

This document is the Submitted Version of a Published Work that appeared in final form in *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, *January-February 2020*.

Online version: <https://www.elsevier.es/es-revista-clinica-e-investigacion-arteriosclerosis-15-avance-resumen-niveles-plasmaticos-glucosa-trigliceridos-vldl-S0214916819300646>

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2019.05.001>

Clínica e Investigación en Arteriosclerosis

Niveles plasmáticos de glucosa, triglicéridos, VLDL, leptina y resistina como potenciales biomarcadores de la grasa miocárdica en ratones.

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Original
Section/Category:	Investigación Básica
Keywords:	esteatosis cardíaca; resistencia a la insulina; triglicéridos; metabolismo
Corresponding Author:	Ricardo Rodriguez-Calvo, Ph.D CIBERDEM-URV Reus, SPAIN
First Author:	Ricardo Rodriguez-Calvo, Ph.D
Order of Authors:	Ricardo Rodriguez-Calvo, Ph.D Sara Samino Sandra Guaita-Esteruelas Neus Martínez-Micaelo Mercedes Heras Josefa Girona Oscar Yanes Xavier Correig Lluís Masana
Abstract:	<p>Introducción. El incremento de grasa miocárdica ha sido propuesto como uno de los principales precursores de la disfunción miocárdica de etiología diabética independiente de la enfermedad arterial coronaria. Sin embargo, actualmente se carece de biomarcadores que reflejen el contenido de grasa miocárdica para la detección clínica de esta patología.</p> <p>Métodos. Las correlaciones entre el contenido de triglicéridos cardíacos y los niveles plasmáticos de las principales moléculas alteradas durante la diabetes y los niveles cardíacos de ARNm de genes implicados en el metabolismo cardíaco (Cd36 y Pdk4) han sido exploradas en un modelo murino de resistencia a la insulina inducida por una dieta con alto contenido en grasas.</p> <p>Resultados. En ratones resistentes a la insulina, la dieta grasa aumentó los niveles de triglicéridos del miocardio, en comparación con animales controles alimentados con una dieta estándar. El contenido de triglicéridos cardíacos se encontró directamente asociado con los niveles plasmáticos de glucosa, triglicéridos, VLDL, resistina y leptina. Además, se observó una correlación inversa entre el contenido de triglicéridos y los niveles cardíacos de ARNm de Cd36 y Pdk4.</p> <p>Conclusiones. Nuestros datos revelan que el contenido cardíaco de triglicéridos se encuentra asociado con un perfil bioquímico plasmático alterado y con una reprogramación de la expresión de genes dirigida a atenuar el impacto de la acumulación ectópica de lípidos en miocardio.</p>

Clínica e Investigación en Arteriosclerosis
Dr. Josep Ribalta,
Redactor Jefe

Lunes, 15 de abril de 2019

Estimado Dr. Josep Ribalta,

Encuentre adjunto nuestro manuscrito titulado "**Niveles plasmáticos de glucosa, triglicéridos, VLDL, leptina y resistina como potenciales biomarcadores de la grasa miocárdica en ratones**", que nos gustaría fuese considerado para su publicación en *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*.

El incremento de grasa miocárdica ha sido propuesto como uno de los principales precursores de la disfunción miocárdica de etiología diabética independiente de la enfermedad arterial coronaria. Sin embargo, actualmente se carecen de biomarcadores que reflejen el contenido de grasa miocárdica para la detección clínica de esta patología. Los mecanismos subyacentes a la acumulación ectópica de grasa en miocardio no son plenamente conocidos. Durante la diabetes tipo 2, la captación de los ácidos grasos supera la capacidad que tiene la célula para metabolizarlos, de manera que se acumulan intracelularmente como metabolitos lipídicos bioactivos, contribuyendo directamente al bloqueo de la vía de señalización de la insulina. Además, el tejido adiposo libera a la circulación una gran cantidad de adipoquinas, que pueden participar en el control del metabolismo energético, regulando la preferencia del sustrato para la producción de energía. De esta manera, las adipoquinas se postulan como moléculas claves en la red de comunicación entre el tejido adiposo y el corazón. Sin embargo, el potencial papel de estas moléculas como biomarcadores de la grasa miocárdica no ha sido explorado en profundidad. En este trabajo se muestra que el contenido cardíaco de triglicéridos se encuentra asociado con un perfil bioquímico plasmático alterado y con una reprogramación de la expresión de genes dirigida a atenuar el impacto de la acumulación ectópica de lípidos en miocardio.

Esperamos su opinión en cuanto a la idoneidad, o no, de nuestro manuscrito para su inclusión en *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*.

Muchas gracias de antemano por su atención.
Sinceramente,

Ricardo Rodríguez-Calvo, PhD
Pere Virgili Health Research Institute (IISPV)
Spanish Biomedical Research Centre in Diabetes and Associated
Metabolic Disorders (CIBERDEM)
Sant Llorenç, 21, 4301 Reus, Spain
e-mail: ricardo.rodriguez@ciberdem.org; rrodriguez080480@yahoo.es

En nombre de todos los coautores, afirmo que la manipulación y los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con la Guía para el Cuidado y el Uso de Animales de Laboratorio publicada por el U.S. National Institutes of Health (NIH publicación no. 85-23, revisada en 1996). Todos los procedimientos fueron aprobados por el comité de Bioética de la Universidad Rovira i Virgili, tal y como se encuentra establecido en la ley 5/12 de Julio de 1995, y fueron aprobados por la Generalitat de Cataluña.

El manuscrito no se encuentra bajo consideración para su publicación en ninguna otra revista. Todos los autores han leído y aprobado la versión final del manuscrito. El trabajo ha sido financiado por una beca FEA/SEA para Investigación Básica en aspectos básicos de la arteriosclerosis y sus factores de riesgo, convocatoria 2015. No hay compromisos que puedan considerarse como conflictos de interés.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

**Niveles plasmáticos de glucosa, triglicéridos, VLDL, leptina y resistina como
potenciales biomarcadores de la grasa miocárdica en ratones.**

**Plasma glucose, triglycerides, VLDL, leptin and resistin levels as potential
biomarkers for myocardial fat in mice.**

**Niveles plasmáticos de glucosa, triglicéridos, VLDL, leptina y resistina como
potenciales biomarcadores de la grasa miocárdica en ratones.**

**Plasma glucose, triglycerides, VLDL, leptin and resistin levels as potential
biomarkers for myocardial fat in mice.**

Ricardo Rodríguez-Calvo^{1,2*}, Sara Samino^{2,3}, Sandra Guaita-Esteruelas^{1,2}, Neus
Martínez-Micaelo^{1,2}, Mercedes Heras^{1,2}, Josefa Girona^{1,2}, Oscar Yanes^{2,3}, Xavier
Correig^{2,3} y Lluís Masana^{1,2*}

¹Unidad de Medicina Vascul ar y Metabolismo, Unitat de Recerca en Lípids i Arteriosclerosis, Hospital Universitario Sant Joan, Universitat Rovira i Virgili, Institut de Investigació Sanitària Pere Virgili; ²CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM)-Instituto de Salud Carlos III. Reus. España. ³Plataforma de Metabolómica, Institut de Investigació Sanitària Pere Virgili; Departamento de Ingeniería Electrónica (DEEEA), Universitat Rovira i Virgili.

*Correspondencia: Dr. Ricardo Rodríguez-Calvo y Dr. Lluís Masana

Unitat de Recerca en Lípids i Arteriosclerosis. Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili. CIBERDEM.

C/. Sant Llorenç, 21. 43201 Reus. España.

Correo electrónico: ricardo.rodriquez@ciberdem.org, luis.masana@urv.cat

Conflicto de intereses: no existen.

Financiación-Este estudio ha sido financiado por una beca FEA/SEA para Investigación Básica en aspectos básicos de la arteriosclerosis y sus factores de riesgo (convocatoria 2015), el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (PI15/00627), el CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM) (CB07/08/0028 y CB07/08/0014), el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Introducción. El incremento de grasa miocárdica ha sido propuesto como uno de los principales precursores de la disfunción miocárdica de etiología diabética independiente de la enfermedad arterial coronaria. Sin embargo, actualmente se carece de biomarcadores que reflejen el contenido de grasa miocárdica para la detección clínica de esta patología.

Métodos. Las correlaciones entre el contenido de triglicéridos cardíacos y los niveles plasmáticos de las principales moléculas alteradas durante la diabetes y los niveles cardíacos de ARNm de genes implicados en el metabolismo cardíaco (*Cd36* y *Pdk4*) han sido exploradas en un modelo murino de resistencia a la insulina inducida por una dieta con alto contenido en grasas.

Resultados. En ratones resistentes a la insulina, la dieta grasa aumentó los niveles de triglicéridos del miocardio, en comparación con animales controles alimentados con una dieta estándar. El contenido de triglicéridos cardíacos se encontró directamente asociado con los niveles plasmáticos de glucosa, triglicéridos, VLDL, resistina y leptina. Además, se observó una correlación inversa entre el contenido de triglicéridos y los niveles cardíacos de ARNm de *Cd36* y *Pdk4*.

Conclusiones. Nuestros datos revelan que el contenido cardíaco de triglicéridos se encuentra asociado con un perfil bioquímico plasmático alterado y con una reprogramación de la expresión de genes dirigida a atenuar el impacto de la acumulación ectópica de lípidos en miocardio.

Palabras clave: Esteatosis cardíaca, resistencia a la insulina, triglicéridos, metabolismo.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
Introduction. The increase in myocardial fat has been proposed as one of the main precursors of myocardial dysfunction due to diabetic aetiology, independently of coronary artery disease. However, biomarkers reflecting the myocardial fat content for the clinical detection of this pathology are currently lacking.

11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
Methods. Correlations between cardiac triglyceride content and plasma levels of major altered molecules during diabetes and cardiac mRNA levels of genes involved in cardiac metabolism (*Cd36* and *Pdk4*) have been explored in a murine model of insulin resistance induced by a high-fat diet.

22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
Results. In insulin-resistant mice, the fatty diet increased myocardial triglyceride levels, compared to control animals fed with a standard diet. The content of cardiac triglycerides was directly associated with plasma levels of glucose, triglycerides, VLDL, resistin and leptin. In addition, an inverse correlation was observed between the content of cardiac triglycerides and the cardiac mRNA levels of *Cd36* and *Pdk4*.

35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
Conclusions. Our data reveal that the cardiac triglyceride content is associated with altered plasma biochemical profile and reprogramming of gene expression aimed to mitigate the impact of ectopic lipid accumulation in the myocardium.

Key words: Cardiac steatosis, insulin resistance, triglycerides, metabolism.

Introducción

1
2 La resistencia a la insulina ha sido propuesta como un importante factor de riesgo de
3
4 insuficiencia cardíaca (IC), la principal causa de muerte en individuos con diabetes
5
6 mellitus (DM) ¹. Los individuos diabéticos presentan entre dos y cinco veces más
7
8 riesgo de IC ². La principal alteración miocárdica relacionada con esta patología es la
9
10 enfermedad arterial coronaria. Sin embargo, la IC ha sido asociada con alteraciones
11
12 metabólicas independientes de la lesión vascular ³. Específicamente, se ha observado
13
14 una acumulación de triglicéridos a nivel miocárdico en pacientes con cardiomiopatía no
15
16 isquémica en estado terminal ⁴. La acumulación de lípidos a nivel cardíaco se conoce
17
18 comúnmente como esteatosis cardíaca, y se ha visto independientemente asociada
19
20 con una función contráctil alterada y con el inicio de la disfunción miocárdica ⁵⁻⁸. De
21
22 hecho, el incremento de grasa miocárdica es evidente en ausencia de IC y precede la
23
24 disfunción del miocardio ^{6,8}, siendo propuesto como uno de los principales precursores
25
26 de la disfunción miocárdica debida a la diabetes ⁴⁻⁸.
27
28
29
30

31
32
33 Los mecanismos subyacentes a la acumulación ectópica de grasa en miocardio no son
34
35 plenamente conocidos en la actualidad. El incremento de ácidos grasos circulantes
36
37 observado durante la DM facilita la utilización de los mismos como sustrato energético
38
39 preferente para la producción de energía en las células cardíacas. Sin embargo, la
40
41 captación de los ácidos grasos supera la capacidad que tiene la célula para
42
43 metabolizarlos ⁹, de manera que se acumulan intracelularmente como metabolitos
44
45 lipídicos bioactivos, contribuyendo directamente a la activación de rutas moleculares
46
47 que conducen al bloqueo de la vía de señalización de la insulina ¹⁰. Además, el tejido
48
49 adiposo libera a la circulación una gran cantidad de moléculas bioactivas llamadas
50
51 adipoquinas, que pueden participar en el control del metabolismo energético,
52
53 regulando la preferencia del sustrato utilizado para la producción de energía en sus
54
55 tejidos diana. De esta manera, las adipoquinas se postulan como moléculas claves en
56
57 la red de comunicación entre el tejido adiposo y los tejidos periféricos, incluido el
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

corazón ¹¹, aunque su potencial papel como biomarcador de la grasa miocárdica no ha sido explorado en profundidad.

A pesar de las evidencias que sustentan la acumulación de grasa cardíaca como potencial agente causal de la disfunción miocárdica independiente de la patología isquémica en individuos diabéticos, en la actualidad se carece de biomarcadores que reflejen el contenido de triglicéridos miocárdicos para el diagnóstico de esta patología.

En este trabajo se analizan las asociaciones entre el contenido de triglicéridos cardíacos y el perfil bioquímico plasmático en ratones alimentados con una dieta grasa.

Métodos

Animales

Ratones C57BL/6J macho de seis semanas de edad fueron mantenidos en condiciones estándar de luz/oscuridad (ciclos de 12 horas) y temperatura ($21\pm 1^\circ\text{C}$) con acceso *ad libitum* a agua y comida. Los animales se distribuyeron de manera aleatoria en dos grupos experimentales (10 animales/grupo) y fueron alimentados con una dieta estándar (STD) (10% de kcal de grasa; Panlab; Barcelona, España) o con una dieta grasa (HFD) (60% kcal de grasa Panlab; Barcelona, España) durante 12 semanas ¹². A las 12 semanas los animales fueron sacrificados y los corazones fueron inmediatamente congelados en nitrógeno líquido y conservados a -80°C para futuros análisis. Se obtuvieron muestras de plasma, donde se determinaron los niveles de glucosa (Spinreact; Barcelona, España), ácidos grasos libres (AGL. Wako; Osaka, Japan), colesterol total y lipoproteínas de alta densidad (HDL, del inglés *high-density lipoproteins*) (Spinreact; Barcelona, España) utilizando un autoanalizador Cobas Mira Plus (Roche Diagnostics, España). Los niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL, del inglés *low-density lipoproteins*) y muy baja densidad (VLDL, del inglés *very low-density lipoproteins*) fueron determinados por Fridewald ¹³. Los niveles de insulina, resistina, leptina, adiponectina fueron determinados mediante kits comerciales (Milliplex®, Millipore; Billerica, MA, USA). La resistencia a la insulina se evaluó mediante el índice HOMA utilizando la siguiente ecuación: $[\text{glucosa en ayuno (mmol/L)} \times \text{insulina en ayuno ((}\mu\text{U/mL)}]/22.5$ ¹⁴. La manipulación y los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con la Guía para el Cuidado y el Uso de Animales de Laboratorio publicada por el U.S. National Institutes of Health (NIH publicación no. 85-23, revisada en 1996). Todos los procedimientos fueron aprobados por el comité de Bioética de la Universidad Rovira i Virgili, tal y como se encuentra establecido en la ley 5/12 de Julio de 1995, y fueron aprobados por la Generalitat de Cataluña.

Tinción del contenido lipídico

1 El contenido lipídico fue determinado en secciones de 5 mm de corazones congelados
2 de ratón utilizando el colorante Oil Red O (Sigma-Aldrich; Madrid, España) siguiendo el
3 protocolo descrito por Mehlem *et al* ¹⁵. Las imágenes fueron capturadas con un
4 microscopio Olympus IX71 (España).
5
6
7
8
9

10 *Determinación de los triglicéridos miocárdicos*

11 El contenido de lípidos cardíaco fue extraído en metanol al 0.1% de ácido fórmico. La
12 muestra se fragmentó mediante vortex, inversión en N₂ líquido y ultrasonicación.
13 Seguidamente, se añadieron 3 volúmenes de diclorometano y 1 volumen de agua de
14 manera secuencial. Las muestras fueron incubadas a 4°C durante 20 minutos, y
15 centrifugadas a 15,000 rpm durante 15 minutos a 4°C. La fase orgánica fue recogida y
16 secada bajo una corriente de nitrógeno. Los pellets lipídicos fueron resuspendidos en
17 metanol:tolueno (9:1) para análisis por cromatografía líquida/espectrometría de masas
18 (LC/MS).
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30

31 Los análisis de LC/MS fueron realizados utilizando un sistema UHPLC (1200 series,
32 Agilent Technologies) acoplado a un MS 6550 ESI-QTOF (Agilent Technologies)
33 operando en un modo de ionización positiva por electrospray (ESI+). Los lípidos
34 fueron separados por una cromatografía de fase reversa con un Acquity UPLC C18-
35 RP (ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 μM, Waters).
36
37
38
39
40
41

42 Mediante el análisis por MS/MS se identificaron 36 triglicéridos incrementados por la
43 HFD. Los datos de LC/MS fueron procesados utilizando el software XCMS (versión
44 1.34.0) ¹⁶. Se realizó el sumatorio de las intensidades de las especies individuales
45 como indicador del contenido total de los triglicéridos identificados en cada grupo
46 experimental. El rendimiento de la plataforma se evaluó calculando la desviación
47 estándar relativa de estas características en muestras agrupadas (CVQC) ¹⁷.
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57

58 *Preparación del ARN y análisis de la expresión génica mediante PCR cuantitativa a* 59 *tiempo real* 60 61 62 63 64 65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Los niveles relativos de ARNm fueron analizados por transcriptasa reversa-reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-real time PCR) como se ha descrito previamente^{18, 19}. El ARN total se aisló utilizando el reactivo TRI™ (Sigma-Aldrich; Madrid, España) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La integridad de ARN se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa y se cuantificó con un espectofotómetro NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific; Madrid, España). 1 µg de ARN total fue retro-transcrito utilizando el PrimeScript RT Reagent Kit (Takara Bio; Francia). Los niveles de ARNm fueron determinados por PCR a tiempo real en un equipo ABI PRISM 7900 (Applied Biosystems; CA, USA). Se utilizaron sondas TaqMan (IDT; Leuven, Belgium) de ratón para la detección de la expresión génica de *Cd36* (Mm.PT.58.7548967) y *Pdk4* (Mm.PT.58.9453460). Se analizó el nivel de expresión de TBP (TATA-binding protein) como referencia para la normalización de los resultados¹⁹⁻²¹.

Análisis estadísticos

Los resultados se expresan como la mediana y rango intercuartílico. Las diferencias significativas fueron establecidas mediante U de Mann-Whitney. Las asociaciones entre las variables fueron analizadas mediante el test de correlación de Spearman. Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa informático SPSS (IBM SPSS Statistics, version 22.0). Las diferencias fueron consideradas significativas a partir de $P < 0.05$.

Resultados

1
2 *La resistencia a la insulina inducida por dieta grasa incrementa el contenido lipídico*
3
4 *miocárdico.*

5
6 Para inducir resistencia a la insulina alimentamos ratones con dieta grasa (HFD). Los
7
8 animales alimentados con esta dieta mostraron niveles plasmáticos aumentados de
9
10 glucosa (mediana 360.00; rango intercuartílico 243.00-487.00 mg/dL) e insulina
11
12 (mediana 70.50; rango intercuartílico 23.79-158.29 pg/dL) comparados con los
13
14 animales control alimentados con una dieta estándar (STD) ((glucosa: mediana
15
16 185.00; rango intercuartílico 127.00-223.00 mg/dL); (insulina: mediana 23.79; rango
17
18 intercuartílico 7.12-68.52 pg/dL)) ($p < 0.05$). Como consecuencia, los animales
19
20 alimentados con dieta grasa presentaban un índice HOMA de resistencia a la insulina
21
22 superior a los animales control (Figura 1A). Estos animales mostraron un contenido
23
24 miocárdico de lípidos superior a los animales control (Figura 1C). Mediante una
25
26 aproximación metabolómica se observó que los animales alimentados con HFD
27
28 presentaban un contenido miocárdico de triglicéridos incrementado ~6 veces respecto
29
30 a los animales alimentados con la dieta control (Figura 1B).

31
32
33
34
35
36
37
38 *El contenido miocárdico de triglicéridos se asocia con los niveles plasmáticos de*
39
40 *glucosa.*

41
42 Dada la estrecha relación entre la DM y la acumulación de grasa ectópica en
43
44 miocardio, en primer lugar analizamos las potenciales asociaciones entre el contenido
45
46 miocárdico de triglicéridos y el metabolismo de la glucosa. Aunque no se encontraron
47
48 correlaciones entre los triglicéridos cardíacos y los niveles plasmáticos de insulina,
49
50 éstos se encontraron positivamente asociados con los niveles plasmáticos de glucosa
51
52 ($r = 0.634$, $p = 0.015$) (Figura 2).

53
54
55
56
57
58 *El contenido miocárdico de triglicéridos se asocia con los niveles plasmáticos de*
59
60 *triglicéridos y VLDL.*

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

A continuación, determinamos la asociación de los triglicéridos cardíacos con el metabolismo lipídico y del colesterol. Como muestra la Figura 3, los triglicéridos cardíacos se asociaron de manera directa con los niveles plasmáticos de triglicéridos ($r = 0.656$, $p = 0.011$) (Figura 3A) y VLDL ($r = 0.660$, $p = 0.007$) (Figura 3B). Sin embargo, no se encontraron asociaciones significativas entre estas moléculas y los niveles plasmáticos de AGL, colesterol total, LDL ni HDL.

El contenido miocárdico de triglicéridos se asocia con los niveles plasmáticos de leptina y resistina.

Dada la función de las adipoquinas como potenciales reguladores del metabolismo energético en corazón, seguidamente analizamos las asociaciones entre los triglicéridos cardíacos y estas moléculas. Los triglicéridos cardíacos no se asociaron con los niveles plasmáticos de adiponectina. Sin embargo, se encontró una correlación directa entre estas moléculas y los niveles plasmáticos de leptina ($r = 0.631$, $p = 0.016$) (Figura 4A) y resistina ($r = 0.643$, $p = 0.018$) (Figura 4B).

El contenido miocárdico de triglicéridos se encuentra inversamente asociado a la expresión de genes que regulan el metabolismo energético cardíaco.

Puesto que la acumulación ectópica de grasa en miocardio se encuentra finamente regulada por la utilización preferente de los sustratos metabolizados para la producción de energía, finalmente analizamos el contenido de triglicéridos cardíacos con la expresión de dos genes claves en la regulación de estos procesos. Los triglicéridos cardíacos se encontraron inversamente relacionados con la expresión cardíaca del transportador de ácidos grasos *Cd36* ($r = -0.565$, $p = 0.035$) (Figura 5A) y con la *Piruvato deshidrogenas kinasa 4 (Pdk4)* ($r = -0.807$, $p < 0.001$) (Figura 5B).

Discusión

1
2 Numerosas evidencias proponen la acumulación ectópica de grasa en corazón como
3
4 uno de los principales precursores de la disfunción miocárdica de etiología diabética ⁴
5
6 ⁸. Sin embargo, los mecanismos moleculares que subyacen al acumulo intramiocelular
7
8 de lípidos en individuos diabéticos no son plenamente conocidos, y hasta el momento,
9
10 ninguna de las moléculas propuestas como potenciales biomarcadores del contenido
11
12 de grasa miocárdica han sido utilizados para el diagnóstico clínico de esta patología.
13
14 En este trabajo, estudiamos las potenciales asociaciones entre el contenido
15
16 miocárdico de triglicéridos y distintos componentes plasmáticos en un modelo murino
17
18 de resistencia a la insulina inducido por dieta grasa.
19
20
21
22
23

24 Tal y como describimos previamente, la dieta grasa indujo resistencia a la insulina en
25
26 nuestros animales, evidenciada por un aumento en los niveles plasmáticos de glucosa
27
28 e insulina, así como un índice HOMA incrementado, en comparación con los animales
29
30 alimentados con una dieta estándar ²². Los animales resistentes a la insulina
31
32 presentaban un perfil bioquímico plasmático característico de la DM, caracterizado por
33
34 niveles plasmáticos elevados de AGL, triglicéridos, resistina y leptina, y niveles
35
36 reducidos de adiponectina plasmática ²². Además, estos animales mostraban niveles
37
38 plasmáticos aumentados de VLDL, sin mostrar cambios en los niveles de colesterol
39
40 total, LDL y HDL. Interesantemente, los animales alimentados con dieta grasa
41
42 presentaban el contenido de triglicéridos cardíacos aumentados, sugiriendo que la
43
44 acumulación de lípidos observada en estos animales podía predisponer a un mayor
45
46 riesgo de IC en estados más avanzados de la patología.
47
48
49
50
51
52

53 Con el objetivo de identificar potenciales biomarcadores plasmáticos relacionados con
54
55 la acumulación ectópica de grasa en corazón, realizamos estudios de asociación entre
56
57 el contenido cardíaco de triglicéridos y los principales componentes plasmáticos que
58
59 se encuentran alterados en la DM. En primer lugar exploramos la asociación entre
60
61
62
63
64
65

1 estas moléculas y los niveles plasmáticos de insulina y de glucosa. A pesar de no
2 encontrar asociaciones significativas entre los triglicéridos cardíacos y la insulina,
3 éstos se encontraron directamente asociados con la glucosa plasmática, subrayando
4 la relación existente entre la DM y la esteatosis del miocardio. Además, los triglicéridos
5 cardíacos se encontraron directamente asociados con los niveles plasmáticos de
6 triglicéridos y VLDL, indicando que estas moléculas podrían vehicular el transporte
7 de los triglicéridos hacia el miocardio.
8
9

10
11
12
13
14
15
16
17 Puesto que el tejido adiposo participa en la regulación de distintos procesos
18 metabólicos, como la resistencia a la insulina en tejidos periféricos, decidimos explorar
19 si este tejido podría participar además en la acumulación ectópica de grasa en
20 corazón, a través de la utilización de distintas adipoquinas como agentes implicados
21 en la comunicación entre ambos tejidos. Nuestros resultados mostraron una
22 correlación positiva entre los niveles plasmáticos de leptina y resistina con el contenido
23 de triglicéridos cardíaco, sugiriendo una participación directa de estas moléculas en la
24 acumulación ectópica de grasa en corazón.
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36

37 Finalmente, para explorar los mecanismos moleculares implicados en la acumulación
38 de lípidos cardíacos, analizamos las potenciales asociaciones de los triglicéridos
39 cardíacos con la expresión de dos de los principales genes implicados en la regulación
40 del sustrato utilizado para la producción de energía en corazón, el transportador de
41 ácidos grasos *Cd36* y *Pdk4*. Mientras que *Cd36* facilita la captación de los ácidos
42 grasos por el cardiomiocito, y por lo tanto la utilización de los mismos, *Pdk4* inhibe la
43 entrada de piruvato a la mitocondria a través de la inhibición de la piruvato
44 deshidrogenasa, bloqueando por tanto la obtención de energía procedente de la
45 glucosa. Nuestros resultados muestran que la expresión de ambos genes se
46 encuentra inversamente relacionada con el contenido de triglicéridos cardíacos,
47 sugiriendo que un contenido elevado de estas moléculas podría estar relacionado con
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 una adaptación metabólica a nivel transcripcional dirigida a preparar a la célula para
2 reducir la captación de ácidos grasos y potenciar la utilización de glucosa.
3

4
5
6 En resumen, nuestros resultados muestran que el contenido de triglicéridos cardíaco
7 se encuentra asociado con un perfil bioquímico alterado y con una reprogramación de
8 la expresión de genes dirigida a atenuar el impacto de la acumulación ectópica de
9 lípidos en miocardio. Sin embargo, se necesitan más estudios para validar nuestros
10 resultados en humanos y explorar si la adaptación transcripcional es suficiente para
11 revertir/atenuar el impacto de la resistencia a la insulina en cuanto a la utilización de
12 sustrato y la acumulación intracelular de lípidos se refiere.
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Bibliografía

1. Dirkx E, Schwenk RW, Glatz JF, Luiken JJ, van Eys GJ. High fat diet induced diabetic cardiomyopathy. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2011;85:219-25.
2. Cohen-Solal A, Beauvais F, Logeart D. Heart failure and diabetes mellitus: epidemiology and management of an alarming association. *J Card Fail*. 2008;14:615-25.
3. Roberts AW, Clark AL, Witte KK. Review article: Left ventricular dysfunction and heart failure in metabolic syndrome and diabetes without overt coronary artery disease-do we need to screen our patients? *Diab Vasc Dis Res*. 2009;6:153-63.
4. Sharma S, Adroque JV, Golfman L, Uray I, Lemm J, Youker K, et al. Intramyocardial lipid accumulation in the failing human heart resembles the lipotoxic rat heart. *FASEB J*. 2004;18:1692-700.
5. Levelt E, Mahmood M, Piechnik SK, Ariga R, Francis JM, Rodgers CT, et al. Relationship Between Left Ventricular Structural and Metabolic Remodeling in Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 2016;65:44-52.
6. McGavock JM, Lingvay I, Zib I, Tillery T, Salas N, Unger R, et al. Cardiac steatosis in diabetes mellitus: a 1H-magnetic resonance spectroscopy study. *Circulation*. 2007;116:1170-5.
7. Ng AC, Delgado V, Bertini M, van der Meer RW, Rijzewijk LJ, Hooi Ewe S, et al. Myocardial steatosis and biventricular strain and strain rate imaging in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation*. 2010;122:2538-44.
8. Rijzewijk LJ, van der Meer RW, Smit JW, Diamant M, Bax JJ, Hammer S, et al. Myocardial steatosis is an independent predictor of diastolic dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52:1793-9.
9. Bonen A, Holloway GP, Tandon NN, Han XX, McFarlan J, Glatz JF, et al. Cardiac and skeletal muscle fatty acid transport and transporters and triacylglycerol and fatty acid oxidation in lean and Zucker diabetic fatty rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009;297:R1202-12.
10. Erion DM, Shulman GI. Diacylglycerol-mediated insulin resistance. *Nat Med*. 2010;16:400-2.
11. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:2548-56.
12. Furuhashi M, Tuncman G, Gorgun CZ, Makowski L, Atsumi G, Vaillancourt E, et al. Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2. *Nature*. 2007;447:959-65.
13. Girona J, Rodriguez-Borjabad C, Ibarretxe D, Heras M, Amigo N, Feliu A, et al. Plasma inducible degrader of the LDLR, soluble low-density lipoprotein receptor, and proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 levels as potential biomarkers of familial hypercholesterolemia in children. *Journal of clinical lipidology*. 2018;12:211-8.
14. 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;28:412-9.
15. Mehlem A, Hagberg CE, Muhl L, Eriksson U, Falkevall A. Imaging of neutral lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease. *Nat Protoc*. 2013;8:1149-54.
16. Smith CA, Want EJ, O'Maille G, Abagyan R, Siuzdak G. XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Anal Chem*. 2006;78:779-87.
17. Vinaixa M, Samino S, Saez I, Duran J, Guinovart JJ, Yanes O. A Guideline to Univariate Statistical Analysis for LC/MS-Based Untargeted Metabolomics-Derived Data. *Metabolites*. 2012;2:775-95.
18. Rodriguez-Calvo R, Vazquez-Carrera M, Masana L, Neumann D. AICAR Protects against High Palmitate/High Insulin-Induced Intramyocellular Lipid Accumulation and

1 Insulin Resistance in HL-1 Cardiac Cells by Inducing PPAR-Target Gene Expression.
2 PPAR Res. 2015;2015:785783.

3 19. Rodriguez-Calvo R, Guadall A, Calvayrac O, Alonso J, Ferran B, Marti I, et al. [The
4 nuclear receptor NOR-1 regulates the activation of vascular cells and vascular
5 remodelling in response to hemodynamic stress]. Clin Investig Arterioscler.
6 2014;26:66-75.

7 20. Rodriguez-Calvo R, Guadall A, Calvayrac O, Navarro MA, Alonso J, Ferran B, et al.
8 Over-expression of neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) exacerbates neointimal
9 hyperplasia after vascular injury. Hum Mol Genet. 2013;22:1949-59.

10 21. Calvayrac O, Rodriguez-Calvo R, Marti-Pamies I, Alonso J, Ferran B, Aguilo S, et
11 al. NOR-1 modulates the inflammatory response of vascular smooth muscle cells by
12 preventing NFkappaB activation. J Mol Cell Cardiol. 2015;80:34-44.

13 22. Bosquet A, Girona J, Guaita-Esteruelas S, Heras M, Saavedra-Garcia P, Martinez-
14 Micaelo N, et al. FABP4 inhibitor BMS309403 decreases saturated-fatty-acid-induced
15 endoplasmic reticulum stress-associated inflammation in skeletal muscle by reducing
16 p38 MAPK activation. Biochimica et biophysica acta Molecular and cell biology of
17 lipids. 2018;1863:604-13.
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2 *Figura 1. Ratonés resistentes a la insulina presentan niveles de lípidos miocárdicos*
3 *aumentados.*

4 Los animales fueron alimentados con una dieta estándar (STD) o grasa (HFD) durante
5 12 semanas. (A) Índice HOMA de resistencia a la insulina. (B) Niveles de triglicéridos
6 miocárdicos. (C) Imágenes representativas de la tinción de lípidos por Oil Red O en
7 corazones de ratones alimentados con dieta estándar o grasa. Los datos se expresan
8 como la mediana y rango intercuartílico. ^a*P*<0,05; ^{aa}*P*<0,01 vs. STD.
9

10
11
12
13
14
15
16
17 *Figura 2. El contenido miocárdico de triglicéridos se asocia con los niveles plasmáticos*
18 *de glucosa.*

19 Resultados del test de la correlación de Spearman mostrando la asociación entre el
20 contenido miocárdico de triglicéridos miocárdico y los niveles plasmáticos de glucosa.
21

22
23
24
25
26
27
28 *Figura 3. El contenido miocárdico de triglicéridos se asocia con los niveles plasmáticos*
29 *de triglicéridos y VLDL.*

30 Resultados del test de la correlación de Spearman mostrando la asociación entre el
31 contenido miocárdico de triglicéridos miocárdico y los niveles plasmáticos de
32 triglicéridos (A) y VLDL (B).
33

34
35
36
37
38
39
40
41
42 *Figura 4. El contenido miocárdico de triglicéridos se asocia con los niveles plasmáticos*
43 *de leptina y resistina.*

44 Resultados del test de la correlación de Spearman mostrando la asociación entre el
45 contenido miocárdico de triglicéridos miocárdico y los niveles plasmáticos de leptina
46 (A) y resistina (B).
47

48
49
50
51
52
53
54
55 *Figura 5. El contenido miocárdico de triglicéridos se encuentra inversamente*
56 *asociados a la expresión de Cd36 y Pdk4.*
57
58
59
60
61
62
63
64
65

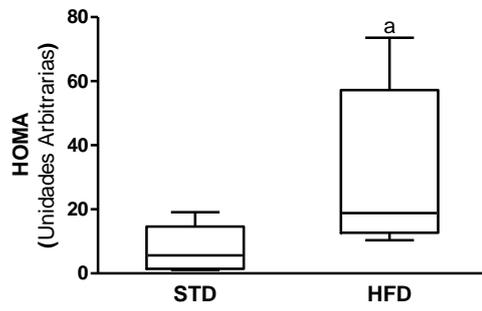
Resultados del test de la correlación de Spearman mostrando la asociación entre el contenido miocárdico de triglicéridos miocárdico y los niveles cardíacos de ARNm de *Cd36* (A) y *Pdk4* (B).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

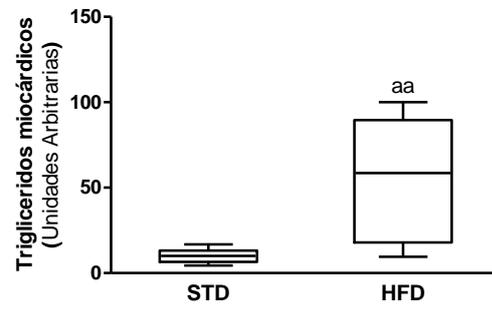
Figura 1.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

A



B



C

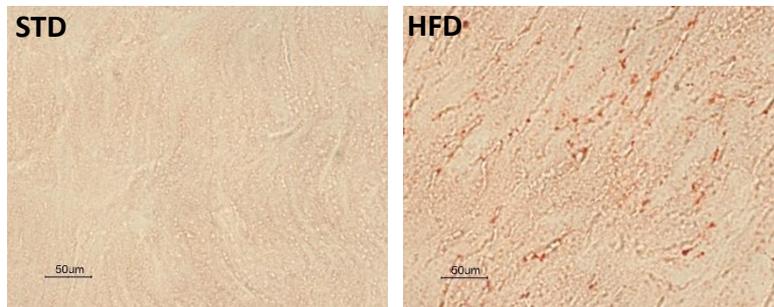
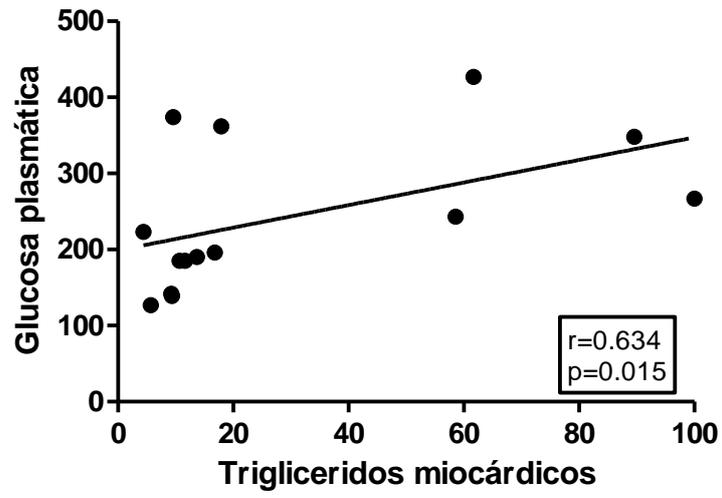


Figura 2.

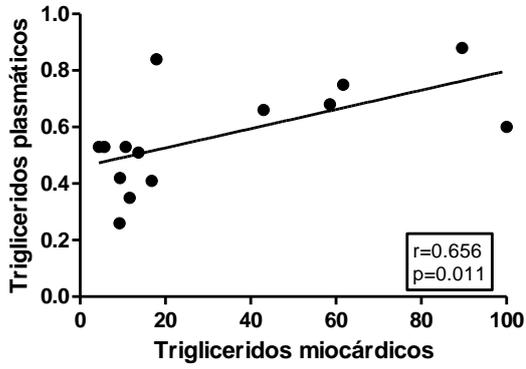


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figura 3.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

A



B

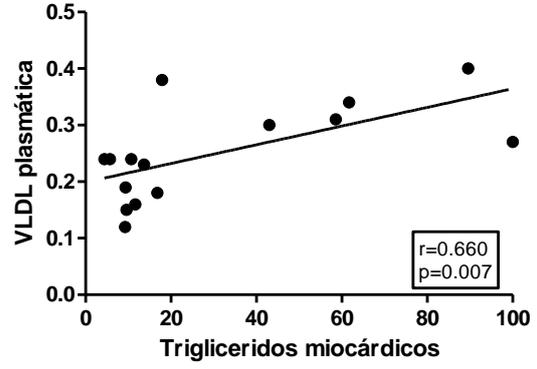
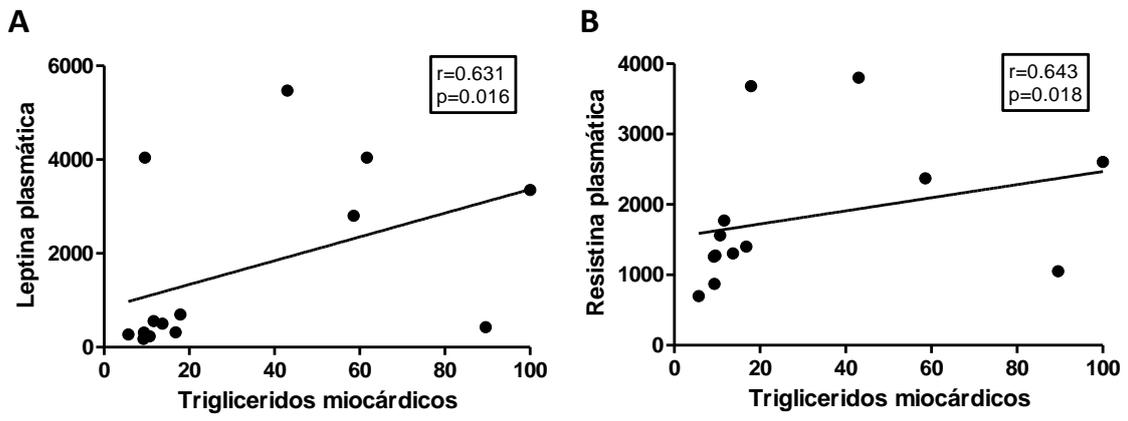
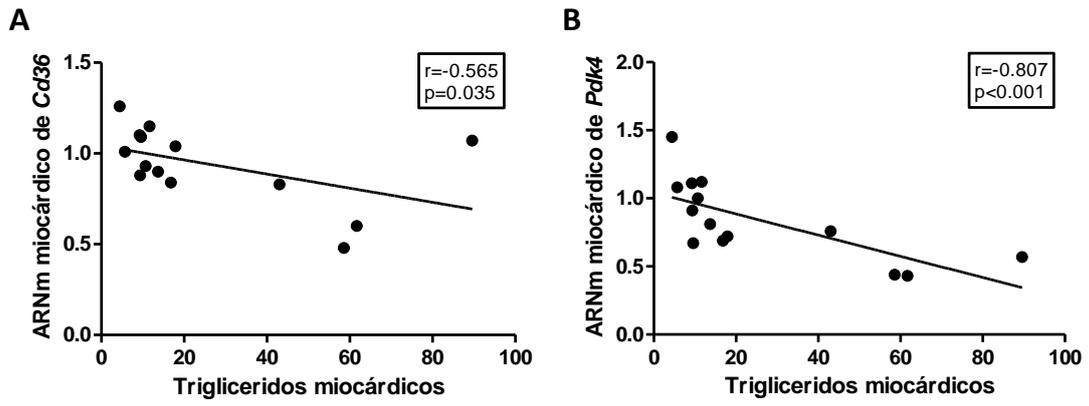


Figura 4.



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figura 5.



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65