülsmann, 1983) evidències de que en el rang de pH neutre-bàsic, no existeix al cor de rata altre activitat TAGH diferent de la LPL. La seva conclusió es basa principalment en que (i) el pH_o de l'activitat TAGH del SPN, en absència de sèrum o Apo C-II, pot augmentar fins a 8 - 8.5 quan s'utilitza Intralipid com a substrat (emulsió comercial de fosfatidilcolina i triacilglicerols), (ii) aquesta activitat és estimulada per sèrum o Apo C-II i inhibida per NaCl 1.0 M, (iii) immunoglobulines G botingudes contra LPL vascular de cor de rata, inhibeixen en un 94% l'activitat TAGH del SPN mesurada en absència de sèrum o Apo C-II, i (iv) un 90% de l'activitat TAGH del SPN es lliga a gels d'heparina-sefarosa i s'elueix amb 1.5 M NaCl. Des del nosre punt de vista, dos aspectes enterboleixen la seva conclusió (i) tot i produir-se una ele-

vada inhibició de l'activitat TAGH-SPN (- sèrum) per les IgG anti-LPL, aquella activitat és menyss sensible als anticosso que la mesurada en presència de sèrum, i (ii) en emprar cor sencer, encara que perfundits amb hepoarina, podria donar-se un emmascarament d'altres activitats intracel.lulars per part de la LPL intersticial (Hülsmann i col., 1982), que no eliminen de les seves preparacions.

1.6.- CONTRIBUCIO DE LES DIFERENTS ACTIVITATS TRIACILGLICEROL HIDROLASES A LA LIPOLISI ENDOGENA

Si encara no està establerta la identitat de les TAG hidrolases al cor, molt meys és conegut el paper de cadascuna de les activitats ni en la lipòlisi endògena basal, ni en l'estimulada pels diferents agents. De fet existeixen actuament diferents grups d'investigació (el de Hülsmann i Stam a Rotterdam, el de Severson a Calgary i el de Oscai i Palmer a Chicago, principalment) que dediquen un considerable esforç a aquest tema. Cada grup però, defensa idees contraposades.

Així, el grup de Hülsmann fou el primer en abordar el tema (Hülsmann i Stam, 1978), tot i emprant el conegut inhibidor lisosomal cloroquina (DeDuve i col., 1974). Observaren que, en cors perfundits amb 0.05 mM cloroquina, s'abolia totalment tant la lipòlisi basal com l'estimulada per catecolamines. Contràriament, en cors enriquits en TAG per prèvia alimentació del animals amb àcid eurícic, observaren una inhibició només parcial de la lipòlisi basal. Les catecolamines continuaven estimulant la lipòlisi. En un treball posterior utilitzant altre inhibidor lisosomal (metilamina), observen un comportament similar però menysd dràstic tant de la lipòlisi basal com de l'estimulada per glucagó (Hülsmann i col., 1981).Basats en aquests resultats, conclouen que en cors normals la lisa àcida lisosomal és ñla rsponsable tant de la lipòlisi basal com de l'estimulada per catecolamines o

glucagó. Com per altra banda, defensen que no existeix altre lipase que no sigui aquesta i la LPL, la qual no tindria cap paper en la lipolisi endògena, postulen que a diferència del que és conegut al teixit adipós i tal com ha estat proposat pel fetge (DeBeer i col.,1982), foren els lisosomes i les seves hidrolases àcides les responsables de la mobilització dels TAG endògens. En cors enriquits en TGA, però, el panorame fora diferent. Troben que l'inhibidor de la "lipasa neutre" dietil-p-nitrofenilfosfat bloquejava totalment l'alliberament de glicerol per aquests cors perfundits (Hülsmann i col., 1981), i que perfusions de cors amb Intralipid provocaven un augment de 10 vegades de l'activitat TAGH-SPN sense que s'alteri l'activitat de la TAGH àcida i l'activitat LPL vascular augmentava lleugerament (Stam i Hülsmann, 1982). Basats en aquestes observacions conclouen que només quan es produeix un augment considerable del contingut de TAG al teixit cardíac, la inducció de l'aparició d'una activitat lipàsica neutre (quina identitat o no amb la LPL no ha estat encara estudiada) feria que, a més de la TAGH àcida, aquesta nova activitat TAGH neutre participés en la mobilització endògena dels TAG acumulats. Segons aquest grup el mecanisme pel que es regularia la lipòlisi fóra la taxa d'oxidació dels àcids grassos alliberats (Hülsmann i col., 1984). Es basen en que no han pogut observar cap efecte de les catecolamines o del glucagó sobre cap de les activitats lipàsiques (Stam i Hülsmann, 1983), i en que és conegut l'efecte inhibidor del producte format, o els seus derivats, sobre totes les activitats lipàsiques cardíaques (Severson i Hurley, 1982). Ara bé, en contra de la seva hipòtesi està el fet de que no s'ha observat cap efecte de les catecolamines sobre l'oxidació d'àcids grassos (Creisberg, 1966a; Severson, 1985 observació no publicada).

La conclusió de que la TAGH àcida és la responsable

de la lipòlisi endògena es basa en els efectes dels agents lisosomotròpics. En aquest sentit els resultats obtinguts pel grup de Hülsmann i Stam no han estat corroborats quan han estat intentats reproduir. Així, Severson i col.laboradors (1980) no observen que la pre-perfusió amb cloroquina afecti ni a la lipòlisi basal ni a la estimulada per epinefrina. Per altra banda, molt recenment en el mateix laboratori Kryski (1985) ha observat que ni la metilamina ni d'altres inhibidors lisosomals afecten ni a la lipòlisi basal ni a l'estimulada per isoproterenol en miòcits aillats de cor de rata. Aquest grup, basat en els seus resultats, descarta que la TAGH àcida pugui estar involucrada en el procés lipolític endogen.

Paral.lelament el desenvolupament de la controvèrsia sobre el paper de la TAGH àcida en la mobilització dels TAG endògens, Oscai i Palmer han presentat una sèrie de resultats, alguns d'ells molt controvertits, que els hi serveixen per concloure que fóra l'activitat LPL residual (intracel.lular) la responsable d'aquesta lipòlisi endògena. Així, observen una variació contraposada dels nivells de TAG tissulars i de l'activitat LPL residual en homogenat de cor de rates tractades amb diferents dosis de glucagó (Oscai, 1979) o de cors perfundits amb adrenalina o tres-isobutil-1-metilxantina o dibutiril AMPc (Palmer i col., 1981). En tots els casos, en base els elevadíssims coeficients de correlació, infereixen una relació causal. En el sentit de que seria l'augment d'activitat LPL residual la que causaria de disminució dels nivells endògens de TAG. Curiosament la resposta és bifàsica, observant a baixes dosis de glucagó o a baixes concentracions d'adrenalina (5 nM) un efecte inhibidor de la lipòlisi (elevats nivells de TAG) i de l'activitat LPL, mentre que elevades concentracions d'hormona provoquen una estimulació de la LPL i disminució dels nivells de TAG. Igualment observen que l'addició de diferents concentracions d'AMPc directament a l'homogenat de cor, provoca també la

UNIVERSITAT DE BARCELONA FACULTAT DE BIOLOGIA

resposta bifàsica. Sorprenentment, l'addició de la subunitat catalítica de la proteïna quinasa depenent d'AMPc (tot i no posar ATP-Mg^{2+} en el sistema) provoca també una estimulació de l'activitat LPL (Palmer i col.,1981). Posteriorment els mateixos autors observaren que si l'activitat es mesurava en polses acetòniques, la resposta a diferents contracions d'adrenalina en el medi de perfusió no era ja bifàsica sinó que sempre obtenien estimulació de l'activitat LPL (Palmer i Kane, 1983a). Tot i no existir doncs aquesta correlació continuen defensant la seva hipotesi en els seus darrers treballs. Així, treballant amb miòcits aillats, troben que incubant-los 5 nM observen ara, i a diferència del que obtenien els cors perfundits tant estimulació de la lipòlisi endògena com de l'activitat LPL, conjuntament amb un augment dels nivells d'AMPc (Palmer i Kane, 1983b). Posteriorment han continuat presentant correlacions altement significatives, entre variacions d'activitat LPL residual en homogenat de teixit i contingut tissular de TAG en diferents situacins experimentals (Miller i col., 1984; Miller i Oscai, 1985).

En base a aquests resultats postulen que la LPL residual (que anomenen lipasa sensible a les hormones tipus L) és la responsable de les variacions en els nivells intracel.lulars de TAG, tant per mecanismes de fosforilació-defosforilació depenents d'AMPc, com independents d'ell (han observat variacions en les que els nivells d'AMPc no s'alteraven, Miller i col., 1984).

Com comentavem al principi d'aquest apartat, el coneixement dels mecanismes pels que es produeix i regula la mobilització de les reserves lipídiques endògenes al cor és un tema on abunden més les incongruències i contradiccions que l'acord sobre resultats aportats pels diferents laboratoris.

1.7.- OBJECTIUS

L'estudi de la regulació i mecanismes de la mobilització dels triacilglicerols endogens ha estat sempre complicat en cors perfundits. Per una banda, molts agents que alteren aqueste mobilització també afecten a la funció cardíaca i,per tant, a tot el metabolisme, no havent estat possible el determinar si els efectes eren directes o secundaris a canvis en la contractilitat. Tampoc ha pogut determinar-se inequivocament, els mecanismes que mitjançaven aquesta estimulació. Per altre banda, en ésser un organ heterogeni en la seva composició cel.lular, quedava per resoldre si realment era un procés localitzat en les cèl.lules musculars, com havia estat suposat. Igualment, l'existència d'aquesta heterogeneïtat i d'un espai intersticial on hi és present la LPL, ha dificultat la caracterització definitiva de les lipases intracel.lulars dels cardiomiòcits.

En els darrers deu anys ha estat introduïda la utilització de cardiomiòcits aïllats, tolerants al Ca^{2+} i quiescents tant en estudis electrofisiològics com metabòlics o farmacològics. Aquest model presenta importants avantatges per a l'estudi de la lipòlisi endògena. Així pot establir-se la seva localització o no en aquest tipus cel.lular sense interferències d'adipòcits o d'altres tipus cel.lulars. A més,en ésser quiescents, les respostes als diferents agents no han de veure's emmascarades per alteracions en la contractilitat, que en aquest model no es produeix sense un estímul elèctric. Finalment, pot abordar-se l'estudi de les activitat TAG hidrolases intracel.lulars amb garantia de no interferència pel medi intersticial.

Amb aquest model ha pogut demostrar-se al nostre laboratori que, efectivament, els miòcits de cor utilitzen les seves reserves lipídiques i que aquesta via

és sensible ala modulació per hormones. Concretament, les catecolamines l'afecten directament i, presumiblement, a través de l'AMPc. Com a pas previ a l'aprofundiment en els mecanismes moleculars d'aquest procés, ens plantejàrem el caracteritzar les activitats Triacilglicerol Hidrolases en els cardiomiòcits aïllats, específicament ens hem centrat en determinar si existeix o no, en el marge de pH neutre-bàsic, alguna activitat diferenciada de la LPL.

Primerament hem caracteritzat les activitats en homogenats cel.lulars en referència a l'efecte de diferents activadors o inhibidors, així com la distribució subcel.lular i l'alliberabilitat amb heparina. Tot seguint el ventalld de característiques conegudes de la LPL hem pretès obtenir una primera aproximació sobre la identitat de l'activitat TAGH neutra independent de sèrum.

Per tal d'obtenir una demostració més directa de l'existència o no de la hipotètica TAGH neutra, vàrem purificar parcialment la LPL i caracteritzàrem les seves propietats, determinades en presència i absència de sèrum, així com les de les activitats no co-purificades amb ella. Els resultats obtiguts els agrupem i constitueixen la segona part d'aquesta Tesi.

Finalment hem determinat l'efecte de les catecolamines i la diabetes sobre les activitats caractwritzades. Una i altra són situacions on la lipòlisi està estimulada i pretenïem establir si es produïa una variació paral.lela d'alguna de les activitats TAG hidrolases, com a primera aproximació en l'estudi dels mecanismes pels que es regula la via lipolítica als cardiomiòcits aïllats de rata.

2.- MATERIALS I METODES

2.1.- MATERIALS

2.1.1.- Reactius i productes químics

Tri- (1-C^{14})oleïlglicerol (activitat específica 48-56 mCi/mmol), tri(9,10-(n)-H^3)oleïlglicerol (1.0 Ci/m mol) i líquid d'escintil.lació aquosa ACS-II els obtinguérem d'Amersham Canada (Oakville, Ont.). Tri--(1-C^{14})oleïlglicerol (109 mCi/m mol) l'obtinguérem també de New England Nuclear Canada (Lachine, Quebec).

Els següents productes els obtinguérem de Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO): albúmina sèrica bovina (A-9647), albúmina sèrica bovina lliure d'àcids grassos (A-6003), d,l-carnitina, àcid N-2-hidroxi-etilpiperazina-N'-"-etanosulfònic (HEPES), àcid piperazina-N,N'--bis(2-etanosulfònic) (PIPES), Tris(hidroximetil)aminometà (TRIS), N-Tris(hidroximetil)metil-glicina (Tricina), ditiotreitol (DTT), polioxietilen lauril èter (Brij 35), o-ftaldialdèhid (OPA), immunoglobulina G (IgG) de cabra; IgG-(anti-IgG de cabra) de conill amb peroxidasa de raba conjugada, IgG-(anti-IgG de conill) de cabra amb peroxidasa conjugada,blau de Tripà, glicina, imidazol (grau III, baixa fluorescència), -nicotinamida adenina dinucleòtid (NAD), -nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat (NADP), adenosina 5'-monofosfat (AMP, tipus III de múscul de cavall), glicogen (tipus X, lliure de nucleòtids), (+/-)-isoproterenol, solució estandard de glucosa, kit per la determinació de glucosa, àcid oléic, mono-, di- i tri-oleïlglicerol, fosfatidilcolina i 2-mercaptoetanol.

Biorad Laboratories (richmond, CA) ens proporcionà els reactius per l'electroforesi: dodecil sulfat sòdic (SDS), acrilamida, bis-acrilamida, persulfat amònic, N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamida (TEMED), glicina, 2-mercaptoetanol, blau de bromofenol, blau de Coomassie R-250 i els marcadors d'alt i baix pes molecular. Boheringer-Mannheim Canada (Dorval, Quebec)

ens suministrà: glucosa-1-fosfat, glicerol deshidrogenasa (Enterobacter aerogenes), fosfoglucomutasa (múscul de conill), glucosa-6-fosfst deshidrogenasa (llevat), 4-metiumbel.liferil i 4-metilumbel.liferil-2-acetamida-2-desoxi- -D-glucopiranòsid. Les bombones de N_2 i O_2/CO_2 (95%/5%) les obtinguérem de Union Carbide Canada Inc. (Medigas, Calgary, Alberta), la col.lagenasa Worthington tipus II (125-203 unitats/mg) de Flow Laboratories (Mississauga, Ont.), el Medi-Mínim-Essencial Jokilk de GIBCO Canada (burlington, Ont.), l'heparina-sefarosa CL-6B Pharmacia PL Biochemicals (dorval, Quebec), protamina sulfat i estreptozotocina els aconseguírem de Calbiochem-Behring (La Jolla, CA).

L'aigua utilitzada fou sempre purificada i desionitzada pel sistema de filtració Millipore. Les apolipoproteïnes C-II i $C\text{-}III_2$ foren gentilment donades pel Dr. M.W. Huff (University of Western Ontario, London, Ontario). Les IgG anti-LPL (de cor) obtingudes en cabra foren gentilment donades pel Dr. M.C. Schotz (Veterans Administration Hospital Wadsworth Center, Los Angeles, CA). Tots els altres reactius i productes químics foren de la màxima puresa i proporcionats per Fisher Scientific Co. (Calgary, Alberta).

2.1.2.- Aparells

Per la seva preparació, tots el reactius es pesàren en unes balances de precissió Metler models AC88 ó PN1210. El pH s'ajustà amb un pHmetre Accumet-420 (Fisher Sci. Co.). Per l'aïllament dels miòcits s'utilitzà una boba Minipuls-2 de Gilson i tot el sistema de cànules (GIBCO Canada) es muntà en una càmbra de perfusió (The Apparatus Shop, Vanderbilt University). Per la centrifugació de les cèl.lules durant l'aïllament, s'utilitzà una centrífuga de taula Fisher Centrific amb un rotor tipus 215. Les cèl.lules s'incubaren en un bany d'aigua termostatitzada amb rotació orbital (Lab-Line Instruments Co.). Les cèl.lules es comptaren

en un microscopi Leitz-Wetzlar SM-Lux a 100augments. Quan es feren incubacions de les cèl.lules un cop aïllades, es feu servir el mateix bany amb rotació orbital que per l'aïllament. Un cop fet l'experiment les cèl.lules es centrifugaren en la mateixa centrífuga de taula de baixa velocitat Fisher Centrific, o bé amb una microcentrífuga Eppendorff 3200 (Brickman Instruments).

Les mostres que es congelaren a -80°C es guardaren en un cogelador d'ultra baixes temperatures Revco. Tant les cèl.lules com el substrat per la determinació de les activitats TAG hidrolases, es sonicaren amb un sonicador Braun-Sonic 1510. Per la preparació de les pols acetòniques es feu servir una centrífuga Beckman TJ-6 amb unitat de refrigeració TJ-R. Les incubacions per les diferents valoracions on calgué control de temperatura, es feren en un bany d'incubació Dubnoff. Les centrifugacions requerides a les diferents valoracions es feren en una centrífuga de taula Sorvall GLC-1, sense control de temperatura. La radioactivitat es mesurà en un comptador d'escintil.lació líquida Mark III (Searle Analytic Inc.). Per la preparació de les fraccions subcel.lulars s'emprà una centrífuga preparativa J2-21 de Beckman amb rotor d'angle fix JA-20 i una ultracentrífuga L5-55 també de Beckman amb rotor d"alumini tipus 40, també d'angle fix.

Les cromatografies en capa prima per la quantificació de la puresa del trioleïlglicerol radioactiu abans i després de la purificació, s'empraren plaques de silica gel 60-F_{254} de 0.2 mm de gruix amb soport d'alumini (E. Merck, Terochem Labs., Edmonton, Alberta). Per les cromatografies d'afinitat en heparina-sefarosa CL-6B s'utilitzaren columnes Econo-Column (Biorad Laboratories), col.lctor de fraccions LKB model Ultrorac 2070 i una bomba peristàltica P-1 de Pharmacia PL Biochenicals. La concentració per ultafiltració a pressió es feu en eu aparell Amicon 8MC

amb membranes de 25 mm Ø YM-10 (Amicon Canada Ltd., Oakville, Ont.).

Les electroforesis es feren en una cubeta Protean 16 de Biorad amb una font d'alimentació Buchler 3-1500. Les mostres s'aplicaren amb una microxeringa de volum variable Pedersen. Els gels s'assecaren en un assecador de plaques model 483 de Biorad. La transferència electroforètica a filtres de nitrocel.lulosa (Schleicher & Schuell) es feu en una cèl.lula de Trans-Blot Biorad amb una font 160/1.6 de Biorad.

Les lectures de fluorescència per les determinacions de proteïnes, glicerol i activitat glicogen fosforilasa es feren en un espectrofotòmetre de fluorescència Perkin-Elmer 650-10M. Les densitats òptiques per la valoració de glucoses es llegiren en un espectrofotòmetre Beckman DU-8B.

2.1.3.- Animals

Al llarg del treball han estat emprades rates mascles adultes (230 - 280 g) de la raça Sprague-Dawley, obtingudes de Charles River Canada Inc. (St. - Constant, Quebec) i mantingudes a l'animalari de la Facultat per un període d'al menys, una setmana amb lliure accés a l'aigua i el menjar. L'animalari manté un cicle diari de 12 h llum/12 h foscor i condicions de temperatura i humitat controlades.

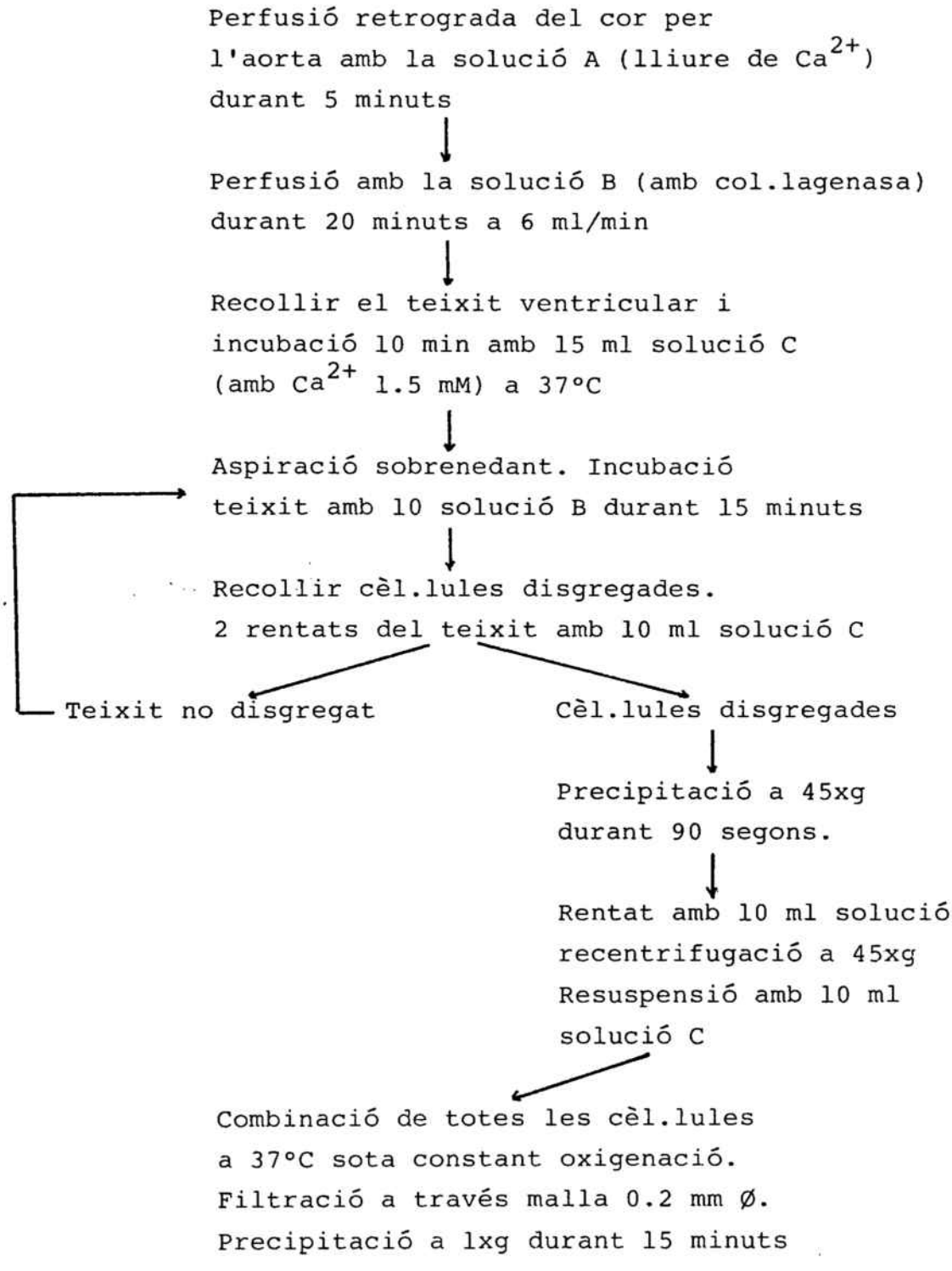
2.2.- METODES

2.2.1.- Aïllament de miòcits de cor de rata

Es feu servir el mètode inicialment descrit per Frangakis i col.laboradors (1980), modificat posteriorment per Montini i col.laboradors (1981) i posat a punt al nostre laboratori per Kryski (1985). Un esquema del mètode es sumaritza a la figura 2.1.

FIGURA 2.1

ESQUEMA DE L'AILLAMENT DE MIOCITS DE COR DE RATA



Una hora abans del sacrifici dels animals per decapitació, s'injectava i.p. heparina sòdica (2.0 Unitats U.S.P./g animal). Després del sacrifici es treia el cor ràpidament de la carcassa i es canulava l'aorta iniciant-se immediatament la perfusió retrògrada amb las solució A (Joklik-MEM, lliure de Ca^{2+} i suplementat amb 1.2 mM $MgSO_4$ i 1.0 mM d,l-carnitina, gassificada amb O_2/CO_2 (95%:5%) a pH 7.4) a un flux de 8 ml/min durant 4-5 minuts. Durant aquest temps, i en dependència de l'experiment concret, es canulaven fins a 4 cors per processar-los simultàniament. Aquesta primera perfusió tenia com a objectiu netejar el cor de restes de sang. A continuació els cors eren perfundits durant 20 minuts de forma no-recirculant amb la solució B (solució A contenint 200 Unitats/ml de col.lagenasa i 1.0 mg/ml albúmina lliure d'àids grassos) també gassificada i mantinguda a 40°C, a un flux de 6 ml/min. En aquest temps els cors canviavena a un color molt més clar, s'inlaven i es tornaven flàcids.

Acabada la perfusió s'agafava el teixit ventricular, s'obrien les dues cavitats amb tisores primes i s'incubaven 10 minuts a 37°C en erlenmeyers de plàstic de 25 ml amb la solució C (solució A suplementada amb 1.5 mM $CaCl_2$ i 10 mg/ml d'albúmina lliure d'àcids grassos) sota constant oxigenació i agitació orbital de 110 cicles/min. Aquesta incubació provocava las ràpida mort de les cèl.lules intolerants al calci que eren eliminades per aspiració de la solució C. La restaa del teixit tolerant al calci era llavors incubat per 15 minuts a 37°C sota les mateixes condicions d'agitació i oxigenació amb 15 ml de la solució B.

Les cèl.lules disgregades eren recollides per decantació en tubs de plàstic cònics de 50 ml de cabuda amb tap de rosca. La resta del teixit era rentat dues vegades amb 10 ml de la solució C per tal de, per agitació mecànica, disgragar més cèl.lules. La suspensió cel.lular obtinguda era llavors centrifugada

UNIVERSITAT DE BARCELONA FACULTAT DE BIOLOGIA

45 x g durant 90 segons a temperatura ambient i amb frenat lent. El precipitat cel.lular es rentava amb 1ç ml de la solució C i es recentrifugava sota les mateixes condicions. El nou precipitat era resuspès i les cèl.lules mantingudes en erlemmeyer de 100 ml amb 10 ml de la solució C. Mentre es feia aquest procés, la resta de teixit que no havia estat disgrgat era reincubat amb altres 15 ml de la solució B per altres 15 minuts, transcorreguts els quals es repetia el procés de decantació , rentat del teixit residual i centrifugacions; així fins a la total digestió del teixit ventricular. Normalment no calgueren més de dues incubacions amb la solució B per aconseguir-ho. Totes les cèl.lules disgregades als diferents pasos eren combinades i filtrades a través d'una malla de seda de 0.2 mm de diàmetre de porus. Els miòcits viables eren purificats per sedimentació a 1xg durant 15 minuts.

Determinació del nombre de cèl.lules i viabilitat

Els miòcits aïllats varen ésser resuspesos en 10 ml de solució C, 0.05 ml d'aquesta suspensió s'afegiren a 0.05 ml de blau de tripà 0.4% en salí-fosfats pH 7.4. El nombre de cèl.lules es determinà microscòpicament comptant les cèl.lules en un hemocitòmetre. Una cèl.lula es considerà viable si, sota observació microscòpica, excloïa el colorant i era de morfologia allargada.

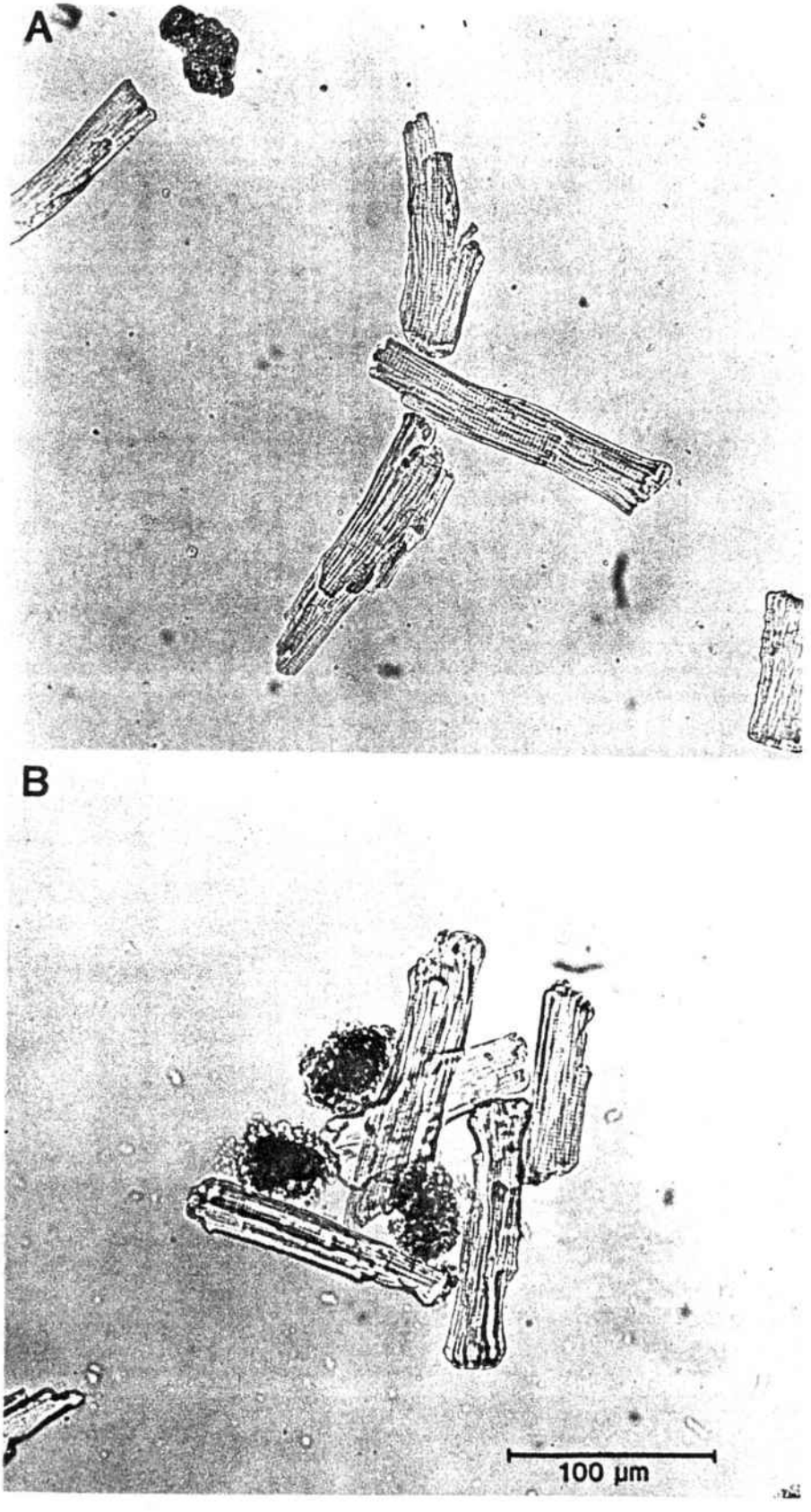
A la figura 2.2 es mostra l'aspecte que oferien aquestes cèl.lules sota el microscopi òptic. Aquestes fotografies han estat generosament cedides pel Dr. A.J. Kryski del nostre laboratori.

A la taula 2.1 es mostren algunes de lesd característiques de les cèl.lules obtingudes. Aquestes cèl.lules calci-tolerants eren majoritàriament quiescents ($<$ 10% contreïen), i les que ho feïen ho feren a un ritme baix ($<$ 30contraccions/min) i en cap cas les

FIGURA 2.2

FOTOGRAFIES AL MICROSCOPI OPTIC DE MIOCITS AILLATS DE COR DE RATA. (300 augments).

Fotografies gentilment cedides pel Dr. A.J. Kryski del Cell Regulation Reseach Group, Heath Sciences Center, The University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada.


A
B
100 µm

TAULA 2.1

CARACTERISTIQUES DELS MIOCITS AILLATS DE COR DE RATA

nombre de cèl.lules/cor ($x10^{-6}$)	11.8±0.5 (53)
viabilitat (%)	71±1 (53)
pes sec (mg/10^6cel.)	10.7±0.6 (26)
proteïnes (mg/10^6cel.)	5.1±0.3 (23)

catecolamines provocaven augment delc nobre de cèl.lules que es contreïen, o el ritme de les que ho feïen (Kryski, 1985).

2.2.2.- Processament de les mostres

Un cop obtingudes les cèl.lules eren centrifugades i guardades a -80°C fins el moment de la seva utilització, sempre en menys d'una setmana.

El precipitat cèl.lular fou resuspès en un volum no superior a 5.0 ml de medi Ib (HEPES 10 mM, EDTA 1.0 mM, DTT 1.0 mM, sacarosa 0.25 M pH 7.5) i sonicat 3-4 vegades per 30 segons a 200W a 4°C. Per observació microscòpica més d'un 97% de les cèl.lules quedaven trencades amb aquest tractament. Finalment es portava fins a la dilució apropiada amb Ib (generalment 5 mgprot/ml). L'homogenat es podia guardar a -80°C fins, al menys, un mes sense pèrdua apreciable d'activitats TAG hidrolases. Per la preparació de la pols acetônica es seguí el mètode de Garfinkel i Schotz (1972), afegint 3 volums d'acetona freda (-20°C) a un volum d'homogenat cel.lular. El precipitat es rentà un cop amb acetona freda i dos cops amb èter etílic fred. La pols s'assecà sota corrent de N_2 i es guardà a -80°C fins el moment del seu us, en el que es resuspengué en 1.0 ml Ib i es sonicà breumenta 125 W.

2.2.3.- Valoració de les activitats Triacilglicerol hidrolases

Tant el trioleïlglicerol procedent d'Amersham com el de New England Nuclear tenien un grau de puresa 95%, especialment el tritiat quina puresa era 90%. Això ens obligà a repurificar-ho per tal de disminuir la quantitat d'oleat contaminat (inicialment, 3%).

Purificàrem el TOG radioactiu seguint el mètode de Carroll (1961) de cromatografia en Florosil. Aquest fou activat per escalfament a 240°C per 48 h. amb pos-

terior afegiment de 1.4 ml d'A.D. a 10 g de Florosil, i assecat a 60°C. Un cop activat, el Florosil es manté estable per anys.

Per la purificació del TOG s'empaquetà el Florosil en una columna feta amb una pipeta Pasteur. El Florosil es rentà amb hexà . S'aplicaren 0.25-0.5 mCi TOG-C^{14} o bé 1.0-2.0 mCi TOG-H^3, en un volum de 0.5 ml hexà, a la columna i s'eluí amb 80 ml d'èter etílic anhidre lliure de peròxids 7.5% en hexà. L'eluït es recollí i s'assecà sota corrent de N_2, resuspenent-se en 2.5-5.0 ml de toluè . Es comptà 1.0 ul per quatriplicat i es comprovà la puresa per cromatografia en capa prima, aplicant 1.0 ul a una placa de silics gel (7 x 2.5 cm) de 0.2 mm de gruix, conjuntament amb 1.0 ul d'una solució estandard (trioleïlglicerol, dioleïlglicerol, monooleïlglicerol i àcid oéic en toluè). La placa es corregué amb hexà- èter etílic anhidre- acètic glacial (73:25:2) com a fase mòbil. Les taques es visualitzaren per breu exposició a vapors de iode. A la figura 2.3 es mostra la posició de les diferents bandes un cop visualitzades. Posteriorment es retallaren les bandes i es posaren amb 3.5 ml de líquid d'escintil.lació a minivials de plàstic on es comptà la radioactivitat.

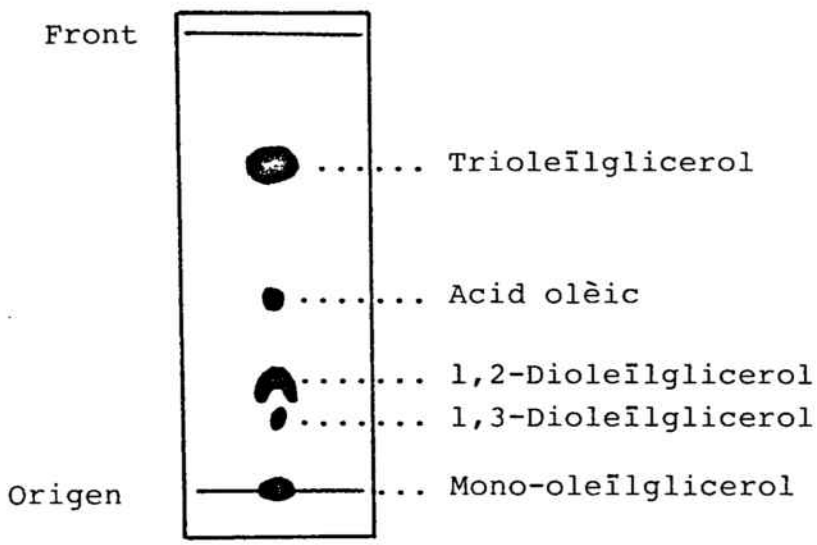
El TOG purificat es guardà a -20°C sota atmòsfera de nitrogen.

Proves prèvies

El TOG es el substrat més communment emprat per la determinació de les activitats triacilglicerol hidrolases . En ésser aquest insoluble s'han descrit molts mètodes per preparar emulsions reconeixibles pels enzims. Entre d'elles els més àmpliament difundits són l'emulsió en presència de fosfolípids i glicerol (Nilsson-Ehle i col., 1976), l'emulsió en medi aqüos emprant goma aràbiba com emulsionant (Ehnholm i col., 1975). També han estat utilitzats al nostre labo-

FIGURA 2.3

POSICIO DEL TRIOLEILGLICEROL I ELS SEUS CONTAMINANTS DESPRES DE LA SEPARACIO PER CROMATOGRAFIA EN CAPA PRIMA



ratori la dispersió directa en glicerol o etanol (severson i col., 1981b).

Inicialment comparàrem tres d'aquests substrats:

1.- TOG dispers en glicerol
2.- TOG dispers en etanol
3.- TOG + fosfatidilcolina dispers en glicerol

Per fer-ho els preparàrem tal com s'indica als treballs originals on es posa a punt cadascun. El substrat (1) i (2), segons Severson i col.laboradors (1981b), i (3) segons Nilsson-Ehle i col.laboradors (1976).

Seguint els protocols descrits per cada mètode, estudiàrem la linealitat en funció de la quantitat de mostra valorada, prenent aquest paràmetre com a indicador de la bondat del mètode. Com pot veure'a a la figura 2.4, cap d'ells donà resultats satisfactoris. Amb el substrat (1) no obtinguérem linealitat ni quan es determina en presència de sèrum, ni quan es determinà en la seva absència. Amb el substrat (3) obtinguérem una certa linealitat en presència de sèrum, però no en la seva absència. Amb el substrat (2) obtinguérem millor linealitat, però molt poca reproduibilitat i molta dispersió dels duplicats .

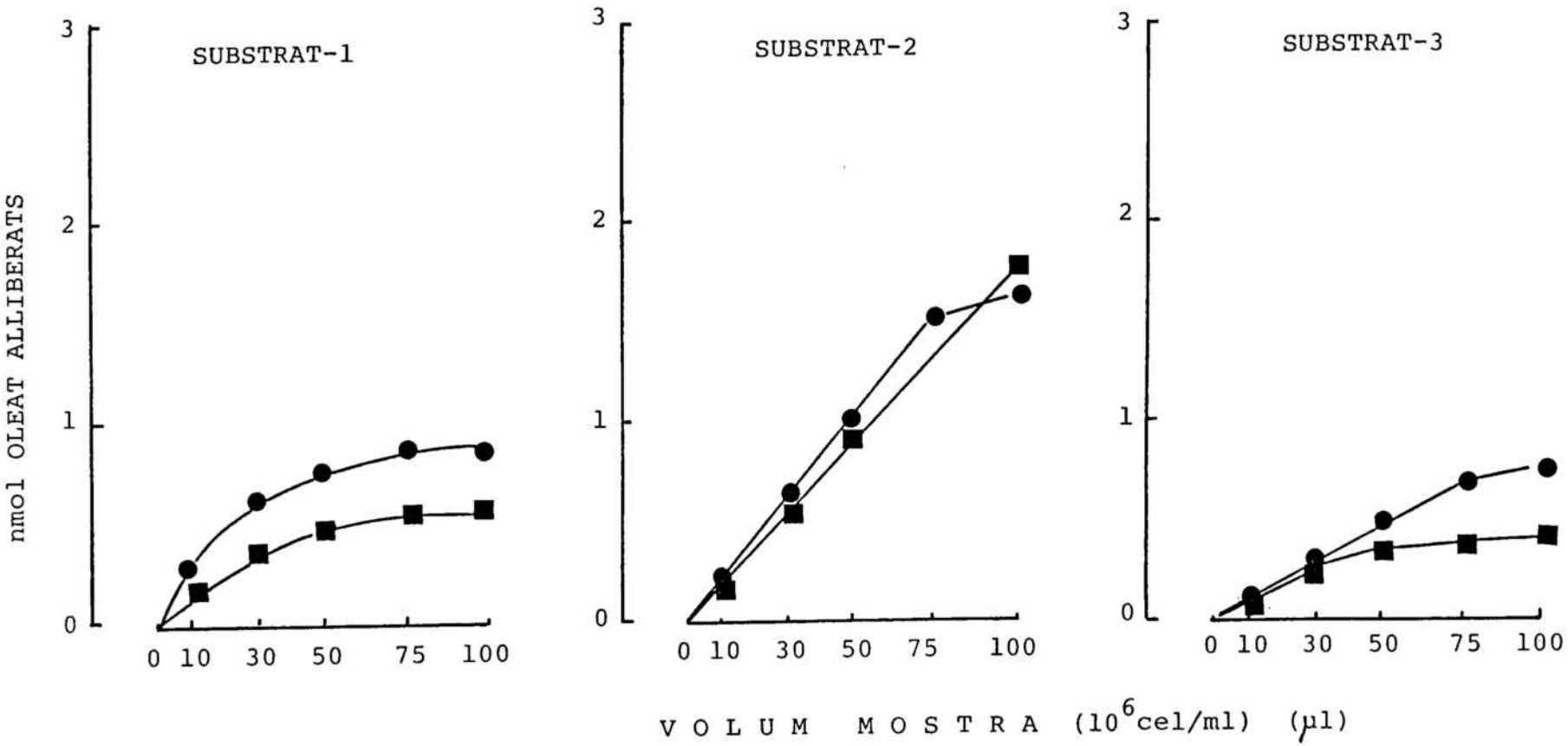
Després de vàries proves amb les que pretenïem millorar cadascun dels sistemes, totes elles amb resultat negatius, decidírem de desenvolupar un nou sistema de preparació del substrat que, en les nostres mostres, donés elevades linealitats, fos reproduïble i també dones elevades activitats. Finalment obtinguérem resultats satisfactoris emprant una modificació del substrat(2) en la eliminàrem l'etanol, utilitzant la sonicació com a mètode d'obtenció d'una emulsió.

Valoració de l'activitat TAGH àcida

Es feu seguint una modificació del mètode descrit

FIGURA 2.4

LINEALITAT DE L'ACTIVITAT TRIACILGLICEROL HIDROLASA NEUTRE EN FUNCIO DEL VOLUM DE MOSTRA



per Severson (1979) per la determinació de l'activitat TAGH àcida en homogenats de cor sencer de rata.

Un mil.lilitre de substrat es preparà de la següent manera: en un tub de vidre es posaren 0.857 u mol de TOG i 0.857 uCi TOG-C^{14} (o bé 1.714 uCi TOG-H^3), s'assecà sota corrent de nitrogen i s'afegiren 0.143 ml de tampó acetat 0.2 M, albúmina lliure d'àcids grassos 4 mg/ml, pH 5.0 i 0.867 ml d'A.D.. Es sonicà 3 vegades durant 15 segons a 200 W a 4°C i es mantingué a 4°C fins el moment del seu us (no més de poques hores després).

Quan calgué preparar volums superiors a 5.0 ml, es posà el volum adequat del tampó i fins a 5.0 ml amb A.D., essonicà i, un cop emulsionat, es portà amb A.D. fins el volum total requerit. Finalment s'agità amb vortex per espai d'un minut.

Si bé preparàrem cada dia un nou substrat, comprovàrem que es podia guardar gongelat a -20°C per varies setmanes, calguent només resonicar-ho en descongelar.

La reacció començà en afegir 0.05 ml de mostra a 0.35 ml de substrat, i es feu en un bany termostatitzat a 30°C amb agitació constant de 60 cicles/minut. Als 30 minuts s'aturà la reacció afegint 3.0 ml de metanol/cloroform/heptà (1.45:1.21:1), àcid oléico 0.1 mM. S'afegí 0.1 ml de NaOH 1 M, l'oleat format es recollí en la fase hidrosoluble. 1.0 ml d'aquesta es comptà amb 4.5 ml de líquid d'escintil.lació. Les mostres es valoraren sempre per duplicat. Els blancs es feren afegint 0.05 ml de medi Ib en lloc de mostra.

Quan es tractà de testar l'efecte de diferents agents sobre l'activitat, aquests s'afegiren en un volum de 0.05-0.1 ml al tub de reacció. Per tal de mantenir el volum final fix a 0.4 ml, s'ajustà el volum d'aigua en la preparació del substrat de forma que

les concentracions dels components no quedés alterada. A la taula 2.2 es mostra la concentració dels diferents components en el medi d'incubació final.

Aquest mètode donà resultats lineals fins a 60 minuts d'incubació i 125 ug de proteína (figura 2.5).

Valoració de les activitats TAGH neutres

El mètode seguit és també una modificació de l'originalment descrit per Severson (1979) per la determinació de l'activitat TAGH neutra en homogenats de cor sencer de rata.

Un mil.lilitre de substrat el preparàrem de la següent forma: en un tub de vidre posàrem 0.857 uCi TOG-C^{14} (o bé TOG-H^3) i 0.857 u mols de TOG, els assecàrem sota corrent de nitrogen i afegírem 0.143 ml de tampó PIPES 0.2 M, albúmina lliure d'àcids grassos 4 mg/ml, pH 7.5 i 0.78 ml d'A.D.. Els sonicàrem 3 vegades durant 15 segons a 200 W a 4°C. Posteriorment posàrem 0.043 ml de $MgCl_2$ 1.33 M i 0.034 ml de sèrum pre-escalfat 1h a 50°C, o el mateix volum d'A.D., segons es valorés l'activitat TAGH neutra (+) o (-) sèrum. Un cop afegits tots els components s'agità intensament amb vortex i es guardà a 4°C fins el moment del seu us.

De la mateixa manera que per l'activitat TAGHA, quan calgué preparar més de 5.0, el volum d'A.D. en excès es posà després de la sonicació. Igualment, el substrat podia guardar-se per vàries setmanes a -20°C mantenint les seves propietats. Només calia resonicar en descongelar-ho. Totoi això, nosaltres el preparàrem sempre fresc.

El procés d'incubació i quantificació del producte format fou idèntic al descrit per l'activitat TAGH àcida. Comprovàrem que, sota les nostres condicions, recuperàvem més d'un 97% de l'oleat produït. A l'igual que per l'activitat TAGH àcida, quan s'afe-

TAULA 2.2

CONCENTRACIONS DELS DIFERENTS COMPONENTS EN EL SISTEMA DE VALORACIO DE LES ACTIVITATS TRIACILGLICEROL HIDROLASES

Substrat	1	2	3
Trioleïlglicerol	0.6 mM	0.6 mM	0.6 mM
TOG-C^{14}	0.24 µCi	0.24 µCi	0.24 µCi
(TOG-H^3)	(0.48 µCi)	(0.96 µCi)	(0.24 µCi)
A.E. (µCi/µmol)[a]	1.0 (2.0)[b]	1.0 (4.0)	1.0 (1.0)
PIPES	----	25 mM	25 mM
Acetat	25 mM	----	----
Albúmina	7.6 µM	7.6 µM	7.6 µM
$MgCl_2$	----	50 mM	50 mM
Sèrum	----	----	3.0%
pH	5.0	7.5	7.5

a: A.E.= activitat específica

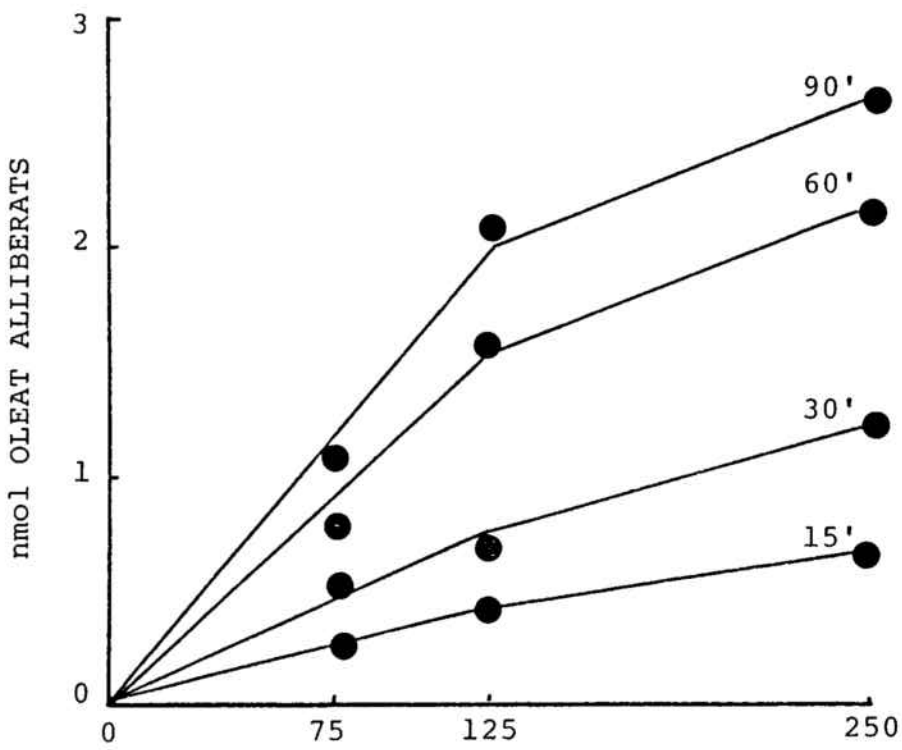
b: corresponent a l'un de TOG-H^3

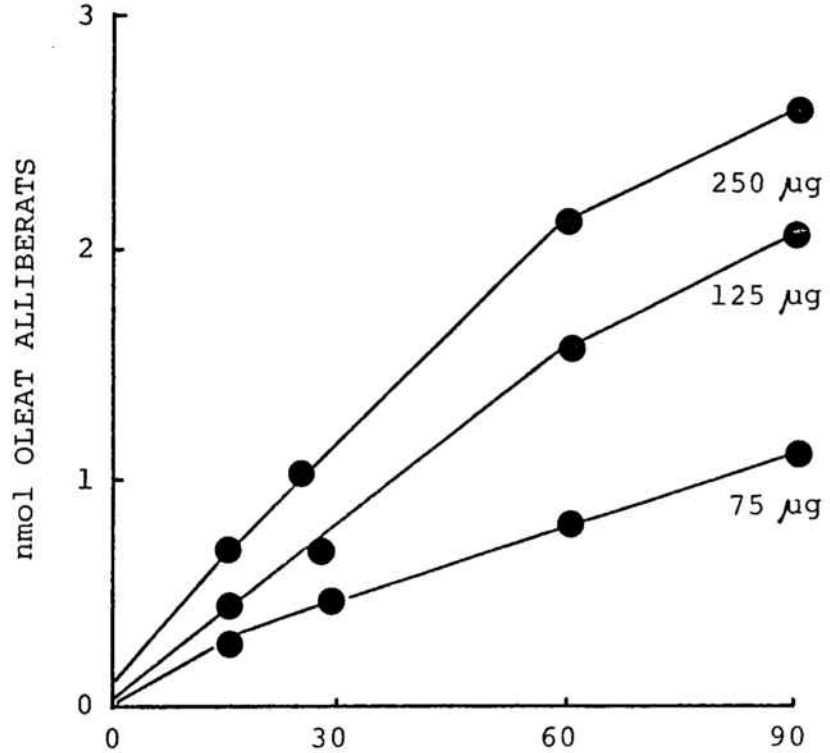
Substrat 1: per la determinació de l'activitat TAGHA

Substrat 2: per l'activitat TAGH neutre (-) sèrum

Substrat 3: per l'activitat TAGH neutre (+) sèrum

FIGURA 2.5 LINEALITAT DE L'ACTIVITAT TRIACILGLICEROL HIDROLASA ACIDA EN FUNCIO DEL TEMPS I DE LA CONCENTRACIO DE PROTEINES





giren altres components al sistema de valoració, s'ajustà el volum d'A.D. en la preparació del substrat de forma que les concentracion finals dels components no es veiés afectada. Les concentracions finals dels components es mostren a la taula 2.2.

En alguns experiments s'ha modificat lleugerament la composició del sistema de valoració en el sentit que ja s'indica en la presentació dels resultats corresponents. Es tracte dels primers assaigs on no teníem encara definida la concentració òptima dels diferents constituents.

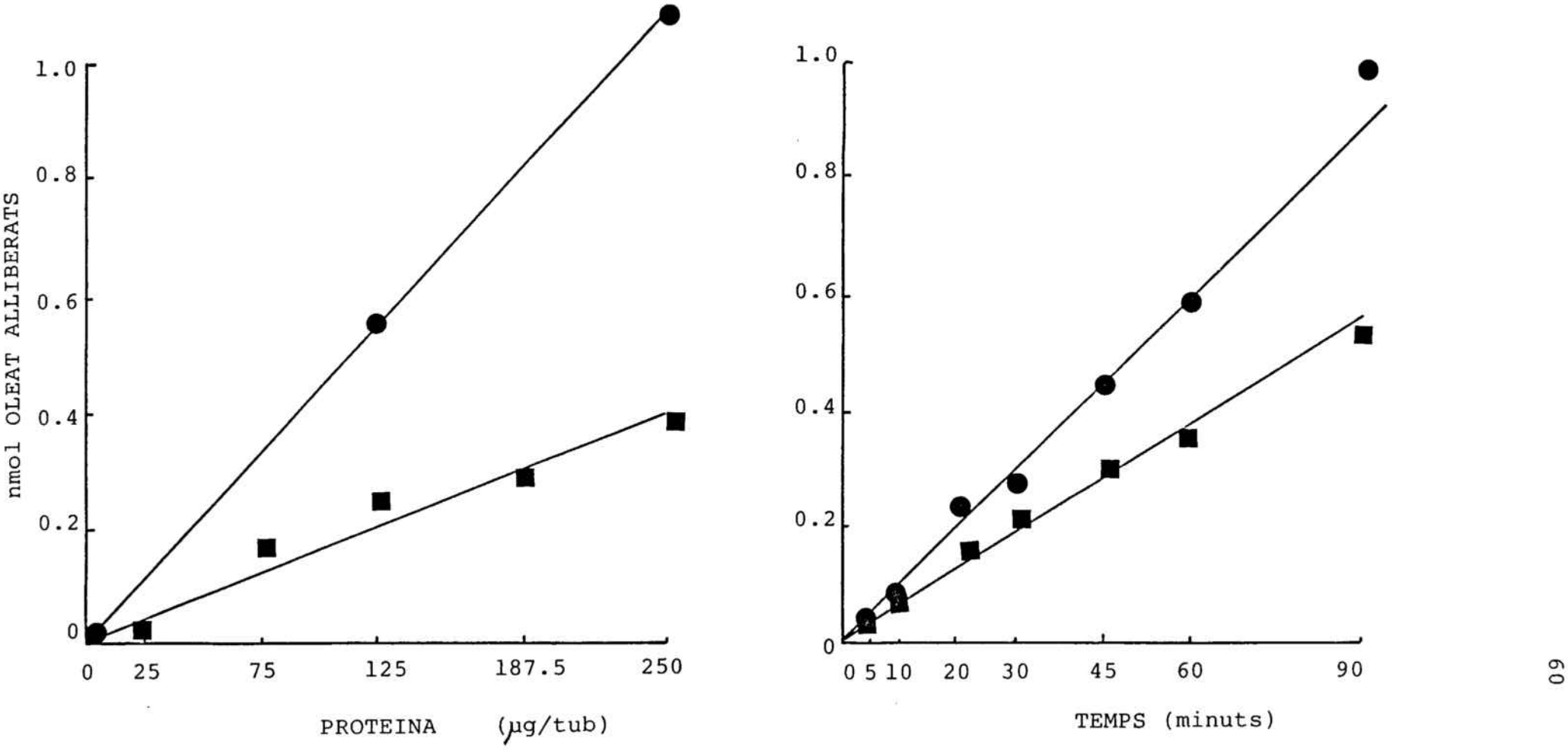
Aquest mètode donà resultats reproduïbles i lineals fins, al menys, 90 minuts i 250 ug proteïna (figura 2.6). Els resultats de totes lesa activitats TAG hidrolases s'expressa normalment com a nanomol de producte format (oleat) per hora d'incubació i per milió de cèl.lules (nmol/h/10^6 cel.).

Modificacions introduïdes a l'utilitzar TOG-H^3

Quan férem els primers experiments amb anticossos anti-LPL, i per tal de disposar d'un marge de DPM suficientment ampli per poder observar inhibicions, incrementàrem l'activitat específica del substrat (TOG). Donat que aquests experiments els començàrem als laboratoris del Dr. M.C. Schotz on utilitzen TOG-H^3 en lloc de l'isòtop amb C^{14}, i a que la forma tritiada és considerablement més barata, des de llavors empràrem sempre l'isòtop tritiat.

Així per la preparació dels substrat 1 (per la determinació de la TAGHA) utilitzàrem una activitat específica de 2.0 mCi/mmol. Pel substrat 2 (per la determinació de la TAGHN(-) sèrum) 4.0 mCi/mmol i no es canvià la del substrat 3 (per la TAGHN (+) sèrum).

FIGURA 2.6 LINEALITAT DE L'ACTIVITAT TRIACILGLICEROL HIDROLASA NEUTRE EN FUNCIO DEL TEMPS I DE LA CONCENTRACIO DE PROTEINES



Qualsevol altre canvi de l'activitat específica dels substrat per algun dels experiments que realitzàrem es farà constar a l'apartat corresponent d'aquesta secció de Materials i Mètodes.

2.2.4.- Fraccionament subcel.lular

Un cop aïllades, les cèl.lules es rentaren dues vegades amb el medi isotònic Ib (HEPES 10 mM, EDTA 1.0 mM, DTT 1.0 mM,sacarosa 0.25 M, pH 7.5) i es guardaren precipitades a -80°C fins el moment de la seva utilització, o bé es processaren immediatament.

El fraccionament subcel.lular el férem per centrifugació diferencial seguint el mètode de Wang i col.laboradors (1977), originalment sdescrit pel fraccionament d'homogenatsd de cor sencere i posteriorment aplicat per altres (Chohan i Cryer, 1979) als homogenats cel.lulars de cardiomiòcits. Un esquema del procediment pot veure's a la figura 2.7.

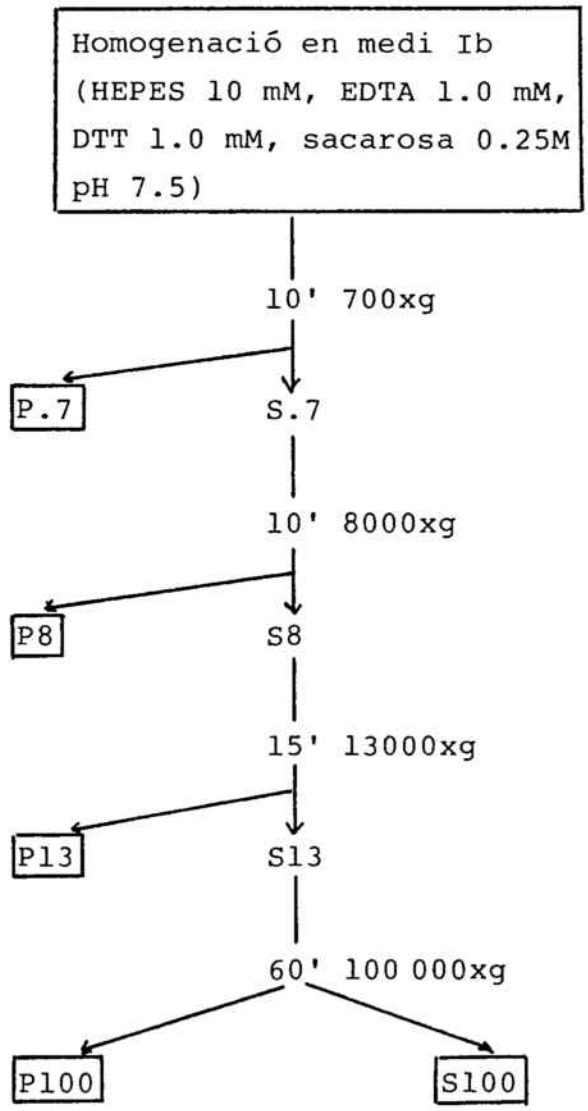
Les cèl.lules varen ésser sonicades 2 x 30 segons a 75 W a 4°C i centrifugades a 4°c per 10 minuts a 700xg. El precipitat (P.7) es resonicà en un volum idèntic a l'original (3-10 ml). El sobrenadant (S.7) es centrifugà primer 10 minuts a 8000xg, després a 13000xg durant 15 minuts i finalment a 100 000xg durant 60 minuts, totes elles a 4°C. Obtenírem, respectivament els P8, P13,i P100, que es resuspengueren en 1-2 ml de medi Ib. Les diferents fraccions (P.7, P8, P13, P100, S100) es guardaren a -80°C fins el moment de la seva valoració.

2.2.5.- Incubacions amb heparina

Per estudiar l'efecte de l'heparina sobre l'alliberament de les diferents activitats TAG hidrolases des de les cèl.lules cap el medi d'incubació, incubàrem en erlemmeyers de plàstic de 25 ml, $7x10^6$ cèl.lules

FIGURA 2.7

ESQUEMA DEL PROTOCOL DE CENTRIFUGACIONS DIFERENCIALS PER L'OBTENCIO DE FRACCIONS SUBCEL.LULARS



en 2.5 ml de solució C (Joklik-MEM suplementat amb 1.2 mM $MgSO_4$, 1.0 mM d,l-carnitina, 1.5 mM $CaCl_2$ i 10 mg/ml albúmina lliure d'àcids grassos, pH 7.4), als que afegírem 0.025 ml d'heparina (1000 Unitats/ml) o 0.025 ml de solució C als controls. La concentració final d'heparina fou de 10 Unitats/ml. Less cèl.lules les incubàrem per 2minuts a 37°C amb agitació orbital de 110 cicles/minut i sota constant oxigenació.(95% O_2/ 5% CO_2). Passat el temps, el contingut dels vials es decantà en tubs de plàstic de 15 ml i es centrifugà 90 segona a 45xg a temperatura ambient. Es recollí el sobrenadant i es guardà a -80°C fins el moment de la determinació de les activitats TAGH. El precipitat fou processat com s'indica a l'apartat 2.2.2.

2.2.6.- Inactivació tèrmica

S'estudià l'efecte de la preincubació de l'homogenat cel.lular a diferents temperatures sobre les activitats TAGH, mesurades posteriorment. tal efecte, en tubs de vidre amb tap de rosca es posaren 5.0 ml de mostra (homogenat cel.lular, fracció no lligada a gels d'heparina-sefarosa i concentrada per ultrafiltració, fracció eluïda amb 1.2 M NaCl dels gels d'heparina-sefarosa),i i s'incubaren en bany termostatitzat a 40°C o 50°C per un període de dues hores.

Als 0, 5, 10, 15, 30, 60 i 120 minuts s'extragueren alíquotes de 0.6 ml que es refredaren ràpidament a 4°C i es portaren a -80°C fins el moment del seu us per la determinació de les activitats enzimàtiques, sempre poques hores després. En alguns experiments les mostres es valoraren immediatament després de la incubació sense que el resultat diferís de l'obtingut en aquells experiments en els que les mostres es congelaren a -80°C.

Paral.lelament a la preincubació a 40°C ó 50°C, es mantingué una mostra a 4°C que serví de control.

Per tal de tenir un marge més ampli de DPM en el que observar les pèrdues d'activitat, en aquells experiments en els que determinàrem les activitats amb TOG-C^{14}, augmentàrem l'activitat específica dels substrats per la determinació de la TAGHA i la TAGHN (-) sèrum al dobler i al triple respectivament (veure taula 2.2).

Obtenció de la constant d'inactivació

A partir de les corbes d'inactivació tèrmica obtingudes en aquests experiments, es calculà la constant d'inactivació per cadascuna de les activitats mesurades i per a cada temperatura estudiada (veure Segel, 1975). Aquesta constant l'obtinguérem a partir de la fòrmula:

$$\text{Log } (R) = -kt + c$$

essent,
R: activitat residual (%) al temps 't'
k: CONSTANT D'INACTIVACIO
t: temps de preincubació (minuts)
c: constant ($\cong$2.0)

Essent aquesta una relaciólienal fins, al menys, els 30 minuts de preincubació. La constant d'inactivació 'k' és, per tant, el pendent de la recta.

2.2.7.- Experiments amb Immunoglobulines G anti-LPL

Aquests experiments varen ésser en col.laboració amb el Dr. M.C. Schotz del Research Service de la Veterans Administration Hospital Wadsworth Center, Los Angeles, Califòrnia, qui ens facilità les seves instalacions per desenvolupar-los en part i ens donà les IgG anti-LPL.

Les IgG anti-LPL havien estat obtigudes a partir de sèrum de cabra injectada amb LPL purificada de cor de rata (Schotz i col., 1977). Les IgG controls, de cabres no tractades, les obtinguérem parcialment del

mateix laboratori i parcialment comercials.

Prèviament a la utilització tant de les IgG anti-LPL, com de les IgG-Pi (controls, no específiques), aquestes es dialitzaren extensivament contra 4 l de tampó fosfats 5 mM, NaCl 15 mM, pH 7.5 a 4°C durant 24 h amb canvi de tampó a les 12 h. Un cop dialitzades es determinà la concentració de proteïnes, després de centrifugar per eliminar material insoluble, i es guardaren alíquotes a -80°C fins el moment del seu us, prèviament al que es recentrifugaren 2 minuts a 15000xg a temperatura ambient.

Establiment de les condicions d'incubació

Com a prova prèvia de l'establiment d'unes con-estandaritzades d'incubació del les IgG amb les mostres, comparàrem diferents possibilitats. Incubàrem en un volum final de 0.1 ml, 0.05 ml d'homogenat cel.lular (0.25 mg prot.) amb 0.05 ml (2.36 mg prot./ml) d'IgG anti-LPL o de tampó fosfats 5 mM, NaCl 15 mM, pH 7.5; bé durant 1h a 0°C (condicions normalmet emprades al laboratori del Dr. Schotz), bé 0, 5 ó 10 minuts a 30°C amb agitació constant de 60 cicles/min. Transcorregut el temps exacte, afegírem 0.3 ml del substrat per la determinació de l'activitat TAGHN (+) sèrum, i es continuà la valoració immediatament a 30°C. Com es despren dels resultats obtinguts, mostrats a la taula 2.3, l'efecte inhibidor de l'anticòs fou el mateix incubant 10' a 30°C que l'observat incubant 60' a 0°C. En tots dos casos hi hagué una inhibició substancial de l'activitat, indicant la validesa d'aquestes IgG pel seu us al experiments que pretenïem dur a terme.

Corbes d'inhibició amb IgG anti-LPL

S'incubaren 0.05 ml de mostra amb diferents volums d'IgG anti-LPL o quantitata equivalesnts en proteïna d'IgG-Pi, en un volum final de 0.1 ml, durant 10 minuts a 30°C amb agitació constat de 60 cicles/min.

TAULA 2.3

EFECTE DE DIFERENTS CONDICIONS D'INCUBACIO DE LES IMMUNOGLOBULINES ANTI-LPL AMB L'HOMOGENAT CEL.LULAR SOBRE LA INHIBICIO DE L'ACTIVITAT LPL

	0°C	30°C		
	60'	0'	5'	10'
Control	802.0	1086.2	1148.1	1238.7
IgG anti-LPL	225.0	566.3	355.6	314.1
Activitat Residual (%)	28	52	31	25

activitat en nmol/h/10^6cel.

Transcorregut aquest temps s'afegiren 0.3 ml de substrat per la determinació, bé de la TAGHN (-) sèrum, bé de la TAGHN (+) sèrum, continuant la incubació per altres 30 minuts a 30°C. Posteriorment es continuà tal com s'indica a l'apartat 2.2.3.

En el primer experiment on comprovàrem la validesa de la nostre hipòtesi de treball en la que fonamentàvem aquest grup d'experiments, utilitzàrem com a mostra la LPL alliberada amb heparina perfundida durant 30 segona a cors de rates dejunades de 48h (Ben-Zeev i col., 1981), mostre gentilment donades per J. Nikazy del laboratori del Dr. Schotz.

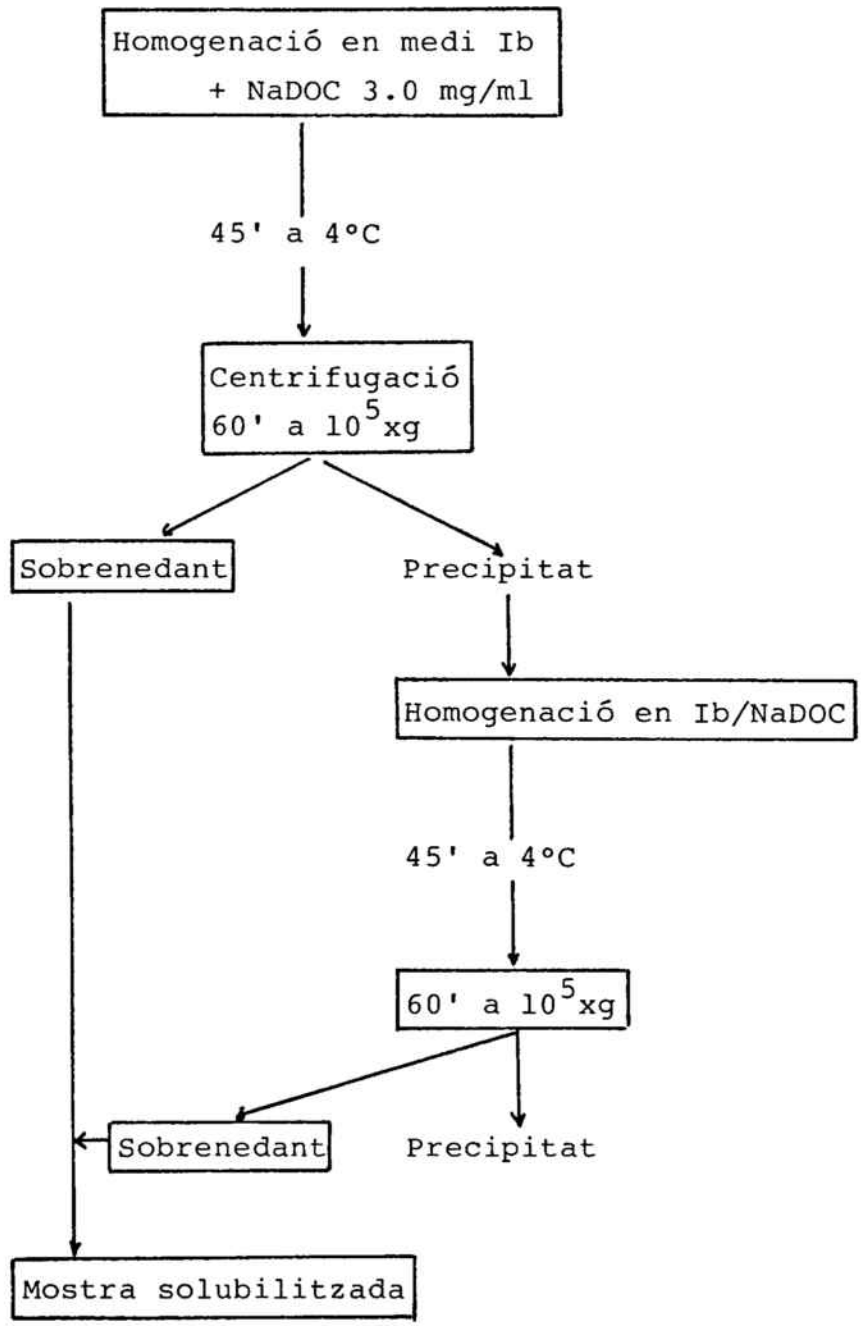
Dels diferents lots d'anticossos dels que disposaven , inicialment utilitzàrem aquell que tenien un títol més elevat amb les nostres mostres (lot que anomemàrem Ab_1). En exhaurir aquest lot, haguérem de continuar els experiments amb altre (que anomenàrem Ab_2) amb títol més baix. Mentre que d'Ab_1 calgueren 4.0 ± 0.8 ug IgG/n molh^{-1}LPL (n=4) per tenir un grau d'inhibició a partir del que l'addició de més IgG no augmenta la inhibició (el que anomenem "quantitat saturant d'IgG-anti-LPL"), calguren 35.8 ± 1.2 ug IgG/n molh^{-1} LPL (n=2) d'Ab_2 per assolir el mateix grau de "saturació". Malgrat aquesta diferència de títol, els dos lots d'anticossos mostraren el mateix patró de comportament i graus d'inhibició màxima de les activitats TAGH neutres. Tot i això, a l'hora dels resultats, indiquem quins experiments han estat fets amb un lot i quins amb l'altre.

2.2.8.- Solubilització de les activitats TAGH

Les mostres que havien d'éser passades a través de les columnes dels gels d'heparina-sefarosa foren prèviament solubilitzades seguint el protocol que es decriu a la figura 2.8.

FIGURA 2.8

ESQUEMA DEL PROTOCOL DE SOLUBILITZACIO DE LES ACTIVITATS TRIACILGLICEROL HIDROLASES



Sonicàrem les cèlules ($6x10^6$cel./ml), 4 x 30 segons a 200W a 4°C en el medi Ib suplementat amb deoxicolat sòdic 3.0 mg/ml (7.2 mM). Un cop sonicada la mostra es guardà a 4°C durant 45 minuts, temps en el que passà d'un color tèrbol a un altre més transparent. Es centrifugà llavors a 10^5xg durant 60 minuts a 4°C i el sobrenant es guardà a 4°C. El precipitat es resonicà en un volum 1/2 de l'inicial amb el mateix mwdi Ib-NaDOC 3 mg/ml. Igualment fou incubat 45 minuts a 4°C, transcorregutsd esl quals es tornà a centrifugar a 10^5xg durant 60 minuts a 4°C; finalment es combinaren els sobrenadants.

2.2.9.- Cromatografia d'afinitat en heparina-sefarosa

Es ben coneguda l'afinitat de la LPL per l'heparina (Olivecrona i col., 1977). Aquesta propietat és la que portà a Egelrud i Olivecrona (1972) a utilitzar columnes d'heparina-sefarosa com a pas principal en el procés de purificaciói de la LPL. Nosaltres hem emprat aquesta tècnica per resoldre la identitat de les activitats TAGH neutres.

Ferem servir dos protocols lleugerament difernts aplicata a columnesd de dues mides distintes.

Columnes de 1.4 x 7.5 cm

Es rentaren 10 ml de gel d'heparina-sefarosa CL-6B amb 100 ml de tampó barbital 5 mM, NaCl 0.15 M, glicerol 30% (vol/vol), pH 7.5, i s'empaquetaren en una columna de 1.4x7.5 cm, procés que realitzàrem a 4°C, així com també es feu a 4°C tota l'utilització posterior de les columnes.

En el moment de la utilització de les columnes, i abans d'aplicar la mostra, es tornà rentat amb 50 ml de tampó barbital 5 mM, NaCl 0.15 M, glicerol 30%, pH 7.5. Per aquestes columnes es passà normalment de 20 a 40 ml de mostra solubilitzada, que prèviament portàrem a 0.15 M NaCl, que corresponia a una mostra

original de $40\text{-}60x10^6$ cèl.lules. La mostra s'plicà a un flux de 15 ml/h. Un cop entrat tot el volum de la mostra a la columna, es rentà amb 100 ml de barbital 5 mM, NaCl 0.15 M, glicerol 30%,pH 7.5 al mateix flux de 15 ml/h, per tal d'eluir la proteïna no lligada al gel.

Per l'elució de la proteïna lligada específicament, s'incrementà la concentració de NaCl en el tampó formant un gradient discontinu, En alguns casos, com el perfil d'elució mostrat a la figura 3.18, es feu molt progressivament. Un cop però, coneixíem on sortien les activitats, eluírem amb dues úniques passes. Una primera amb NaCl 0.75 M en el mateix tampó barbital-glicerol. Passàrem un volum de 100 ml a un flux de 15 ml/h. El darrer eluït el férem amb altres 100 ml de tampó barbital-glicerol amb NaCl 1.2 M, correguts al mateix flux.

Als primers experiments es recolliren fraccions des de l'inici de l'aplicació de la mostra. Posteriorment però, no es començà fins a l'inici de l'elució amb NaCl 0.75 M, recollint-se en una única fracció tot l'eluït a 0.15 M NaCl. Les fraccions que es recolliren en el col.lector foren de 5.0 ml de volum.

Tot i tenint glicerol 30% en els tampons d'elució com a estabilitzador de l'activitat LPL (Twu icol., 1976) processàrem les mostres en intervals no superiors a les dues hores. Es destinaren 2 ml per a la determinació de proteïnes i als 3 ml restants sel's afegí 0.03 ml d"albúmina 100 mg/ml, donant una concentració final de proteïna de $\simeq$ 1.0 mg/ml. Immediatament es guardaren a -80°C fins a la seva utilització. La presència d'albúmina 1 mg/ml i glicerol 30% estabilitzà l'activitat eluïda de la columna de forma que la congelació a -80°c no provocà cap pèrdua d'activitat, conservant-se més d'un 90% d'aquesta durant un temps de, al menys, un mes a aquestes baixes temperatures.

Fins i tot una mateixa alíquota podia ésser congelada i descongelada vàries vegades (3-5) sense que tampoc es perdés més d'un 15% d'activitat.

Quan es recollí en una única fracció la proteïna no lligada a la columna, aquesta fracció es concentrà a 1/4 del volum per filtració a pressió.

Un cop utilitzada la columna, es re-equilibrà passant 100 ml de tampó barbital 5 mM, NaCl 0.15 M, glicerol 30%, pH 7.5. La mateixa columna la utilitzàrem unes 15 vegades , regenerant-la cada 5 vegades passant alternativament 100 ml d'acetat 5 mM 0.5 M NaCl, pH 4. 5 i de TRIS- HCl 5 mM, 0.15 M NaCl, pH 8.5.

Columnes de 0.7 x 2.5 cm

En alguns experiments, especialment aquells descrits al principi de la part III de la secció de Resultats i Discussió, empràrem columnes més petites per tal de poder obtenir mostres parcialment purificades més ràpidament. S'empaquetà 1.0 ml de gel en una columnas de 0.7 x 2.5 cm i s'equilibrà amb el mateix tampó barbital 5 mM, NaCl 0.15 M, glicerol 30%,pH 7.5.

Per aquestes columnes es passà un volum de mostra de 1.0-1.5 ml. Les rentàrem, després de passades les mostres, amb 5 ml de barbital-glicerol NaCl 0.15 M, que recollírem en una única fracció. Posteriorment s'eluí directament amb altres 5 ml de barbital-glicerol contenint ara 1.2 M NaCl, que també recollírem en una única fracció a la que afegírem 0.05 ml d'albúmina 100 mg/ml i que guardàrem congelada a -80°C. La primera fracció, la que contenia tota la proteïna no retinguda pel gel, la concentràrem fins a un volum de 2.0 ml per ultrafiltració a pressió. La columna la correguérem au un flux de 10 ml/h, de forma que tot el procés no durà més de 1h 30 minuts.

2.2.10.- Electroforesi en gels de poliacrilamida

Seguírem el mètode de Laemmli (1970) per fer les electroforesis en gradients de gels de poliacrilamida (7.5-20%)(en plaques de 12x14x0.15 cm), en presència de dodecil-sulfat-sòdic i 2-mercaptoetanol.

Per la formació del gradient preparàrem una solució al 7.5% d'acrilamida i altre al 20%. La solució al 7.5%la férem afegint, per aquest ordre, 4.0 ml de TRIS-HCl 1.5 M, SDS 4 mg/ml pH 8.8, 4.0 ml d'una solució d'acrilamida 30%, bis-acrilamida 0.8%, 0.22 ml de glicerol pur, 7.7 ml d'A.D., 0.08 ml de persulfat amònic 3.3% i 0.007 ml de TEMED. La solució al 20% d'acrilamida la preparàrem afegint, també per aquest ordre, 4 ml del mateix tampó TRIS-HCl, 10.65 ml de la solució d'acrilamida/bis-acrilamida, 0.42 ml de glicerol, 0.85 ml d'A.D. i, finalment, els mateixos volums de persulfat amònic i de TEMED que par la solució anterior. Després d'agitar les dues solucions vigorosament, les posàrem al formador de gradients, el qual aplicàrem, a un flux de 100 ml/h, a l'espai contingut entre les dues plaques de vidre i els dos separadors de plàstic (de 0.15 cm de gruix), montats sobre l'aparell soportador del gel. Un cop format el gradient posàrem una capa d'isobutanol entre el gel i l'aire per tal d'obtenir una línea totalment recta en la part superior del gel.

Un cop polimeritzat el gel separador, rentàrem l'isobutanol i aplicàrem el gel concentrador (5% d'acrilamida). Aquest el preparàrem afegint a 2.5 ml de TRIS-HCl 0.5 M, SDS 4 mg/ml pH 6.8, 1.5 ml de la solució d'acrilamida/bis-acrilamida que ja havíem emprat anteriorment, 6 ml d'A.D. , 0.03 ml de persulfat amònic 10% i 0.01 ml de TEMED. Immediatament posàrem la pinta formadora de pous (sempre empràrem la de 10 pous), i deixàrem polimeritzar. Els gels els férem servir immediatament després de preparats.

Un cop preparat, posàrem el gel de forma vertical a l'interior de la cubeta inferior, on prèviament ha-i víem posat 4.0 l del tampó TRIS 25 mM, glicina 192 mM, SDS 1.0 mg/ml, pH 8.6. A la cubeta superior hi posàrem 1.0 l del mateix tampó. Quan la cubeta fou muntada, aplicàrem les mostres amb mcroxerina.

Correguérem mostres d'homogenats cel.lulars, de solubilitzats amb NaDOC, de la fracció no retinguda pels gels d'heparina-sefarosa i de la fracció eluïda amb 1.2 M NaCl. Per tal d'eliminar les sals d'aquesta darrera fracció, dialitzàrem 30 ml contra 4 l de NH_4HCO_3 10 mM pH 7.4 durant 48 h amb canvi de tampó a les 24h. Posteriorment els lifilitzàrem i resuspenguérem en en volum de 0.1 ml de medi Ib. Així obtinguérem una concentració final de proteïna de 2 mg/ml (empràrem una mostra a la que no havíem afegit albúmina doncs no ens calia determinar l'activitat que es perderia en el procés de diàlisi i liofilització, per altre banda). També l'homogenat, el solubilitzat i la fracció no lligada al gel d'heparina-sefarosa els portàrem fins a una concentració de proteïnes de 2 mg/ml amb medi Ib. Abans d'ésser aplicades al gel, les mostres foren bu-llides durant 2 minuts a 100°C amb un volum igual de TRIS-HCl 50 mM, SDS 10 mg/ml, blau de bromofenol 0.1 mg/ml, glicerol 30%,2-mercaptoetanol 1%, pH 6.8.

El gel el correguérem a temperatura ambient i a intensitat constant de 36 mA/del de 1.5mm gruix. L'electroforesi la donàrem per acabada quan el blau de bromofenol arribà al límit de la placa, aproximadament 3 hores després de començada. Tenyírem llavors el gel amb 250 ml d'una solució de metanol 45%, àcid acètic 10%, blau de Coomassie R-250 0.6 mg/ml, durant 4-6 hores a temperatura ambient i sota constant agitació. La decoloració la férem amb àcid acètic 10% durant 12 hores. Un cop fotografiat, i per la seva consevació, assecàrem el gel a 80°C i al buït.

Per la determinació del pes molecular de les bandes observades correguérem sempre a cada gel les següents proteïnes de pes molecular conegut:

PROTEINA	PES MOLECULAR (kDa)
Miosina	205
-Galactosidasa	116
Glicogen fosforilasa b	97.4
Albúmina sèrica bovina	66
Albúmina d'ou	45
Anhidrasa carbònica	29

El pes molecular aparent de les bandes que ens interessaren el calculàrem a partir de la relació lineal existent entre els Rf de cada banda i el pes molecular (figura 2.9).

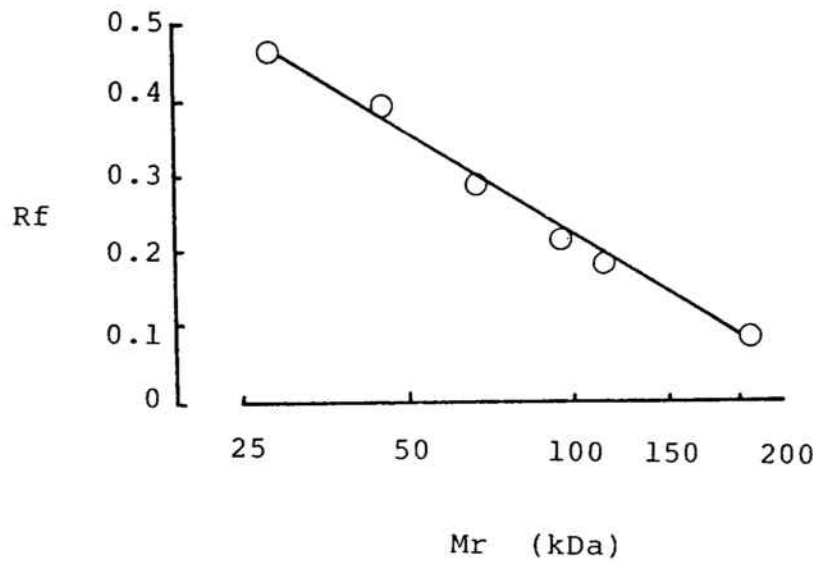
2.2.11.- Transferència electroforètica a filtrs de nitrocel.lulosa. Reconeixement immunològic de la LPL ("Immunoblotting")

Per a la identificació de les bandes corresponents a la LPL en els gels férem un "immunoblotting" adaptant una modificació (Ngai i col., 1985) de la tècina descrita per Burnett (1981) d'adaptació als gels correguts en presència de SDS del mètode de transferència de proteïnes a filtres de nitrocel.lulosa prèviament descrit per Towdin i col.laboradors (1979).

Després de correguts els gels i sense tenyir-los, els embeguérem amb 100 ml de tampó de transferència (TRIS 25 mM, glicina 192 mM, SDS 1.0 mg/ml, metanol 20% pH 8.3) durant 1h. Paral.lelament, filtres de nitrocel.lulosa (15x15 cm) varen ésser embeguts durant 30 minuts amb A.D. i altres 30 minuts amb el tampó de transferència. Tot seguit es montà la cèl.lula de transferència. Col.locàrem el gel sobre el filtre de nitrocel.lulosa i la unitat gel-filtre la posàrem, entre dos

FIGURA 2.9

PATRO PER LA DETERMINACIO DEL PES MOLECULAR DE LES BANDES DELS GELS DE POLIACRILAMIDA



r = -0.993

Log (Mr) = -2.0 Rf + 5.4

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE BIOLOGIA
BIBLIOTECA

papers de filtre Whatmann-1 (15x15 cm) embeguts en el tampó de transferència, dintre de la cèl.lula, i orientat el filtre cap a l'ànode i el gel ca el càtode. Posàrem la cèl.lula dintre de la cubeta on col.licàrem uns 3.5 l del tampó de transferència. Aquesta es realitzà durant 16h a 4°C i a corrent constat de 40V.

Un cop transferides les proteïnes del gel al filtre de nitrocel.lulosa, els espais buïds d'aquests foren ocupats incubant-el amb 40 ml d'albúmina 30mg/ml en tampó TRIS-salí (TRIS-HCl 10 mM, NaCl 0.154 M, pH 7.4) durant 1h a 40°C amb agitació ocassional. L'albúmina no adsorbida es rentà a temperatura ambient amb tres incubacions,de 5 minuts cada una, amb 40 ml de TRIS-salí.

A continuació incubàrem el filtre de nitrocel.lulosa amb l'anticos primari en 40 ml de TRIS-salí als que afegírem una quantitat suficient de IgG anti-LPL o IgG-Pi per tenir una concentració de 50 ug/ml. La incubació la férem a 40°C durant 2h amb agitació ocassional. L'excés d'IgG el rentàrem, a temperatura ambient, 5 vegades amb 50 ml cada una de TRIS-salí durant 5 minuts.

La visualització de les bandes on s'havia lligat l'anticòs primari la férem emprant un segon i un tercer anticòs, ambdós amb peroxidasa de raba conjugada. La utilització del tercer anticós calgué per una millor visualització de les bandes, de forma que pogessin ésser fotografiades. Incubàrem 40 ml de TRIS-salí contenint 0.08 ml de la solució d'anticòs secundari (IgG anti-IgG de cabra, obtingudes en conill) durant 2h a 40°C amb agitació ocassional. L'excés del segon anticòs el rentàrem de la mateixa forma de com ho havíem fet per rentat l'excés d'anticòs primari. Finalment incubàrem amb altres 40 ml de TRIS-salí contenint ara 0.06 ml de l'anticòs terciari (IgG anti-IgG de conill, obtingudes en cabra). Aquesta darrera incubació la férem durant 16h a temperatura ambient i amb agitació constat. Després

de rentar l'excés d'anticòs terciari, segunt el mateix protocol.que pel primari i secundari, visualitzàrem les bandes incubant el filtre amb 50 ml de H_2O_2 0.015% (v/v), 4-clor-1-naftol 0.5 mg/ml, metanol 16.7%; produïnt-se la precipitació del clor-naftol oxidat (producte colorat) sobre el complex Antigen-Ab_2'-Ab_p''-Ab_p''' (p=peroxidasa). Reacció que es donà instantàniament.

2.2.12.- Incubacinons de les cèl.lules amb Isoproterenol

Per estudiar l'efecte de l'isoproterenol (ISO) sobre les activitats TAG hidrolases, les cèl.lules, un cop aïllades, es rentaren tres vegades amb tampó Krebs-Henseleit bicarbonat albúmina (KHBA, NaCl 118 mM, KCl 4.7 mM, $MgSO_4$ 1.2 mM, KH_2PO_4 1.2 mM $NaHCO_3$ 25 mM, $CaCl_2$ 1.5 mM, glucosa 10 mM, albúmina lliure d'àcids grassos 10 mg/ml, gassificat O_2 95%/CO_2 5% pH 7.4), i s'ajustaren a una concentració de 10^6cel./ml. Posàrem aliquotes de 4 ml en erlenmeyers de plàstic de 25 ml i la incubació començà en afegir 0.04 ml d'ISO 1.0 mM (concentració final 0.01 mM) o de KHBA. Un cop transcorreguts els 20 minuts a 37°C i sota constant oxigenació de la incubació, les mostres es processaren segons convingués a l'experiment concret que es fes.

Quan s'estudià l'efecte de l'heparina sobre l'alliberament d'activitats TAG hidrolases al medi, posàrem en erlenmeyers aliquotes de 2.0 ml de cèl.lules i 0.02 ml d'heparina 1000 Unitats/ml (concentració final 10 Unitats /ml) o de KHBA, i/o 0.02 ml d'ISO 1.0 mM ó KHBA. També els incubàrem durant 20 minuts a 23°C ó a 37°C sota constant oxigenació i agitació.

Per a la determinació de la producció de glicerol, 3 ml de la suspensió cel.lular es posà amb 0.3 ml de $HClO_4$ 70%, donant una concentració final d'àcid de 6.4%. Es refredà i centrifugà 5 minuts a 1000xg. El sobrenadant el neutralitzàrem amb K_2CO_3 5 N. Després de centrifugar uns 20 minuts a 1000xg, el sobrenadant

el guardàrem a -80°C fins que determinàrem el contingut de glicerol.

Immediatament després d'agafar una alíquota per a la determinació delglicerol, dues alíquotes de 0.5 ml cadascuna les centrifugàrem durant 10 segons a 15000xg en microcentrífuga quin rotor havíem refredat prèviament al congelador de -80°C. Tant el sobrenadant com el precipitat els congelàrem ràpidament amb N_2 líquid. Des de que agafàvem l'alíquota fins que introduíem els vials en el N_2 líquid no passà mai més de 25-30 segons. Posteriormentguardàrem totes les mostres a -80°C fins el moment del seu processament bé per la determinació de l'activitat glicogen fosforilasa, bé de les activitats TAGH .

En alguns experiments tot el contingut dels erlenmeyers el centrigugàrem durant 90 segons a 45xg a temperatura ambient i el precipitat el congelàrem amb N_2 líquid, guardant-el posteriorment a -80°C fins el moment del seu processament. Aquestes mostres les utilitzàrem per la determinació de la proporció de l'activitat soluble i particulada. Per això resuspenguérem el precipitat en el medi isotònic Ib i el sonicàrem 2 x 30 segons a 75 Watt a 4°C. L'homogenat el centrifugàrem directamenta a 10^5xg durant 1h a 4°C. El precipitat el resuspenguérem en un volum igual a l'inicial i, juntament amb el sobrenadant, els congelàrem a -80°C fins el moment de la seva utilització per la determinació de les activitats TAG hidrolases.

Els precipitats que serviren per la determinació de les activitats TAGH els resuspenguérem en medi Ib just abans de la seva determinació, i els sonicàrem 2 copss a 200W durant uns 30 segons cada mostra.

2.2.13.- Experiments amb rates diabètiques

Per estudiar l'efecte de la diabetes aguda sobre

les activitats TAGH, a rates normals d'uns 270 g de pes corporal se'ls administrà de forma intravenosa 100 mg/Kg p.c. d'estreptozotocina en un volum de 0.2-0.6 ml de citrat 50 mM, NaCl 0.154 M, pH 4.5. Els animals que serviren de controls foren injectats amb un volum idèntic del tampó citrat-salí. De 3 a 4 dies després els animals foren sacrificarts per ddecapitació. Del coll es recollí en tubs freds heparinitzats i del cor s'aïllaren els miòcits pel mètode descrit a l'apartat 2.2.1 amb la modificació introduïda per Kenno i Severson (1985) per l'aïllament de cardiomiòcits de rates diabètiques. Es basa en que, per raons desconegudes, els miòcits de cors de rates diabètiques són meys tolerants al calci.De forma que per obtenir viabilitata semblants a les d'animals controls cal reduir la concentració de Ca^{2+} als tampons tant dee l'aïllament com als de les incubacions posteriors. Com Kenno i Severson (1985), nosaltres la baixàrem de 1.5 mM a 0.75 mM.

Un cop aïllades les cèl.luless, aquestes es processaren, es fraccionaren i les activitats TAGH es determinaren tal com s'ha indicat als apartats 2.2.2, 2.2.4 i 2.2.3 respectivament.

Igualment, alíquotes de 2.0 ml de cèl.lules (10^6cel./ml) les incubàrem a 23°C en presència o absència d'heparina 10 Unitats/ml durant 20 minuts sota constant oxigenació i agitació. El sobrenadant i precipitat cel.lular (90 segons a 45xg) els guardàrem a -80°C fins el moment de la seva utilització, moment en el que el precipitat es resuspengué amb medi Ib i el sonicàrem 2 x 30 segons a 200 W a 4°C.

2.2.14.- Altres mètodes

Proteïnes

El contingut en proteïnes de les diferents mostres el determinàrem pel mètode de Robrish i col.laboradors

(1978) basat en la producció de compostos altament fluorescents, derivats del O-ftaldialdèhid, en reaccionar aquest amb amines primàries en presència de 2-mercaptoetanol.

A un volum de fins 1.0 ml de mostra o estandard (fins a 50 ug d'albúmuna sèrica bovina), s'afegiren 3.0 ml de reactiu (O-ftaldialdèhid 0.8 mg/ml en K_3BO_3 0.14 M, Brij-35 0.1% (p/v), 2-mercaptoetanol 0.2% (v/v) pH 9.7). S'incubà durant,al menys, 30 minuts a temeratura ambient i es llegí fluorescència a una exitació de 340 nm i una emissió de 455 nm a un rang de 0.1. Les mostres i patrons es feren per duplicat. La relació entre proteïna i fluorescència fou lineal en el marge de concentracions estudiat (figura 2.10) i sufientment sensible com per determinar valors de 1.0 ug/ml.

N-acetil-β-glucosaminidasa

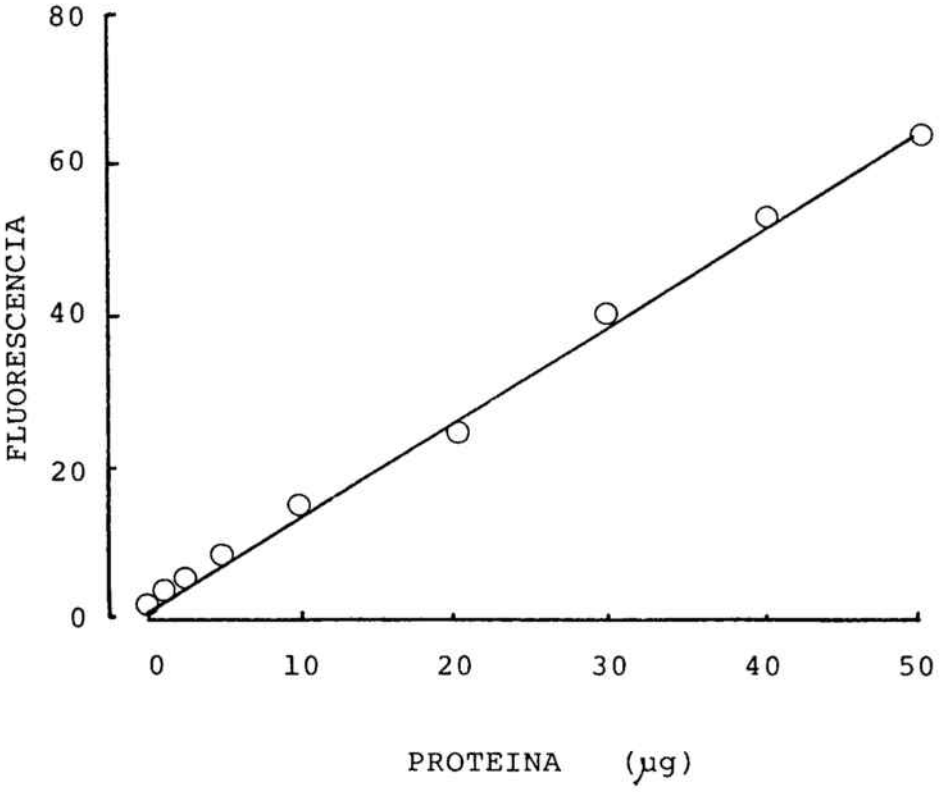
Es determinà l'activitat N-acetil- -glucosaminidasa a les diferents fraccions subcel.lulars seguint el mètode de Brecher i col.laboradors (1977).

A 0.02 ml de mostra s'afegiren 0.02 ml de tampó citrat 0.1 M,fosfat disàdic 0.2 M pH 4.0 i s'inicià al reacció afegint 0.1 ml de substrat (4-metil-umbel.liferil-2-acetamida-2-desoxi- -D-glucopiranòsid 0.5 M). La incubació durà 30 minuts a 37°C i l'aturàrem amb 2.86 ml de glicina 2 M pH 10.5. Els blancs els férem afegint l'enzim després de la glicina.

L'estandard la preparàrem afegint quantitats creixents de 4-metil-umbel.liferil en lloc de mostra. Es quantificà la fluorescència a una exitació de 325 nm i a una emissió de 430 nm, a un rang de 0.1. A la figura 2.11 es mostra la relació entre quantitat de 4-metil-umbel.liferil i fluorescència. en el marge estudiat la relació fouu perfectament lineal. Tant less mostres com les estandards les valoràrem per

FIGURA 2.10

PATRO PER LA QUANTIFICACIO DE PROTEINES

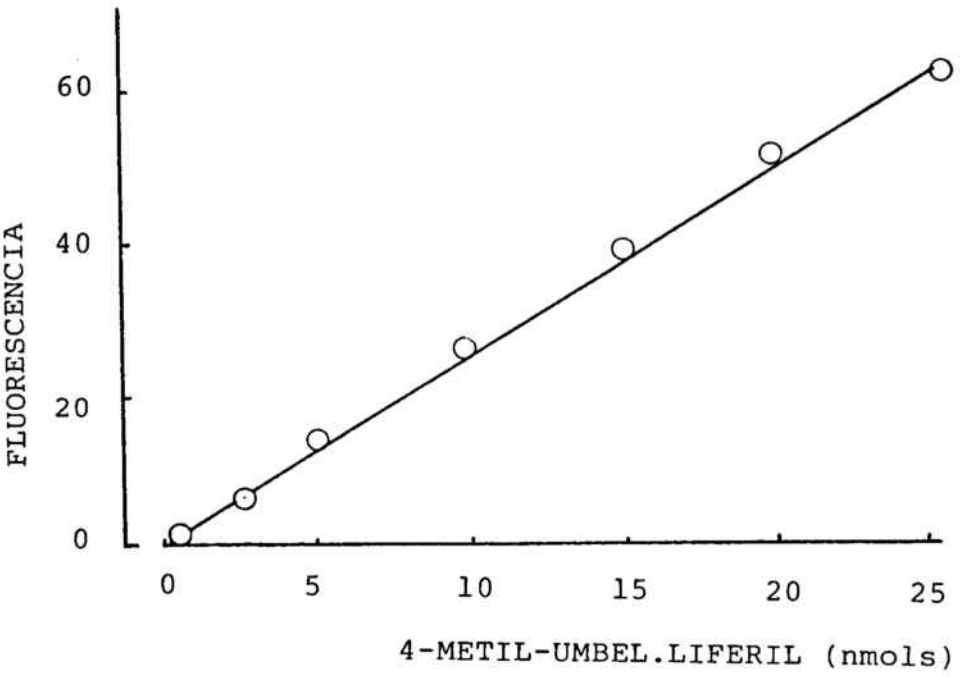


r = 0.9987

µg = 0.78 F - 1.00

FIGURA 2.11

PATRO PER LA DETERMINACIO DE L'ACTIVITAT N-ACETIL-β-GLUCOSAMINIDASA



r = 0.9994

nmol = 0.41 F - 0.34

duplicat.

Glicerol

El contingut de glicerol als sobrenedants neutralitzats del desproteïnitzat amb $HClO_4$ es quantificà fl fluorimètricament pel mètode de Davison i Karjala (1970).

A 1.0 ml de mostra o estandard afegírem 2.0 ml de NAD 4.52 mM en K_2CO_3 0.1 M pH 10.0 i 1.0 ml de glicerol deshidrogenasa (0.1 Unitat/ml en fosfats 1.25 mM pH 7.5). Als 90 minuts exactes llegírem la fluorescència a una exitació de 350 nm i una emissió de 460 nm, a un rang de 3. L'estandard la preparàrem afegint quantitats creixents de glicerol (0-50 n mol) d'una solució mare 10 mM. El volum l'ajustàrem amb KHBA desproteïnitzat amb $HClO_4$ i neutralitzat amb K_2CO_3.

A la figura 2.12 es mostra la relació entre el contingut en glicerol i unitats de fluorescència. Tant l"estandard com les mostres les valoràrem per duplicat.

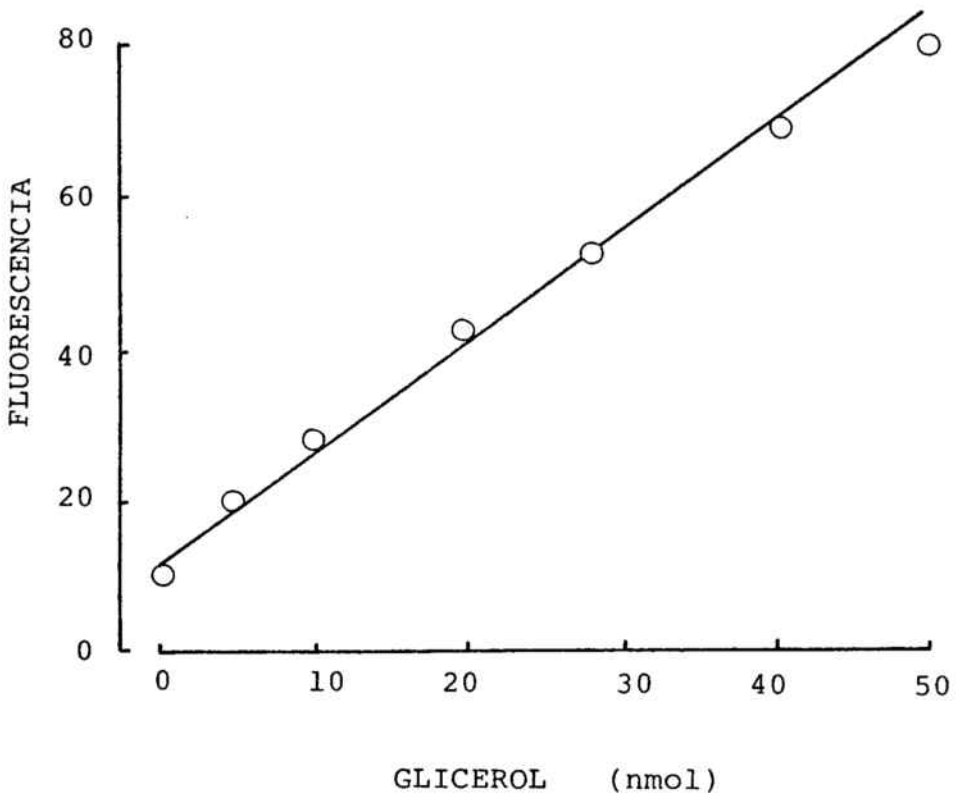
Glicogen fosforilasa

L'activitat de la glicogen fosforilasa ($\pm$ AMP) en homogenats cel.lulars, la determinàrem en la direcció fisiològica de degradació de glicogen, seguint una lleugera modificació del mètode de Hardman i col.laboradors (1965). Segons aquest, la glucosa-1-fosfat alliberada per acció de la glicogen fosforilasa, es quantificada fluorimètricament per acoblament de la reacció de la fosfoglucomutasa i la glucosa-6-fosfat deshidrogenasa.

El precipitat cel.lular destinat a aquesta valoració fou resuspés en un volum apropiat per donar una concentració final de $0.5x10^6$cel./ml, amb tampó glicerol-2-fosfat 40 mM, 2-mercaptoetanol 40 mM, NaF 10 mM, albúmina 1.0 mg/ml pH 6.8. Fou llavors sonicat a 200 W

FIGURA 2.12

PATRO PER LA DETERMINACIO DE GLICEROL



r = 0.9985

nmol = 0.69 F - 8.78

durant 2 x 30 segons a 4°C.

A 0.005 ml de mostra (uns 12.5 ug de proteïna) s'afegíren 0.05 ml de substrat (glicogen 10 mg/ml en tampó fosfat potàssic 50 mM, albúmina 1.0 mg/ml pH 6.8 en presència o absència de AMP 2.0 mM) i s'incubà 10 minuts a 30°C. Aquesta primera reacció s'aturà afegint 0.005 ml de HCl 0.7 M. Els blancs els férem afegint la mostra després del HCl.

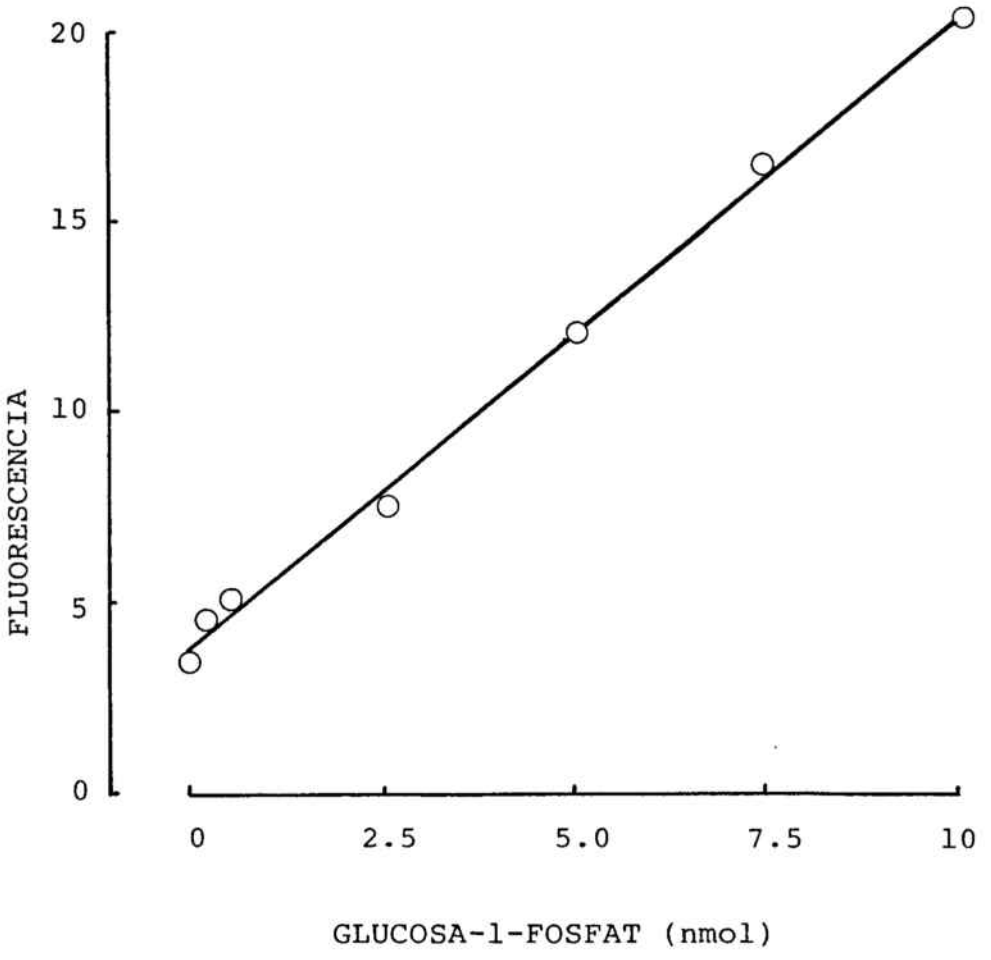
Després de, al menys, 2 minuts a 30°c, s'afegiren 0.25 ml del reactiu de quantificació de la glucosa-1-fosfat alliberada (Imidazol 100 mM, acetat magnèsic 2.0 mM, NADP 0.25 mM, pH 7.4, contenint 20 unitats de fosfoglucomutasa i 35 unitats de glucosa-6-fosfat deshidrogenasa). Deixàrem reaccionar durant 10 minuts a 30°C i afegírem 2.0 ml de tampó carbonat/bicarbonat sòdic 20 mM, EDTA-Na_2 1.0 mM pH 10.0. Immediatament llegírem fluorescència a una exitació de 365 nm i a una emissió de 440 nm a un rang de 3.

Per la quantificació de la glucosa-1-fosfat es feu una estandard amb quantitats creixents de glucosa-1-fosfat (0-10 nmols), que posàrem en un volum de 0.005 ml i als que afegírem els 0.05 ml del substrat perr la reacció de la glicogen fosforilasa i que incubàrem de forma paral.lela a les mostres. Igualment els hi afegírem el reactiu per la quantificació de la glucosa-1-fosfat i llegírem la fluorescència. Tant la patró com les mostres les valoràrem per duplicat.

Sota les nostres condicions, la relació entre glucosa-1-fosfat i fluorescència fou lineal (figura 2.13). Aquesta reacció de transformacióo fins a 6-fosfogluconat fou molt ràpida donc comprovàrem que ja als 2 minuts 30 segons d'afegit el reactiu la reacció havia arribat a l'equilibri per qualsevol concentració inicial de glucosa-1-fosfat (resultats no mostrats). Igualment comprovàrem que la presència de AMP 2.0 mM

FIGURA 2.13

PATRO PER LA QUANTIFICACIO DE GLUCOSA-1-FOSFAT



r = 0.9949

nmol = 0.59 F - 2.15

en el primer substrat no afectava la fluorescència produïda, de forma que no calgue preparar dues estandards diferents (amb i sense AMP).

Un cop demostrada la linealitat de la quantificació del producte, comprovàrem que la reacció de la glicogen fosforilasa, sota les nostres condicions, fos lineal amb el temps d'incubació i la quatitat de proteïna (figures 2.14 i 2.15). Les condicionsd que després empràrem (10 minuts i 12.5 ug prot.) entraren dintre dels marges de linealitat, tant per l'activitat (-) AMP com (+)AMP.

Glucosa plasmàtica

La sang recollida als tubs heparinitzats en el moment de l sacrifici dols animals diabètics i els deus controls, la centrifugàrem 30 minuts a 1000xg a 4°C. El plasma obtingut el desproteïnitzàrem pel mètode de Somogyi (1945), afegint 1.4 ml d'A.D.freda a 0.2ml de plasma i, tot seguit, el mateix volum de $ZnSO_4$ 0.11 M i de $Ba(OH)_2$ saturat. El sobrenedant desproteïnitzat, després de centrifugar a 1000xg a 4°C durant 15 minuts, el guardàrem a -20°C fins el moment de la seva utilització.

La concentració de glucosa al sobrenedant desproteïnitzat la determinàremc pel mètode de Hugget i Nixon (1957), acoblant les reaccions de la glucosa oxidasa i la peroxidasa, amb el dihidroclorur d'o--dianisidina com a acceptor d'oxigen. Compost qué, un cop oxidat, presenta color groc en medi àcid i pot ésser quantificat espectrofotomètricament per absorció a 415 nm.

A 0.1 ml de tampó fosfat potassic 0.2 M pH 7.4, afegírem 0.025 ml de mostra o de diferents volums d'estandard (fins a 20 ug de glucosa), portant tots els tubs fins a un volum final de 0.2 ml amb A.D.. Afegí-

FIGURA 2.14 LINEALITAT EN FUNCIO DEL TEMPS I LA PROTEINA DE L'ACTIVITAT GLICOGEN FOSFORILASA A (-AMP)

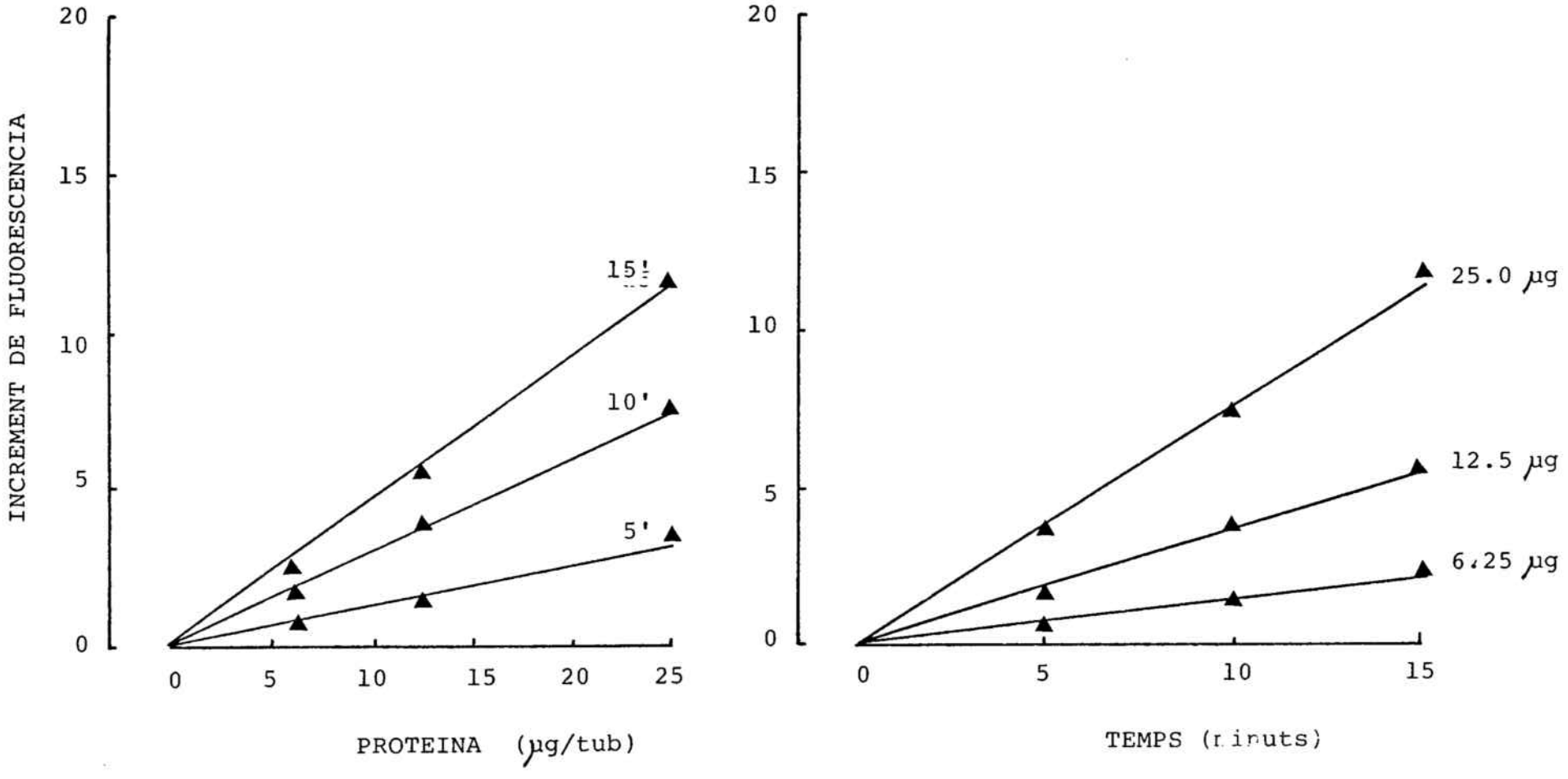
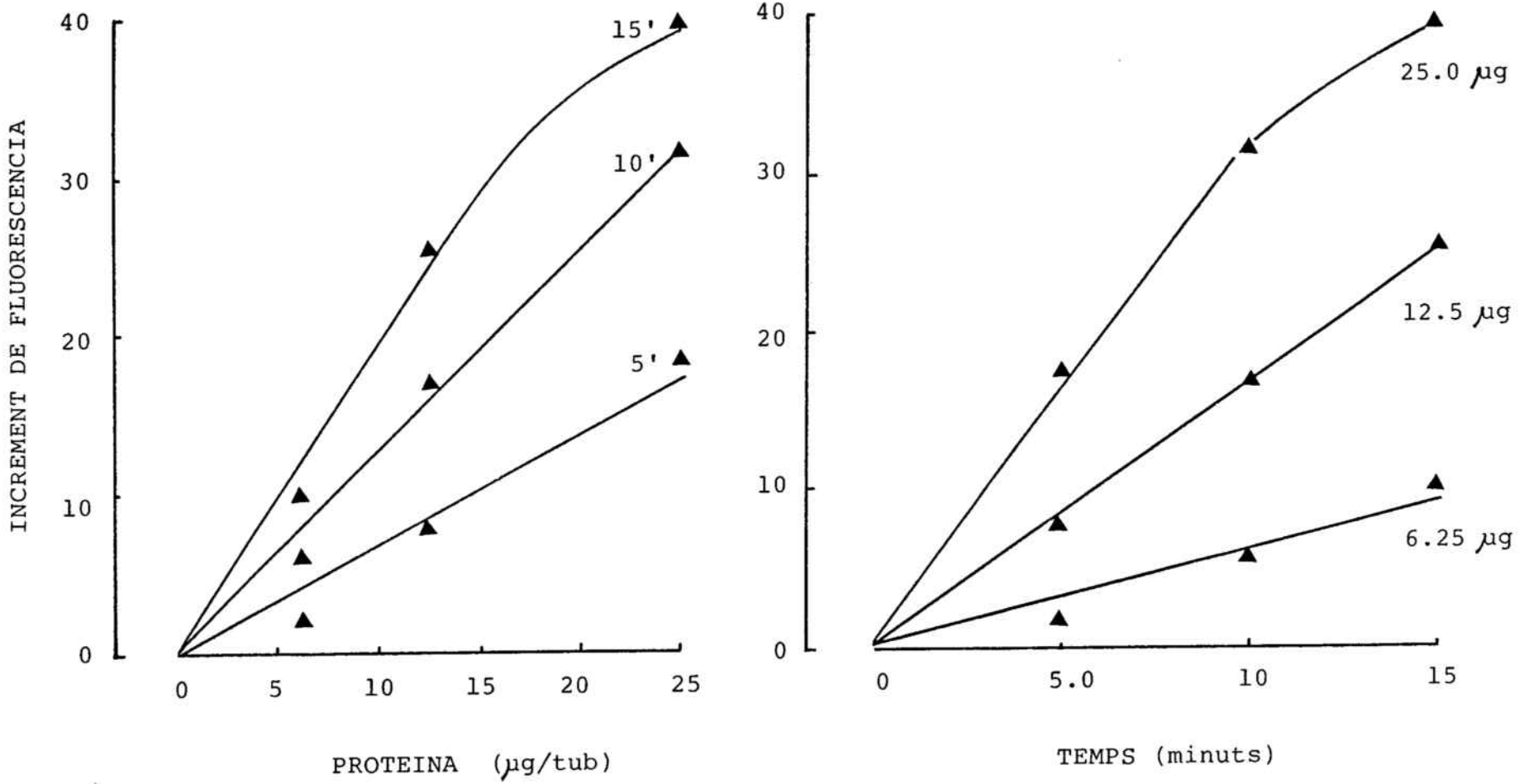


FIGURA 2.15 LINEALITAT EN FUNCIO DEL TEMPS I LA PROTEINA DE L'ACTIVITAT GLICOGEN FOSFORILASA TOTAL (+AMP)



rem 1.0 ml de reactiu (glucosa oxidasa 1.25 Unitats/ml, peroxidasa 0.25 Unitats/ml, dihidroclorur d'o-dianisidina 0.025 mg/ml en tampó fosfats 6.0 mM. pH 7.4)i incubàrem 30 minuts a temperatura ambient. La reacció l'aturàrem per acidificació amb 0.1 ml de HCl 3 N. Després de 15 minuts llegírem l'absorció de llum a 415 nm. Tant les mostres com les estandards les valoràrem per duplicat. En el marge de concentracions de l'estandard emprades, la relació entre concentració i A_{415} fou lineal (figura 2.16).

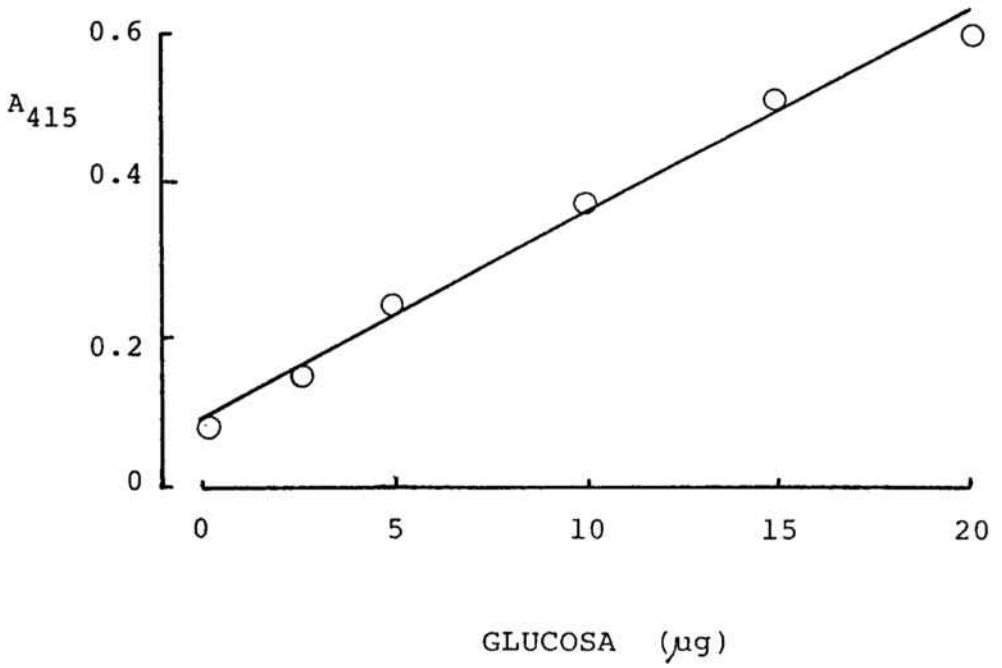
2.2.15.- Estadística

D'alguns experiments es mostra només el resultat d'un de representatiu, tot i que sempre els repetírem, al menys una vegada més. Quan el nombre de dades és suficient, es representa la mitjana $\pm$ l'error estandard de la mitjana, indicant-se el nombre de dades.

Quan interessà comparar dos grups de dades per tal de conéixer en quin grau les diferències eren significatives estadísticament, s'aplicà el test de la t-Student de dades aparellades, o, quan aquest no fou aplicable (comparacions entre controls i diabètiques), el de la t-Student de dades independents.

FIGURA 2.16

PATRO PER LA QUANTIFICACIO DE LA GLUCOSA



r = 0.9997

µg = 36.0 A_{415} - 3.3

3.- RESULTATS I DISCUSSIO

3.1.- CARACTERITZACIO DE LES ACTIVITATS TRIACILGLICEROL HIDROLASES EN HOMOGENAT CEL.LULAR

Com a primera aproximació a la identificació de les activitats triacilglicerol ester hidrolases (TAGH) presents als cardiomiòcits de rata, estudiàrem les propietats d'aquestes activitats als homogenats cel.lulars obtinguts per sonicació (veure apartat 2.2.2).

Anteriorment a nosaltres s'havia descrit clarament la presència d'activitat TAGH àcida i lipoproteïna lipasa (LPL), tant a cor sencer com a cardiomiòcits aïllats, existint controvèrsia sobre l'existència o no d'altre activitat neutra independent dee la LPL (veure apartat 1.5).

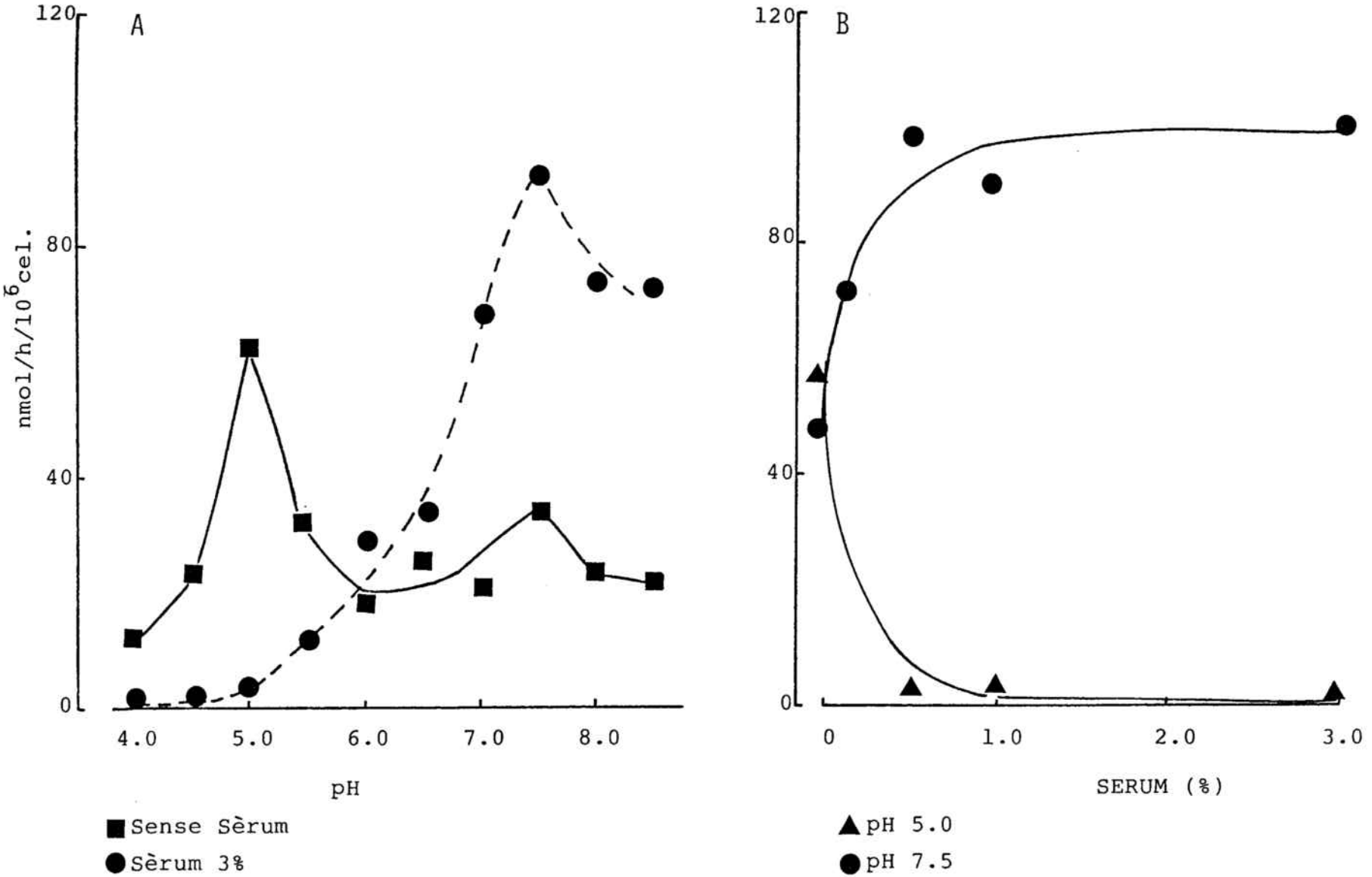
3.1.1.- Efecte de les modificacions en la composició del sistema de valoració

Efecte del pH i del sèrum

El primer experiment que férem fou determinar la variació de l'activitat TAGH en funció del pH del medi. Per pHs entre 4.0 i 6.0 utilitzàrem el tampó acètic/ acetat sòdic i per pHs entre 6.0 i 8.5 el tampó PIPES, sempre a concentració de 25 mM. Per aquests experiments s'escollí com a concentració de substrat (troleïlglicerol)la de 0.125 mM, emprada normalment al nostre laboratori per la determinació d'activitats lipàsiques tant neutres com àcides a diferents teixits i, d'entre ells, el cor sencer (Severson 1979b; Secerson i col., 1981b). Com a únic altre component del medi dee valoració es posà albúmina lliure d'àcids grassos 7.6 uM. La resta de condicions d'incubació són les descrites a l'apartat 2.2.3.

Quan es valorà en absència de sèrum obtinguérem dos pics d'activitat en funció del pH: un a 5.0 i l'altre a 7.5 (figura 3.1 A). Quan al medi de valoració

FIGURA 3.1 EFECTE DEL pH I DEL SERUM SOBRE LES ACTIVITATS TAG HIDROLASES EN HOMOGENATS CEL.LULARS



s'afegí sèrum 3% pre-escalfat s'observà només un pic a pH 7.5. A l'experiment mostrat a la figura 3.1 A la relació d'activitats +/- sèrum fou de 2.7 a pH 7.5. Es realitzaren un total de 5 experiments, i aquesta relació oscil.là entre 2.4-2.9. Aquest resultat és pràcticament idèntic al descrit per Stam i Hülsmann (1983) en sobre-- nadantss postnuclears de cors de rata perfundits prèviament amb heparina. Dos pics a 5.0 i 7.5 també havien estat descrits rn homogenats de cor valorats sense sèrum (Severson, 1979b). Als següents experiments empràrem aquests dos pH (5.0 i 7.5) per la determinació de less activitats TAGH àcida i neutra respectivament.

Està ben descrita la presència d'activitat LPL als cardiomiòcits de rata (veure apartat 1.5). Ara bé, nosaltres no observem cap activitat amb pH òptim 8.0-8.5. Com mostraren Hülsmann i col.laboradors (1982), això es deu, probablement, a les condicions d'assaig. Als treballs on es descriu un pH òptim per la LPL més alcalí que el que nosaltres trobem per l'activitat TAGH neutra (+) sèrum, acostumen a introduir-se fosfolípids com a emulsionants (Twu i col., 1975, 1976; Nilsson-Ehle i col., 1976). En resultats que no mostrem, nosaltres hem observat que l'addició tant de fosfatidilcolina, com fosfatidiletenolamina, o fosfatidilserina, o fosfatidilinositol provoquen un desplaçament del pH òptim de l'activitat mesurada en presència de sèrum fins a valors de 8.0-8.5.

Les variacions de les activitats TAGH a pH 5.0 i 7.5 en funció de la concentració de sèrum, varen ésser determinades sota les mateixes condicions descrites a l'apartat anterior. L'activitat TAGH àcida és ja inhibida més d'un 95% a concentracions de sèrum tant baixes com el 0.5% (figura 3.1 B). L'activitat TAGH neutra és, pel contrari, estimulada 2.1 vegades, essent aquesta estimulació màxima a la concentració de sèrum del 3%. Els resultats mostrats corresponen a un experiment representatiu dels quatre que realitzàrem.

Només ha estat publicat un treball on s'estudia l'efecte del sèrum sobre l'activitat TAGH àcida; i no ha estat fet a cor, sinó als fibroblasts de la línea L929 (Gorin i col., 1982). En les seves condicions, calgué una concentració de sèrum superior al 10% per que es produís una inhibició del 90% o més de l'activitat. Aprofundint sobre la naturalesa del factor inhibidor, auqests autors observaren que era termolàbil, no-dialitzable i destruït per prèvia incubació amb tripsina. Per totes aquestes característiques conclogueren que era de naturalesa proteica i amb un pes molecular aparent, obtingut després d'una purificació parcial per filtració en gel, de 50 kDa. Nosaltres no hem aprofondit sobre el factor responsable d'aquesta inhibició i no ens atrevim a establir paral.lelismes puix manquen treballs realitzats amb altres condicions d'assaig i procedència de la mostra que permetin de sustentar la generalització.

Si bé normalment s'utilitza una concentració de sèrum del 6-10% per activar la LPL (Nilsson-Ehle i col., 1976; Stam i Hülsmann, 1983; etc.), nosaltres trobem, que, sota les nostres condicions, concentracions molt inferiors ja produeixen una estimulació màxima de l'activitat dependent de sèrum. També Reina (1984) trobà que per la LPL tnant del teixit adipós com del fetge de nounats alimentats 8 hores i, posteriorment, dejunats 16 hores, una concentració del 3% era ja suficient per obtenir una màxima estimulació. A partir del nostre resultat utilitzàrem en tots els experiments següents la concentració del 3% de sèrum com l'òptima.

Efecte de les sals (força iònica)

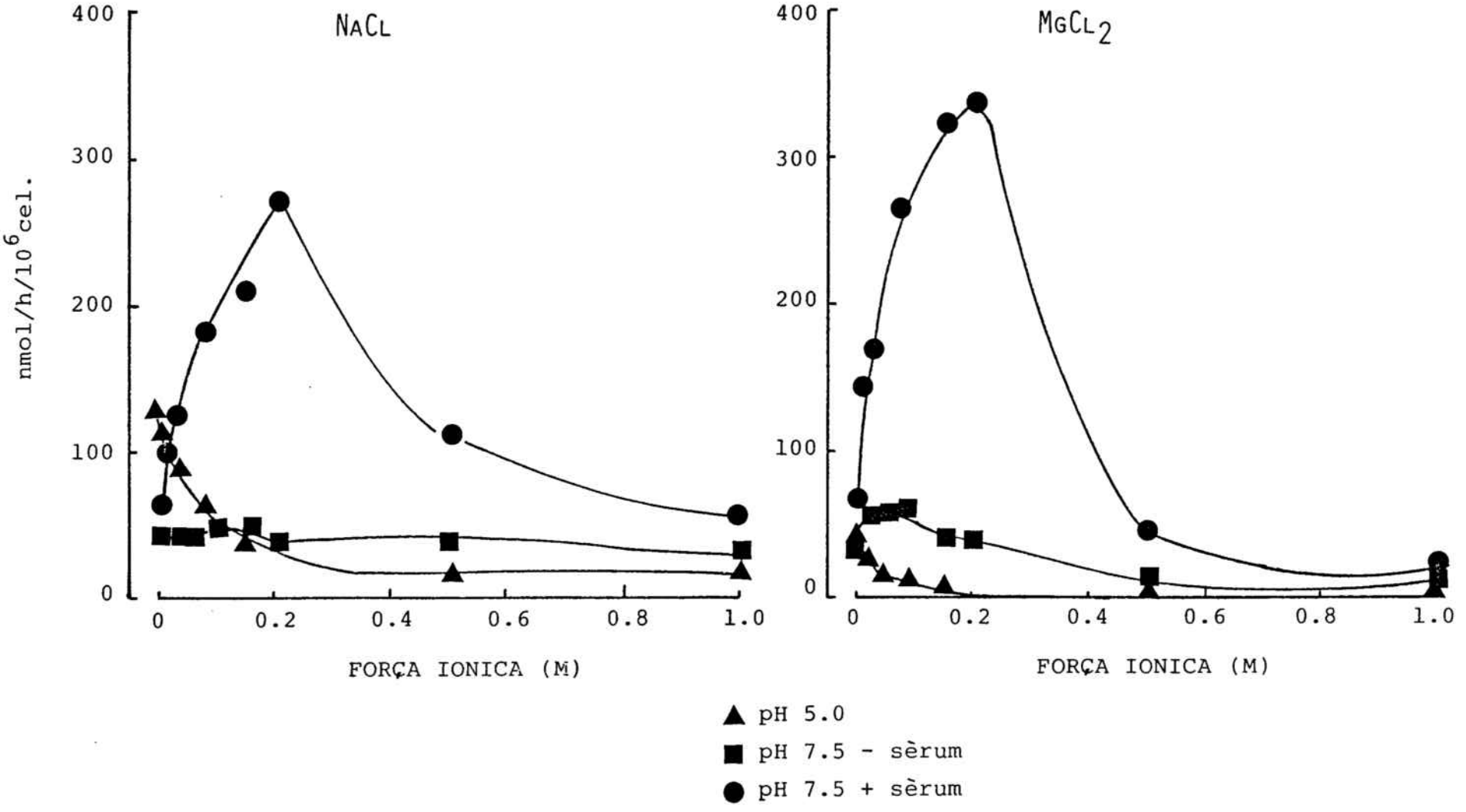
Una de les proves més clàssiques per la caracterització de la LPL és la seva sensibilitat a concentracions elevades de NaCl. Es per això que nosaltres hem determinat l'efecte del NaCl, així com d'altres sals, de les que mostrem els resultats del $MgCl_2$, sobre les diferents

activitats TAG hidrolases als homogenats cel.lulars. Els experiments els férem afegint directament al medi d'incubació, aliquotes de 0.1 ml de solucions bé de NaCl bé de $MgCl_2$ de diferents concentracions. En aquests experiments la concentració de substrat també fou de 0.125 mM.

A la figura 3.2A es mostren els resultats obtinguts en augmentar la concentració de NaCl des de 0 a 1.0 M (forces iòniques 0-1.0 M).Com ja havia estat descrit per Severson (1979b) en preparacions de cor sencer, concentracions creixents de NaCl provoquen una inhibició de l'activitat TAGH àcida. Un 50% d'inhibició es produeix a concentracions de NaCl de 75 mM (I=0.075). Igualment el $MgCl_2$ (figura 3.2B) inhibeix l'activitat TAGH àcida, essent més sensible a aquesta sal que al NaCl, doncs un 50% d'inhibició es produiex a concentracions de 6-7 mM (I=0.02 M). Tots aquests resultats concorden plenament amb els descrits a cor sencer (Severson, 1979b).

Tant la LPL purificada de cor de rata (Twu i col., 1975), com l'alliberable per heparina en cors perfundits també de rata (Stam i Hülsmann, 1983), s'inhibeixen per concentracions de NaCl superiors a 0.2 M. També la LPL d'altres procedències té el mateix comportament (del teixit adipós blanc per exemple, Ehnholm i col., 1974). L'activitat que nosaltres mesurem a pH neutre en presència de sèrum és primerament estimulada per concentraicions creixents de NaCl o $MgCl_2$fins a forces iòniques I=0.15-0.2 M (fig. 3.2A i 3.2B). Concentracions superiors provoquen una progressiva inhibició. La concentració de NaCl que donà una estimulació màxima fou la de 0.2 M; mentre que generalment, malgrat el que pot observar-se a la figura 3.2B, pel $MgCl_2$ fou de 50 mM (I=0.15 M). Igualment s'observà que,de forma consistent, l'estimulació provocada pel $MgCl_2$ 50 mM era superior a la que provocava el NaCL 0.2 M (352.6$\pm$54.5 vs 251.9$\pm$34.0 nmols/h/10^6cel., n=6, p 0.05). També el

FIGURA 3.2 EFECTE DEL NaCl I DEL $MgCl_2$ SOBRE LES ACTIVITATS TAG HIDROLASES EN HOMOGENATS CEL.LULARS



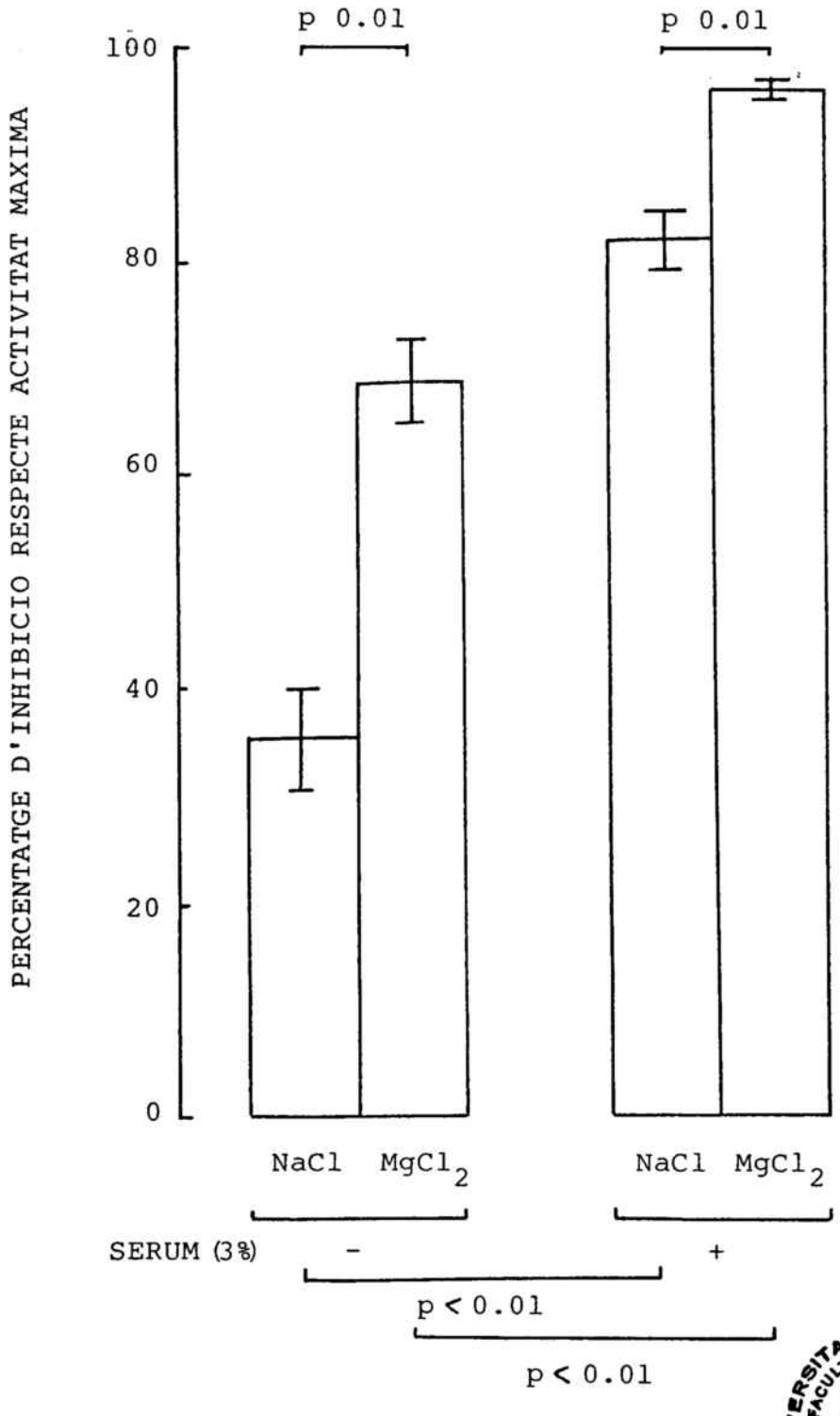
grau d'inhibició que s'obté amb forces iòniqes de I=1.0 M és superior amb $MgCl_2$ que amb NaCl (95.7±0.6 vs 83.4± 2.7% d'inhibició respecte de la màxima activitat a I= 0.15-0.2 M, n=6, p 0.01; figuraa 3.3).

L'activitat TAGH neutre (-) sèrum és molt meny sensible a l'efecte del NaCl (figura 3.2A). Així, concentracions fins a 0.2 M provocaren només un increment de 1.5 vegades el l'activitat (en presència de sèrum l'augment era de 3.6 vegades) i tampoc concentracions fins a 1.0 M in hibiren gaire l'activitat. Una comparació entre l'efecte inhibidor de l'elevada força iònica (I=1.0 M) respecte de l'activitat màxima (a 0.2 M NaCl pel cas d'aquesta sal) es representa a la figura 3.3. Mentre que en absència de sèrum , 1.0 M NaCl només provoca una inhibició del 35%, en presència de sèrum 3% la inhibició és considerablement superior (83%). Aquest resultat discrepa d'altres publicats prèviament i referents a cors sencers perfundits o no amb prèviament amb heparina. Així, Severson (1979b) observà també un efecte activador (1.5 vegades) del NaCl 0.2 M sobre l"activitat mesurada en absència de sèrum i a pH 7.5. Contràriament, a concentracions superiors observà una molt considerable inhibició. Stam i Hülsmann (1983), si bé no observen cap efecte fina a 0.2 M NaCl, també troben que concentracions superiors inhibeixen l'activitat mesurada en absència de sèrum. Una possible explicació per aquesta discrepància no ens era aparent en aquest punt de la nostra investigació. No seria fins més d'un any després, quan realitzàrem els experiments finals del la segona part d'aquesta Tesi, que entreveièrem una possible explicació, que seràs discutida llavors.

El $MgCl_2$ també estimulà lleugerament l'activitat TAGH neutre (-) sèrum fins a concentracions de 25-50 mM (I=0.075-0.15) (figura 3.2B). Contràriament al NaCl, concentracions superiors sí que inhibiren considerablement l'activitat. Així, 333 mM $MgCl_2$ (I=1.0 M) provocaren una inhibició del 68% (fig. 3.3) que, si bé

FIGURA 3.3

EFECTE INHIBIDOR DE LES ELEVADES FORCES IONIQUES SOBRE LES ACTIVITATS TAG HIDROLASES NEUTRE EN HOMOGENATS CEL.LULARS



UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE BIOLOGIA
BIBLIOTECA

és superior a la que provoca el NaCl, també és inferior a la ques es produeix en presència de sèrum.

A partir d'aquests resultats introduírem $MgCl_2$ 50 mM en el sistema de valoració de les activitats TAGH neutres (+) sèrum (veure apartat 2.2.3). Comprovàrem que ni el pH ni la concentració de sèrum òptimes quedessin afectats per la introducció d'aquests component (resultats no presentats).

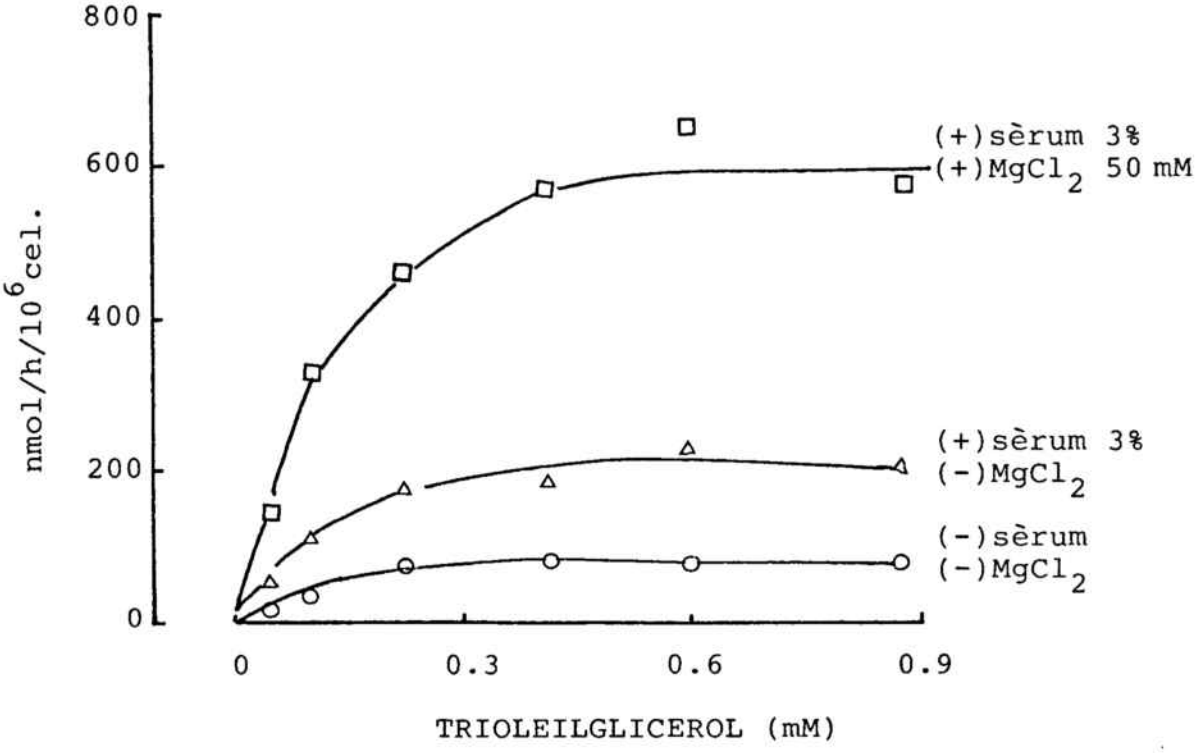
Efecte de la concentració de substrat (paràmetres cinètics)

Si bé havíem començat aquest estudi amb una concentració de substrat que era àmpliament utilitzada al nostre laboratori per la determinació d'activitats TAG hidrolases, intuíem que probablement, al menys per l'activitat TAGH neutre (+) sèrum, treballàvem per sota de les concentracions òptimes; ja que, normalment, s'utilitzen per la valoració de la LPL concentracions de substrat de 3-6 mM. Per altre banda, s'ha descrit que la LPL residual després de perfundir cors amb heparina té una Km aparent de 2-4 mM (Ben-Zeev i col.,1981 a i b; Stam i Hülsmann, 1984).

Per això estudiàrem l'efecte de concentracions creixents de substrat (0.012-1.2 mM) sobre les activitats TAGH. Les diferents concentracions les preparàrem per diñlució d'un stock de màxima concentració. Mantinguérem fixa doncs, l'activitat específica . Preferírem fer-ho així doncs el fet d'ajustar la concentració final variant només la quantitat de substrat no radioactiu ens obligava a realitzar múltiples sonicacions per emulsionar els substrats de concentracions i activitats específiques variables. Aquesta hagués estat una important font de variabilitat en no poder controlar exactament el tipus d'emulsió resultant en cada cas.

A la figura 3.4 es mostra un experiment representatiu on es determinà l'activitat a pH 7.5 en pre-

FIGURA 3.4 EFECTE DE LA CONCENTRACIO DE SUBSTRAT SOBRE LES ACTIVITATS TAG HIDROLASES NEUTRES EN HOMOGENTS CEL.LULARS



TAULA 3.1 PARAMETRES CINETICS DE LES DIFERENTS ACTIVITATS TAG HIDROLASES EN HOMOGENATS CEL.LULARS

pH	Sèrum (3%)	$MgCl_2$ (50 mM)	Km ap. (mM)	Vmax. (nmol/h/10^6cel.)	n
5.0	-	-	0.08	97.5	1
7.5	-	-	0.15±0.02	70.2±9.4	5
7.5	+	-	0.15±0.01	211.9±21.2	6
7.5	+	+	0.15±0.03	746.2±25.8	2

sència o absència de sèrum i de $MgCl_2$. Les activitats seguiren una cinètica clàssica Michaelis-Menten. A la taula 3.1 es sumaritzen els resultats d'aquests experiments. Els valors aparents de Km i Vmàx han estat obtinguts després de linealitzacions pel mètode de Eadie-Hofstee. L'activitat TAGH àcida ens donà una Km aparent de 0.08 mM en l'única determinació que d'aquest paràmetre férem d'aquesta activitat. Amb un mètode de valoració sensiblement diferent pel que fa al sistema d'emulsió del substrat, Knauer i col.laboradors (1983) obtingueren una Km aparent de 0.13 mM per la mateixa activitat TAGH àcida de cardiomiòcits aïllats de gat. Valor que considerem relativament semblant al nostre. Amb l'activitat mesuradaa a pH 7.5 obtinguérem una Km aparent de 0.15 mM que no fou afectada pel sèrum o pel sèrum i el $MgCl_2$. Els efectes activadors del sèrum i del sèrum+$MgCl_2$ es centren sobre la velocitat màxima. El sèrum la incrementa 3 vegades i el sèrum+$MgCl_2$ unes 10.

Sota les nostres condicions obtenim uns valors de Km aparent per l'activitat TAGH neutre (+) sèrum més d'un ordre de magnitud inferior a l'obtingut per altres laboratoris (Ben-Zeev i col., 1981a; Stam i Hülsmann, 1983) per l'activitat corresponent a la LPL residual de cor. De totes formes, elsa resultats no poden ésser comparats doncs els sistemes de valoració són força diferents i, en ésser les lipases enzims que actuen a la interfase lípid-aigua, la composició exacta d'aquesta és fonamental, no tant sols condicionant l'activitat màxima, sinó també l'afinitat aparent pel substrat (Brockman, 1984).

A partir d'aquests experiments establírem les condicions generals d'assaig descrites a l'apartat 2.2.3 de Materials i Mètodes: s'utilitzà com a concentració de substrat la de 0.6 mM tant per l'activitat mesurada a pH 5.0 com a 7.5. Aquesta darrera es valorà tant amb com sense sèrum 3%, incloent-hi $MgCl_2$ 50 mM, fet que

ja no indicarem més, excepte que no sigui així.

Efecte de les apolipoproteïnes C-II i $C\text{-}III_2$

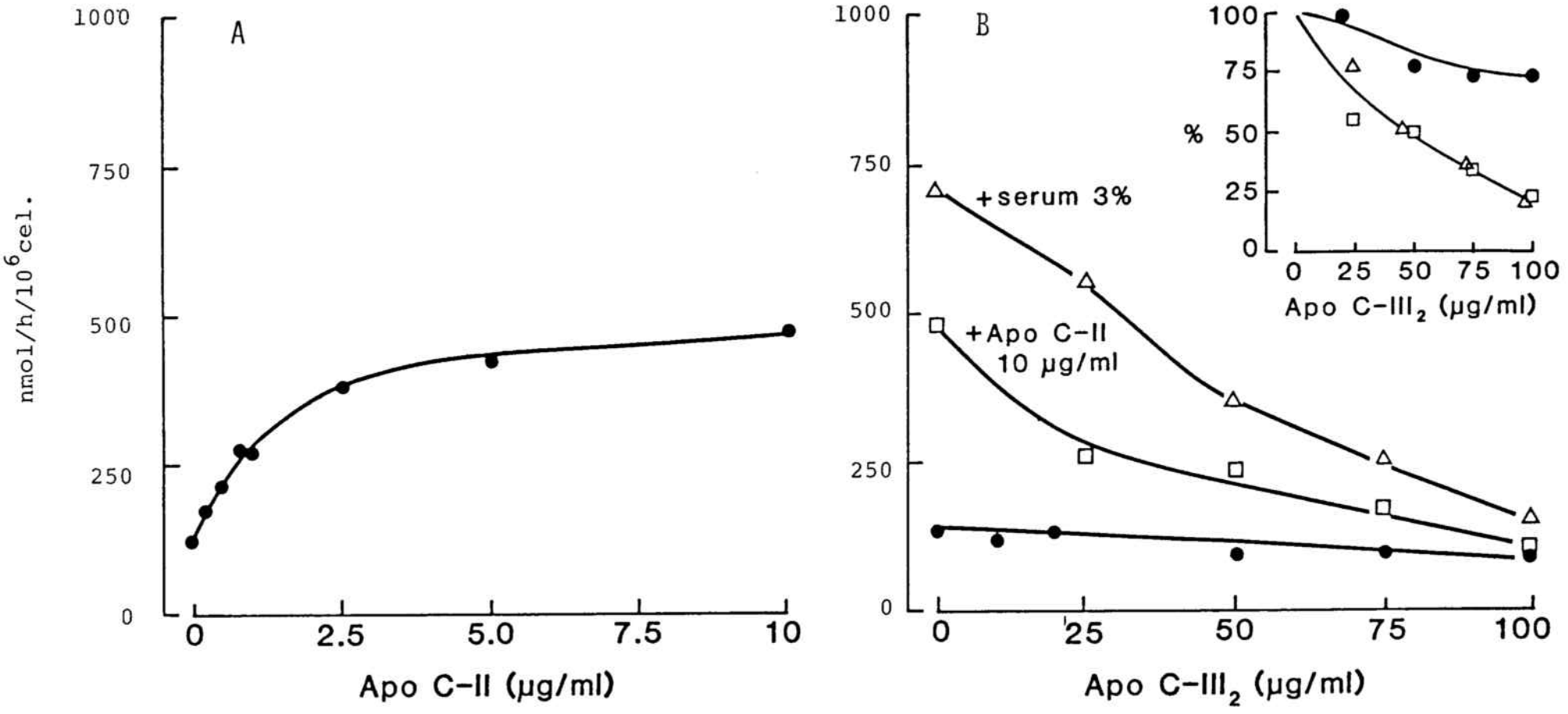
Una de les característiques fonamentals i exlusives de la LPL és la seva estimulació per apolipoproteïna C-II (apo C-II) (Havel i col., 1970; La Rosa i col., 1970). Es la presència d'aquesta apoproteïna,tant al plasma com al sèrum, la responsable de l'activació de la LPL per un i l'atre. Nosaltres hem testat l'efecte d'aquesta apoproteïna, així com de la $C\text{-}III_2$, procedents de VLDL de plasma d'humans i generosament donades pel Dr. M.W. Huff de la University of Western Ontario (Ontario, Canada).

Estudiàrem l'efecte de quantitats creixents d'apo C-II sobre l'activitat TAGH neutre (valorada en absència de sèrum). A la figura 3.5A es mostra el resultat d'un experiment on arribàrem fins a concentracions de 10 ug/ml. Concentracions superiors (fins a 30 ug/ml) no provocaren més activació que la ja observada amb 10 ug/ml (resultats no presentats). L'activitat mesurada en presència d'apo C-II fou, a l'igual que ho era la mesurada en presència de sèrum, màxima a concentracions de $MgCl_2$ de 50 mM (resultats no presentats).

Tots els treballs realitzats amb LPL purificada de cor descriuen també l'activació per l'apo C-II, obtenint tots ells activacions màximes a concentracions de 10-20 ug/ml (Twu i col., 1975 i 1976; Ehnholm i col., 1975; Chung i Scanu, 1977). També amb LPL alliberada en perfundir cors amb heparina, s'ha descrit activació per l'apo C-II, essent màxima a concentracions de 20 ug/ml (Stam i Hülsmann, 1983). Al mateix treball es mostra que concentracions tant baixes com 2 ug/ml ja produeixen una màxima activació de la LPL residual. aquests autors no poden explicar clarament les raons d'aquesta diferència.

Es generalment acceptat que l'apo C-III inhibeix

FIGURA 3.5 EFECTES DE LES APOLIPOPROTEINES C-II I C-III$_2$ SOBRE LES ACTIVITATS TAGH NEUTRES EN HOMOGENATS CEL.LULARS



en major o menor grau l'activitat LPL de diferents procedències (Twu i col., 1975, 1976; Lukens i Borensztajn, 1978; Holdworth i col., 1985). Nosaltres hem observat que concentracions creixents d'apo C-III_2 (fins a 100 ug/ml) tenen un lleuger efecte inhibidor sobre l'activitat mesurada en absència de sèrum o apo C-II (fig. 3.5B). Chung i Scanu (1977) observàren un efecte inhibidor molt superior de l'activitat LPL mesurada en absència de cofactor (80% d'inhibició a 100 ug/ml) comparat amb el nostre (25% d'inhibició a la mateixa concentració). Si la diferència es deu a que nosaltres treballem amb un dels subtipus de l'apo C-III (el C-III_2), mentre que ells no les subfraccionaren, als diferents tipus d'emulsions, o a algun altre factor, ho desconeixem.

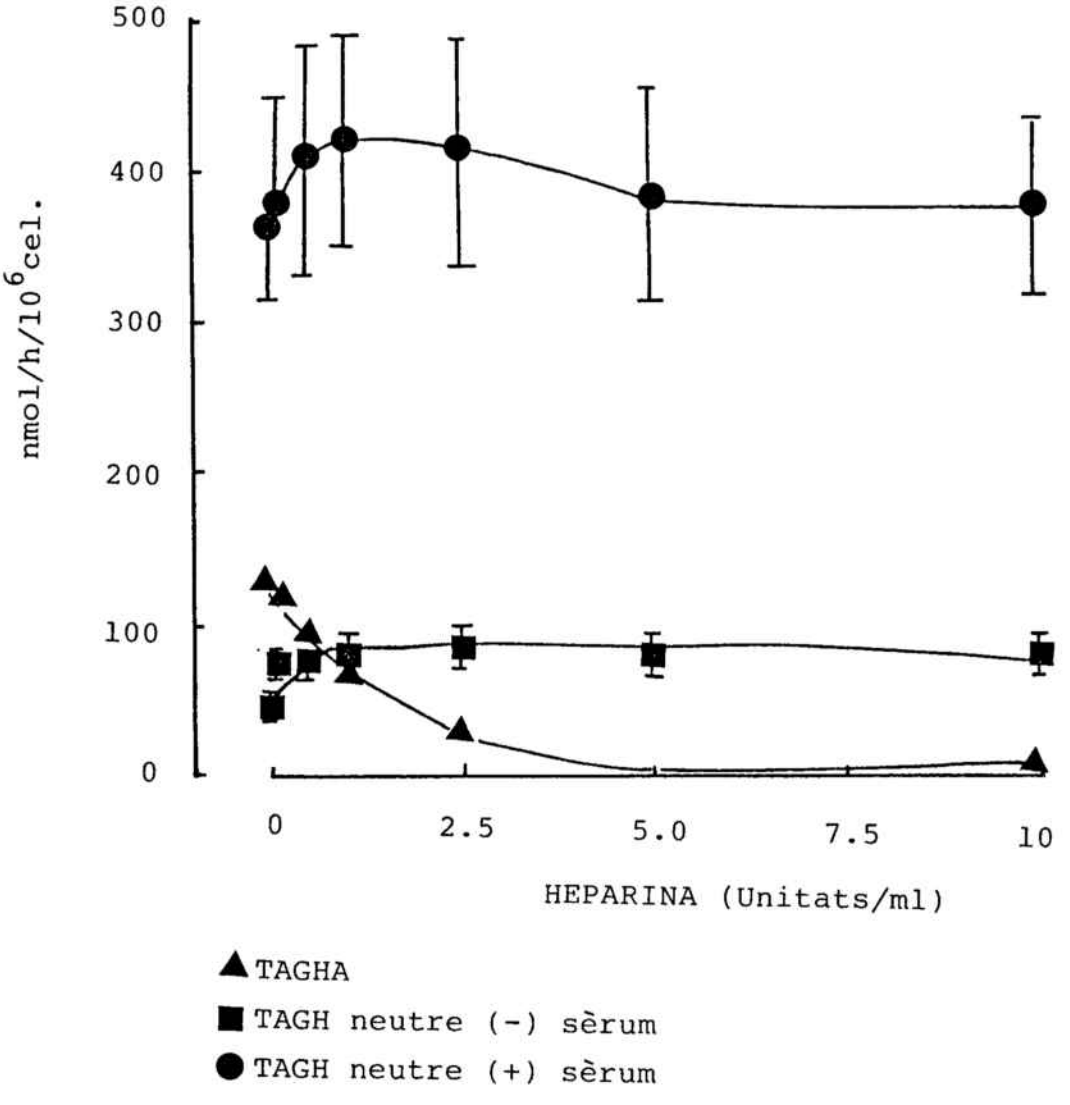
Quan al medi d'incubació són presents sèrum 3% o apo C-II 10 ug/ml, concentracions creixents d'apo C-III_2 provoquen una inhibició paral.lela d'ambdues activitats, essent a 100 ug/ml d'apo C-III_2 del mateix ordre que la determinada en absència de cofactor o de sèrum (figura 3.5B). Resultats semblant varen ésser descrits per Lukens i Borensztajn (1978) utilitzant LPL alliberada amb heparina i substrats naturals (quilomicrons).

Efecte de l'heparina, la protamina sulfat i l'albúmina

Si bé està ben demostrada la interacció entre la LPL i l'heparina (Olivecrona i col., 1977 per revisió), no semba clar que aquesta interacció afecti a l'activitat de l'enzim. De fet s'han publicat tant activacions com inhibicions i, fins i tot, activacions a baixes concentracions però inhibicions a concentracions superiors (per revisió veure Olivecrona i Bengtsson, 1984). Fin on nosaltres coneixem no ha estat publicat treball algun on s'estudiés l'efecte de l'heparina sobre l'activitat TAGH àcida. Nosaltres no trobem cap efecte consistent de l'heparina sobre les activitats TAGH neutres (±)sèrum (n=3) (figura 3.6). Ara bé, sí que observem un potent efecte inhibidor de l'activitat TAGH àcida (95% d'inhi-

FIGURA 3.6

EFECTE DE L'HEPARINA SOBRE LES ACTIVITATS TAG HIDROLASES EN HOMOGENATS CEL.LULARS

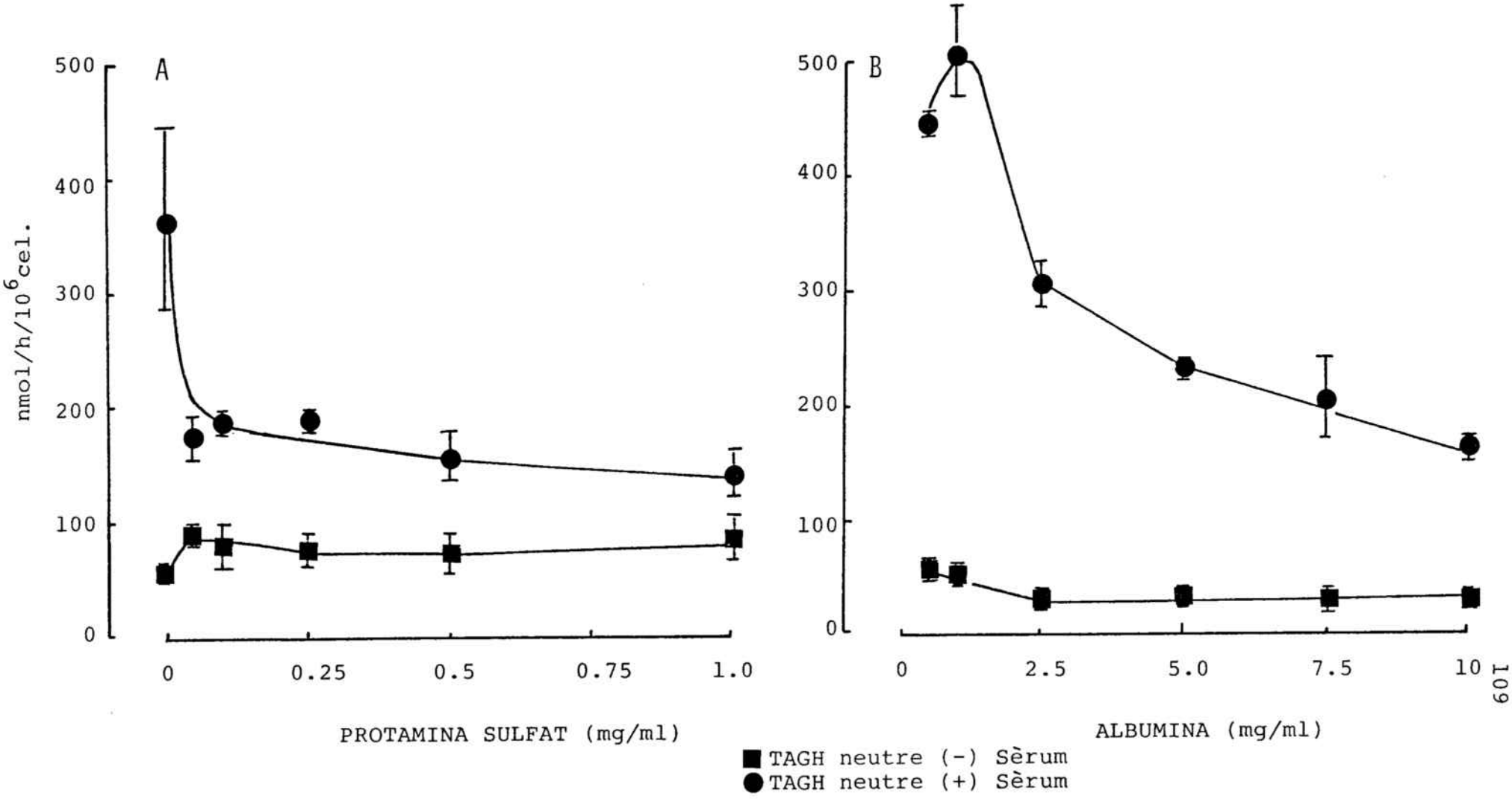


bició amb 10 unitats/ml).

Els efectes tant de la protamina sulfat com de l'albúmina els estudiàrem només sobre les activitats TAGH neutres (+) sèrum, principalment buscant diferències de comportament entre elles. Mentre que qualsevol de les concentracions de protamina sulfat emprades inhibiren vora un 50% de l'activitat mesurada en presènciasde sèrum (n=2) (figura 3.7A), en la seva absència fou, fins i tot, lleugerament incrementada. De fet, com passava amb l'heparina, s'ha descrit qualsevol tipus d'efecte amb la protamina sulfat. Així, amb la LPL purificada de cor tant de rates com d'humans, Twu i col.laboradors (1975, 1976) observaren una inhibició de l'activitat que ells mesuraven en presència de sèrum. Stam i Hülsmann (1983), contràriament, observaren una activació de la LPL residual quan era valorada en presència de sèrum, al sobrenadant postnuclear de cors de rata perfundits amb heparina. L'activitat independent de sèrum no fou afectada per la protamina sulfat, sota les seves condicions. Curiosament, la LPL alliberada amb heparina els hi respongué de forma diferent en dependència de si la protamina sulfat s'afegia directament al sistema de valoració o es realitzava una pre-incubació amb la mostra. Una activació amb protamina sulfat d'una activitat determinada en presència de sèrum fou descrita també per Jesmok i col.laboradors (1976) en la fracció particulada solubilitzada amb lubrol d'homogenats de cor de rata.

Tots aquests resultats, al menys aparentment, contradictoris han estat obtinguts amb diferents tipus de mostres (purificada de cor total, alliberadaa amb heparina, sobrenadants postnuclears, solubilitzats de precipitats particulats), i amb diferents tipus d'emulsions de substrats. Probablement tots aquestsd factors condicionin, de forma desconeguda encara, l'efecte de la protamina sulfat. De fet, amb teixit adipós blanc de porc, Bensadoun i col.laboradors (1974) observaren di-

FIGURA 3.7 EFECTE DE LA PROTAMINA SULFAT I L'ALBUMINA SOBRE LES ACTIVITATS TAGH NEUTRES EN HOMOGENATS CEL.LULARS



ferents resultats amb la ptotamina sulfat en funció de l'estadi de purificació dse la mosrta i la forma en que la pols acetònica s'extreïa del teixit (primer pas del seu procés de purificació).

El sistema de valoració conté albúmina com a acceptor dels àcids grassos alliberats. Ara bé, en alguns sistemes s'ha demostrat que la LPL pot ésser inhibida per concentracions elevades d'albúmina (Posner i Morrison, 1979; Olivecrona i Bengtsson, 1984). Amb el nostre mètode de valoració, concentracions creixents d'albúmina provocaren una progressiva inhibició de l' activitat TAGH neutre tant quan determinada en presència com en absència de sèrum (figura 3.7B). A concentracions de 10 mg/ml d'albúmina (la concentració normal és de 0.5 mg/ml, 7.6 uM) es produïa un 43% d'inhibició i un 64% d'inhibició de les activitats TAGH neutre (-) i (+) sèrum respectivament (n=2). S'ha postulat que al inhibició que s'observa, en alguns sistemes, a elevades concentracions d'albúmina es deu a la capacitat d'aquesta proteïna de lligar-se a la interfase aigua-lípid, interferint amb el lligam de la lipasa a aquesta inerfase (Posner i Morrison, 1979). Amb un sistema relativament simple constituït per LPL de llet bovina purificada fins a homogeneïtat i emulsió de trioleïlglicerol amb goma aràbiga, s'ha observat que l'addició de l'apo C-II reverteix la inhibició produïda per l'albúmina (Olivecrona i Bengtsson, 1984). El que en el nostre sistema no sigui així pot deure's a la presència d moltes altres proteïnes, presents bé a la mostra bé al sèrum, que evitin la reversió de la inhibició.

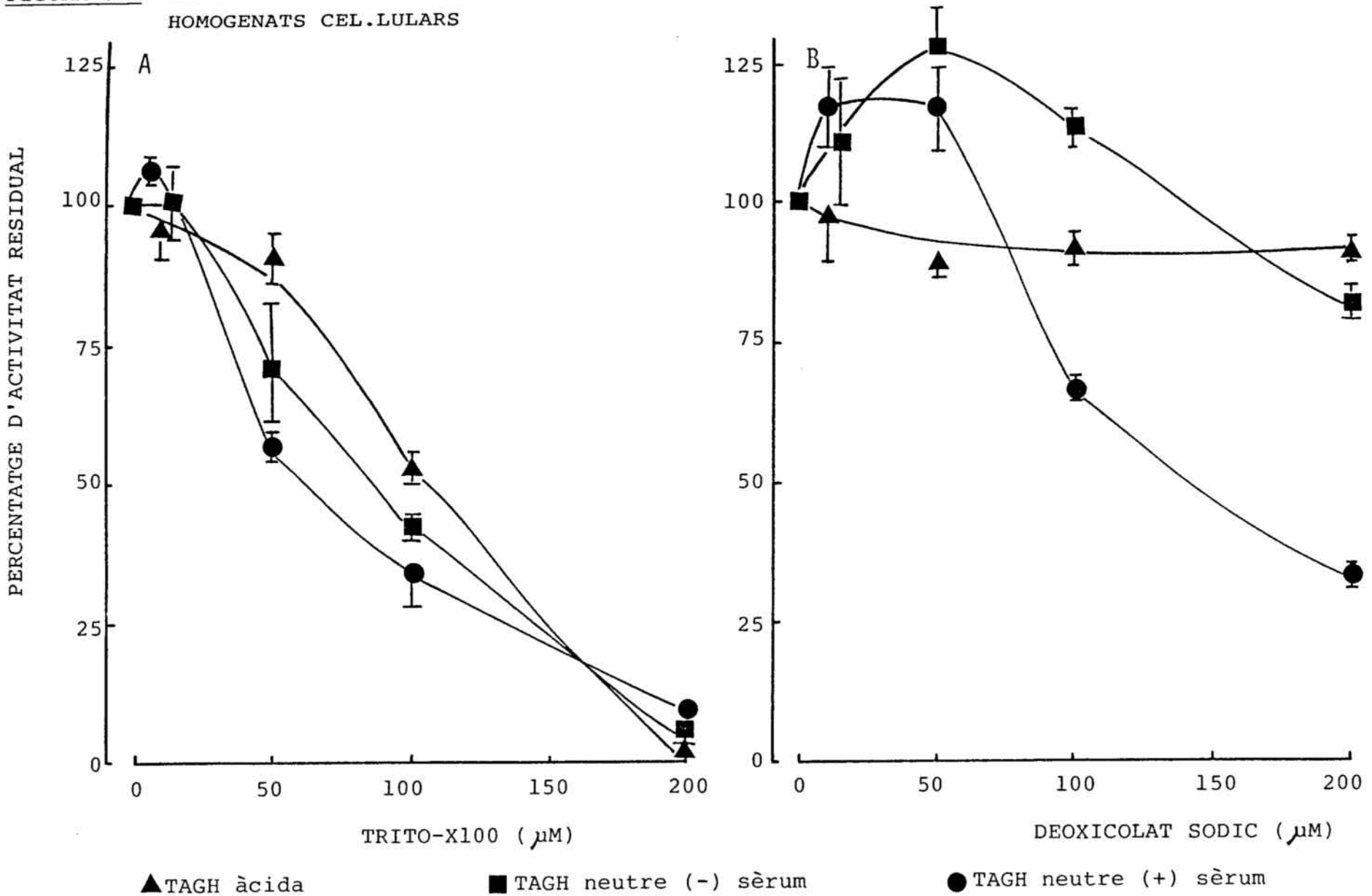
Efecte del Tritó X-100 i del desoxicolat sòdic

Els detergents afecten profundament a totes les activitats lipàsiques. Per una banda, en ésser substàncies tensioactives es lliguen a la interfase lípid-aigua alterant-la. Així, jades de fa temps es conegut

que el Tritó WR-1339 altera les propietats de les lipoproteïnes plasmàtiques (Scanu i Oriente, 1961). També ha estat utilitzat el Tritó X-100 per la preparació d'emulsions de substrats (Krauss i col., 1973). Igualment, els detergents poden afectar al propi enzim. Concretament per la LPL s'ha demostrat que el desoxicolat sòdic (NaDOC) es lliga directament a la molècula de la LPL estabilitzant-la, solubilitzant-la i desadsorbint-la de la interfase lípid-aigua (Bengtsson i Olivecrona, 1979). Nosaltres estudiàrem, en aquesta primwera part, l'efecte de concentracions creixents tant de Tritó X-100 com de NaDOC, afegides directament al sistema de valoració, sobre les diferents activitats TAG hidrolases als homogenats cel.lulars (figura 3.8). Concentracions d'uns 0.2 mM de Tritó X-100 provocarèn una inhibició completa de totes les activitats mesurades. Altres autors han descrit activació per Tritó X-100 de l'activitat TAGH àcida de cardiomiòcits (Knauer i col., 1983), ara bé, només ho determinaren a concentracions molt inferiors a les emprades per nosaltres. També ha estat descrita una inhibició de la LPL de llet bovina per Tritó X-100 utilitzant com a substratVLDL marcades radioactivament (Eisenberg i col., 1981). L'efecte del NaDOC fou menys pronunciat. Així l'activitat TAGH àcida no fou afectada per concentracions fins a 0.2 mM, mentre que l'activitat TAGH neutre (-) sèrum fou primer lleugerament estimulada, i després inhibida. La TAGH neutre (+) sèrum fou també primerament lleugerament estimulada i després més fortament inhibida (figura 3.8B). A concentracions de 0.5 mM totes les activitats foren completament inhibides (resultats no presentats).

Se'ns fa impossible explicar les causes dels efectes dels detergents observats en aquests experiments. Tampoc era la nostre intenció, en realitzar-los, l'aprofondir sobre aquests efectes. Realment no varen ésser fets cronològicament en el moment seqüencial en el que es mostren ara, sinó al principi de la segona part d'aquesta Tesi. Ara bé, en haver estat fets amb homo-

FIGURA 3.8 EFECTE DEL TRITO-X100 I DEL DEOXICOLAT SODIC SOBRE LES ACTIVITATS TAG HIDROLASES EN HOMOGENATS CEL.LULARS



genat cel.lular i presentat certes diferències entre les activitats TAGH neutres (±) sèrum, especialment pel cas del NaDOC, hem cregut oportú l'incloure'ls ara. Una discussió més extensa sobre els efectes dels detergents la realitzarem a l'inici de la segona part del treball.

3.1.2.- Efecte de la manipulació de la mostra

Amb el primer bloc d'experiments quedava clarament indicada la presència d'una activitat TAGH àcida (pH òptim 5.0, inhibida per sèrum, sals, heparina i Tritó X-100), i de l'activitat LPL caracteritzada pel seu pH òptimneutre (però bàsic en presència de fosfolípids), la seca activació per sèrum i apo C-II (ambdues activacions revertides per l'apo $C\text{-}III_2$)inhibida per elevades forces iòniques i protamina sulfat. Ambdues activitats eren ja ben conegudes i descrites als cardiomiòcits (Bagby i col., 1977; Knauer i col., 1983), si bé la TAGH àcida havia estat descrita las cardiomiòcitsd de gat, no de rata (Knauer i col., 1983).

Tot i que entre l'activitaty mesurada en presència i la mesurada en absència de sèrum existeixen certes diferencies respecte del seu comportament devant de les sals i la protamina sulfat, especialment, res ens permet ni tant sols suggerir si l'activitat neutre mesurada en absència de sèrum correspon totalment o no, a l'activitat residual de laa LPL que, com s'ha demostrat per d'altres sistemes,no és totalment dependent de la presència de sèrum (Egelrud i Olivecrona, 1973). Això és així doncs no coneixem encara la forma exacta per la que l'apo C-II activa a la LPL, ni tampoc quin efecte tenen aquests agents (protamina sulfat, NaCl, detergents, etc.) sobre l'apo C-II, sobre la interacció LPL-apo C-II o sobre la interacció apo C-II-substrat. Podríem especular per tant dient (pel cas del NaCl per exemple) que, en base a la hipòtesi de Fielding i Fielding (1976) per la que la unió apo C-II-

LPL es afectada pel NaCl, les activitats ± sèrum corresponen a la mateixa entitat molecular, i que les diferències observades són el fruit d'un efecte sobre l'activació de l'enzim per l'apo C-II més que sobre el centre catalític. Essent així s'explicaria que l'activitat mesurada en presència de sèrum fos més sensible a les inhibicions per NaCl, $MgCl_2$, i per extensió les inhibicions per protamina sulfat i detergents. Aquesta interpretació estaria d'acord amb els treballs de Hülsmann i col:laboradors (1982) i Stam i Hülsmann (1983).

El mateix resultat de l'efecte diferencial del NaCl el podríem utilitzar per concloure justament el contrari. Ara, basant-nos en les més recents hipòtesis de Posner i Morrison (1979) i Bengtsson i Olivecrona (1983) segons les que el NaCl no afectaria a la interacció LPL-apo C-II, sinó al lligam de l'enzim a la interfase aigua-lípid,podríem dir que les diferències der comportament reflectirien l'existència d'una eltre activitat hidrolasa neutre, bé independent de sèrum bé inhibida per aquest, resistent, o fins i tot estimulada, per elevades forces iòniques. En el mateix sentit s"interpretaria l'efecte de la protamina sulfat i dels detergents.

En definitiva, dificilment per aquestaa via podria arribar-se a cap conclusió determinativa sobre l'existència po no d'una activitat neutre independent de la LPL. Els següents experiments varen ésser fets no ja incidint sobre el sistema de valoració, sinó manipulant la mostrra (l'homogenat cel.lular) esperant obtenir algun tipus de resultat que indiqués més clarament la naturalesa de l'activitat TAGH neutre (-) sèrum. En aquest segon bloc d'experiments estudiàrem primer la localització subcel.lular de les diferents activitats.

Fraccionament subcel.lular

Les fraccions subcel.lulars les obtinguérem per centrifugació diferencial seguint el protocol descrit a l'apartat 2.2.4 i esquematitzat a la figura 2.7. A les tsaules 3.2 i 3.3 es mostra la distribució de les proteïnes i de l'activitat N-acetil- -glucosaminidasa. respectivament. A diferència dellque altres ha trobat tant en cor sencer (Wang i col., 1977) com a miòcits aïllats (Chohan i Cryer, 1979), nosaltres trobem que l la major part de la proteïna precipita a 700xg. Probablement és un reflex del diferent sistemadd'homogenació del teixit. Per tal de no provocar un exessiu trencament de les estructures vesiculars intracel.lulars, només sonicàrem breument la mostra destinada al fraccionament subcel.lular. A diferència dels altres autors, nosaltres no realitzàrem centrifugacions pèvies a 120xg per tal de precipitar cèl.lules no trencades, de forma que el nostre precipitat a 700xg inclou tant cèl.lules no trencades com precipitat nuclear i membranes plasmàtiques. La major part de la proteïna postnuclear és soluble (59% al S100), un 22% precipita a 10^5xg (P100), un 11% a 8000xg (P8) i un 8% a 13000xg (P13). Aquesta distribució concorda força amb la ja descrita a cor sencer (Wang i col., 1977) i a miòcits a ïllats (Chohan i Cryer, 1979).

En el treball original, Wang i col.laboradors (1977) caracteritzen les diferents fraccions valorant l"activitat de diferents marcadors subcel.lulars. Així, tot i detectar contaminacions de les diferents fraccions entre si, conclouen que el P.7 correspon a unaa fracció enriquida en nuclis, el P8 en mitocòndries, el P13 en lisosomes, el P100 en "microsomes" i el S100 corresponia al citosol. Seguint un protocol semblant, Chohan i Cryer (1979) identifiques tant a cor sencer com a miòcits aïllats les mateixes fraccions subcel.lulars, potser ells amb menors contaminacions creuades.

TAULA 3.2

DISTRIBUCIO DE LES PROTEINES ENTRE LES DIFERENTS FRACCIONS SUBCEL.LULARS

Fracció	Proteïna (%)
P.7	59.0±3.1
P8	4.6±0.7
P13	3.1±0.3
P100	9.0±0.9
S100	24.3±2.1

(n=10)

TAULA 3.3

DISTRIBUCIO SUBCEL.LULAR DE LA N-ACETIL-β-GLUCOSAMINIDASA

	H	P.7	P8	P13	P100	S100
nmol/h/mg prot.	46.4	42.8	83.6	91.4	82.2	30.9
Distribució (%)	100	69.7	3.3	4.2	13.1	9.8
Activitat específica relativa	1.0	0.9	1.8	2.0	1.8	0.7

mitjana de dos experiments

No era el nostre objectiu el realitzar un estudi molt acurat de distribució subcel.lular. Per això hagués calgut unà àmpli estudi amb marcadors de les diferents fraccions i una optimització del protocol de centrifugació , així com la introducció de centrifugacions amb gradients de densitat per l'eliminació de les impureses contaminats. Essent el nostre objectiuu principal el determinar específicament si les activitats TAGH neutres (±) sèrum coprecipitaven en les mateixes fraccions o no, només determinàrem la distribució d'un marcador lisosomal, la N-acetil- -glucosaminidasa. La fracció que tingué una més elevada activitat específica fou la P13, si bé també fou elevada a les P8 i P100 (taula 3.3), indicant que tant una com l'altre contenen lisosomes contaminants. També és la fracció P13 la que presentava una més elevada activitat específica relativa (definida com el cocient entre el % de l'activitat i el % de proteïna per cada fracció). Tot i ésser la fracció P13 la més enriquida en l'activitat N-acetil- -glucosaminidasa, només contenia el 4.2% del total d'activitat present al homogenat inicial. Wang i col.laboradors tampoc recuperen una proporció important d'activitat en aquesta fracció (9.5%). Si corregim per la deferència de recuperació al precipitat nuclear, donant un valor més comparable de distribució entre les fraccion postnuclears, nosaltres oobtenim un 12% a la fracció P13 iWang i col.laboradors (1977) un 14%. També Severson (1979b) obté en cor sencer, un 17% en una fracció P17 que correspon al conjunt cde motocòndriess i lisosomes en no interposar cap altre centrifugació entre aques ta i la que realitzaren a 1000xg per precipitar nuclis i restes de teixits. Mentre Wang i col.laboradors (1977) obteniren una major recuperació a la fracció P8 (42% de l'activitat al S.7), nosaltres l'obtenim a la P100 (43% de l'activitat al S.7). Probablement indicant que, mentre ells contaminaven principalment la fracciόm mitocondrial, nosaltres ho férem amb la "microsomal". Tant nosaltres com ells obtenim una proporció significativa d'activitat a la fracció solu-

ble (≈30% de l'activitat al S.7). Aquest aactivitat presumiblement correspon a lisosomes trencats en el pocés d'homogenació.

La distribució de l'activitat TAGH àcida és paral.lela a la de la N-acetil- -glucosaminidasa. Així la fracció P13 és la que té una més elevada activitat específica (taula 3.4) i una més elevada activitat específica relativa, recuperant-se però només un 12.6% de l'activitatt total, que corresponen a un 25% de la present al sobrenadant postnuclear. Tal com passava amb l'activitat N-acetil- -glucosaminidasa, laa major part de l'activitat la recuperàrem al P100 (23% del total, 46% del S.7). Resultats similars va obtenir Severson (1979b) amb homogenat de cor sencer i Stam i col.laboradors (1980) també amb homogenats de cor sencer d'animals alimentats amb dieta rica en àcid eurícic.

L'activitat TAGH neutre (-) sèrum es distribueix de forma diferent a l'àcida. Així, tant l'activitat específica com l'activitat específica relativa són màximes a la fracció P100, com també ho és el percentatge d"activitat recuperada (taula 3.5). Contràriament a l'àcida on la fracció S100 contenia molt poca activitat (5% del total), la TAGH neutre (-) sèrum a la fracció S100 té una activitat específica similar a la de l'homogenat cel.lular. Resultats similars obtingueren Wang i col.laboradors (1977).

A l'igual que per l'activitat TAGH neutre (-) sèrum, la determinada en la presència de sèrum presenta l'acticitat específica més elevada a la fracció P100, així com també el percentatge d'activitat recuperada en aquesta fracció és força elevat i representa el 54% de l'activitat del sobrenadant postnuclears(taula 3.6). També es recupera una proporció considerable d'activitat a la fracció soluble (29% de l'activitat del S.7). En miòcits aïllats ha estat descrita una distribució de LPL similar en termes d'activitat específica relativa

TAULA 3.4

DISTRIBUCIO SUBCEL.LULAR DE L'ACTIVITAT TRIACILGLICEROL HIDROLASA ACIDA

Fracció.....	H	P.7	P8	P13	P100	S100
Activitat específica (nmol/h/mg prot)	26.2±2.3	23.3±1.9	98.5±8.5	179.3±22.2	156.6±33.6	7.7±0.5
Distribució (%)	100	49.3±3.9	9.9±1.1	12.6±0.9	23.3±3.5	5.1±0.8
Activitat específica relativa	1.0	0.8±0.04	2.3±0.3	4.0±0.2	2.9±0.4	0.2±0.03

(n=8-10)

TAULA 3.5

DISTRIBUCIO SUBCEL.LULAR DE L'ACTIVITAT TRIACILGLICEROL HIDROLASA NEUTRE (-) SERUM

Fracció.....	H	P.7	P8	P13	P100	S100
Activitat específica (nmol/h/mg prot)	7.2±1.0	5.5±0.8	14.9±2.2	26.4±2.7	41.3±4.6	5.5±0.8
Distribució (%)	100	37.8±1.8	6.6±0.7	8.3±0.9	35.0±1.6	12.3±0.9
Activitat específica relativa	1.0	0.6±0.03	1.5±0.1	2.7±0.2	4.2±0.2	0.5±0.04

(n=10-12)

TAULA 3.6

DISTRIBUCIO SUBCEL.LULAR DE L'ACTIVITAT TRIACILGLICEROL HIDROLASA NEUTRE (+) SERUM

Fracció.....	H	P.7	P8	P13	P100	S100
Activitat específica (nmol/h/mg prot)	40.7±6.9	35.6±5.4	66.9±10.7	115.9±17.9	236.0±36.1	44.3±7.6
Distribució (%)	100	45.8±2.0	4.4±0.5	5.5±0.6	29.0±1.5	15.8±1.3
Activitat específica relativa	1.0	0.8±0.04	1.0±0.1	1.8±0.2	3.5±0.3	0.7±0.05

(n=10-12)

màxima a la fracció "microsomal" (Chohan i Cryer, 1979). Ara bé, ells obtingueren una més elevada recuperació a la fracció soluble (46% de l'activitat al S.7) que a la microsomal (16%). En el mateix treball descriuen una distribució similar de la LPL als homogenats de cor sencer.

Una comparació gràfica de les tres activitats TAGH es mostra a la figura 3.9, on es presenta la representació de De Duve (1975) en la que en abcisses figura el % de proteïna per fracció i en ordenades l'activitat específica relativa (% d'activitat/% de proteïna). L'aventatge d'aquest arepresentació és la de que ràpidament pot visualitzar-se les fraccions més enriquides amb les activitats i la quantitat d'activitat recuperada en cada fracció (proporcional a l'àrea del rectangle). Clarament s'observa que l'activitat TAGH àcida es distribueix de forma diferent a la TAGH neutre ($\pm$) sèrum. En aquesta figura no s'observen clarament les diferencies entre l'activitat neutre determinada en absència de sèrum i la determinada en la seva presència. Es per això que introduïm la figura 3.10, on directament es compara la distribució d'ambdues activitats . Donat que el percentatge d'activitat recuperada al sobrenadant postnuclear difereix (62% -sèrum, 54% +sèrum), la comparació del repartiment de les activitats entre les diferents fraccions postnuclears ha de corregir-se per aquesta diferència. Al panel A de la figura 3.10 es comparen la distribució entre les diferents fraccions postnuclears. En la fracció soluble (S100) es recupera un 10% més d'activitat (+) sèrum que (-) sèrum (29.3$\pm$2.3% vs 19.8$\pm$1.4%, p 0.01).Paral.lelament, la recuperació en les diferents fraccions particulades és menor per l'activitat (+) sèrum que per la (-) sèrum. En el mateix sentit, en cor sencer es trobà que es recuperava en la fracció soluble un 34% de l'activitat postnuclear neutre mesurada en presència de sèrum i noméssun 19% de la mesurada en absència de sèrum (Wang i col., 1977). Com es comentava anteriorment, Chohan i

FIGURA 3.9 "DE DUVE PLOT" DE LA DISTRIBUCIO SUBCEL.LULAR DE LES ACTIVITATS TAG HIDROLASES

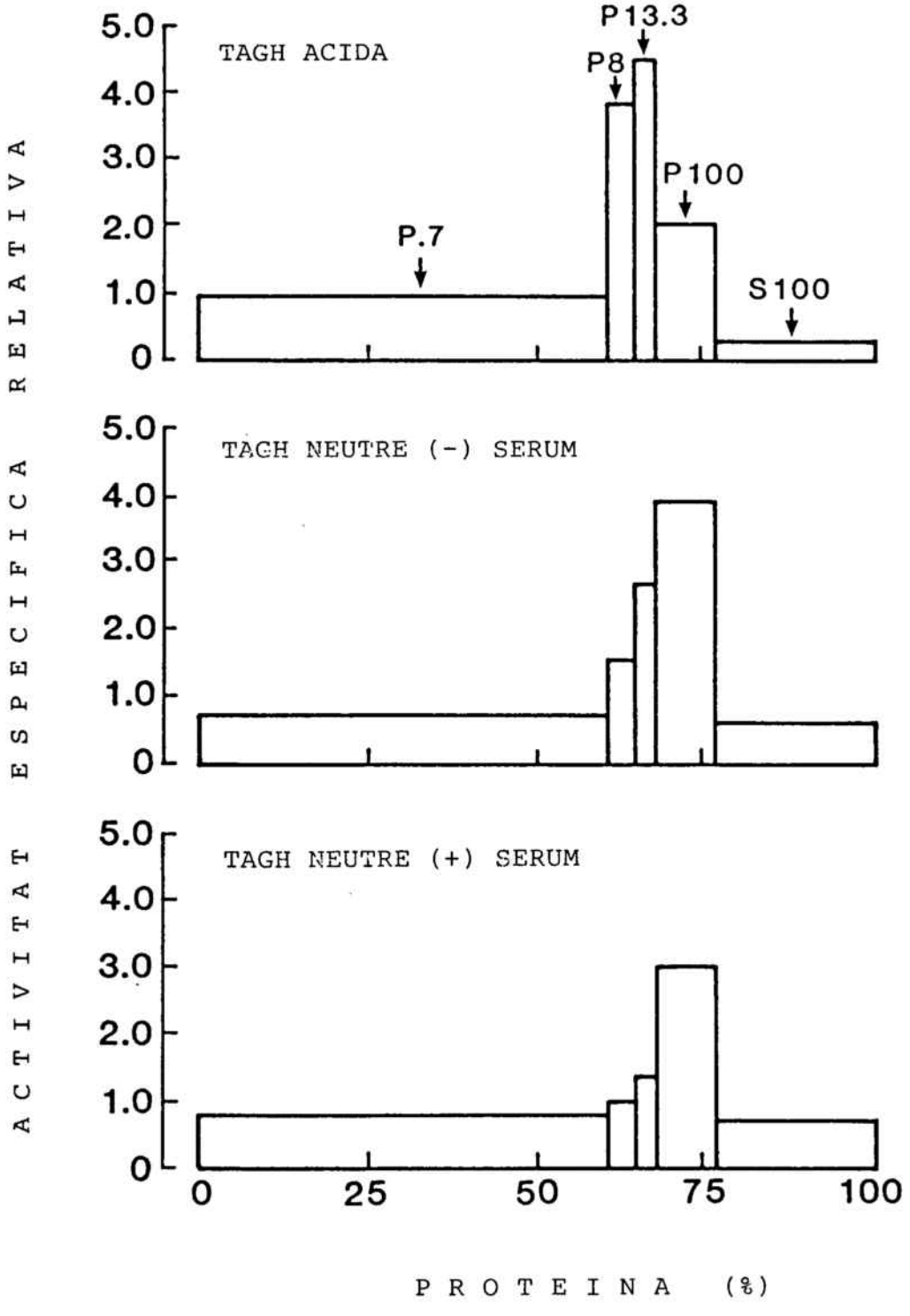
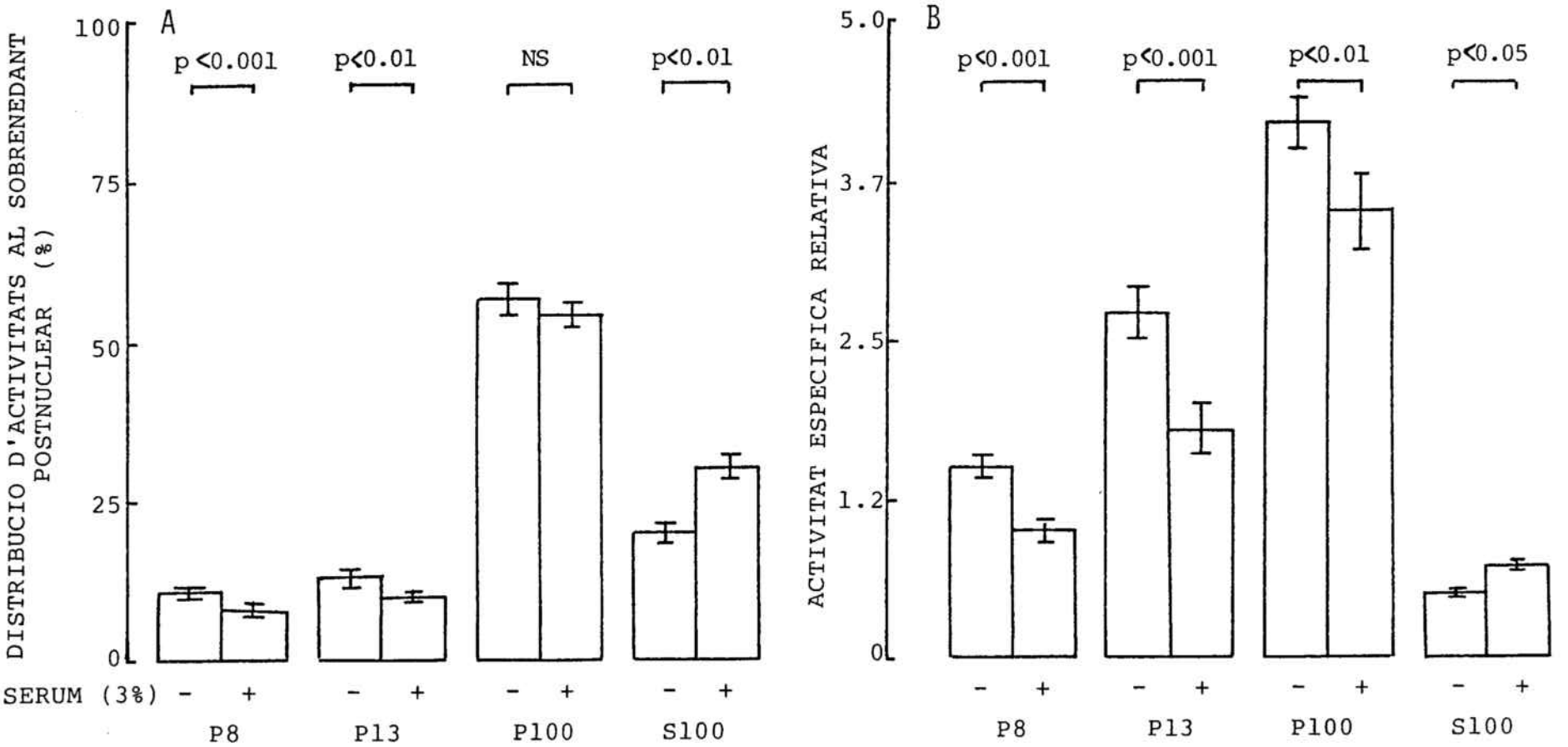


FIGURA 3.10 COMPARACIO DE LA DISTRIBUCIO SUBCEL.LULAR DE LES ACTIVITATS TAG HIDROLASES NEUTRES



Cryer (1979) recuperaren un 46% d'activitat LPL post-nuclear a la fracció soluble, tant a cor sencer com a miòcits aïllats. L'activitat específica relativa de les activitats (±) sèrum a les diferents fraccions post-nuclearsa es comparen al panel B de la figura 3.10. Com passava amb el percentatge de distribució, a les fraccions particulades l'activitat específica relativa de la TAGH nuetre (-) sèrum és més elevada que la de l'activitat TAGH neutre (+) sèrum i, contràriament, a la fracció soluble la de l'activitat mesurada en presència de sèrum és superior a la de l'activitat mesurada en absència de sèrum.

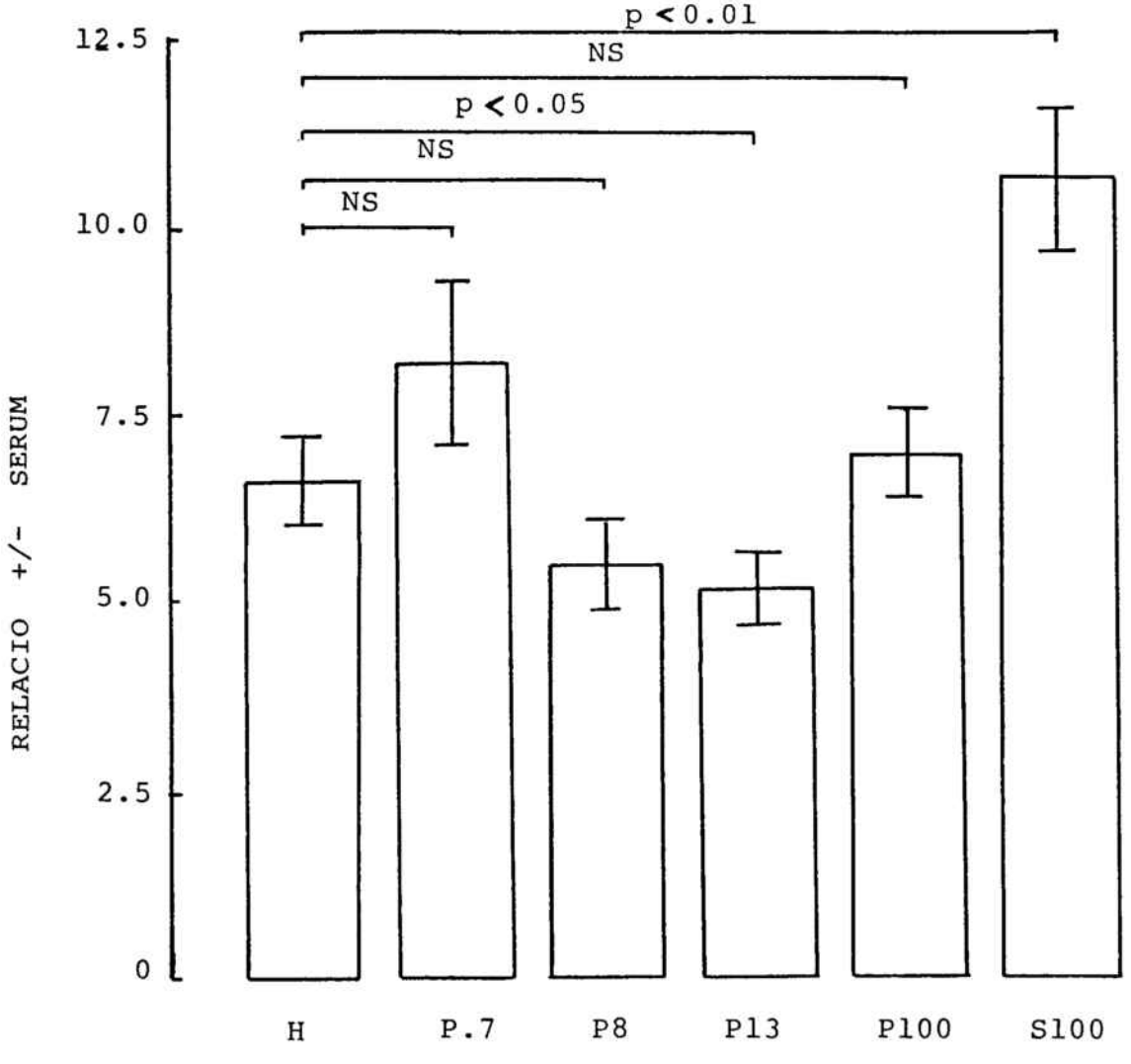
En resum, existeixen clares diferències qualitatives entre la distribució de l'activitat TAGH àcida i la distribució de les activitats TAGH (±) sèrum, essent l'àcida lisosomal (com ha estat descrit per aquesta activitat a d'altres tipus cel.lulars i teixits) i les neutres "microsomals" majoritàriament. Existeixe a més, diferències quantitatives entre la distribució de l'activitat (+) sèrum respecte de la (-) sèrum. Aquestes diferències són les que provoques que la relació d2activitats +/- sèrum sigui vora del doble a la fracció soluble respecte de les particulades (figura 3.11).

Alliberament amb heparina

Es ben conegut que la presència d'heparina estimula l'alliberament de LPL al medi d'incubació tant a cèl.lules mesenquimals en cultiu de cor de rata (Chajek i col., 1978), com a miòcits aïllats de cors de rata adulta (Chohan i Cryer, 1980). Així doncs, nosaltres estudiàrem l'efecte d'una incubació amb heparina durant un temps curt (2 minuts) a 37°C, amb 10 unitats/ml d'heparina sobre l'aparició d'activitats TAG hidrolases al medi d'incubació. En condicions basals, al medi d'incubaci pot detectar-se certa quantitat d'activitat TAGH neutre (+) sèrum que correspon a un 6% de l'activitat

FIGURA 3.11

RELACIO D'ACTIVITATS +/- SERUM A LES DIFERENTS FRACCIONS SUBCEL.LULARS

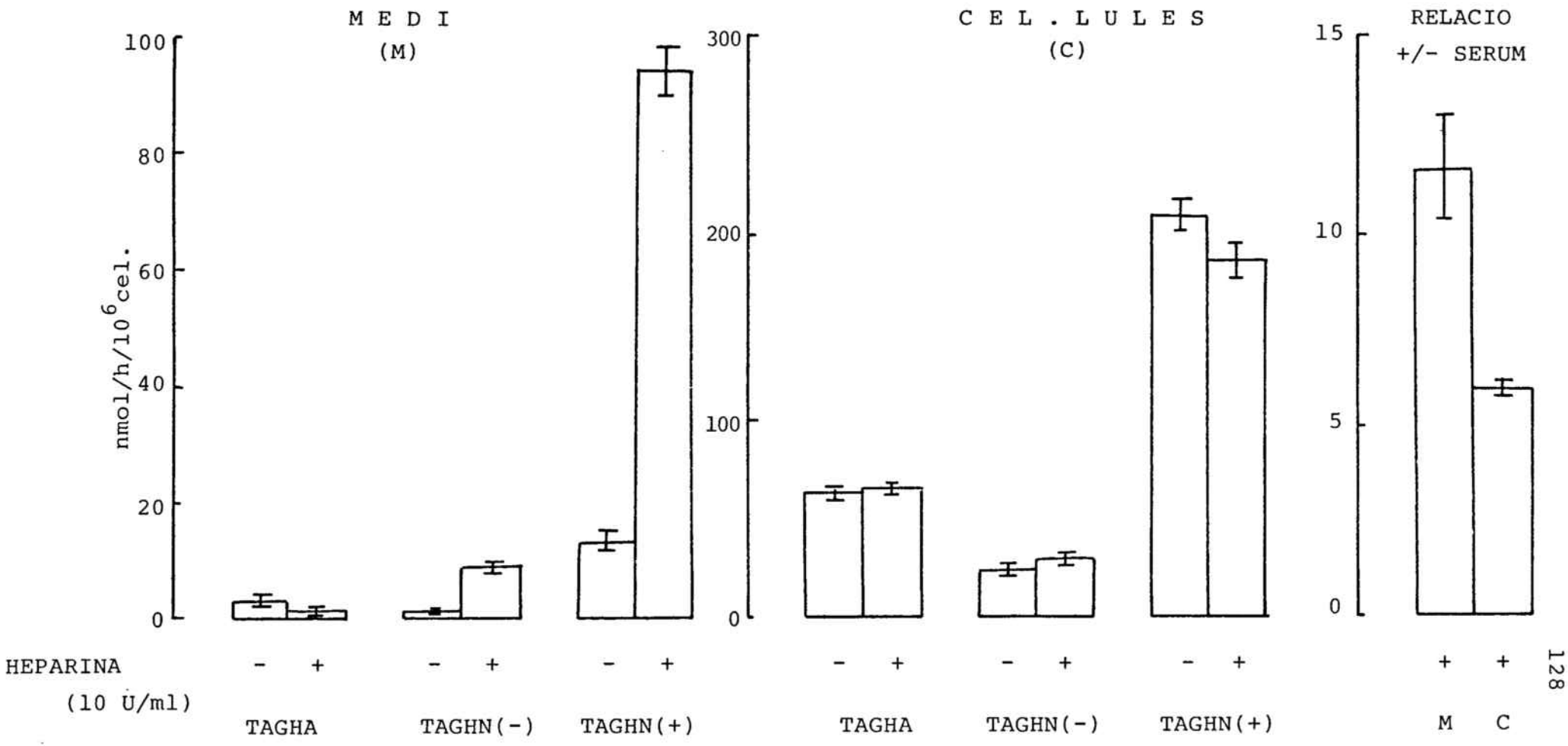


total (figura 3.12). Els nivells d'activitat TAGH àcida o neutre (-) sèrum eren molt en el límit de sensibilitat del mètode de valoració. L'activitat TAGH àcida del medi, ni la de les cèl.lules, nieen conseqüència la total, foren afectades per la incubació de les cèl.lules amb l'heparina (la disminució dels ja molt baixos nivells d'activitat TAGH àcida al medi, sens dubte poden ésser atribuïts a la presència d'heparina a concentració de 1.2 unitats/ml a l'assaig final de l'activitat). La incubació amb heparina provocà un important augment d'ambdues activitats neutres al medi d'incubació. Donat que no s'afectà de forma important l'activitat a les cèl.lules, l'activitat total (medi+cèl.lules) augmentà. Aquest augment d'activitat total s'ha produït en un temps extraordinàriament curt, en el que creiem que no pot considerar-se un augment de la síntesi de nou enzim. En aquesttsentit s'ha trobat que la inhibició de la síntesi proteica mab cicloheximida no afectà a temps curts l'alliberament, per cèl.lules mesenquimals en cultiu de cor de rata, de LPL al medi en presència d'heparina , però sí que interferí amb l'alliberament a temps més llargs (més de 15 minuts) (Chajek i col., 1978).

En no ésser la LPL totalment dependent de la prsència de sèrum, no és estrany que també hagi augmentat l'activitat al medi mesurada en absència de sèrum. Es de destacar però, que la relació d'activitats +/- sèrum en el medi d'incubació de l'erlenmeyer on havíem posat heparina, fou aproximadament el doble que la relació +/- sèrum a l'intrerior de les cèl.lules del mateix erlenmeyer.

Tant aquests experimentsd d'alliberament amb heparina com els anteriors de distribució subcel.lular ens mostren dues situacions on està alterada la relació d'activitats +/- sèrum de la TAGH neutre. Podíem interpretar ambdós experiments com a indicadors de l'existència d'una entitat molecular diferenciada de la LPL. A-

FIGURA 3.12 EFECTE DE LA INCUBACIO AMB HEPARINA SOBRE L'ALLIBERAMENT DE LES ACTIVITATS TAG HIDROLASES AL MEDI



questa activitat hauria d'ésser bé insensible, bé inhibida, per sèrum. Podria, si bé no necessàriament, ésser resistent o fins i tot estimulada per NaCl i protamina sulfat. la seva localització preferentment particulada i la seva no alliberabilitat per heparina justificarien els resultats obtinguts en els dos darrers experiments.

En front d'aquesta interpretació pot encara argüir-se que l'observat tant a la distribució subcel.lular com a l'alliberament amb heparina, no són més que diferències reals en la dependència del sèrum per part de la LPL provocades per artefactes experimentals. Cal tenir present que aquelles mostres on la relació +/- sèrum és més elevada (o dit d'altre manera, la dependència del sèrum és major) són en les que l'enzim és soluble i també la quantitat de fosfolípids presents a la mostra és menor. En les fraccions particulades la LPL es troba lligada a les membranes, doncs no la solubilitzen ni la sonicació, ni el xoc hiper- o hipo-osmòtic,ni l'heparina; només ho fa la incubació amb detergents (resultats no presentats). Molt probablement, la conformació que tingui la LPL quan lligada a les membranes sigui diferent de la que tingui en estat soluble i és possible, al menys teòricament, que la diferent conformació comporti una major o menor dependència del sèrum. Independentment d'aquesta possibilitat, és ben cert que a l'homogenat cel.lular i a les fraccions particulades la presència de fosfolípids és elevada. No podem ara calcular la concentracióoexacta d'aquests a les diferents fraccions subcel.lulars, però sí que podem aproximar un càlcul perr l'homogenat cel.lular. Els cardiomiòcits aïllats contenen uns 130 nmol/10^6cel. de fosfolípids (Kryski i col., 1985b). A partir d'aquest valor podem calcular una concentració aproximada de 0.02 mM al tub d'assaig on valorarem les activitats pel cas de l'homogenat cel.lular. En canvi, si la mostra és el medi d'incubació, la concentració de fosfolípids és nul.la. No sabem fins a quin punt aquests, en el cas de l'homo-

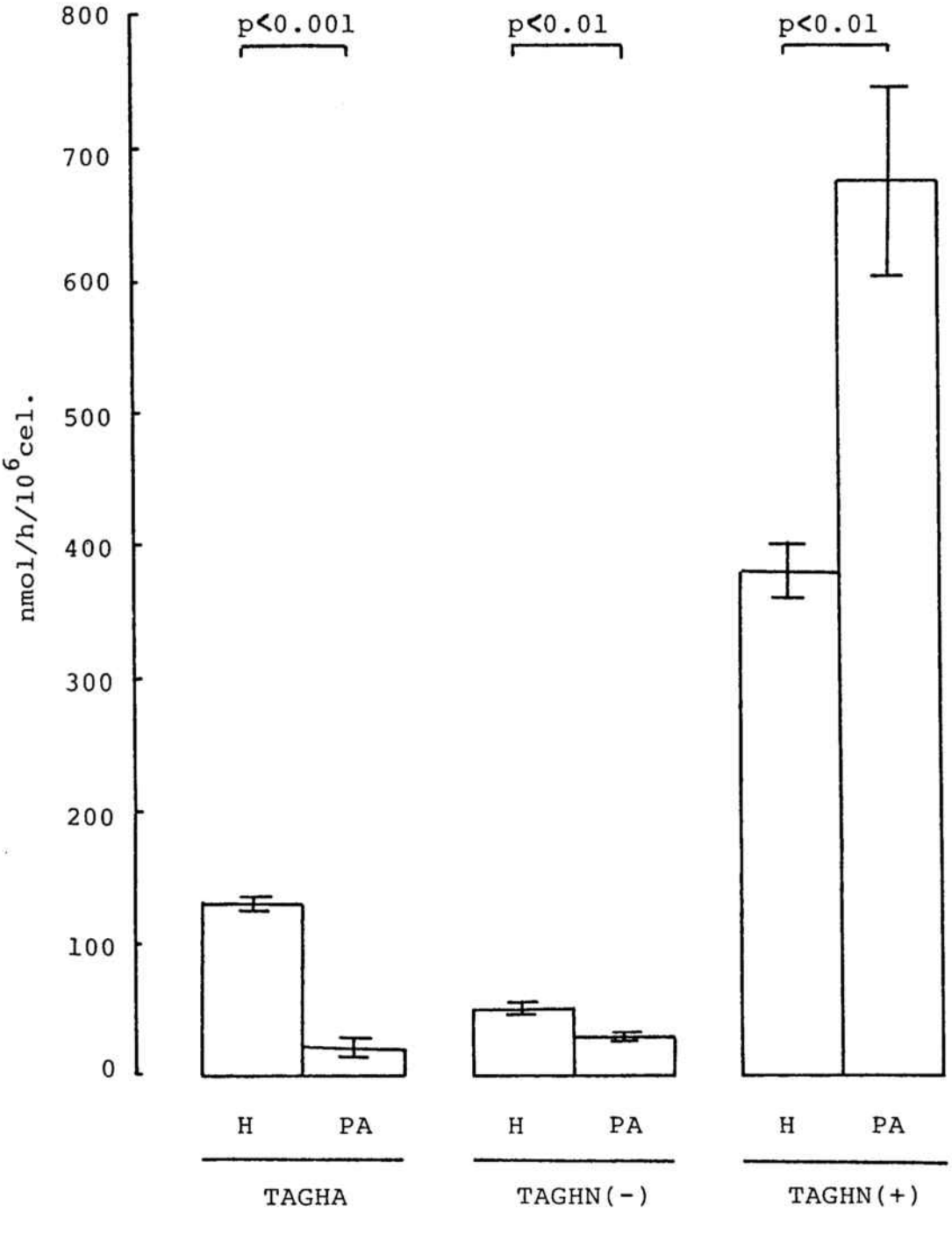
genat, s'associaran amb el substrat alterant-lo, i no podem calcular quina serà la relació molar fosfolípids/ trioleïlglicerol a la interfase lípid-aigua. Segur però, serà diferent en el cas de que la mostra sigui el nedi d'incubació, on aquesta relació val zero. Per altre banda, ha estat demostrat que la dependència per l'apo C-II de la LPL purificada de llet bovina, depen de la relació molar fosfolípids/trioleïlglicerol a la interfase on l'enzim actua (Vainio i col., 1983). Així, si bé no podem arribar a quantificar acuradament aquest possible artefacte, sí que ens justifica un dubte raonable sobre qualsevol interpretació dels experiments de distribució subcel.lular i d'alliberament amb heparina.

Pols acetòniques d'homogenats cel.lulars

El mateix tipus d'argumentació pot aplicar-se al darrer experiment d'aquest segon bloc. Prepararem pols acetòniques d'homogenats cel.lulars i determinarem en elles les diferents activitats TAG hidrolases. Mentre que tant l'activitat TAGH àcida com neutre (-) sèrum no resistiren el tractament (85% i 42% de disminució d'activitat respectivament, figura 3.13), la TAGH neutre (+) sèrum augmentà l'activitat un 78%. Com a conseqüència, la relació d'activitats +/- sèrum passà d'ésse 7.8 a l'homogenat a ésser 23.8 a la pols acetònica. Altres autors han observat també una més elevada activitat LPL en pols acetòniques que als homogenats cel.lulars (Chohan i Cryer, 1978; Vahouny i col., 1980). Considerant que la major part és microsomal, Chohan i Cryer (1979) concloguéren que l'augment d'activitat es devia a que el tractament amb els dissolvents orgànics, en desferr les estructures membranoses, feia assequible una proporció d'enzim que, en estar a l'interior de les vesícules microsomals, en un homogenat no eren accessibles al substrat.

FIGURA 3.13

ACTIVITATS TAG HIDROLASES EN HOMOGENATS CEL.LULARS I POLS ACETONIQUES



(n=5)

3.1.3.- Inactivació tèrmica i efecte d'anticossos anti-LPL

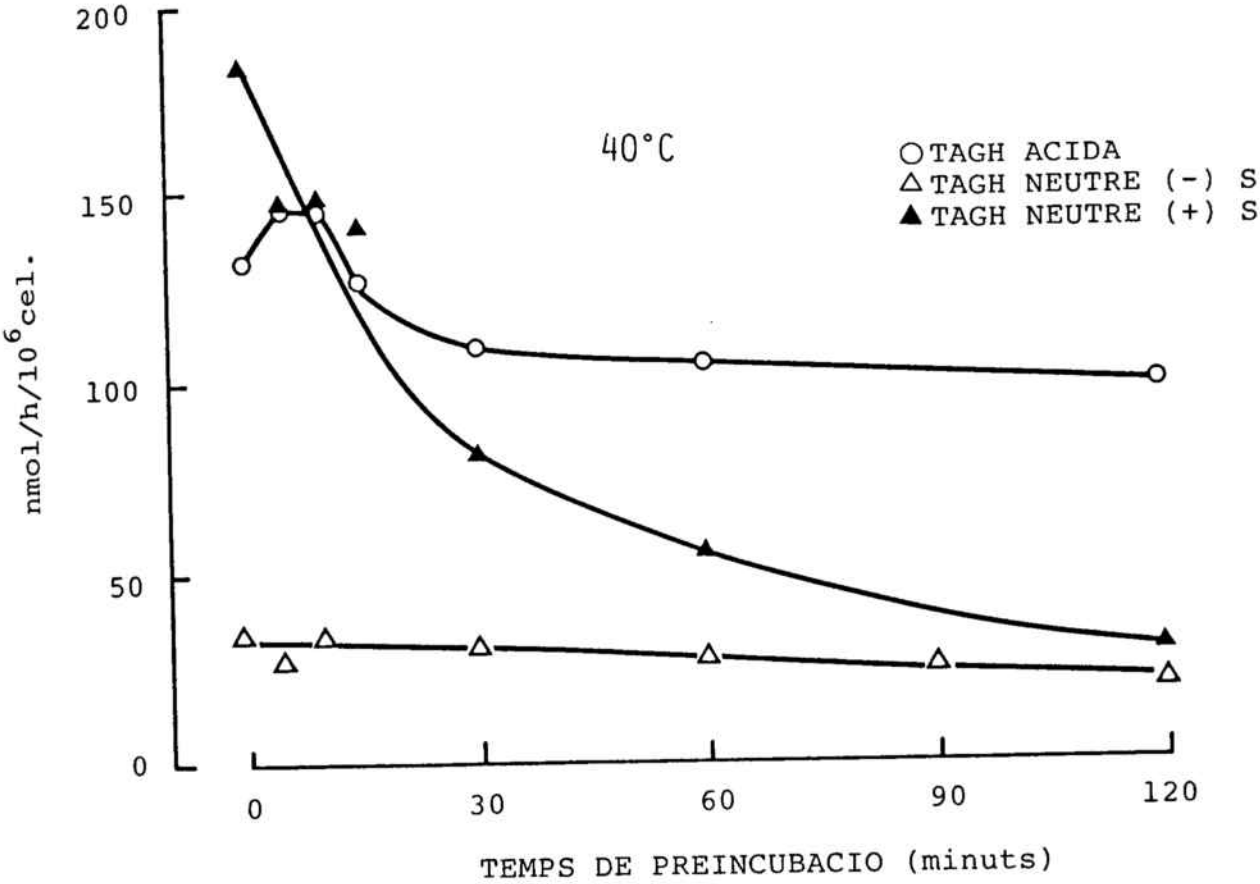
Inactivació tèrmica

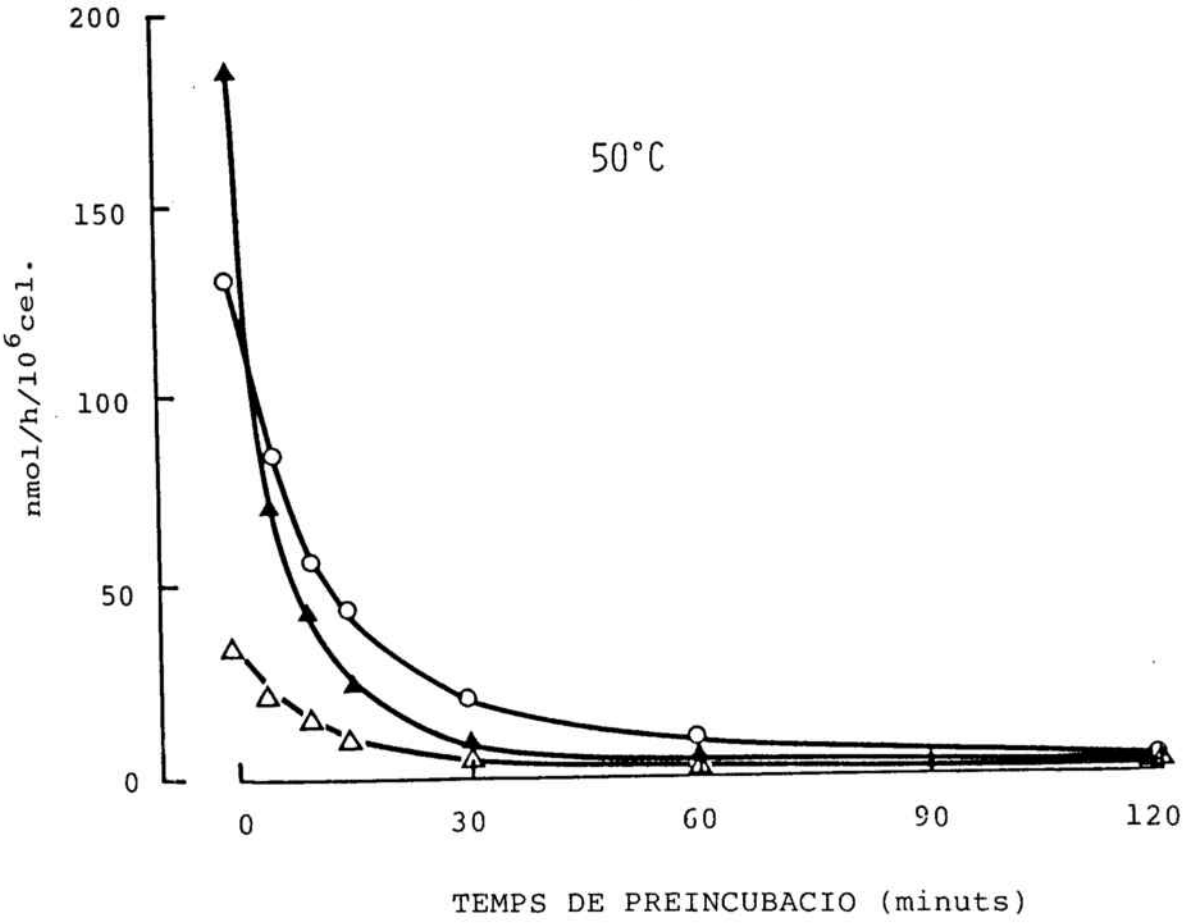
Si bé anàvem acumulant resultats que podien suggerir l'existència d'una activitat diferenciada de la LPL, no era possible en aquest moment concloure res definitivament. Com a darrer bloc d'aquesta primera part ens plantejàrem realitzar dos experiments diferents on no alteràrem les condicions d'assaig ja establertes, ni tampoc manipularem les mostres de forma que els resultats no fossin tant directament comparables.

Primerament estudiàrem la sensibilitat a la inactivació tèrmica. Per això, seguint ellprotocol descrit a l'apartat 2.2.6, determinàrem les variacions de les diferents activitats TAGH (mesurades a 30°C) en funció del temps d'incubació prèvia a 40°C o a 50°C. Al panel superior de la figura 3.14 es mostren el resultats d'un experiment representatiu dels dos que férem a 40°C, ial pane inferior els resultats de la preincubació a 50°C d'altre alíquota de la mateixa mostra emprada pel experiment del panel superior. A 50°C férem cinc experiments diferents. A 40°C es produeix una ràpida inactivació de la TAGH neitre (+) sèrum, de forma que a les dues hores s'ha perdut ja un 84% de l'activitat inicial. Contràriament, l'activitat TAGH neutre (-) sèrum perd només un 44% de l'activitat inicial en el mateix període de temps. La TAGH àcida és també relativament estable. A 50°C totes les activitats TAG hodrolases s'inactivaren molt més ràpidament, de forma que ja als 30 minuts s'havia perdut més del 80% de l'activitat inicial a totes elles. De totes formes, també fou més sensible l"activitat (+) sèrum que la (-) sèrum. Alíquotes de les mateixes mostres mantingudes a 0°C pel mateix període de temps no perderen gens d'activitat (resultat no mostrat), de forma que les variacions observades són realment atribuibles al tempsd de preincubació a les elevades temperatures.

FIGURA 3.14

INACTIVACIO TERMICA DE LES ACTIVITAT TAGH D'HOMOGENATS CEL.LULARS





A partir d'aquestes corbes i de la seva linealització, calculàrem les constants d'inactivació per a cada temperatura i activitat valorades, Els valors d'aquestes constants es representen a la taula 3.7. L'activitat TAGH àcida i la neutre (-) sèrum tenen constants d'inactivació molt semblants tant a 40°C com a 50°C, essent les de 50°C unes 5-6 vegades superiors. L'activitat TAGH neutre (+) sèrum té una constant d'inacti-v vació tant a40°C com a 50°C unes 2.0-2.5 vegades superior al de la TAGH neutre (-) sèrum, mostrant clarament la més elevada sensibilitat tèrmica d'aquella activitat.

No coneixem dades a la bibliografia referents a constant d'inactivació tèrmica per les activitats mesurades, llevat d'un únic treball realitzat amb diferents soques de ratolí on s'estudià la inactivació de la LPL de cor i de teixit adipós blanc a 52°C i a 54°C respectivament (Ben-Zeev i col., 1983). Existeixen nombroses diferències entre aquest treball i el nostre. Per una banda aquests autors utilitzen cor sencer de ratolí homogenat en un tampó diferents del nostre (barbital 5 mM, glicerol 20% (v/v), pH 7.2), si bé la concentració de proteïna final és semblant a lanostre (uns 5 mg/ml). Per altre banda, no realitzen una coba sencera sinó que determinen l'activitat residual després de 40-60 minuts. Finalment utilitzen per cada teixit una temperatura diferent i superior a la nostra. Malgrat tot, el valor que obtenen per la LPL de cor, promig de les diferents soques, és de 31.2×10^{-3} min^{-1} que, sorprenentment, és molt similar al nostre de 50°C per l'activitat TAGH neutre (+) sèrum (34.8×10^{-3} min^{-1}). Si aquesta similitud és fruit de la casualitat o, pel contrari, reflecteix algun tipus d'identitat entre les seves mostres i les nostres ens és impossible de judicar.

Efecte dels anticossos anti-LPL

Potser, l'indici més sòlid de tots els presentats en aquesta primera part sobre l'existència d'una acti-

TAULA 3.7

CONSTANTS D'INACTIVACIO TERMICA A 40°C I 50°C DE LES ACTIVITATS TAG HIDROLASES EN HOMOGENATS CEL.LULARS

Activitat	Temperatura	k (min^{-1})		n
1	40°C	$3.0\pm0.5x10^{-3}$		2
1	50°C	$18.6\pm5.3x10^{-3}$		4
2	40°C	$3.5\pm0.1x10^{-3}$		2
2	50°C	$17.5\pm7.9x10^{-3}$	]	5
3	40°C	$8.7\pm2.4x10^{-3}$	*	2
3	50°C	$34.8\pm8.8x10^{-3}$	]	5

*: diferències significatives ($p < 0.01$)

Activitat 1: TAGH àcida
Activitat 2: TAGH neutre (-) sèrum
Activitat 3: TAGH neutre (+) sèrum

vitat TAGH neutre diferenciada de la LPL, l'obtinguérem utilitzant IgG específiques contra LPL purificada de cor. Aquestes IgG foren obtingudes en cabra immunitzada amb LPL purificada de cor de rata (Schotz i col., 1977). Amb aquestes IgG es demostrà prèviament que inhibien tant la LPL d'extractes de cor de rata, com de reixit adipós o de glàndula mamària del mateix animal, eren inefectives però contra l'anomenada lipasa hepàtica (alliberable amb heparina) (Schotz i col., 1977). Com auquests experiments havien estat fets determinant l'activitat en presència de sèrum, calia comprovar que el que fessin les IgG no fós el bloquejar el lloc d'unió a l'apo C-II. Per tal de comprovar-ho utilitzàrem LPL alliberada en perfundir cors de rata amb heparina. Com es mostra a la figura 3.15, quantitats creixents d'IgG anti-LPL inhibiren en un mateix grau l'activitat mesurada en presència i en absència de sèrum. Aquest resultat demostra que les IgG no estan dirigides, al menys principalment, contra el lloc d'unió de l'apo C-II. Fet que concorda amb el trobat per altres grups d'investigadors treballant també amb anticossos policlonals, si bé obtinguts en conills contra LPL de llet bovina (Shirai i col., 1982; Olivecrona i Bengtsson, 1983). Ambdós grups troben que els seus anticossos estan dirigits principalment contra el lloc d'unió al substrat lipídic. Recentment però, han estat obtinguts anticossos monoclonals contra el lloc d'unió de l'apo C-II a la LPL de la llet bovina (Voyta i col.,1985). Ara bé, al menys pel que dels nostres resultats preliminars es despren, els anticossos que nosaltres empràrem no sembaven dirigits específicamentcontra ell lloc d'unió de l'apo C-II.

En base a aquest supòsit realitzàrem els darrers experiments d'aquesta primera part. Incubàrem homogenats cel.lulars amb quantitats creixents d'anticossos anti-LPL i determinàrem les variacions de les activitats valorades en presència i en absència de sèrum. Al panel A de la figura 3.16 es mostra el resultat d'un experiment típic. Mentre que les IgG no específiques

FIGURA 3.15

EFECTE DE LES IMMUNOGLOBULINES G ANTI-LPL SOBRE L'ACTIVITAT LPL ALLIBERADA AMB HEPARINA DE CORS DE RATA PERFUNDITS

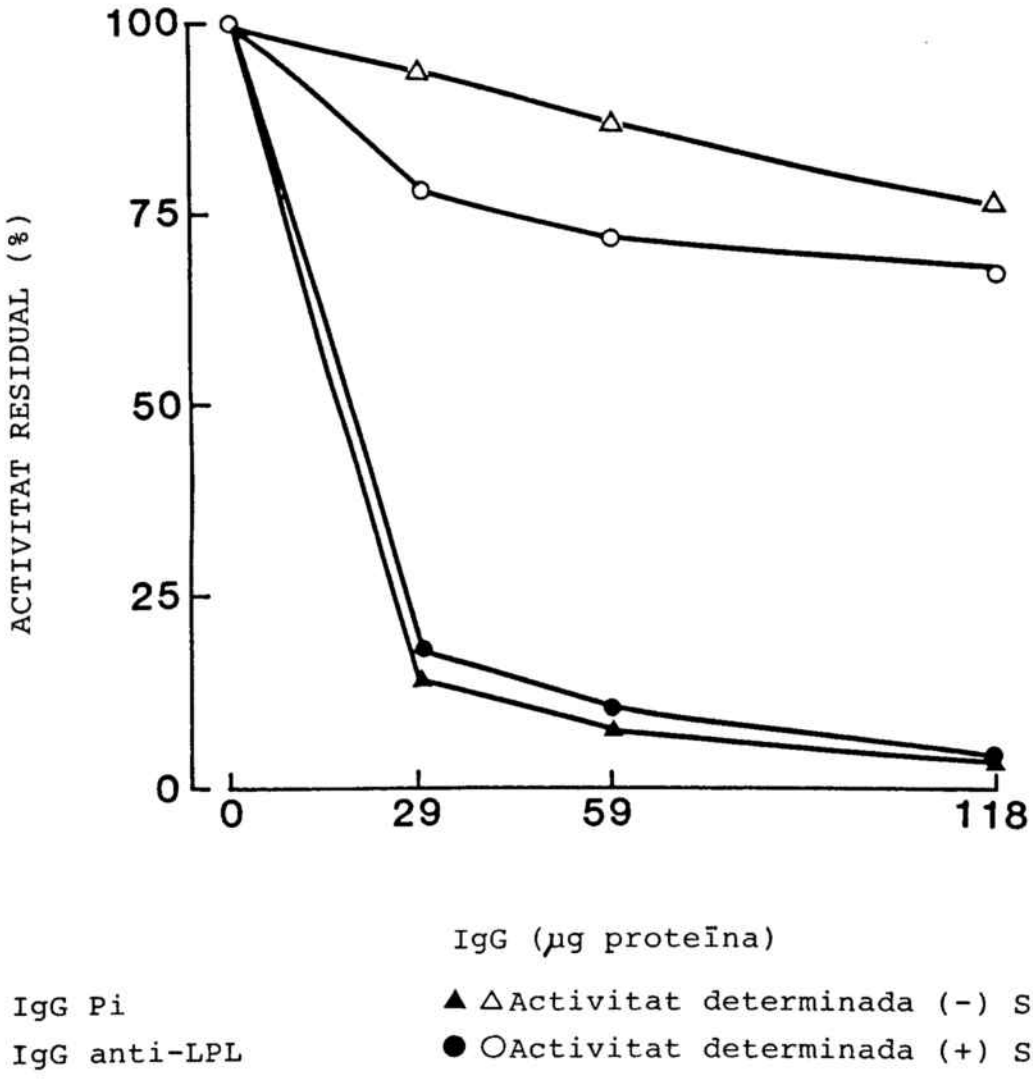
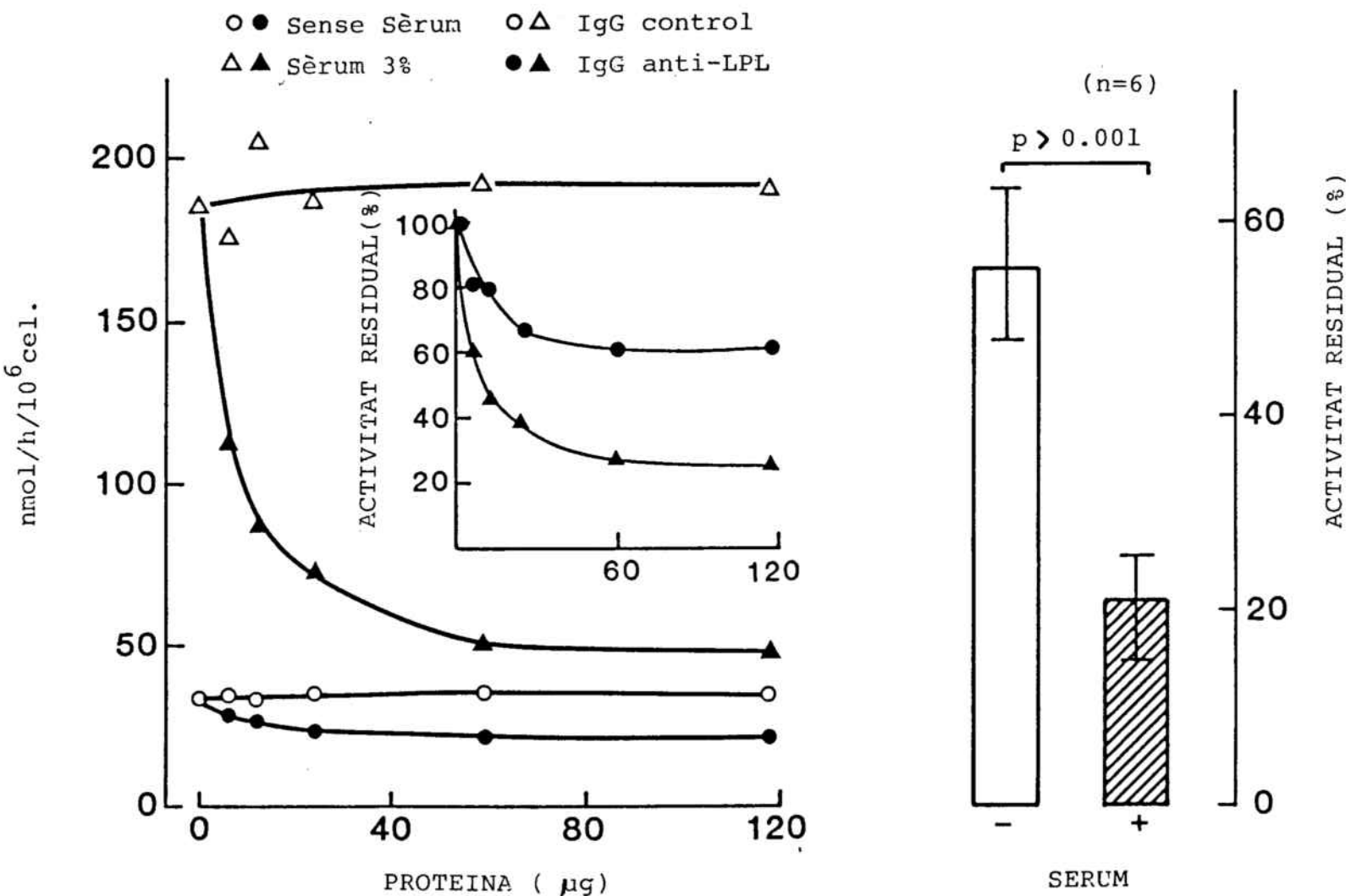


FIGURA 3.16 EFECTE DE LES IMMUNOGLOBULINES G ANTI-LPL DE COR SOBRE LES ACTIVITATS TAG HIDLOSASES NEUTRES



no afectaren ni a l'activitat TAGH neutre (+) sèrum ni a la mesurada en absència de sèrum, ambdues foren progrssivament inhibides en incrementat la quantitat de IgG anti-LPL afegides. A partir de 60 ug IgG no augmentà el grau d'inhibició. Aquest experiment representatiu fou realitzat amb l'anticòs de títol més elevat, el que anomenàrem Ab_1. En principi aquest resultat és similar a l'obtingut per Stam i Hülsmann (1983).

Si bé ambdues activitats s'inhibeixen, la sensibilitat de l'activitat (-) sèrum és molt inferior a la l'activitat (+) sèrum. Això es veu clarament a la representació de les variacions de les activitats normalitzades a 100 com a activitat inicial (fig. 3.16A, representació inserta). Clarament l'activitat (-) sèrum s'inhibeix menys que la (+) sèrum. al panel B de la mateixa figura 3.16 presentem el resum de sis experiments independents (quatre realitzats amb Ab_1 i dos amb l'Ab_2) on es representa l'activitat residual percentual obtinguda amb una quantitat d'anticòs "saturant" (veure apartat 2.2.7). Mentre que l'activitat (+) sèrum s'inhibeix en un 75%, l'activitat (-) sèrum només en un 45%, essent les diferencies altament significatives (p 0.001). Aquesta diferència de sensibilitat, clarament observada a les nostres mostres, també pot observar-se en els resultats de Stam i Hülsmann (1983). Ara bé, rn base a que arriben a inhibir quasi completament ambdues activitats, ells no consideren les diferències de sensibilitat com un fet remarcable, especialment donat que ambdues activitats se'ls hi lliguen a columnes d'heparina-sefarosa d'on són eluïdes amb elevades concentracions de NaCl, com és característic de la LPL.

Tot i que també aquest darrer experiment podria ésser criticat en la seva conclusió pel fet de que havíem comprovat la hipòtesi inicial en un tipus de mostra (perfundit amb heparina) amb característiques diferenciades clarament d'aquella (homogenat cel.lular) amb la que després extreiem conclusions, nosaltres arribàrem

al final d'aquesta part amb la sospita, crèiem que fundada, de l'existència d'una TAG hidrolasa activa a pH neutre i distinta de la LPL. Pensàvem que aquesta activitat, conjuntament amb aquella activitat de la LPL que s'expressa en absència de sèrum o d'apo C-II, era el que observàvem en valorar a pH 7.5, en presència dee $MgCl_2$, albúmina 7.6 uM i en absència de sèrum.

3.2.- RESOLUCIO DE LES DIFERENTS ACTIVITATS TRIACILGLICEROL HIDROLASES PER CROMATOGRAFIA D'AFINITAT EN HEPARINA-SEFAROSA

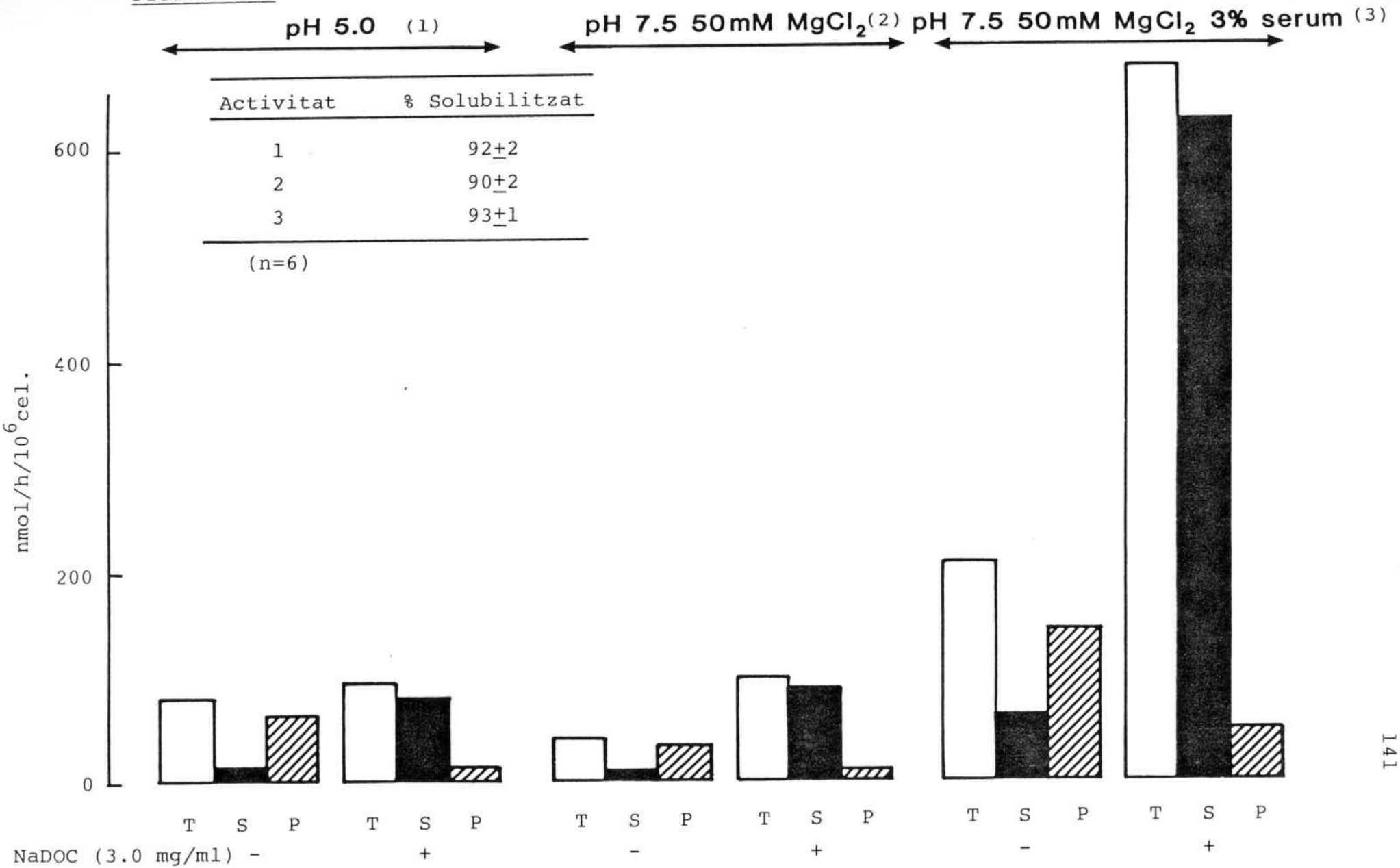
Les diferents vies d'aproximació emprades fins el moment no havien permès d'obtenir una conclusió definitiva sobre l'existència d'una TAGH neutre diferenciada de la LPL. Només una separació física d'ambduessactivitats podria demostrar la seva existència. Per això, utilitzàrem la tècnica de cromatografia d'afinitat emprant gels d'heparina-sefarosa, dons és ben conegut que la LPL es lliga a aquests gels i s'elueix només amb elevades concentracions de NaCl, essent aquest el pas més important en el procés de purificació d'aquests enzim.

3.2.1.- Solubilització de les activitats TAG hidrolases

Donat que totes les activitats TAG hidrolases (l'àcida i les neutres) eren majoritàriament particulades (taules 3.4 a 3.6), calgué primerament solubilitzar-les.Dels diferents mètodes estudiats, el que donà millors resultats fou la utilització de detergents. Mostrem els resultats obtinguts amb el deoxicolat sòdic (NaDOC) que fou el que posteriorment utilitzàrem.

A la figura 3.17 es mostra el resultat d'un experiment representatiu en el que s'utilitzà NaDOC 7.2 mM. Totes tres activitats foren solubilitzades quasi completament amb aquest tractament (90-93% de l'activitat total fou solubilitzada). També augmentà , si

FIGURA 3.17 SOLUBILITZACIO DE LES ACTIVITATS TAG HIDROLASES AMB DEOXICOLAT SODIC



bé no tant dramàticament la proporció de proteïna recuperada en la fracció solubilitzada (60% vs 27% als controls). Curiosament, tant a la TAGH (-) sèrum com a la (+) sèrum, l'activitat total augmentà considerablement després de la incubació de l'homogenat amb el NaDOC. Així, l'activitat específica de les TAGH (-) i (+) sèrum a l'homogenat augmentà 2.1 i 2.7 vegades respectivament (taula 3.8). Es també interessant constatar que l'augment en la proporció d'activitat soluble, s'associa amb un augment de les activitats específiques a aquestes fraccions. Així, a la fracció soluble de les mostres tractades ambNaDOC, les activitats específiques de les TAGH (-) i (+) sèrum foren 2.4 i 1.5 vegades superiors a les de l'homogenat incubat amb el detergent. Contràriament, a la fracció soluble de la mostra no tractada amb el NaDOC, les activitats específiques fore, fins i tot, inferiors a les de l'homogenat original (taula 3.8). A l'activitat TAGh àcida, l'homogenat i la fracció soluble de la mostra tractada amb NaDOC tenen la mateixa activitat específica, ara bé, quan no s'incubà amb el detergent, la fracció soluble la tenia unes 2.2 vegades inferior. Així doncs, la utilització de NaDOC (segons el protocol descrit a la figura 2.8) provoca una solubilització eficient de totes les activitats TAG hidrolases. Especialment considerant que la presència de NaDOC, quina concentració final al medi de valoració era de 0.15 mM, podia estar inhibint sensiblement l'activitat TAGH neutre |+) sèrum (figura 3.8) i per tant, provocant una subestimació de la recupéració real d'aquesta activitat.

Aquest efecte del NaDOc sobre l'activitat LPL havia estat descrit prèviament per Chohan oi Cryer (1979). Ells observàren que la incubació de microsomes aïllats d'homogenats de cor amb NaDOC 3.5 mg/ml durant 10 minuts a 30°C augmentà tant l'activitat total (2.6 vegades) com la proporció soluble (61% vs 31%). Aquest efecte probablement és equivalent al del tractament amb acetona/ èter, en el sentit de que desfaria les estructures mem-

TAULA 3.8

ACTIVITATS ESPECIFIQUES DE LES ACTIVITATS TAG HIDROLASES SOLUBILITZADES AMB DEOXICOLAT SODIC

Activitat	Activitat específica (nmol/h/mg prot)			
	(-) NaDOC		(+) NaDOC	
	Homogenat	Soluble	Homogenat	Soluble
TAGH àcida	15.0	6.8	16.0	11.4
TAGH neutre (-)	8.4	7.3	17.6	43.1
TAGH neutre (+)	40.5	30.6	111.0	160.7

mitjana de dos experiments

branoses i, en fer-ho, alliberaria quantitats d'enzim que no eren assequibles al substrat. Això explicaria l'augment d'activitat tant total com específica a l'homogenat cel.lular.

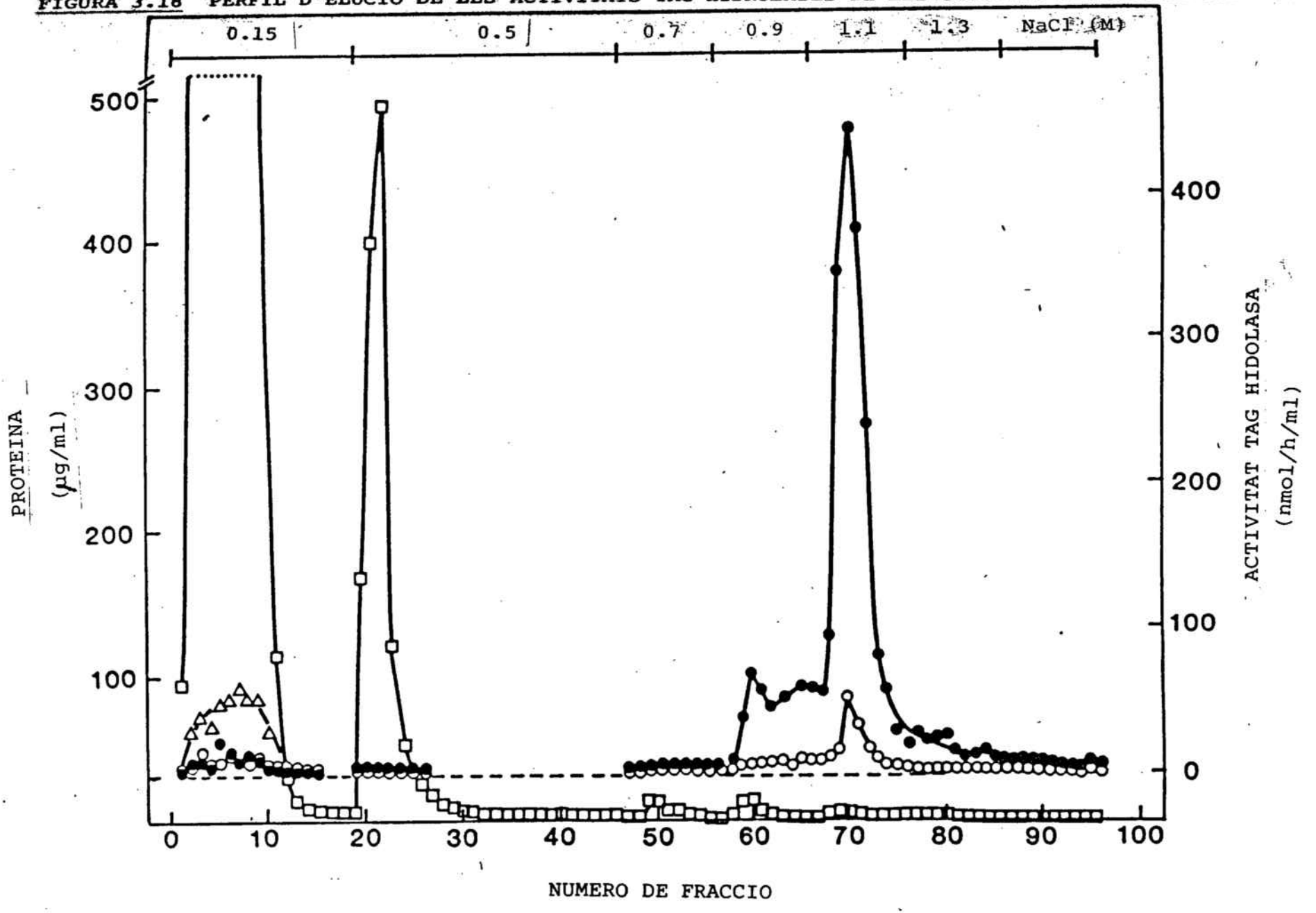
3.2.2.- Perfil d'elució de les activitats TAG hidrolases de les columnes d'heparina-sefarosa

A la figura 3.18 es mostra un perfil d'elució obtingut en aplicar 35 ml de mostra solubilitzada (6.9mg proteïna/ml) a una columna de gel d'heparina-sefarosa de 1.4 x 7.5 cm. La mostra fou aplicada a 0.15 M NaCl i eluída la columna amb concentracions creixents de la sal, tal com d'indica al marge superior de la figura . El 70% de la proteïna aplicada es recuperà amb la fracció no retinguda per la columna (taula 3.9). Amb cada canvi de tampó s'eluí un pic de proteïna cada cop menor. Si bée en aquest cas particular la recuperació global de proteïnasfou molt baixa, 75%, per terme mig oscil.là al voltant del 90-95% (n=5).

L'activitat TAGH àcida no es lligà a la columna i s'eluí completament amb el primer rentat (figura 3.18, taula 3.9). Tot i que valoràrem l'activitat a totes les fraccions, només es representen a la figura 3.18 les corresponents al primer eluït per tal de simplificar la representació.

Pràcticament tota l'activitat TAGH neutre (+) sèrum es lligà a la columna. Només un 3% de l'activitat inicial sortí amb la fracció no retingudaspel gel (taula 3.9). Donada la presència de NaCl a les diferents fraccions, modificàrem lleugeramentla composició del sistema de valoració . En lloc de $MgCl_2$ 50 mM, s'ajustà la concentracióide NaCl a 0.15 M bé diluïnttles fraccions, bé afegint-hi a aquelles on la concentració era baixa..Ni a 0.5 M ni a 0.75 M s'eluí cap activitat TAGH neutre (+) sèrum. A 0.9 M començà a eluir-se activitat, si bé no arribà mai a formar un pic definit. A d'altres

FIGURA 3.18 PERFIL D'ELUCIO DE LES ACTIVITATS TAG HIDROLASES DE LES COLUMNES D'HEPARINA-SEFAROSA



TAULA 3.9

RECUPERACIO I PURIFICACIO DE LES ACTIVITATS TAG HIDROLASES APLICADES A COLUMNES D'HEPARINA-SEFAROSA

			TAGH àcida				TAGH neutre (-) S.				TAGH neutre (+) S.			
	Vol. (ml)	Prot. (mg)	Activitat (mU)	(mU/mg)	R. (%)	P.	Activitat (mU)	(mU/mg)	R. (%)	P.	Activitat (mU)	(mU/mg)	R. (%)	P.
Aplicada	35	241.5	1638	6.8	100	1.0	1.67	6.9	100	1.0	8.01	33.2	100	1.0
Eluït 0.15 M NaCl	95.5	169.7	2130	12.4	128	1.8	0.48	2.8	29	0.4	0.53	3.1	6	0.09
Eluït 0.5 M NaCl	150	7.4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Eluït 0.7 M NaCl	53	0.32	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Eluït 0.9 M NaCl	53	0.26	—	—	—	—	0.27	1030	16	149	2.34	9010	29	271
Eluït 1.1 M NaCl	53	0.14	—	—	—	—	0.80	5710	48	828	9.29	66360	116	2000
Eluït 1.3 M NaCl	53	—	—	—	—	—	0.05	—	3	—	0.87	—	11	—
Eluït 1.5 M NaCl	50	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Valors corresponents a l'experiment mostrat a la figura 3.18

mU: nmol/h (unitats d'activitat)

R.: Recuperació

P.: Factor de purificació (relació d'activitats específiques)

corregudes on eluírem amb un volum superior, tampoc arribà a diferenciar-se del proper pic (resultat no presentat). Fou amb 1.1 M NaCl on s'eluí la gran major part de l'activitat . A concentracions més elevades ja no s'eluí més activitat. L'activitat recuperada en tot el pic fou d'un 156% respecte de la inicialment aplicada. Aquesta elevada recuperació no ha d'estranyar, doncs a la mostra original la presència deeNaDOC, molt probablement, interferiasamb la determinació de l'activitat en aquesta mostra, de forma que obteníem una subestimació de l'activitat inicialment aplicada al gel. Es per això que, segurament, el factor de purificació de 2000 per aquesta activitat estigui dobrevalorat. Sigui com sigui, l'activitat específica de la fracció amb màxima activitat (nº 70) fou de 74.3 umol/h/mg prot. Valors entre 50-80 umol/h/mg els obtinguérem normalment a les diferents purificacions realitzades. Aquest valor, si bé duplica els obtinguts per Twu i col.laboradors (1975, 1976)en cors humans i de rates, són un ordre de magnitud inferiors als descrits perEhnholm i col.laboradors al cor de porc (1975) i per Chung i Scanu (1977) pel cor de rata.

Part de l'activitat TAGH neutre (-) sèrum no es lligà a les columnes d'heparina-sefarosa, representant una proporció significativa de l'activitat inicial (29%) (taula 3.9). A l'igual que passava amb l'activitat (+) sèrum, la (-) sèrum fou determinada sense $MgCl_2$ 50 mM i ajustant la concentració de NaCl al tub de valoració a 0.15 M. Es de destacar que l'activitat weluïda amb el gros de la proteïna no fou estimulada per la presència de sèrum al sistema de valoració (figura 3.18, taula 3.9). La resta de l'activitat (-) sèrum fou eluïda conjuntament amb la (+) sèrum a 0.9-1.1 M NaCl. Al llarg de tot aquest pic la relació d'activitats +/- sèrum fou molt constat (9.5 de promig).

Després d'aquests primers experiments on no observàrem l'elució de cap activitat fins a concentra-

cions de NaCl elevades, modificàrem el protocol d'elució en el sentit descrit a l'apartat 2.2.9 de Materials i Mètodes. Després de passar la mostra i rentar a 0.15 M, eluïrem amb 0:75 M per eliminar proteïnes no específiques i després amb 1.2 M NaCl on sortí l'activitat lligada. D'aquest amanera obtinguérem dues fraccions amb activitat TAG hidrolasa. Una primera que s'eluïa amb el gros de la proteïna a 0.15 M NaCl i altre que s'alliberava a elevades concentracions de NaCl. A totes dues podia detectar-se activitat TAGH neutre. Mentre que la primera fracció no semblava que el sèrum l'afectés (si bé res podíem dir encara doncs els nivells baixos d"activitat detectada no suposava mai més 20-50 DPM per sobre dels blancs), a la segona la dependència del sèrum era consederable.

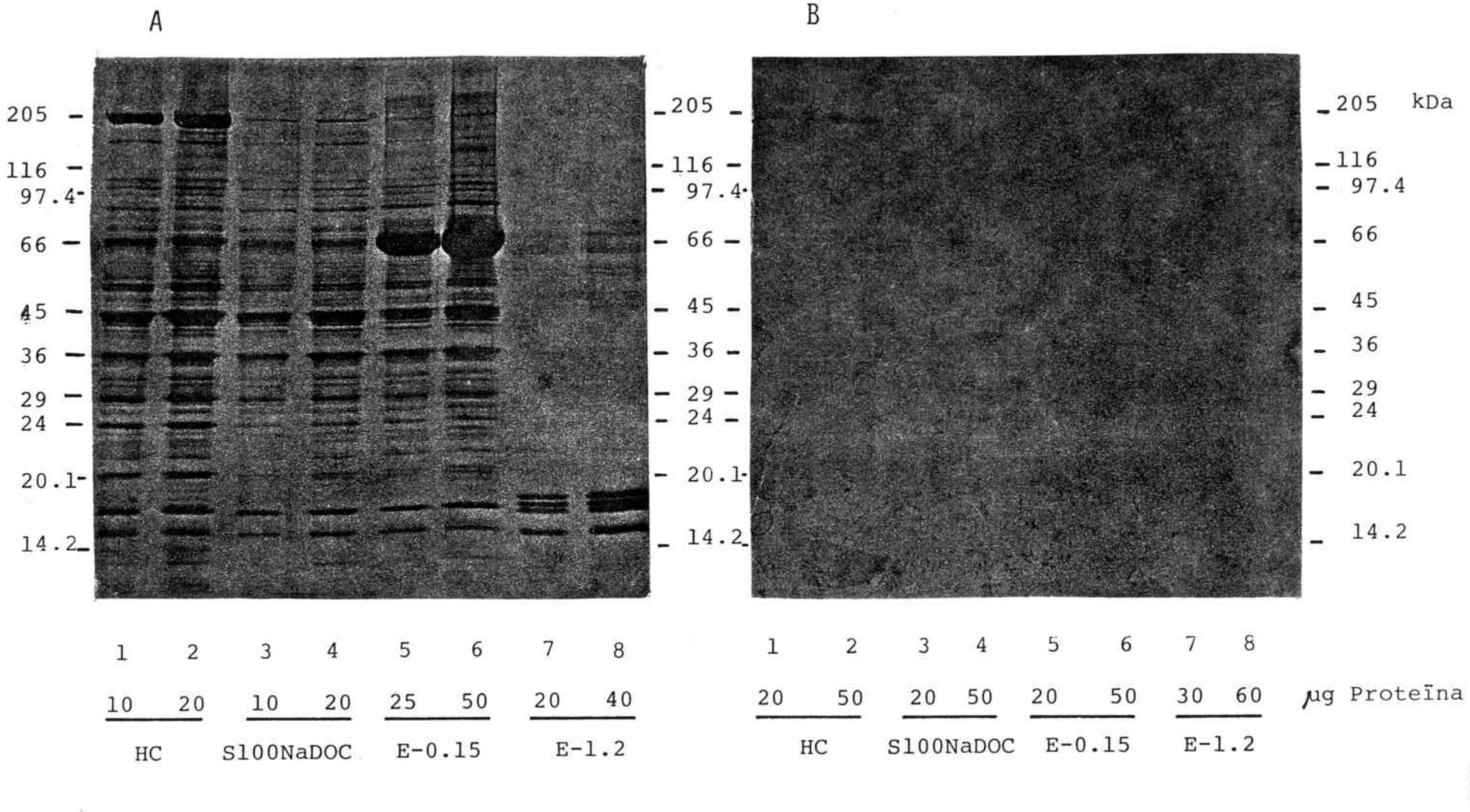
En treballs recents, Stam i Hülsmann (1983, 1984) també descriuem el lligam de l'activitat TAGH neutre (±) sèrum del sobrenadant postnuclear, a l'heparina-sefarosa. Mai però fan referència al 10-15% d'activitat que es lliga a les seves columnes. Contràriament a nosaltres, ells observen que, en aplicar els sobrenadants postnuclears a columnes d'heparina-sefarosa, elueixen dos pics d'activitat LPL, un a 1.2 M i altre a 1.6 M NaCl (Stam i Hülsmann, 1984). En alguns experiments nosaltres hem eluït fins amb 2.0 M NaCl sense obtenir cap segon pic d'activitat. En tenir ells l'enzim tant soluble com particulat, si la presència dels dos pics correspon a aquestes dues formes de la LPL o no ho desconeixem.

En els dos darrers blocs d'experiments d'aquesta segona part pretendríem caracteritzar les dues fraccions amb activitat TAG hidrolases, tot comparant les propietats amb les que havíem observat a l'homogenat cel cel.lular.

Prèviament però, i com a darrer experiment d'aquest primer bloc, volíem coneixer el grau de puresa de

l'activitat eluïda a elevades concentracions de NaCl. A la figura 3.19 A es mostra el resultat representatiu d'una electroforesi correguda en gradient de gel de poliacrilamida (7.5-20%) en presència de SDS i 2-mercaptoetanol (condicions desnaturalitzants i reductores). Aplicàrem mostres de l'homogenat cel.lular (HC), del solubilitzat amb NaDOC (S100-NaDOC), de la fracció no lligada a l'heparina-sefarosa (E-0.15) i de l'eluïda amb 1.2 M NaCl (E-1.2), aquesta darrera l'obtinguérem després d'un eluït a 0.75 M NaCl. Tant a aquest experiment, com a d'altres similars que realitzàrem, corregúerem sempre dues quantitats de proteïna per cada mostra. Es interessant d'observar que el patró de bandes del solubilitzat és similar al de l'homogenat, excepte per la manca d'algunes de les bandes majoritàries, especialment la de 205 kDa corresponent a la cadena pesada de la miosina. El patró de bandes de la fracció no lligada a la columna era pràcticament idèntic al del solubilitzat, excepte per la presència d'una intensíssima banda de 66 kDa, que correspon al BSA afegit a aquesta mostra per estabilitzar-la. La fracció eluïda amb 1.2 M NaCl (corresponent al "pool" de totoel pic i no només a la fracció de màxima activitat) presentà un patró de bandes ben diferenciat. Apareguéren quatre bandes majoritàries de baix pes molecular aparent 11.6, 13.2 14.0 i 14.5 kDa (mitjana de dues quantificacions), i unes 8-10 bandes, segons el gel, minoritàries de pesos moleculars aparents de 45-80 kDa. Per la identificació de quina d'aquestes bandes corresponia a la LPL realitzàrem un "immunoblotting" (transferència de les bandes del gel a filtres de nitrocel.lulosa sota corrent elèctica amb posterior identificació de bandes específiques immunològicament). A la figura 3.19 B es mostra un gel tenyit amb blau de coomassie R-250 després de la transfèrència de les bades al filtre de nitrcel.lulosa. Com pot observar-se, només una petita part de les proteïnes més pesades no foren transferides.

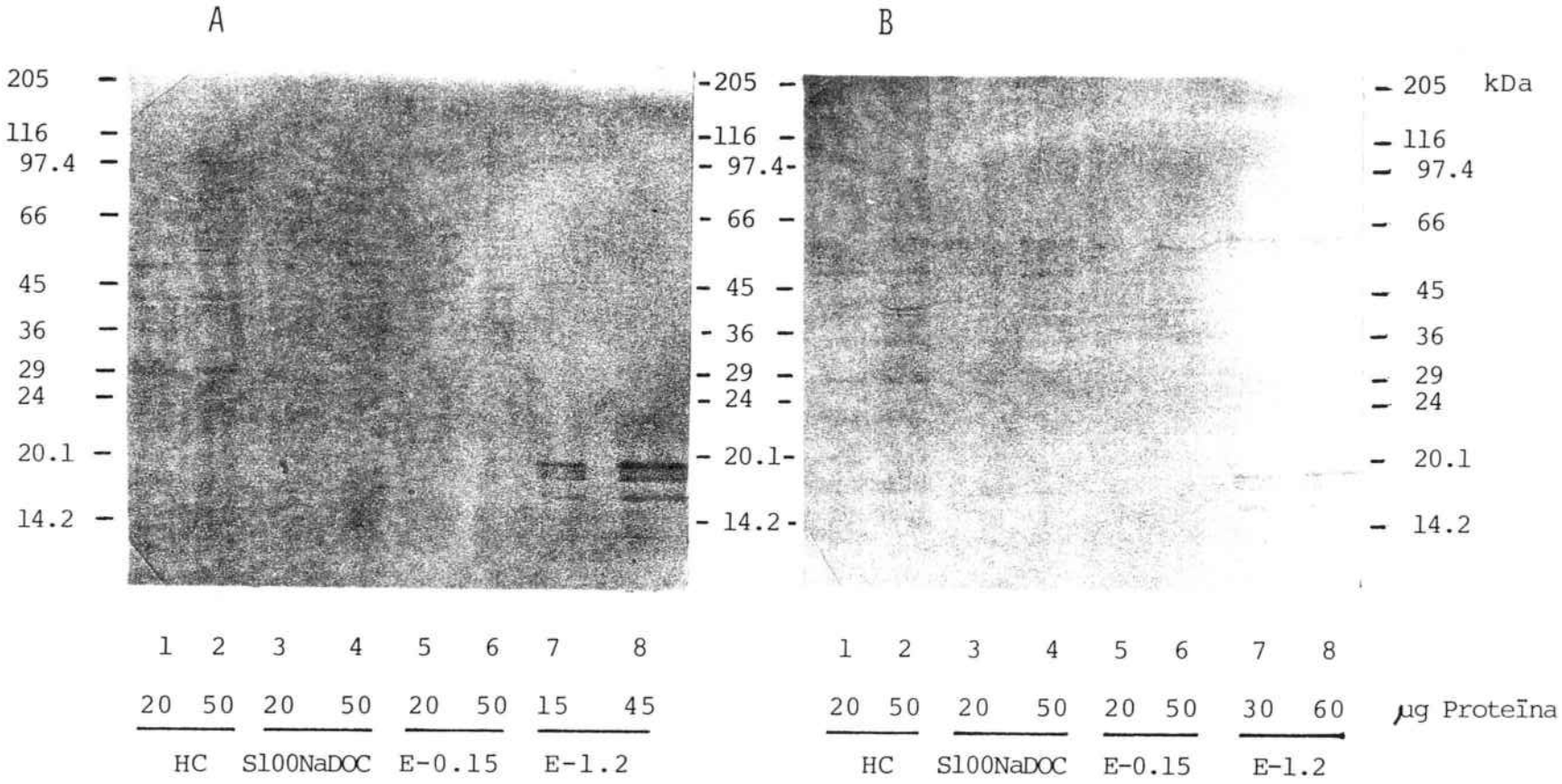
FIGURA 3.19 TINCIO AMB BLAU DE COOMASSIE DELS GELS DE POLIACRILAMIDA ABANS I DESPRES DE L'ELECTROTRANSFERENCIA A FILTRES DE NITROCEL.LULOSA



Incubàrem filtres tant amb IgG no específiques (controls) com específiques anti-LPL (del lot de menor títol Ab_2). Després de les incubacions amb els anticossos secundarisdi terciaris i del revelat, observàrem que les bandes majoritàries de la fracció eluïda de l'heparina-sefarosa amb 1.2 M NaCl, lligaven tant les IgG no específiques com les específiques anti-LPL (mostres 7 i 8 de la figura 3.20 A i B). Ara bé,apareixia un doblet de bandes de pesos molecularsa aparents de 60 i 57 kDa wue eren reconegudes específicament per les IgG anti-LPL. Aquestes bandes no s'observen a la fracció no lligada al gel d'heparina-sefarosa (E-0.15, mostres 5 i 6,,figura 3.20 B). la banda de 60 kDa s'observa també, molt feblement, tant a l'homogenat cel.lular (HC, mostres 1 i 2, fig. 3.20 B), com al solubilitzat (S100-NaDOC, mostres 3 i 4, fig. 3.20 B). Aquestes bandes no s'observen als filtres incubats amb IgG no específiques en cap de les mostres (figura 3.20 A). També s'observen vàries bandes, especialment a l'homogenat, que lliguen tant IgG específiques com no especifíques.

Així doncs, el doblet de bandes que s'observa a la fracció eluïda amb 1.2 M NaCL((únic parell de bandes específicament reconegudes per les IgG anti-LPL), corresponen a la LPL parcialment purificada. Donat que només s'observa la banda de 60 kDa a l'homogenat i no la de 57 kDa, ens atrevíríem a suggerir que el pes molecular de la LPL intracel.lular és d'uns 60 kDa, mentre que la banda de 57 kDa probablement correspon a algun fragment proteolitzat , doncs no afegírem al medi d'homogenació inhibidors de les proteases. En ésser aquestes bandes una proporció minoritàriadel total de proteïna en aquesta fracció, no és d'estranyar que l'activitat específica que obtenim sigui unes 10^3 vegadesinferior a la màxima descrita per la LPL purificada d'altres fonts (Iverius i Ostlund-Lindqvist, 1976).

FIGURA 3.20 DETECCIO IMMUNOLOGICA DE LA LPL EN ELS FILTRES DE NITROCEL.LULOSA DESPRES DE L'ELECTROTRANSFERENCIA DES DELS GELS DE POLIACRILAMIDA



El pes molecular obtingut per nosaltres concorda amb el descrit per Twu i col.laboradors (1975, 1976) per la LPL purificada del cor de rataa i d'humans, així com els descrits per la LPL del teixit adipós blanc de porc (Bensadoun oi col., 1974) i d'aorta bovina (Wisner i col., 1980). Ara bé, als mateixos teixits,i d'altres, han estat descrits pesos moleculars aparents que oscil.len entre els 34 kDa al cor de rata (Chung i Scanu, 1977) i els 77 kDa a plasma postheparínic humà (Betch i col., 1980) (una llista complerta pot trobar-se a la revisió recent de Smith i Pownall, 1984).

3.2.3.- Caracterització de les activitats TAGH eluïdes amb 1.2 M NaCl de les columnes d'heparina-sefarosa

Estavem convençuts de que l'activitat mesurada en absència de sèrum, així com la valorada en la seva presència, a la fracció eluïda amb 1.2 M de NaCl de les columnes d'heparina-sefarosa corresponien a una mateixa entitat molecular: la LPL intracel.lular. Aquest convenciment es basava en el fet de que l'activitat TAGH neutre (+) sèrum que nosaltres detectàvem als homogenats cel.lulars complia tots els requisits per poder ésser considerada com una LPL: (i) el pH òptim era neutre-bàsic, (ii)era activada per apo C-II o sèrum, (iii) era inhibida per NaCl 1.0 M i per anticossos anti-LPL i (iv) s'eluïa de les columnes d'heparina-sefarosa amb concentracions de NaCl superiors a 1.0 M. per altre banda, en ésser a la fracció eluïda amb 1.2 M NaCl la dependència del sèrum tant elevada (en general la relació d"activitats +/- sèrum era entre 10-15), pensàvem que l'activitatt que mesuràvem en absència de sèrum en aquesta fracció no ers més que l'activitat residual de la LPL que pot expressar-se en absència de l'apo C-II. Finalment, no s'ha descrit cap altre activitat TAG hidrolasa que s'elueixi a concentracions superiors a 1.0 M NaCl. De fet, a més de la LPL, només es coneix una altre activitat TAG hidrolasa amb afinitat per l'heparina. Aquesta correspon a l'anomenada lipasa hepàtica (alli-

berable amb heparina) que és eluïda dels gels amb 0.75 M NaCl (Assmann i col., 1973). Si bé no es coneix si presenta activitat TAG hidrolasa, també ha estat descrita recentment la purificació parcialdd'una activitat diacilglicerol hidrolasa de cervell boví amb gels d'heparina-sefarosa (Farooqui i col., 1984). Aquesta activitat s'elueix amb 0.5 M NaCl de la columna. Específicament es coneix que ni la lipasa sensible a les hormones ni la monoacilglicerol hidrolasa del teixit adipós blanc de pollastre es lliguen a l'heparina-sefarosa (Khoo i col., 1976).

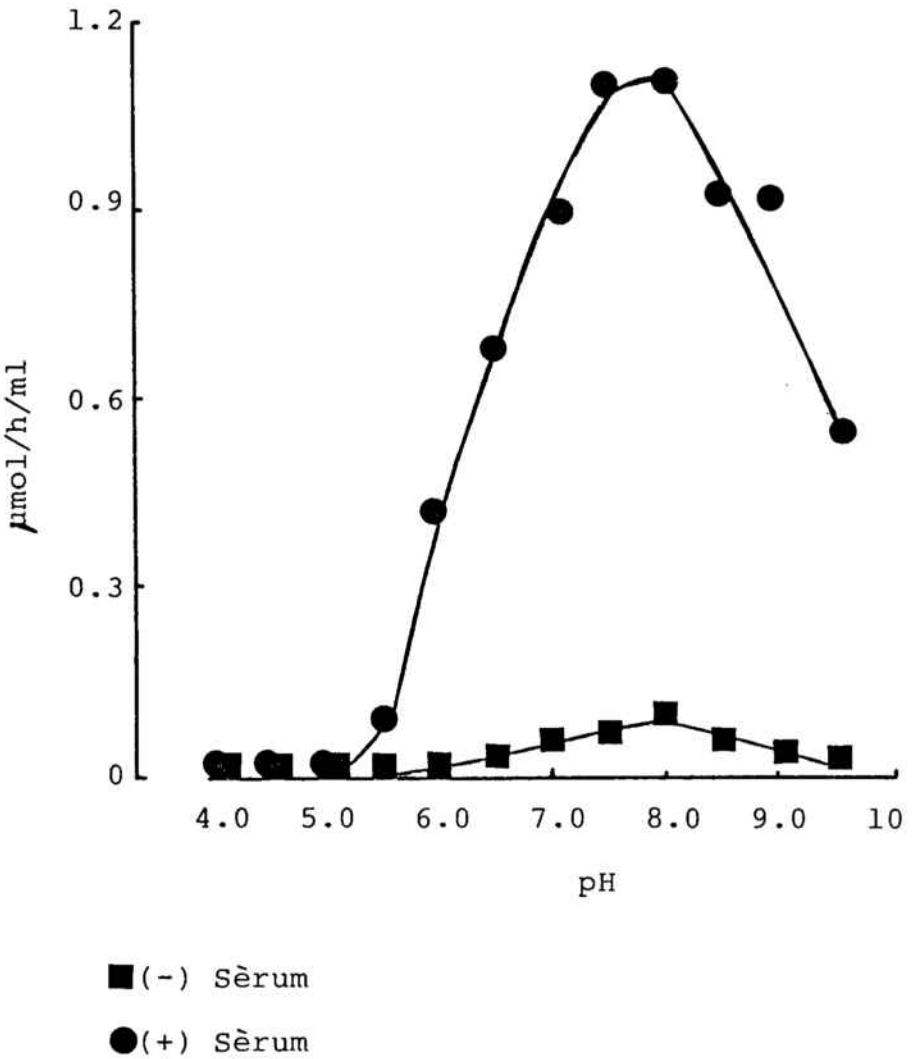
Així, l'estudi de les característiques de l'activitat eluïda amb 1.2 M NaCl no havia sinó de confirmar la nostra suposició.

Tant quan mesurada en presència de sèrum, com quan en absència, el pH òptim es desplaçà lleugerament cap a valors més alcalins. A la figura 3.21 es mostra un experiment on obtinguérem un màxim d'activitat a pH 7.5-8.0. Realitzàrem dos experiments més amb resultats similars, un pH òptim al voltant de 8.0. Per aquestes proves empràrem tampó acetat per pH entre 4.0-6.0, tampó fosfats per pH entre 6.0-8.5 i tampó Tricina entre 8.5-9.5, tots ells a 25 mM. Les raos del desplaçament del pH òptim cap a valors més bàsics les desconeixem. Ara bé, en treballs fets amb LPL purificada de la llet bovina, Bengtsson i Olivecrona (1982) demostraren que no és tant l'estat d'ionització del centre actiu com l'estabilitat de l'enzim, qui condicina l'activitat a cada pH donat. Desconeixem però, si la LPL en tampó barbital 5 mM amb glicerol i BSA és més estable que en el medi d'homogenació emprat per nosaltres, a pH elevats. En tot cas, tot i el lleuger desplaçament del pH òptim, continuàrem emprant el pH de 7.5 a les següentssvaloracions per tal de que els resultats fossin més comparables amb els obtinguts a l"homogenat cel.lular.

A la mateixa figura 3.21 pot observar-se la gran

FIGURA 3.21

EFECTE DEL pH SOBRE L'ACTIVITAT TAG HIDROLASA ALUIDA AMB 1.2 M NaCl DE LES COLUMNES D'HEPARINA-SEFAROSA



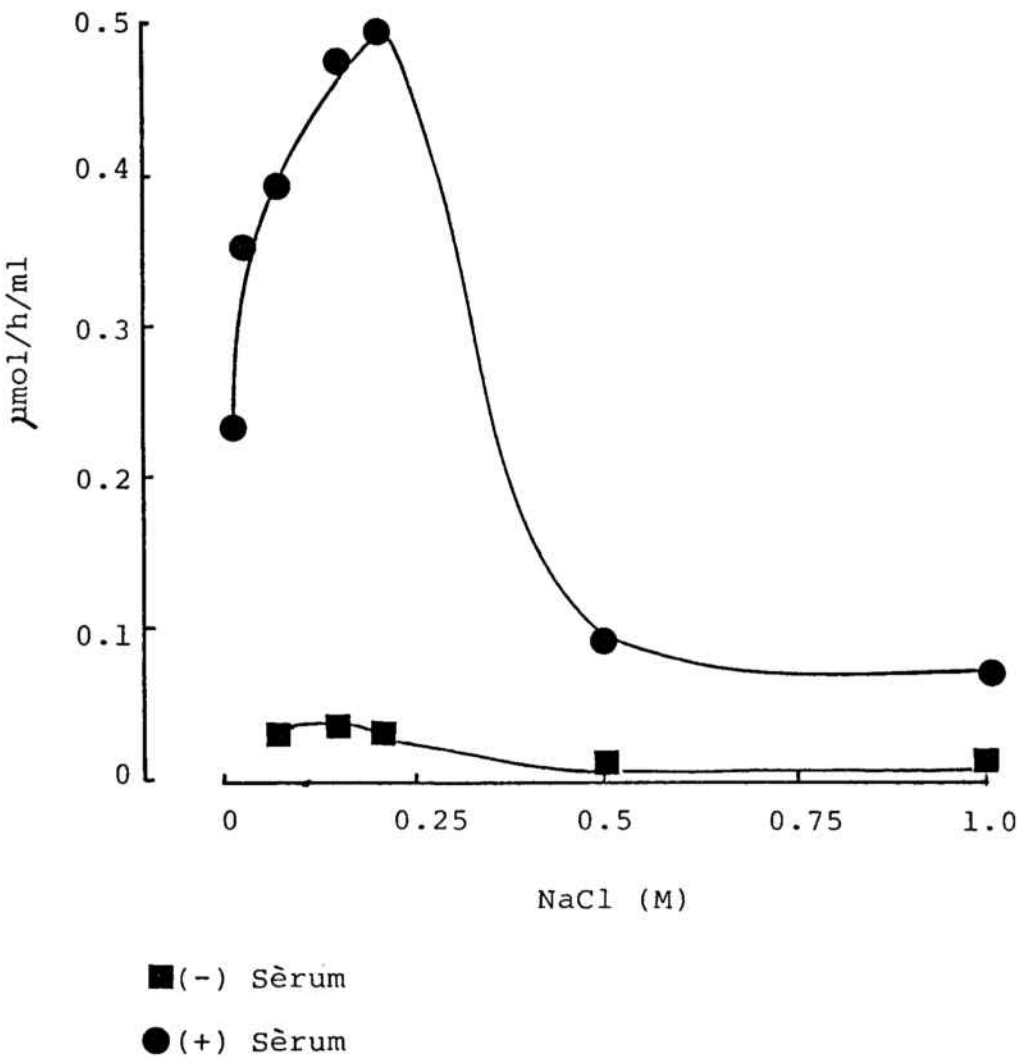
dependència del sèrum d'aquesta activitat. A l'igual que per l'activitat al homohenat, obtinguérem una estimulació màxima amb concentracions de sèrum del 3% (resultat no presentat).

També l'efecte de la presència de diferents concentracions de NaCl (figura 3.22) fou semblant a l'obtingut amb l'homogenat cel.lular. Concentracions inferiors a 150 mM les obtinguérem per dilucions de la mostra i concentracions superiors afegint NaCl al sistema de valoració. La diferent quantitat de ptoteïna no afectà al resultat doncs es treballà dintre dels marges de linealitat (fins a 0.5 uç de proteïna i fins a 60 minuts d'incubació, resultats no mostrats). Tal com passava amb l'activitat TAGH neutre (+) sèrum de l'homogenat cel.lular, l'activitat mesurada en presència de sèrum fou màxima a una concentració de NaCl de 0.2 M, concentracions superiors la inhibiren (84% d'inhibició amb NaCl 1.0 M respecte de l'activitat màxima a 0.2 M). Contràriament al que s'esdevenia a l'homogenat cel.lular, on l'activitat TAGH neutre (-) sèrum era relativament insensible a l'efecte inhibidor de les elevades concentracions de NaCl (35% d'inhibició, figura 3.3), l'activitat mesurada en en absència de sèrum - en aquesta fracció eluïda amb 1.2 M NaCl de les columnes d'heparina-sefarosa - és inhibida per concentracions elevades de NaCl (50% d'inhibició per NaCl 1.0 M).

Tot i això, continua produïnt-se una més elevada inhibició quan es valora en presència de sèrum. Suposant que en aquesta fracció només tenim LPL, aquests resultats podrien indicar-no que l'efecte de l'elevada força iònica sobre la LPL és doble. Per una banda, com postulen Posner i Morrison (1979) i Benbtsson i Olivecrona (1983), afectaria bé al centre actiu, bé a al regió de lligam a la interfase aigua-lípid, provocant en qualsevol dels casos una disminució de l'activitat mesurada en presència i en absència de sèrum. En el nostre cas però, també afectaria al lloc d'unió a

FIGURA 3.22

EFECTE DEL NaCl SOBRE L'ACTIVITAT TAG HIDROLASA ELUIDA AMB 1.2 M NaCl DE LES COLUMNES D'HEPARINA-SEFAROSA



l'apo C-II tal com suggerien Fielding i Fielding (1976), doncs també observem una disminució de la relació d'activitats +/- sèrum a elevades forces iòniques. Probablement l'elevada força iònica pot afectar tant en un sentit com en l'altre, però la seva manifestació podria dependre de les condicions precise d'assaig i dels factors limitants de l'activitat en cadscuna d'aquestes condicions.

L'efecte de la protamina sulfat fou més drstic en aquestaafracció parcialment purificada (figura 3.23 A) del que ho era a l'homogenat cel.lular (figura 3.7 A). Així, tant l'activitat mesurada en presència com en absència de sèrum foren inhibides (80% i60% respectivament) per 10 mg/ml de protamina sulfat. També l'efecte de concentracions elevades d'albúmina difereix de l'obtingut a l'homogenat cel.lular. Mentre que en aquest tant l'activitat TAGH (+) com (-) sèrum s'inhibiren (64% i 43% respectivament, figura 3.7 B) per concentracions de 10 mg/ml, en la fracció eluïda amb 1.2 M NaCl l'acticitat determinada en absència de sèrum s'inhibí fins a un 70% amb BSA 10 mg/ml, però pràcticament no s'afectà l'activitat determinada en presència de sèrum (figura 3.23 B). De fet, només concentracions superiors a 7.5 mg/ml provocaren una certas inhibició. Si bé aquests difereixenntotalment dels obtinguts amb l'homogenat, concorda amb el descrit per Olivecrona i Bengtsson (1984) per la LPL de llet bovina, en el sentit de que la presència d'apo C-II - en el nostre cas sèrum - prevent la inhibició de l'activitat LPL per elevades concentracions de BSA. Com la presència de la resta de components de l'homogenat bloqueja l'efecte protector de l'apo C-II, ens és totalment desconegut.

També l'estudi de la sensibilitat tèrmica de les activitats (±) sèrum d'aquesta fracció eluïda amb 1.2 M de NaCl de les columnes d'heparina-sefarosa, mostrà diferències amb els resultats que havíem obtingut a l'homogenat cel.lular. Tant a 40°C (figura 3.24 A) com

FIGURA 3.23 EFECTE DE LA PROTAMINA SULFAT I DE L'ALBUMINA SOBRE L'ACTIVITAT TAG HIDROLASA ELUIDA AMB 1.2 M NaCl DE LES COLUMNES D'HEPARINA-SEFAROSA

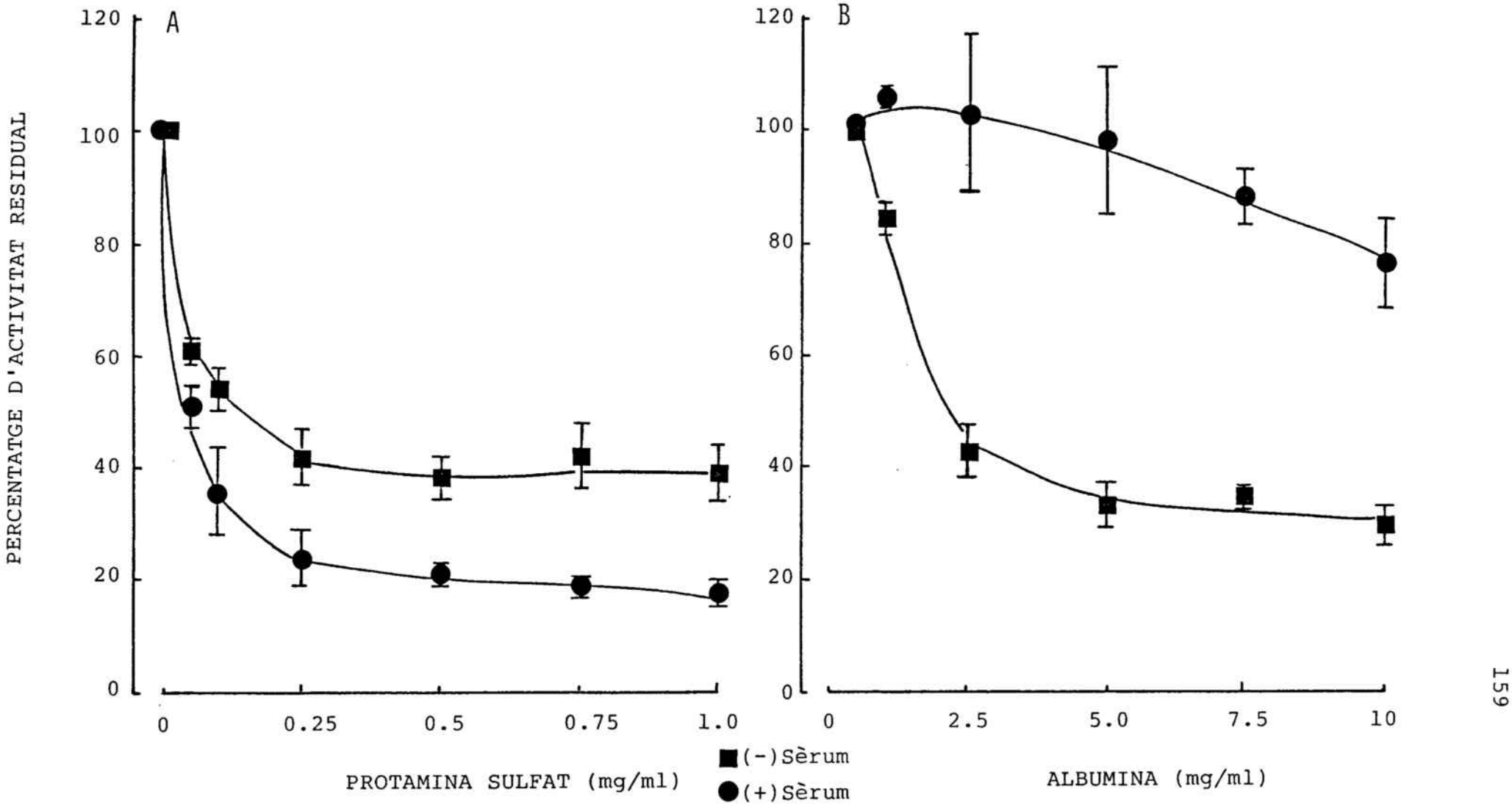
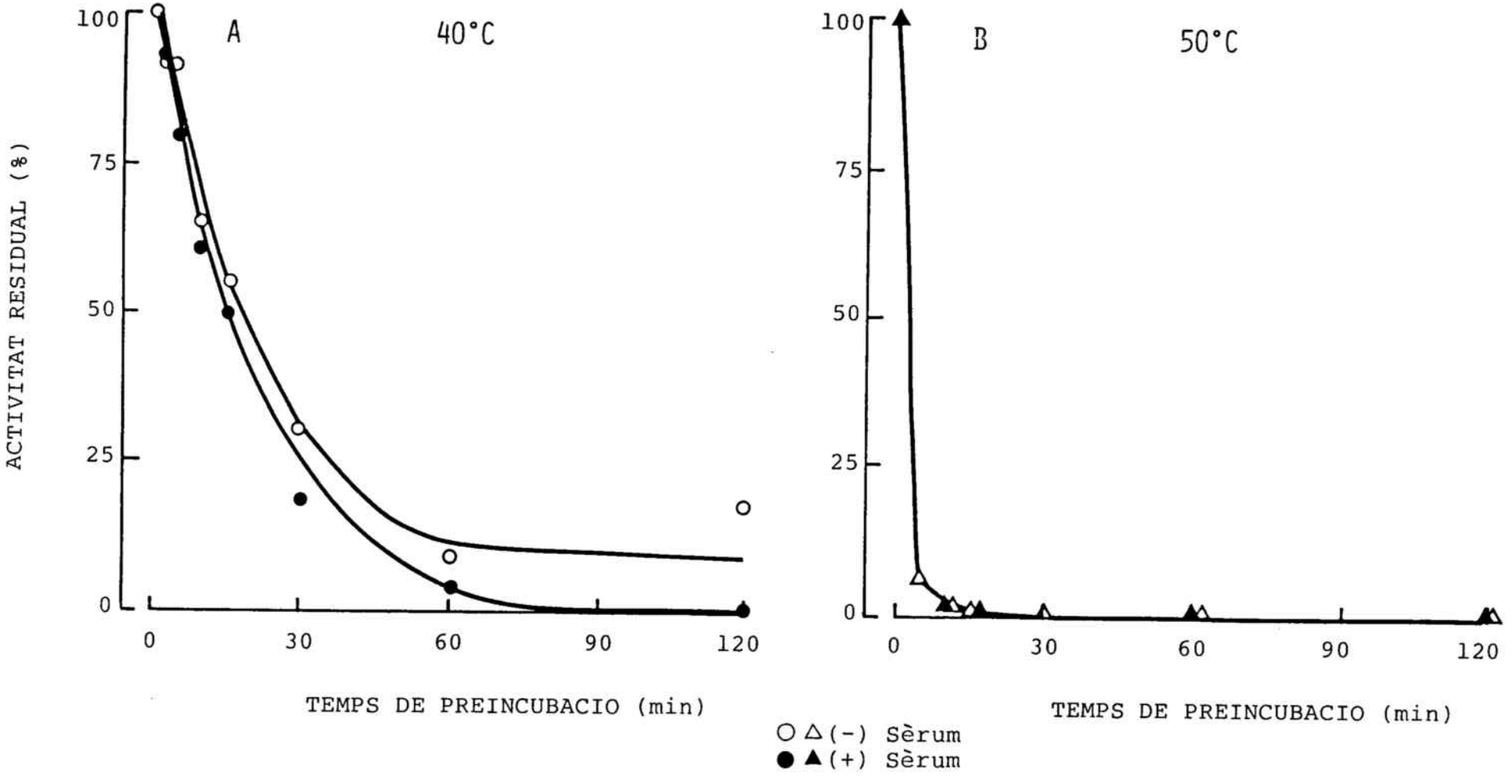


FIGURA 3. 24 INACTIVACIO TERMICA DE L'ACTIVITAT TAG HIDROLASA ELUIDA AMB 1.2 M NaCl DE LES COLUMNES D'HEPARINA-SEFAROSA



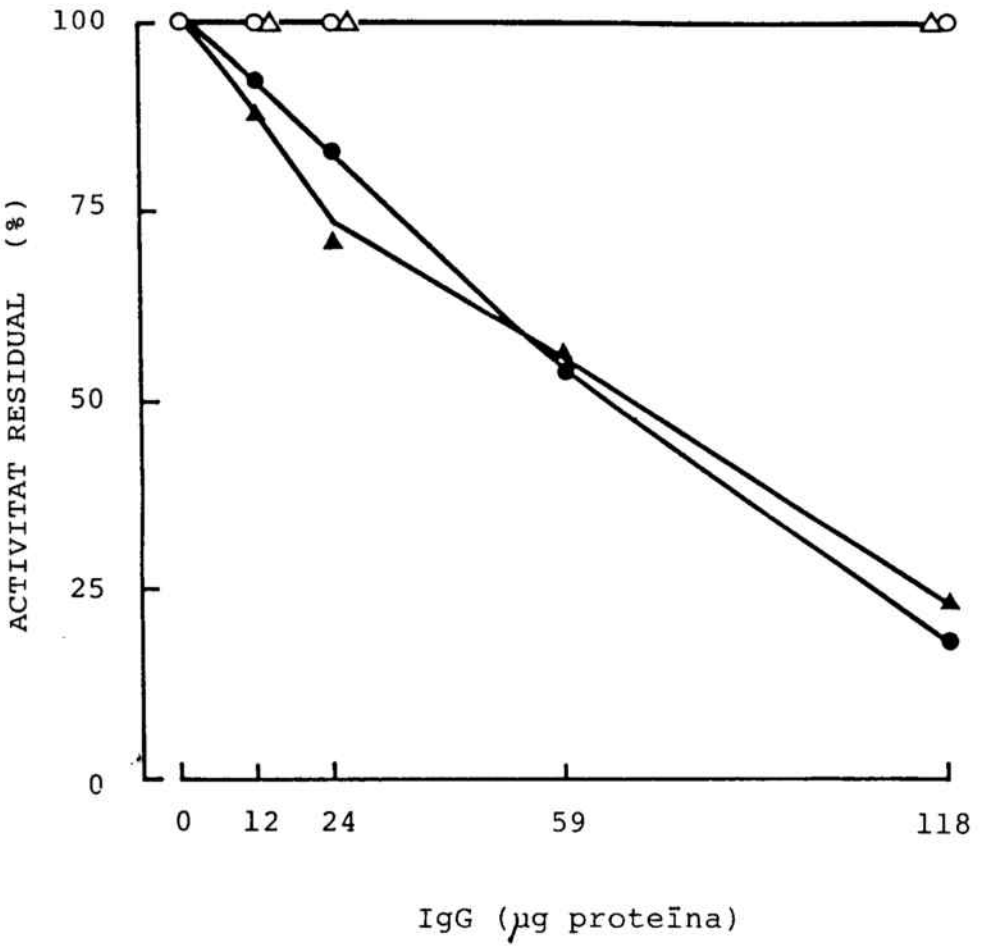
a 50°C (figura 3.24 B), l'activitat (-) sèrum s'inhibí en el mateix grau que l'activitat (+) sèrum. Fet que podria indicar que la pèrdua d'activitat de la LPL, com a efecte de la desnaturalització tèrmica, es deu principalment a una pèrdua de capacitat de lligam al substrat o de capacitat d'hidròlisi més que a una disminucióde la capacitat d'unió a l'apo C-II, que igualment podria estar afectada, però no ésser el factor limitant de l'activitat. No és sorprenent que la sensibilitat tèrmica d'aquesta LPL parcialment purificada sigui molt superior a la sensibilitat que presentava a l'homogenat, doncs és conegut que factorss com la força iònica , el tipus de pampó, la concentració de proteïnes, etc. afecten a l'estabilitst de les proteïnes :(Dixon i Webb, 1979). Així ara, a 40°C, la constant d'inactivació (k) és de $24.1x10^{-3}min^{-1}$ (llavors era de $8.7x10^{-3}$ min^{-1}) i a 50°C de $185x10^{-3}min^{-1}$ (a l'homogenat era de $34.8x10^{-3}min^{-1}$).

Finalment estudiàrem l'efecte de les IgG específiques contra LPL. Per aquesttexperiment empràrem el lot d"IgG amb més elevat títol (Ab_1). Com pot veure's a la figura 3.25, mentre que les IgG inespecífiques no afectaren l'activitat mesurada en presència de sèrum o en la seva absència, l'addició de quantitats creixents d'IgG anti-LPL inhibí progressivament l'activitat valorada en presència de sèrum. La determinada en la seva absència fou inhibida en el mateix grau que aquella. Aquest resultattés perfectament comparable amb el que havíem obtingut amb la LPL alliberada amb heparina dels endotelis capil.lars (veure figura 3.15), en el sentit de que les activitats (±) sèrum s'inhibiren en ambdós casos de forma paral.lela. Aquest resultat reforça poderosament la nostra suposició inicial de que cap altre activitat TAGH que la LPL és present a la fracció eluïda amb 1.2 M NaCl de les columnes d'heparina-sefarosa.

Hi ha però un fet que, potser, és interessant de discutir en relació a la comparació de les corbes d'in-

FIGURA 3.25

EFECTE DE LES IgG ANTI-LPL SOBRE L'ACTIVITAT ELUIDA AMB 1.2 M NaCl DE LES COLUMNES D'HEPARINA-SEFAROSA



○△IgG Pi
●▲IgG anti-LPL

▲△Activitat determinada (-) Sèrum
●○Activitat determinada (+) Sèrum 3%

hibició per les IgG de la LPL alliberada amb heparina i la parcialment purificada del'interior dels miòcits. Aquest fet és la gran diferència de sensibilitat d'ambdues mostres. Mentre que incubàrem unes 134 munitat (nmol/h) de LPL vascular amb les diferents quantitats de l'anticòs, només posàrem unes 24 munitats de la LPL purificada. tot i això, calgueren uns 50 ug d'IgG anti-LPL per inhibir un 50% d'aquesta LPL intracel.lular parcialment purificada, i només uns 17 ug d'IgG anti-LPL per inhibir la LPL vascular. Evidentment, ambdós experiments vàren ésser realitzats amb el mateix lot d'anticossos. Inicialment pensàrem que aquesta molt menor sensibilitat de la LPL intracel.lular podia reflectir la presència de LPL inactiva a la mostra, però que tambéllligués anticòs. Ens fonamentàvem en que es creu que existeix a l'interior de les cèl.lules sintetitzadores de LPL (cardiomiòcits, adipòcits) una quantitat, encara no determinada, de LPL inactiva (per revisió veure Nilsson-Ehle i col., 1980). L'activació d'aquesta fóra la que explicaria que, tot i inhibint la síntesi proteica, en incubar les cèl.lules amb heparina, l"activitat total augmentés (Stewart i Schotz, 1971, 1974; Chajek i col., 1978). Ara bé, resultats previs (figura 3.20) ens mostraven que les IgG de cabra també es lliguen a d'altres proteïnes inespecíficament, concretament les proteïnes majoritàries de la fracció eluïda amb 1.2 M NaCl de les columnes d'heparina-sefarosa lliguen aquestes IgG. Així, en quin grau un "segrestament" d'IgG per part dels contaminants de la LPL expliquen la diferència de sensibilitat no ho podem establir.

Amb tots aquests experiments confirmàvem que que l"activitat eluïda amb 1.2 M de NaCl de les columnes d'heparina-sefarosa, tant la determinada en presència com en absència de sèrum, corresponia a la LPL, i que les seves propietats coincideixen amb les determinades a l'homogenat cel.lular per l'activitat TAGH neutre (+) sèrum. Moltes més diferències però observàrem entre l'activitat LPL determinada en absència de sèrum, i les

propietats de l'activitat TAGH neutre (-) sèrum de l'homogenat cel.lular. Especialment la sensibilitat al NaCl, la protamina sulfat, la inactivació tèrmica i la sensibilitatta les IgG anti-LPL. La major resistència de l'activitat TAGH neutre (-) sèrum a tots aquests agents ens reforçava en la conclusió que ja apuntàvem al final de la primera part d'aquesta Tesi.

3.2.4.- Caracterització de les activitats TAGH no retingudes per les columnes d'heparina-sefarosa

Si bé la caracterització d'aquestes activitats cronològicament les realitzàrem de forma simultània a la deela LPL eluïda a 1.2 M NaCl, pensem que, per motius de claredat, és millor no presentartels resultats conjuntament.

Per poder abordar la caracterització de les activitats no retingudes pels gels d'heparina-sefarosa calia resoldre iun problema previ. La presència de deoxicolat sòdic limitava el volum de l'alíquota que podíem valorar, mantenint les condicions de linealitat, a no més de 0.01 ml. Donat que, especialment, l'activitat neutre era baixa i, a més, estava diluïda, als comptatges de la valoració no obteníem més d'unes 50-150 DPM netes. Observàrem que després d'una ultrafiltració a pressió, amb la que concentràvem la mostra unes 2-4 vegades en un temps inferior a les 3 hores, recuperàvem més del 80% de les activitats inicials (tant l'àcida com les neutres (+) sèrum) i manteníem el límit d'uns 0.01-0.015 ml de mostra fins rls que les activitats eren lineals. Paral.lelament augmentàrem l'activitat específica del substrat per a la determinació de l'activitat neutre. Així, en lloc dels 4 mCi/mmol utilitzàrem entre 7 i 10 mCi/mmol, segons fos l'activitat de la mostra. L'activitat específica per a la determinació de la TAGH àcida la mantinguérem a 2 mCi/mmol. Sota aquestes condicions podíem treballar sempre amb unes 1500-2000 DPM netes.

Primerament reavaluàrem la recuperació de les diferents activitats a la fracció no retinguda després d"ésser concentrada, respecte de l'aplicada inicialment a lescolumnes. Els resultats es mostren a la taula 3.10. Es recuperà la totalitat de l'activitat TAGH àcida, més d'un 30% de l'activitat TAGH neutre (-) sèrum i només vora el 3% de l'activitat (+) sèrum. A diferència del que férem en estudiar el perfil d'elució de les columnes, ara determinàrem l'activitat neutre en presència de $MgCl_2$ 50 mM. Es interessant de constatar que la presència de sèrum no tant sols no estimulà l'activitat nertre, sinó que clarament la inhibí.

L'activitat TAGH àcida mostrà una màxima activitat a pH 5.0 (figura 3.26), tal com ho feu a l'homogenat cel.lular (figura 3.1). Fou inhibida per NaCl i $MgCl_2$ (figura 3.27) de forma similar a com ho fou a l'homogenat (figura 3.2). La presència de sèrum també inhibí l'activitat TAGH àcida (figura 3.26), si bé en menor grau de com ho feia a l'homogenat cel:lular (figura 3.1 B). La presència conjunta de $MgCl_2$ 50 mM i sèrum 3% anul.là quasi completament l'activitat TAGH àcida (figura 3.26). Tal com passava amb la LPL parcialment purificada, també l'activitat TAGH àcida a la fracció no retinguda per l'heparina-sefarosa fou més sensible que la de l'homogenat, a la inactivació tèrmica (figures 3.14 i 3.30). Així, a 40°C obtinguérem una constant d'inactivació de $11.5x10^{-3}min^{-1}$ (a l'homogenat era de $3.0x10^{-3}min^{-1}$, taula 3.7) i a 50°C de $59.7x10^{-3}$ min^{-1} (a l'homogenat era de $18.6x10^{-3}min^{-1}$, taula 3.7), valors lògicament més elevat que el de 40°C. L'estar la ptroteïna solubilitzada probablement és la causa de la més gran sensibilitat a la inactivació tèrmica d'aquesta activitat en aquesta fracció que a l'homogenat (Dixon i Webb, 1979). En general, l'activitat TAGH àcida presenta les mateixes propietats que mostrava a l'homogenat cel.lular.

L'activitat mesurada en presència de $MgCl_2$ 50 mM

TAULA 3.10

ACTIVITATS TRIACILGLICEROL HIDROLASES NO LLIGADES ALS GELS D'HEPARINA-SEFAROSA

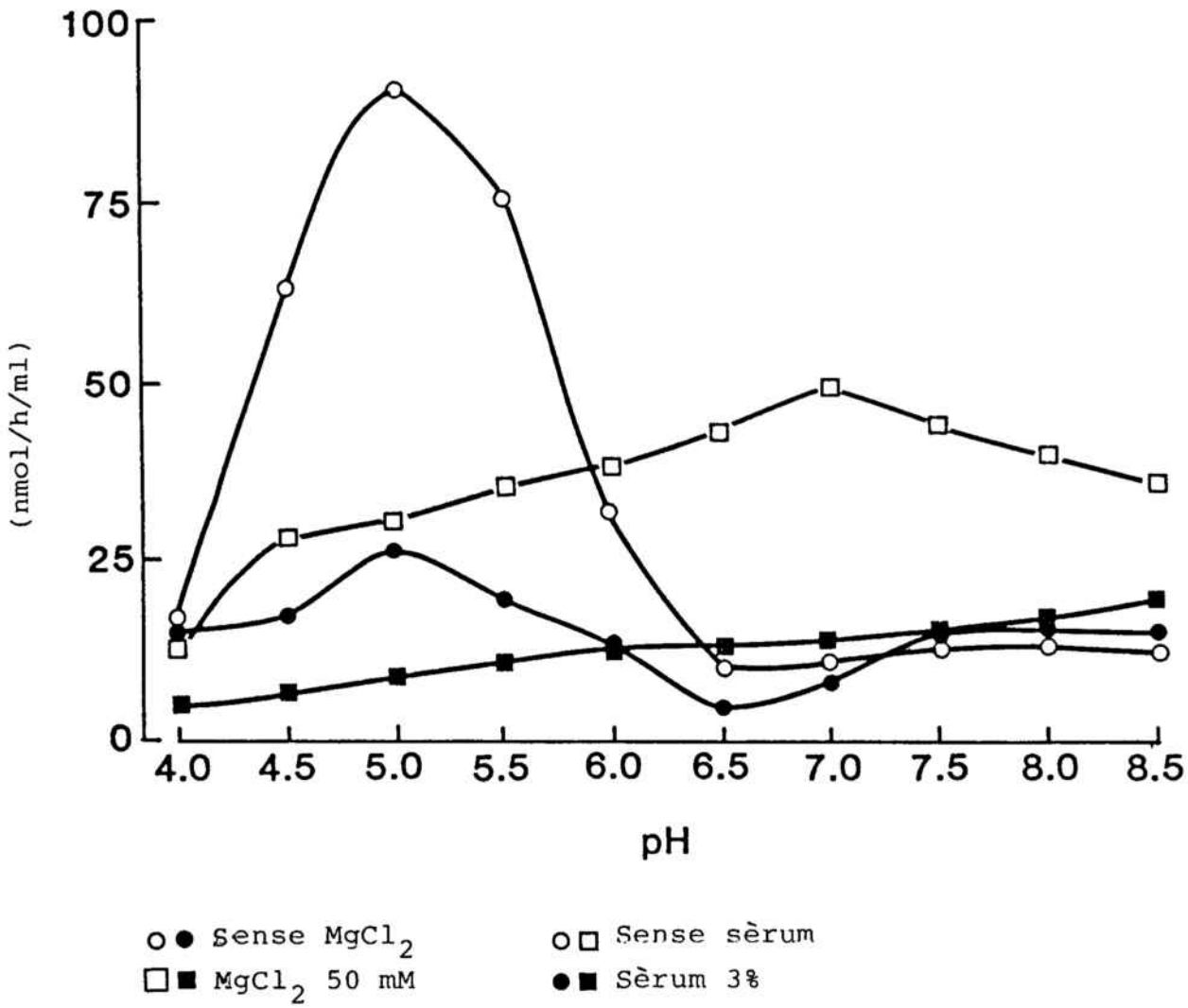
	Activitat (nmol/h/ml)[a]	Recuperació[b] (%)	n
TAGH àcida	41.0±12.6	107.0±7.8	4
TAGH neutre (-) S	23.4±7.1	32.6±6.0	5
TAGH neutre (+) S	8.7±2.8	2.8±1.2	5

a: Després de concentrar 4-6 vegades

b: Respecte de la inicialment aplicada a les columnes

FIGURA 3.26

EFECTE DEL pH SOBRE LES ACTIVITATS TAG HIDROLASES NO LLIGADES A L'HEPARINA-SEFAROSA



(mitjana de dos experiments)

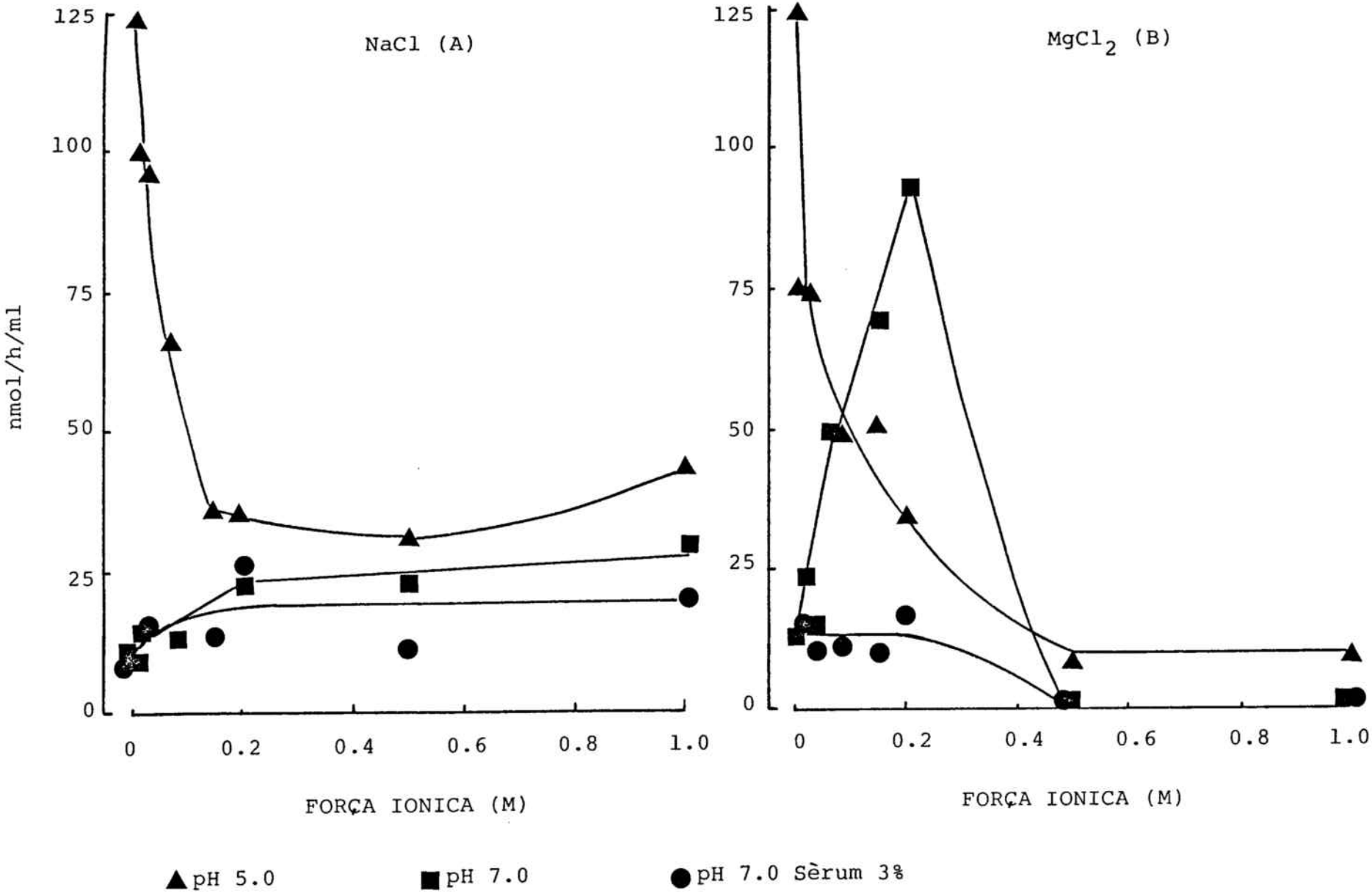
presentà la màxima aactivitat a pH 7.0 (figura 3.26). Ara bé, entre un pH de 6.0 i 8.5 no s'observà una disminució de l'activitat, respecte de la màxima, superior al 25%. Indicant clarament la no excessiva dependència del pH d'aquest aactivitat. En absència de $MgCl_2$ i/o en presència de sèrum 3%, l'activitat fou molt inferior i no s'observà cap pH òptim entre 6.5 i 8.5 (figura 3.26).

Aquesta activitat neutra semblava presentat un c comportament estrany davant el sèrum. Així, quan la valoràvem en absència de sals o en presència de NaCl 0.15 M (veure taula 3.9) no observàvem cap efecte de la presència de sèrum 3% en el sistema d'incubació. Ara bé, quan determinàven l'activitat amb $MgCl_2$ 50 mM el sèrum inhibia fortament l'activitat. Per tal d'obtenir més informació que pogués ajudar a explicar el fenomen, així com per poder comparar amb eel que ja coneixíem de las LPL purificada i de les activitats neutres a l'homogenat cel.lular, estudiàrem l'efecte de concentracions creixents de NaCl i $MgCl_2$ sogre aquestas activitat neutre nooretinguda per l'heparina-sefarosa (figures 3.27 i 3.28).

La presència de NaCl provocà un augment ede l'activitat, tant de la mesurada en presència com de lavalorada en absència de sèrum, de forma dosi-depenent (figura 3.27 A), una estimulació màxima l'obtinguérem ja amb 0.2 M NaCl. Es de destacar que concentracions de 1.0 M no provocaren cap inhibició. De fet, obtinguérem un increment de 2.5 vegades en l'activitat mesurada en presència de 1.0 M NaCl respecte de la determinada en absència de sal. (figura 3.28). Es també remarcable que la presència de sèrum no afectà significativament a l'activitat mesurada ni en absència ni a 1.0 M NaCl (figura 3.28).

El $MgCl_2$ produí un efecte força diferent. Fins a una concentració de 66 mM (I=0.2 M), l'activitat mesurada en absència de sèrum augmentà, mentre que concentracions superiors provocaren una dramàtica inhibició (figura 3.27 B). Una concentració de 50 mM provocà una

FIGURA 3.27 EFECTE DEL NaCl I DEL $MgCl_2$ SOBRE LES ACTIVITATS TAG HIDROLASES NO RETINGUDES PER L'HEPARINA-SEFAROSA

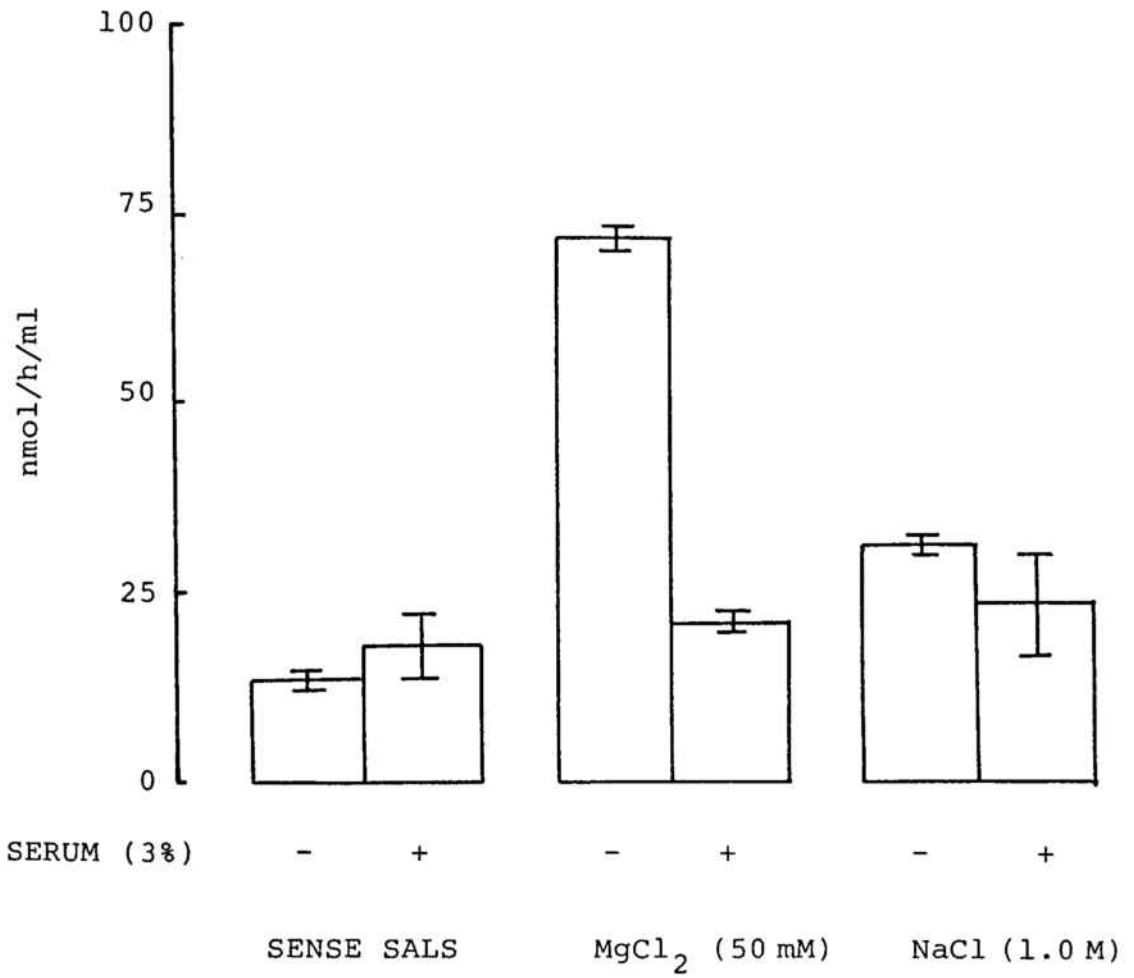


estimulació de més de 5 vegades (figura 3.28). En presència de sèrum el $MgCl_2$, fins a una concentració de 66 mM, no provocà cap variació de l'activitat; concentracions superiors però provocaren la mateixa dràstica inhibició que es produïa en absència de sèrum (figura 3.27 B). Així doncs, es sèrum sembla actuar prevenint l'activació que promou el $MgCl_2$, i ho fa específicament sobre aquesta sal doncs no afectà a l'efecte del NaCl. Ni els mecanismes pels que el $MgCl_2$ estimula específicament l'activitat, ni aquells pels que el sèrum, també específicament, bloqueja aquesta estimulació els coneixem. Sigui com sigui, aquestes propietats són radicalment diferents de les de la LPL.

De fet totes les propietats que estudiàrem diferei-xen d'allò que havíem obtingut amb la LPL. Així, aquesta activitat mesurada en absència de sèrum i tant en presència de $MgCl_2$, com de NaCl 1.0 M, com en absència de sals, no fou afectada ni per la protamina sulfat, fins a una concentració de 1.0 mg/ml (figura 3.29 A), ni per l'albúmina, fins a 10 mg/ml (figura 3.29 B). Més encara, la preincubació a 40°C fins a dues hores de la fracció no retinguda per les columnes d'heparina-sefarosa, no provocà cap pèrdua de l'activitat neutre (figura 3.30 A). Fins i tot resistí la preincubació a 50°C durant 30 minuts amb una pèrdua d'activitat de només un 10% (figura 3.30 B). Després de 2h no s'havia inhibit més del 70% de l'activitat inicial. Com era ja de preveure després de tots aquests resultats, les IgG anti-LPL (del lot amb menor títol, l'anomenat Ab_2) no afectaren en absolut l'activitat neutre, mesurada en presència de $MgCl_2$ 50 mM i en absència de sèrum, de la fracció no retinguda als gels d'heparina-sefarosa (figura 3.31). En el mateix experiment determinàrem, com a controls, l'efecte de 0.18 mg d'IgG anti-LPL (del mateix lot Ab_2) sobre les activitats TAGH neutres ($\pm$) sèrum d'alíquotes de l'homogenat a partir del que s'havia obtingut aquella fracció no retinguda. Tant

FIGURA 3.28

EFECTE DEL SERUM SOBRE L'ACTIVITAT TAG HIDROLASA NEUTRE NO RETINGUDA PER L'HEPARINA-SEFAROSA



(n=4)

FIGURA 3.29 EFECTE DE LA PROTAMINA SULFAT I L'ALBUMINA SOBRE L'ACTIVITAT TAG HIDROLASA NEUTRE NO RETINGUDA PER L'HEPARINA-SEFAROSA

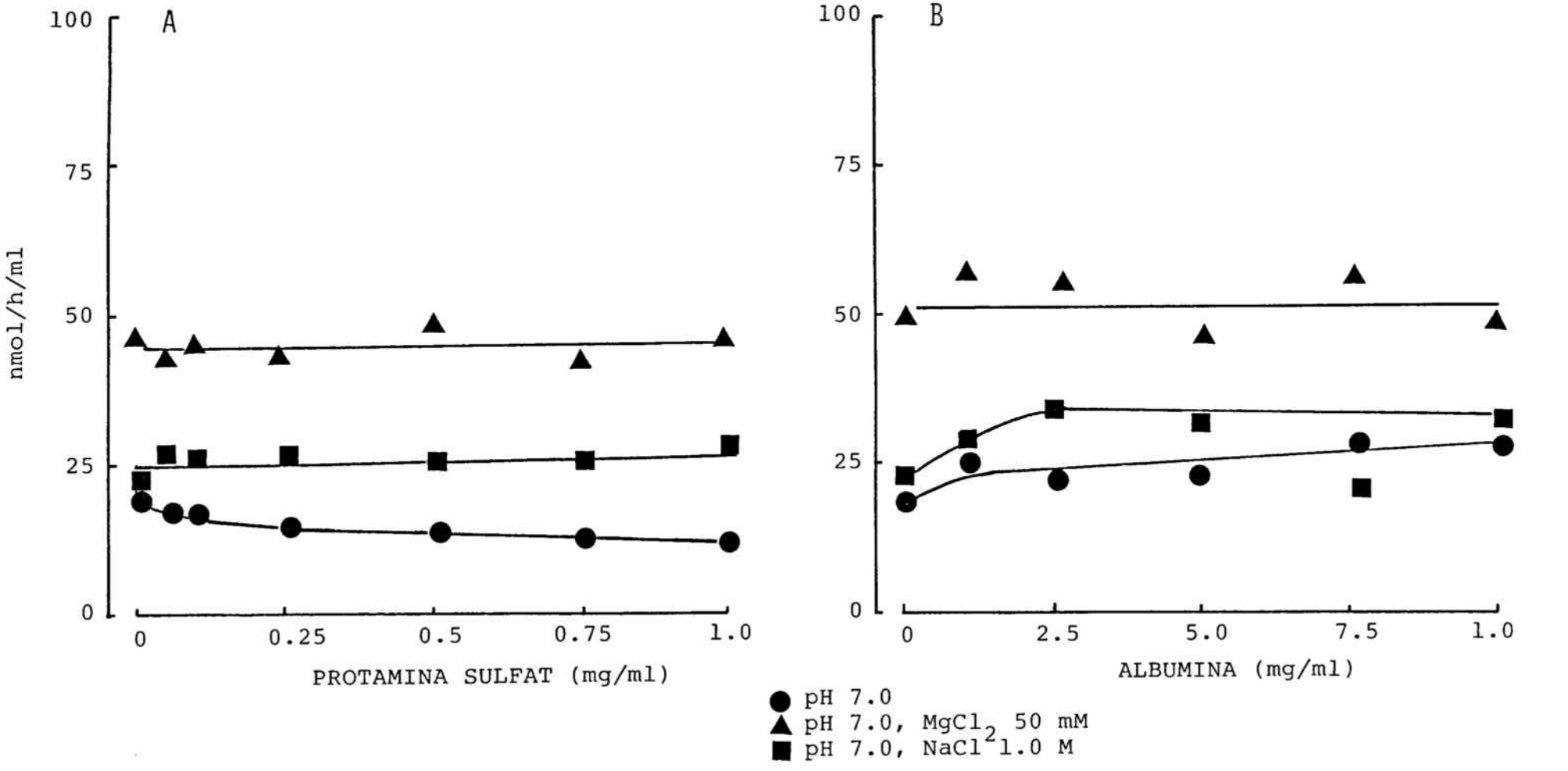


FIGURA 3.30 INACTIVACIO TERMICA DE LES ACTIVITATS TAGH NO RETINGUDES PER L'HEPARINA-SEFAROSA

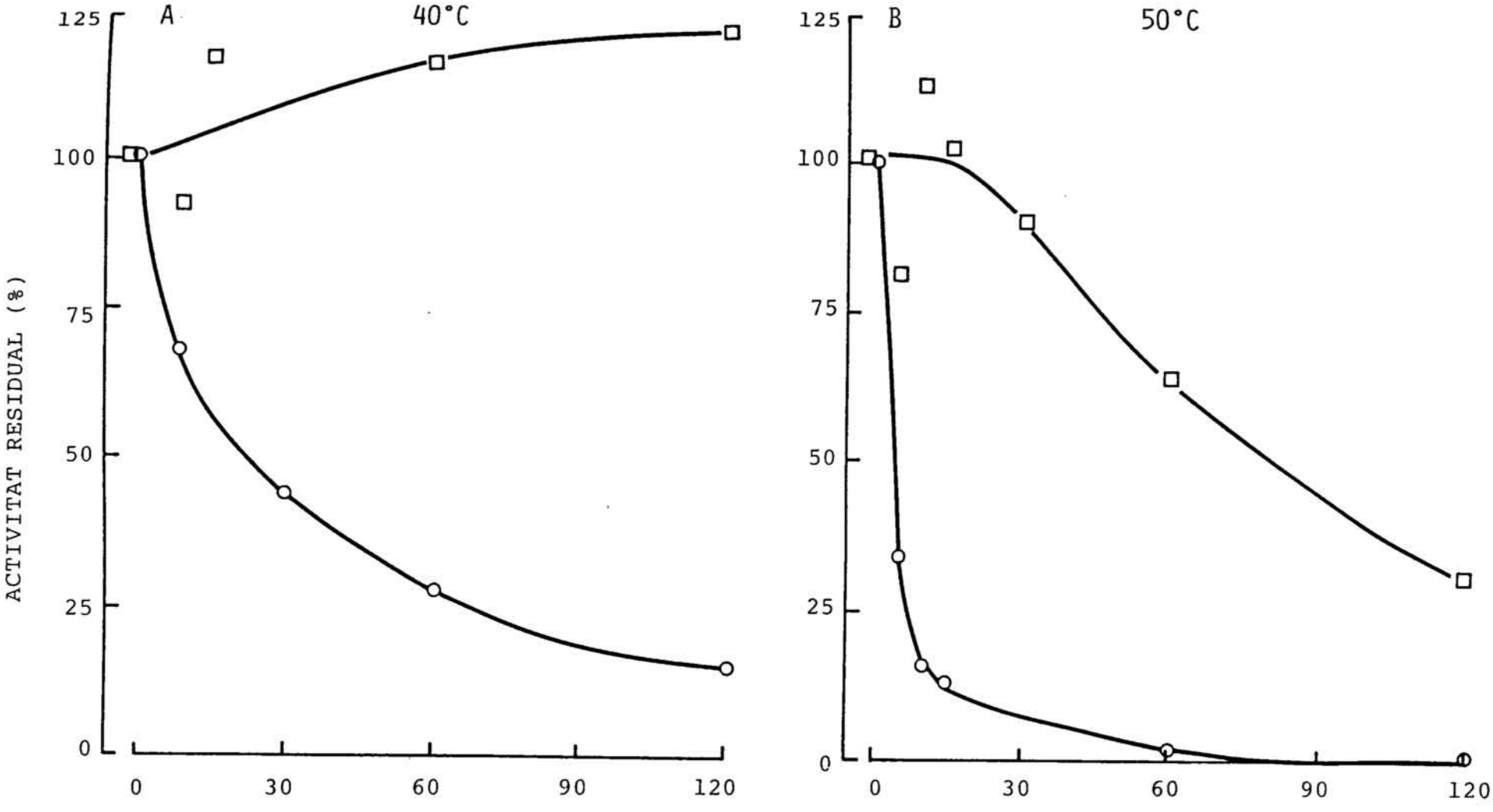
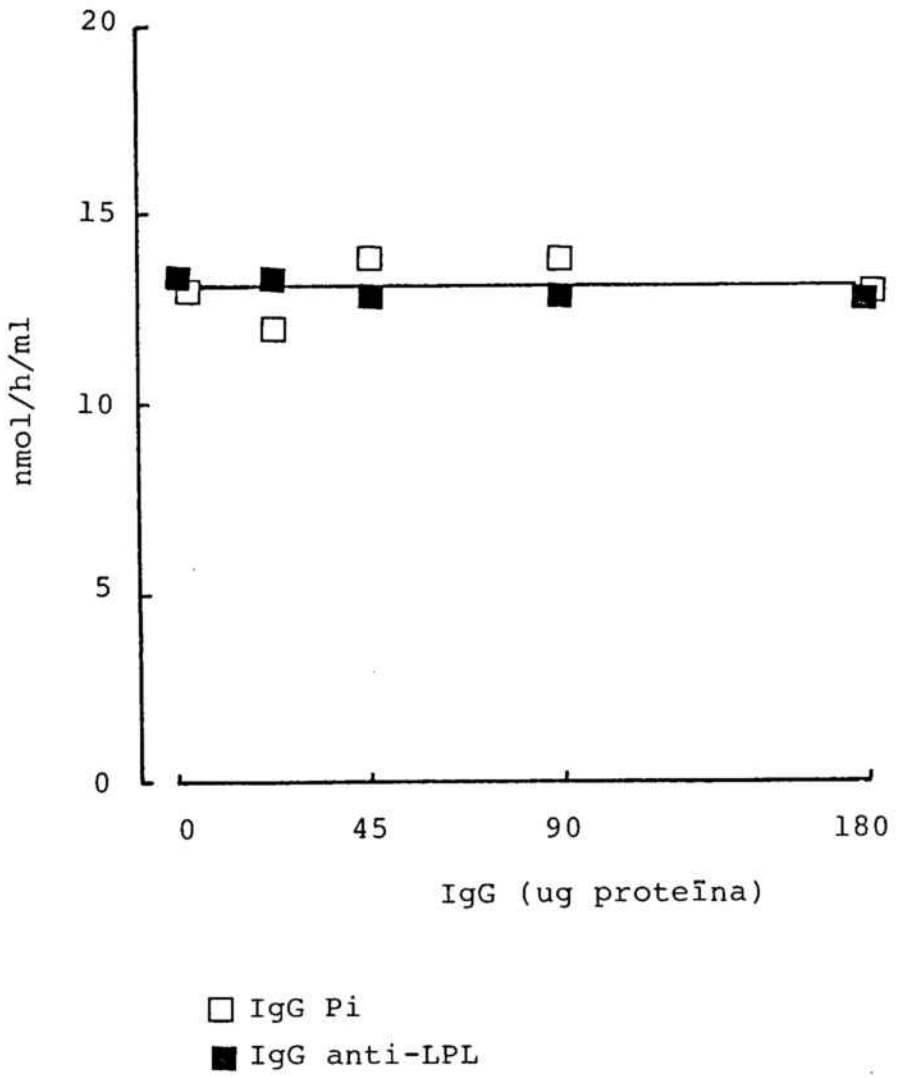


FIGURA 3.31

EFECTE DE LES IMMUNOGLOBULINES G ANTI-LPL SOBRE L'ACTIVITAT TAG HIDROLASA NEUTRE NO RETINGUDA PER L'HEPARINA-SEFAROSA



d'aquesta com de l'homogenat original, incubàrem la mateixa quatitat de proteïna (0.13 mg). L'activitat TAGH neutre (+) sèrum de l'homogenat s'inhibí un 63% i la TAGH neutre (-) sèrum un 43%.

Per totes aquestes propietats (insensibilitat al sèrum, alnNaCl 1.0 M, a la protamina sulfat, no afinitat per l'heparina, no inhibició per IgG anti-LPL), ens atrevim a concloure que als cardiomiòcits de rata existeix, a més de les jacconegudes lipoproteïna lipasa i TAGH àcida, una tercera activitat que hidrolitza els enllaços ester dels triacilglicerols alliberant àcids ggrassos. Pel seu pH òptim de 7.0 i la seva independència del sèrum anomenàrem aquesta activitat, TAG hidrolasa neutre independent de sèrum (TAGHNIS).

Des dels primers temps en els que començà a detectar-se una activació de la lipòlisi endògena per les catecolamines als cors perfundits, s'intentà demostrar la presència d'una activitat TAG hidrolasa-sensible a les hormones equivalent a la del teixit adipós. Fins ara no ha pogut demostrar-se l'existència d'aquesta activitat. La comunment anomenada lipasa-sensible a les hormones (LSH) del teixit adipós es caracteritza per tenir un pH òptim de 6.8, ésser resistent al NaCl 1.0 M i protaminassulfat 0.8 mg/ml, ésser insensible al sèrum, inhibir-se per NaF 10 mM, i ésser activada per la proteïna quinasa depenent d'AMPc en presència de ATP-Mg^{2+} i AMPc (Huttunen i col., 1970a i b). Aquesta lipasa no es lliga als gels d'heparina-sefarosa (Khoo i col., 1976). Ha estat purificada fins a un 50% de puresa i es determinà un pes molecular aparent de 84 kDa (Fredrickson i col., 1981). Es força ben coneguda la seva regulació per fosforilació-defosforilació, fins i tot a nivell molecular (per molt recent revisió veure Belfrage i col., 1984). La LSH pot hidrolitzar també esters de colesterol a una velocitat un 50% superior a la de degradació dels TAG (Fredrickson i col., 1981). L'activitat colesterol esterasa de la LSH és

també incrementada per la proteïna quinasa depenent d'AMPc en presència d'ATP-Mg^{2+} i AMPc (Severson i col., 1981b). També s'ha demostrat que aquesta LSH del teixit adipós és la mateixa proteïna amb activitat colesterol esterasa neutre de l'escorça adrenal (Cook i col., 1982; Trzeciak i col., 1984) i del cos luti (Cook i col., 1983). Molt recentment Goldberg i Khoo (1985) han observat una activitat colesterol esterasa activable per preincubació amb proteïna quinasa al cor de ratolí. Més encara, observen que, eliminant la LPL per heparina-sefarosa , un 30% deel'activitat TAG hidrolasa neutre determinada en absència de sèrum no és retinguda pels gels. Aquesta activitat té propietats similars a les que nosaltres describim. A les seves mans, aquestaa TAG hidrolasa neutre, quan separada de la LPL, s'activa un 40% per prèvia incubació amb ATP-Mg^{2+} i AMPc; la dependència d'aquesta activació de la proteïna quinasa la conclouen a partir de la inhibició de l'activació que provoca l'addició de l'inhibidor de la proteïna quinasa (Goldberg i Khoo, 1985).

Algunes de les propietats que nosaltre observem per la TAGHNIS concorden amb les descrites per ls LSH. Així, ambdues tenen un pH òptim vora 7.0, són resistents al sèrum, el NaCl 1.0 M i la protamina sulfat i no tenen afinitat per l'heparina. Tot i que els molt recents resultats de Goldberg i Khoo (1985) reforcen el paral.lelisme entre ambdues activitats, a partir dels nostres resultats no podem concloure res de definitiu sobre la identificació de la TAGHNIS que nosaltres describim amb la LSH del teixit adipós.

Sigui quina sigui la identitat de l'activitat TAGHNIS, el que sí que creiem és en la seva inequívoca existència com a entitat molecular diferenciada de la LPL. Se'ns planteja doncs, el tractar de trobar les raons per les que el grup de Hans Stam i Willem C. Hülsmann a Rotterdam arriben a una conclusió diametralment aposada a la nostra.

Vist des de la perspectiva actual, és clar que aquesta activitat es manifestava ja quan caracteritzàrem l'activitat TAGH neutre (-) sèrum a l'homogenat cel.lular. Per una banda la relativa insensibilitat al NaCl i la inhibició per protamina sulfat que observàvem llavors (figures 3.2 i 3.7) reflecteixen la seva presència en l'activitat que valoràvem, conjuntament amb l"activitattresidual de la LPL (que és sensible a la inhibició per NaCl i protamina sulfat fins i tot quan determinada en absència de sèrum, figures 3.22 i 3.23). També la menor sensibilitat a la inactivació tèrmica i a la inhibició per IgG anti-LPL a l'homogenat cel.lular (figures 3.14 i 3.16), així com també la no retenció d'una proporció significativa d'activitat pels gels d d'heparina-sefarosa (taula 3.9), són reflex de la coparticipació de la TAGHNIS i la LPL en l'activitat mesurada a l'homogenat cel.lular a pH 7.5, en presència de $MgCl_2$ 50 mM i absència de sèrum (comparar figura 3.14 amb 3.24 i 3.30, i figura 3.16 amb 3.25 i 3.31). Es més, basant-nos en els nostres resultats d'inhibició per anticossos (figura 3.16) i d'inactivació tèrmica (figura 3.14) a l'homogenat cel.lular, així com en els d'elució i caracterització de les activitats després de l'heparina-sefarosa (especialment la taula 3.10), enssatreviríem a dir que entre el 35% i el 60% de l'activitat,mesurada a l'homogenat en absència de sèrum, correspon a la TAGHNIS. La resta correspondria a l'activitat resilual de la LPL.

Contràriament, Stam i Hülsmann no troben que, al sobrenadant postnuclear d'homogenats de cors de rata dels que la LPL vascular ha estat eliminada per prèvia perfusió amb heparina, l'activitat que mesuren a pH 7.4 en absència de sèrum presenti caractyeristiques diferents de les determinades en presència de sèrum. Així, ambdues activitats són, en el seu cas, fortament inhibides per 1.0 M NaCl (Stam i Hülsmann, 1983). L'activitat que mesuren en absència de sèrum se'ls inhibeix un 95% amb anticossos policlonals contra LPL vascular

(Hülsmann i col., 1982), si bé també observen una menor sensibilitat als anticossos per part de l'activitatt que determinen en absència de sèrum que la que valoren en lasseva presència (Stam i Hülsmann, 1983). Aquesta gran inhibició, conjuntament amb que troben que més del 85% de l'activitat neutre (-) sèrums'elueix de les columnes d'heparina-sefarosa a 1.5 M NaCl (Stam i Hülsmann, 1984), són el fonament de la seva conclusió negativa sobre l'existència d'una activitat neutre diferenciada de la LPL. Si bé la diferent sensibilitat als anticossos i la no caracterització de l'activitat no retinguda a l'heparina-sefarosa són un hàndicap, sembla que a partir de les seves dades la conclusió a la que arriben no és desencertada.

Unas diferència, potser important, entre els seus treballs i el nnostre és el tipus de mostra emprada. Ells utilitzen sobrenedants postnuclears d'homogenats de cor total. Tot i que hagin eliminat la LPL vascular, i potser arrossegat part de la intersticial (Jansen i col., 1980), encara tenen unaa quantitat important de LPL intersticial que només s'allibera amb una perfusió lliure de Ca^{2+} (Hülsmann i col., 1982). Així doncs, a més de l'activitat intracel.lular, les seves mostres contenen LPL extracel.lular que, segurament, estarà incrementant la participació d'aquest enzim en l'activitat total determinada en absència de sèrum, fent més difícil la identificació d'altre activitat. Nosaltres, en emprar miòcits aïllats, obviem la participació hipotètica del medi extracel.lular.

Altre diferència que també podria ésser impotant, és la composició del medi d'homogenació. Mentre ells utilitzen tampó fosfats 1.0 mM pH 7.4, nosaltres emprem un medi molt més complex format per HEPES 10 mM, EDTA 1.0 mM, DTT 1.0 mM, sacarosa 0.25 M, pH 7.5. Creiem que la presència de sacarosa i EDTA pot ésser de gran transcendència. Es ben conegut que només en presència d'aquests dos components s'obté una bona dissociació

de la lipasa-sensible a les hormones de les gotes lipídiques sense que aquest enzim s'inactivi ràpidament (Huttunen i col., 1970a). Si la nostra TAGHNIS és la mateixa LSH, l'absència tant de sacarosa com de d'EDTA del medi d'homogenació emprat per Stam i Hülsmann explicaria molt bé la seva conclusió negativa, sobre tot donat que estan potencian la participació de la LPL en l'activitat que determinen en absència de sèrum. Nosaltres no hem comprovat la importància que cadascun d'aquests factors pogui tenir per l'obtenció del resultat negatiu del grup de Stam i Hülsmann. Ara bé, pensem que aquests comentats, i potser algun altre que se'ns escapa, són els responsables de la discrepància entre el grup de Rotterdam i nosaltres.

3.3.- EFECTE DE LES CATECOLAMINES I LA BIABETES EXPERIMENTAL SOBRE LES ACTIVITATS TRIACILGLICEROL HIDROLASES ALS CARDIOMIOCITA AILLATS

Un cop caracteritzàrem les activitats TAGH presents als cardiomiòcits aïllats de rata, ens interessava determinar les seves variacions en aquelles situacions on s'havia observat una augmentada lipòlisi. En coccret, i dintre de la linea general que porta el nostre laboratori, ens centrèrem en l'efecte de de la incubació de les cèl.lules aïllades amb l'agoniste -adrenèrgic isoproterenol (ISO), i en l'efecte de la diabetes mellitus experimentalment induïda.

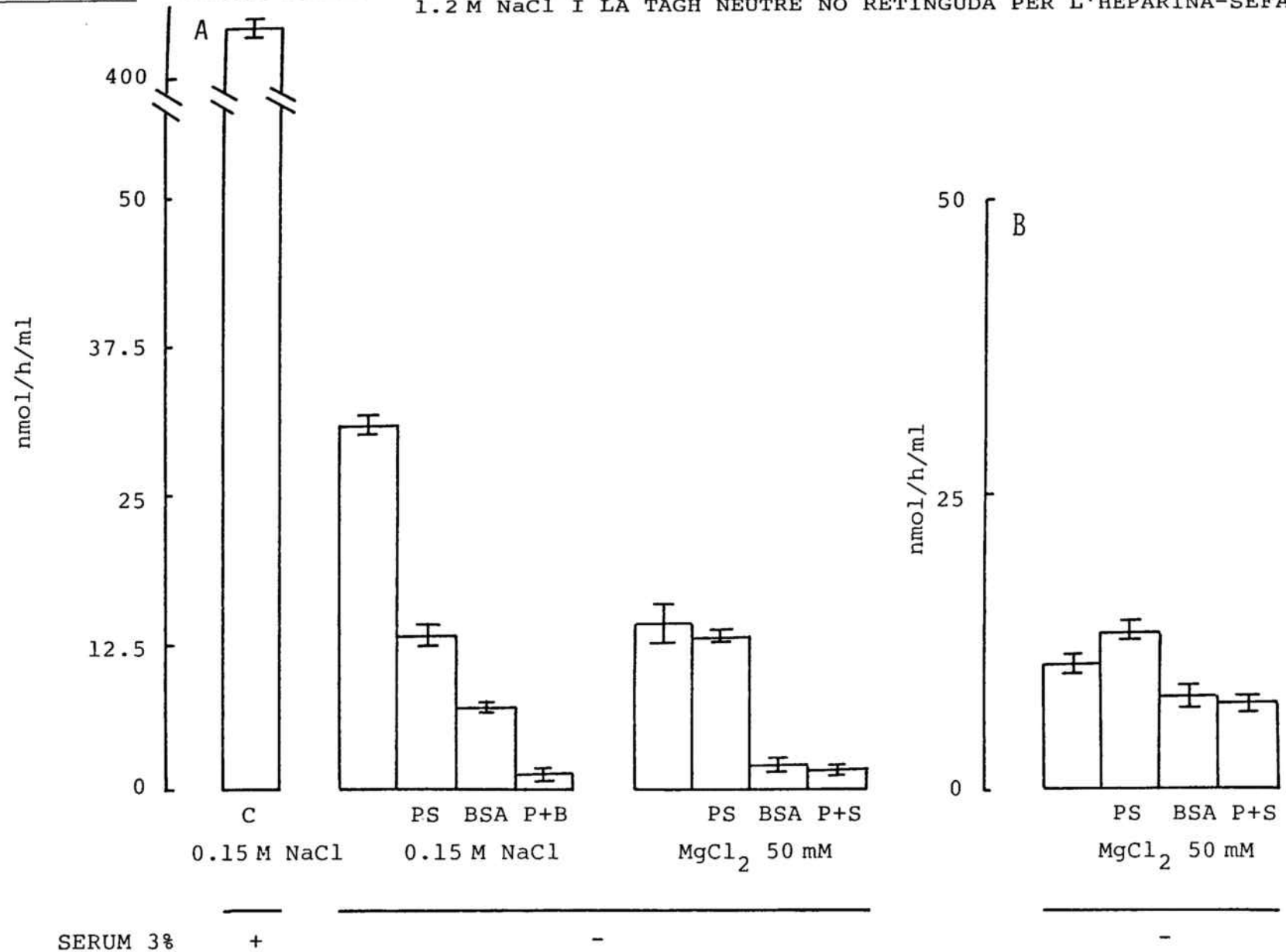
No teníem però, un mètode apropiat amb el que determinar l'activitat TAGH neutre independent de sèrum (TAGHNIS). Així doncs, prèviament calia posar-ne a punt un sistema per valorar l'activitat TAGHNIS sense interferència de l'activitat residual de la LPL

3.3.1.- Determinació i caracterització de l'activitat TAG hidrolasa neutre independent de sèrum en homogenats cel.lulars sense interferència de la LPL

Sabem que la LPL pot inhibir-se fàcilment amb NaCl (fig. 3.22), protamina sulfat o albúmina (fig. 3.23), i aquests productes no afecten a l'activitat TAGHNIS (figs.3.27 i 3.29). El grau d'inhibició de la LPL però, no superà el 70% quan fou mesurada en absència de sèrum. Amb LPL parcialment purificada estubiàrem les condicions per la seva inhibició total. Donat que ja a partir de 0.25 mg/ml de protamina sulfat (PSO_4) i de 5.0 mg/ml d'albúmina (BSA) obtenírem inhibicions màximes (fig. 3.23) quan era determinada l'activitat LPL en absència de sèrum, estudiàrem l'efecte de la combinació d'ambdós factors (PSO_4+BSA) tant a baixa com a elevada força iònica. Comparada amb l'activitat mesurada en presència de sèrum 3% i NaCl 0.15 M (429 nmol/h/ml), l'activitat mesurada en presència de PSO_4 0.25 mg/ml i BSA 5.0 mg/ml, i en absència de sèrum, fou pràcticament indetectable; tant si la concentració de NaCl era 0.15M (1.5 nmol/h/ml) com 1.0 M (1.7 nmol/h/ml), representant només un 0.3% i un 0.4% respectivament de l'activitat màxima (figura 3.32 A). L'activitat no retinguda a l'heparina-sefarosa , mesurada a pH 7.0 i en presència de $MgCl_2$ 50 mM pràcticament no fou afectada per per la presència conjunta de PSO_4 i BSA (fgura 3. 32 B). A d'altres proves havíem observat que tampoc la presència de PSO_4 i BSA conjuntament, afectaven a l'activitat neutre no retinguda als gels quan es mesurava enpresència de NaCl 1.0 M enlloc de $MgCl_2$ (resultat no presentat).

En homogenats cel.lulars, l'activitat mesurada a pH 7.0 en presència de $MgCl_2$ 50 mM, de PSO_4 0.25 mg/ml i BSA 5.0 mg/ml, és només un 43% de la mesurada a pH 7.5 en presència de $MgCl_2$ 50 mM (taula 3.11). Pensem que aquests 17.8 nmol/h/10^6cel. representen l'activitat TAGHNIS un cop s'inhibeix la LPL residual. Es interssant constatar que si en lloc de $MgCl_2$ 50 mM, s'utilitzava NaCl 1.0 M en el sistema de valoració, l'activitat disminuïa a 8.9 nmol/h/10^6cel. (taula 3.11), resultat que concorda amb els obtinguts amb l'activitat neutre no retinguda per l'heparina-sefarosa (figura 3.28). Per

FIGURA 3.32 EFECTE COMBINAT DE LA PROTAMINA SULFAT I DE L'ALBUMINA SOBRE LA LPL ELUIDA AMB 1.2 M NaCl I LA TAGH NEUTRE NO RETINGUDA PER L'HEPARINA-SEFAROSA



(n=4)

TAULA 3.11

ACTIVITATS TRIACILGLICEROL HIDROLASES EN HOMOGENATS CEL.LULARS, DETERMINADES EN DIFERENTS CONDICIONS

Condició	Activitat (nmol/h/10^6cel.)	
pH 5.0	199.7±8.5	
pH 7.0, NaCl 1M, (PSO_4+BSA)	8.9±0.9	a
pH 7.0, $MgCl_2$ 50mM, (PSO_4+BSA)	17.8±0.9	b
pH 7.5, $MgCl_2$ 50mM	41.5±2.2	b
pH 7.5, $MgCl_2$ 50mM, sèrum 3%	384.0±14.7	

(PSO_4+BSA): Protamina sulfat 0.25 mg/ml + Albúmina 5.0 mg/ml (quan no indicat: albúmina 0.5 mg/ml)

a: diferències significatives ($p < 0.01$)

b: diferències significatives ($p < 0.001$)

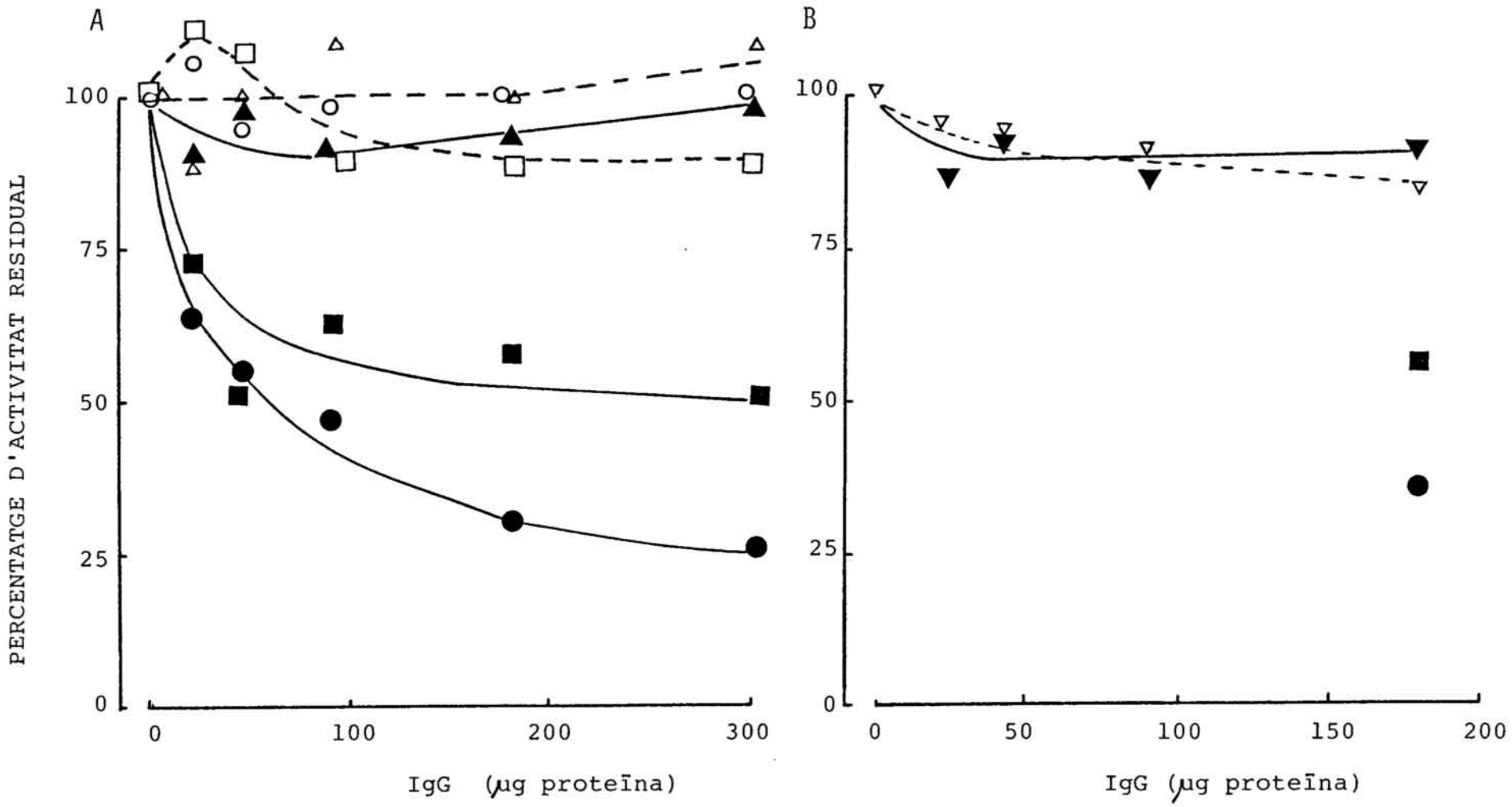
(n=4)

altre banda, la proporció del 43% d'activitat TAGHNIS respecte de la total valorada a pH 7.5 i en presència només de $MgCl_2$ 50 mM s'ajusta molt bé a la que ja havíem estimat nosaltres teòricament al final de l'apartat 3.2.4 basant-nos en els resultats prèvis presentats a les figures 3.14 i 3.16 i en la taula 3.10 especialment.

Les IgG anti-LPL no inhibiren ni l'activitat mesurada a l'homogenat en presència de $MgCl_2$ 50 mM (figura 3.33 B), ni la mesurada en presència de NaCl 1.0 M (figura 3.33 A), ambdues a pH 7.0 i contenint el medi de valoració PSO_4 0.25 mg/ml i BSA 5.0 mg/ml. En ambdós experiments les activitats mesurades a pH 7.5 en presència de $MgCl_2$ 50 mM (+) sèrum 3% s'inhibiren entre 43-50% en absència de sèrum i entre 65-75% en presència de sèrum (experiments tots ells fets amb les IgG del lot Ab_2). Aquest resultat ens reforçà en la suposició de que la presència conjunta de PSO_4 i BSA eliminava la interferència de la LPL. Si això era així, en la fracció que s'elueix amb 0.15 M NaCl de les columnes d'heparina-sefarosa havíem de recuperar tota l'activitat aplicada inicialment. De fet no fou així. Després de dos experiments, recuperàrem a la fracció no retinguda un 31.5% de l'activitat mesurada a pH 7.0 amb $MgCl_2$ 50 mM, PSO_4 0.25 mg/ml i BSA 5.0 mg/ml aplicada inicialment (taula 3.12). A l'eluït amb 1.2 M NaCl només recuperàrem un 3% donant una recuperació total del 34.5%. Si calculem però la proporció de l'activitattrecuperada en el rentat inicial respecte del total d'activitat recuperada, llavor obtenim que del total d'activitat recuperada, un 92% ho fou al rentat inicial. Un resultat molt similar l'obtinguérem per l'activitat mesurada a pH 7.0 amb PSO_4 i BSA i amb NaCl 1.0 M en lloc de $MgCl_2$ 50 mM.

L'activitat que no recuperem en aquestes dues fraccions no s'elueix a cap concentració de NaCl fins a 2.0 M. Aquest 65% correspon, probablement, a inactivació de l'enzim, potser per proteòlisi. Mai però comprovàrem si la presència d'inhibidors delles proteases millora-

FIGURA 3.33 EFECTE DE LES IgG ANTI-LPL SOBRE LES ACTIVITATS TAGH NEUTRES EN HOMOGENATS CEL.LULARS



TAULA 3.12

LLIGAM DE L'ACTIVITAT TAGH NEUTRE INDEPENDENT DE SERUM A COLUMNES D'HEPARINA-SEFAROSA

	NaCl 1.0 M		$MgCl_2$ 50 mM	
	Activitat (nmol/h)	Recuperació (%)	Activitat (nmol/h)	Recuperació (%)
Aplicat	66.9		84.0	
No lligat	22.6	37.5	26.7	31.5
Eluït amb 1.2 M	5.2	8.0	2.5	3.0

(mitjana de dos experiments)

En tots dos casos l'activitat fou mesurada a pH 7.0 en presència de protamina sulfat 0.25 mg/ml i albúmina 5.0 mg/ml

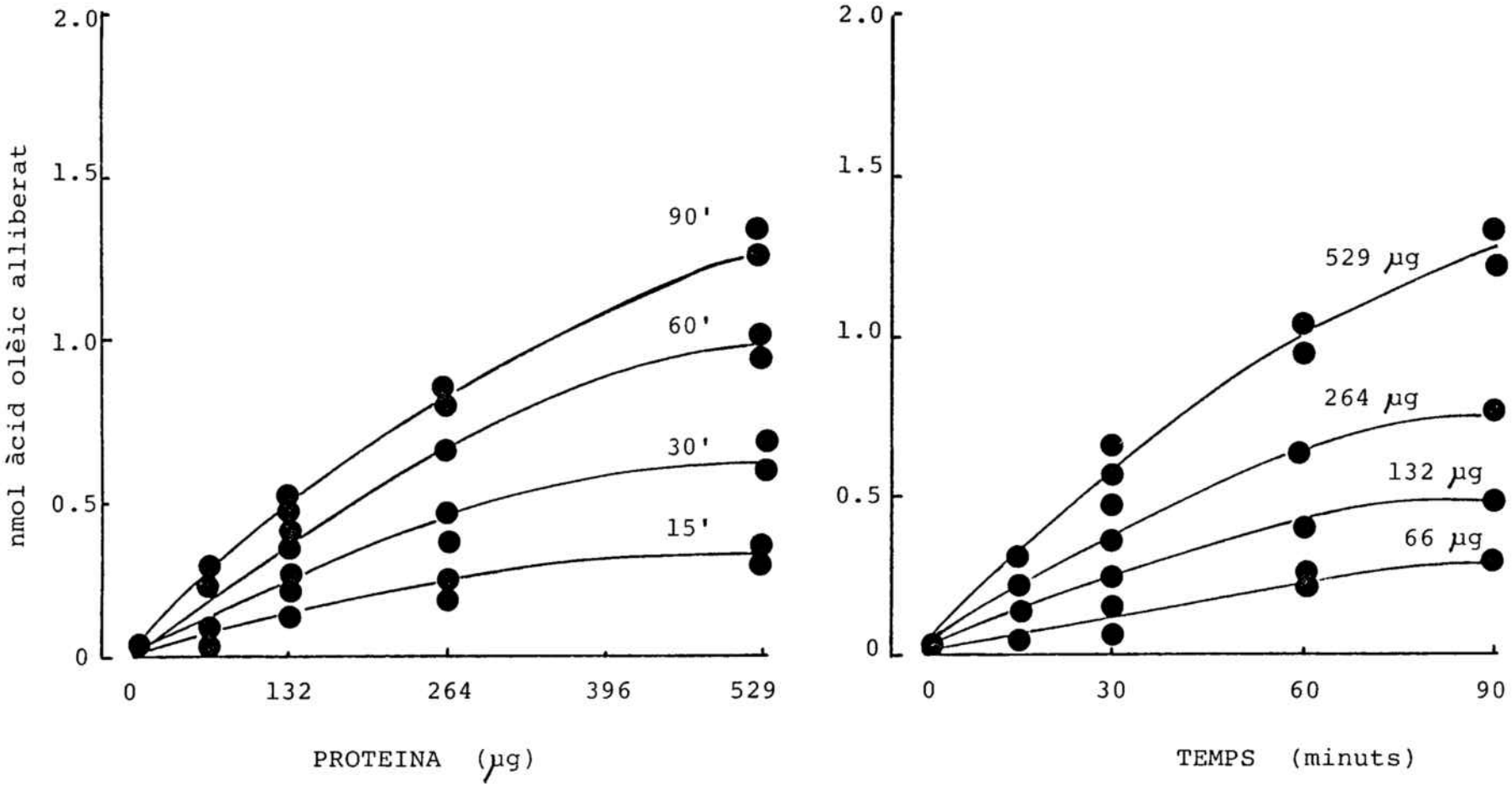
ven la recuperació. En aquest sentit podria ésser interessant recordar que en el procés de purificació de la lipasa-sensible a les hormones del teixit adipós, la inclusió de d'inhibidors de les proteases és especialment important a les primeres etapes del procés per tal d'obtenir una bona recuperació (Fredrickson i col., 1981).

En base a aquestş darres resultats concloguérem que en presència de $MgCl_2$ 50 mM (o NaCl 1.0 M), protamina sulfat 0.25 mg/ml, albúmina 5.0 mg/ml, l'activitat mesurada a pH 7.0 correspon totalment a la quee anomenem TAGHNIS, sense interferències de la LPL residual. Preferírem la utilització de $MgCl_2$ a la de NaCl doncs obteníem activitats més elevades.

L'activitat determinada a l'homogenat cel.lular sota aquestes condicions (PIPES 25 mM pH 7.0,$MgCl_2$ 50 mM, protamina sulfat 0.25 mg/ml, albúmina 5.0 mg/ml, tri-(9,10-(n)-H^3)oleïlglicerol 0.6 mM, 7.0 mCi/mmol en un volum final de 0.4 ml) era lineal fins uns 0.265 mg proteïna i 60 minuts d'incubació (figura 3.34). En tots els experiments posteriors incubàrem 0.125 mg proteïna cel.lular durant un temps de 60 minuts per la determinació de l'activitat TAGHNIS.

Tot i que a la fracció no retinguda per l'heparina-sefarosa no s'observava cap estimulació per sèrum, ans al contrari, de l'activitat neutre (figura 3.28), a l"homogenat, la presència de sèrum 3% al medi de valoració augmentà 4 vegades l'activitat mesurada sota les condicions anteriorment indicades (taula 3.13). A les mateixes mostres, l'activitat mesurada a pH 7.5 amb $MgCl_2$ 50 mM fou estimulada 7.5 vvegades. La interpretació és complicada, però creiem que ens la porta els resultats de l'experiment següent en el que estudiàrem l'efecte de PSO_4+BSA sobre l'activitat LPL parcialment purificada i determinada (+) i (-) sèrum a 0.2 M NaCl (taula 3.14). Mentre que l'activitat mesurada en ab-

FIGURA 3.34 LINEALITAT AMB TEMPS I CONCENTRACIO DE PROTEINA DE L'ACTIVITAT TAGH NEUTRE INDEPENDENT DE SERUM



TAULA 3.13

EFECTE DEL SERUM SOBRE L'ACTIVITAT TAGH NEUTRE DETERMINADA EN PRESENCIA DE PROTAMINA SULFAT I ALBUMINA EN HOMOGENATS CEL.LULARS

Condició	Activitat (nmol/h/10^6cel.)		Relació +/- sèrum
	(-) sèrum	(+) sèrum	
1	36.3±3.4	263.7±4.0	7.5±0.7 ($p < 0.01$)
2	24.9±2.0	98.5±4.6	4.0±0.3

Condició 1: pH 7.5, $MgCl_2$ 50 mM
Condició 2: pH 7.0, $MgCl_2$ 50 mM, PSO_4 0.25 mg/ml, BSA 5 mg/ml
(n=5)

TAULA 3.14

EFECTE DE LA PROTAMINA SULFAT I L'ALBUMINA SOBRE L'ACTIVITAT LPL PARCIALMENT PURIFICADA I VALORADA (+) O (-) SERUM

Condició	Activitat (nmol/h/ml)	
	(-) sèrum	(+) sèrum
Control (NaCl 0.2 M)	42.8±1.8	474.6±14.6
+ PSO_4 0.25 mg/ml	16.1±1.8	320.2±13.5
+ BSA 5.0 mg/ml	10.1±1.4	408.4±12.4
+ PSO_4 + BSA	1.4±0.3	278.8±12.4

(n=2)

sència de sèrum i en presència de PSO_4 i BSA fou un 0.3% de l'activitat màxima (com ja coneixíem pel resultat de la figura 3.32), la determinada en presènciade sèrum no fou inhibida més que un 41% per la presència conjunta de PSO_4 iBBSA. Basant-nos en aquest resultat, creiem que quan a l'homogenat cel.lular determinem l'activitat a pH 7.0 amb $MgCl_2$, PSO_4 i BSA i en pprència de sèrum, a més de l'activitat TAGHNIS (que podria estar inhibida), es quantifica una proporció significativa d"activitat LPL. Fet que no s'esdevé, com hem demostrat anteriorment, quan es valora en absència de sèrum. En aquest sentit, quan determinàrem l'efecte del sèrum sobre l'activitat de l'homogenat cel.lular determinada a pH 7.0 amb NaCl 1.0 M, PSO_4 0.25 mg/ml i BSA 5.0 mg/ml, observàrem un augment d'activitat de dues vegades només (de 4.9 ± 0.6 a 9.8 ± 0.9 nmol/h/10^6cel., n=3). Paral.lelament, l'activitat LPL parcialment purificada s'inhibí un 88% quan la determinàrem en presència de sèrum 3%, NaCl 1.0 M, PSO_4 0.25 mg/ml i ESA 5.0 mg/ml, respecte de l'activitat màxima (sèrum 3%, NaCl 0.2M) (24.4 ± 2.1 vs 197 ± 9 nmol/h/ml, n=4). Així, en augmentar la inhibició de la LPL mesurada en presència de sèrum, disminueix l l'estimulació per sèrum de l'activitat mesurada a pH 7.0 en presència de PSO_4 i BSA a l'homogenat.

Estudiàrem també la resistència a la pols acetònica i la distribució subcel.lular de l'activitat TAGHNIS. Observàrem que aquestaaactivitat era molt sensible al tractament amb acetona/èter, a l'igual que ho era la TAGH àcida i contràriament a la LPL (taula 3.15). L'activitat esprcífica màxima es localitzà a la fracció P100 (taula 3.16), disminuïnt progressivament a les fraccions P13 i P8, essent a P.7 i S100 inferior a la de l'homogenat. Com a les altres activitats (taules 3.4 i 3.6), es recuperà una proporció considerable de l'activitat TAGHNIS al precipitat a 700xg (34%). Entre les fraccions postnuclears, es recuperà una major proporció d'activitat (48% vs S.7) a la fracció P100 (taula 3.16). On es recuperà la menor part de l'activitat fou a la fracció

TAULA 3.15

COMPARACIO DE LES ACTIVITATS TRIACILGLICEROL HIDROLASES EN HOMOGENATS CEL.LULARS I POLS ACETONIQUES

	Homogenat (nmol/h/10^6cel.)	Pols Acetònica (nmol/h/10^6cel.)	
pH 5.0	133.0±5.9	20.4±6.8	($p < 0.001$)
pH 7.0, $MgCl_2$ 50 mM PSO_4 0.25 mg/ml BSA 5.0 mg/ml	22.9±0.9	4.8±0.6	($p < 0.01$)
pH 7.5, $MgCl_2$ 50 mM	48.9±0.9	28.4±2.3	($p < 0.01$)
pH 7.5, $MgCl_2$ 50 mM, Sèrum 3%	380.1±21.9	676.2±71.3	($p < 0.001$)

(n=5)

TAULA 3.16

DISTRIBUCIO SUBCEL.LULAR DE L'ACTIVITAT TAG HIDROLASA NEUTRE INDEPENDENT DE SERUM

Fracció.....	H	P.7	P8	P13	P100	S100
Activitat específica (nmol/h/mg prot)	3.1±0.4	1.9±0.2	10.3±1.6	14.4±3.0	19.5±4.6	1.6±0.6
Distribució (%)	100	34.3±4.9	12.9±2.4	11.0±1.9	32.0±4.2	9.9±3.1
Activitat específica relativa	1.0	0.6±0.1	2.3±0.2	3.1±0.6	4.4±0.8	0.4±0.1

(n=6)

soluble, on també fou menor l'activitat específica relativa (taula 3.16, figura 3.35). Així doncs, l'activitat TAGHNIS és majoritàriament "microsomal" (figura 3.35). De fet, el resultat era previsible a partir dels que ja coneixíem per les taules 3.5 i 3.6 on s'observava que es recuperava una més gran proporció d'activitat soluble a la TAGH neutre (+) sèrum que a la TAGH neutre (-) sèrum.

3.3.2.- Efecte de la incubació de les cèl.lules amb isoproterenol sobre les activitats TAG hidrolases

Un cop obtingut un ssistema per determinar específicament l'activitat TAGHNIS, podíem abordar l'estudi de les variacions de les diferents activitats TAGH en les situacions en les que la lipòlisi endògena està estimulada.

Comprovàrem primerament, que les cèl.lules responien a l'agonista -específic isoproterenol (ISO). Així observàrem que tant l'alliberament de glicerol al medi d'incubació (índex de lipòlisi), com la relació d"activitats -/+ AMP de la glicogen fosforilasa estaven incrementades després de la incubació durant 20 minuts amb ISO 0.01 mM (figura 3.36). L'alliberament de glicerol augmentà vora el doble, si bé tant el valor basal com l'estimulat foren sensiblement més alts que els obtinguts prèviamentaal nostre laboratori (Kryski, 1985; Kryski i col., 1985a i b; Kenno i Severson, 1985). La relació d'activitats -/+ AMP de la glicogenfosforilasa augmentà un 63%, fet que es deu exlusivament a un augment de l'activitat independent d'AMP (figura 3.36), i també ara el valor basl (0.24) és més elevat que el descrit per altres en cors perfundits (Ingrebetsen i col., 1981; Werth i col., 1983), però similar a la descrita en cèl.lules aïllades o en cultiu (Hayes i col., 1982; Buxton i Brunton, 1983). La diferència podria deure's a que, als cors perfundits, les mostres es congelen rapidíssimament "in situ" (freeze-clamping), mentre que nosaltres, prèvia-

FIGURA 3.35

"DE DUVE PLOT" DE LA DISTRIBUCIO SUBCEL.LULAR DE L'ACTIVITAT TAGH NEUTRE INDEPENDENT DE SERUM

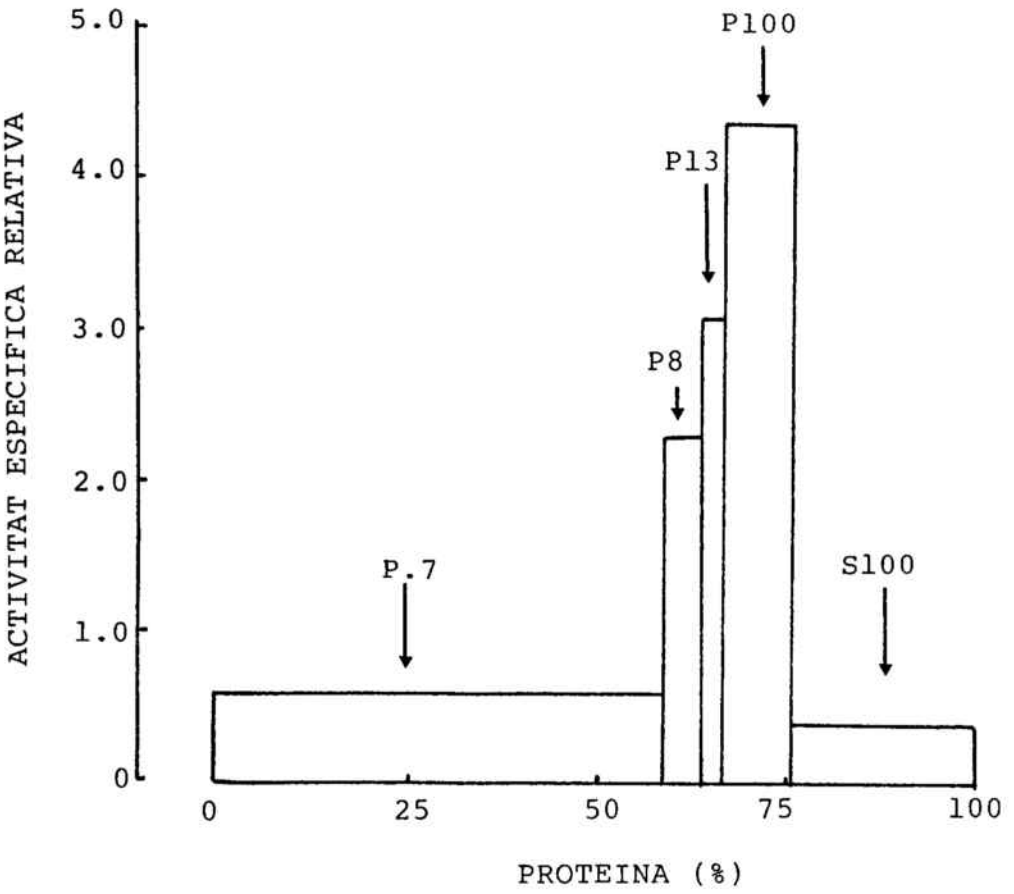
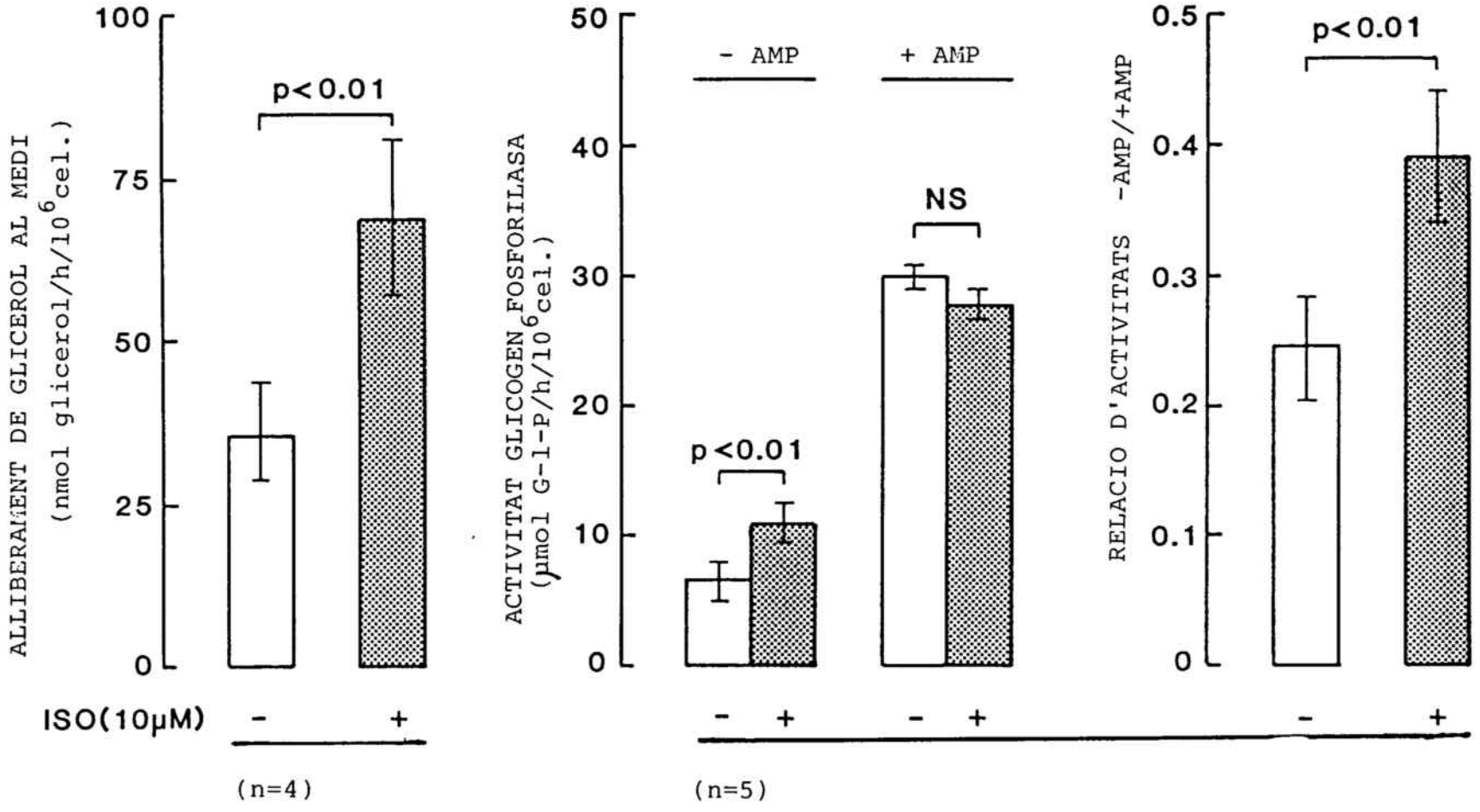


FIGURA 3.36 EFECTE DE LA INCUBACIO AMB ISOPROTERENOL SOBRE L'ALLIBERAMENT DE GLICEROL I L'ACTIVITAT GLICOGEN FOSFORILASA

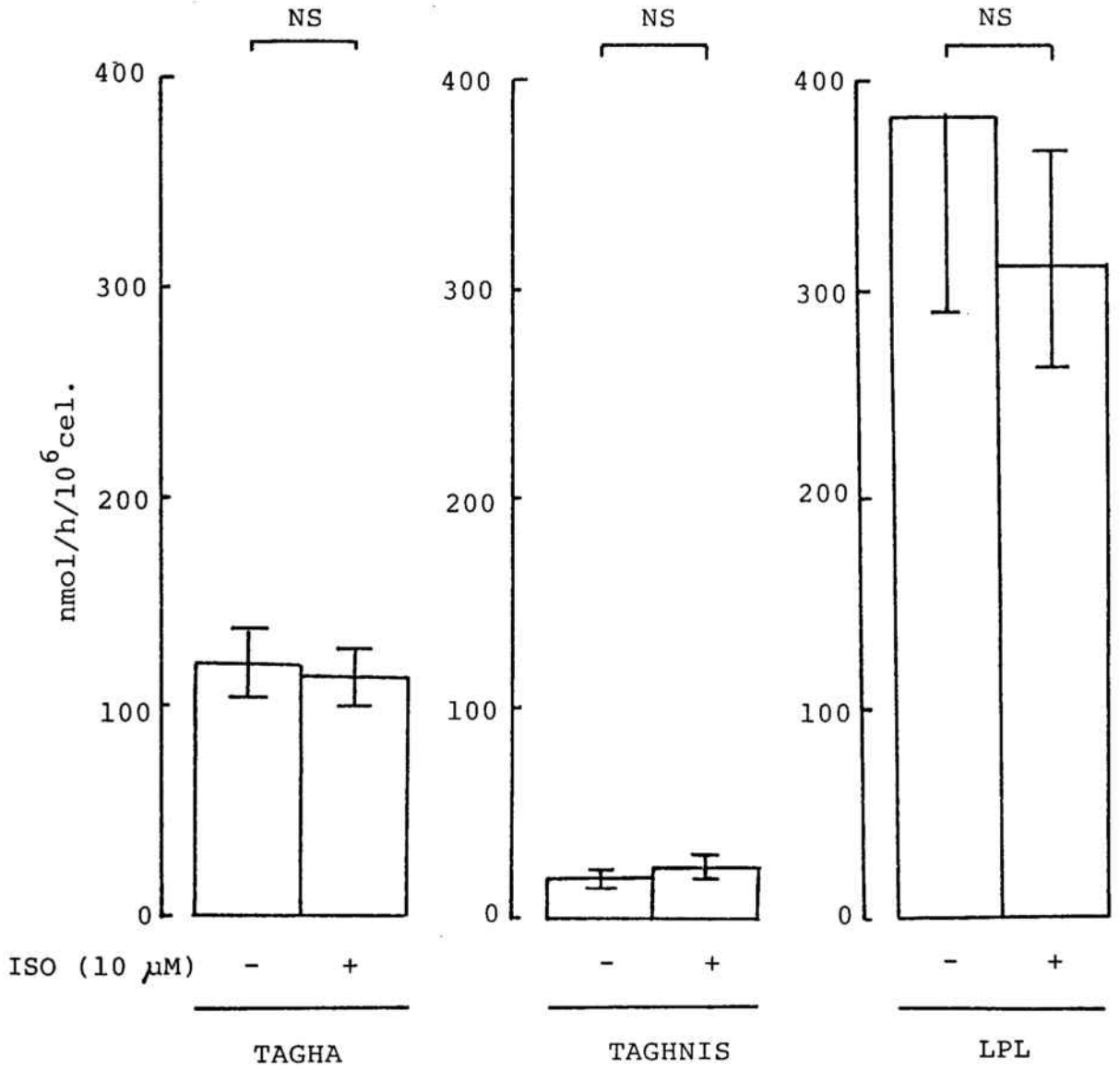


ment a la congelació amb N_2 líquid, havíem de centrifugar les cèl.lules. Es coneix que l'activitat glicogenfosforilasa al cor és molt sensible a l'anòxia (Cornblath i col., 1963). Així doncs, el curt període anòxic al que sotmetíem les cèl.lules abans de la congelació podria ésser el responsable de l'augmentdde la relació +/- AMP en condicions basals. De fet, Kryski (1985) observà que aturant la incubació de lesccèl.lules amb l'ISO mitjançant l'us d'acetona freda (-80°C), obtenia unes relacions +/- AMP, en condicions basals, de 0.05 que augmentava 3-4 vegades després de la incubació de les cèl.lules amb SISO. Observà rambé, que seguint un p protocol idèntic al descrit a l'apartat 2.2.12, obtenia unes relacions +/- AMP semblants a les nostres.

Tot i produir-se estimulació de la lipòlisi, no observàrem variacions consistents i significatives de cap de les tres activitats TAG hidrolases (l'àcida, la neutre independent de sèrum i la LPL) com a resultat de la icubació de les cèl.lules amb 0.01 mM ISO durant 20 minuts (figura 3.37). Aquests resultats concorden amb els obtinguts per Stam i Hülsmann (1983), qui tampoc observen, en cors perfundits amb glucagó o norepinefrina, cap efectedd'aquestes hormones ni sobre la LPL alliberable amb heparina ni sobre la LPL residual. Tampoc Alousi i Mallow (1964) cap efecte de l'administració aguda d'epinefrina sobre l'activitat LPL en cor total. Contràriament, Jesmok i col.laboradors (1977) observaren un augment de LPL al cor total després de perfundir amb epinefrina. També el grup de Palmer i Oscai a Chicago troben un augment d'activitat LPL no-alliberable amb heparina després de perfusions amb glucagó o catecolamines, així com d'incubacions de cèl.lules aïllades amb catecolamines. Aquest grup, basat en l'elevada correlació entre les variacions d'activitat LPL residual que observen i els nivells tissulars de TAG, conclouen que la LPL intracel.lular és la "lipasa-sensible a les hormones " al cor (Oscai, 1979; Palmer i col., 1981; Oscai i col., 1982; Palmer i Kane, 1983a i b; Miller i col., 1984; Miller

FIGURA 3.37

EFECTE DE LA INCUBACIO DELS CARDIOMIOCITS AILLATS AMB ISOPROTERENOL SOBRE LES ACTIVITATS TAGH EN HOMOGENATS CEL.LULARS



(n=7)

i Oscai, 1984). Es difícil establir les causes de les diferències entre els seus resultats i els nostres. Per una banda, suposant com ells suposen que l'activació es deu a fosforilació de l'enzim, en preparar la mostra per la determinació de les activitats, en les nostres condicions, podria produir-se una defosforilació de l'enzim amb la conseqüent desactivació. L'activació de la LPL ha estat trobada tant en homogenats con en pols acetòniques del cors, així com en extractes fets amb lubrol dels homogenats de teixit (Jesmok i col., 1977). Per tal d'eliminar una possible ràpida desactivació en les nostres condicions, férem uns experiments en els que la incubació amb l'ISO l'aturàrem en prendre una alíquota de la suspensió cel.lular i posar-la amb acetona a -80°C i preparàrem unes pols acetòniques. Tampoc així obtinguérem resultats positius (413 ± 61 nmol/h/10^6cel (+) ISO vs 357 ± 62 nmol/h/10^6cel. (-) ISO, n=9, diferències no significatives). Ni l'activitat àcida, ni la neutre independent de sèrum les determinàrem en aquests experiments al no resistir el tractament amb acetona/èter. Altre possibilitat podria ésser que el nostre substrat fos inadequat per poder quantificar les activacions que en realitat es produïssin. Així, podria donar-se que l'activació, tot i ésser present a les nostres mostres, pogués observar-se només amb substrats naturals o molt semblants a aquests. En aquest sentit Okuda i col.laboradors (1983) observaren que només podien detectar activació de la lipasa-sensible a les hormones del teixit adipós com a resposta a la incubació amb epinefrina, quan utilitzaven substrats endògens per a la quantificació de l'activitat; si bé altres autors sí trobaren activació de la LSH tot i treballant amb emulsions artificials (veure Belfrage i col., 1984 per revisió). En tot cas, la composició exacta del substrat segurament és important tant pel valor d'activitat basal com, potser, per l'observació d'activacions de la LSH per proteïna quinasa. Així, Severson i Hurley (1985) demostren recentment que quan el substrat es prepara en presència de fosfatidiletano-

lamina, l'activitat basal de la LSH del teixit adipós de coloms augmenta, però no pot observar-se cap efecte estimulador de la preincubació de la mostra amb proteïna quinasa depenent d'AMPc. Activació que sí es produeix doncs si la mateixa mostra preincubada es valora amb substrat preparat sense el fosfolípid, l'activació s'observa normalment. Si això és extrapolable a la LPL dec cor o no, ho desconeixem. Ara bé, el grup de Palmer i Oscai utilitzen, per la determinació de l'activitat LPL, emulsions artificials de trioleïlglicerol amb fosfatidilcolina com a emulsionant. Jesmok i col.laboradors, que també observaven activació de la LPL, empaven lubrol PX per les emulsions. Nosaltres emprem albúmina, probablement en estat desnaturalitzat, Stam i Hülsmann (1983) utilitzen goma aràbiga. No sabem si aquestes diferències són crítiques per l'observació de laspossible activació de la LPL. En tot cas, nosaltres hem provat diferents substrats preparats afegint-hi fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina, i tampoc hem observat diferències entre l'activitat LPL de cèl.lules en presència o absència d'ISO 0.01 mM (resultats no presentats). Sigui com sigui, els nostres resultats no ens permeten donar suport, si bé tampoc ens atrevim a rebutjar, les teories segons les que la LPL intracel.lular fóra l'enzim involucrat en la regulació de la lipòlisi endògena al cor.

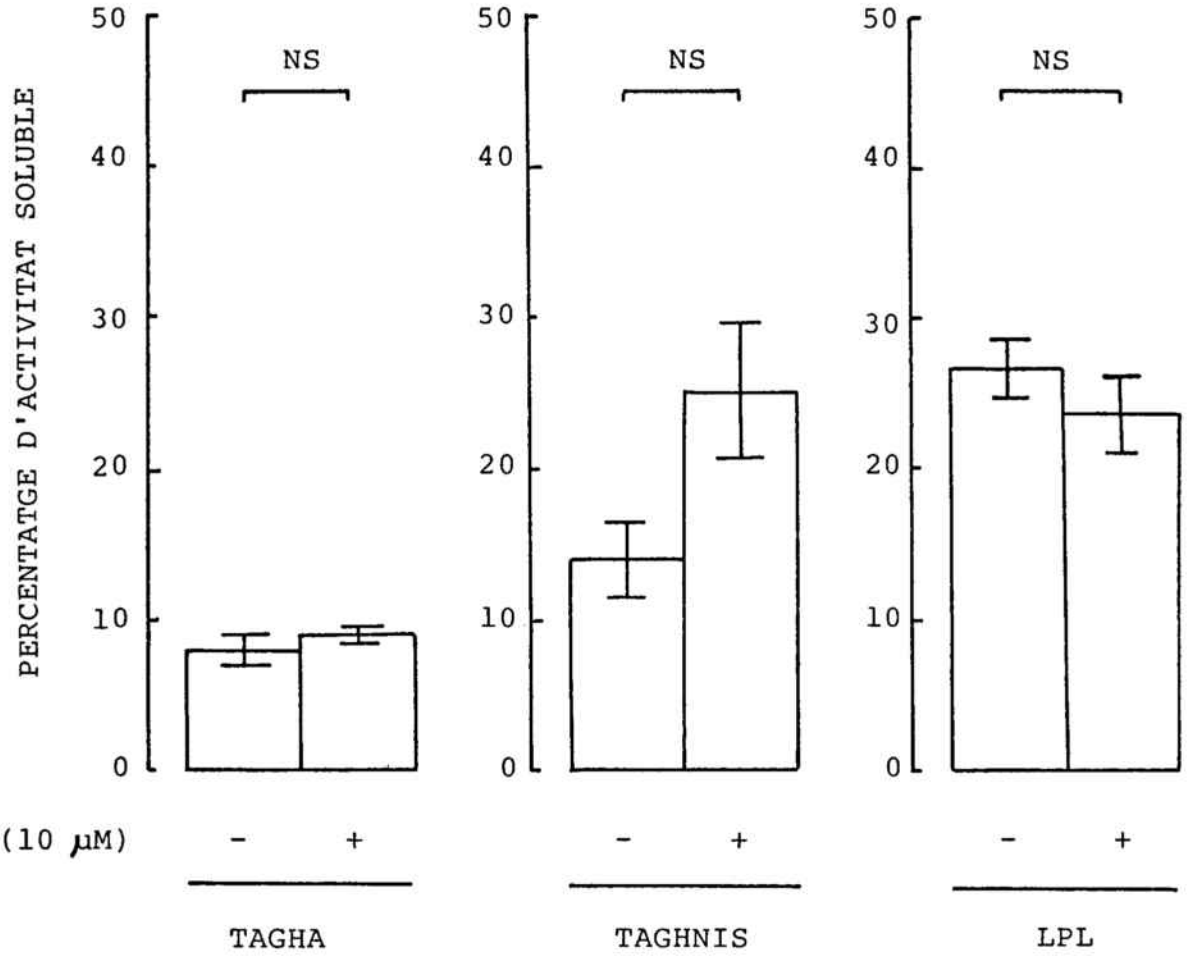
En els darrers anys ha estat demostrada la importància de la translocació subcel.lular en la regulacióo de l'activitat d'alguns enzims. Inicialment es descrigué per la CTP:fosfocolina citidiltransferasa a hepatòcits en cultiu (per revisió veure Vance i Pelech, 1984), i més recentment per la fosfatidat fosfohidrolasa igualment amb hepatòcits en cultiu (Cascales i col., 1984). També ha estat descrita la translocació de la lipasa-sensible a les hormones, en adipòcits diferenciats en cultiu de la línea 3T3-L1, com a resposta a laaincubació de les cèl.lules amb isoproterenol (Hirsch i Rösen, 1984). Aquests autors observaren que, tant la

incubació de les cèl.lules amb ISO 1.0 uM com amb anàlegs de l'AMPc, produïen un augment de la proporció de l'activitat precipitable a $4x10^4$xg (del 42% al 89%), produint-se una disminució paral.lela de l'activitat soluble, suggerint que la interacció de l'enzim amb el substrat i membranes associades podria ésser un nou punt de regulació de l'activitat de la LSH del teixit adipós blanc. En vista d'aquests resultats realitzàrem una sèrie d'experiments per tal d'aclarir la possibilitat de canvis en la distribució subcel.lular com a forma de regulació d'alguna de les activitatssper acció de l'ISO. Forma de regulació que no hauris de comportar, necessàriament, alteracions de l'activitat total. Com pot observar-se a la figura 3.38, no detectàrem cap variació consistent i significativa en la proporció d'activitat soluble (S100) ni per la TAGH àcida , ni per la neutre independent de sèrum ,ni per la LPL com a resposta a la incubació amb isoproterenol. Paral.lelament, tampoc observàrem diferències en la proporció d'activitat particulada (P100), obtinguda sense cap altre fraccionament previ (veure apartat 2.2.12) (resultat no presentat).

Així doncs, nosaltres no hem obtingut cap evidència en favor de que sigui l'activitat d'alguna de les TAG hidrolases el punt on es reguli, bé per increment de l'activitat bé per translocació subcel.lular,la mobilització dels triacilglicerols endogens. Existeixen altres possibilitats. Així, es coneix que els nivells d'acil-CoA i acil-carnitina afecten tant a l'activitat TAGH àcida com a la neutre de cors de rata (Severson i Hurley, 1982). Una modulació per part de les catecolamines de la taxa d'oxidació d'aquests metabòlits podria, indirectament, modular la via lipolítica. Ara bé, ni en cors perfundits (Kreisberg, 1966a) ni en miòcits aïllats (Severson, observació no puclicada) ha estat observat cap efecte de les catecolamines sobre l'oxidació d'àcids grassos. En tot cas, a partir dels nostres resultats, només podem afirmar que cal un més

FIGURA 3.38

EFECTE DE LA INCUBACIO DE LES CEL.LULES AMB ISOPROTERENOL SOBRE EL PERCENTATGE D'ACTIVITAT SOLUBLE DE LES DIFERENTS TAG HIDROLASES



(n=6)

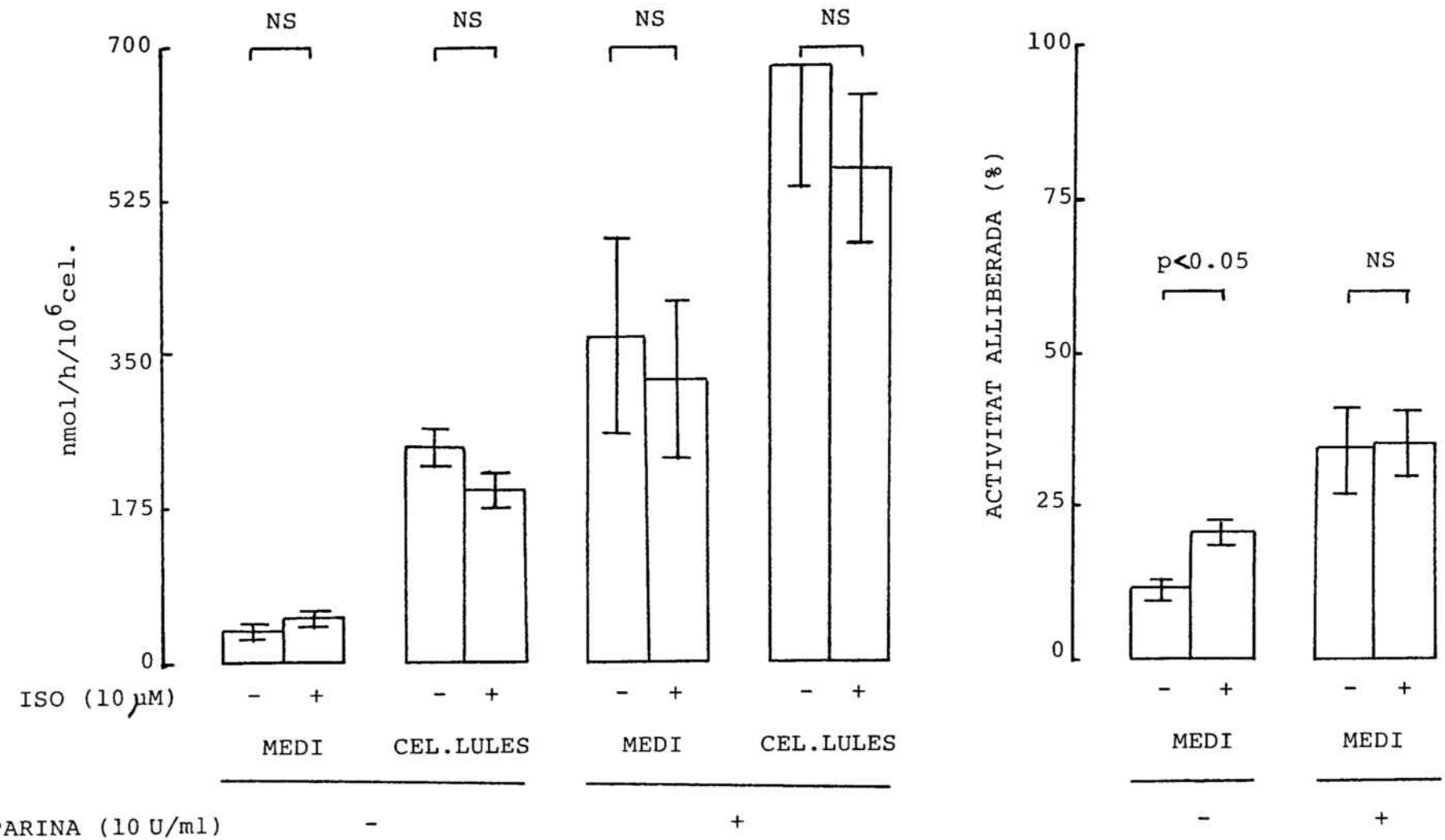
UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE BIOLOGIA
BIBLIOTECA

gran esforç experimental per tal de definir els mecanismens moleculars pels que les catecolamines estimulen la mobilització de les reserves grasses del cor.

De forma colateral vàrem estudiar l'efecte de l'isoproterenol sobre l'alliberament de LPL al medi d'incubació. Es coneix que la perfusió de cors aïllats duranr cinc minuts amb epinefrina o glucagó 0.2 uM no afecta la quantitat de LPL alliberable amb heparina (Stam i Hülsmann, 1983), però perfusions de 2 ó 4 hores amb aquesteshormones sí que provoquen un augment de la LPL alliberable amb heparina (Stam i Hülsmann, 1984). Aquests estudis, tant els de temps curts de perfusió com els de llarga durada, foren fets en cors amb bategar controlat i fixat a 300 batecs/minut. A estudis anteriors havia estat un molt ràpid (1-2 minuts) i transitori efecte de les catecolamines sobre l'alliberament de LPL en cors pre-perfundits amb heparina (simpson, 1979). L'efecte però, no s'observà si els cors no havien estat pre-perfundits amb l'heparina. En coincidir l'augment d'activitat LPL alliberada amb un increment del ritme i del flux cardíac, no pot assegurar-se si l'efecte era, o no, secundari a un augment de la irrigació del teixit ventricular.

Nosaltre observàrem que, en absència d'heparina al medi, la incubació amb ISO 10 uM durant 20 minuts a 37°C, provocà un lleuger augment de l'activitat LPL present al medi i un lleuger descens de l'activitat a les cèl.lules, ambdues variacions, però, no foren significatives si bé sí que foren consistents (figura 3.39). Ara bé, expressant el resultat com a proporció d'activitat present al medi respecte de la total (panel dret) sí que s'observen diferències significatives: l'ISO provocà un augment de 1.7 vegades en la proporció d'activitat alliberada (11.7% als controls, 20.4% amb ISO). En presència d'heparina, l'activitat present al medi fou molt superior a l'obtinguda en absència d'heparina. També augmentà l'activitat a les cèl.lules i,

FIGURA 3.39 EFECTE DE LA INCUBACIO DE LES CEL.LULES AMB ISOPROTERENOL SOBRE L'ALLIBERAMENT D'ACTIVITAT LPL AL MEDI



(n=3)

per tant, la total. Tot i això,també augmentà la proporció d'activitat alliberada al medi, que fou unes tres vegades superior a la que havíem obtingut en condicions basals. En presència d'heparina, l'ISO no afectà, consistentment i significativament, ni a l'activitat alliberada al medi, ni a la present a les cèl.lules . Tampoc alterà la ja elevada proporció d"activitat alliberada al medi (figura 3.39).

En experiments (n=2) fets a 23°C en lloc de a 37°C, obtinguérem un resultat similar: en absència d'heparina, la presència d'ISO 10 uM augmentà l'activitat al medi (de 27.8 a 40.4 nmol/h/10^6cel.) i reduí la present a les cèl.lules (de 442.8 a 329.8 nmol/h/10^6cel.), com a conseqüència augmentà 2 vegades el percentatge d'activitat alliberada (de 5.6% a 10.9%) . En presència d'heparina l'activitat al medi (278.8 nmol/h/10^6cel.) i les cèl.lules (854.0 nmol/h/10^6cel.) foren superiors a les detectades en absència d'heparina; essent tot i això, el percentatge d'activitat alliberada també més elevat (24.9%). A l'igual que a 37°C, a 23°C l'ISO no afectà l'alliberament de LPL al medi en presència d'heparina (279.8 nmol/h/10^6cel. al medi, 877.8 nmol/h/10^6cel. a les cèl.lules, 24.0% d'activitat alliberada). Es interessant constatar que, tal com ja havia estat descrit anteriorment (Chajek i col., 1978), l'alliberamnt d'activitat al medi és més elevada a 37°C qu a 23°C. A totes dues temperatures però, l'efecte de l'ISO fou el mateix.

En un únic experiment en el que determinàrem la variació d'activitat LPL en funció del temps d'incubació a 37°C, observàrem que mentre als controls no essproduïa cap variació apreciable en el percentatge d'activitat alliberada (11.4% als 5 minuts i 11.8% als 20 minuts), en presència d'ISO 10 uM, als 5 minuts l'activitat al medi era ja el 17.3%, als 10 minuts el 19.4%, als 15 minuts el 19.7% i als 20 minuts el 19.4%; indicant que l'efecte es produeix força ràpidament. Aquesta fóra, la rapidesa de l'efecte,l'únic punt en que el nostre re-

sultat concorda amb el de Simpson (1979), doncs mentre ell no observava cap efecte de l'isoproterenol quan era perfundit a cors pre-perfundits sense heparina i sí, en canvi, als cors prèviament perfundits amb heparina, nosaltres observem tot el contrari. Pensem que Simpson no podia en el seu treball detectar un efecte de petita magnitud, com el que nosaltres observem quan incubem en absència d'heparina, quan ell perfundia en absència d'heparina. Doncs, per alguna raó, els nivells d'activitat que detecta en perfundir sense heparina són extremadament baixos (0.5 umol/h/g x min^{-1}). Altres però, s´que quantifiquen un alliberament d'activitat LPL en condicions basals (2.0 umol/h/g x min^{-1}), donant-li un sentit fisiològic en el procés de recanvi d'aquest enzim (Bagby, 1983).

El que nosaltres no observem cap efecte de l'ISO quan incubem en presència d'heparina podria deure's a que aquesta, per si mateixa, podria produir ja una estimulació màxima del mecanismes d'alliberament de LPL. En aquest sentit, als nostres experiments, emprem una concentració d'heparina força elevada (10 unitats/ml). si l'ISO actuéssen el mateix sentit d'activació dels mecanismens de l'alliberament, s'explicaria la manca d'efecte a l'estar activat ja l'alliberament per efecte d'un estimulador més potent, com fóra l'heparina. Per explicar el resultat de Simpson (1979) en el que s'observa efecte de l'ISO en cors perfundits amb heparina, creiem que existeixen diverses possibilitats. Potser per la que més ens inclinem es basa en que, en el seu model, l'administració de la catecolamina ve acompanyada d'un augment del flux idel ritme cardíac, amb la qual cosa l'efecte sobre l'alliberament de LPL podria no ésser real, sinó conseqüència d'un augment d'irrigació dels cors.

Finalment, en relació a l'efecte de l'isoproterenol, no podem descartar totalment que els nostrés resultats no siguin més que un artefacte. Així, si la

incubació amb ISO provoqués una major fragilitat de la sarcolemma, elsresultats obtinguts podrien ésser simplement conseqüència d'un trencament cel.lular més elevat en els erlenmeyers on hi afegírem ISO. Tanmateix, no es produí l'aparició de cap altre activitat TAG hidrolasa al medi d'incubació (resultats no presentats) que si bé no són majoritàriament citosòliques, sí que haurien d'haver-se detectat en cas de trencament cel.lular. En tot cas, ens hauria calgut determinar l'alliberament d'activitats citosòliques, com la lactat deshidrogenasa que és àmpliament utilitzada com indicadora de trencament cel.lular, per poder eliminar definitivament aquesta possibilitat.

Es interessant discutir un darrer aspecte d'aquestes incubacions amb heparina. Si comparem l'efecte d'una incubació de 2 minuts a 37°Camb 10 unitats/ml d'heparina (figura 3.12), amb els d'una incubació de 20 minuts també a 37°C i amb 10 unitats/ml d'heparina (figura 3.39), observem algunes diferències. Si bé ja amb 2 minuts s'alliberava al medi un34: de l'activitat total, aquesta no varià més que en un 25% d'increment. Després de 20 minuts també hi ha un 34% de l'activitat total al medi. Però en aquest cas l'activitat total augmenta un 378%. Així, després de 20 minuts, no només augmenta l"activitat al medi, sinó també l'activitat que queda a l'interior de les cèl.lules. Aquests resultats discrepen dels descrits per Chohan i Cryer (1980). Ells, estudiant l'efecte de l'heparina sobre l'alliberament de LPL pels cardiomiòcits aïllats, observàren que l'activitat al medi augmentava linealment en un període de 4 hores, mentre que la present a les cèl.lules no s'alterava. El fet de que aquests autors empraren una cobcentració d'heparina deu vegades inferior a la nostre, podria explicar parcialment la diferència. De fet, després d'una hora d'incubació a 25°C, només recuperaren al medi un 15% de l'activitat total. Nosaltres, després de 20 minuts a 23°C ja recuperem vora del 25%. Tampoc la nostre observació és similar a la que des-

criuen Chajek i col.laboradors (1978). Ells observen que, incubant cèl.lules mesenquimals en cultiu amb 5.0 unitats/ml d'heparina tant a 23°C com a 37°C, l'activitat a l'interior de les cèl.lules disminueix amb el temps d'incubació, mentre que la del medi i la total augmenten. Si bé també observen un més gran efecte a 37°C qu a 23°C, la proporció d'activitat que recuperen al medi és molt superior a la nostre. Les diferències podrien deure's a que aquests autors treballen amb cèl.lules precursores i no amb cèl.lules diferenciades, com fem nosaltres. A partir d'experiments que ells realitzen amb cicloheximida (Chajek i col., 1978) arriben a concloure que existeixen dues fases en l'efecte de l'heparina. Una primera, independent de la síntesi proteica i que dura els primers minuts, en la que s'allibera una certa quantitat d'enzim intracel.lular al medi, i una segona en la que el continuat alliberament de LPL al medi es produeix només quan la síntesi proteica no està interferida. Es en aquesta fase en la que comença a produir-se un gran augment de l'activitat total. Pensem que els nostres resultats s'ajusten a aquest esquema: uns primers minuts on l'heparina provoca l'alliberament al medi d'un "pool" intracel.lular de LPL i en els que no es produeix un canvi considerable de l'activitat total, i una segona fase en la que es produeix un augment considerable de l'activitat total. Potser, i és pura especulació, l'estimulació dels mecanismes d'alliberament al medi per part de l'heparina estigui desreprimint tant l'activació com la síntesi de nou enzim.

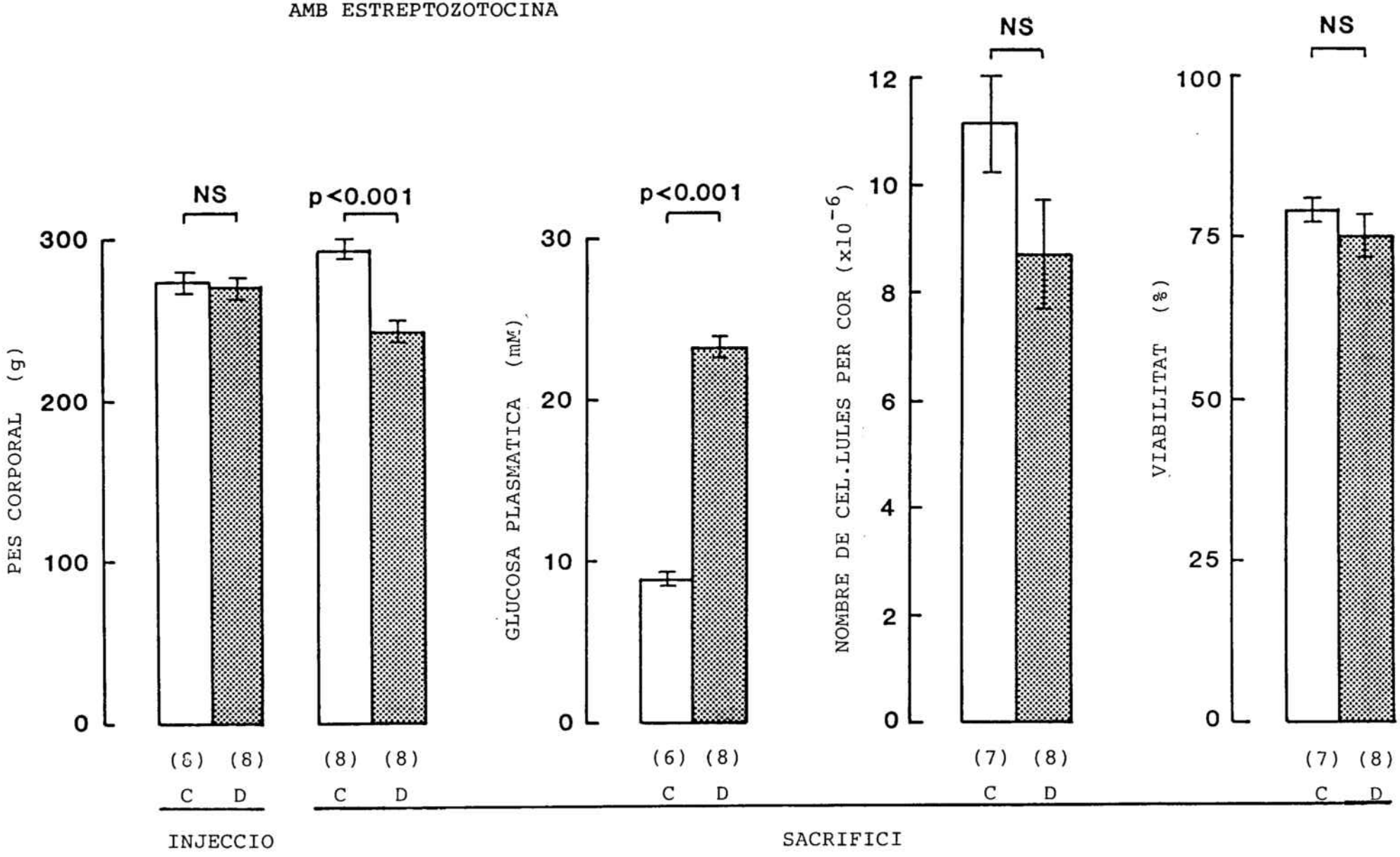
3.3.3.- Efecte de la diabetes experimental sobre les activitats TAG hidrolases als cardiomiòcits aïllats

Finalment, estudiàrem l'efecte de la diabetes experimentalment induïda per l'administració intravenosa de 100mg/Kg p.c. d'estreptozotocina, sobre les activitats TAGH dels cardiomiòcits aïllats.

Es conegut que la diabetes provoca al cor, entre d'altres alteracions, un important acúmul de triacilglicerols (Denton i Randle, 1967). Aquest acúmul es déu probablement tant a una augmentada síntesi com a una disminuïda degradació d'aquestes TAG (Muethy i Shipp, 1980; Paulson i Crass, 1982). Ara bé, la capacitat lipolítica és molt superior als animals diabètics que als normals doncs tant en cors perfundits (Garland i Randle, 1963), com en miòcits aïllats (Kenno i Severson, 1985), quan l'assequibilitat de substrats exògens està dismnuïda, la mobilització dels TAG endogens es produeix a una taxa mot elevada.

No hem realitzat una molt àmplia caracterització ni dels animals diabètics ni dels miòcits aïllats dels cors d'aquests animals, doncs al mateix laboratori, i simultàniament als nostres experiments, ho feu el Dr. K. Kenno, qui es dedicà intensament a l'estudi de la regulació de la lipòlisi als cardiomiòcits d'animals diabètics (veure Kenno i Severson, 1985). Només prenguérem com a control de l'estat diabètic dels animals, la variació del pes corporal i els nivells plasmàtics de glucosa. En els 3-4 dies transcorreguts des de l'administració de l'estreptozotocina, ela animals tractats perderen 27 g de pes corporal (un 10% del pes inicial). En aquest mateix període els controls guanyaren 18 g (figura 3.40). Així, si bé a l'inici del tractament no existien diferències significatives entre els pesos corporals dels dos grups d'animals, en el moment del sacrifici els animals diabètics pesaven un 16% menys que els seus controls. Igualment la glucosa plasmàtica indica clarament l'estat diabètic dels animals tractats amb la droga. Mentre als controls el valor fou de 9.1 mM, als diabètics fou 2.6 vegades superior (figura 3.40). Contràriament al descrit per Kenno i Severson (1985), les diferències que nosaltres hem obtingut en el nombre de cèl.lules per cor no és significativament inferior als animals diabètics. Ara bé, sí obtenim un valor sensiblement inferior (figura 3.40). Potser amb un nombre

FIGURA 3.40 PARAMETRES GENERALS DEFINITORIS DE L'ESTAT DIABETIC DELS ANIMALS TRACTATSAMB AMB ESTREPTOZOTOCINA



més elevat d'animals per grup les diferències haurien arribat a ésser significatives. La viabilitat cel.lular però fou totalment comparable entre ambdós grups (figura 3.40). El contingut de proteïnes als miòcits d'animals diabètics (5.7 ± 0.4 mg/10^6cel., n=7) no fou significativament inferior al dels animals controls (6.1 ± 0.6 mg/10^6cel., n=5). Tampoc hagueren diferències en la distribució de proteïnes entre les diferents fraccions subcel.lulars (taula 3.17).

Contràriament al descrit inicialment per Rösen i col.laboradors (1981) i més recentment per Stam i col.laboradors (1984) en homogenats de cor, nosaltres no observem cap efecte de la diabetes sobre l'activitat de la TAGh àcida en homogenats cel.lulars (figura 3.41), ni tampoc en la seva distribució subcel.lular (taula 3.18). En canvi, l'activitat TAGH neutre independent de sèrum fou un 58% més elevada als cardiomiòcits d'animals diabètics que als dels controls, tant expressada per 10^6cel. (figura 3.41) com per mg proteïna (taula 3.19). Aquest augment d'activitat específica de la TAGHNIS es manifesta també a les diferents fraccions subcel.lulars dels cardiomiòcits dels animals diabètics, especialment a la fracció P100 on les diferències foren significatives (taula 3.19). Tanmateix no hi hagueren diferències en la distribució percentual entre les difernents fraccions dels animals controls i diabètics. L'activitat LPL disminuí un 47% a les cèl.lules d'animals diabètics (figura 3.41). Igualment l'activitat específica fou inferior a totes les fraccions subcel.lulars, llevat de la S100 (taula 3.20). Aquests canvis s'associaren amb alteracions en la distribució subcel.lular. Es recuperà un 47: de l'activitat al sobrenedant postnuclear de les cèl.lules d'animals controls i un 64% al de les diabètiques (taula 3.20). Entre les diferents fraccions postnuclears, el més remarcable fou l'augmet d'activitat percentual al S100 i la disminució a la P100.

TAULA 3.17

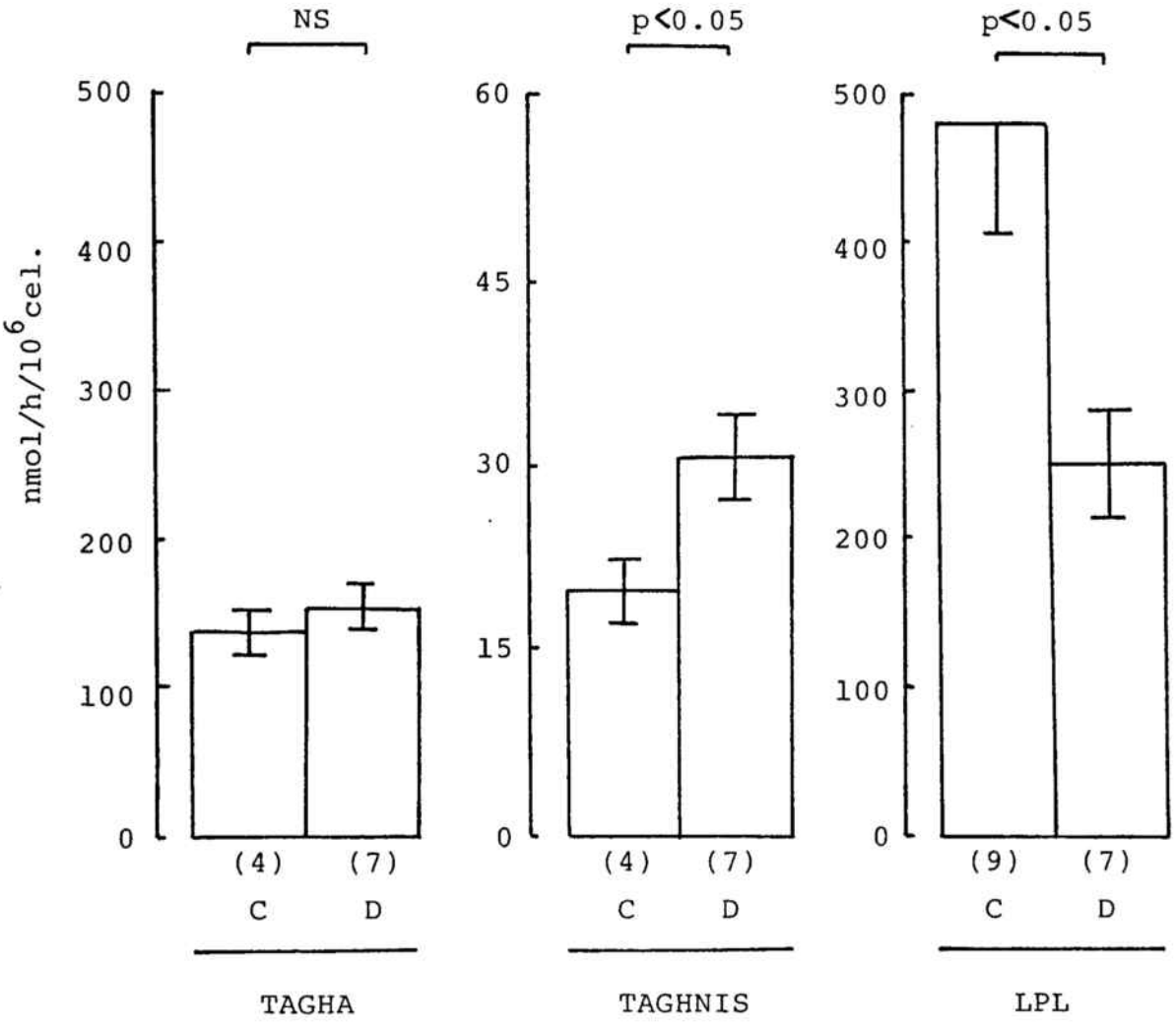
EFECTE DE LA DIABETES SOBRE LA DISTRIBUCIO DE PROTEINES ENTRE LES DIFERENTS FRACCIONS SUBCEL.LULARS

Fracció	Controls	Diabètiques	
P.7	61.2±3.2[a]	61.7±1.4	(NS)
P8	4.4±0.6	5.1±0.3	(NS)
P13	2.3±0.2	2.6±0.2	(NS)
P100	6.5±1.1	6.5±1.0	(NS)
S100	25.2±3.0	24.0±0.9	(NS)

a: Percentatge de distribució
(NS): diferències no significatives
Controls: n=10, Diabètiques: n=11

FIGURA 3.41

EFECTE DE LA DIABETES SOBRE LES ACTIVITATS TAG HIDROLASES EN HOMOGENATS CEL.LULARS DE CARDIOMIOCITS AILLATS



TAULA 3.18

EFECTE DE LA DIABETES SOBRE LA DISTRIBUCIO SUBCEL.LULAR DE L'ACTIVITAT TAGH ACIDA

Fracció	Activitat específica (nmol/h/mg prot)		Distribució (%)	
	Controls	Diabètiques	Controls	Diabètiques
H	22.7±2.8	27.1±3.1 (NS)	100	100
P.7	25.8±4.7	30.2±4.9 (NS)	48.2±2.6	48.8±1.5 (NS)
P8	104.5±13.0	114.8±13.3(NS)	13.3±1.8	14.3±1.7 (NS)
P13	187.7±38.1	185.9±30.8(NS)	11.0±0.9	10.6±0.5 (NS)
P100	161.2±41.4	180.1±36.9(NS)	21.1±3.0	18.5±2.9 (NS)
S100	8.8±1.2	10.6±0.5 (NS)	7.0±2.0	7.8±1.5 (NS)

Control n=4, Diabètiques n=7

(NS): diferències entre controls i diabètiques no significatives

TAULA 3.19

EFECTE DE LA DIABETES SOBRE LA DISTRIBUCIO SUBCEL.LULAR DE L'ACTIVITAT TAGH NEUTRE INDEPENDENT DE SERUM

	Activitat específica (nmol/h/mg prot)		Distribució (%)	
Fracció	Controls	Diabètiques	Controls	Diabètiques
H	3.2±0.4	5.4±0.6 *	100	100
P.7	2.8±0.6	4.8±0.8 (NS)	42.8±1.8	42.9±3.3 (NS)
P8	10.2±1.5	16.0±2.5 (NS)	10.3±1.0	11.1±2.1 (NS)
P13	22.3±2.8	19.4±3.2 (NS)	10.8±1.1	6.8±1.2 (NS)
P100	23.9±2.2	38.8±4.7 *	24.2±0.6	23.0±1.4 (NS)
S100	2.3±0.7	5.2±1.4 (NS)	12.0±2.0	16.2±1.3 (NS)

Controls n=4, Diabètiques n=7

(NS): diferències entre controls i diabètiques no significatives

*: diferències entre controls i diabètiques significatives ($p < 0.05$)

TAULA 3.20

EFECTE DE LA DIABETES SOBRE LA DISTRIBUCIO SUBCEL.LULAR DE L'ACTIVITAT LIPOPROTEINA LIPASA

	Activitat específica (nmol/h/mg prot)		Diatribució (%)			
Fracció	Controls	Diabètiques	Controls		Diabètiques	
H	60.5±8.4	40.1±2.9 *	100		100	
P.7	52.5±4.6	25.1±1.4 **	52.8±2.9		35.9±1.5 **	
P8	98.0±11.2	47.4±2.1 **	2.8±0.3	(5.9±0.4)[a]	5.1±0.4 **	(8.1±0.7 *)
P13	141.2±20.6	80.7±2.7 *	3.5±0.8	(7.6±2.1)	4.4±0.2 (NS)	(7.6±0.5 NS)
P100	302.3±18.9	172.5±14.5 **	27.8±1.8	(59.2±1.3)	31.6±1.6 (NS)	(49.2±1.4 **)
S100	67.1±7.9	57.7±7.6 (NS)	14.4±0.8	(27.3±2.8)	22.9±0.7 **	(35.8±1.0 *)

Controls n=4, Diabètiques n=4

a: Percentatge de distribució respecte del sobrenedant postnuclear

(NS): diferències entre controls i diabètiques no significatives

*,**: diferències entre controls i diabètiques significatives ($p < 0.05$ i $p < 0.01$)

Els nostres resultats d'activitat LPL als cardiomiòcits ens permeten de qüestionar el paper d'aquest enzim en la mobilització de les reserves de TAG. La base en que principalment es fonamenta la hipòtesi d'Oscai i Palmer és l'elevada correlació negativa que observen entre variacions d'activitat LPL residual (no alliberable amb heparina) a cor i el contingut de TAG al teixit, no només com a resposta tant a les catecolamines com el glucagó, sinó també en diferents situacions fisiològiques (Oscai, 1979; Palmer i col., 1981; Oscai i col., 1982; Palmer i Kane, 1983a i b; Miller i col., 1984; Miller i Oscai, 1984). Si bé observem una disminució de l'activitat LPL de vora del 50% (figura 3.41) i els nivells de TAG cel.lulars estan augmetats vora 4 vegades (Kenno i Severson, 1985), la capacitat lipolítica d'aquestes cèl.lules és unes 6 vegades superior a la de les cèl.lules controls (Kenno i Severson, 1985). Així doncs, no sembla existir correlació entre activitat LPL i capacitat lipolítica, al menys, en la situació patològica de la diabetes experimental.

Només l'augmentada activitat TAGHNIS permetria d'explicar parcialment l'elevada capacitat lipolítica de les cèl.lules del múscul cardíac dels animals diabètics. No sembla però, que pogui ésser aquesta l'única causa, doncs està més augmentada laacapacitat per mobilitzar els TAG endogens que l'activitat TAGHNIS. Altre possible causa podria ésser els elevats nivells de TAG intracel.lulars, com ja havia estat suggerit anteriorment (Rösen i col., 1981; Kenno i Severson, 1985). Així, una més elevada assequibilitat de substrat i activitat TAGHNIS podrien, conjuntament, ésser les causes de l'elevada capacitat dels cors de rates diabètiques per mobilitzar les seves reserves lipídiques. En condicions fisiològiques però, els elevats nivells tant de cossos cetònics com d'àcids grassos circulants foren la causa d'un acúmul d'acil-CoA i acil-carnitina que mantindrien inhibida la lipòlisi.

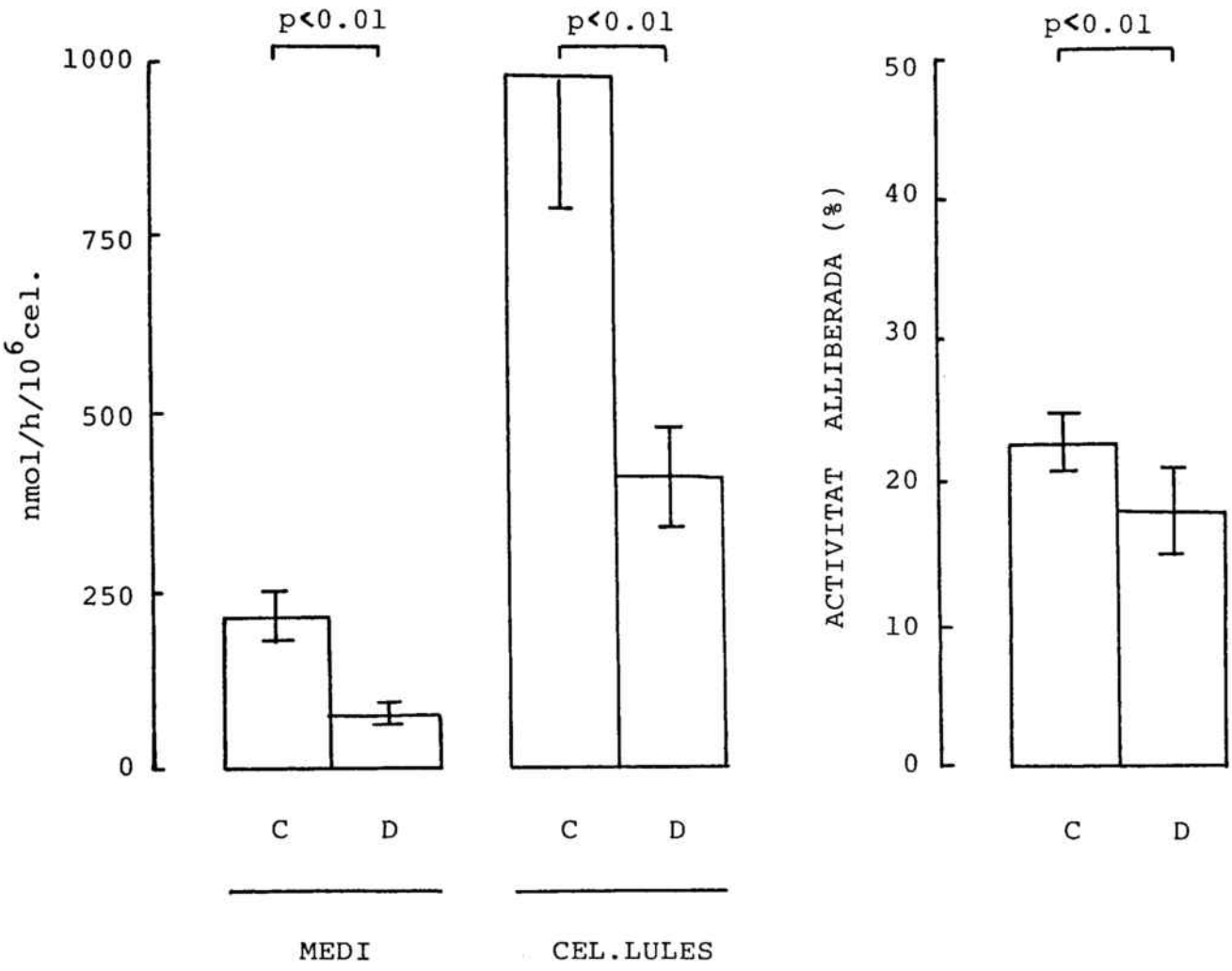
Finalmet, donades les alteracions tant de l'activitat total com de la distribució subcel.lular de la LPL a les cèl.lules dels animals diabètics, volguérem conéixer si la capacitat d'alliberament ede LPL al medi estava efectada també. Observàrem que després de la incubació a 23°C, en presència d'heparina, l'activitat alliberada al medi per cèl.lules d'animals diabètics fou un 64% inferior (figura 3.42). L'activitat a l'interior de les cèl.lules fou també un 57% menor a les cèl.lules dels animals diabètics. La proporció d'activitat alliberada al medi però, no fou significativament inferior (figura 3.42), la qual cosa indica probablement que els mecanismes d'alliberamentde LPL al medi no estan afectats per ala diabetes, al meys en aquests 3-4 primers dies.

Els resultats que hem obtingut d'activitat LPL als miòcits de cors de rates diabètiques concorden amb els descrits per O'Looney i col.laboradors (1983), qui detecten una menor LPL alliberable amb heparina i també una menor LPL no-alliberable amb heparina als cors de rates diabètiques. Altres però, no han observat cap variació de l'activitat no-alliberable amb heparina (Murthy i col., 1983) o, fins i tot, l'ha trobada augmentada (Stam i col., 1984).

En base als nostres resultats, ens atreviríem a suggerir que la disminuïda activitat de la LPL a l'interior dels miòcits, tot i no estar alterats els mecanismes d'alliberament al medi, fóra la responsable de la menor activitat LPL alliberable amb heparina als cors perfundits que observen O'Looney i col.laboradors (1983). Aquesta menor activitat LPL vascular explicaria la disminució d'un 50% en la captació de TAG tant de quilomicrons (Kreisberg, 1966b) com de VLDL (O'Looney i col., 1983). En humans també ha estat descrita una disminuïda activitat LPL tant de múscul esquelètic com de teixit adipós blanc en pacients diabètics (Taskinen i Nikkilä, 1979). Aquesta però, no fóra l'única causa

FIGURA 3.42

EFECTE DE LA DIABETES SOBRE L'ALLIBERAMENT INDUIT PER HEPARINA D'ACTIVITAT LPL AL MEDI



C: Controls (n=6)

D: Diabètiques (n=8)

dels elevats nivells de TAG circulants freqüentment observats tant a pacients amb diabetes tipus I o II (New i col., 1963, i molts altres), doncs també ha estat descrita alteracions en la composició de les diferents classes de lipoproteïnes (Taskinen i col., 1982; Patel i col., 1984; O'Looney i col., 1985). Així, cors d'animals controls perfundits amb VLDL d'animals diabètics, hidrolitzen un 36% menys VLDL-TAg que quan són perfundits amb VLDL d'animals controls (O'Looney i col., 1985). Quan aquests autors perfundiren "VLDL normals" a cors d'animals diabètics, aquesta hidrolitzaren un 47% menys VLDL-TAG del que ho feien els controls. Finalment, quan perfundiren VLDL de rates diabètiques a cors també diabètics, la hidròlisi fou un 77% inferior a la que observaren amb VLDL i cors d'animals normals. Experiments aquests, que clarament reflecteixen el que anteriorment comentàvem: tant la disminuïda activitat LPL vascular (conseqüència d'una menor activitat intracel.lular) com les alteracions en la composició de les VLDL, són les causes de la menor utilització de lipoproteïnes riques en TAG per part de cors d'animals diabètics.

4.- CONCLUSIONS I PERSPECTIVES

CONCLUSIONS

1.- La principal conclusió a la que arribem a partir dels nostres resultats és que, a més d'una activitat TAG hidrolasa àcida i de la lipoproteïna lipasa, els miòcits aïllats de cor de rata contenen una activitat TAG hidrolasa neutre independent de sèrum ben diferenciada da la LPL. Les propietats que hem observat per cadascuna d'aquestes activitats lipolítiques es resumeixen a la taula 4.1.

2.- Els nostres resultats d'incubacions amb isoproterenol i de cèl.lules de rates diabètiques, no ens permeten donar soport, i fins i tot ens porten a qüestionar, la hipòtesi inicialment presentada per Lawrance B. Oscai (1979) segons la qual la LPL intracel.lular fóra la "lipasa-sensible a les hormones" al cor. Contràriament, ens indiquen que l'activitat TAG hidrolasa neutre independent de sèrum podria estat involucrada en l'elevada capacitat lipolítica dels cors de rates diabètiques.

3.- La més baixa activitat LPL present al llit vascular dels cors de rates diabètiques (O'Looney i col., 1983) pot deure's, al menys parcialment, a una interferència amb la síntesi i/o activació de la LPL a l'interior dels miòcits més que a una deficiència en el mecanisme d'alliberament a l'exterior i transport als capil.lars.

TAULA 4.1

CARACTERISTIQUES OBSERVADES DE LES ACTIVITATS TAG HIDROLASES DELS CARDIOMIOCITS AILLATS

TAGHA	TAGHNIS	LPL
pH òptim 5.0	pH òptim 7.0	pH òptim 7.5
Inhibida per sèrum	Sèrum < cap efecte inhibició	Activació per sèrum o apo C-II Inhibició per Apo $C\text{-}III_2$
Inhibició per NaCl i $MgCl_2$	Resistència al NaCl 1.0 M Activació per $MgCl_2$ (50 mM) Inhibició per $MgCl_2$ (>70 mM)	Activació per NaCl i $MgCl_2$ fins I=0.15-0.2 M Inhibició per I>0.2 M
Inhibida per heparina	Resistent a protamina sulfat i albúmina	Inhibida per protamina sulfat i albúmina
Sensible a la pols acetònica	Sensible a la pols acetònica	Resistent a la pols acetònica
Lisosomal (màxima A.E.R.)	"Microsomal"	"Microsomal"/citoplasmàtica
No retinguda pels gels d'heparina-sefarosa	No retinguda pels gels d'heparina-sefarosa	Eluïda amb 1.2 M NaCl dels gels d'heparina-sefarosa
	Resistent a IgG anti-LPL	Inhibida perIgG anti-LPL

PERSPECTIVES

Basant-nos en les propietats de l'activitat TAGHNIS i en els resultats molt recentment publicats per Goldberg i Khoo (1985) en els que troben als cors de ratolí una activitat TAG hodrolasa amb propietats similars a les que nosaltres describim per la TAGHNIS i que, a les seves mans, és activable per la proteïna quinasa depenent d'AMPc, pensem que aquesta activitat descrita per ells i per nosaltres podria correspondre a la mateixa lipasa-sensible a les hormones/colesterol esterasa del teixit adipós, adrenals i cós luti. En aquest sentit, futures investigacions hauran de determinar si l'activitat TAGHNIS és activable per la proteïna quinasa depenent d'AMPc bé a extractes cel.lulars bé en preparacions parcialment purificades. Per altre banda, la purificació d'aquesta activitat haurà de permetre establir definitivament la seva identificació amb la lipasa-sensible a les hormones.

Sigui quina sigui la identitat de l'activitat TAGHNIS, queda per resoldre la participació de cadascuna de les diferents activitats lipàsiques en el recanvi normal i la mobilització dels TAG endogens al cor. Pensem que l'obtenció d'anticossos monoclonals contra cadascuna de les activitats TAG hidrolases permetria dur a terme una sèrie d'experiments que, al menys potencialment, podrien generar resultats altament clarificadors.

5.- B I B L I O G R A F I A

Altschuld, R., Gibb, L., Ansel, A., Hohl, C., Kruger, F.A. and Brierley, G.P. (1980). Calcium tolerance of isolated rat heart cells. J. Mol. Cell. Cardiol. 12 1383-1395.

Aupecle, P. and Pinson, A. (1982). The role of lysosomal lipases in triacylglycerol cleavage. FEBS Lett. 144 93-96.

Bagby, G.J., Liu, M.-S. and Spitzer,J.A. (1977). Lipoprotein lipase activity in rat heart myocytes. Life Sci. 21 467-474.

Barovsky, K. and Gross, S.R. (1981). Rate dependence of isoproterenol-stimulated phosphorylase a formation in mouse heart. J. Pharmacol. Exp. Ther. 217 326-332.

Beinlich, C.J., Clark, M.G., McKee, E.E., Lins, J.A. and Morgan, H.E. (1981). Neutral-alkaline proteolytic activity in rat cardiac muscle cells. J. Mol. Cell. Cardiol. 13 23-36.

Belfrage, P. and Vaughan, M. (1969). Simple liquid-liquid partition system for isolation of labeled oleic acid from mixtures with glycerides. J. Lipid Res. 10 341-344.

Ben-Zeev, O., Schwalb, H. and Schotz, M.C. (1981). Heparin-releasable and nonreleasable lipoprotein lipase in the perfused rat heart. J. Biol. Chem. 256 10550-10554.

Bergmeyer, H.U. (1974). Methods of Enzymatic Analysis Vol.3. Academic Press Inc., 2nd English Edition.

Berry, M.N., Friend, D.S. and Scheurer, J. (1970). Morphology and metabolism of intact muscle cells isolated from adult rat heart. Circ. Res. 26 679-687.

Biale, Y., Gorin, E. and Shafrir, E. (1968). Characterization of tissue lipolytic and esterolytic activities cleaving full and partial glycerides. Biochem. Biophys. Acta 152 28-39.

Bihler, I., Ho, T.K. and Sawh, P.C. (1984). Isolation of Ca^{2+}-tolerant myocytes from adult rat heart. Can. J. Physiol. Pharmacol. 62 581-588.

Bing, R.J., Siegel, A., Ungar,I. and Gilbert, M. (1954). Metabolism of the human heart. Am. J. Med. 16 504-515.

Bing, R.J. (1956). The metabolism of the heart. In Harvey Lecture Series pp. 27-70. Academic Press, New York.

Bing, R.J. (1965). Cardiac Metabolism. Physiol. Rev. 45 171-213.

Bishop, S.P. and Drummond, J.L. (1979). Surface morphology and cell size measurement of isolated rat cardiac myocytes. J. Mol. Cell. Cardiol. 11 423-433.

Bjorntorp, P. and Furman, R.H. (1962). Lipolytic activity in rat heart. Biochem. Biophys. Acta. 203 323-326.

Bkaily, G., Sperelakis, N. and Doane, J. (1984). A new method for preparation of isolated single adult myocytes. Am. J. Physiol. 247 H1018-1026.

Bloom, S. (1970). Spontaneous rhythmic contraction of separated heart muscle cells. Science 167 1727-1729.

Bloom, S. (1971). Requirements for spontaneous contractility in isolated adult mammalian heart muscle cells. Exper. Cell Res. 69 17-24.

Borensztajn, J. and Robinson, D.S. (1970). The effect of fasting on the utilization of chylomicron triglyceride fatty acids in relation to clearing factor lipase (lipoprotein lipase) releasable by heparin in the perfused rat heart. J. Lipid Res. 11 111-117.

Bustamante, J.O., Watanabe, T. and McDonald, T.F. (1981). Single cells from adult mammalian heart: isolation procedure and preliminary electrophysiological studies. Can. J. Physiol. Pharmacol. 59 907-910.

Burns, A.H. and Montini, J. (1982). Myocardium in hypertropy: oxygen consumption by isolated cardiac myocytes and working hearts from spontaneously hypertensive rats. Life Sci. 30 29-37.

Buxton, I.L.O. and Brunton, L.L. (1983). Compartments of cyclic AMP and protein kinase in mammalian cardiomyocytes. J. Biol. Chem. 256 10233-10239.

Buxton, I.L.O. and Brunton, L.L. (1985). Direct analysis of β-adrenergic receptor subtypes on intact adult ventricular myocytes of the rat. Circ. Res. 56 126-132.

Carlson, E.C., Grosso, D.S., Romero, S.A., Frangakis, C.J., Byus, C.V. and Bressler, R. (1978). Ultrastructural studies of metabolically active isolated adult rat heart myocytes. J. Mol. Cell. Cardiol. 10 449-459.

Carroll, K.K. (1961). Separation of lipid classes by chromatography on florosil. J. Lipid Res. 2 135-141.

Cavanaugh, N.W. (1955). Pulsation, migration, and division in dissociated chick embryo heart cells in vitro . J. Exper. Zool. 128 573-585.

Chajek, T., Stein, O. and Stein, Y. (1977). Rat heart in culture as a tool to elucidate the cellular origin of lipoprotein lipase. Biochem. Biophys. Acta. 488 140-144.

Challoner, D.R. and Steinberg, D. (1965). Metabolic effect of epinephrine on the QO_2 of the arrested isolated perfused rat heart. Nature 205 602-603.

Challoner, D.R. and Steinberg, D. (1966). Oxidative metabolism of myocardium as influenced by fatty acids and epinepherine. Am. J. Physiol. 211 897-902.

Chalvardjian, A. and Rudnicki, E. (1970). Determination of lipid phosphorous in the nanomolar range. Anal. Biochem. 36 225-226.

Cheung, J.Y., Thompson, I.G. and Bonventre, J.V. (1982). Effects of extracellular calcium removal and anoxia on isolated rat myocytes. Am. J. Physiol. 243 C184-190.

Chohan, P. and Cryer, A. (1978). The lipoprotein lipase (clearing factor lipase) activity of cells isolated from rat cardiac muscle. Biochem. J. 174 663-666.

Christian, D.R., Kilsheimer, G.S., Pettett, G., Paradise, R. and Ashmore, J. (1969). Regulation of lipolysis in cardiac muscle: a system similar to the hormone-sensitive lipase of adipose tissue. Adv. Enz. Regul. 7 71-81.

Clark, M.G. and Patten, G.S. (1981). Adrenaline activation of phosphofructokinase in rat heart mediated by α-receptor mechanism independent of cyclic AMP. Nature 292 461-463.

Clark, M.G., Gannon, B.J., Bodkin, N., Patten, G.S. and Berry, M.N. (1978). An improved procedure for the high-yield preparation of intact beating heart cells from the adult rat: biochemical and morphological study. J. Mol. Cell. Cardiol. 10 1101-1121.

Cornblath, M., Randle, P.J., Parmeggiani, A. and Morgan, H.E. (1963). Regulation of glycogenolysis in muscle: effects of glucagon and anoxia on lactate production, glycogen content, and phosphorylase activity in the perfused isolated rat heart. J. Biol. Chem. 238 1592-1597.

Crass, M.F. III, McCaskill, E.S. and Shipp, J.C. (1969). Effect of pressure development on glucose and palmitate metabolism in perfused heart. Am. J. Physiol. 216 1569-1575.

Crass, M.F. III and Shipp, J.C. (1970). Metabolism of exogenous and endogenous fatty acids in the heart. In Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Function Vol.1 pp. 115-125. University Park Press, Baltimore.

Crass, M.F., McCaskill, E.S., Shipp, J.C. and Murthy, V.K. (1971). Metabolism of endogenous lipids in cardiac muscle: effect of pressure development. Am. J. Physiol. 220 428-435.

Crass, M.F. III (1972a). Heart triglyceride and glycogen metabolism: effects of catecholamines, dibutryl cyclic AMP, theophylline, and fatty acids. In Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Function. Vol.3 pp.275-289. University Park Press, Baltimore.

Crass, M.F. III (1972b). Exogenous substrate effects on endogenous lipid metabolism in the working rat heart. Biochem. Biophys. Acta. 280 71-81.

Crass, M.F. III., Shipp, J.C. and Pieper, G.M. (1975). Effects of catecholamines on myocardial endogenous substrates and contractility. Am. J. Physiol. 228 618-627.

Crass, M.F. III (1977). Regulation of triglyceride metabolism in the isotopically prelabeled perfused heart. Fed. Proc. 36 1995-1999.

Cruickshank, E.W.H. and Kosterlitz, H.W. (1941). The utilization of fat by the aglycaemic mammalian heart. J. Physiol. 99 208-223.

Cuatrecasas, P. (1971). Perturbation of the insulin receptor of isolated fat cells with proteolytic enzymes. J. Biol. Chem. 246 6522-6531.

Dani, A.M., Cittadini, A., Flamini, G., Festuccia, G. and Terranova, T. (1977). Preparation and some properties of isolated beating myocytes from adult rabbit heart. J. Mol. Cell. Cardiol. 9 777-784.

Dani, A.M., Cittadini, A. and Inesi, G. (1979). Calcium transport and contractile activity in dissociated mammalian heart cells. Am. J. Physiol. 237 C147-155.

Davidson, M.B. and Karjala, R. (1970). Simplified fluorometric method for the determination of plasma glycerol. J. Lipid Res. 11 609-612.

DeDuve, C., Debarsy, T., Poole, B., Trouet, A., Tulkens, P. and Van Hoof, F. (1974). Lysosomotropic agents. Biochem. Pharmacol. 23 2495-2531.

DeLeiris, J. and Opie, L.H. (1980). Effect of substrates and of coronary artery ligation on mechanical performance and on release of lactate dehydrogenase and creatine phosphate in isolated working rat heart. Cardiovasc. Res. 12 585-596.

Denton, R.M. and Randle, P.J. (1965). Hormonal control of lipid concentration in rat heart and gastrocnemius. Nature 208 488.

Denton, R.M. and Randle, P.J. (1967a). Concentration of glycerides and phospholipids in rat heart and gastrocnemius muscles: effects of alloxan-diabetes and perfusion. Biochem. J. 104 416-422.

Denton, R.M. and Randle, P.J. (1967b). Measurement of flow of carbon atoms from glucose and glycogen glucose to glyceride glycerol and glycerol in rat heart and epididymal adipose tissue: effects of insulin, adrenaline and alloxan-diabetes. Biochem. J. 104 423-434.

Dhalla, N.S., Yates, J.C. and Proveda, V. (1977). Calcium-linked changes in myocardial metabolism in the isolated perfused rat heart. Can. J. Physiol. Pharmacol. 55 925-933.

Dow, J.W., Harding, N.G.L. and Powell, T. (1981). Isolated cardiac myocytes. I. Preparation of adult myocytes and their homology with the intact tissue. II. Functional aspects of mature cells. Cardiovasc. Res. 15 483-514 & 549-579.

Drake-Holland, A.J. (1983). Substrate utilization. In Cardiac Metabolism . pp.195-213. Drake-Holland, A.J. and Noble, M.I.M., editors. John Wiley & Sons Ltd., New York.

Eckel, J. and Reinhauer, H. (1980). Characteristics of insulin receptors in the heart muscle. Binding of insulin to isolated muscle cells from adult rat heart. Biochem. Biophys. Acta. 629 510-521.

Eckel, J., Offermann, A. and Reinhauer, H. (1982). Insulin receptors on isolated heart cells: effect of temperature and hydrolytic enzymes. Basic Res. Cardiol. 77 323-332.

Enser, M.B., Kunz, F., Borensztajn, J., Opie, L.H. and Robinson, D.S. (1967). Metabolism of triglyceride fatty acid by the perfused rat heart. Biochem. J. 104 306-317.

Epstein, S.E., Levey, G.S. and Skelton, C.L. (1971). Adenyl cyclase and cyclic AMP: biochemical links in the regulation of myocardial contractility. Circ. 43 437-450.

Evans, C.L. and Matsuoka, Y. (1914). Mammalian heart. J. Physiol. 49 378-405.

Evans, J.R. (1964). Importance of fatty acid in myocardial metabolism. Circ. Res. Suppl. II 14 & 15 96-106.

Farmer, B.B., Harris, R.A., Jolly, W.W., Hathaway, D.R., Katzberg, A., Watanabe, A.M., Whitlow, A.L. and Besch, H.R. (1977). Isolation and characterization of adult rat heart cells. Arch. Biochem. Biophys. 179 545-558.

Farmer, B.B., Mancina, M., Williams, E.S. and Watanabe, A.M. (1983). Isolation of calcium tolerant myocytes from adult rat hearts: review of the literature and description of a method. Life Sci. 33 1-18.

Feuvray, D. and DeLeiris, J. (1973). Effects of short DMSO perfusions on ultrastructure of the isolated rat heart. J. Mol. Cell. Cardiol. 5 63-68.

Frangakis, C.J., Bahl, J.J., McDaniel, H. and Bressler, R. (1980). Tolerance to physiological calcium by isolate myocytes from the adult rat heart: an improved cellular preparation. Life Sci. 27 815-825.

Fredrikson, G., Stralfors, P., Nilsson, N.O. and Belfrage, P. (1981). Hormone-sensitive lipase of rat adipose tissue: purification and some properties. J. Biol. Chem. 256 6311-6320.

Fry, D.M., Scales, D. and Inesi, G. (1979). The ultrastructure of membrane alterations of enzymatically dissociated cardiac myocytes. J. Mol. Cell. Cardiol. 11 1151-1163.

Garland, P.B. and Randle, P.J. (1964). Regulation of glucose uptake by the muscle X. Effects of alloxan-diabetes, starvation, hypophysectomy and adrenalectomy, and of fatty acids, ketone bodies and pyruvate on the glycerol output and concentrations of free fatty acids, long-chain fatty acyl-coenzyme A, glycerol phosphate and citrate-cycle intermediates in rat heart and diaphragm muscles. Biochem. J. 93 678-687.

Gartner, S.L. and Vahouny, G.V. (1973). Endogenous triglyceride and glycogen in perfused rat hearts. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 143 56-60.

Glaviano, V.V., Goldberg, J. and Pindok, M.T. (1975). Acetylcholine and norepinepherine interactions on cardiac lipids and hemodynamics. Am. J. Physiol. 228 1678-1684.

Glick, M.R., Burns, A.H. and Reddy, W.J. (1974). Dispersion and isolation of beating cells from adult rat heart. Anal. Biochem. 61 32-42.

Goodale, W.T. and Hackel, D.B. (1953). Myocardial carbohydrate metabolism in normal dogs, with effects of hyperglycemia and starvation. Circ. Res. 1 509-517.

Gould, R.P. and Powell, T. (1972). Intact isolated muscle cells from the adult rat heart. Proc. Physiol. Soc. 20 17P-19P.

Grosso, D.S., Frangakis, C.J., Carlson, E.C. and Bressler, R. (1977). Isolation and characterization of myocytes from the adult rat heart. Prep. Biochem. 7 383-401.

Hamid, M.A., Lech, J.J., Barboriak, J.J. and Calvert, D.N. (1973). Some properties of a protamine-stimulated triglyceride-hydrolyzing enzyme from rat ventricle. Biochem. Pharmacol. 22 2165-2170.

Hammons, G.T. and Jarett, L. (1980). Lysosomal degradation of receptor-bound ^{125}I-labeled insulin by rat adipocytes: its characterization and dissociation from short-term biologic effects of insulin. Diabetes. 29 475.

Hardman, J.G., Mayer, S.E. and Clark, B. (1965). Cocaine potentiation of the cardiac inotropic and phosphorylase responses to catecholamines as related to the uptake of H^3 -catecholamines. J. Pharmacol. Exper. Therapeut. 150 341-348.

Haworth, R.A., Hunter, D.R. and Berkoff, H.A. (1980). The isolation of Ca^{2+}-resistant myocytes from the adult rat. J. Mol. Cell. Cardiol. 12 715-723.

Haworth, R.A., Hunter, D.R., Berkoff, H.A. and Moss, R.L. (1983). Metabolic cost of the stimulated beating of isolated adult rat heart cells in suspension. Circ. Res. 52 342-351.

Hazeki, O. and Ui, M. (1980). $Beta_1$- and $beta_2$-adrenergic receptors responsible for cyclic AMP accumulation in isolated heart and lung cells. Mol. Pharmacol. 17 8-13.

Hewett, K., Legato, M.J., Danilo, P.Jr. and Robinson, R.B. (1983). Isolated myocytes from adult canine left ventricle: Ca^{2+} tolerance, electrophysiology, and ultrastructure. Am. J. Physiol. 245 H830-839.

Hohl, C.M., Altschuld, R.A. and Brierly, G.P. (1983). Effects of calcium on the permeability of isolated adult rat heart cells to sodium. Arch. Biochem. Biophys. 221 197-205.

Hron, W.T., Jesmok, G.J., Lombardo, Y.B., Menahan, L.A. and Lech, J.J. (1977). Calcium dependency of hormone stimulated lipolysis in the perfused rat heart. J. Mol. Cell. Cardiol. 9 733-748.

Hron, W.T., Menahan, L.A. and Lech, J.J. (1978). Inhibition of hormonal stimulation of lipolysis in perfused rat heart by ketone bodies. J. Mol. Cell. Cardiol. 10 161-174.

Hulsmann, W.C. and Stam, H. (1978). Intracellular origin of hormone-sensitive lipolysis in the rat. Biochem. Biophys. Res. Commun. 82 53-59.

Hulsmann, W.C., Stam, H. and Breeman, W.A.P. (1981). Acid and neutral lipases involved in endogenous lipolysis in small intestine and heart. Biochem. Biophys. Res. Commun. 102 440-448.

Hulsmann, W.C., Stam, H. and Breeman, W.A.P. (1982). On the nature of neutral lipase in rat heart. Biochem. Biophys. Res. Commun. 108 371-378.

Hulsmann, W.C., Stam, H., and Jansen, H. (1984). Localization and function of myocardial lipolysis. Basic Res. Cardiol. 79 268-273.

Hutter,J.F., Piper, H.M. and Spiekermann, P.G. (1984). Kinetic analysis of myocardial fatty acid oxidation suggesting an albumin receptor mediated uptake process. J. Mol. Cell. Cardiol. 16 219-226.

Huttunen, J.K. and Steinberg, D. (1971). Activation and phosphorylation of purified adipose tissue hormone-sensitive lipase by cyclic AMP-dependent protein kinase. Biochem. Biophys. Acta 239 411-427.

Idell-Wenger, J.A. and Neely, J.R. (1978). Regulation of uptake and metabolism of fatty acids by muscle. In Disturbances in Lipid and Lipoprotein Metabolism. pp. 269-284. Dietschy, J.M., Gotto, A.M. Jr. and Ontko, J.A. editors. Waverly Press, Inc., Baltimore.

Im, J.H., Puckett, S.W., Bowdon, H.R., Poger, W.J., Meezan, E., Kim, H.D. and Rackely, C.E. (1984). Isolation and Characterization of β-adrenergic receptors from adult, rat cardiac myocytes. J. Mol. Cell. Cardiol. 16 867-873.

Ingebretsen, W.R. Jr., Friedman, W.F. and Mayer, S.E. (1981). Isoproterenol-induced restoration of contraction in K^+-depolarized hearts: relationship to cAMP. Am. J. Physiol. 241 H187-193.

Isenberg, G. and Klockner, U. (1982). Calcium tolerant ventricular myocytes prepared by preincubation in a "KB medium". Pflugers Arch. 395 6-18.

Jansen, H., Stam, H., Kalkman, C. and Hulsmann, W.C. (1980). On the dual localization of lipoprotein lipase in rat heart. Studies with a modified perfusion technique. Biochem. Biophys. Res. Commun. 92 411-416.

Jesmok, G.J., Calvert, D.N. and Lech, J.J. (1977). The effect of inotropic agents on glycerol release and protein kinase activity ratios in the isolated perfused rat heart. J. Pharmacol. Exp. Ther. 200 187-194.

Jesmok, G.J., Mogelnicki, S.R., Lech, J.J., and Calvert, D.N. (1976). Effect of polyamines, ions and epinepherine on triolein hydrolysing activity of rat ventricular extracts. J. Mol. Cell. Cardiol. 8 283-298.

Josephson, I.R., Sanchez-Chapula, J. and Brown, A.M. (1984). A comparison of calcium currents in rat and guinea pig single ventricular cells. Circ. Res. 54 144-156.

Julien, P., Dagenais, G.R., Gailis, L. and Roy, P.-E. (1978). Role of cardiac lymph and interstitial fluid in lipid metabolism of canine heart. Can. J. Physiol. Pharmacol. 56 1041-1046.

Julien, P., Gailis, L., Lepage, M., and Roy, P.-E. (1979). A comparison of fatty acid patterns of arterial plasma, pericardial fluid and cardiac lymph in dog. Artery 5 37-44.

Kao, R.L., Christman, E.W., Luh, S.L., Krauhs, J.M., Tyers, G.F.O. and Williams, E.G. (1980). The effects of insulin and anoxia on the metabolism of isolated mature rat cardiac myocytes. Arch. Biochem. Biophys. 203 587-599.

Katz, A.M. and Messino, F.C. (1981). Lipid-membrane interactions and the pathogenesis of ischemic damage in the myocardium. Circ. Res. 48 1-16.

Keely, S.L. and Corbin, J.D. (1977). Involvement of cAMP-dependent protein kinase in the regulation of heart contractile force. Am. J. Physiol. 233 H269-275.

Khoo, J.C. and Steinberg, D. (1974). Reversible protein kinase activation of hormone-sensitive lipase from chicken adipose tissue. J. Lipid Res. 15 602-610.

Khoo, J.C., Steinberg, D., Huang, J.J. and Vagelos, P.R. (1976). Triglyceride, diglyceride, monoglyceride, and cholesterol ester hydrolases in chicken adipose tissue activated by adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase: chromaotographic resolution and immunochemical differentiation from lipoprotein lipase. J. Biol. Chem. 251 2882-2890.

Khoo, J.C., Vance, J.E., Mahoney, E.M., Jensen, D., Wancewicz, E. and Steinberg, D. (1984). Neutral triglyceride lipase in macrophages. Arteriosclerosis 4 34-40.

Kjekshus, J.K. and Mjos, O.D. (1972). Effect of free fatty acids on myocardial function and metabolism in the ischaemic dog heart. J. Clin. Invest. 51 1767-1776.

Kono, T. (1969). Roles of collagenases and other proteolytic enzymes in the dispersal of animal tissues. Biochem. Biophys. Acta 178 397-400.

Korn, E.D. (1955). Clearing factor, a heparin activated lipoprotein lipase. J. Biol. Chem. 215 1-26.

Knauer, T.M. and Weglicki, W.B. (1983). Characteristics of multiple forms of the acidic triacylglycerol lipase(s) of canine cardiac myocytes. Biochem. Biophys. Acta 753 173-185.

Knowlton, F.P. and Starling, E.H. (1913). Experiments on the consumption of sugar in the normal and the diabetic heart. J. Physiol (London) 44 147-163.

Kobayashi, K. and Neely, J.R. (1979). Control of maximum rates of glycolysis in rat cardiac muscle. Circ. Res. 44 166-175.

Kreisberg, R.A. (1966). Effect of epinepherine on myocardial triglyceride and free fatty acid utilization. Am. J. Physiol. 210 385-389.

Kryski, A. Jr., Kenno, K.A., Krug, C.H. and Severson, D.L. (1985). Regulation of rates of lipolysis in isolated myocardial cells from rat heart. Adv. Myocardiol. 6 195-204.

Kuksis, A. (1978). Handbook of Lipid Research: Fatty Acids and Glycerides. Vol. 1, pp. 123-196. Kuksis, A., editor. Plenum Press, New York.

Kurien, V.A. and Oliver, M.F.A. (1970). A metabolic cause for arrhythmias during acute myocardial hypoxia. Lancet 1 813-815.

Lech, J.J., Jesmok, G.J. and Calvert, D.N. (1977). Effects of drugs and hormones on lipolysis in heart. Fed. Proc. 36 2000-2008.

Lindemann, J.P., Bailey, J.C., and Watanabe, A.M. (1982). Potential biochemical mechanisms for regulation of the slow inward current: theoretical basis for drug action. Am. Heart J. 103 746-756.

Litosch, I., Hudson, T.H., Mills, I., Li, S.-Y. and Fain, J.N. (1982). Forskolin as an activator of cyclic AMP accumulation and lipolysis in rat adipocytes. Mol. Pharmacol. 22 109-115.

Locke, F.S. and Rosenheim, O. (1904). The disappearance of dextrose when perfused through the isolated mammalian heart. J. Physiol.(London) 31 14.

Mallov, S. and Alousi, A.A. (1969). In vitro effect of epinepherine on lipase activity of heart. Am. J. Physiol. 216 794-799.

Mayer, S.E. (1974). Effect of catecholamines on cardiac metabolism. Circ. Res. 34, 35 Suppl. III 129-135.

McCormack, J.G. and Denton, R.M. (1981). The activation of pyruvate dehydrogenase in the perfused rat heart by adrenaline and other inotropic agents. Biochem. J. 194 639-643.

McCormack, J.G. and England, P.J. (1983). Ruthenium red inhibits the activation of pyruvate dehydrogenase caused by positive inotropic agents in perfused rat heart. Biochem. J. 214 581-585.

McCormack, J.G. and Denton, R.M. (1984). Role of Ca^{2+} ions in the regulation of intramitochondrial metabolism in rat heart. Biochem. J. 218 235-247.

McKee, E.E., Clark, M.G., Beinlich, C.J., Lins, J.A. and Morgan, H.E. (1979. Neutral-alkaline proteases and protein degradation in rat heart. J. Mol. Cell. Cardiol. 11 1033-1051.

Mersel, M., Heller, M. and Pinson, A. (1979). Intracellular lipase activities in heart and skeletal muscle homogenates. Biochem. Biophys. Acta. 572 218-224.

Miller, O.N. and Olson, R.E. (1952). Metabolism of cardiac muscle, IV. Utilization of pyruvate and DL-lactate by duck heart. J. Biol. Chem. 199 457-473.

Miller, W.C., Palmer, W.K. and Oscai, L.B. (1984). Relationship between type L hormone-sensitive lipase activity and endogenous triacylglycerol in the hearts of colchicine-treated rats. Biochem. J. 224 1-6.

Mjos, O.D., Kjekshus, J.K. and Lekven, J. (1974). Importance of free fatty acids as a determinant of myocardial oxygen consumption and myocardial ischemic injury during norepinephrine infusion in dogs. J. Clin. Invest. 53 1290-1299.

Montini, J., Bagby, G.J., Burns, A.H. and Spitzer, J.J. (1981). Exogenous substrate utilization in Ca^{2+}-tolerant myocytes from adult rat hearts. Am. J. Physiol. 240 H659-663.

Montini, J., Bagby, G.J. and Spitzer, J.J. (1984). Importance of exogenous substrates for the energy production of adult rat heart myocytes. J. Mol. Cell. Cardiol. 13 903-911.

Moustafa, E., Skomedal, T., Osnes, J.-B. and Oye, I. (1976). Cyclic AMP formation and morphology of myocardial cells isolated from adult rat heart: effect of Ca^{2+} and Mg^{2+}. Biochem. Biophys. Acta. 421 411-415.

Moustafa, E., Giachetti, A., Downey,H.F. and Bashour, F.A. (1978). Binding of (^{3}H)dihydroalprenolol to beta adrenoceptors of cells isolated from adult rat heart. Arch. Pharmacol. 303 107-109.

Murthy, V.K., Stiles, M.R. and Shipp, J.C. (1983). Inhibition by adenosine triphosphate of heart microsomal neutral lipase activity. Lipids 18 413-416.

Nag, A.C. and Zak, R. (1979). Dissociation of adult mammalian heart into single cell suspension: and ultrastructural study. J. Anat. 129 541-559.

Neely, J.R., Bowman, R.H. and Morgan, H.E. (1969). Effects of ventricular pressure development and palmitate on glucose transport. Am. J. Physiol. 216 804.

Neely, J.R., Rovetto, M.J. and Oram, J.F. (1972). Myocardial utilization of carbohydrate and lipids. Prog. Cardiovasc. Disease 15 289-327.

Neely, J.R. and Morgan, H.E. (1974). Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of the heart muscle. Ann. Rev. Physiol. 36 413-449.

Neely, J.R., Whitmer, K.M. and Mochizuki, S. (1976). Effects of mechanical activity and hormones on myocardial glucose and fatty acid utilization. Circ. Res. 38 I-22-I-29.

Newsholme, E.A., Arch, J.R.S., Brooks, B. and Surholt, B. (1983). The role of substrate cycles in metabolic regulation. Biochem. Soc. Trans. 11 52-56.

Nilsson-Ehle, P., Garfinkel, A.S. and Schotz, M.C. (1980). Lipolytic enzymes and plasma lipoprotein metabolism. Ann. Rev. Biochem. 49 667-693.

Olson, R.E. and Hoeschen, R.J. (1967). Utilization of endogenous lipid by the isolated perfused rat heart. Biochem. J. 103 796-801.

Onorato, J.J. and Rudolph, S.A. (1981). Regulation of protein phosphorylation by inotropic agents in isolated rat myocardial cells. J. Biol. Chem. 256 10697-10703.

Opie, L.H. (1968,1969). Metabolism of the heart in health and disease. Parts 1, 2, and 3. Am. Heart J. 76 685-698; 77 100-122; 77 383-410.

Oram, J.F., Bennetch, S.L. and Neely, J.R. (1973). Regulation of fatty acid utilization in isolated perfused rat hearts. J. Biol. Chem. 248 5299-5309.

Oscai, L. (1979). Role of lipoprotein lipase in regulating endogenous triacylglycerols in rat heart. Biochem. Biophys. Res. Commun. 91 227-232.

Palmer, W.K., Caruso,R.A. and Oscai, L.B. (1981). Possible role of lipoprotein lipase in the regulation of endogenous triacylglycerols in the rat heart. Biochem. J. 198 159-166.

Palmer, W.K. and Kane, T.A. (1983a). Hormonal activation of type-L hormone-sensitive lipase measured in defatted heart powders. Biochem. J. 212 379-383.

Palmer, W.K. and Kane, T.A. (1983b). Hormone-stimulated lipolysis in cardiac myocytes. Biochem. J. 216 241-243.

Patten, G.S., Filsell, O.H. and Clark, M.G. (1982). Epinephrine regulation of phosphofructokinase in perfused rat heart. A calcium ion-dependent mechanism mediated via α-receptors. J. Biol. Chem. 257 9480-9486.

Patterson, S.W. and Starling ,E.H. (1912). The carbohydrate metabolism of the isolated heart lung preparation. J. Physiol. (London) 45 137-148.

Pedersen, M.E., Cohen, M. and Schotz, M.C. (1983). Immunocytochemical localization of the functional fraction of lipoprotein lipase in the perfused heart. J. Lipid Res. 24 512-521.

Powell, T. and Twist, V.W. (1976). A rapid technique for the isolation and purification of adult cardiac muscle cells having respiratory control and a tolerance to calcium. Biochem. Biophys. Res. Commun. 72 327-333.

Powell, T., Terrar, D.A. and Twist, V.W. (1980). Electrical properties of individual cells isolated from adult rat ventricular myocardium. J. Physiol. 302 131-153.

Rabin, R.A. and Allen, D.O. (1984). Role of protein kinase and contractile force in the regulation of myocardial lipolysis. Horm. Metabol. Res. 16 465-467.

Rajs, J., Sundberg, M., Sundby, G.-B., Danell, N., Tornling, G., Biberfeld, P. and Jakobsson, S.W. (1978). A rapid method for the isolation of viable cardiac myocytes from adult rat. Exper. Cell Res. 115 183-189.

Rajs, J., Sundberg, M., Harm, T., Grandinsson, M. and Soderlund, U. (1980). Interrelationships between ATP levels, enzyme leakage, gluconate uptake, trypan blue exclusion and length/width ratio of isolated rat cardiac myoyctes subjected to anoxia and reoxygenation. J. Mol. Cell. Cardiol. 12 1227-1238.

Randle, P.J., Newsholme, E.A., and Garland, P.B. (1964). Regulation of glucose uptake by muscle. VIII. The effects of fatty acids, ketone bodies and pyruvate and of alloxan-diabetes and starvation, on the uptake and metabolic fate of glucose in rat heart and diaphragm muscle. Biochem. J. 93 652.

Randle, P.J., Garland, P.B., Hales, C.N., Newsholme, E.A., Denton, R.M. and Pogson,C.I. (1966). Interactions of metabolism and the physiological role of insulin. Recent Prog. Horm. Res. 22 1-44.

Rizza, R.A., Crass, M.F. and Shipp, J.C. (1971). Effect of insulin treatment in vivo on heart glycerides and glycogen of alloxan-diabetic rats. Metabol. 20 539-543.

Robinson, J. and Newsholme, E.A. (1967). Glycerol kinase activities in rat heart and adipose tissue. Biochem. J. 104 2c-4c.

Rosen, P., Buddle,Th. and Reinhauer, H. (1981). Triglyceride lipase activity in the diabetic rat heart. J. Mol. Cell. Cardiol. 13 539-550.

Roy, P.-E. (1975). Lipid droplets in the heart interstitium: concentration and distribution. In Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism. Vol. 10., pp. 17-27. Roy, P.-E. and Rona, G., editors. University Park Press, Baltimore.

Russo, M.A., Cittadini, A., Dani, A.M., Inesi, G. and Terranova, T. (1981). An ultrastructural study of calcium induced degenerative changes in dissociated heart cells. J. Mol. Cell. Cardiol. 13 265-279.

Scheuer, J. and Olson, R.E. (1967). Metabolism of exogenous triglyceride by the isolated perfused rat heart. Am. J. Physiol. 212 301-307.

Schimmel, R.J. (1984). Stimulation of cAMP accumulation and lipolysis in hamster adipocytes with forskolin. Am. J. Physiol. 246 C63-C68.

Schotz, M.C., Twu, J-S., Pedersen, M.E., Chen, C.-H., Garfinkel, A.S. and Borensztajn, J. (1977). Antibodies to lipoprotein lipase: application to perfused heart. Biochem. Biophys. Acta. 489 2140224

Schousboe, I., Bartels, P.D. and Jensen, P.K. (1973). Triglyceride lipase activity in subcellular fractions from beef heart. FEBS Lett. 35 279-283.

Seamon, K.B. and Daly, J.W. (1981). Forskolin: a unique diterpene activator of cyclic AMP-generating systems. J. Cyclic Nucleotide Res. 7 201-224.

Severson, D.L. (1979a). Characterization of triglyceride lipase activities in rat heart. J. Mol. Cell. Cardiol. 11 569-583.

Severson, D.L. (1979b). Regulation of lipid metabolism in adipose tissue and heart. Can. J. Physiol. Pharmacol. 57 923-937.

Severson, D.L., Lefebvre, F.T. and Sloan, S.K. (1980). Effect of chloroquine on rates of lipolysis in the isolated perfused rat heart and in rat epididymal fat pads. J. Mol. Cell. Cardiol. 12 001-015.

Severson, D.L., Sloan, S.K. and Kryski, A. (1981a). Acid and neutral triacylglycerol ester hydrolases in the rat heart. Biochem. Biophys. Res. Comm. 100 247-253.

Severson, D.L., Fletcher, T., Groves, G., Hurley, B., and Sloan, S. (1981b). Hydrolysis of triolein, cholesterol oleate, and 4-methylumbelliferyl stearate by acid and neutral ester hydrolases (lipases) from pigeon adipose tissue: effects of cAMP-dependent protien kinase. Can. J. Biochem. 59 418-429.

Severson, D.L. and Hurley, B. (1982). Regulation of rat heart triacylglycerol ester hydrolases by free fatty acids, fatty acyl CoA and fatty acyl carnitine. J. Mol. Cell. Cardiol. 14 467-474.

Shimoda, M. (1968). A study on fatty acid metabolism with reference to epinephrine-sensitive lipase in vitro. Japan Circ. J. 32 813-817.

Shipp, J.C., Opie, L.H. and Challoner, D. (1961). Fatty acid and glucose metabolism in the perfused heart. Nature 189 1018-1019.

Shipp, J.C., Matos, O.E., Knizley, H. and Crevasse, L.E. (1964) CO_2 formed from endogenous and exogenous substrates in perfused heart. Am. J. Physiol. 207 1231-1236.

Silver, L.H., Hemwall, E.L., Marino, T.A. and Houser, S.R. (1983). Isolation and morphology of calcium-tolerant feline ventricular myocytes. Am. J. Physiol. 245 H891-896.

Skomedal, T., Aass, H. and Osnes, J.-B. (1984). Specific binding of [^{3}H]prazosin to myocardial cells isolated from adult rats. Biochem. Pharmacol. 33 1897-1906.

Snowdowne, K.W., Ertel, R.J. and Borle, A.B. (1985). Measurement of cytosolic Ca^{2+} with aequorin in dispersed rat ventricular cells. J. Mol. Cell. Cardiol. (in press).

Spitzer, J.J. (1983). Studies of substrate metabolism in isolated myocytes. In Cardiac Metabolism . pp. 217-229. Drake-Holland, A.J. and Noble, M.I.M., editors. John Wiley and Sons Ltd., New York.

Stam, H., Geelhoed-mieras, T. and Hulsmannn, W.C. (1980). Erucic acid induced alteration of cardiac triglyceride hydrolysis. Lipids 15 42-250.

Stam, H. and Hulsmannn, W.C. (1981). Control of lipolysis in triglyceride enriched rat hearts. Ann. Nutr. Metab. 25 11-19.

Stam, H. and Hulsmannn, W.C. (1984). Effects of hormones, amino acids, and specific inhibitors on rat heart heparin-releasable lipoprotein lipase and tissue neutral lipase activities during long-term perfusion. Biochem. Biophys. Acta. 794 72-82.

Steinberg, D. and Koo, J.C. (1977). Hormone-sensitive lipase of adipose tissue. Fed. Proc. 36 1986-1990.

Stralfors, P. and Befrage, P. (1983). Phosphorylation of hormone-sensitive lipase by cyclic AMP-dependent protein kinase. J. Biol. Chem. 258 15146-15152.

Stralfors, P., Bjorgell, P. and Befrage, P. (1984). Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase in intact adipocytes: identification of phosphorylated sites and effects on the phosphorylation by lipolytic hormones and insulin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 3317-3321.

Tamboli, A., Vander Maten, M., O'Looney, P. and Vahouny, G.V. (1983a). Metabolism of fatty acid, glycerol and a monoglyceride analogue by rat cardiac myocytes and perfused hearts. Lipids 18 808-813.

Tamboli, A., O'Looney, P., Vander Maten, M. and Vahouny, G.V. (1983b). Comparative metabolism of free and esterified fatty acids by the perfused rat heart and rat heart myocytes. Biochem. Biophys. Acta. 750 404-410.

van der Vusse, G.J. and Reneman, R.S. (1983). Glycogen and lipids (endogenous substrates). In Cardiac Metabolism pp. 215-237. Drake-Holland A.J. and Noble M.I.M., editors. John Wiley & Sons Ltd.

Vahouny, G.V., Wei, R., Starkweather, R. and Davis, C. (1970). Preparation of beating heart cells from adult rats. Science 167 1616-1618.

Vahouny, G.V., Wei, R.W., Tamboli, A. and Albert, E.N. (1979). Adult canine myocytes: isolation, morphology and biochemical characteristics. J. Mol. Cell. Cardiol. 11 339-357.

Vahouny, G.V., Tamboli, A., Vander Maten, M., Jansen, H., Twu, J.-S. and Schotz, M.C. (1980). Lipoprotein lipase activity of adult rat cardiocytes. Biochem. Biophys. Acta 620 63-69.

Vary, T.C., Reibel, D.K. and Neely, J.R. (1981). Control of energy metabolism of heart muscle. Ann. Rev. Physiol. 43 419-430.

Victor, T., la Cock, C. and Lochner, A. (1984). Myocardial tissue free fatty acids. J. Mol. Cell. Cardiol. 16 709-721.

Vik-Mo, H., Riemersa, R.A., Mjos, O.D. and Oliver, M.F. (1979). Effect of myocardial ischaemia and antilipolytic agentson lipolysis and fatty acid metabolism in the in situ dog heart. Scand. J. Clin. Lab. Inv. 39 559-568.

Visscher, M.B. and Mulder, A.G. (1930). The carbohydrate metabolism of the heart. Am. J. Physiol. 94 631-640.

Wang, T.-W., Menahan, L.A., and Lech, J.J. (1977). Subcellular localization of marker enzymes, lipase and triglyceride in rat heart. J. Mol. Cell. Cardiol. 9 25-38.

Watanabe, A.M. and Besch, H.R. Jr. (1974). Cyclic adenosine monophosphate modulation of slow calcium influx channels in guinea pig hearts. Circ. Res. 35 316-324.

Welman, E. and Peters, T.J. (1976). Properties of lysosomes in guinea pig heart: subcellular distribution and in vitro stability. J. Mol. Cell. Cardiol. 8 443-463.

Whitmer, J.T., Idell-Wenger, J.A., Rovetto, M.J. and Neely, J.R. (1978). Control of fatty acid metabolism in ichemic and hypoxic hearts. J. Biol. Chem. 253 4305-4309.

Wibo, M. and Poole, B. (1974). Protein degradation in cultured cells. II. The uptake of chloroquine by rat fibroblasts and the inhibition of cellular protein degradation and cathepsin B_1. J. Cell. Biol. 63 430-440.

Williamson, J.R. (1964). Metabolic effects of epinephrine in the isolated, perfused rat heart. J. Biol. Chem. 239 2721-2729.

Wittenberg, B.A. and Robinson, T.F. (1981). Oxygen requirements, morphology, cell coat and membrane permeability of calcium-tolerant myocytes from hearts of adult rats. Cell Tissue Res. 216 231-251.

Yokayama, H.O., Jennings, R.B. and Wartman, W.B. (1961). Intercalated discs of dog myocardium. Exp. Cell Res. 23 29-44.

UNIVERSITAT DE BARCELONA FACULTAT DE BIOLOGIA BIBLIOTECA