

INSTITUTO DE CARDIOLOGIA Y CIRUGIA CARDIOVASCULAR

## Actividad de la lipasa de lipoproteínas en corazón y tejido adiposo epididimal de rata después de la inyección de Intralipid

Por:

Dr. MARCELINO LAVIN CABRERA, Dr. RAUL CABRERA PEREZ

Lavín Cabrera, M.; Cabrera Pérez, R. *Actividad de la lipasa de lipoproteínas en corazón y tejido adiposo epididimal de rata después de la inyección de Intralipid.*

Se investigó la respuesta aguda de las lipasas de lipoproteínas (LPL) de corazón y tejido adiposo epididimal de rata a una sobrecarga de triglicéridos (TrG) administrada por vía— endovenosa en forma de Intralipid 10%. En los animales ayunados previamente se observó una depresión significativa ( $p < 0,01$ ) en la actividad de la enzima de corazón al final de la primera hora que siguió a la administración de TG y una recuperación de dicha actividad al final del experimento (2 h). En los animales alimentados hubo aumento mantenido de la actividad LPL de corazón todo el tiempo, hasta hacerse significativo al final de la segunda hora ( $p < 0,02$ ), acompañado de una disminución rápida de TG circulantes. La enzima de tejido adiposo epididimal de ratas ayunadas experimentó un aumento significativo en su actividad, detectado a los 60 min ( $p < 0,05$ ), que se mantuvo hasta el final del experimento ( $p < 0,01$ ). En las ratas alimentadas se produjo también un aumento (no significativo) en la actividad de LPL de tejido adiposo.

### INTRODUCCION

En condiciones normales, los triglicéridos (TG) de los quilomicrones (QM) son extraídos de la circulación más rápidamente que cualquier otra lipoproteína plasmática, caracterizándose su catabolismo por dos fases:<sup>1</sup> en la primera, los TG son hidrolizados en los tejidos extrahepáticos por acción de la lipasa de lipoproteínas (LPL) localizada en el endotelio capilar, y los ácidos grasos no esterificados (AGNE) son liberados a la sangre; en la segunda fase, la partícula residual es extraída por el hígado, donde continúa su degradación la lipasa hepática. En el hombre, este proceso dura menos de 1 hora.<sup>2</sup>

Las LPL de tejido adiposo y corazón responden en forma opuesta, según el estado nutricional del animal. La enzima de tejido adiposo (epididimal) es deprimida durante el ayuno y

\* Médico especialista del departamento de bioquímica del Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular.

estimulada por la alimentación,<sup>3 5</sup> mientras la LPL cardíaca experimenta un aumento de su actividad en el ayuno y un descenso después de la alimentación.<sup>4,6,7</sup>

*Bragdon* y *Gordon* llamaron la atención acerca de que los TG de QM inyectados a ratas por vía endovenosa, no eran retirados con mayor rapidez en los animales ayunados que en aquéllos con balance calórico positivo.<sup>8</sup>

En este trabajo nos interesó conocer las respuestas de la actividad enzimática de los tejidos cardíaco y adiposo de rata a una sobrecarga de TG en situaciones de ayuno y alimentación.

#### MATERIALES Y METODOS

Fueron utilizadas 92 ratas albinas, machos, de 330-370 g de peso corporal, albergadas en jaulas convencionales con comida y agua *ad libitum*, durante no menos de una semana antes de la realización de los experimentos. Las ratas fueron distribuidas en cuatro grupos de 24 animales cada uno: I) control ayunado, II) experimental ayunado, III) control sin ayuno y IV) experimental sin ayuno. El ayuno fue de 16 h previas al experimento, realizado en las primeras horas de la mañana.<sup>9</sup> Los animales experimentales fueron inyectados, bajo anestesia ligera con éter, con 2 ml de Intralipid<sup>10</sup> % por vía endovenosa (vena safena media), demorando 30 seg la administración. Los controles fueron inyectados en iguales condiciones con igual volumen de NaCl 0,9 %. De cada grupo fueron tomados ocho animales para los distintos tiempos de sacrificio: 5, 60 y 120 min. En experimentos previos se observó que el máximo nivel de TG en sangre se alcanzaba a los 5 min de efectuada la inyección de Intralipid. Cada día de experimentos se utilizó una rata de cada grupo, siguiéndose una estricta rotación de los grupos entre dos experimentos consecutivos.

Bajo anestesia con éter se extrajo sangre por punción cardíaca, dejándola coagular a 37 °C, procediéndose a la retracción del coágulo en frío y centrifugando después a 3 500 rpm durante 10 min; el suero fue guardado en congelación hasta su procesamiento. El cojinete epididimal izquierdo<sup>11</sup> y el corazón (aún latiendo), fueron extraídos y lavados con NaCl 0,9 % frío, secados en papel de filtro y pesados: alrededor de 250 mg de tejido adiposo y 60 mg de ventrículos. A continuación los tejidos fueron procesados e incubados siguiendo la técnica descrita en otro trabajo.<sup>11</sup>

La actividad de LPL fue determinada por la liberación de AGNE, determinados por el método de *Dole* y *Meinertz*,<sup>12</sup> modificado por *Salaman* y *Robinson*,<sup>5</sup> La actividad fue expresada en micro-equivalentes de AGNE/g de tejido/h de incubación. Los TG de suero fueron determinados por la técnica de *Grafnetter*.<sup>13</sup>

Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el test no paramétrico de la U de Mann-Whitney,<sup>14</sup> con un nivel de significación de 5%

#### RESULTADOS

En el grupo control ayunado (gráfico 1) se observan ligeras variaciones en los TG del suero, Si bien parece haber tendencias opuestas entre los niveles séricos de TG y la actividad LPL del

corazón, estas fluctuaciones carecen de significación estadística.

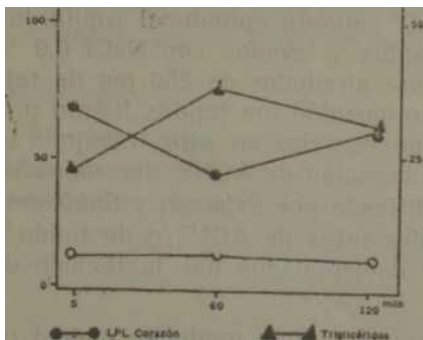
En el grupo experimental ayunado (gráfico 2) se observa una actividad LPL que guarda paralelismo con sus controles, aunque es siempre menor. En la 1ª h que sigue a la administración de Intralipid, la actividad de la enzima cardíaca cae significativamente y en el transcurso de la 2 h cuando la concentración de TG séricos desciende, en concordancia con el aumento significativo de la actividad LPL de tejido adiposo, la actividad de la enzima cardíaca comienza a recuperarse y alcanza a las 2 h el valor inicial, cuando la concentración de TG es sólo un 50 % de su valor inicial.

En el grupo control sin ayuno (gráfico 3), hubo aumento marcado (significativo al final de las 2 h) de la actividad LPL en corazón. Este hecho podría explicarse por la observación de que los animales no comieron durante las 2 h de experimento, a pesar de haberseles ofrecido el alimento, iniciándose así una fase de ayuno no intencional (ver Introducción). Aquí una vez más, y durante la 2- h, se observa un paralelismo entre la caída de TG y al aumento de actividad de la enzima cardíaca.

Por último, en los animales experimentales no ayunados (gráfico 4), la actividad de la LPL cardíaca aumenta desde el principio ante la sobrecarga de TG impuesta. Esta actividad se hace significativamente mayor que el valor inicial al final del experimento.

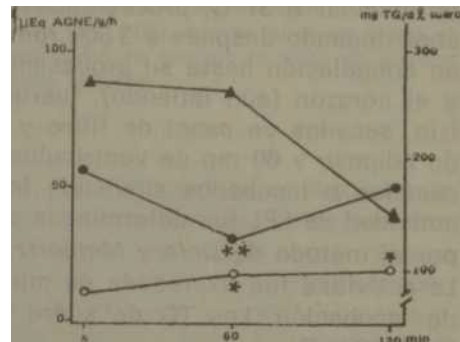
En el cuadro aparecen las medianas y los rangos de variación de todas las determinaciones.

Gráfico 1



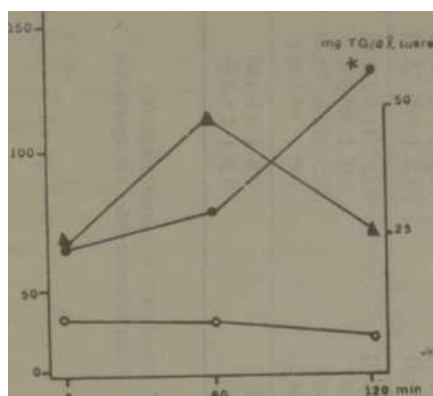
Actividad de lipasa de lipoproteínas (LPL) en corazón y tejido adiposo epididimal y concentración de triglicéridos (TG) en suero de ratas control ayunadas. Cada punto representa la mediana de 8 determinaciones

Gráfico 2



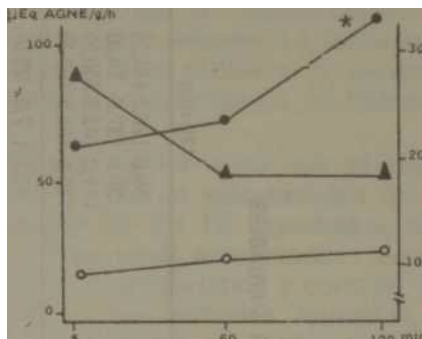
Actividad de lipasa de lipoproteínas (LPL) en corazón y tejido adiposo epididimal y concentración de triglicéridos (TG) en suero de ratas ayunadas e inyectadas con 2 ml de intralipid 10% por vía endovenosa al tiempo 0. Cada punto representa la mediana de 8 determinaciones excepto TG de 5 min,  $n = 6$ . (Símbolos como en gráfico 1) \* $p < 0,01$  vs 5 min; \*\* $p < 0,05$  vs 5 y 60 min.

Gráfico 3



Actividad de lipasa de lipoproteínas en corazón y tejido adiposo epididimal y concentración de triglicéridos (TG) en suero de ratas controladas no ayunadas. Cada punto representa la mediana de 8 determinaciones. (Símbolos como en gráfico 1) \* $p = 0.005$  vs 5 min.

Gráfico 4



Actividad de lipasa de lipoproteínas (LPL) en corazón y tejido adiposo epididimal y conc suero de ratas no ayunadas, inyectadas con 2 ml de intralipid 10% por vía endovenosa. Cada punto representa la mediana de 8 determinaciones. (Símbolos como en gráfico 1) \* $p < 0,02$  vs 5 min.

#### DISCUSION

La frecuente observación del aumento de la actividad LPL cardíaca, acompañado de un descenso marcado de los TG sanguíneos (2<sup>o</sup> h en experimentales ayunados y controles sin ayuno, y la 1<sup>a</sup> h en experimentales sin ayuno o viceversa (1<sup>a</sup> h en controles ayunados), concuerda con las observaciones de Friedman y colaboradores<sup>15</sup> en el sentido de que la enzima de corazón pudiera estar regulada por su propio sustrato, los TG. Estos autores deprimieron la liberación hepática de TG mediante la administración de 4-APP a ratas, registrando aumento de la actividad LPL cardíaca. Al inyectar lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) con el fin de restaurar la concentración sanguínea de TG, la actividad de LPL cardíaca volvía a los valores iniciales.

Sin embargo, resulta más difícil de explicar la aparente incapacidad del tejido cardíaco en ayunas para la captación de una sobrecarga de TG (gráfico 2), durante la primera hora que siguió a la Intralipid; esto se hace evidente al comparar los valores de LPL cardíaca de animales ayunados con la actividad LPL cardíaca de las ratas no ayunadas (gráfico 5), siendo estadísticamente significativa la diferencia de actividades LPL entre ambos grupos a los 60 min ( $p = 0,001$ ) y a los 120 min ( $p < 0,005$ ) de comenzado el experimento. Este hallazgo pudiera deberse a: 1) aumento en la utilización de glucosa y disminución en la utilización de AGNE como combustible en los animales ayunados;

CUADRO

MEDIANAS Y RANGOS CORRESPONDIENTES (ENTRE PARENTESIS) DE LAS VARIABLES DETERMINADAS. n = 8 EXCEPTO PARA\* (n = 6)

		5 min	60 min	120 min	
Actividad LPL ( $\mu$ Eq AGNE/g/h)	Corazón	CA	66,6 (50,3-118,3)	43,1 (27,1-121,4)	59,8 (26,2-141,7)
		EA	56,2 (28,0-117,2)	31,1 (15,0- 40,1)	50,0 (37,0- 75,3)
		C	38,9 (17,9- 56,3)	59,7 (28,0-105,5)	111,0 (43,2-200,3)
		E	65,1 (40,6-109,8)	75,4 (36,7-120,2)	115,5 (38,6-160,5)
	Tejido adiposo	CA	12,0 ( 6,9- 17,9)	14,0 ( 7,2- 33,5)	13,2 ( 7,8- 23,9)
		EA	11,1 ( 4,9- 23,6)	19,5 (10,1- 32,5)	19,7 (12,0- 40,3)
		C	21,9 (11,5- 62,9)	19,7 ( 5,1- 35,4)	12,8 ( 7,0- 52,6)
		E	17,4 ( 8,6- 61,8)	23,1 ( 8,8- 35,5)	27,2 ( 9,5- 55,0)
Triglicéridos (mg/100 ml suero)	CA	21,8 (10,7- 40,8)	37,9 (17,0- 58,5)	31,2 (11,9-122,8)	
	EA	277 (211-674)*	264 (115-739)	145 ( 88-588 )	
	C	38,9 (17,9- 56,3)	47,5 (16,3-146)	26,2 (10,4- 72,4)	
	E	274 (169-683)	190 (110-464)	186 ( 86-532 )	
AGNE (mEq/l suero)	EA	3,8 ( 3,1-4,7)*	3,8 ( 1,2-4,8)	1,8 ( 0,9-4,6)	
	E	2,7 ( 2,0-4,5)	1,6 ( 1,1-2,8)	1,6 ( 1,1-2,8)	

AGNE: ácidos grasos no esterificados  
CA: controles ayunados

EA: experimentales ayunados

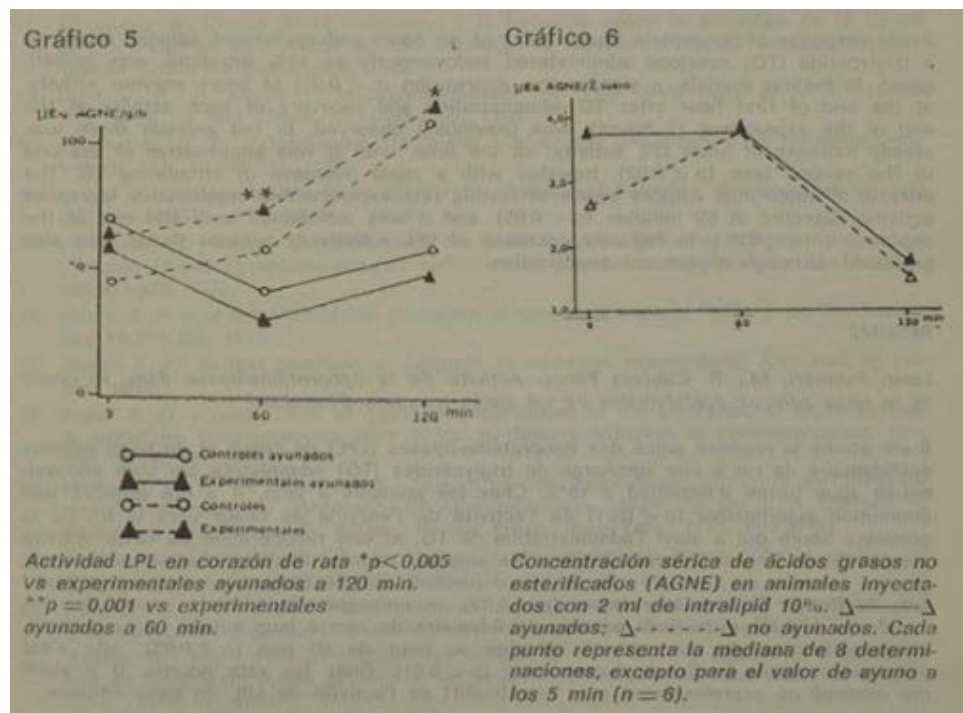
C y E: controles y experimentales, respectivamente, no ayunados

R.C.M.  
MARZO, 1985

2) aumento del contenido de AGNE en el corazón de estos animales, consecutivo a un aumento en el nivel sanguíneo de AGNE provocado por la intensificación de la actividad de la lipasa hormono-sensible del tejido adiposo. La primera posibilidad parece improbable, pues el corazón sólo utiliza a la glucosa en forma preferencial en situaciones de hipoxia o sobrecarga de trabajo mecánico.<sup>16,17</sup>

En relación con la segunda posibilidad, se ha visto que al inyectar quilomicrones por vía endovenosa, la velocidad de aclaramiento del plasma y el destino de los AGNE procedentes de los TG inyectados, dependen del estado nutricional del animal.<sup>18</sup> En ratas alimentadas, alrededor de 34 % de los AGNE fue hallado en músculo esquelético y corazón, mientras sólo un 10 % seguía este destino en los animales ayunados. Este hallazgo podría estar relacionado con el contenido de ácidos grasos hísticos en ambos estados nutricionales, que son un producto de la acción de la LPL en el endotelio capilar del órgano<sup>19</sup> e inhibidor de su actividad.

En favor de esta explicación está la mayor concentración de AGNE séricos en los animales experimentales ayunados (gráfico 6) en comparación con sus homólogos no ayunados, durante la primera hora del experimento.



Las fluctuaciones en la actividad de la LPL de tejido adiposo según el estado nutricional, pudieran ser atribuidas, en parte, al control que ejerce la insulina sobre esta enzima.<sup>20</sup> La baja actividad de la LPL de tejido adiposo procedente de animales diabéticos, es restaurada por la administración de insulina;<sup>21,22</sup> mientras en el animal normal, alimentado, la hormona aumenta la captación de TG por los cojinetes adiposos epididimales, *in vitro*, siempre que se agregue glucosa al medio.<sup>22</sup> *In vivo*, la administración de Intralipid y glucosa a seres humanos es seguida de un aumento de la actividad de LPL de tejido adiposo hasta siete veces el valor inicial<sup>23</sup> y este efecto de la insulina no parece radicar en la síntesis de novo de la enzima y sí en su activación, transporte o secreción desde el adipocito.<sup>24</sup>

Nuestros resultados concuerdan con los de *Hansen y colaboradores*,<sup>25</sup> quienes hallaron una elevada actividad de LPL en tejido adiposo de ratas alimentadas y baja actividad enzimática durante el ayuno. En adipocitos aislados<sup>26</sup> también se ha encontrado una actividad significativamente mayor de la enzima si los adipocitos provenían de ratas alimentadas, al ser comparada con la actividad de LPL en adipocitos de ratas ayunadas.

#### SUMMARY

Lavín Palmieri, M.; R. Cabrera Pérez. *Lipoprotein lipase activity in rat heart and epididymal adipose tissue after Intralipid injection.*

Acute response of lipoprotein lipase (LPL) of rat heart and epididymal adipose tissue to a triglyceride (TG) overload administered endovenously as 10% Intralipid, was investigated. In fasting animals, a significant depression ( $p < 0,01$ ) of heart enzyme activity, at the end of first hour after TG administration and recovery of such activity at the end of the experiment (2 hours), was previously observed. In fed animals there was steady increase of heart LPL activity, all the time, until it was significant at the end of the second hour ( $p < 0,02$ ), together with a rapid decrease of circulating TG. The enzyme of epididymal adipose tissue of fasting rats experimentally increased activity, detected at 60 minutes ( $p < 0,05$ ), and it was maintained until the end of the experiment ( $p < 0,01$ ). In fed rats, increase of LPL activity of adipose tissue was also produced, although it was not significant.

#### RÉSUMÉ

Lavín Palmieri, M.; R. Cabrera Pérez. *Activité de la lipoprotéine-lipase dans le coeur et le tissu adipeux épидидymaire de rat après injection d'Intralipid.*

Il est étudié la réponse aiguë des lipoprotéine-lipases (LPL) de coeur et de tissu adipeux épидидymaire de rat à une surcharge de triglycérides (TG) administrée par voie endoveineuse sous forme d'Intralipid à 10%. Chez les animaux à jeun, il a été observé une diminution significative ( $p < 0,01$ ) de l'activité de l'enzyme de coeur vers la fin de la première heure qui a suivi l'administration de TG, et une récupération de cette activité vers la fin de l'essai (2 heures). Chez les animaux nourris, il a été observé un accroissement soutenu de l'activité LPL de coeur pendant tout le temps, qui a été significatif vers la fin de la deuxième heure ( $p < 0,02$ ), accompagné d'une chute rapide des TG circulants. L'enzyme de tissu adipeux épидидymaire de rats à jeun a subi une augmentation significative de son activité, décelée au bout de 60 min ( $p < 0,05$ ); elle s'est maintenue jusqu'à la fin de l'expérience ( $p < 0,01$ ). Chez les rats nourris, il a aussi été observé un accroissement (non significatif) de l'activité de LPL de tissu adipeux.

## BIBIOGRAFIA

1. Eisenberg, S.; R. I. Levy: Lipoprotein metabolism. *Adv Lipid Res* 13:1-89, 1975.
2. Jackson, R. L. y otros: Lipoprotein and Lipid Transport: Structural and Functional Concepts. In: *Hyperlipidemia. Diagnosis and Therapy*. Ed. por B. M. Rifkind y R. I. Levy, Gruñe and Stratton, 1977. Pp. 1-16.
3. Cherkas, R. S.; J. R. Gordon: The liberation of lipoprotein lipase by heparin from adipose tissue incubated in vitro. *J Lipid Res* 1:97-107, 1959.
4. Brady, M.: The properties of the lipoprotein lipases of rat heart, lung and adipose tissue. *Biochim. Biophys Acta* 137:140-148, 1967.
5. Salaman, M. R.; D. S. Robinson: The effect of fasting on the clearing factor lipase activity of rat adipose tissue and plasma. In: *Enzymes of Lipid Metabolism*. Ed. por P. Desnuelle, Pergamon Press, New York, 1961. Pp. 218-230.
6. Zemptényi, T.; D. Grafnetter: The lipolytic activity of heart and aorta in experimental atherosclerosis in rabbits. *Br J Exp Pathol* 40:312-318, 1959.
7. Borensztajn, J. y otros: Effect of fasting on the clearing factor lipase (lipoprotein lipase) activity of fresh and defatted preparations of rat heart muscle. *J Lipid Res* 11:102-110, 1970.
8. Bragdon, J. H.; R. S. Gordon: Tissue distribution of C<sup>14</sup> after the intravenous injection of labeled chylomicrons and unesterified fatty acids in the rat. *J Clin Invest* 37:574-578, 1958.
9. Borensztajn, J.; D.; S. Robinson: The effect of fasting on the utilization of chylomicron triglyceride fatty acids in relation to clearing factor lipase (lipoprotein lipase) releasable by heparin in the perfused rat heart. *J Lipid Res* 11:111-117, 1970.
10. Wing, D. R. y otros: Clearing factor lipase in adipose tissue. Factors influencing the increase in enzyme activity produced on incubation of tissue from starved rats in vitro. *Biochem J* 99:648-656, 1966.
11. Mombeya, A: Efecto de la colchicina y la heparina sobre la actividad de la lipasa de lipoproteínas en corazón de rata. Trabajo de Diploma. Facultad de Ciencias Biológicas. Dpto. de Bioquímica, 1979.
12. Dole, V. P.; H. Meinertz: Microdetermination of long chain fatty acids in plasma and tissue. *J Biol Chem* 235:2595-2599, 1960.
13. Grafnetter, D. Z.: Zjdnodusene stanovenii triglyceridu pro diagnostiku hyperlipidemii. *Vnitřní Lék* 19:808-811, 1973.
14. Siegel, S.: *Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences*. International Student Edition. McGraw-Hill editors, 1956.
15. Friedman, G. y otros: Stimulation of rat heart lipoprotein lipase activity by 4-amino-pyrazolo (3,4-d) pyrimidine-induced reduction of plasma triacylglycerol. *Febs Letters*. 100:371-373, 1979.
16. Neely, J. R. y otros: Myocardial utilization of carbohydrate and lipids. *Prog Cardiovasc Dis* 15:289-329, 1972.
17. Sobel, B. Salient biochemical features in ischemic myocardium. *Circ Res* 35:173-181, 1974.
18. Scow, R. O. y otros: Role of capillary endothelium in the clearance of chylomicrons. A model for lipid transport from blood by lateral diffusion in cell-membranes. *Circ Res* 39:149-162, 1976.
19. Mantulin, W. W.; A. M. Gotto, Jr.: Human plasma lipoproteins: structure and metabolism. In: *International Conference of Atherosclerosis, Milán*. Ed. por L. A. Carlson, R. Paoletti, C. R. Sirtori, G. Weber. Raven Press, New York, 1977. Pp. 57-69.
20. Borensztajn, J. y otros: Effects of insulin on lipoprotein lipase activity in the rat adipose tissue. *Am J Physiol* 223:1271-1275, 1972.
21. Kessler, J. I.: Effects of diabetes and insulin on the activity of myocardial and adipose tissue lipoprotein lipase of rats. *J Clin Invest* 42:362-367, 1963.
22. Austin, W.: The effect of glucose and insulin in vitro on the uptake of triglyceride and on lipoprotein lipase activity in fat pads from normal, fed rats. *Biochim Biophys Acta* 164:59-65, 1968.



23. *Taskinen, M. fi. y otros*: Effect of parenteral hyperalimentation on serum lipoproteins and on lipoprotein lipase activity of adipose tissue and skeletal muscle. *Eur J Clin Invest* 11:317-323, 1981.
24. *Garfinkel, A. S. y otros*: Regulation of lipoprotein lipase induction by insulin. *Biochim Biophys Acta* 424:264- 273, 1976.
25. *Jansen, H. y otros*: Regulation of lipoprotein lipase. Immunological study of adipose tissue. *Biochim Biophys Acta* 531:109-114, 1978.
26. *Spencer, I. M. y otros*: The effect of nutritional State on the lipoprotein lipase activity of isolated fat cells. *Biochim Biophys Acta* 530:375-384, 1978.

Recibido: 5 de junio de 1983.

Aprobado: 6 de septiembre de 1983.

Dr. *Marcelino Lacín Palmieri*  
Instituto de Cardiología  
17 y A, Vedado, Plaza, Ciudad de La Habana.