

Papel de ANGPTL4, GPIHBP1 y PPAR-gamma como moduladores del comportamiento de la lipoproteína lipasa en el tejido adiposo epicárdico de pacientes con enfermedad coronaria

Role of ANGPTL4, GPIHBP1 and PPAR-gamma as modulators of lipoprotein lipase behavior in epicardial adipose tissue of patients with coronary artery disease

Bioq. Magalí Barchuk,¹ Bioq. Vanessa Touceda,¹ Bioq. Florencia Bermejo,¹ Bioq. Graciela López,² Dr. Miguel Rubio,³ Dra. Verónica Miksztoiwicz,⁴ Dra. Laura Schreier,⁴ Dra. Gabriela Berg⁴

¹Bioquímica, Departamento de Bioquímica Clínica, Laboratorio de Lípidos y Aterosclerosis, Instituto de Fisiopatología y Bioquímica Clínica (INFIBIOC), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Ciudad de Buenos Aires, Argentina. ²Bioquímica Especialista, Departamento de Bioquímica Clínica, Laboratorio de Lípidos y Aterosclerosis, Instituto de Fisiopatología y Bioquímica Clínica (INFIBIOC), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Ciudad de Buenos Aires, Argentina. ³Médico, División de Cirugía Cardíaca, Hospital de Clínicas José de San Martín, Universidad de Buenos Aires, Ciudad de Buenos Aires, Argentina. ⁴Doctora, Departamento de Bioquímica Clínica, Laboratorio de Lípidos y Aterosclerosis, Instituto de Fisiopatología y Bioquímica Clínica (INFIBIOC), Facultad de Farmacia y Bioquímica; CONICET, Universidad de Buenos Aires, Ciudad de Buenos Aires, Argentina.

Resumen

Introducción: El tejido adiposo epicárdico (TAE) es un tipo de TA visceral, ubicado sobre el miocardio y alrededor de las arterias coronarias. El aumento de su volumen ha sido propuesto como nuevo factor de riesgo cardiovascular. La lipoproteína lipasa (LPL) hidroliza los triglicéridos (TG) de las lipoproteínas circulantes, suministrando ácidos grasos al TA y contribuyendo a su expansión. Nuestro objetivo fue evaluar la expresión y la actividad de LPL en el TAE de pacientes con enfermedad coronaria (EC) o sin ella, y sus reguladores tisulares: proteína similar a la angiopoyetina 4 (ANGPTL4), proteína de unión a lipoproteína de alta densidad anclada a glicosilfosfatidilinositol 1 (GPIHBP1) y receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR-gamma).

Materiales y métodos: En el TAE y el TA subcutáneo (TAS) de pacientes con EC (n = 50) y sin EC (No EC, n = 30), se evaluó la actividad y la expresión de la LPL, y la expresión de ANGPTL4, GPIHBP1 y PPAR-gamma. En suero se evaluó el perfil lipídico-lipoproteico y los marcadores de insulinorresistencia.

Resultados: La actividad de la LPL fue significativamente mayor en el TAE de pacientes con EC respecto de aquellos con No EC ($p < 0.001$), sin diferencias en la expresión de la enzima. En el TAE de sujetos con EC se observó aumento significativo de los niveles de GPIHBP1, acompañado de una disminución en los niveles de ANGPTL4, en comparación con pacientes No EC ($p < 0.001$). No se observaron diferencias significativas en el PPAR-gamma en el TAE entre los grupos. En el TAE, la actividad de la LPL se asoció de manera directa con GPIHBP1 y PPAR-gamma, y de manera inversa con ANGPTL4 ($p < 0.001$).

Abstract

Introduction: Epicardial adipose tissue (EAT) is a visceral AT, located above the myocardium and around the coronary arteries. The increase in its volume has been proposed as a novel cardiovascular risk factor. Lipoprotein lipase (LPL) hydrolyzes the triglycerides (TG) of circulating lipoproteins, supplying fatty acids to the AT contributing to its expansion. Our objective was to evaluate LPL expression and activity in EAT of patients with and without coronary artery disease (CAD), and their tissue regulators ANGPTL4, GPIHBP1 and PPAR-gamma.

Materials and methods: In EAT and subcutaneous AT (SAT) of patients with CAD (n = 50) and without CAD (Non-CAD, n = 30), LPL activity and expression and ANGPTL4, GPIHBP1 and PPAR-gamma levels were evaluated. In serum, lipid-lipoprotein profile and insulin resistance markers were evaluated.

Results: The activity of LPL was significantly higher in EAT of CAD compared to Non-CAD ($p < 0.001$) without differences in the expression of the enzyme. A significant increase in the levels of GPIHBP1 was observed in EAT of CAD accompanied by a decrease in ANGPTL4 levels compared to Non-CAD ($p < 0.001$). There were no significant differences in PPAR-gamma in EAT between groups. In EAT, LPL activity was directly associated with GPIHBP1 and PPAR-gamma and inversely with ANGPTL4 ($p < 0.001$).

Conclusion: The increase in LPL activity in EAT of patients with CAD, without changes in their protein expression, would suggest that their regulation would be mostly post-translational, mainly through the

Conclusión: El aumento en la actividad de la LPL en el TAE de pacientes con EC, sin cambios en su expresión proteica, sugeriría que su regulación sería mayoritariamente postraduccional, principalmente mediante el comportamiento antagónico de GPIHBP1 y ANGPTL4.

PALABRAS CLAVE: lipoproteína lipasa, proteína de unión a lipoproteína de alta densidad anclada a glicosilfosfatidilinositol 1, proteínas similares a angiopoyetinas, tejido adiposo epicárdico, enfermedad coronaria

antagonistic behavior of GPIHBP1 and ANGPTL4.

KEYWORDS: lipoprotein lipase, glycosylphosphatidylinositol anchored high density lipoprotein binding protein 1, similar angiopoietin proteins, epicardial adipose tissue, coronary artery disease

Recibido en septiembre de 2019 – Aceptado en septiembre de 2019
Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Correspondencia:
Prof. Dra. Gabriela Berg.
e-mail: gaberg@ffyb.uba.ar

INTRODUCCIÓN

La enfermedad cardiovascular (ECV), primera causa de muerte en el mundo occidental, constituye una de las afecciones crónicas no transmisibles más representativa, cuya prevalencia aumenta en forma continua debido a factores de riesgo cardiometabólicos ligados al estilo de vida actual. En los últimos años se ha propuesto al tejido adiposo epicárdico (TAE) como nuevo factor de riesgo independiente de ECV.¹ El TAE es un tipo de TA visceral, ubicado sobre el miocardio y alrededor de las arterias coronarias, metabólicamente activo, que produce distintas adipocitoquinas.² Dado que no existe fascia o tejidos similares que separen al TAE del miocardio y de los vasos coronarios, existiría una interacción directa entre estas estructuras, cuyas consecuencias sobre la salud cardiovascular aún son motivo de estudio. En trabajos previos hemos informado que el TAE de pacientes con enfermedad coronaria (EC) presenta mayor número de adipocitos más pequeños que el TA subcutáneo (TAS). Asimismo, hemos observado mayor actividad de metaloproteasas, enzimas responsables de degradar la matriz extracelular, en el TAE de pacientes con EC, en comparación con pacientes sin EC, asociado con mayor densidad vascular.³

Ha sido ampliamente demostrado que el aumento de volumen del TAE se correlaciona directamente con la aparición de placas ateroscleróticas^{4,5} y con la presencia de complicaciones metabólicas como la diabetes mellitus tipo 2^{6,7} consecuentemente, la expansión de este tejido determinaría mayor riesgo de EC. La expansión del TAE dependería, en parte,

del mayor flujo de ácidos grasos (AG) provenientes del catabolismo de las lipoproteínas ricas en triglicéridos (RLT) o de los AG libres circulantes. El catabolismo de las RLT en el TA es críticamente determinado por la acción de la lipoproteína lipasa (LPL), sin embargo, el mecanismo por el cual se regula la expresión y actividad de la LPL en los diferentes tejidos es aún controvertido, y en muchos aspectos, desconocido.^{8,9} Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que la actividad de la LPL se encuentra aumentada en el TAE de pacientes con EC, en comparación con el TAS, aun en situaciones de insulinorresistencia (IR).^{10,11}

Dada la importancia fisiológica de la LPL, esta se encuentra finamente regulada, tanto en su nivel transcripcional como postraduccional. Entre los principales reguladores positivos de la transcripción de la enzima podemos mencionar a los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR), expresados en la gran mayoría de los tejidos, de los cuales el PPAR-gamma es el de mayor importancia a nivel del TA. Por otro lado, como reguladores positivos de la actividad de la enzima cabe mencionar a la proteína de unión a lipoproteína de alta densidad anclada a glicosilfosfatidilinositol 1 (GPIHBP1), mientras que como reguladores negativos postraducionales se encuentran las proteínas similares a angiopoyetina (ANGPTL), de las cuales la de tipo 4 (ANGPTL-4) es la predominante en el TA. La GPIHBP1 es responsable, en parte, del anclaje no covalente al endotelio vascular de la LPL, necesario para su actividad enzimática.¹² Si bien aún no se encuentra completamente dilucidado, se conoce que la expresión de la GPIHBP1 se halla

bajo el control transcripcional de PPAR-gamma.¹³ Cabe destacar que la GPIHBP1 también funcionaría como una “plataforma” para la unión simultánea e interacción entre la LPL y las lipoproteínas circulantes,¹² así como la prevención de la LPL ante un plegamiento erróneo.¹⁴ La información actual respalda que es la GPIHBP1 la mayor responsable de la “captura” de las lipoproteínas ricas en TG de la circulación para acercarlas a la LPL para ser hidrolizadas, por lo que, entonces, es un activador clave de la enzima. Por su parte, la ANGPTL4 es una proteína de 50 kDa cuya expresión se encuentra bajo regulación transcripcional por los receptores PPAR, la cual, en el TA, se encuentra regulada por el PPAR-gamma;¹⁵ en consecuencia, sus niveles dependen de los niveles de los AG libres circulantes. Dado que el TA es uno de los principales productores de LPL y de ANGPTL4, se propone a este último como el principal y, casi específico, regulador negativo de la actividad de la enzima en este tejido.¹⁶ Hasta el momento se desconoce el comportamiento de dichos reguladores y su asociación con la expresión y actividad de la LPL en el TAE. Por tal motivo, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el comportamiento de la LPL y de sus principales reguladores tisulares (PPAR-gamma, GPIHBP1 y ANGPTL4) en el TAE de pacientes con EC.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sujetos

Se estudiaron pacientes adultos de ambos sexos, provenientes de la División de Cirugía Cardíaca del Hospital de Clínicas “José de San Martín”, bajo la dirección del Dr. Miguel Rubio. Se conformaron dos grupos de pacientes, uno con diagnóstico de EC derivado a cirugía de *bypass* (n = 50) y un grupo control (No EC, n = 30), constituido por pacientes con indicación de cirugía cardiovascular no coronaria (reemplazo valvular-plástica mitral) con arterias coronarias angiográficamente normales. Se recolectaron retrospectivamente los datos demográficos de factores de riesgo cardiovascular, medicación previa, datos clínicos, presión arterial, peso y altura, y se calculó el índice de masa corporal (IMC) como peso (kg)/altura² (m²) para evaluar el grado de obesidad, clasificándolos según correspondiera en: normopeso, IMC = 18.50 kg/m² y < 25 kg/m²; sobrepeso, IMC = 25 kg/m² y < 30 kg/m²,

y obeso, IMC ≥ 30 kg/m². Se registraron datos de tabaquismo y otras afecciones. Se consideraron criterios de exclusión para el estudio el consumo de más de 20 g/día de alcohol; la presencia de alteraciones tiroideas, renales o hepáticas; la cirugía cardiovascular previa; las infecciones concomitantes, y cualquier otra afección que pudiera interferir en los resultados. El protocolo fue oportunamente aprobado por el Comité de Ética del Hospital de Clínicas “José de San Martín”. Los pacientes firmaron el consentimiento informado correspondiente y se respetó la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial en su última versión.

Obtención de muestras

Se obtuvieron muestras de suero después de 12 horas de ayuno, antes de la cirugía. Durante la cirugía, antes de realizar el procedimiento quirúrgico correspondiente, se obtuvieron muestras de TAE (0.1-1.0 g) proveniente de la región superior del ventrículo derecho; paralelamente se obtuvieron muestras de TAS (≤ 2.0 g) de la región torácica. Las fracciones se conservaron en N₂ para las distintas determinaciones.

Procedimientos analíticos

En el suero de los pacientes se determinaron los niveles de glucemia, colesterol total, triglicéridos (TG), colesterol asociado con lipoproteínas de alta densidad (HDLc) y de baja densidad (LDLc) por métodos enzimático-colorimétricos de punto final (Roche Diagnostics GmbH, Alemania), y de apolipoproteína A-I (apoA-I) y apoB por inmunoturbidimetría (Tina Quant, Roche) en un autoanalizador Cobas C-501. Se calcularon los niveles de remanentes lipoproteicos (RLP) como CT - HDLc - LDLc. Se determinaron los niveles de AGL circulantes mediante un método enzimático manual (Randox, UK). Además, se determinó la insulina por quimioluminiscencia (Immulateautoanalyzer 2000, Siemens, LA, USA). Se calcularon los índices HOMA-IR ([glucosa mM] x [insulina mUI/l]/22.5)¹⁷ y TG/HDLc¹⁸ como indicadores secundarios de resistencia a la insulina.

La medida de la actividad TG-hidrolasa de la LPL se determinó por el método de Nilsson-Ehle,¹⁹ realizando previamente la extracción de la enzima del endotelio capilar del TA con *buffer* Krebs

Ringer con 2.5 UI de heparina. La actividad de la LPL se expresó como los moles de AG liberados por miligramo de tejido por hora.

La medida de la expresión de la LPL y de los reguladores enzimáticos tisulares se realizó por *Western blot* con anticuerpos específicos. Los niveles de expresión de cada proteína se expresaron como unidades relativas (UR) a la actina.

Análisis estadístico

Los datos se expresaron como media \pm desviación estándar (DE) o mediana (rango), según su distribución. Las diferencias entre los grupos se evaluaron utilizando la prueba de la *t* de Student o la prueba de Mann-Whitney, según la distribución de los datos. Los análisis de Pearson o Spearman, para variables paramétricas o no paramétricas, se utilizaron para evaluar las correlaciones entre los distintos parámetros. Se realizó análisis de covarianza (ANCOVA), ajustando por distintas variables de confusión. Para los diferentes análisis estadísticos se utilizaron el paquete estadístico SPSS 19.0 y el *software* GraphPadPrism 5.01. Se consideraron significativos valores de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Características generales de la población en estudio

Las características clínicas de la población estudiada se presentan en la Tabla 1. El grupo de pacientes con EC estuvo conformado por mayor cantidad de hombres que el grupo No EC. Asimismo, este grupo presentó mayor porcentaje de diabéticos, y el porcentaje de pacientes bajo tratamiento con metformina, estatinas o aspirina fue mayor que en el grupo No EC. En referencia al perfil bioquímico, los pacientes con EC tuvieron aumento significativo de los niveles de TG y glucosa y del índice TG/HDLc respecto del grupo No EC, y menores niveles de HDLc (Tabla 2).

Expresión y actividad de la LPL en el TAE y el TAS

No se observaron diferencias significativas en la expresión proteica de la LPL entre los grupos ni entre tejidos (TAE EC: 1.94 ± 1.17 UR, TAE No EC: 2.06 ± 1.19 UR, TAS EC: 2.58 ± 2.31 UR, TAS No

Tabla 1. Características clínicas de los pacientes estudiados.

	No EC n = 30	EC n = 50
Edad (años)	69 \pm 9	67 \pm 10
M/H	26/27	14/75 ¹
PAS (mm Hg)	126 \pm 21	133 \pm 19
PAD (mm Hg)	71 \pm 13	74 \pm 11
IMC (kg/m ²)		
Antecedentes (%)	28.1 \pm 5.3	27.4 \pm 3.7
HTA	74	69
Ex tabaquista	49	60
Diabetes	9	38 ²
Medicación (%)		
Metformina	3	28 ³
Insulina	5	10
Estatinas	50	74 ⁴
IECA	51	46
Betabloqueantes	51	68
Aspirina	27	79 ⁵

Resultados expresados como media \pm DE.

¹p = 0.001; ²p = 0.001; ³p = 0.010; ⁴p = 0.040; ⁵p < 0.001. Prueba de *chi* al cuadrado. M/H, mujeres/hombres; PAS, presión arterial sistólica; PAD, presión arterial diastólica; IMC, índice de masa corporal; HTA, hipertensión arterial; IECA, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina.

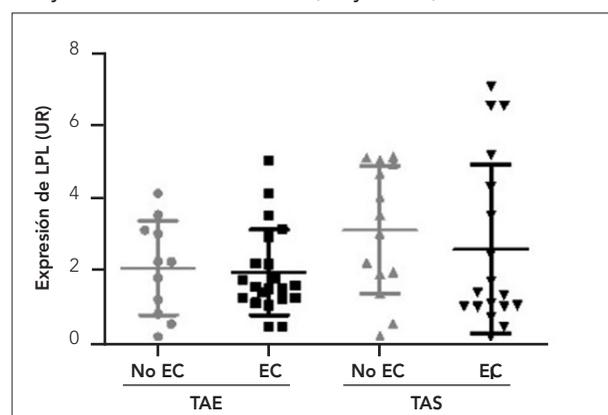
EC: 3.10 ± 1.75 UR, $p = ns$) (Figura 1). Sin embargo, la actividad de la LPL fue de 35.2 ± 13.4 μ mol AG/mg.h vs. 20.2 ± 10.7 μ mol AG/mg.h respectivamente ($p < 0.001$) (Figura 2), diferencia que se mantuvo significativa luego de ajustar por sexo ($F = 13.77$, $p < 0.001$), consumo de aspirina ($F = 9.68$, $p < 0.001$) y tratamiento con estatinas ($F = 10.11$, $p = 0.001$) o metformina ($F = 12.77$, $p < 0.001$). La actividad de la LPL en el TAE se asoció en forma inversa y significativa con los niveles de TG (No EC: $r = -0.302$, $p = 0.040$; EC: $r = -0.400$, $p = 0.040$) y con los RLP (No EC: $r = -0.245$, $p = 0.048$; EC: $r = -0.541$, $p = 0.020$). Por su parte, la actividad de la LPL en el TAE fue superior a la del TAS en ambos grupos estudiados (TAS EC: 7.5 ± 3.7 μ mol AG/mg.h, TAS No EC: 5.7 ± 2.9 μ mol AG/mg.h, $p < 0.001$ en ambos casos).

Tabla 2. Perfil bioquímico de la población estudiada.

	No EC n = 30	EC n = 50
Triglicéridos (mg/dl)	102 (34-252)	126 (57-284) ¹
Colesterol total (mg/dl)	157 (64-221)	153 (66-220)
LDLc (mg/dl)	103 (23-166)	115 (21-180)
HDLc (mg/dl)	37 ± 9	32 ± 8 ²
Colesterol No HDL (mg/dl)	120 (36-180)	131 (40-199)
RLPc (mg/dl)	12 (1-37)	17 (1-43)
ApoA-I (mg/dl)	105 ± 41	100 ± 26
ApoB (mg/dl)	75 ± 25	74 ± 22
AGL (mg/dl)	1.00 ± 0.50	1.20 ± 0.51
Glucemia (mg/dl)	96 (72-134)	106 (72-178) ³
Insulinemia (μUI/ml)	5.51 ± 3.43	6.15 ± 3.30
TG/HDLc	2.9 ± 1.3	4.1 ± 1.9 ⁴
HOMA-IR	1.27 (0.17-2.77)	1.67 (0.42-3.95)

Resultados expresados como media ± DE o mediana (rango), según distribución paramétrica o no paramétrica de los datos. ¹p = 0.041; ²p = 0.006; ³p = 0.040; ⁴p = 0.001 vs. No EC. Test de Student si la distribución es normal o test de Mann-Whitney si la distribución es no paramétrica. RLP, remanentes lipoproteicos; AGL, ácidos grasos libres; TG, triglicéridos; LDLc, colesterol asociado con lipoproteínas de baja densidad; HDLc, colesterol asociado con lipoproteínas de alta densidad.

Figura 1. Expresión de la lipoproteína lipasa (LPL) en el tejido adiposo epicárdico (TAE) y el TA subcutáneo (TAS) en pacientes con y sin enfermedad coronaria (EC y No EC).

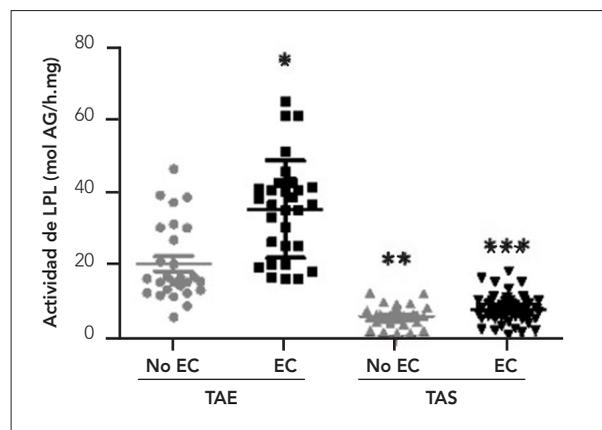


Los resultados se expresan como media ± DE. Test de la t de Student. UR, unidades relativas.

Expresión de reguladores enzimáticos tisulares

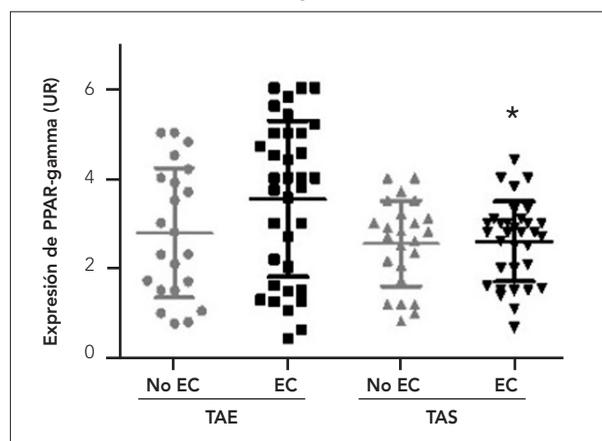
PPAR-gamma. Los niveles de PPAR-gamma no mostraron diferencias significativas entre los grupos en el TAE ni en el TAS (TAE EC: 3.54 ± 1.73

Figura 2. Actividad de la lipoproteína lipasa (LPL) en el tejido adiposo epicárdico (TAE) y el TA subcutáneo (TAS) en pacientes con y sin enfermedad coronaria (EC y No EC).



Los resultados se expresan como media ± DE. *p < 0.001 vs. TAE No EC, **,**p < 0.001 vs. TAS, Test de la t de Student.

Figura 3. Expresión de PPAR-gamma en el tejido adiposo epicárdico (TAE) y el TA subcutáneo (TAS) en pacientes con y sin enfermedad coronaria (EC y No EC).

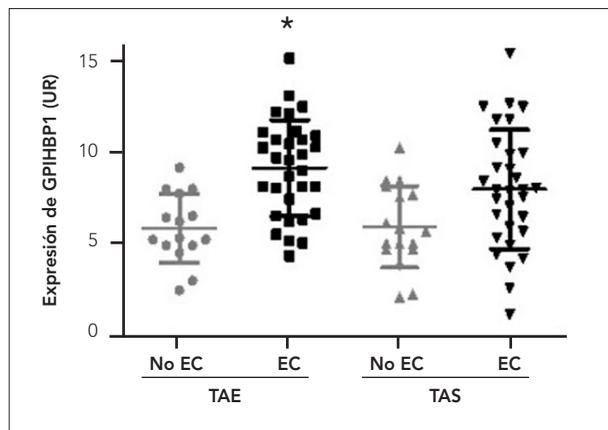


Los resultados se expresan como media ± DE. *p = 0.04 vs. TAE de EC. Test de la t de Student. UR, unidades relativas.

UR vs. TAE No EC: 2.78 ± 1.44 UR; TAS EC: 2.59 ± 0.89 UR vs. TAS No EC: 2.54 ± 0.95, UR). Por su parte, en el grupo EC, los niveles del regulador fueron superiores en el TAE comparado con el TAS (p = 0.040) (Figura 3). En el TAE, los niveles de PPAR-gamma se asociaron en forma directa y significativa con la actividad de la LPL (r = 0.539, p < 0.001), y esta asociación se mantuvo en ambos grupos (EC: r = 0.837, p = 0.005; No EC: r = 0.757, p < 0.001).

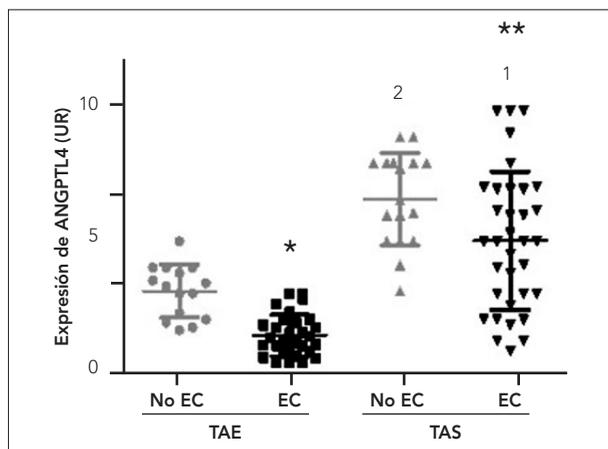
GPIHBP1. El TAE del grupo EC presentó aumento significativo de los niveles de GPIHBP1 respecto del grupo No EC (9.07 ± 2.60 UR vs. 5.82 ± 1.85 UR,

Figura 4. Expresión de la GPIHBP1 en el tejido adiposo epicárdico (TAE) y el TA subcutáneo (TAS) en pacientes con y sin enfermedad coronaria (EC y No EC).



Los resultados se expresan como media \pm DE.
* $p < 0.001$ vs. TAE de No EC. Test de la t de Student.
UR, unidades relativas.

Figura 5. Expresión de la ANGPTL4 en el tejido adiposo epicárdico (TAE) y el TA subcutáneo (TAS) en pacientes con y sin enfermedad coronaria (EC y No EC).



Los resultados se expresan como media \pm DE.
* $p = 0.005$ vs. TAE de No EC, ** $p = 0.032$ vs. TAS No EC, ¹ $p < 0.001$ vs. TAE EC,
² $p < 0.001$ vs. TAE No EC. Test de la t de Student.
UR, unidades relativas.

$p < 0.001$) (Figura 4), diferencia que se mantuvo significativa luego de ajustar por sexo ($F = 10.45$, $p < 0.001$), consumo de aspirina ($F = 3.83$, $p = 0.031$) y tratamiento con estatinas ($F = 3.69$, $p = 0.035$) o metformina ($F = 3.69$, $p = 0.035$). Por su parte, los niveles de GPIHBP1 en el TAE se vincularon en forma directa y significativa con la actividad de la LPL ($r = 0.306$, $p = 0.046$), asociación que se mantuvo significativa en cada grupo (EC: $r = 0.580$, $p = 0.014$; No EC $r = 0.568$, $p = 0.043$).

En el TAS, si bien los niveles del regulador fueron superiores en el grupo EC, las diferencias no

resultaron estadísticamente significativas (EC: 7.92 ± 3.21 UR vs. No EC: 5.91 ± 2.21 UR, $p = 0.060$).

ANGPTL4. Los niveles de ANGPTL4 disminuyeron significativamente tanto en el TAE como en el TAS del grupo EC, en comparación con el grupo No EC (TAE EC: 1.39 ± 0.79 UR vs. TAE No EC: 3.10 ± 1.01 UR, $p = 0.005$; TAS EC: 5.03 ± 2.65 UR vs. TAS No EC: 6.63 ± 1.77 UR, $p = 0.032$) (Figura 5). Todas estas diferencias se mantuvieron significativas luego de ajustar por sexo ($F = 21.15$, $p < 0.001$ en el TAE; $F = 3.10$, $p = 0.050$ en el TAS), consumo de aspirina ($F = 18.17$, $p < 0.001$ en el TAE; $F = 2.99$, $p = 0.048$ en el TAS) y tratamiento con estatinas ($F = 22.63$, $p < 0.001$ en el TAE; $F = 3.10$, $p = 0.050$ en el TAS) o metformina ($F = 19.57$, $p < 0.001$ en el TAE, $F = 3.16$, $p = 0.049$ en el TAS). A su vez, en ambos grupos de pacientes, los niveles de ANGPTL4 fueron inferiores en el TAE respecto del TAS ($p < 0.001$) (Figura 5). En el TAE, la expresión del regulador se asoció en forma inversa y significativa con la actividad de la LPL del tejido ($r = -0.705$, $p < 0.001$), asociación que se mantuvo en cada grupo (EC: $r = -0.475$, $p = 0.049$; No EC: $r = -0.669$, $p = 0.012$).

DISCUSIÓN

En estudios previos de nuestro laboratorio habíamos demostrado que la actividad de la LPL del TAE de pacientes con EC se encuentra aumentada al compararla con la de pacientes sin EC, así como con el TAS de ambos grupos.¹⁰ En esta oportunidad, profundizando en el estudio de este tejido, hemos evaluado el comportamiento de los principales reguladores de la LPL en el TAE en pacientes con y sin EC, y su asociación con los niveles y la actividad de la enzima. En primer lugar, hemos observado un aumento en la actividad de la LPL en el TAE de pacientes con EC, en comparación con pacientes sin EC, sin diferencias en su expresión proteica. Este hallazgo podría explicar parcialmente la asociación existente entre la expansión del TAE y la EC, dada por un aumento en el suministro de AG desde las lipoproteínas circulantes, y su asociación con distintos factores de riesgo cardiometabólicos como la obesidad, la IR y la hipertrigliceridemia.²⁰⁻²² Se propone que los AG suministrados provendrían del catabolismo de las lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) y de los RLP circulantes, dado que en trabajos previos hemos informado una

correlación inversa entre la actividad de la LPL del TAE y el contenido de TG de las VLDL,^{10,11} lo cual es concordante con la asociación inversa observada en el presente trabajo entre la actividad de la enzima y los niveles de RLP. Asimismo, las diferencias registradas en los parámetros evaluados entre el TAE y el TAS subrayan el comportamiento del TAE como un TA visceral.

La LPL es una enzima cuya regulación está dada tanto a nivel transcripcional como postraduccional. Entre los reguladores de expresión en el TA encontramos al PPAR-gamma, cuya expresión se altera en distintas enfermedades metabólicas.

Es además conocido que este factor de transcripción regula otras proteínas involucradas en el metabolismo lipídico, como las mismas GPIHBP1 y ANGPTL4.^{23,24} En el presente trabajo, la asociación directa que se verificó entre PPAR-gamma y la actividad de la LPL, no obstante su expresión conservada entre los grupos y la falta de asociaciones con los niveles proteicos de la enzima, sugiere que este factor modularía la expresión de otras proteínas involucradas en la regulación de la enzima. Estos resultados plantean nuevos interrogantes acerca del papel del PPAR-gamma en el TAE.

Con referencia al efecto modulador negativo de la ANGPTL4 sobre la LPL, su expresión ha sido previamente informada en distintos tipos de TA, así como su expresión génica en el TAE, sin diferencias entre pacientes con y sin EC;²⁵ sin embargo, sus niveles proteicos no habían sido evaluados en este tejido. En el presente trabajo, hemos observado un comportamiento antagónico entre los niveles proteicos de ANGPTL4 y la actividad de la enzima.²⁶ Dijk y col. encontraron previamente la misma asociación inversa en el TAS, sosteniendo el papel inhibitorio de ANGPTL4.²⁶ En este sentido, proponemos a la ANGPTL4 como un regulador clave en el comportamiento de la LPL del TAE en la EC.

Por su parte, los niveles de GPIHBP1, proteína de anclaje necesaria para la correcta actividad de la LPL, se encontraron aumentados en el TAE de los pacientes con EC, en comparación con sus respectivos controles, en concordancia con la actividad aumentada de la LPL en estos pacientes. La

expresión de este regulador no ha sido aún señalada en el TAE, y su comportamiento es controvertido en situaciones de IR en otros tejidos. Mientras algunos autores no demuestran cambios en la expresión de la GPIHBP1 en respuesta a la insulina,²⁷ otros informan una asociación inversa entre los niveles de ARN mensajero de la GPIHBP1 y el índice HOMA, la glucemia, la insulinemia y el IMC,²⁸ comportamiento similar al que presenta la LPL en la IR.²⁹ Estos resultados sostienen a la GPIHBP1 como otro factor importante involucrado en el aumento de la actividad de la LPL en el TAE de pacientes con EC.

CONCLUSIÓN

Es la primera vez que se informa la expresión y la actividad de la LPL en el TAE, junto con la expresión de tres de sus principales reguladores, ANGPTL4, GPIHBP1 y PPAR-gamma. El aumento en la actividad de la enzima en la EC, sin cambios en su expresión proteica, sugeriría que su regulación sería mayoritariamente postraduccional. Este aumento de actividad sería, en parte, responsable de la expansión del TAE en la EC, y la GPIHBP1 y la ANGPTL4, como reguladores enzimáticos, tendrían un papel crucial en el metabolismo de este tejido, por lo que podrían ser blanco de futuras terapias farmacológicas.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y a la Universidad de Buenos Aires por financiar el presente trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sacks HS, Fain JN. Human epicardial adipose tissue: a review. *Am Heart J* 153(6):907-917, 2007.
2. Mazurek T, Zhang L, Zalewski A, Mannion JD, Diehl JT, Arafat H, et al. Human epicardial adipose tissue is a source of inflammatory mediators. *Circulation* 108(20):2460-2466, 2003.
3. Miksztowicz V, Morales C, Barchuk M, López G, Póveda R, Gelpi R, et al. Metalloproteinase 2

- and 9 Activity Increase in Epicardial Adipose Tissue of Patients with Coronary Artery Disease. *Curr Vasc Pharmacol* 15(2):135-143, 2017.
4. Djaberi R, Schuijf JD, van Werkhoven JM, Nucifora G, Jukema JW, Bax JJ. Relation of epicardial adipose tissue to coronary atherosclerosis. *Am J Cardiol* 102:1602-1607, 2008.
 5. Oka T, Yamamoto H, Ohashi N, Kitagawa T, Kunita E, Utsunomiya H, Yamazato R, et al. Association between epicardial adipose tissue volume and characteristics of non-calcified plaques assessed by coronary computed tomographic angiography. *Int J Cardiol* 161(1):45-49, 2012.
 6. Wheeler GL, Shi R, Beck SR, Langefeld CD, Lenchik L, Wagenknecht LE, et al. Pericardial and visceral adipose tissues measured volumetrically with computed tomography are highly associated in type 2 diabetic families. *Investig Radiol* 10(26):40-97, 2005.
 7. Iacobellis G, Leonetti F. Epicardial adipose tissue and insulin resistance in obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 90:6300-6302, 2005.
 8. Zhang R. The ANGPTL3-4-8 model, a molecular mechanism for triglyceride trafficking. *Open Biol* 6(4), 2016.
 9. Dallinga-Thie GM, Kroon J, Borén J, Chapman MJ. Triglyceride-Rich Lipoproteins and Remnants: Targets for Therapy? *Curr Cardiol Rep* 18(7):67, 2016.
 10. Barchuk M, Miksztowicz V, López G, Fernández Tome MC, Rubio M, Schreier L, et al. Actividad de lipoproteína lipasa en el tejido adiposo epicárdico de pacientes con enfermedad coronaria: ¿Es determinante de la composición de las lipoproteínas de muy baja densidad circulantes?. *Rev Arg de Lípidos* 2(1):3-9, 2018.
 11. Barchuk M, Schreier L, López G, Cevy A, Baldi J, Fernandez Tomé MDC, et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein-binding protein 1 and angiopoietin-like protein 4 are associated with the increase of lipoprotein lipase activity in epicardial adipose tissue from diabetic patients. *Atherosclerosis* 288:51-59, 2019.
 12. Young SG, Davies BS, Voss CV, Gin P, Weinstein MM, Tontonoz P, et al. GPIHBP1, an endothelial cell transporter for lipoprotein lipase. *J Lipid Res* 52(11):1869-1884, 2011.
 13. Davies BS, Waki H, Beigneux AP, Farber E, Weinstein MM, Wilpitz DC, et al. The expression of GPIHBP1, an endothelial cell binding site for lipoprotein lipase and chylomicrons, is induced by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *MolEndocrinol* 22(11):2496-2504, 2008.
 14. Mysling S, Kristensen KK, Larsson M, Beigneux AP, Gårdsvoll H, Fong LG, et al. The acidic domain of the endothelial membrane protein GPIHBP1 stabilizes lipoprotein lipase activity by preventing unfolding of its catalytic domain. *Elife* 5:12095, 2016.
 15. Georgiadi A, Lichtenstein L, Degenhardt T, Boekschoten MV, van Bilsen M, Desvergne B, et al. Induction of cardiac Angptl4 by dietary fatty acids is mediated by peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta and protects against fatty acid-induced oxidative stress. *Circ Res* 106(11):1712-1721, 2010.
 16. Zhang R. The ANGPTL3-4-8 model, a molecular mechanism for triglyceride trafficking. *Open Biol* 6(4):150272, 2016.
 17. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28(7):412-419, 1985.
 18. McLaughlin T, Reaven G, Abbasi F, Lamendola C, Saad M, Waters D, et al. Is there a simple way to identify insulin-resistant individuals at increased risk of cardiovascular disease? *Am J Cardiol* 96:399-404, 2005.
 19. Nilsson-Ehle P, Ekman R. Rapid, simple and specific assay for lipoprotein lipase and hepatic lipase. *Artery* 3(3):194-209, 1977.
 20. Sironi AM, Gastaldelli A, Mari A, Ciociaro D, Positano V, Buzzigoli E, et al. Visceral fat in hypertension: influence on insulin resistance and beta-cell function. *Hypertension* 44:127-133, 2004.

21. Iacobellis G, Ribaldo MC, Assael F, Vecci E, Tiberti C, Zappaterreno A, et al. Echocardiographic epicardial adipose tissue is related to anthropometric and clinical parameters of metabolic syndrome: a new indicator of cardiovascular risk. *J Clin Endocrinol Metab* 88:5163-5168, 2003.
22. Mahabadi AA, Massaro JM, Rosito GA, Levy D, Murabito JM, Wolf PA, et al. Association of pericardial fat, intrathoracic fat, and visceral abdominal fat with cardiovascular disease burden: the Framingham Heart Study. *Eur Heart J* 30:850-856, 2009.
23. Blanchard PG, Turcotte V, Côté M, Gélinas Y, Nilsson S. Peroxisome proliferator-activated receptor γ activation favours selective subcutaneous lipid deposition by coordinately regulating lipoprotein lipase modulators, fatty acid transporters and lipogenic enzymes. *Acta Physiol* 217(3):227-239, 2016.
24. Davies BS, Waki H, Beigneux AP, Farber E, Weinstein MM, et al. The expression of GPIHBP1, an endothelial cell binding site for lipoprotein lipase and chylomicrons, is induced by peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Mol. Endocrinol* 22:2496-2504, 2008.
25. Jaffer M, Riederer P, Shah P, Peters F, Quehenberger, Wood A, et al. Expression of fat mobilizing genes in human epicardial adipose tissue. *Atherosclerosis* 220:122-127, 2012.
26. Dijk W, Schutte S, Aarts EO, Janssen IMC, Afman L, Kersten S. Regulation of angiotensin-like 4 and lipoprotein lipase in human adipose tissue. *J Clin Lipidol* 12(3):773-783, 2018.
27. Ruge T, Sukonina V, Kroupa O, Makoveichuk E, Lundgren M, Svensson M, et al. Effects of hyperinsulinemia on lipoprotein lipase, angiotensin-like protein 4, and glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein binding protein 1 in subjects with and without type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 61(5):652-660, 2012.
28. Surendran R, Udayyapan S, Clemente-Postigo M, Havik S, Schimmel A, et al. Decreased GPIHBP1 protein levels in visceral adipose tissue partly underlie the hypertriglyceridemic phenotype in insulin resistance. *PLoS One* 13(11):e0205858, 2018.
29. Miksztowicz V, Schreier L, McCoy M, Lucero D, Fassio E, Billheimer J, et al. Role of SN1 lipases on plasma lipids in metabolic syndrome and obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34(3):669-675, 2014.