

Lipasa endotelial versus lipoproteína lipasa: ¿enzimas antagónicas en la insulinorresistencia?

Verónica Miksztowicz*†, Diego Lucero*†, Mary McCoy‡, Eduardo Fassio‡, Jeffrey Billheimer*, Daniel J. Rader‡, Laura Schreier*, Gabriela Berg**

*Facultad de Farmacia y Bioquímica. Dpto. de Bioquímica Clínica. Laboratorio de Lípidos y Aterosclerosis. Instituto de Fisiopatología y Bioquímica Clínica. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina. †CONICET. Buenos Aires, Argentina. ‡Institute for Translational Medicine and Therapeutics, School of Medicine, Universidad de Pensilvania, EE.UU. *Departamento de Gastroenterología, Hospital Nacional Prof. A. Posadas. Buenos Aires, Argentina.

Introducción y objetivos: La lipoproteína lipasa (LPL) y la lipasa endotelial (LE) están involucradas en el metabolismo lipoproteico, principalmente de las lipoproteínas de muy baja densidad (*very low-density lipoprotein*, VLDL) y las lipoproteínas de alta densidad (*high-density lipoprotein*, HDL), respectivamente. El comportamiento de LPL en insulinorresistencia (IR) es controversial, y de LE es prácticamente desconocido. Nuestro objetivo fue evaluar la actividad de LE y de LPL en individuos con síndrome metabólico (SM) y con distintos grados de obesidad, y su relación con el perfil lipídico-lipoproteico e inflamatorio.

Métodos: Se determinó la actividad de LE y LPL en 59 pacientes con SM y 36 individuos control (sin SM) por un método cromogénico y radiométrico, respectivamente.

Resultados: En el grupo con SM, la actividad de LE mostró una tendencia a estar aumentada respecto del grupo sin SM, mientras que se incrementó significativamente en el grupo con obesidad respecto del grupo normopeso ($p=0.009$) y en pacientes con IR severa ($p<0.05$). LE se asoció negativamente con colesterol HDL ($p=0.002$) y con apolipoproteína A-I ($p=0.043$). LPL se encontró disminuida en SM ($p<0.001$) y en sobrepeso y obesidad ($p=0.015$ y $p=0.004$, respectivamente) respecto del grupo normopeso. LPL se asoció negativamente con el tamaño ($p=0.001$) y el contenido de triglicéridos de VLDL ($p=0.001$). Ambas enzimas se asociaron con HOMA-IR (*Homeostasis Model Assessment for Insulin Resistance*) y con adiponectina.

Conclusión: El aumento en la actividad de LE y la disminución en la actividad de LPL sería parcialmente responsable de las alteraciones lipídicas-lipoproteicas características del SM y de la obesidad. El impacto de la IR en la actividad de las enzimas lipolíticas determinaría su comportamiento y las modificaciones lipoproteicas observadas.

PALABRAS CLAVE: Lipasa endotelial, lipoproteína lipasa, síndrome metabólico, obesidad.

INTRODUCCIÓN

La obesidad y el síndrome metabólico (SM) aumentan el riesgo de enfermedad cardiovascular (ECV), principal causa de muerte en el mundo occidental¹. Debido principalmente a modificaciones en el perfil lipídico-lipoproteico, que incluyen hipertrigliceridemia, bajos niveles de colesterol de lipoproteínas de alta densidad (*high-density lipoprotein*, HDL) y aumento en los niveles de lipoproteínas de baja densidad (*low-density lipoprotein*, LDL) pequeñas y densas (LDL_{pyd}). Estas alteraciones, características de los estados de insulinorresistencia (IR) son consecuencia, principalmente, de la obesidad abdominal; sin embargo, debe considerarse que el aumento en el índice de masa corporal (IMC) no siempre es reflejo de IR.

El perfil lipoproteico alterado observado en pacientes con IR podría deberse, en parte, a cambios en el comportamiento de las enzimas lipolíticas. La familia de las SN¹ lipasas está constituida por la lipoproteína lipasa (LPL), la lipasa hepática (LH) y la lipasa endotelial (LE), involucradas en el metabolismo lipoproteico². Estas enzimas derivan de un mismo gen ancestral, sin embargo, se expresan en distintos tejidos y actúan sobre diferentes sustratos lipoproteicos, indicando que habrían evolucionado hacia roles específicos diferentes³. LH y LE se encuentran ancladas al endotelio vascular a través del heparán sulfato, y a través de la proteína de

Recibido en marzo de 2017 - Aceptado en marzo de 2017
Conflictos de interés: ninguno

Correspondencia
Email: gaberg@ffyba.uba.ar

unión GPIHBP1 (*glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1*) la LPL⁴. Su principal función es la hidrólisis de los triglicéridos (TG) y los fosfolípidos (FL) de las lipoproteínas circulantes en la posición SN1. Las tres lipasas tienen actividad TG-hidrolasa y fosfolipasa, sin embargo, la LPL es principalmente TG-hidrolasa y la LE actúa fundamentalmente como fosfolipasa, mientras que la LH tiene actividad intermedia². La LPL y la LH han sido ampliamente estudiadas en pacientes con distintos grados de IR y de obesidad⁵⁻⁷, reportándose disminución en la actividad de LPL, asociada a hipertrigliceridemia y HDL disminuida, y aumento en la actividad de LH, asociado a aumento en los niveles de LDL_{pyd}. No obstante, hasta el momento, en IR y obesidad el comportamiento de LE es prácticamente desconocido.

Distintos estudios *in vitro* e *in vivo* sugieren que LE estaría involucrada en el metabolismo de la HDL. Estudios en animales transgénicos que sobreexpresan LE muestran una reducción significativa en los niveles de colesterol HDL, mientras que la inhibición *in vivo* de la actividad enzimática en animales se asocia con incremento de los niveles de colesterol HDL y apolipoproteína A-I (apoA-I)⁸. Sin embargo, su rol fisiológico no se encuentra claramente dilucidado. Estudios en ratones mostraron niveles detectables de ARNm de LE en tejido adiposo solo en ausencia de LPL, sugiriendo que la expresión de LE sería una vía alternativa para el aporte de ácidos grasos como fuente de energía a los tejidos en ausencia de LPL⁹. El objetivo de nuestro trabajo fue evaluar la relación entre la actividad de LE y de LPL en el plasma post-heparínico de individuos con distintos grados de IR y obesidad, y su relación con el perfil lipídico-lipoproteico.

MÉTODOS

Sujetos

Se estudió a 59 pacientes de ambos sexos con diagnóstico de SM (con SM) según ATP-III (*National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III*)¹⁰, atendidos en la Unidad de Hepatología del Hospital Nacional Prof. Alejandro Posadas (Buenos Aires, Argentina). Todos los pacientes presentaron esteatosis hepática diagnosticada por ultrasonografía abdominal y confirmada por biopsia hepática. Paralelamente, se reclutó a 36 individuos sanos, de ambos sexos, como grupo control (sin SM). En todos ellos se descartó esteatosis hepática por ultrasonografía.

Se excluyó a los pacientes que consumían más de 15 g alcohol/día, y a aquellos que presentaron diabetes, ECV previa, neoplasias, disfunción hepática, tiroidea o enfermedades infecciosas agudas, insuficiencia renal aguda, o individuos seropositivos para hepatitis B o C. Ninguno de los sujetos se encontraba bajo tratamiento con esteroides, fármacos inmunosupresores, estrógenos, amiodarona o fármacos que induzcan hígado graso o que afecten el metabolismo lipídico.

Todos los sujetos incluidos brindaron su consentimiento informado para la realización de los diferentes estudios, y se respetó la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial en su última versión. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires y del hospital correspondiente.

En todos los pacientes y controles se midió con ropas livianas y sin calzado el peso y la altura, y se calculó el IMC como peso (kg)/altura (m²) para evaluar el grado de obesidad. La circunferencia de cintura se midió entre la costilla del margen lateral inferior y la cresta ilíaca superior anterior, en posición vertical, procedimiento siempre efectuado por el mismo investigador. Se midió la tensión arterial con los sujetos sentados, luego de un período de reposo de 10 minutos.

Según el IMC, los individuos fueron divididos según el grado de obesidad en las siguientes categorías: normopeso ([NP] IMC entre 18.5 y 24.9 kg/m²) (n=27); sobrepeso ([SP] IMC entre 25.0 y 29.9 kg/m²) (n=20); y obeso ([OB] IMC ≥30.0 kg/m²) (n=48).

Muestras

Luego de 12 horas de ayuno se obtuvieron muestras de sangre por punción venosa. El suero se conservó a 4°C para la determinación de enzimas hepáticas, glucosa y el perfil lipídico-lipoproteico o fue almacenado a -70 °C para la posterior determinación de niveles de insulina, ácidos grasos libres (AGL), adiponectina, proteína C reactiva (PCR) y para el aislamiento de lipoproteínas de muy baja densidad (*very low-density lipoprotein*, VLDL).

Para la medida de la actividad de LE y LPL, luego de la primera toma de muestra, se administró heparina intravenosa (60 UI/Kg de peso) y luego de 10 minutos se obtuvo sangre por punción venosa del brazo contralateral y se recogió en tubos sumergidos en hielo. El plasma post-heparínico (PPH) se separó por

centrifugación a 3.000 rpm y 4°C por 10 minutos, y se almacenó en alícuotas a -70°C hasta su procesamiento.

Determinaciones analíticas

En suero se determinaron las enzimas hepáticas aspartato-aminotransferasa (AST), alanina-aminotransferasa (ALT) y gamma glutamil transpeptidasa (γ GT), colesterol total, TG y glucosa por métodos enzimáticos colorimétricos estandarizados (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) en un autoanalizador Cobas C-501. El coeficiente de variación (CV) intraensayo fue <1.9% y el interensayo <2.4% en todos los parámetros.

El colesterol HDL y colesterol LDL se determinaron por métodos estandarizados de precipitación selectiva, usando ácido fosfotúngstico/Cl₂Mg y polivinilsulfato como reactivos precipitantes, CV intraensayo <2.0% y CV interensayo <3.0%.

Los niveles séricos de apoA-I y B-100 (apoB) se midieron por inmunoturbidimetría, con métodos estandarizados (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) en autoanalizador, CV intraensayo <1.9% e interensayo <2.5% para ambos parámetros.

Los niveles de AGL fueron determinados en suero por un método enzimático-colorimétrico (Randox Laboratorios, Reino Unido), y los niveles de insulina con Immulite/Immulite 1000 Insulin (Siemens, Estados Unidos), CV intraensayo <2.6% y CV interensayo <3.9% para ambos parámetros. El grado de IR de controles y pacientes fue estimado calculando los índices HOMA-IR (*Homeostasis Model Assessment for Insulin Resistance*)¹¹, y el índice TG/colesterol HDL¹². La concentración sérica de adiponectina fue determinada por ensayo inmunoenzimático (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) con anticuerpos monoclonales específicos (R&D Systems, Minneapolis, MN). Se determinó la concentración sérica de PCR como marcador de inflamación mediante un método inmunoturbidimétrico de alta sensibilidad Tinaquant CRP (Latex), (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) en un autoanalizador Cobas C-501. CV intraensayo <1.3% y CV interensayo <2.5%.

Separación y caracterización de VLDL

La separación de la VLDL [densidad (d) <1.006 g/ml] se llevó a cabo por ultracentrifugación secuencial preparativa en una ultracentrífuga Beckman

XL-90. rotor modelo 90 Ti, a 105.000 x g, durante 18 horas, a 15°C.

En VLDL se determinó contenido en TG y colesterol tal como se describió previamente, FL según el método de Bartlett¹³ y proteínas (PT) según el método de Lowry¹⁴. Se calcularon los índices TG/PT para estimar el tamaño de VLDL¹⁵ y colesterol/TG para estimar el tipo de VLDL. Los resultados se expresaron como % de cada componente de VLDL.

El tamaño de las VLDL se determinó por HPLC (cromatografía líquida de exclusión molecular [*high-performance liquid chromatography*]). Las VLDL aisladas se inyectaron en una columna SK-Gel Lipopropack XL, 7.8 mm ID x 30 cm (Tosoh, Japón) y se separaron usando como fase móvil buffer Tris acetato 0.05 mol/l (pH 8.0) conteniendo acetato de sodio 0.3 M, azida sódica 0.05% y 0.005 Brij-35. El eluato de la columna fue monitoreado a 280 nm. Para la conversión del tiempo de elución en el diámetro de partícula, se utilizó una curva estándar, de partículas de látex de 100 nm de diámetro (Fluka, Sigma-Aldrich) y de 27 y 39 nm de diámetro (MagsphereINC).

Actividad de enzimas lipolíticas

La actividad de LPL en el PPH fue determinada según el método de Nilsson-Ehle¹⁶, mediante la medida de ácido oleico producido por la hidrólisis enzimática de una emulsión conteniendo [3H]-trioleína (Amersham TRA191, Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido), trioleína fría (Sigma T-7140), L- α -lisofosfatidilcolina (Sigma Aldrich, Estados Unidos), 4% de albúmina (Sigma A-6003), 10% v/v de suero humano como fuente de apolipoproteína C-II (apoC-II) en buffer Tris-HCl 0.2 M pH 8.0. La emulsión se incubó a 37°C con el PPH para determinar la actividad lipolítica total y, simultáneamente, con el PPH y NaCl 1M como inhibidor de la LPL. Los AG liberados se separaron por una extracción selectiva con buffer Carbonato-Borato, pH 10.5¹⁷. La masa de ácido oleico-[3H] liberado por acción de la enzima fue cuantificada utilizando un Analizador de Centelleo Líquido (Packard TRI-CARB 2100; Packard Instruments, Meridian, CT). La actividad de LPL se determinó según la diferencia entre la actividad lipolítica total y la actividad lipolítica en presencia de NaCl 1M. Los resultados se expresaron como μ moles de AG liberados por ml de PPH por hora.

La actividad fosfolipásica de LE se determinó mediante método cromogénico descrito previamente¹⁸. Brevemente, la actividad total SN1 fosfolipásica se determinó usando 1-decanoil-2-desoxi-2-decanoilglicero-3-fosforil etilenglicol (ThioPEG, Avanti) como sustrato. A una emulsión de ThioPEG 4 mM se le agregó ácido 5.5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) 271 mM (Sigma Aldrich, Estados Unidos) en dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich, Estados Unidos) en cantidad adecuada para obtener un sustrato cromogénico de relación 1:1. La actividad fosfolipásica total se determinó midiendo la mezcla de PPH con el sustrato cromogénico a 37°C y 412 nm durante 30 minutos en un espectrofotómetro Molecular Devices Spectra Max 250. Simultáneamente, el PPH fue preincubado en hielo, durante 15 minutos, con NaCl 1M de concentración final, como inhibidor de la actividad de la LE. Luego se agregó el sustrato cromogénico y se leyó, a 37°C y 412 nm. La absorbancia medida es directamente proporcional a la liberación de un AG por hidrólisis de una molécula de ThioPEG. La actividad de LE se determinó según la diferencia entre la actividad lipolítica total y la actividad lipolítica en presencia de NaCl 1M. Los resultados se expresaron en μmol de AG liberados por ml de PPH por hora.

Análisis estadístico

Las diferencias entre los grupos con y sin SM se establecieron por medio de test paramétricos y no paramétricos, según la distribución de los datos, utilizando el test T de Student, test U de Mann-Whitney o test X^2 , respectivamente. Para evaluar la distribución de las variables se utilizó el test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov. Para comparar los parámetros según grado de obesidad y de IR, se utilizó el test de ANOVA (*analysis of variance*) (de los datos previamente logaritmizados cuando correspondiera) y de Scheffé como test *a posteriori*. Los resultados fueron expresados y/o graficados como media \pm DE (desvío estándar) para aquellos datos con distribución normal y como mediana (rango) para los datos no paramétricos. Las correlaciones entre variables se determinaron utilizando los test de Pearson o Spearman dependiendo de la distribución de los datos. Cuando fue necesario, se efectuó análisis de covarianza (*analysis of covariance*, ANCOVA), ajustando por variables distractoras como la edad y el género, entre otras. Se realizó análisis de regresión lineal para identificar correlaciones independientes entre variables. Previamente, se evaluó la distribución de las variables y aquellas con distribución no normal

fueron transformadas en sus logaritmos. Se utilizó el programa SPSS 19.0 (Chicago, IL). Las diferencias se consideraron significativas con un $p < 5\%$.

RESULTADOS

Características de la población estudiada

Las características clínicas y bioquímicas de ambos grupos se observan en la Tabla 1. Los pacientes con SM fueron de mayor edad y presentaron mayor IMC y circunferencia de cintura que el grupo sin SM ($p < 0.001$). Con respecto al perfil lipídico-lipoproteico, los pacientes con SM presentaron un aumento significativo en los niveles séricos de TG ($p < 0.001$), colesterol total ($p = 0.042$), colesterol LDL ($p < 0.001$) y apoB ($p = 0.002$), y disminución significativa en los niveles séricos de colesterol HDL y de apoA-I ($p < 0.001$).

Tabla 1. Características clínicas y bioquímicas

	Sin SM (n=36)	Con SM (n=59)	p
Edad (años)	35 \pm 14	48 \pm 11	0.001
H/M*	20/16	43/16	NS
IMC (kg/m ²)	23.5 \pm 2.7	34.2 \pm 5.9	0.001
Cintura (cm)	81.5 \pm 11.6	105.3 \pm 10.1	0.001
TG (mg/dl)	86 (39-261)	186 (92-487)	0.001
Colesterol total (mg/dl)	180 (126-292)	199 (138-312)	0.042
Colesterol LDL (mg/dl)	114 \pm 40	141 \pm 35	0.001
Colesterol HDL (mg/dl)	59 \pm 17	41 \pm 9	0.001
ApoA-I (mg/dl)	170 \pm 36	144 \pm 30	0.001
ApoB-100 (mg/dl)	90 \pm 30	111 \pm 30	0.007
AST (U/l)	20 \pm 10	29 \pm 20	NS
ALT (U/l)	24 \pm 15	55 \pm 27	0.037
AST/ALT	0.8 \pm 0.6	0.5 \pm 0.4	0.017
γ GT (U/l)	20 \pm 14	55 \pm 37	0.048
Glucosa (mg/dl)	88 (70-104)	99 (80-127)	0.001
Insulina (μ U/ml)	5.4 (2.0-17.0)	11.0 (2.0-70.0)	0.001
HOMA-IR	1.24 (0.37-3.6)	2.50 (0.54-20.6)	0.001
TG/colesterol HDL	1.7 (0.5-7.9)	4.4 (2.1-16.2)	0.001
AGL (mmol/l)	0.5 (0.1-0.8)	0.6 (0.3-1.1)	0.011
Adiponectina (μ g/ml)	12.3 (4.8-28.3)	5.6 (1.9-20.6)	0.001
PCR-us (mg/l)	1.3 (0.1-11.7)	3.1 (0.3-29.7)	0.001

Los datos se expresan como media \pm DE (desvío estándar) o mediana (rango) (Test-T de Student) o mediana (rango) (Test-U Mann-Whitney) según distribución. *Test X^2 .

Referencias: AGL, ácidos grasos libres; ALT, alanina-aminotransferasa; ApoA-I, apolipoproteína A-I; ApoB-100, apolipoproteína B-100; AST, aspartato-aminotransferasa; γ GT, gamma glutamil transpeptidasa; H/M, hombres/mujeres; HDL, lipoproteínas de alta densidad (*high-density lipoprotein*); HOMA-IR, *homeostasis model assessment-estimated insulin resistance*; IMC, índice de masa corporal; LDL, lipoproteínas de baja densidad (*low-density lipoprotein*); NS, no significativo; PCR, proteína C reactiva ultrasensible; SM, síndrome metabólico; TG, triglicéridos.

Al evaluar los marcadores de IR y de inflamación, como era de esperarse, en el grupo con SM se observaron mayores niveles de glucosa, insulina, índice HOMA-IR,

TG/colesterol HDL, AGL y de PCR-us (ultrasensible) ($p<0.001$), así como disminución en los niveles de adiponectina ($p<0.001$) con respecto al grupo sin SM (Tabla 1). Los pacientes con SM presentaron VLDL de mayor tamaño ricas en TG en comparación con el grupo sin SM (Tabla 2).

Tabla 2. Características de las VLDL de los individuos con y sin síndrome metabólico

	Sin SM (n=36)	Con SM (n=59)	p
TG-VLDL (%)	49±12	56±6	0.018
Colesterol VLDL (%)	13±3	14±3	NS
PT-VLDL (%)	14±4	16±4	NS
FL-VLDL (%)	18±4	14±4	0.002
TG/PT-VLDL	2.8±1.5	3.9±1.8	0.005
colesterol/TG-VLDL	0.26±0.06	0.26±0.07	NS
TG/apoB	6.2±2.8	11.7±4.7	0.001
VLDL grandes (%)	7.8 (1.0-21.9)	33.5 (1.2-72.9)	0.010

Los datos se expresan como media±DE (desvío estándar) o mediana (rango). Referencias: ApoB, apolipoproteína B; FL, fosfolípidos; HDL, lipoproteínas de alta densidad (*high-density lipoprotein*); LDL, lipoproteínas de baja densidad (*low-density lipoprotein*); NS, no significativo; PT, proteínas; SM, síndrome metabólico; TG, triglicéridos; VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad (*very low-density lipoprotein*).

Actividad de LE

En el grupo con SM se observó un aumento en la actividad de LE respecto del grupo sin SM, aunque dicho aumento no llegó a ser significativo (Figura 1A). No hubo diferencias significativas en la actividad enzimática entre hombres y mujeres: 1.25 (0.29-3.06) versus 1.0 (0.09-2.53) $\mu\text{mol AGL/ml PPH.h}$; $p=0.330$.

La actividad de LE no se asoció con la edad ($r=-0.167$; $p=0.147$) ni con la circunferencia de cintura ($r=0.183$; $p=0.126$). Dada la asociación directa con el IMC ($r=0.291$; $p=0.01$), se analizó el comportamiento de la enzima según el grado de obesidad de los individuos. La actividad de LE fue significativamente mayor en el grupo OB en comparación con NP ($p=0.009$) (Figura 1B), incluso luego de ajustar por edad y género ($F=6.9$; $p=0.004$ y $F=4.8$; $p=0.01$, respectivamente).

Por otro lado, la actividad de la LE correlacionó inversamente con el colesterol HDL ($r=-0.35$; $p=0.002$) (Figura 1C) y apoA-I ($r=-0.24$; $p=0.043$), sugiriendo su posible rol en el catabolismo de HDL.

Con respecto a los marcadores de IR, se observó que la actividad de LE se asoció positivamente con insulina ($r=0.26$; $p=0.034$) y con HOMA-IR ($r=0.28$; $p=0.022$) y TG/colesterol HDL ($r=0.25$; $p=0.034$), mientras que se asoció negativamente con adiponectina ($r=-0.25$; $p=0.05$). Mediante un análisis de regresión

múltiple, se evaluó el efecto de la IR sobre la asociación encontrada entre la actividad de LE y adiponectina, observándose que la correlación entre ambas variables se pierde luego de corregir por HOMA-IR, proponiendo a la IR como mejor predictor del comportamiento de LE: $\beta=0.33$; $p=0.023$.

Finalmente, dada la correlación hallada entre la actividad de LE y HOMA-IR, y debido a que no se encontraron diferencias significativas en la actividad de la enzima entre el grupo con y sin SM, se categorizó a los individuos según el percentil (P) HOMA-IR. Los percentiles se definieron entre los siguientes rangos de valores: P1: ≤ 1.02 ; P2: 1.03-1.76; P3: 1.77-3.30; y P4: ≥ 3.31 . Aquellos individuos con mayor grado de IR (P4) presentaron aumento significativo de actividad de LE con respecto a los individuos con menor grado de IR (P1) ($p<0.05$) (Ver Figura 1D).

Actividad de LPL

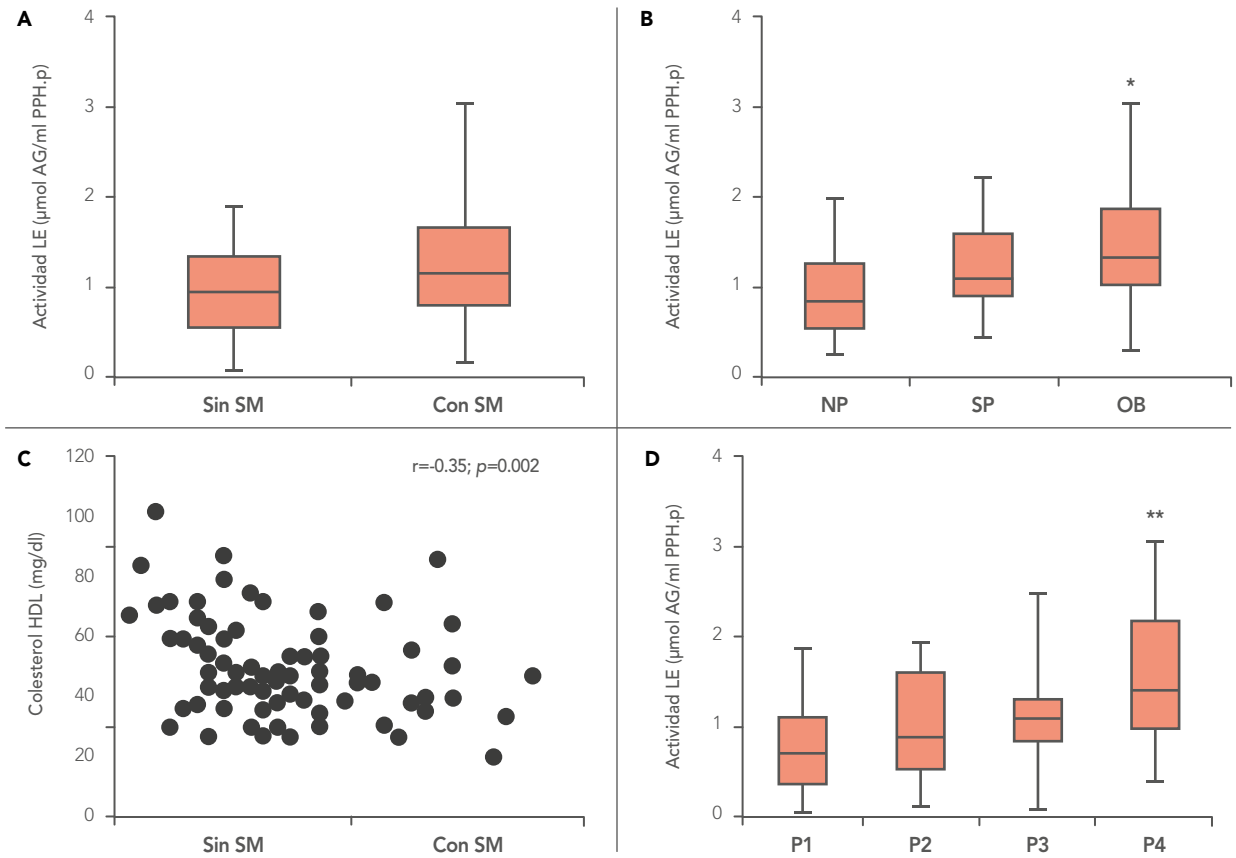
El grupo con SM presentó menor actividad de LPL que el grupo sin SM ($p<0.001$; Ver Figura 2A), incluso luego de ajustar por edad ($F=10.7$; $p=0.002$) y género ($F=12.1$; $p=0.001$). No se observó diferencia entre hombres y mujeres: 0.99 (0.26-1.55) versus 1.15 (0.04-2.58) $\mu\text{mol AG/ml PPH.h}$, $p=0.160$, y no se asoció con la edad ($r=-0.171$; $p=0.173$).

Al evaluar la actividad de la enzima según el grado de obesidad se observó una disminución significativa en su actividad en los grupos SP ($p=0.015$) y OB ($p=0.004$) respecto de NP (Ver Figura 2B), aun luego de ajustar por edad ($F=5.9$; $p=0.004$) y género ($F=6.6$; $p=0.002$).

A su vez, la actividad de LPL correlacionó inversamente con el contenido de TG ($r=-0.49$; $p=0.001$) y con el tamaño de VLDL ($r=-0.48$; $p=0.001$), indicado por el índice TG/PT.

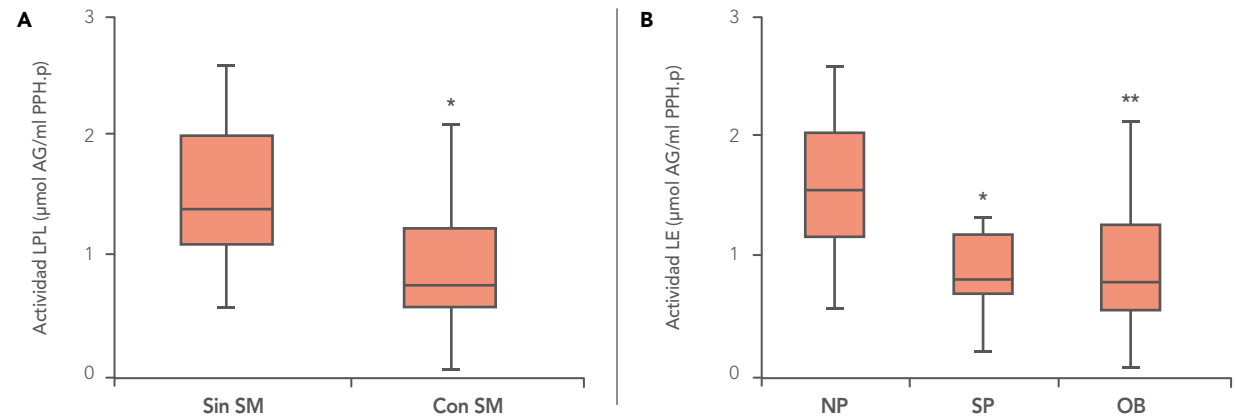
Con respecto a los marcadores de IR, la actividad de LPL correlacionó negativamente con insulina ($r=-0.30$; $p=0.024$), HOMA-IR ($r=-0.31$; $p=0.019$) y TG/colesterol HDL ($r=-0.38$; $p=0.002$) y con AGL ($r=-0.28$; $p=0.049$), mientras que correlacionó directamente con adiponectina ($r=0.38$; $p=0.003$). Esta última asociación se mantuvo luego de corregir por IMC: $\beta=0.31$ ($p=0.01$), por circunferencia de cintura: $\beta=0.25$ ($p=0.04$) y HOMA-IR: $\beta=-0.35$ ($p=0.02$), sugiriendo que estas variables no condicionarían la relación entre adiponectina y la actividad de LPL.

Figura 1.



Actividad de lipasa endotelial (LE) en: A) Sin síndrome metabólico (SM) y con SM; B) Diferentes grados de obesidad: normopeso (NP), sobrepeso (SP) y obeso (OB); C) Relación entre colesterol de lipoproteínas de alta densidad (*high-density lipoprotein*, HDL) y actividad de LE; D) Diferentes grados de IR según percentil (P) de índice HOMA-IR *homeostasis model assessment-estimated insulin resistance*: P1 (≤ 1.02); P2 (entre 1.03 y 1.76); P3 (entre 1.77 y 3.30); P4 (≥ 3.31). *NP versus OB; $p = 0.009$ y **P1 versus P4; $p < 0.05$.

Figura 2.



Actividad de lipoproteína lipasa (LPL) en: (A) Sin síndrome metabólico (SM) y con SM; B) Diferentes grados de obesidad: normopeso (NP), sobrepeso (SP) y obeso (OB). *Con SM versus sin SM; $p < 0.001$; *SP versus NP; $p = 0.015$ y **OB versus NP; $p = 0.004$.

DISCUSIÓN

En este trabajo presentamos el comportamiento inverso de LE y LPL y su asociación con el perfil lipoproteico y marcadores de IR e inflamación en plasma humano de pacientes con distintos grados de IR y obesidad. Es bien sabido que la obesidad y la IR son principales contribuyentes a la ECV, fundamentalmente debido a alteraciones lipídicas-lipoproteicas como hipertrigliceridemia y disminución de colesterol HDL. Según nuestro estudio, la actividad de LE aumenta con el grado de obesidad y de IR, asociado con disminución en los niveles de colesterol HDL y apoA-I, en concordancia con los resultados de Badellino y colaboradores, quienes reportaron que la concentración plasmática de LE se asocia directamente con marcadores de obesidad, como el IMC y la circunferencia de cintura en individuos sanos¹⁹. En parte, esta asociación entre LE y obesidad podría atribuirse al estado de IR, corroborado en nuestro estudio por la asociación encontrada con el índice HOMA-IR y por el aumento de actividad de LE observado en los individuos con mayor grado de IR.

Asimismo, estudios en pacientes con SM¹⁹ y obesidad²⁰ han reportado aumento en la expresión de LE, asociado con disminución en la concentración de HDL. En este estudio hemos observado un aumento, aunque no estadísticamente significativo, en la actividad de LE en pacientes con SM en comparación con controles.

Hasta el momento son escasos los estudios que describen posibles mecanismos de regulación de la LE. Estudios *in vitro* en cultivo de células endoteliales de arteria coronaria humana han reportado que el factor de necrosis tumoral alfa (*tumor necrosis factor- α* , TNF- α) podría estimular la secreción de LE, y que esta regulación sería atenuada por la acción de la adiponectina²¹. Pese a que, según nuestros resultados, la IR sería el mejor predictor del comportamiento de LE, es importante destacar la asociación inversa encontrada con adiponectina, ya que podría sugerirse una posible regulación indirecta de esta adipocitoquina a través de la inhibición del TNF- α . Se requiere la realización de nuevos estudios para poder dilucidar la regulación de LE. Con respecto a su acción sobre las lipoproteínas, la correlación negativa observada entre LE y colesterol HDL y apoA-I, confirmaría el rol de esta enzima en el remodelamiento de la HDL, contribuyendo a la disminución de sus niveles en situaciones de IR.

Con respecto a LPL, observamos una disminución significativa de su actividad en los individuos con SM, asociada a la hipertrigliceridemia característica de estos pacientes. En individuos con SM se ha observado menor masa de LPL en plasma preheparínico al aumentar el número de componentes del síndrome, lo que podría reflejar la severidad del SM⁵. A su vez, la masa de LPL se encontró asociada negativamente con el IMC²² y con HOMA-IR²³. En nuestro estudio, reportamos una disminución significativa en la actividad de LPL en los individuos con sobrepeso y obesidad. Estudios previos han mostrado que la expresión y actividad de LPL en PPH es menor en individuos obesos diabéticos, respecto de individuos obesos sin diabetes y controles²⁴. Más aún, se ha reportado disminución en la expresión del gen de LPL en el tejido adiposo (TA) visceral de individuos con obesidad mórbida respecto de individuos obesos, y en ambos respecto de individuos delgados²⁵. La disminución en la actividad de LPL plasmática justificaría la acumulación de VLDL grandes y ricas en TG en SM. Estas VLDL modificadas constituyen un mejor sustrato para la enzima, tal como hemos demostrado previamente²⁶.

Distintos factores modularían la actividad de LPL en SM y obesidad. En la IR, el aumento de citoquinas producidas por el TA, como el TNF- α , provocaría la disminución en la expresión de LPL. Al evaluar la regulación de la actividad de LPL se observó una asociación negativa con los niveles de insulina y con los distintos marcadores de IR, indicando un efecto negativo de la IR sobre la actividad de la enzima²⁷. Con respecto a la relación positiva observada entre adiponectina y LPL, trabajos previos han reportado la disminución de la actividad de LPL en situaciones de hipoadiponectinemia, sugiriendo un efecto regulatorio positivo de esta adipocitoquina. Estos resultados fueron independientes del grado de obesidad y de la IR, y explicarían parcialmente la asociación encontrada previamente entre la hipoadiponectinemia y la hipertrigliceridemia características de la obesidad y del SM²⁸.

Hasta el momento se dispone de escasos estudios que analizan el efecto de distintos fármacos, como las estatinas, en el comportamiento de LPL y LE. Endo y colaboradores reportaron un aumento en la masa de LPL en plasma de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 e hipercolesterolemia tratados con atorvastatina y pravastatina²⁹; sin embargo, recientemente, Tada y

colaboradores reportaron resultados controversiales, mostrando que rosuvastatina disminuiría la masa de LPL y aumentaría la masa de LE en pacientes con hipercolesterolemia familiar³⁰. Por lo tanto, continuar con el estudio de las enzimas lipolíticas como blanco terapéutico constituye un desafío científico para el mejoramiento del perfil lipoproteico y la reducción del riesgo cardiovascular en IR y obesidad.

CONCLUSIÓN

En el presente trabajo hemos reportado el comportamiento antagónico de LE y LPL en pacientes con distintos estadios de IR y obesidad, destacando el rol de cada una de ellas en el metabolismo lipoproteico. Según nuestros hallazgos, la regulación de la actividad de LE y LPL es multifactorial debido a que la IR y la obesidad comparten características difíciles de disociar, siendo la adiponectina un modulador fundamental.

BIBLIOGRAFÍA

1. Reaven GM. Insulin resistance, the insulin resistance syndrome, and cardiovascular disease. *Panminerva Med.* 2005 Dec; 47 (4): 201-10.
2. McCoy MG, Sun GS, Marchadier D, Maugeais C, Glick JM, Rader DJ. Characterization of the lipolytic activity of endothelial lipase. *J Lipid Res.* 2002 Jun; 43 (6):921-9.
3. Hasham SN, Pillarisetti S. Vascular lipases, inflammation and atherosclerosis. *Clin Chim Acta.* 2006 Oct; 372 (1-2): 179-83.
4. Beigneux AP, Davies BS, Gin P, Weinstein MM, Farber E, Qiao X, et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 plays a critical role in the lipolytic processing of chylomicrons. *Cell Metab.* 2007 Apr; 5 (4): 279-91.
5. Saiki A, Oyama T, Endo K, Ebisuno M, Ohira M, Koide N, et al. Preheparin serum lipoprotein lipase mass might be a biomarker of metabolic syndrome. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007 Apr; 76 (1): 93-101.
6. Miksztowicz V, Lucero D, Zago V, Cacciagiú L, Lopez G, Gonzalez Ballerga E, et al. Hepatic lipase activity is increased in non-alcoholic fatty liver disease beyond insulin resistance. *Diabetes Metab Res Rev.* 2012 Sep; 28 (6): 535-41.
7. Labadzhyan A, Cui J, Péterfy M, Guo X, Chen YI,

Hsueh WA, et al. Insulin clearance is associated with hepatic lipase activity and lipid and adiposity traits in Mexican Americans. *PLoS One.* 2016; 11 (11): e0166263.

8. Jin W, Sun GS, Marchadier D, Octaviani E, Glick JM, Rader DJ. Endothelial cells secrete triglyceride lipase and phospholipase activities in response to cytokines as a result of endothelial lipase. *Circ Res.* 2003 Apr 4; 92 (6): 644-50.

9. Kratky D, Zimmermann R, Wagner EM, Strauss JG, Jin W, Kostner GM, et al. Endothelial lipase provides an alternative pathway for FFA uptake in lipoprotein lipase-deficient mouse adipose tissue. *J Clin Invest.* 2005 Jan; 115 (1): 161-7.

10. Grundy SM, Cleeman JI, Merz CN, Brewer HB Jr, Clark LT, Hunninghake DB, et al.; National Heart, Lung, and Blood Institute; American College of Cardiology Foundation; American Heart Association. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Circulation.* 2004 Jul 13; 110 (2): 227-39.

11. 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.* 1985 Jul; 28 (7): 412-9.

12. 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.* 2005 Aug 1; 96 (3): 399-404.

13. Bartlett GR. Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem.* 1959 Mar; 234 (3): 466-8.

14. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951 Nov; 193 (1): 265-75.

15. Georgopoulos A, Rosengard AM. Abnormalities in the metabolism of postprandial and fasting triglyceride-rich lipoprotein subfractions in normal and insulin-dependent diabetic subjects: effects of sex. *Metabolism.* 1989 Aug; 38 (8): 781-9.

16. Nilsson-Ehle P, Ekman R. Rapid, simple and specific assay for lipoprotein lipase and hepatic lipase.

Artery. 1977; 3 (3): 194-209.

17. Belfrage P, Vaughan M. Simple liquid-liquid partition system for isolation of labeled oleic acid from mixtures with glycerides. *J Lipid Res*. 1969 May; 10 (3): 341-4.

18. Miksztowicz V, McCoy MG, Schreier L, Cacciagiú L, Elbert A, Gonzalez AI, *et al*. Endothelial lipase activity predicts high-density lipoprotein catabolism in hemodialysis: novel phospholipase assay in postheparin human plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012 Dec; 32 (12): 3033-40.

19. Badellino KO, Wolfe ML, Reilly MP, Rader DJ. Endothelial lipase concentrations are increased in metabolic syndrome and associated with coronary atherosclerosis. *PLoS Med*. 2006; 3 (2): e22.

20. Paradis ME, Badellino KO, Rader DJ, Tchernof A, Richard C, Luu-The V, *et al*. Visceral adiposity and endothelial lipase. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Sep; 91 (9): 3538-43.

21. Badellino KO, Wolfe ML, Reilly MP, Rader DJ. Endothelial lipase is increased in vivo by inflammation in humans. *Circulation*. 2008 Feb 5; 117 (5): 678-85.

22. Kobayashi J, Saito K, Fukamachi I, Taira K, Takahashi K, Bujo H, *et al*. Pre-heparin plasma lipoprotein lipase mass: correlation with intra-abdominal visceral fat accumulation. *Horm Metab Res*. 2001 Jul; 33 (7): 412-6.

23. Hanyu O, Miida T, Obayashi K, Ikarashi T, Soda S, Kaneko S, *et al*. Lipoprotein lipase (LPL) mass in preheparin serum reflects insulin sensitivity. *Atherosclerosis*. 2004 Jun; 174 (2): 385-90.

24. Costabile G, Annuzzi G, Di Marino L, De Natale C, Giacco R, Bozzetto L, *et al*. Fasting and post-prandial adipose tissue lipoprotein lipase and hormone-sensitive lipase in obesity and type 2 diabetes. *J Endocrinol Invest*. 2011 May; 34 (5): 110-4.

25. Clemente-Postigo M, Queipo-Ortuño MI, Fernandez-Garcia D, Gomez-Huelgas R, Tinahones FJ, Cardona F. Adipose tissue gene expression of factors related to lipid processing in obesity. *PLoS One*. 2011; 6 (9): e24783.

26. Schreier L, Berg G, Zago V, Gonzalez AI, Wikinski R. Kinetics of in vitro lipolysis of human very low-density lipoprotein by lipoprotein lipase. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2002 Feb; 12 (1): 13-8.

27. Von Eynatten M, Schneider JG, Humpert PM, Rudofsky G, Schmidt N, Barosch P, *et al*. Decreased plasma lipoprotein lipase in hypoadiponectinemia: an association independent of systemic inflammation and insulin resistance. *Diabetes Care*. 2004 Dec; 27 (12): 2925-9.

28. Qiao L, Zou C, van der Westhuyzen DR, Shao J. Adiponectin reduces plasma triglyceride by increasing VLDL triglyceride catabolism. *Diabetes*. 2008 Jul; 57 (7): 1824-33.

29. Endo K, Miyashita Y, Saiki A, Oyama T, Koide N, Ozaki H, *et al*. Atorvastatin and pravastatin elevated pre-heparin lipoprotein lipase mass of type 2 diabetes with hypercholesterolemia. *J Atheroscler Thromb*. 2004; 11 (6): 341-7.

30. Tada H, Kobayashi J, Kawashiri MA, Miyashita K, Nohara A, Inazu A, *et al*. Changes in lipoprotein lipase and endothelial lipase mass in familial hypercholesterolemia during three-drug lipid-lowering combination therapy. *Lipids Health Dis*. 2016 Apr 2; 15: 66.