

# Actividad y expresión (ARNm) de la lipoproteína lipasa y de la lipasa sensible a las hormonas en tejidos de ratas vírgenes y preñadas diabéticas

Lipoprotein lipase and hormone-sensitive lipase activity and mRNA expression in tissues of virgin and pregnant diabetics rats

BLANCO-DOLADO, L., HERRERA, E. \* y MARTÍN-HIDALGO, A.  
Universidad San Pablo-CEU \* y Departamento de Bioquímica-Investigación. Hospital Ramón y Cajal. 28034 Madrid.

## RESUMEN

Para estudiar el efecto de la gestación y la diabetes sobre la actividad y la expresión (ARNm) de la lipoproteína lipasa (LPL) y de la lipasa sensible a las hormonas (HSL) en tejidos, las ratas recibieron 40 mg de estreptozotocina/kg y se sacrificaron al día 20 de gestación. En el tejido adiposo blanco (TAB), la actividad y el ARNm de la LPL eran más bajos en las ratas preñadas controles (PC) que en las vírgenes controles (VC), siendo también inferior la actividad en las diabéticas (D) que en las controles (C), tanto vírgenes (V) como preñadas (P). En la glándula mamaria (GM), la actividad y el ARNm de la LPL estaban más altos en las PC que en las VC, y disminuyeron en las PD y VD respecto de las C. En el TAB, la actividad HSL estaba más alta en las P que en las V y era similar en las PC y PD, sin cambios en los niveles de ARNm. En la GM, la actividad y el ARNm de la HSL estaban más bajos en las P que en las V y eran menores en las D que en las C. Estos resultados permiten concluir que los mecanismos de regulación de la actividad y de la expresión molecular (ARNm) de la LPL y de la HSL durante la gestación y la diabetes son específicos de cada tejido. El paralelismo en los cambios de la actividad y el nivel de ARNm de la LPL en el TAB y GM, así como entre la actividad y el ARNm de la HSL en la GM, indican que la regulación a nivel transcripcional de la expresión de estos genes es un mecanismo importante para la captación y movilización de los TG en estos tejidos.

**Palabras clave:** Gestación. Diabetes. Lipoproteína lipasa. Lipasa sensible a las hormonas.

## ABSTRACT

In order of studying the effect of gestation and diabetes on tissue lipoprotein lipase (LPL) and hormone-sensitive lipase (HSL) activities and mRNA expression, rats were treated with 40 mg streptozotocin/kg and killed at day 20 of gestation. LPL activity and mRNA level in white adipose tissue (WAT) were lower in control pregnant rats (CP) than in control virgin rats (CV), the activity decreasing in diabetic rats with

regard to control rats (C), both pregnant (P) and virgins (V). LPL activity and mRNA level in mammary gland (MG) was higher in CP than CV, and it was lower in DV and DP with respect to C. HSL activity in WAT was higher in P than in V, whereas did not differ between CP and DP and no changes were found in mRNA levels. In MG both mRNA level and HSL activity were lower in P than V, and it was lower in D than in C rats. We concluded that the mechanism of regulation of LPL and HSL activities and molecular expression during gestation and diabetes are tissues-specific. The parallelism between LPL activity and mRNA level in WAT and MG, and between HSL activity and mRNA level in MG indicates that transcriptional regulated-genes expression could be an important mechanism for the tissue triglyceride uptake and mobilization in these tissues.

**Key words:** Gestation. Diabetes. Lipoprotein lipase. Hormone-sensitive lipase.

Recibido: 28-11-96.

Aceptado: 12-12-96.

BIBLID [0004-2927(1996) 37:4; 945-956]

## INTRODUCCIÓN

En la última fase de la gestación se desarrolla una hiperlipemia que corresponde de forma específica a un aumento en los niveles de triglicéridos (TG) en el plasma (1, 2 y 3). De entre los factores que contribuyen a esta hipertrigliceridemia, destacan dos: 1/ una aumentada producción hepática de TG, que es mantenida por el aumento en el transporte de ácidos grasos libres (FFA) hacia el hígado desde el tejido adiposo, como consecuencia de la intensa lipólisis presente en este tejido, y 2/ un disminuido aclaramiento de los TG de las lipoproteínas circulantes causado por la disminución de la actividad de la LPL en el tejido adiposo (4).

La lipoproteína lipasa (LPL, EC 3.1.1.34) (5) y la lipasa sensible a las hormonas (HSL, EC 3.1.1.3) (6) son las principales enzimas lipolíticas. La LPL cataliza la hidrólisis de los TG de las lipoproteínas circulantes ricas en ellos (7), mientras que la HSL cataliza la hidrólisis de los TG almacenados en el interior de los adipocitos (8).

La LPL se sintetiza en las células parenquimales de varios tejidos extrahepáticos (5) en forma de proenzima inactiva, y después de todo un proceso de maduración y activación en el retículo endoplásmico rugoso y en el aparato de Golgi es translocada al endotelio vascular donde se une a moléculas de heparán sulfato, ejerciendo allí su función (9, 10 y 11). Aunque esta enzima se sintetiza en la mayoría de los tejidos extrahepáticos, los valores más altos de actividad y expresión de la LPL se han encontrado en el tejido adiposo blanco, glándula mamaria, corazón y músculo de fibra roja (5, 7, 12, 13, 14 y 15).

La HSL es una lipasa neutra citosólica, con actividad triacilglicérido

lipasa y colesterol ester hidrolasa (8 y 16). La actividad de esta enzima se regula a corto plazo mediante un mecanismo de fosforilación-defosforilación, dependiente de la activación de proteínas quinasas cuya actividad se estimula por aumento de los niveles de AMPc, siendo esta cascada iniciada por distintas hormonas (16,17 y 18). La fosforilación de la HSL no solo aumenta su actividad sino que también facilita su translocación desde el citosol acuoso hasta la gota de grasa, donde actúa sobre el triglicérido sustrato (19). Esta enzima se encuentra principalmente en el tejido adiposo y en los tejidos esteroideogénicos (6, 20 y 21), aunque está presente también en otros tejidos (22, 23 y 24).

Ambas enzimas, LPL y HSL, están reguladas por distintos factores, hormonales, nutricionales, de desarrollo, estacionales, etc. De entre los factores hormonales, se sabe que la insulina estimula la actividad LPL mientras que inhibe la de la HSL en el tejido adiposo blanco (25 y 26). Algunos estudios apuntan a que ambas enzimas se regulan de forma recíproca en determinados tejidos (27, 28 y 29), y que responden de manera específica según los tejidos y la situación fisiológica del organismo. La diabetes puede ser un buen modelo para esclarecer la implicación de la insulina en la regulación *in vivo* de ambas enzimas, así como la gestación donde se observan variaciones en los niveles de insulina circulantes, apareciendo resistencia a la insulina al final de la misma (30, 31 y 32). Los cambios en la actividad y el ARNm de la LPL en distintas situaciones fisiopatológicas están bien documentados en la literatura, aunque el mecanismo de regulación enzimática específico de cada tejido no está del todo establecido. A diferencia de la LPL, hay pocos estudios de actividad HSL en distintos tejidos durante la gestación, y menos aún en una situación de diabetes. Por ello el principal objetivo del presente trabajo ha sido estudiar en la rata el efecto de la gestación y de la diabetes sobre la actividad y la expresión (ARNm) de la LPL y de la HSL en tejido adiposo blanco de localización lumbar y en la glándula mamaria.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los animales utilizados en el estudio fueron ratas *Wistar*, hembras, de 180-200 g de peso corporal, sometidas a ciclos constantes de 12 horas de luz/oscuridad, mantenidas en el animalario a una temperatura de 22-24°C y con ventilación continua. Se les indujo una diabetes experimental inyectándoles, tras una noche de ayuno, por una vena de la cola, 40 mg de estreptozotocina (STZ) disuelta en tampón de citrato sódico/Kg.p.c. A los animales controles se les inyectó solamente el tampón citrato. Tras 48 h de la inyección de STZ se sometió a los animales a un test de glucosuria, incluyendo en el estudio solamente aquéllos que dieron positivo. A partir de este día (día 1 de trata-

miento), y durante 7 días consecutivos, se les inyectó s.c. una dosis diaria de 1,5 UI insulina bovina ultralente/100 g.p.c (MC, Novo, Dinamarca). Tras esta semana, los animales se cruzaron, y el día en que aparecieron espermatozoides en el frotis vaginal se consideró día 0 de gestación; se suspendió el tratamiento con insulina y se apartaron los animales a otra jaula para sacrificarlos 20 días después. Se establecieron 4 grupos experimentales, ratas vírgenes, controles y diabéticas, y ratas preñadas de 20 días, controles y diabéticas.

Los animales se sacrificaron mediante decapitación con guillotina y en el momento del sacrificio se recogió la sangre del cuello en tubos heparinizados enfriados con hielo, para separar inmediatamente el plasma a 4°C. El tejido adiposo lumbar y la glándula mamaria se disecaron, se congelaron inmediatamente en N<sub>2</sub> líquido y se mantuvieron a -80°C hasta ser procesados. Las muestras de plasma se utilizaron para valorar glucosa (33), insulina, mediante RIA utilizando un kit específico para rata (Novo, Dinamarca)(34), triglicéridos (35) y ácidos grasos libres (36). En el tejido adiposo y en la glándula mamaria se valoraron la actividad y la expresión del ARNm de la LPL y de la HSL por los métodos anteriormente descritos (37, 38 y 39), siguiendo el protocolo de trabajos anteriores (40).

## RESULTADOS

Para establecer si los cambios en los niveles circulantes de insulina podían modificar la actividad y la expresión del ARNm de la LPL y de la HSL en el tejido adiposo y en la glándula mamaria, se determinaron algunos parámetros plasmáticos (figura 1).

Como se muestra en la figura 1, los niveles de glucosa circulante estaban significativamente disminuidos en las ratas preñadas controles comparados con los de las ratas vírgenes controles. Sin embargo, en lo que se refiere a los niveles de glucosa, las ratas diabéticas, vírgenes y preñadas, como cabía esperar, eran marcadamente hiperglucémicas, siendo el aumento en los niveles de glucosa menor en las ratas preñadas que en las vírgenes. Los niveles de insulina plasmática, al contrario que los de glucosa, estaban aumentados en las ratas preñadas controles respecto de sus correspondientes vírgenes. Las ratas diabéticas, vírgenes y preñadas, presentaban disminuidos los niveles de insulina circulante, anulándose las diferencias entre las ratas vírgenes y preñadas. En la figura 1 también se muestran los cambios en los niveles de lípidos circulantes en los mismos grupos experimentales. Los triglicéridos (TG) plasmáticos estaban aumentados en las ratas preñadas controles respecto de las vírgenes controles. Las ratas diabéticas, vírgenes y preñadas, presentaron unos niveles de TG más elevados que los de las controles correspondientes. Las ratas preñadas diabéticas fueron las que presentaron una

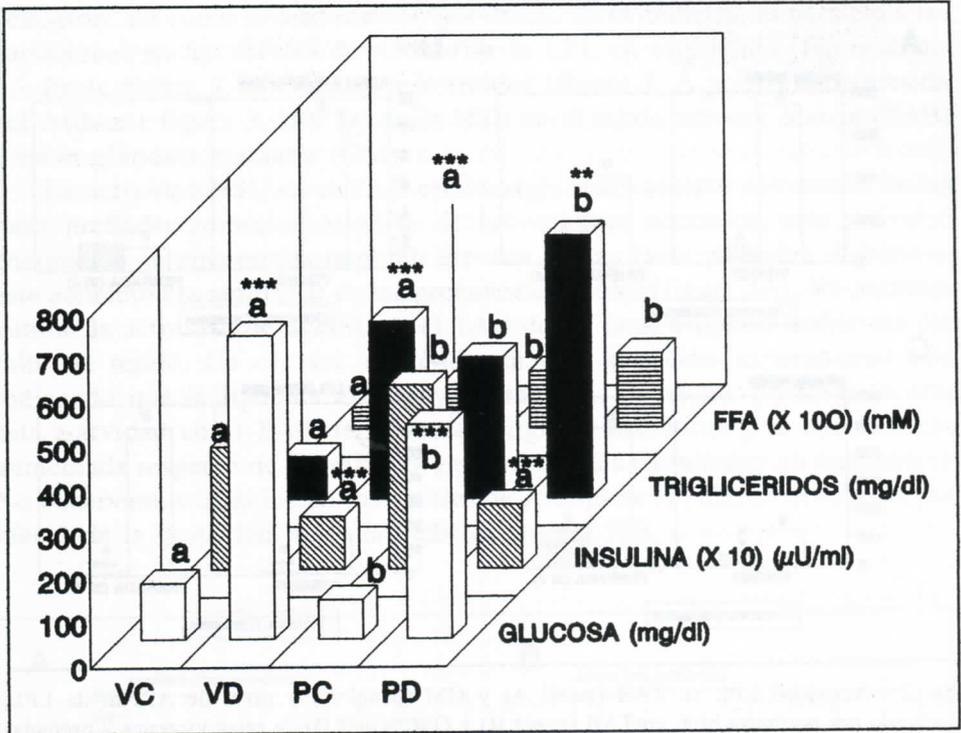


Fig. 1.—Cambios en los niveles de glucosa, insulina, triglicéridos y ácidos grasos libres en el plasma de ratas vírgenes (V) y preñadas (P), controles (C) y diabéticas (D). El “\*” señala diferencias estadísticamente significativas entre ratas controles y diabéticas, y las “letras” entre ratas vírgenes y preñadas, existiendo diferencias cuando se trate de letras distintas.

hipertrigliceridemia más exagerada; en ellas se suman los efectos de la gestación y de la diabetes. Los ácidos grasos libres en plasma (FFA) estaban aumentados en las ratas preñadas controles respecto de las vírgenes controles (figura 1). Las ratas diabéticas, vírgenes y preñadas, presentaron unos niveles de FFA superiores a los de las respectivas controles, siendo este aumento estadísticamente significativo en el caso de la rata virgen. Los FFA aparecen aumentados en la rata preñada diabética frente a la virgen diabética, al igual que ocurre en la situación control.

En la figura 2, se muestra la actividad (figura 2, A y C) y la expresión del ARNm (figura 2, B y D) de la LPL en el tejido adiposo blanco (TAB) y en la glándula mamaria (GM).

La actividad LPL en el TAB estaba disminuida en la rata preñada control respecto de la virgen control (figura 2A). En las ratas diabéticas, vírgenes y preñadas, la actividad LPL en este tejido estaba significativamente disminuida respecto de sus correspondientes controles, no encontrándose diferencias

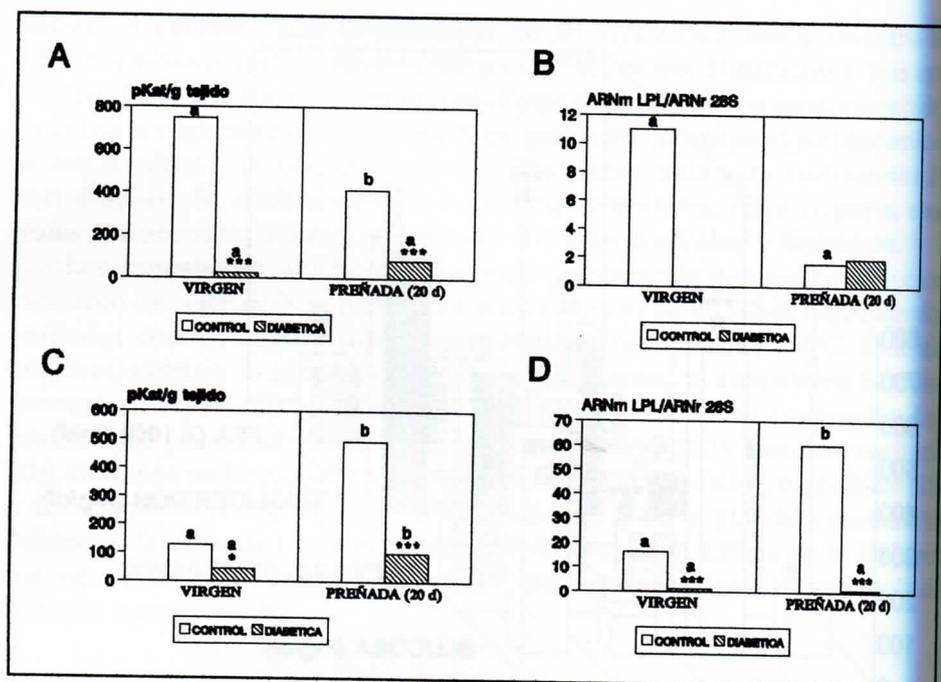


Fig. 2.—Actividad LPL en TAB (panel A) y GM (panel C) y nivel de ARNm de LPL, analizado por northern blot, en TAB (panel B) y GM (panel D) de ratas vírgenes y preñadas de 20 días, controles y diabéticas tratadas i.v. con 40 mg de STZ/Kg p.c. Los “\*” indican diferencias estadísticamente significativas entre ratas controles y diabéticas, y letras distintas señalan diferencias entre ratas vírgenes y preñadas.

entre las ratas vírgenes y preñadas diabéticas. Los niveles de ARNm, expresados como cociente entre el ARNm de la LPL y el ARN ribosómico 28S, eran más bajos en las ratas preñadas controles que en las vírgenes controles (figura 2B). En las ratas preñadas diabéticas, la expresión del ARNm de la LPL en este tejido era muy baja, al igual que ocurría con la actividad de esta enzima. En las ratas vírgenes diabéticas no pudimos cuantificar los niveles de ARNm por escasez de tejido, por ello no podemos presentar este resultado; sin embargo, hay estudios en la literatura que demuestran que la expresión del ARNm de la LPL en el tejido adiposo de las ratas vírgenes diabéticas está disminuido (41).

Al contrario de lo que observamos en el TAB, la actividad LPL en la GM estaba aumentada en las ratas preñadas, controles y diabéticas, respecto de sus correspondientes vírgenes, siendo este aumento mayor en los animales controles que en los diabéticos (figura 2C). La diabetes, al igual que ocurría en el TAB, produjo una disminución de la actividad LPL en la GM de las ratas vírgenes y preñadas. El aumento de la actividad LPL en la GM con la

gestación, así como la disminución por efecto de la diabetes, es paralelo a las variaciones en los niveles de ARNm de la LPL en este tejido (figura 2D).

En la figura 3, se muestra la actividad (figura 3, A y C) y la expresión del ARNm (figura 3, B y D) de la HSL en el tejido adiposo blanco (TAB) y en la glándula mamaria (GM).

La actividad HSL en el TAB estaba significativamente aumentada en las ratas preñadas controles respecto de las vírgenes controles; esta actividad enzimática se encontraba también elevada en las ratas preñadas diabéticas, este aumento era similar al de las preñadas controles (figura 3A). No pudimos valorar la actividad de la HSL en el TAB de las ratas vírgenes diabéticas por falta de tejido. La escasez de tejido en esta situación experimental está indicando que la lipólisis está muy estimulada; de hecho, pudimos valorar esta actividad en el TAB de dos ratas vírgenes diabéticas y la encontramos aumentada respecto de las ratas vírgenes controles (resultados no mostrados). No observamos cambios en los niveles de ARNm de la HSL en el TAB ni por efecto de la gestación ni de la diabetes (figura 3B).

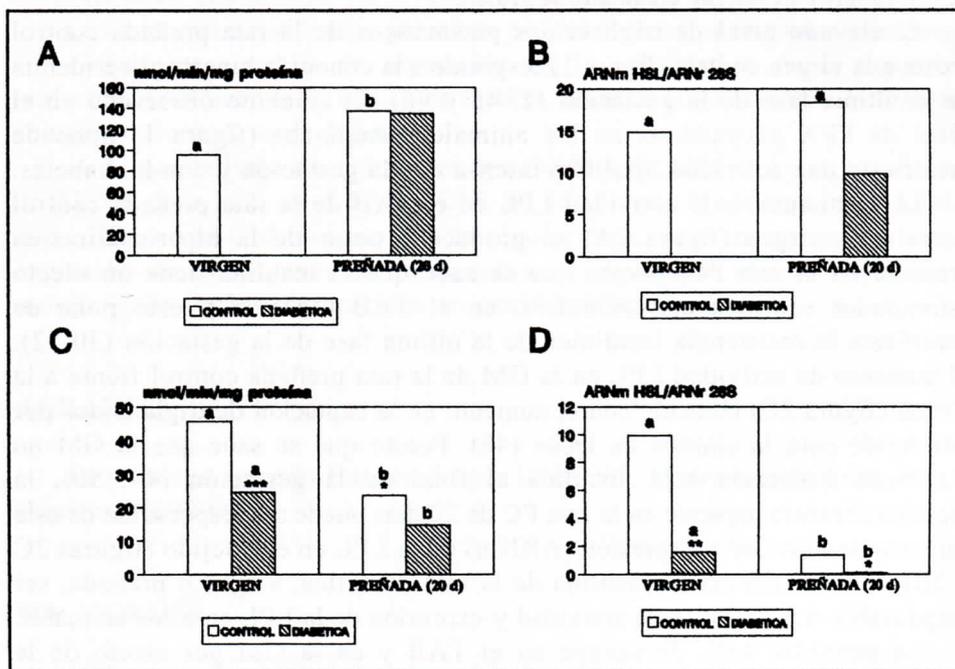


Fig. 3.—Actividad HSL en TAB (panel A) y GM (panel C) y nivel de ARNm de HSL, analizado por northern blot, en TAB (panel B) y GM (panel D) de ratas vírgenes y preñadas de 20 días, controles y diabéticas tratadas i.v. con 40 mg de STZ/Kg p.c. Los “\*” indican diferencias estadísticamente significativas entre ratas controles y diabéticas, y letras distintas señalan diferencias entre ratas vírgenes y preñadas.

La actividad HSL de la GM estaba disminuida en las ratas preñadas controles respecto de las vírgenes controles (figura 3C); contrariamente a lo que ocurría con la actividad de la LPL en este tejido (figura 2C). En las ratas diabéticas, vírgenes y preñadas, la actividad de la HSL en este tejido se encontraba disminuida respecto de sus correspondientes controles, estando la actividad más baja en la preñada diabética que en la vírgen diabética (figura 3C) al igual que ocurre en la situación control. Los cambios en la expresión del ARNm de la HSL en la GM eran paralelos a los observados en la actividad de la enzima, así también encontramos una disminución de los niveles de ARNm, con la gestación y con la diabetes (figura 3D).

## DISCUSIÓN

La disminución en los niveles de glucosa plasmática, así como el aumento en los niveles de insulina (figura 1) por efecto de la gestación en la rata control, coinciden con la hipoglucemia (42, 43) e hiperinsulinemia (44) gestacionales descritas en la bibliografía.

El elevado nivel de triglicéridos plasmáticos de la rata preñada control frente a la vírgen control (figura 1) responde a la conocida hipertrigliceridemia de la última fase de la gestación (1, 45 y 46). El aumento observado en el nivel de FFA plasmáticos en los animales estudiados (figura 1) pone de manifiesto una actividad lipolítica intensa con la gestación y con la diabetes.

La disminución de actividad LPL en el TAB de la rata preñada control frente a la vírgen (figura 2A) se produce a pesar de la hiperinsulinemia presente en la rata PC; puesto que se sabe que la insulina tiene un efecto estimulador sobre la actividad LPL en el TAB (14 y 47), esto pone de manifiesto la resistencia insulínica de la última fase de la gestación (30-32). El aumento de actividad LPL en la GM de la rata preñada control frente a la vírgen (figura 2C) coincide con el aumento en la captación de triglicéridos por este tejido para la síntesis de leche (48). Puesto que se sabe que la GM no manifiesta resistencia a la insulina al final de la gestación (49, 50), la hiperinsulinemia presente en la rata PC de 20 días puede ser responsable de este aumento de actividad y expresión (ARNm) de la LPL en este tejido (figuras 2C y 2D) y la deficiencia de insulina de la rata diabética, vírgen o preñada, ser responsable del descenso de actividad y expresión de la LPL en estos animales.

La actividad LPL disminuye en el TAB y en la GM por efecto de la diabetes (figuras 2A y 2C), y en el caso de la GM también se ve acompañada por un descenso en el nivel de ARNm (figura 2D). El paralelismo encontrado entre la actividad y la expresión de la LPL en el TAB y GM sugiere un mecanismo de regulación a nivel transcripcional de la LPL en estos tejidos y situaciones experimentales.

El aumento de la actividad HSL en el TAB de la rata preñada, control y diabética (figura 3A) coincide con elevados niveles de FFA en estas situaciones (figura 1), lo cual está indicando que la lipólisis está muy estimulada. La insulina podría estar modulando estos cambios, de manera que, teniendo en cuenta el efecto antilipolítico de la insulina (51, 52), la estimulada actividad HSL en el TAB de la rata preñada control (figura 3A), hiperinsulinémica frente a la virgen control (figura 1), pone de manifiesto nuevamente la resistencia a la insulina de la última fase de la gestación, y la deficiencia insulínica de la rata preñada diabética permite la presencia de una actividad HSL estimulada en estos animales.

Los cambios en la actividad LPL y HSL indican que ambas enzimas estarían reguladas de forma recíproca en el TAB y la insulina tendría un efecto estimulador sobre la LPL e inhibitorio sobre la HSL.

La disminución observada en la actividad HSL de la GM por efecto de la gestación y de la diabetes, también se ve reflejada en una disminución en los niveles de ARNm, con la gestación y con la diabetes (figuras 3C y 3D), lo que sugiere que el mecanismo responsable de estos cambios de actividad HSL en estas situaciones experimentales se regula a nivel transcripcional.

Los presentes resultados permiten proponer dos conclusiones concretas:

— Los mecanismos de regulación de la actividad y de la expresión molecular (ARNm) de la LPL y de la HSL durante la gestación y la diabetes son específicos de cada tejido.

— El paralelismo encontrado en los cambios de actividad y en los niveles de ARNm de la LPL en el TAB y GM, así como entre la actividad y el ARNm de la HSL en la GM, indican que la regulación a nivel transcripcional de la expresión de estos genes es un mecanismo importante para la captación y movilización de los triglicéridos en estos tejidos.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por DGICYT, Ministerio de Educación y Ciencia (PB92-0918).

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) HERRERA, E., LASUNCIÓN, M. A., GÓMEZ-CORONADO, D., ARANDA, A., LÓPEZ-LUNA, P. and MAIER, I.: "Role of lipoprotein lipase activity on lipoprotein metabolism and the fate of circulating triglycerides in pregnancy". *Am J Obstet Gynecol* (1988), **156**:1575-1583.
- (2) ARGILES, J., HERRERA, E.: "Lipids and lipoproteins in maternal and fetus plasma in the rat". *Biol Neonate* (1981), **39**:37-44.