



REGULACIÓ DE FABP4 DEPENDENT DE NRF2 EN MACRÒFAGS Iolanda Lázaro López

ISBN: 978-84-693-8852-5
Dipòsit Legal: T.1952-2010

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Iolanda Lázaro López

Regulació de FABP4 dependent de Nrf2 en macròfags

TESI DOCTORAL

dirigida pel Prof. Lluís Masana Marín i la Dra. Anna Cabré Llobet

Unitat de Recerca en Lípids i Arteriosclerosi

Departament de Medicina i Cirurgia



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Reus, 2010

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
REGULACIÓ DE FABP4 DEPENDENT DE NRF2 EN MACRÒFAGS
Iolanda Lázaro López
ISBN:978-84-693-8852-5/DL:T.1952-2010

Autorització del director/a o codirector/s/a/es de la tesi doctoral

DADES IDENTIFICATIVES DE LA TESI DOCTORAL	
Títol de la tesi doctoral Regulació de FABP4 depenent de Nrf2 en macròfags	
Doctorand/a IOLANDA LÁZARO LÓPEZ	
Programa de Doctorat / Programa Oficial de Postgrau NUTRICIÓ I METABOLISME	
Departament MEDICINA I CIRURGIA	Grup de recerca Unitat de Recerca en Lípids i Arteriosclerosi
Director/a Prof. LLUÍS MASANA MARÍN	Correu electrònic del Director/a luis.masana@urv.cat
Codirector/a Dra. ANNA CABRÉ LLOBET	Correu electrònic del Codirector/a anna.cabre@urv.cat
Tutor/a (si s'escau)	Correu electrònic del Tutor/a

INFORME DEL DIRECTOR DE TESI		
El/s (co)director/s sotasignats emeten l'informe de la tesi doctoral presentada a tràmit de dipòsit, en base a la revisió dels següents elements de qualitat:		
	SÍ	NO
La tesi consisteix en un treball original de recerca	X	
El títol reflecteix acuradament el contingut de la tesi	X	
Les hipòtesis i/o els objectius de la tesi estan clarament formulats	X	
La metodologia està descrita	X	
Hi consta el procediment	X	
Hi consten els resultats i la discussió dels mateixos	X	
Les conclusions de la tesi corresponen a les hipòtesis i/o objectius formulats	X	
La bibliografia està ben reflectida	X	
D'aquesta tesi es deriven les següents aportacions científiques:		
- 2,4-decadienal upregulates FABP4 expression via Nrf2-dependent mechanism in human macrophages Lázaro I, Cabré A, Girona J, Masana L. (manuscrit en procés d'elaboració)		
En paral·lel al desenvolupament de la tesi, s'han produït 8 treballs en l'àmbit de la FABP4 circulant: 5 publicats en revistes internacionals i de primer quartil; i, 3 sotmesos per publicació.		
Altres comentaris sobre la qualitat de la tesi:		

I en conclusió, s'emet l'informe FAVORABLE pel tràmit de dipòsit de la tesi doctoral i posterior defensa pública.

Reus, 9 de juliol de 2010

Nom i cognoms LLUÍS MASANA MARÍN

Nom i cognoms ANNA CABRÉ LLOBET

Director/a de la tesi

Codirector/a (si s'escau)

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
REGULACIÓ DE FABP4 DEPENDENT DE NRF2 EN MACRÒFAGS
Iolanda Lázaro López
ISBN:978-84-693-8852-5/DL:T.1952-2010

El punt d'inflexió, a nivell professional i personal, que representa aquesta tesi em serveix d'excusa per mirar enrere i agrair a totes aquelles persones que han contribuït, sigui de la forma que sigui, a què me n'hagi sortit amb aquest projecte.

Un estiu, ja fa quasi mil anys, vaig arribar a la Unitat de Recerca en Lípids i Arteriosclerosi per fer pràctiques i conèixer què era exactament això del món de la recerca. D'aquell primer tastet, n'ha resultat aquesta tesi. Per tant, voldria donar les gràcies al Prof. Lluís Masana Marín, com a director de la Unitat de Recerca en Lípids i Arteriosclerosi, per proporcionar-me l'oportunitat de treballar i formar part d'aquest grup durant aquests anys. En segon lloc, voldria donar-li també les gràcies com a director de tesi. Per mi, ha estat un privilegi treballar i aprendre dia a dia d'una persona de tanta vàlua i per la confiança que m'ha estat transmesa. El contrast entre les visions clínica i bàsica m'ha ensenyat a trobar un sentit a la recerca i no perdre la perspectiva entre macròfags THP-1 i Western blots. El treball diari de la direcció de la tesi l'ha dut a terme la Dra. Anna Cabré Llobet, a la qual voldria donar les gràcies per transmetre'm amb paciència i comprensió tots els seus coneixements, pel treball colze a colze al laboratori, per les reunions productives de les set de la tarda, pel suport incondicional i la confiança, per mil coses... En definitiva, per enfrontar-nos juntes al repte dual d'aprendre "el com dirigir" i "el com fer" una tesi. Moltes gràcies, Anna. Una altra part important han estat tots els companys i companyes que formen i han format part de la URLA durant aquests anys, als quals voldria agrair l'ajuda i el suport que m'heu donat, a part de les moltes estones agradables que hem passat junts.

Durant aquest temps, hem pogut comptar amb els companys de les unitats de recerca veïnes que, com a bons veïns, sempre han estat disposats a ajudar-nos en qualsevol moment. Al CRB, el Gerard, l'Anna, el Raül, la Judit i el Fernando; així com, els responsables del laboratori, el Dr. Jorge Joven i el Dr. Jordi Camps. L'Esperanza Rodríguez de la Unitat de Farmacologia, la Núria Besalduch de la Unitat d'Histologia i la Marta Rodríguez d'Oncologia. I, també les companyes de la Unitat de Psiquiatria.

Alguns dels treballs realitzats en aquest temps, s'han pogut dur a terme gràcies a la col·laboració amb altres investigadors amb els quals ha estat sempre molt enriquidor treballar; voldria destacar al Dr. Blai Coll i al Dr. Carlos Alonso-Villaverde. També voldria enrecordar-me molt especialment de la Dra. Mònica Tous i la Dra. Neus Franco, que sempre han estat a punt per ajudar en el que calgués, us estic molt agraïda. I, també, al grup del Dr. Jesús Egido de la Fundació Jiménez-Díaz, per acollir-me en la meva breu estada i l'ajuda que em van proporcionar.

Durant aquests anys, ha estat molt important el fet que quan sortia del laboratori, em trobés una colla de gent que sempre tenia temps per preguntar-me com anaven les “nenes”, que donava suport moral animant de manera incondicional, o que tenia temps per anar a la piscina o per fer cervesetes terapèutiques. No voldria oblidar-me de ningú, però ja sabeu que us estic molt agraïda.

Al Mariano i la Karina, i el nostre agermanament Bahía Blanca-Reus.

Als soparets i les estonetes amb la Gemma Montagut i la Noemí Serra, i tots els que ens queden per fer, sigui on sigui que anem a parar (Sheffield, Brussel·les, Tarragona o *wherever*).

A la Roser, i a la seva petita família d’*“hòmens”*.

Al Javi, per tots aquests anys d’amistat que van començar en un laboratori de pràctiques a la Facultat de Química i que espero que en siguin molts més.

A la meva família, molt especialment, als meus avis. Porque esta tesis es el resultado de cosas tan pequeñas pero tan importantes como el tiempo que he pasado con vosotros.

A la Carme i al Josep Maria. Per aconsellar-me, ensenyar-me, donar-me suport en el que calgués i estar sempre. En definitiva, ser els meus referents i els meus models a seguir. És molt difícil, però espero haver après com fer-ho i poder-ho posar en pràctica amb els vostres *little monsters*.

A l’Enrique i la Mari, els meus pares. Per tot. Sembla tòpic, però no tinc paraules ni sé com expressar tot els que us dec, que és moltíssim. Aquesta tesi és per i gràcies a vosaltres.

...i a vegades ens en sortim!
Captatio Benevolentiae (Manel)

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
REGULACIÓ DE FABP4 DEPENDENT DE NRF2 EN MACRÒFAGS
Iolanda Lázaro López
ISBN:978-84-693-8852-5/DL:T.1952-2010

Índex

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
REGULACIÓ DE FABP4 DEPENDENT DE NRF2 EN MACRÒFAGS
Iolanda Lázaro López
ISBN:978-84-693-8852-5/DL:T.1952-2010

Presentació i justificació	19
Introducció	23
1. <i>Adipocyte fatty acid-binding protein</i> (A-FABP o FABP4)	23
1.1 FABP4: definició, estructura, localització i funció	23
1.2 FABP4: expressió i regulació	28
1.3 FABP4: en macròfag i cèl·lula escumosa	30
1.4 FABP4: biomarcador d'alteracions metabòliques	33
1.4.1 FABP4, obesitat i síndrome metabòlica	33
1.4.2 FABP4, oxidació, dany tissular i resposta inflamatòria	39
1.4.3 FABP4, resistència a la insulina i diabetis tipus 2	43
1.4.4 FABP4 i malaltia cardiovascular	47
1.4.5 FABP4: diana terapèutica	48
2. Sistema de defensa antioxidant: Keap1-Nrf2-ARE	52
2.1 Keap1-Nrf2-ARE: descripció del sistema	52
2.1.1 <i>Antioxidant Response Elements</i> (ARE)	53
2.1.2 Nrf2: descripció i activitat	54
2.1.2.1 Supressió de l'activitat de Nrf2 i promoció de la seva degradació per part de Keap1 en condicions homeostàtiques	56
2.1.2.2 Activació de Nrf2: alliberament de la repressió de Keap1 en condicions d'estrès oxidatiu	59
2.1.2.3 Activació de Nrf2: vies implicades en el mecanisme d'alliberament de Keap1 en condicions d'estrès oxidatiu	61
2.1.2.4 <i>Loops</i> auto-regulatoris del sistema Keap1-Nrf2-ARE	65
2.2 Keap1-Nrf2-ARE: implicació en la regulació gènica de la defensa antioxidant	66
Hipòtesi i objectius	73
Materials i mètodes	77
1. Estudi <i>in silico</i> de la seqüència del promotor del gen FABP4 humà	77
2. Cultiu de cèl·lules THP-1	79
2.1 Incubacions amb aldehids apolars: DDE i hexanal	80
2.1.1 Valoració de l'efecte de la incubació amb aldehids sobre la transformació a cèl·lules escumoses	81

2.1.2	Estudi dosi-resposta dels aldehids per definir la concentració per les incubacions dels experiments	81
2.1.3	Estudis temps-resposta a partir de la concentració definida dels aldehids	81
2.1.4	Efecte de la inhibició de la transcripció i la traducció	82
2.1.5	Estabilització del mRNA de FABP4	83
2.2	Incubacions amb el control positiu de l'expressió de FABP4: BRL	83
2.2.1	Valoració de l'efecte de la incubació sobre la transformació a cèl·lules escumoses	83
2.2.2	Efecte sobre l'expressió gènica i proteica de FABP4	84
2.3	Incubacions amb el control positiu de l'activació de Nrf2: <i>tert-butyl hydroquinone</i>	84
2.3.1	Efecte sobre l'expressió gènica i proteica de FABP4	85
2.3.2	Efecte sobre l'activació de Nrf2	85
2.4	Incubacions amb l'inhibidor de la síntesi proteica: cicloheximida	85
2.4.1	Valoració de la síntesi <i>de novo</i> de Nrf2	86
2.4.2	Valoració de la síntesi <i>de novo</i> de proteïnes implicades en la transcripció	86
2.5	Incubacions amb l'inhibidor de la transcripció: actinomicina D	86
2.5.1	Efecte de la inhibició de la transcripció sobre la inducció de mRNA de FABP4	87
2.5.2	Estabilització del mRNA de FABP4	87
3.	Citotoxicitat	87
4.	Determinació de l'expressió gènica. Aïllament del RNA. RT i PCR a temps real.	88
4.1	Aïllament i quantificació del RNA total	88
4.2	RT i PCR a temps real	89
4.2.1	RT: transcripció inversa	89
4.2.2	PCR a temps real	90
5.	Determinació de l'expressió proteica. Extracció de proteïnes nuclears i citoplasmàtiques. Western blot. Immunofluorescència.	93
5.1	Extracció de proteïnes nuclears i citoplasmàtiques	93
5.2	Western blot	94
5.2.1	Controls de càrrega en els Western blots	94
5.2.2	Optimització de la tècnica de Western blot per la detecció del factor de transcripció Nrf2 a nivell citoplasmàtic i nuclear	96
5.3	Immunofluorescència	98
6.	Immunoprecipitació de la cromatina	99

7.	Estudi <i>ex vivo</i> per relacionar els nivells circulants de FABP4 amb l'activació sistèmica de Nrf2	100
7.1	Descripció dels pacients	100
7.2	Determinació dels nivells circulants de FABP4	101
7.3	Obtenció i processament de cèl·lules mononuclears de sang perifèrica	101
7.4	Determinació de l'activació sistèmica de Nrf2	102
8.	Processament de les dades. Anàlisi estadística.	103
8.1	Expressió gènica	103
8.1.1	Quantificació relativa de l'expressió gènica: mètode del $2^{-\Delta\Delta Ct}$	103
8.1.2	Tractament de les dades en funció de l'experiment	104
8.1.2.1	Model experimental a temps únic	104
8.1.2.2	Model experimental de cinètica temporal	104
8.2	Expressió proteica	105
8.2.1	FABP4 a temps únic	106
8.2.2	FABP4 en cinètica temporal	106
8.2.3	Nrf2 fosforilat en cinètica temporal	107
8.2.4	Nrf2 fosforilat a temps únic	107
8.2.5	Proteïnes quinases	107
8.3	MatInspector	108
8.4	GraphPad PRISM	109
8.5	Anàlisi estadística – SPSS	109
9.	Procediments Normalitzats de Treball (PNT)	109
PNT-PO0709-URLA-38	Estudi del promotor d'un gen amb el programari MatInspector	111
PNT-PO0709-URLA-13	Cèl·lules THP-1 (DSMZ)	113
PNT-PO0709-URLA-37	CellTiter-Glo Luminiscent Cell Viability Assay	118
PNT-PO0709-URLA-29	Extracció RNA 6100	120
PNT-PO0709-URLA-33	Transcripció inversa (RT)	122
PNT-PO0709-URLA-30	PCR a temps real	124
PNT-PO0709-URLA-10	Extractes de proteïnes nuclears cel·lulars	126
PNT-PO0709-URLA-03	SDS-PAGE	130
PNT-PO0709-URLA-23	Transferència de proteïnes de gel a membrana	133
PNT-PO0709-URLA-46	Hibridació de membranes per la detecció de proteïnes	136
PNT-PO0709-URLA-18	Cèl·lules HCASMC	139
PNT-PO0709-URLA-47	Marcatge per immunofluorescència de cèl·lules	140
PNT-PO0709-URLA-42	Immunoprecipitació de la cromatina (Nrf2)	142

PNT-PO0709-URLA-11	Human Adipocyte FABP ELISA – FABP4	145
PNT-PO0709-URLA-45	Aïllament i congelació de cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMCs)	149
PNT-PO0709-URLA-44	TransAM Nrf2 (Active Motif)	151
Resultats			159
1.	Efecte de la repetició de dosi dels aldehids sobre l'expressió gènica de FABP4	159
2.	Corbes dosi-resposta dels aldehids sobre l'expressió proteica de FABP4	160
3.	Expressió gènica de FABP4 induïda per la dosi definida dels aldehids	161
4.	Efecte del tBHQ sobre l'expressió gènica i proteica de FABP4	162
5.	Efecte del tBHQ sobre la fosforilació de Nrf2	164
6.	Nrf2 s'uneix a un lloc ARE localitzat al promotor de la FABP4 humana	165
7.	L'activació de Nrf2 és necessària per la inducció de l'expressió de FABP4 mediada per DDE però no per la de l'hexanal	168
8.	Temps-resposta DDE: proteïna i RNA FABP4	171
9.	La inducció de FABP4 a nivell transcripcional mediada per DDE es dona per l'estabilització del mRNA de FABP4 en els macròfags THP-1	173
10.	Vies senyalització implicades en la fosforilació de Nrf2 induïda pel DDE	174
11.	Assaigs d'immunofluorescència	178
11.1	Efecte de la incubació amb el DDE sobre l'expressió proteica de FABP4	178
11.2	Efecte de la incubació amb el DDE sobre la translocació a nucli de la forma fosforilada de Nrf2	178
11.3	Efecte de la incubació amb el DDE sobre l'activació de la via de senyalització PI-3k/Akt	179
12.	Relació entre els nivells circulants de FABP4 i l'activació sistèmica de Nrf2 <i>ex vivo</i>	181
Discussió			185
Conclusions			203
Referències			207
Annexos			235
A1. Treballs publicats			235
1.	Fatty acid binding protein 4 is increased in metabolic syndrome and with thiazolidinedione treatment in diabetic patients. Cabré A, <u>Lázaro I</u> , Girona J, Manzanares JM, Marimón F, Plana N, Heras M, Masana L. <i>Atherosclerosis</i> 2007; 195:e150-e158.		

2. The fatty acid binding protein 4 (FABP4) is a strong biomarker of metabolic syndrome and lipodystrophy in HIV-infected patients.
Coll B, Cabré A, Alonso-Villaverde C, Lázaro I, Aragonès G, Parra S, Girona J, Masana L.
Atherosclerosis 2008; 199:147-153.
3. Plasma fatty acid binding protein 4 is associated with atherogenic dyslipidemia in diabetes.
Cabré A, Lázaro I, Girona J, Manzanares JM, Marimón F, Plana N, Heras M, Masana L.
J Lipid Res 2008; 49:1746-1751.
4. FABP4 plasma levels are increased in familial combined hyperlipidemia.
Cabré A, Lázaro I, Cofán M, Jarauta E, Plana N, García-Otín AL, Ascaso JF, Ferré R, Civeira F, Ros E, Masana L.
J Lipid Res 2010; 51:1173-1178.
5. Plasma fatty acid-binding protein 4 increases with renal dysfunction in type 2 diabetic patients without microalbuminuria.
Cabré A, Lázaro I, Girona J, Manzanares JM, Marimón F, Plana N, Heras M, Masana L.
Clin Chem 2008; 54:181-187.
6. Lifestyle changes lower adipocyte fatty acid-binding protein plasma concentration in obese patients at cardiovascular risk.
Lázaro I, Ferré R, Plana N, Aragonès G, Girona J, Merino J, Heras M, Masana L, Cabré A.
(submitted for publication)
7. Concentraciones plasmáticas de FABP4 y evolución del síndrome metabólico.
Cabré A, Lázaro I, Plana N, Ferré R, Merino J, Masana L.
(submitted for publication)
8. Fatty acid-binding protein-4 plasma levels are associated to metabolic abnormalities and response to therapy in girls and young women with androgen excess.
Lázaro I, Díaz M, Cabré A, Masana L, Ibáñez L
(submitted for publication)

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
REGULACIÓ DE FABP4 DEPENDENT DE NRF2 EN MACRÒFAGS
Iolanda Lázaro López
ISBN:978-84-693-8852-5/DL:T.1952-2010

Presentació i Justificació

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
REGULACIÓ DE FABP4 DEPENDENT DE NRF2 EN MACRÒFAGS
Iolanda Lázaro López
ISBN:978-84-693-8852-5/DL:T.1952-2010

La tesi doctoral que es presenta s'ha desenvolupat a la Unitat de Recerca en Lípids i Arteriosclerosi del Departament de Medicina i Cirurgia de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, de la Universitat Rovira i Virgili sota la direcció del Prof. Lluís Masana Marín, i la codirecció de la Dra. Anna Cabré Llobet.

El principal interès de la Unitat de Recerca en Lípids i Arteriosclerosi ha estat l'estudi del metabolisme lipídic, els mecanismes implicats en l'arteriosclerosi, les seves manifestacions clíniques i els factors de risc associats. La línia d'investigació en què s'ha desenvolupat aquesta tesi deriva del coneixement i l'experiència del grup en els processos d'oxidació i inflamació implicats en el desenvolupament de l'arteriosclerosi, associats a una nova línia en què s'estudien nous biomarcadors d'alteracions metabòliques. En aquest sentit, aquesta tesi s'ha focalitzat en l'estudi de mecanismes intracel·lulars de regulació de la xaperona lipídica intracel·lular que s'erigeix com a nexa dels metabolismes lipídic i glucídic, i en la resposta inflamatòria, la *adipocyte fatty acid-binding protein* (A-FABP o FABP4). Aquesta proteïna citoplasmàtica ha despertat un creixent interès en els darrers anys a causa de la seva identificació a nivell plasmàtic i les associacions trobades amb malalties de component metabòlica, com la síndrome metabòlica, la diabetis tipus 2 i l'arteriosclerosi, que la fan una bona candidata com a biomarcador plasmàtic de la presència i l'evolució d'aquestes malalties. Encara és més interessant el seu potencial com a diana terapèutica per prevenir o combatre el desenvolupament d'aquestes malalties. A nivell intracel·lular, l'expressió de la FABP4 en els macròfags en resposta a les lipoproteïnes modificades oxidativament és clau en l'evolució fenotípica dels macròfags a cèl·lules escumoses, per tant, desencadenant en la formació de la lesió d'ateroma. En aquest treball hem intentat implicar la FABP4 en la resposta antioxidant cel·lular, relacionant-la amb el factor de transcripció Nrf2. Aquest factor de transcripció es considera clau en el lideratge de la resposta antioxidant cel·lular front a una situació d'estrès oxidatiu.

La tesi està estructurada en diferents seccions. La "**Introducció**" se centra bàsicament en els dos actors principals de l'estudi, FABP4 i Nrf2. En relació a la part corresponent a la FABP4, s'ha pretès realitzar una anàlisi detallada del coneixement que es posseeix actualment. A nivell molecular, es presenta el coneixement sobre l'estructura, la regulació de l'expressió i la funcionalitat. I, a nivell del seu paper com a biomarcador d'alteracions metabòliques, s'han tractat els aspectes relacionats amb l'obesitat, la síndrome metabòlica, l'oxidació, la inflamació, la resistència a la insulina i diabetis tipus 2, la malaltia cardiovascular, i, el seu potencial com a diana terapèutica. En l'apartat "**Hipòtesi i objectius**" es justifica el disseny experimental plantejat. En l'apartat de

“**Materials i mètodes**”, es presenta detalladament el disseny dels experiments i les tècniques utilitzades. Com que la nostra unitat treballa segons la norma ISO, en aquest apartat s’inclouen els Procediments Normalitzats de Treball (PNTs). A l’apartat de “**Resultats**”, es presenten els resultats obtinguts a partir del treball experimental realitzat. Aquests resultats són analitzats i contrastats en detall a la “**Discussió**”. I, les evidències trobades es presenten a l’apartat de “**Conclusions**”. Els “**Annexos**” inclouen els treballs realitzats en paral·lel al desenvolupament d’aquesta tesi, que malgrat no formar part dels objectius específics plantejats en aquesta, ens han permès ampliar el coneixement de la FABP4 com a biomarcador metabòlic.

Introducció

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
REGULACIÓ DE FABP4 DEPENDENT DE NRF2 EN MACRÒFAGS
Iolanda Lázaro López
ISBN:978-84-693-8852-5/DL:T.1952-2010

1. *Adipocyte fatty acid-binding protein (A-FABP o FABP4)*

1.1 FABP4: definició, estructura, localització i funció

La *adipocyte fatty acid-binding protein* (A-FABP, FABP4, ALBP o aP2) és una proteïna citoplasmàtica de baix pes molecular (14.7kDa) i caràcter àcid (pI 4.8) formada per 132 aminoàcids que uneix de manera no covalent molècules hidrofòbiques, principalment àcids grassos de cadena llarga, i participa en el seu transport i metabolisme intracel·lulars. La denominació deriva del fet que el primer lloc en què es va descriure va ser l'adipòcit¹⁻³.

FABP4 pertany a la família de les *fatty acid-binding proteins* (FABPs)^{4, 5}. La família FABP es compon de 9 membres, específics de teixit (**Taula 1**), que es caracteritzen perquè els gens que codifiquen aquestes proteïnes deriven d'un mateix gen, molt conservat al llarg de l'evolució^{4, 5}.

Taula 1. Membres de la família FABP, localitzacions d'expressió i cromosòmica

Gen	Teixit de referència	Noms alternatius	Expressió	Localització cromosòmica
FABP1	fetge	L-FABP	fetge , intestí, pàncrees, ronyó, pulmó, estómac	2p11
FABP2	intestí	I-FABP	intestí , estómac, fetge	4q28-q31
FABP3	cor	H-FABP	cor , múscul esquelètic, cervell, ronyó, pulmó, estómac, testicles, aorta, glàndules adrenals, glàndula mamària, placenta, ovari, teixit adipós marró plasma	1p32-p33
FABP4	adipòcit	A-FABP, aP2, ALBP	teixit adipós, adipòcits, macròfags, cèl. escumoses, cèl. dendrítiques, cèl. endotelials, glànd. mamària, epitel·li bronquial, múscul estriat, plasma, placa ateroma	8q21
FABP5	epidermis	E-FABP, mal1, KLBP	pell , llengua, teixit adipós, adipòcits, macròfags, cèl. dendrítiques, glànd. mamària, cervell, intestí, ronyó, fetge, pulmó, cor, múscul esquelètic, testicles, cristal·lí, retina, timus, plasma	8q21.13
FABP6	ili	II-FABP	ili , ovari, glànd. adrenal, estómac	5q33.3-q34
FABP7	cervell	B-FABP	cervell , cèl. glia, retina, glànd. mamària, plasma	6q22-q23
FABP8	mielina	MP2	sistema nerviós perifèric, cèl. Schwann	8q21.2-22.1
FABP9	testicle	T-FABP	testicles , glànd. salivals i mamàries	8q21.13

L'estructura del gen de les FABPs consta de 4 exons i 3 introns. El gen que codifica la FABP4 humana es localitza al cromosoma 8, concretament, a la posició 8q21.3-q22.1⁶ i consta d'una regió promotora a 5.4kb de l'inici de la transcripció (GenBank *accession number* J02874)⁷⁻¹⁰. La raó per la qual es justifica l'especificitat d'expressió en els teixits implica que aquestes proteïnes duguin a terme funcions especialitzades al teixit en què s'expressen⁴. Totes elles uneixen àcids grassos de cadena llarga amb diferències en la selectivitat, l'afinitat i el mecanisme de la unió com a resultat de les petites diferències estructurals existents entre les isoformes¹¹. L'afinitat d'unió varia en funció de la longitud de la cadena i el grau de saturació de l'àcid gras¹¹.

Les proteïnes FABPs presenten, entre elles, una identitat baixa en la seqüència aminoacídica (20-70%). Malgrat aquesta aparent divergència, estudis de cristal·lografia de raigs X han demostrat que aquesta família de proteïnes presenta una estructura terciària comú formant un β -barrel, evolutivament molt conservada (**Figura 1**)⁴.

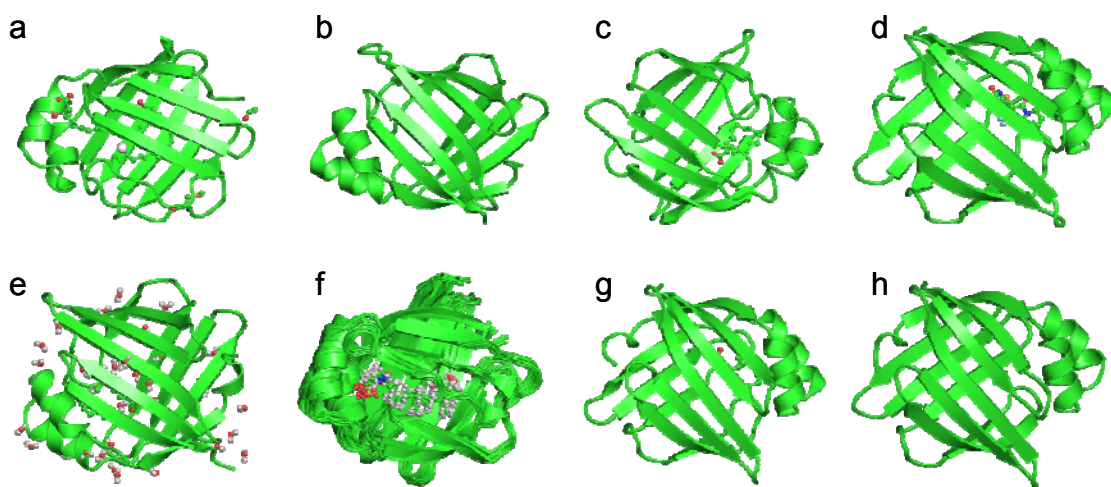


Figura 1. Estructures cristal·lines de les proteïnes FABPs. (a) FABP hepàtica (FABP1) unida a dues molècules d'àcid oleic (PDB: 1lfo). (b) FABP intestinal (FABP2) (PDB: 1dc9). (c) FABP de cor (FABP3) unida a una molècula d'àcid palmític (PDB: 2hmb). (d) FABP d'adipòcit (FABP4) unida a una molècula d'àcid palmític (PDB: 1tou). (e) FABP epidèrmica (FABP5) unida a una molècula d'àcid palmític (PDB: 1b56). (f) FABP ileal (FABP6) unida a una molècula d'àcid biliar (PDB: 1o1v). (g) FABP de cervell (FABP7) unida a una molècula d'àcid oleic (PDB: 1fe3). (h) FABP de mielina (FABP8) unida a una molècula d'àcid oleic (PDB: 1pmp). Imatges de raigs X obtingudes a partir de la base de dades del EBI-EMBL (*European Bioinformatics Institute - European Molecular Biology Laboratory*).

L'estructura en β -barrel es compon de 10 tires β antiparal·leles, lligades per ponts d'hidrogen, que s'organitzen en dues làmines β enfrontades. Aquesta disposició crea una cavitat interna relativament gran, coberta per molècules d'aigua i folrada tant per aminoàcids polars com apolars, en què les cadenes s'estenen cap a la cavitat¹². Encara que el volum de la cavitat és sensiblement més gran que el propi d'un àcid gras, l'estequiometria d'unió és 1:1. El tipus específic de fetge constitueix l'excepció perquè és l'única FABP capaç d'unir 2 molècules simultàniament¹³. En unir-se a la cavitat, l'àcid gras desplaça part de les molècules d'aigua que es troben a l'interior i s'orienta de manera que el grup carboxil queda situat a l'interior de la cavitat i ocupa una tercera part del volum total. A l'extrem N-terminal de les FABPs, es troba un motiu hèlix-loop-hèlix que forma una estructura similar a una tapa a l'extrem superior del barril. S'ha suggerit que aquesta estructura, mitjançant canvis conformacionals transitoris al voltant del lloc on es troba, permet l'entrada i la sortida a la cavitat de l'àcid gras o la molècula hidrofòbica¹⁴.

La funció de la FABP4 i les altres FABPs *in vivo* no està totalment caracteritzada. Com a xaperones lipídiques, les FABPs faciliten activament el transport de lípids a compartiments específics de la cèl·lula: a les *lipid droplets* per l'emmagatzematge energètic; cap al reticle endoplasmàtic per senyalització, el trànsit i la síntesi de membranes; a la mitocòndria o els peroxisomes per a l'oxidació; i a determinats enzims citosòlics, on modulant l'activitat en el metabolisme dels àcids grassos; o, protegeix enzims i membranes dels efectes nocius d'un excés d'àcids grassos; cap al nucli per la regulació transcripcional dirigida per lípids; o, fins i tot, cap a l'exterior de la cèl·lula per senyalització autocrina o paracrina^{4, 13-18} (Figura 2).

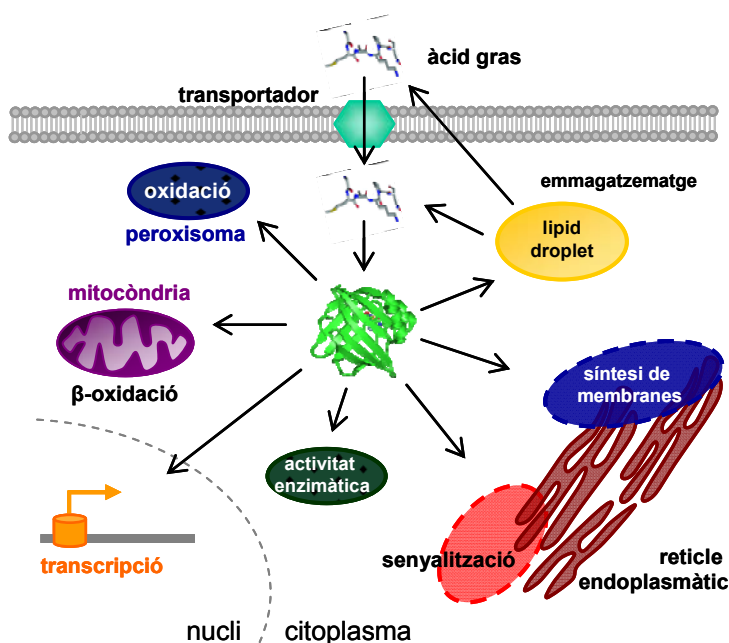


Figura 2. Funcions proposades de les FABPs a la cèl·lula. Les FABPs transporten les molècules lipídiques a diferents compartiments cel·lulars: a les *lipid droplets*, per emmagatzematge; al reticle endoplasmàtic, per senyalització, el trànsit i la síntesi de membranes; a la mitocòndria o als peroxisomes, per oxidació; a determinats enzims citosòlics, per regular-ne l'activitat; a un nucli, en la regulació transcripcional donada per lípids i factors de transcripció; o per accions autocrines o paracrines. (Adaptat de Furuhashi i Hotamisligil. *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7:489-503).

En relació a la funció de la FABP4 com a regulador transcripcional, cooperant amb famílies de factors de transcripció com la PPAR, la interacció àcids grassos lliures (FFA) amb la molècula de FABP4 és essencial pel transport de la molècula lipídica a nucli¹¹. A la molècula de FABP4 es localitza una seqüència *nuclear localization signal* (NLS) compresa entre els residus 22 i 32, que és necessària per aquest procés (**Figura 3**). Després de translocar-se, el complex FFA-FABP4 interacciona amb el factor de transcripció, concretament amb PPAR γ , per activar-lo. Aquesta activació és dependent de lligand. La interacció entre les FABPs i els PPARs es dóna de manera selectiva en funció del lligand: FABP4 activa PPAR γ , i FABP5, PPAR β ¹⁹.

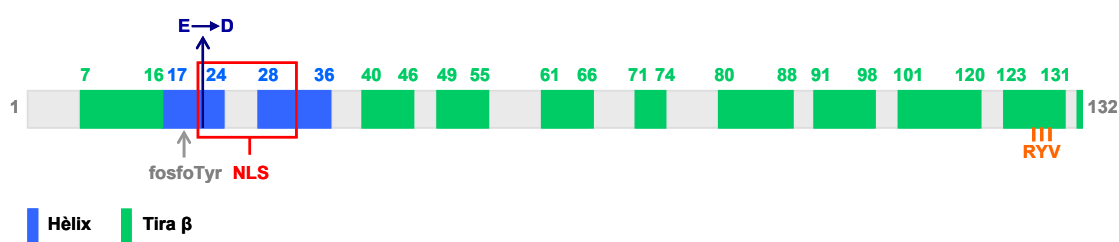


Figura 3. Estructures primària i secundària de la proteïna FABP4. La seqüència primària de la proteïna FABP4 humana està formada per 132 aminoàcids, que s'organitzen en 10 tires β i 2 hèlix en l'estructura secundària. La regió compresa entre les posicions 127-129 és el lloc d'interacció amb l'àcid gras. Aquesta zona comprèn 3 residus aminoacídics: R, Y i V. A la regió compresa entre els residus 22 i 32 es localitza la *nuclear localization signal* (NLS), indicada per possibilitar la translocació a nucli. A la posició 20, es troba un residu de tirosina susceptible de ser fosforilat per tirosina quinases. I, a la posició 23 s'ha descrit una variant genètica natural en què es produeix un canvi d'aminoàcid, de glutamat a aspartat, que s'ha relacionat amb la presència de càncer de mama i colo-rectal (Sjoeblom T *et al.* *Science* 2006; 314:268-74).

La FABP4 influeix la velocitat de lipòlisi en l'adipòcit^{20, 21}. La lipòlisi en l'adipòcit ve en part donada per la interacció de la FABP4 amb la lipasa sensible a hormones (HSL), i forma un complex 1:1. La FABP4 recull els àcids grassos procedents de la lipòlisi dels triglicèrids. Els animals deficients en aP2 presenten una disminució en la lipòlisi, mentre que en els animals mutants que sobreexpressen aP2 és potenciada^{20, 21}. L'activació de HSL per la FABP4 depèn de la unió a l'àcid gras; ja que en absència d'àcid gras no es produeix la interacció HSL-FABP4²²⁻²⁴. Altres estudis han demostrat que la intervenció de FABP4 sobre la lipòlisi també es dóna actuant sobre la perilipina i la lipoproteïna lipasa (LPL)^{21, 25}.

Grimsrud i col·laboradors van descriure que la FABP4 també és capaç d'unir molècules lipídiques modificades com són els aldehids. Aquests autors van observar que la FABP4 es troba carbonilada *in vivo* pel 4-hidroxinonenal (4-HNE), un hidroxialquenal producte final de l'oxidació dels àcids araquidònic o linoleic. La modificació es dona a la posició Cys117. L'efecte resultant és una reducció de 10 vegades en l'afinitat d'unió als àcids grassos²⁶. La unió covalent del 4-HNE conforma una holo-estructura que imita l'estat en què la proteïna es troba unida a l'àcid gras²⁷ (**Figura 4**). Com s'ha esmentat, la interacció FABP4-HSL és dependent de la unió a àcid gras²²⁻²⁴, el grau d'impediment en la formació del complex donat per l'aldehid es reflexa en la lipòlisi en l'adipòcit. Aquest autors suggereixen que la modificació de la FABP4 podria contribuir a la resistència a la insulina en l'obesitat per l'alteració de l'activitat de HSL²⁶.

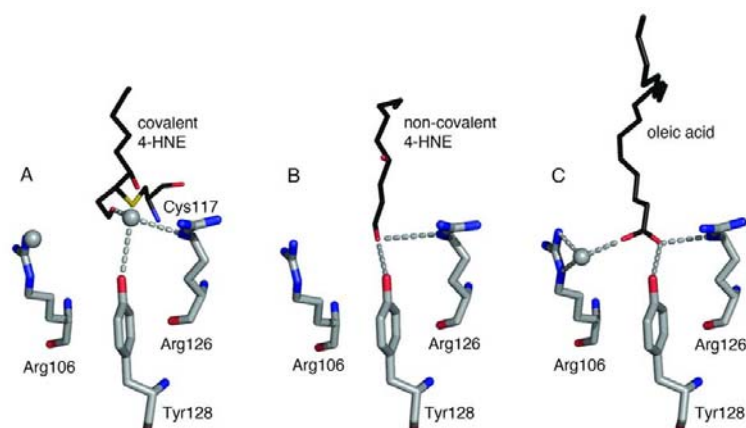


Figura 4. Esquemes de la disposició en la unió covalent i no covalent de 4-HNE a la FABP4 en comparació amb la unió amb un àcid gras proposada per Hellberg i col·laboradors (Hellberg K i col·laboradors. *Protein Sci* 2010; en premsa).

Una altra modificació que afecta la unió de la FABP4 i l'àcid gras és la fosforilació. Hresko i col·laboradors van demostrar que la FABP4 era fosforilada al residu Tyr19 pel receptor tirosina-quinasa de la insulina després de l'activació del receptor per part de la insulina²⁸⁻³⁰. Actualment, les bases de dades suggereixen que la modificació es dona al residu 20 enlloc del 19 (**Figura 3**). La fosforilació es produeix quan la FABP4 es troba unida a àcid gras, ja que és facilitada pel canvi conformacional resultant de la unió²⁸. D'aquesta manera, la fosforilació bloqueja la FABP4 unida a àcid gras i no li permet deslliurar-se'n. La fosforilació de FABP4 per part del receptor de la insulina podria estar produint-se en relació a l'acció antilipolítica de la insulina.

1.2 FABP4: expressió i regulació

Tot i que inicialment es va descobrir en l'adipòcit, també s'ha detectat l'expressió de la FABP4 en macròfags³¹⁻³³ i en altres localitzacions com són les cèl·lules de múscul estriat³⁴. Les plaques d'ateroma murines i humanes també expressen nivells elevats de FABP4³⁵⁻³⁷ (**Taula 1**). Estudis de deleció del gen *aP2* en ratolins han determinat que la FABP4 representa fins un 5% del contingut de proteïna total en l'adipòcit^{17, 32, 38}. En aquest tipus cel·lular també s'expressa un altre membre de la família de les FABPs, la FABP5 (*mal1* o E-FABP); però en condicions normals, l'expressió és minoritària. La relació entre FABP4 i FABP5 és molt estreta; no obstant, estudis cromosòmics han determinat que FABP4 i FABP5, juntament amb FABP8, formen part d'un clúster genètic¹¹. Els animals deficients en FABP4 (*aP2*^{-/-}) són animals aparentment sans que presenten un desenvolupament normal dels adipòcits en el teixit adipós. La manca d'un fenotip anòmal s'explica perquè en condicions d'homeòstasi metabòlica es produeix una expressió compensatòria per part de FABP5^{4, 21, 38}.

Xu i col·laboradors van observar que, a part de ser una proteïna citoplasmàtica, la FABP4 podia ser secretada al medi pels adipòcits en cultiu i podria representar >1% del total de les proteïnes secretades per aquest tipus cel·lular³³. En aquest treball, es va descriure per primer cop la presència de FABP4 en plasma³³. El teixit adipós es postula com la principal font de la FABP4 circulant, a causa de la forta associació observada entre els nivells en plasma de FABP4 i l'expressió en diferents dipòsits de teixit adipós³⁹. La contribució dels altres tipus cel·lulars que també l'expressen i el mecanisme de secreció estan per determinar³³, encara que la secreció per part dels macròfags en la transformació a cèl·lula escumosa també ha estat demostrada⁴⁰. L'expressió de FABP4 és més elevada en el teixit adipós subcutani⁴¹, mentre que al teixit adipós visceral, l'expressió majoritària és la de FABP5⁴¹. Aquesta expressió diferencial es tradueix en velocitats de lipòlisi diferents en estat basal⁴². Els nivells circulants de FABP4 presenten dimorfisme sexual, ja que són més elevats en dones que en homes. Aquesta diferència entre gèneres podria ser conseqüència de la diferent distribució de greix corporal existent entre els dos sexes. Les dones presenten més volum de greix subcutani que els homes, que en posseeixen més de visceral (o abdominal). Aquest fet reflectiria l'expressió diferencial de FABP4 existent entre els aquestes dues localitzacions del teixit adipós. Les diferències regionals de l'expressió de FABPs en el teixit adipós poden estar influenciades per la presència o absència d'obesitat^{41, 43}. A part de l'expressió a nivell subcutani i visceral, Vural i col·laboradors van demostrar l'expressió de FABP4 en teixit adipós epicàrdic⁴⁴.

L'expressió de FABP4 està augmentada durant la diferenciació adipocitària⁴⁵ i per aquesta raó, s'ha utilitzat habitualment com a marcador d'aquest procés. Estudis *in vitro* han permès determinar que àcids grassos, PPAR γ ⁴⁶ i insulina^{47,48} regulen l'expressió de FABP4, així com els agonistes PPAR γ i com les tiazolidinadiones (TZDs)⁴⁹⁻⁵¹. La diferenciació adipocitària que indueixen les TZDs *in vitro* s'ha associat amb un augment dels nivells de mRNA i proteïna FABP4 intracel·lular, així com la proteïna secretada al medi⁵¹ (**Figura 5**).

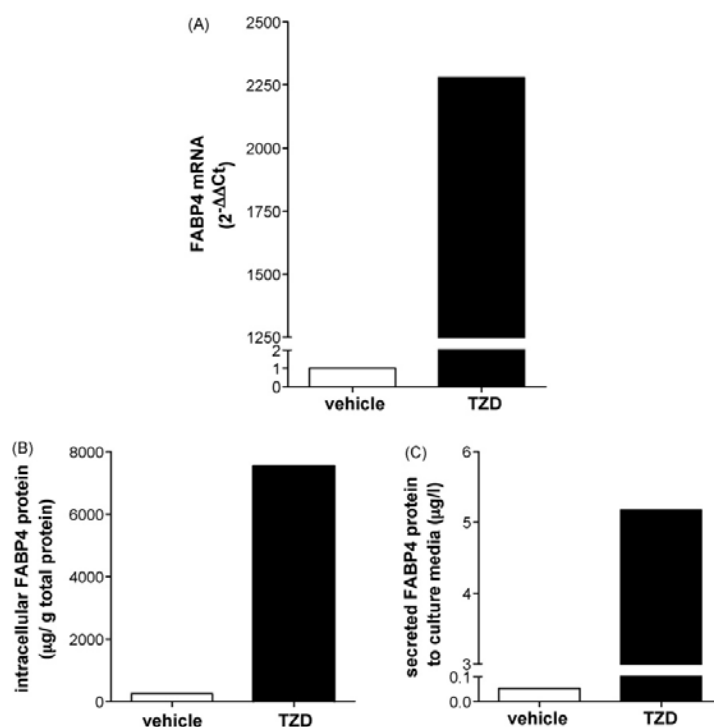


Figura 5. Efecte d'una tiazolidinadiona (TZD) sobre l'expressió gènica i proteica de FABP4 en adipòcits humans. Els nivells d'expressió de mRNA (A) i proteïna (B) de FABP4 van augmentar per efecte d'una TZD (la rosiglitazona); i també el nivell de secreció de la proteïna al medi de cultiu (C). Els nivells de mRNA de FABP4 van ser determinats per RT i PCR a temps real (A). Els nivells intracel·lulars (B) i secretats a medi (C) de proteïna FABP4 es van analitzar per ELISA. AU, unitats arbitràries. (Resultats publicats pel nostre grup a la revista *Atherosclerosis*: Cabré A et al. *Atherosclerosis* 2007; 195: e150-8).

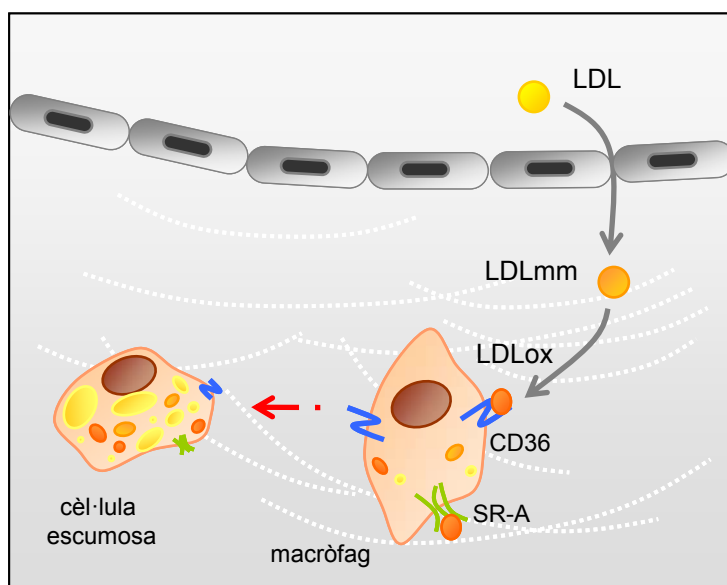
PPAR γ regula l'expressió de FABP4 a través de llocs PPRE (*peroxisome proliferator responsive element*) situats al promotor del gen de la FABP4 que s'ha demostrat que han estat conservats evolutivament entre espècies⁵²⁻⁵⁴. Al promotor del gen també s'ha caracteritzat la presència d'altres elements característics com un lloc *activator protein-1* (AP-1)⁵⁵⁻⁵⁸, una *TATA box* i un lloc *CCAAT/enhancer binding protein* (C/EBP)⁵⁹.

1.3 FABP4, macròfags i cèl·lula escumosa

Els macròfags i els adipòcits mostren una elevada similitud en termes de biologia i funcionalitat, ja que ambdós tipus cel·lulars acumulen lípids, secreten citocines i expressen els mateixos gens implicats en el metabolisme lipídic i la inflamació^{32, 60, 61}. L'expressió de FABP4 no es detecta en cèl·lules en estat de monòcit, però s'evidencia després d'estimular amb *phorbol myristate acetate* (PMA)³⁵, LDLox⁶², agonistes PPAR γ ⁶³, *lipopolysaccharide* (LPS) o activació del *Toll-like receptor* (TLR)⁶⁴. En el cas de l'activació per LPS, un article recent ha demostrat l'existència d'un *loop* regulatori de retroalimentació positiva per part de *cJun NH2-terminal kinases* (JNK) i AP-1 per potenciar la resposta inflamatòria en el macròfag⁶⁵.

D'acord amb el caràcter inflamatori de l'aterosclerosi, que representa una resposta inflamatòria front a l'atac de la paret arterial, el macròfag és una cèl·lula clau. Els macròfags lideren la resposta inflamatòria contra les lipoproteïnes que envaeixen la paret arterial. A més, s'encarreguen de l'aclariment de lipoproteïnes modificades oxidativament i de l'eflux de colesterol en el transport revers de colesterol. S'ha evidenciat que les lesions d'ateroma estan formades majoritàriament per macròfags que, en el procés d'aclariment de lipoproteïnes modificades, han captat una excessiva quantitat de lípid i han evolucionat al fenotip de cèl·lula escumosa (**Figura 6**). La captació del lípid i les lipoproteïnes oxidades es duu a terme a través dels receptors *scavenger* que els macròfags expressen a nivell de la membrana plasmàtica⁶⁶.

Figura 6. Mecanismes que contribueixen a la formació de cèl·lules escumoses.



Les LDL s'internalitzen a la paret arterial on s'adhereixen a la matriu, hi queden retingudes i són susceptibles de ser oxidades. El procés d'oxidació és gradual: de mínimes modificacions (LDLmm), a la completa oxidació (LDLox). Els macròfags internalitzen les LDLox a través dels receptors que expressen a nivell de la membrana plasmàtica (SR-A i CD36). La captació massiva de lipoproteïnes modificades promou l'evolució fenotípica del macròfag a cèl·lula escumosa.

Fu i col·laboradors van determinar que l'expressió gènica i proteica de FABP4 en els macròfags augmentava per efecte de les LDLox⁶². En el moment en què la capacitat d'internalització de LDLox en els macròfags se satura, aquests evolucionen al fenotip de cèl·lules escumoses. En aquest procés també es produeix una expressió augmentada de FABP4³⁷. Addicionalment, Fach i col·laboradors van utilitzar el mateix model *in vitro* de formació de cèl·lules escumoses i van avaluar les proteïnes secretades a medi per part dels macròfags, i que podrien desenvolupar un paper clau en les vies implicades en l'aterosclerosi. Es va observar que, quantitativament, una de les proteïnes més importants era la FABP4⁴⁰. L'atorvastatina pot revertir l'efecte de les LDLox sobre l'expressió de FABP4 en els macròfags⁶⁷. La sobreexpressió de FABP4 en macròfags induïx la transformació a cèl·lules escumoses per l'acumulació d'èsters de colesterol³⁷. Mentre que la deleció de FABP4 en els macròfags augmenta l'eflux de colesterol i evita l'evolució fenotípica a cèl·lules escumoses⁶⁸.

L'estrès del reticle endoplasmàtic en els macròfags induït per la lipotoxicitat és un altre procés que contribueix a la formació de la lesió. Erbay i col·laboradors van observar que atenuació de l'estrès del reticle endoplasmàtic per xaperones químiques provocava una disminució en l'expressió de aP2⁶⁹. Suggerixen que aP2, com a xaperona lipídica, participaria en la regulació de l'homeòstasi del reticle endoplasmàtic en els macròfags i en el paper d'aquests en l'aterosclerosi.

La generació del model animal *apoE^{-/-} aP2^{-/-}* va permetre observar reduccions dràstiques en la formació de lesió a nivell aòrtic en animals sotmesos tant a dieta normal com a una rica en greixos, en comparació amb els animals control *apoE^{-/-}*, que constitueixen un model establert d'aterosclerosi^{35, 36, 70}. En ambdós casos, les reduccions observades eren independents de canvis en els nivells lipídics i la sensibilitat a la insulina. En considerar l'efecte provat que en absència d'expressió d'aP2, es produeix un mecanisme compensatori en què se sobreexpressa mal1, es va generar el model animal triple *knock-out*, *apoE^{-/-} aP2^{-/-} mal1^{-/-}*. En aquest model, es reproduïa una dràstica reducció en la lesió que anava acompanyada de millores en els metabolismes lipídic i glucídic⁷¹ (**Figura 7**).

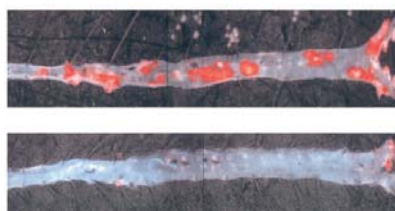


Figura 7. Imatges de l'aorta en animals $apoE^{-/-}$ (control) i triple *knock-out* ($apoE^{-/-} aP2^{-/-} mal1^{-/-}$). A la imatge superior, es pot observar l'aorta del model animal d'aterosclerosi deficient en apoE; la coloració vermella evidencia la presència de múltiples lesions ateroscleròtiques. A la imatge inferior, es presenta l'aorta del model $apoE^{-/-} aP2^{-/-} mal1^{-/-}$; en aquest cas, s'evidencia una reducció dràstica en el nombre de lesions (imatge adaptada de Boord JB *et al. Circulation* 2004; 110:1492-8).

L'estudi específic del paper de la deficiència en aP2 en macròfags $apoE^{-/-}$ sobre el desenvolupament de la lesió es va realitzar a través del transplantament de medulla òssia de ratolins $apoE^{-/-} aP2^{-/-}$ en ratolins $apoE^{-/-} aP2^{+/+}$. La reducció en la lesió resultant en els animals $aP2^{-/-}$ -macròfag va ser comparable a la dels ratolins $apoE^{-/-} aP2^{-/-}$ ³⁵. Per tant, la deficiència en aP2 específica de macròfags es postula com la responsable primària de la protecció contra el desenvolupament d'aterosclerosi. Se suggereix que els efectes locals sobre l'aP2 dels macròfags són crítics per la formació de la lesió, més que els potencials efectes sistèmics mediat a través de l'aP2 de l'adipòcit³⁵.

A nivell inflamatori, l'absència de aP2 en els macròfags provoca un augment en l'activitat PPAR γ , mentre que les vies de senyalització proinflamatòries estan inhibides⁶⁸. Els macròfags $aP2^{-/-}$ han permès determinar que aP2 actua en *upstream* de la via PPAR γ -LXR α -ABCA1, en el control del trànsit de colesterol a través de la promoció de la captació per CD36 de lipoproteïnes modificades, potenciant l'eflux de colesterol que n'evita l'acumulació intracel·lular⁶⁸. En paral·lel, els macròfags $aP2^{-/-}$ presenten una reducció en la producció d'un clúster de citocines proinflamatòries com TNF α , IL-6, IL-1 β , MCP-1^{35, 45, 68}. L'activitat de la via de senyalització IKK-NF- κ B està disminuïda, cosa que es tradueix en la disminució en l'expressió dels gens regulats per aquesta via com són COX-2 i iNOS, i en la producció de citocines pro-inflamatòries⁶⁸. Per tant, se suprimeixen les funcions inflamatòries d'aquest tipus cel·lular.

1.4 FABP4: biomarcador d'alteracions metabòliques

1.4.1 FABP4, obesitat i síndrome metabòlica

La funció de la FABP4 circulant no està caracteritzada, però els estudis publicats fins el moment actual suggereixen un estret vincle amb l'adipositat i la distribució de greix corporal. Des de la seva descripció en plasma, s'ha observat que els nivells circulants de FABP4 estan significativament més elevats en presència de sobrepès o obesitat respecte al normopès³³, tant en població adulta^{72, 73} com infantil⁷⁴⁻⁷⁶.

A nivell de teixit adipós, s'han observat evidències que anirien en el mateix sentit que les observades en la FABP4 circulant en el context de l'obesitat. En individus obesos, l'expressió gènica i proteica de FABP4 està augmentada al teixit adipós subcutani en comparació amb el visceral; fet que coincideix amb una lipòlisi basal elevada en els adipòcits subcutanis⁴³. Mentre que l'expressió de FABP5 no varia entre els diferents dipòsits. En els individus no obesos, l'expressió de FABP4 no varia entre els nivells subcutani i visceral, però els nivells d'expressió de FABP5 són més alts en el visceral⁴³.

Els nivells circulants de FABP4 s'associen de manera positiva i independent de l'edat i el gènere amb els marcadors tradicionals per la valoració de l'adipositat: índex de massa corporal (IMC), índex cintura/maluc (*waist-to-hip ratio*, WHR), perímetre de cintura i percentatge de greix corporal³³. Aquestes associacions amb paràmetres d'adipositat han estat també observades en altres estudis en poblacions amb obesitat mòrbida⁷², síndrome metabòlica (SM)^{33, 39, 77}, diabetis tipus 2 (T2D)^{51, 78}, infecció pel virus de la immunodeficiència humana (VIH)⁷⁹, hiperlipèmia familiar combinada (HFC)⁸⁰, síndrome de l'ovari poliquístic (PCOS)^{81, 82} o malaltia cardíaca⁸³. Els nivells circulants de FABP4 també s'han associat amb mesures directes de composició corporal realitzades amb *dual-energy X-ray absorptiometry* (DEXA). En un estudi realitzat en dones obeses amb PCOS, Möhlig i col·laboradors van trobar una forta associació positiva dels nivells circulants de FABP4 amb la massa grassa total; i, també es van associar amb la massa magra corporal, però en menor grau⁸¹. El nostre grup ha realitzat un estudi prospectiu en població PCOS no obesa, en què també es va determinar la composició corporal per DEXA. A nivell basal, els nivells circulants de FABP4 presentaven fortes associacions positives amb les mesures d'adipositat (massa grassa total i massa grassa abdominal)⁸².

El component d'adipositat corporal es postula com un factor determinant en els nivells circulants de FABP4. Per tant, les actuacions amb l'objectiu final de mobilitzar la massa de greix podrien ser determinants de variacions dels nivells circulants de FABP4. Diferents estudis prospectius d'intervenció en poblacions infantil i adulta amb obesitat han valorat l'efecte del canvi en el pes corporal, com a resultat del programa realitzat, en relació als nivells de FABP4 circulant. Ja sigui en població infantil⁷⁴ com adulta^{72, 73, 84-86}, qualsevol actuació indicada per induir canvis en el pes corporal associats a mobilitzacions de la massa grassa produeix variacions en els nivells de FABP4 circulant. Entre les intervencions proposades en diferents treballs es troben actuacions sobre la dieta^{74, 84}, l'activitat física^{73, 74, 86} o, en el cas de l'obesitat mòrbida, la cirurgia bariàtrica^{72, 85}.

L'obesitat abdominal és una de les alteracions metabòliques que caracteritza la SM⁸⁷,⁸⁸. Encara que inicialment va esdevenir un concepte que despertava controvèrsia entre els clínics⁸⁹⁻⁹¹, actualment la SM és considerada com el principal factor de risc del desenvolupament de T2D i malaltia cardiovascular per l'Organització Mundial de la Salut⁹², la *National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III* (NCEP-ATP III)⁹³ i la *International Diabetes Federation*⁹⁴.

La SM es defineix com un clúster d'anormalitats metabòliques. Segons els criteris de l'ATPIII, les components de la SM són: 1) **obesitat abdominal**, definida com perímetre abdominal ≥ 102 cm en homes i ≥ 88 cm en dones; 2) nivells de **triglicèrids** ≥ 150 mg/dl (> 1.7 mmol/l); 3) **colesterol HDL** < 40 mg/dl (< 1.03 mmol/l) en homes i < 50 mg/dl (< 1.29 mmol/l) en dones; 3) **hiperglicèmia**, nivells de glucosa ≥ 110 i < 126 mg/dl; 4) **hipertensió arterial**, pressió arterial $\geq 130/85$ mmHg. El criteri diagnòstic de SM consisteix a presentar 3 o més de les components anteriorment esmentades. La idea que el teixit adipós té un paper central en el desenvolupament de la SM i la resistència a la insulina s'ha anat consolidant progressivament.

Estudis transversals i longitudinals han associat els nivells de FABP4 circulant amb la SM en diferents poblacions adultes asiàtiques o caucàsiques. En població infantil normopès o obesa, els resultats publicats no han trobat que els nivells de FABP4 siguin marcador de SM⁷⁴⁻⁷⁶.

Xu i col·laboradors van trobar que els nivells de FABP4 augmentaven amb el nombre de components de la SM, tant en homes com en dones, en una població d'individus no diabètics³³. En els nostres treballs realitzats en població general⁵¹ (**Figura 8**), amb T2D⁵¹ (**Figura 8**) i VIH⁷⁹ (**Figura 9**) es va observar la mateixa associació positiva entre els nivells de FABP4 i el número de components de la SM. De les components de la SM, en la població T2D es va trobar associació positiva amb l'IMC, la pressió arterial sistòlica i els nivells de triglicèrids⁵¹. Per la població VIH, els nivells de FABP4 es van associar positivament amb l'IMC, els nivells de triglicèrids, les pressions arterials sistòlica i diastòlica, i els nivells d'insulina; mentre, que l'associació va ser inversa pel colesterol HDL (col-HDL)⁷⁹.

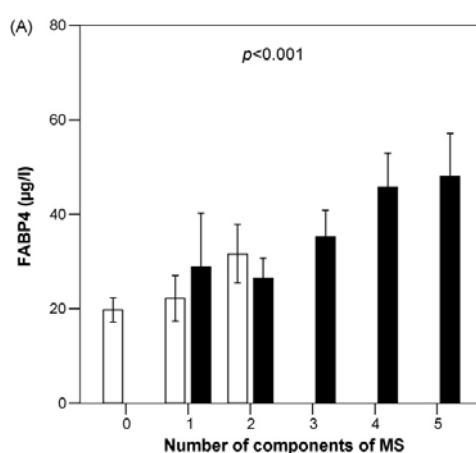


Figura 8. Nivells circulants de FABP4 estratificats en funció del nombre de components de la SM en població T2D. Les columnes blanques representen la població general i les negres, els individus amb T2D. (Resultats publicats a la revista *Atherosclerosis*: Cabré A *et al.* *Atherosclerosis* 2007; 195: e150-8).

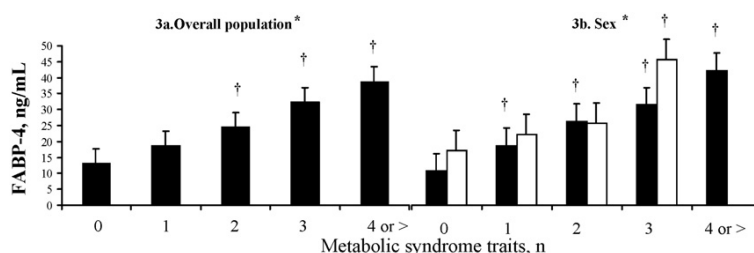


Figura 9. Distribució de les concentracions plasmàtiques de FABP4 d'acord amb el nombre de components de la SM en població VIH. Les 5 primeres columnes de l'esquerra representen tota la població; mentre que en el grup de la dreta, es va distribuir la població per gènere (homes, columnes negres; dones, columnes blanques). En tots els casos, es va observar una associació positiva amb els nivells circulants de FABP4 i el nombre de components de la SM († $p < 0.050$ en comparació amb no trets de SM). (Resultats publicats a la revista *Atherosclerosis*: Coll B *et al.* *Atherosclerosis* 2008; 199: 147-53).

El perfil lipídic de la SM i la T2D, caracteritzat per nivells alts de triglicèrids i baixos de col-HDL, és conegut com a dislipèmia aterògena⁹⁵. En població T2D, es va observar que nivells circulants elevats de FABP4 es van associar positivament amb els nivells de triglicèrids i partícules riques en triglicèrids, i inversament amb el col-HDL i l'apolipoproteïna A1 (apoA1). Per tant, es van proposar com a predictors del desenvolupament de la dislipèmia aterògena independentment de l'obesitat i la resistència a la insulina⁹⁶ (**Figura 10**). Una altra població que comparteix trets amb la dislipèmia aterògena és la de la HFC, que presenta una producció augmentada de partícules riques en triglicèrids, amb nivells elevats en plasma de triglicèrids i colesterol. En la HFC, els nivells de FABP4 estan elevats en relació als nivells de població general. En aquesta població, l'associació de la FABP4 amb els nivells de triglicèrids i partícules riques en triglicèrids (com les VLDL) determinades per ressonància magnètica nuclear només es va observar en el grup que presentava obesitat. D'aquesta manera se suggereix que la presència d'obesitat en la HFC manifesta associacions de FABP4 amb la hipertrigliceridèmia addicionals als mecanismes patològics de la malaltia⁸⁰.

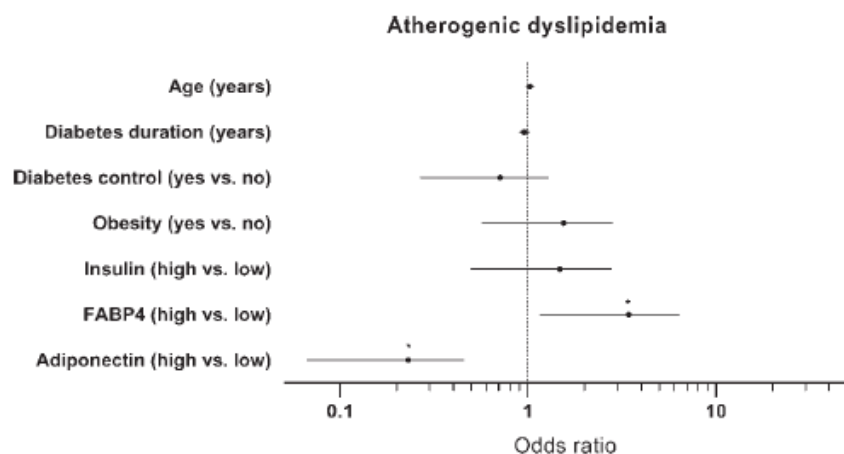


Figura 10. Forest plot per la dislipèmia aterògena en individus amb diabetis tipus 2. Nivells elevats de FABP4 van ser predictors de la dislipèmia aterògena independentment de l'edat, la durada i el control de la diabetis, l'obesitat i la insulina. Les línies horitzontals representen les *odds ratio* i l'interval de confiança del 95% obtinguts per un model de regressió logística binària (* $p < 0.050$). (Resultats publicats a la revista *Journal of Lipid Research*: Cabré A et al. *J Lipid Res* 2008; 49: 1746-51).

S'han proposat més evidències entre els nivells circulants de FABP4 i el metabolisme lipídic. En relació als nivells de colesterol total, es va trobar una associació positiva amb els nivells de FABP4 en població T2D⁵¹. Les disminucions en els nivells de FABP4 circulant eren predictors independents de canvis en els nivells de colesterol durant la realimentació en dones amb anorèxia nerviosa⁹⁷. I, més recentment, s'ha demostrat que el colesterol total i el guany de pes eren predictors independents de les variacions de FABP4 en nens prematurs⁹⁸. D'altra banda, Xu i col·laboradors van trobar que els nivells de FABP4 es van associar positivament amb el colesterol LDL (col-LDL) en individus no obesos³³. Recentment, hem determinat que les disminucions de FABP4 associades a un augment en l'activitat física es relacionaven amb disminucions en els nivells de col-LDL i apolipoproteïna B (apoB)⁸⁶. I, finalment, s'ha determinat que la lipèmia post-prandrial no té efectes aguts sobre les concentracions plasmàtiques de FABP4⁹⁹.

El valor predictiu dels nivells basals de FABP4 sobre el desenvolupament de la SM va ser avaluat en un estudi longitudinal a 5 anys en població no diabètica i sense tractament farmacològic hipolipemiant, realitzat per Xu i col·laboradors³⁹. Els nivells basals de FABP4 circulant ajustats per edat i sexe s'associaven amb un perfil cardiometabòlic alterat als 5 anys: IMC i perímetre de cintura elevats, pressions sistòlica i diastòlica altes, nivells alts de triglicèrids, glucosa, colesterol total i col-LDL, i l'índex *homeostasis model assessment of insulin resistance* (HOMA-IR); i, col-HDL baix. Les concentracions basals de FABP4 van ser significativament més altes en els individus que van presentar progressió de SM als 5 anys. Les evidències clíniques trobades van permetre a aquests autors determinar que els nivells circulants de FABP4 eren predictors independents del desenvolupament de SM independentment de l'adipositat i la resistència a la insulina³⁹.

El nostre estudi d'individus amb obesitat abdominal i risc cardiovascular moderat-alt va mostrar que la progressió de la SM s'associava amb un augment significatiu en els nivells de FABP4. Aquest augment es va associar amb l'aparició d'hipertrigliceridèmia i nivells baixos de col-HDL. En canvi, la disminució dels nivells de FABP4 es va relacionar amb la desaparició d'obesitat abdominal i augmentos en els nivells de col-HDL. La disminució en els nivells de FABP4 circulant va constituir l'únic predictor independent de la regressió de la SM i va suggerir un possible paper causal entre el descens de FABP4 i la desaparició de la SM¹⁰⁰.

La relació entre l'expressió a nivell de teixit adipós i els nivells circulants de FABP4 ha estat determinada en models animals³⁹, però no ha estat relacionada amb la presència de SM. En aquest aspecte, només s'ha trobat un treball en què es relaciona l'expressió de FABP4 en teixit adipós epicàrdic en absència o presència de SM. En aquest estudi, es va observar que l'expressió en aquest teixit era significativament més elevada en la SM vers els no SM, amb la indicació que l'expressió de FABP4 en aquest dipòsit seria un factor important en individus amb el clúster d'alteracions metabòliques⁴⁴.

L'esteatosi hepàtica no alcohòlica (*nonalcoholic fatty liver disease* (NAFLD)) s'ha proposat com una manifestació de la SM a nivell hepàtic. En aquest sentit, s'ha observat que el fet de presentar nivells elevats de FABP4 contribueix al desenvolupament de SM en NAFLD¹⁰¹. Koh i col·laboradors van descriure una associació independent de les concentracions de FABP4 amb la presència de NAFLD en pacients amb T2D¹⁰². En població aparentment sana, un estudi recentment publicat presenta una associació independent dels nivells circulants de FABP4 i la NAFLD¹⁰³. En aquest mateix estudi, els nivells de FABP4 circulant també es van correlacionar amb la SM¹⁰³.

1.4.2 FABP4, oxidació, dany tissular i resposta inflamatòria

L'endoteli vascular controla la vasodilatació, la proliferació de les cèl·lules musculars llisses i la inhibició de les respostes inflamatòries. Quan es trenca l'homeòstasi a nivell vascular, es produeix la disfunció endotelial que és un esdeveniment clau en el desenvolupament de l'aterosclerosi^{66, 104-107}. Aquest fenomen es dona amb molta anterioritat a l'aparició de manifestacions clíniques de la malaltia. La disfunció endotelial s'associa amb una condició protrombòtica i una situació d'estrès oxidatiu augmentat^{104, 108}. Es produeix un augment en l'expressió de les molècules d'adhesió per part de les cèl·lules endotelials que possibilita la internalització de monòcits circulants a nivell de la íntima⁶⁶. Els monòcits activats es diferencien a macròfags, s'observa un augment en la producció i l'alliberament de quimioquines i citocines pro-inflamatòries^{66, 104}. La valoració clínica del grau de disfunció endotelial en els individus no és una pràctica habitual. En un estudi recent, s'ha valorat la relació dels nivells circulants de FABP4 amb la disfunció endotelial determinada per Tonometria Arterial Perifèrica (PAT) en una població amb T2D¹⁰⁹. En aquest treball es va observar que els nivells elevats de FABP4 circulant s'associaven de manera independent amb un empitjorament en la funció endotelial d'aquests individus¹⁰⁹. A nivell *in vitro*, les cèl·lules de l'endoteli presenten augments en l'expressió gènica i proteïna de FABP4 i FABP5 per efecte de la hipòxia intermitent. Aquesta expressió augmentada també podria ser un signe de disfuncionalitat a nivell de l'endoteli¹¹⁰. Recentment, s'ha determinat un impacte directe dels nivells circulants de FABP4 en el desenvolupament de disfunció contràctil cardíaca en individus obesos¹¹¹. Aquestes observacions suggeririen que els nivells circulants de FABP4 podrien tenir efecte directe a nivell de l'endoteli vascular i a nivell de les cèl·lules del múscul cardíac, en ambdós casos, en promourien un funcionament anòmal.

La situació d'estrès oxidatiu és el resultat de la saturació en la capacitat de defensa davant dels estímuls pro-oxidants, el balanç oxidació-antioxidació s'inclina a favor del primer conduint a la generació d'espècies reactives d'oxigen (ROS, *reactive oxygen species*)¹¹². Aquestes espècies són altament reactives i, consegüentment, la seva vida mitjana és molt breu. Per la seva inestabilitat, les ROS poden propagar i amplificar el dany mitjançant els subproductes que generen. Quan les ROS ataquen els àcids grassos poliinsaturats generen aldehids polars i apolars, i hidroxialquenals^{108, 113}. Malgrat la provada toxicitat cel·lular, una exposició baixa als aldehids pot ser rellevant en la senyalització cel·lular conduint a una resposta adaptativa¹¹³. En concret, l'aldehid apolar 2,4-decadienal (DDE), present a les LDL oxidades (LDLox) (**Figura 11**), i que

deriva de l'oxidació dels àcids grassos linoleic (18:2) i araquidònic (20:4), posseeix una elevada activitat biològica i ha estat implicat en la modulació dels processos ateroscleròtics ja que actua sobre l'expressió de citoquines en macròfags humans ¹¹⁴

116

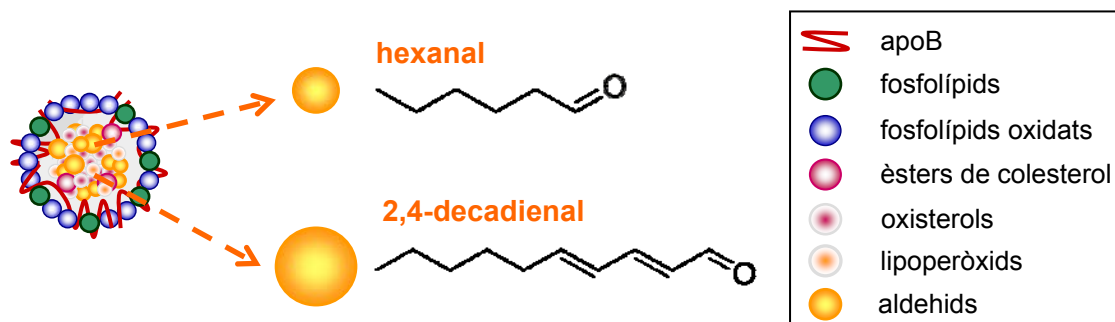


Figura 11. Esquema de l'estructura i composició d'una partícula de LDL oxidada. Com a resultat de l'oxidació, les LDL oxidades contenen una sèrie de components que no es troben a les LDL natives. Les seves presència i quantitat depenen del tipus i el grau d'oxidació. Les LDL oxidades contenen fragments derivats de la proteòlisi de l'apoB, i altres productes com la lisofosfatidilcolina, fosfolípids oxidats i oxisterols. La quantitat de lipoperòxids, productes inicials de l'oxidació, és baixa front a la presència dels productes finals de l'oxidació dels àcids grassos poliinsaturats, els aldehids. Entre els aldehids trobats a les LDL oxidades es troben l'hexanal i el 2,4-decadienal.

Els aldehids poden modificar oxidativament proteïnes. Grimsrud i col·laboradors van observar que la FABP4 es troba carbonilada *in vivo* per l'hidroxialquenal 4-HNE. La modificació observada es produeix a la posició Cys117 i tindria com a resultat una alteració en la unió als àcids grassos²⁶. En un treball previ es va observar que la FABP5 també era diana de la modificació per part de 4-HNE¹¹⁷. La modificació a la FABP5 es dona en Cys120, que és la posició equivalent a la Cys117 de la FABP4. Aquests resultats podrien suggerir un paper antioxidant de les FABPs com a *scavengers* de lípids reactius¹¹⁷.

Oxidació i inflamació moderada crònica són alteracions associades a obesitat i T2D¹¹⁸. A nivell circulant, la FABP4 i l'oxidació únicament han estat relacionats en treballs realitzats al nostre grup. En aquests estudis, es van trobar associacions positives amb nivells de marcadors plasmàtics d'oxidació en població amb risc cardiovascular moderat-alt^{51, 109}. En canvi, l'associació positiva amb els marcadors d'inflamació, principalment la proteïna C reactiva (PCR), tenint en compte l'adipositat, en diferents poblacions caracteritzades per complicacions cardiometabòliques ha suggerit una important contribució de la FABP4 circulant en la inflamació sistèmica^{39, 51, 119}. A la **Taula 2** es presenta un recull d'estudis realitzats en diferents poblacions en què s'ha valorat l'associació entre els nivells de FABP4 i marcadors d'inflamació sistèmica.

Taula 2. Associació dels nivells circulants FABP4 i marcadors d'inflamació sistèmica

Població	Marcador i associació amb FABP4 circulant	Referència
169 individus T2D (w/ i w/o SM), població caucàsica	PCR: - positiva (r=0.242, p=0.002)	51
183 individus HIV (w/ i w/o SM i/o LD), població caucàsica	PCR: - no associació	79
273 individus FCHL: 208 FCHL-no obesos, 65 FCHL-obesos, població caucàsica	PCR: - no associació amb tota la població FCHL - positiva FCHL-obesos (r=0.136, p<0.050)	80
257 individus amb obesitat abdominal i CVR augmentat, població caucàsica	PCR: - positiva amb tota la població (N=257)	109
57 individus SM, població caucàsica	PCR: - no associació	77
Estudi prospectiu 5 anys: 495 individus no T2D (395 no SM i 119 SM), població asiàtica	PCR: - positiva amb els SM a nivell basal (r=0.140, p=0.002)	39
Estudi prospectiu 10 anys: 544 individus no T2D, població asiàtica	PCR: - positiva amb la presència de T2D als 10 anys (RR 3.03, p<0.001)	119
124 nens (38 normopès, 36 sobrepès, 50 obesitat), població caucàsica	PCR: positiva (r=0.413, p<0.001) IL-6: positiva (r=0.352, p=0.002)	75
Estudi prospectiu 3 mesos d'intervenció: 30 dones obesos, població asiàtica	PCR: - positiva a nivell basal (r=0.440, p<0.001) - no associació entre els canvis de FABP4 i els canvis de PCR als 3 mesos	73
102 dones PCOS obesos, no T2D, població caucàsica	PCR: - positiva (r=0.355, p=0.001)	81
19 dones AN, població caucàsica	PCR: - no associació	120
181 individus T2D, categoritzats per grau de severitat NAFLD (42 normal, 78 lleu, 61 moderat), població asiàtica	PCR: - positiva (r=0.320, p<0.001)	102
494 individus w/ i w/o NAFLD, població asiàtica	TNF α : - positiva (r=0.170, p<0.001)	103
16 dones PE, població caucàsica	PCR: - positiva (r=0.545, p=0.029)	121

T2D: diabetis tipus 2; HIV: virus de la immunodeficiència humana; SM: síndrome metabòlica; LD: lipodistrofia; FCHL: hiperlipèmia familiar combinada; CVR: risc cardiovascular; PCOS: síndrome de l'ovari poliquístic; AN: anorèxia nerviosa; NAFLD: *nonalcoholic fatty liver disease*, esteatosi hepàtica no alcohòlica; PE: preclàmpsia.

A part de les associacions de FABP4 amb marcadors d'inflamació sistèmica presentades a la taula anterior, s'ha determinat l'existència d'altres associacions amb marcadors d'inflamació en altres malalties amb gran component inflamatori. Shum i col·laboradors van observar que l'expressió d'aP2 en les cèl·lules de l'epiteli bronquial regula la resposta inflamatòria al·lèrgica de les vies respiratòries donada per les citocines produïdes per limfòcits Th2, per efecte de la inducció de IL-4/IL-13 en l'asma¹²². En l'artritis reumatoide, un estudi va determinar una sobreexpressió de FABP4 en el líquid sinovial de les articulacions dels individus afectats per aquesta malaltia¹²³. En la *obstructive sleep apnea* (OSA), els individus afectats els nivells de TNF α estan augmentats¹²⁴. Lam i col·laboradors van demostrar que els nivells circulants de FABP4 es correlacionaven amb OSA i la resistència a la insulina, independentment de l'obesitat. Els nivells de FABP4 eren marcadors de severitat en OSA¹²⁵.

1.4.3 FABP4, resistència a la insulina i diabetis tipus 2

La **resistència a la insulina** posseeix un paper causal en el desenvolupament de la **T2D**. La resistència a l'acció de la insulina a nivell de teixit adipós, múscul esquelètic i fetge, està acompanyada per la fallida de les cèl·lules β pancreàtiques conseqüència del seu intent de mecanisme compensatori a través d'una secreció exagerada d'insulina (hiperinsulinèmia)¹²⁶. La hiperglicèmia es manifesta quan la hiperinsulinèmia no pot compensar la situació de resistència a la insulina. La determinació de la resistència a la insulina constitueix un bon predictor en un estat primerenc del desenvolupament de T2D¹²⁷. Fins i tot en absència d'hiperglicèmia o T2D, la resistència a la insulina constitueix un important factor de risc en la malaltia cardiovascular i la mort prematura¹²⁸. L'obesitat és una de les principals causes de la resistència a la insulina¹²⁹. Però, la resistència a la insulina no es manifesta en totes les persones obesas, el factor genètic és determinant en el seu desenvolupament, fins i tot, en població no obesa¹³⁰.

Els diferents models animals han permès estudiar l'efecte de la FABP4 en relació a la resistència a la insulina. El primer model animal deficient en FABPs va ser *aP2*^{-/-}³⁸. En absència d'estrès, l'animal no presentava aparentment un fenotip destacable, per l'efecte compensatori de mal1³⁸. Aquest canvi fenotípic es posava de manifest en provocar una situació d'estrès com l'obesitat induïda per la dieta³⁸ o per modificacions genètiques¹³¹. Aleshores s'evidenciava que aquests animals estan protegits davant la resistència a la insulina, ja que presenten reducció en la hiperinsulinèmia i la glicèmia^{38, 131}. També es produïen millores en el metabolisme lipídic en forma de disminucions en els nivells de colesterol i triglicèrids¹³¹. I la capacitat lipolítica de les cèl·lules es troba inhibida, cosa que es manifesta en el fet que presentaven nivells plasmàtics més baixos de glicerol i àcids grassos lliures, ja sigui en estat basal o per inducció amb agents lipolítics^{20, 21, 25}. Els ratolins deficients en *aP2* presenten una disminució en l'eflux d'àcids grassos lliures i duen a terme una utilització preferencial de la glucosa front els àcids grassos^{25, 132}. La millora en la sensibilitat a la insulina també s'observa en els models que van incloure la deficiència en mal1^{71, 133, 134}.

La FABP4 podria estar actuant com a nexa en la interacció que s'estableix entre el macròfag i l'adipòcit, en la convergència dels metabolismes lipídic i glucídic i la inflamació^{20,21,41,133,135}. Furuhashi i col·laboradors van observar que la supressió específica de *aP2* i mal1 en els adipòcits resultava en una disminució de l'expressió de les citokines proinflamatòries en els macròfags. En canvi, la deleció de *aP2* i mal1 en

els macròfags provocava una millora en la senyalització de la insulina i la captació de glucosa en els adipòcits. Aquestes dades suggereixen que la interacció entre adipòcits i macròfags afecta a nivell sistèmic a la sensibilitat a la insulina i el metabolisme de la glucosa¹³⁶.

Els nivells sèrics de FABP4 s'han correlacionat positivament amb els nivells de glucosa, insulina i índexs de resistència a la insulina, com el HOMA-IR^{33,39}, i negativament amb índexs de sensibilitat a la insulina, com el *Quantitative insulin sensitivity check index* (QUICKI)⁷⁷.

En l'estudi de Xu i col·laboradors, realitzat en població no diabètica, els nivells circulants de FABP4 es van associar positivament amb les concentracions de glucosa post-prandrial i insulina en dejú, i l'índex HOMA-IR, tenint en compte les variables confusores d'edat i gènere. L'associació amb l'índex HOMA-IR es perdia en considerar l'IMC³³. En un estudi prospectiu a 10 anys realitzat en població no diabètica, Tso i col·laboradors van observar que el fet de presentar nivells elevats de FABP4 a l'inici de l'estudi constituïa un predictor del desenvolupament de T2D als 10 anys, independentment de l'obesitat, la resistència a la insulina i els índexs glicèmics. Aquest valor predictiu s'observava, fins i tot, en el grup de població amb la tolerància a la glucosa alterada¹¹⁹.

Els individus amb alteracions en el metabolisme de la glucosa o T2D presenten nivells circulants de FABP4 més elevats que individus control sans^{51, 137, 138}. Malgrat presentar nivells significativament més elevats, en la nostra població de T2D⁵¹ no es va trobar associació ni amb els nivells d'insulina o glucosa, ni amb l'adipoquina *retinol binding protein-4* (RBP4). Els nivells de RBP4 s'han associat amb la SM i la resistència a la insulina, i contribueixen a la patogènesi de la T2D^{139, 140}. La disminució dels nivells de RBP4 s'ha plantejat com una estratègia terapèutica per combatre la T2D¹⁴¹.

Tuncman i col·laboradors van analitzar el promotor del gen de la FABP4 humana per trobar possibles polimorfismes que n'afectessin l'expressió en la població del *Nurses' Health Study*. Van identificar la variant genètica T-87C al promotor del gen que perturbava la unió de C/EBP i en resultava una reducció en l'activitat transcripcional del promotor de la FABP4, que es traduïa en una disminució en l'expressió en el teixit adipós. Els portadors d'aquesta variant presentaven un risc significativament més baix de desenvolupar T2D vers els individus *wild-type*¹⁴². En un altre estudi, es va determinar la interacció entre un altre polimorfisme situat al promotor de la FABP4 (A-

376C) i la variant Pro12Ala de PPAR γ en relació a la sensibilitat a la insulina. L'estudi, realitzat en població general, va determinar que la interacció entre les dues variants al·lèliques menys freqüents era un predictor independent de l'índex HOMA-IR, que n'explicaria un 6.5% de la variació¹⁴³.

L'obesitat és un factor determinant en el desenvolupament de resistència a la insulina. En poblacions amb obesitat mòrbida, la pèrdua de pes com a resultat d'intervencions de cirurgia bariàtrica s'ha associat a millores en els nivells de glucosa i insulina, i en l'índex HOMA-IR. Aquestes millores, però, no es van associar amb canvis en els nivells circulants de FABP4^{72, 85}.

En població obesa adulta, els diferents estudis no presenten resultats coincidents. En l'estudi de Stejskal i col·laboradors es va trobar una associació inversa entre els nivells de FABP4 i l'índex QUICKI a nivell basal. Després de la intervenció de 3 mesos en amb una dieta baixa en calories, l'associació només es va mantenir en els individus que no van presentar canvis en l'IMC⁸⁴. Quan la intervenció realitzada es fonamentava a augmentar l'activitat física dels individus, en una intervenció de 3 mesos sobre dones no es va trobar cap associació⁷³. I, en una intervenció de 1 any realitzada en el nostre grup, l'associació entre els canvis en els nivells de FABP4 circulant i els nivells d'insulina només s'observaven en els individus en què el grau d'activitat física no variava⁸⁶.

En població infantil, no hi ha una associació clara. Reihner i col·laboradors no van trobar associació entre els nivells de FABP4 i la resistència a la insulina⁷⁴, mentre que en els estudis de Aeberli⁷⁵ i Yun⁷⁶, els individus amb nivells elevats de FABP4 presentaven associació positiva amb els paràmetres de resistència a la insulina, que es perdien en el segon estudi en corregir per l'IMC⁷⁶. En canvi, en un estudi amb nens prematurs, malgrat no existir una associació entre els nivells de FABP4 i els marcadors de resistència a la insulina, els autors suggereixen la determinació de FABP4 com a marcador predictiu del desenvolupament de resistència a la insulina pel ràpid guany de pes que experimenten aquests infants⁹⁸.

En el PCOS, la presència d'obesitat i resistència a la insulina és molt prevalent, cosa que fa que aquestes dones posseeixin un risc augmentat en el desenvolupament de T2D i malaltia cardiovascular¹⁴⁴⁻¹⁴⁸. Recentment, s'ha descrit una associació entre un polimorfisme en el gen de la FABP4, que el postula com a gen candidat en el desenvolupament de PCOS¹⁴⁹. En un estudi prospectiu de canvis en l'estil de vida en

població PCOS obesa, els canvis en els nivells de FABP4 es van associar amb canvis en marcadors d'obesitat però no de resistència a la insulina⁸¹. En un estudi realitzat en el nostre grup, la intervenció consistia en tractament farmacològic combinat de metformina, flutamida i anticonceptius orals en dones PCOS no obeses. En aquesta població, els nivells basals de FABP4 es van correlacionar positivament amb l'índex HOMA-IR⁸². Es va observar que com més elevats eren d'inici els nivells de FABP4 millor responien al tractament vers a la resistència a la insulina. Per tant, en aquesta població la FABP4 es va considerar un bon marcador i predictor de resposta en relació a la resistència a la insulina⁸².

Els pacients amb T2D poden desenvolupar dany renal com a comorbiditat de la T2D, en el que s'anomena nefropatia diabètica. Els nivells de FABP4 es troben més elevats en els individus amb T2D¹⁵⁰. Dos estudis realitzats en població caucàsica i asiàtica van demostrar una associació independent dels nivells circulants de FABP4 amb l'aparició de dany renal en la T2D^{150, 151}. En el nostre estudi, nivells elevats de FABP4 es van correlacionar amb nivells elevats de creatinina en plasma i velocitat de filtrat glomerular disminuïda, en absència de microalbuminúria o manifestacions clíniques de dany renal. Per tant, se suggeria la determinació dels nivells de FABP4 com un marcador de dany renal primerenc en T2D¹⁵⁰. En l'estudi de Yeung i col·laboradors, els nivells de FABP4 circulant es van associar de manera independent a l'aparició de nefropatia i es van correlacionar positivament amb els nivells de creatinina en sèrum i negativament amb la velocitat de filtrat glomerular. L'associació independent amb els graus de severitat de nefropatia va indicar que en aquesta població els nivells de FABP4 circulant eren indicadors de la progressió de la malaltia¹⁵¹.

1.4.4 FABP4 i malaltia cardiovascular

La FABP4 s'ha detectat en lesions ateroscleròtiques murines i humanes³⁵⁻³⁷. La presència de SM o T2D es consideren factors de risc per l'aterosclerosi i el desenvolupament de malaltia cardiovascular. I, en ambdues situacions, els nivells circulants de FABP4 es troben augmentats^{33, 39, 51, 119}. Aparentment, la reducció de l'expressió de FABP4 promouria un millor perfil cardiometabòlic. La variant genètica T-87C al promotor del gen de la FABP4 trobada per Tuncman i col·laboradors, reduïa l'activitat transcripcional del promotor en els portadors de la variant mutant. Aquests individus presentaven reduccions en els nivells de triglicèrids en sèrum i una significativa reducció en el risc de malaltia coronària¹⁴².

En un estudi en població asiàtica amb risc cardiovascular, es va avaluar la relació entre els nivells de FABP4 circulants i un indicador ben establert d'aterosclerosi, el gruix de la íntima mitja (IMT)¹³⁷. Els nivells circulants de FABP4 es van associar positivament amb la IMT en ambdós gèneres; però, únicament en les dones, els nivells eren significativament més alts en aquelles que presentaven plaques d'ateroma. Els nivells de FABP4 eren predictors independents del desenvolupament de lesió en dones, cosa que indicava una altra evidència clínica del paper de FABP4 en el desenvolupament de la lesió ateroscleròtica en humans¹³⁷.

Altres estudis han determinat que els nivells circulants de FABP4 estan elevats en individus amb malaltia arterial coronària (CAD)^{138, 152}. Rhee i col·laboradors van observar que els nivells circulants de FABP4 es correlacionaven directament amb el nombre d'artèries coronàries estenòtiques¹³⁸. Aquesta observació es reproduïa en un altre treball amb pacients amb CAD i SM però no va arribar a ser estadísticament significativa⁸³. Es va trobar correlació en pacients amb CAD, entre els nivells de circulants de FABP4 i el nombre de components de la SM. Els nivells triglicèrids van ser predictors independents dels nivells de FABP4 en aquesta població⁸³. En el treball de Miyoshi i col·laboradors, els nivells de FABP4 circulants es van associar de manera independent amb la presència d'ateroma a nivell coronari determinada per ecografia intravascular (*intravascular ultrasounds* (IVUS))¹⁵². Contràriament a les evidències presentades, en un treball del nostre grup realitzat en població caucàsica amb T2D, els nivells de FABP4 circulant no es van associar ni amb l'aterosclerosi clínica ni subclínica⁵¹. Mentre que un altre estudi en individus amb T2D, realitzat en població xinesa, proposava els nivells en sèrum de FABP4 com a predictors independents de complicacions macrovasculars¹⁵¹.

1.4.5 FABP4: potencial diana terapèutica

En els darrers anys, s'han dut a terme diverses estratègies de *screening* amb l'objectiu final de trobar i desenvolupar petites molècules inhibidores de FABP4 com a agents terapèutics per prevenir i tractar alteracions metabòliques com la T2D i l'ateriosclerosi. Aquests estudis cerquen molècules que interaccionin amb la molècula de FABP4 de manera similar a com ho realitzaria un àcid gras, impossibilitant-ne la unió i la interacció amb altres proteïnes com la HSL¹⁵³⁻¹⁵⁸. De totes les molècules resultants dels *screenings* virtuals, l'única molècula inhibidora oral testada en ratolins ha estat la BMS309403¹³⁵. La potència i la selectivitat d'aquesta molècula inhibidora imita el fenotip dels animals deficientes en aP2. La molècula ha estat efectiva en la millora del metabolisme de la glucosa, potencia la sensibilitat a la insulina en models d'obesitat genètica o induïda per la dieta, i en el tractament de la T2D i la simptomatologia de l'ateriosclerosi, com a resultat de l'administració oral a ratolins¹³⁵. A part del desenvolupament d'inhibidors sintètics, un estudi recent ha determinat que l'extracte de canyella (CE) podria constituir un inhibidor natural de FABP4¹⁵⁹. Utilitzat com a suplement dietètic, està provat que el CE exerceix efectes de millora sobre la sensibilitat a la insulina sistèmica i la dislipèmia, amb la potenciació de la via de senyalització de la insulina. En un estudi amb rates a les quals s'induïa resistència a la insulina per la dieta, el CE reduïa els nivells plasmàtics de FABP4, simultàniament a la millora de la sensibilitat a la insulina¹⁵⁹. Aquests treballs evidencien la potencialitat de la inhibició d'aP2 com a diana terapèutica davant de la prevenció i del tractament de malalties metabòliques.

Alternativament, diferents estudis han demostrat que intervencions farmacològiques diferents, indicades en el tractament de malalties de component metabòlic, poden influir en els nivells circulants de FABP4 en humans.

En un estudi realitzat en individus no diabètics amb hiperlipèmia, es va observar que el tractament amb atorvastatina 20mg/dia durant tres mesos disminuïa els nivells plasmàtics de FABP4 de manera independent als canvis en els nivells totals de colesterol¹⁶⁰. Aquest resultat *in vivo* coincidia amb un treball prèviament publicat, en què Llaverias i col·laboradors van observar una disminució en l'expressió de FABP4 en macròfags incubats amb LDLox, per efecte del tractament amb atorvastatina⁶⁷. El paper ateroprotector del fàrmac es reforça per l'efecte pleiotròpic que realitza sobre l'expressió de FABP4. En sentit invers, aquests treballs demostren la implicació de la FABP4 en la patogènia de la hiperlipèmia¹⁶⁰. En canvi, en una població amb T2D, els

individus amb tractament d'estatines no presentaven diferències significatives als nivells circulants de FABP4 en comparació als que no seguien aquest tractament⁵¹. També en relació amb el control del perfil lipídic, un altre treball va estudiar l'efecte del fenofibrat, un agonista PPAR α indicat per disminuir els nivells de triglicèrids. En una població d'individus obesos amb T2D, el tractament de tres mesos amb fenofibrat 200mg/dia no va afectar els nivells circulants de FABP4⁷⁸. D'aquest resultat se n'extreu que l'activació de PPAR α no afecta l'expressió de la FABP4.

En relació als fàrmacs pel control de la resistència a la insulina i la T2D, la metformina és un dels primers fàrmacs que es prescriuen. Inhibeix la síntesi de triglicèrids i colesterol, i disminueix els nivells de VLDL i LDL en pacients amb diabetis¹⁶¹⁻¹⁶³. En un estudi *in vitro* publicat recentment, s'ha vist que redueix l'acumulació lipídica en macròfags a través de la inhibició de la transcripció de FABP4 mediada pel factor de transcripció FOXO1¹⁶⁴. La metformina pot desenvolupar un paper important en la prevenció de la formació de la lesió ateroscleròtica. En canvi, en un estudi realitzat en el nostre grup en nenes hiperandrogèniques i dones amb PCOS, el tractament combinat de metformina amb flutamida i un anticonceptiu oral produïa augments en els nivells circulants de FABP4 menys pronunciats del que seria esperable en el subgrup de nenes hiperandrogèniques. El tractament també produïa millores en el perfil metabòlic d'aquestes dones⁸².

El tractament amb TZD, fàrmacs agonistes PPAR γ indicats per millorar la sensibilitat a la insulina¹⁶⁵, produeix un efecte important en els nivells circulants de FABP4. En la mateixa població d'individus amb T2D, es va observar que aquells individus amb tractament amb TZD presentaven nivells significativament més elevats que els no tractats⁵¹. En aquest mateix treball, es van presentar els resultats d'un estudi prospectiu amb pioglitazona 30mg/dia, una TZD, de 12 setmanes de durada en individus amb T2D i naïf per aquest tipus de tractament⁵¹. En aquest cas, es va reproduir l'augment dels nivells en plasma de la FABP4. L'efecte del tractament sobre la FABP4 avançava en paral·lel a un augment en l'activitat PPAR γ a nivell sistèmic⁵¹ (**Figura 12**). Aquests resultats s'explicarien pel paper de les TZD com a activadors de PPAR γ i la regulació de FABP4 per part de PPAR γ està ben establerta^{51, 52}.

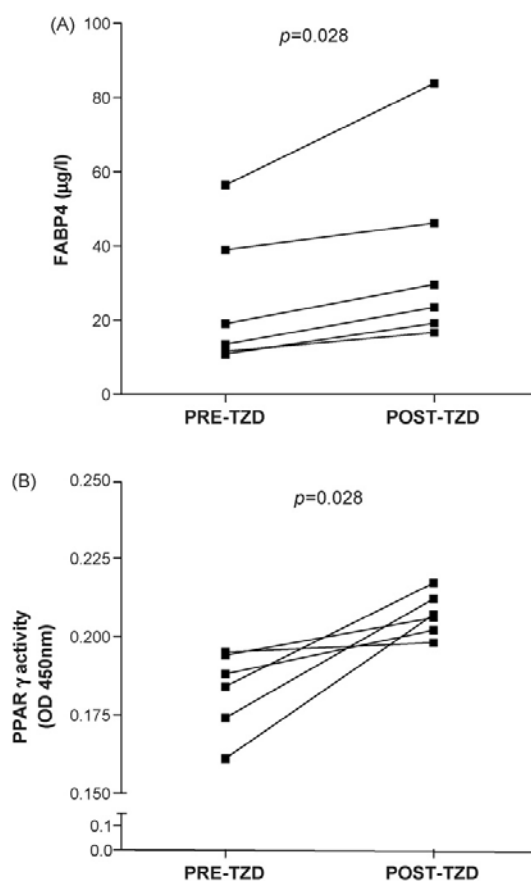


Figura 12. Valoració dels canvis en els nivells circulants de FABP4 i l'activitat sistèmica de PPAR γ en l'estudi prospectiu amb TZD durant 12 setmanes en T2D. Els nivells circulants de FABP4 (A) i de l'activitat sistèmica de PPAR γ (B) van augmentar de manera significativa per efecte del tractament amb la TZD (pioglitazona 30mg/dia). La valoració es va fer comparant els nivells finals (POST-TZD) amb els basals (PRE-TZD) individualment. (Resultats publicats pel nostre grup a la revista *Atherosclerosis*: Cabré A et al. *Atherosclerosis* 2007; 195: e150-8).

Els tractaments farmacològics produeixen efectes diversos sobre els nivells circulants de FABP4, però s'ha de tenir en compte el context metabòlic de les poblacions en què s'han dut a terme. Malgrat això, la potencialitat de la inhibició de FABP4 com a diana terapèutica per la prevenció i el tractament de malalties de base metabòlica és innegable. La potencialitat no rau únicament en el tractament farmacològic. Resulta d'interès el plantejament de la intervenció sobre els nivells circulants de FABP4 a nivell de la promoció de canvis d'estil de vida; és a dir, actuacions sobre la dieta i l'activitat física.

En relació a la dieta, s'havia observat que en una població infantil, els nens que presentaven una ingesta més elevada en greixos, especialment saturats, presentaven nivells elevats de FABP4 circulant que s'associaven a marcadors de resistència a la insulina i a la inflamació⁷⁵. En la intervenció de nens obesos amb una dieta saludable (30% greix, 15% proteïna, 55% hidrats de carboni), es va observar una disminució significativa dels nivells de FABP4 circulant en aquells individus que assolien una pèrdua significativa de pes en finalitzar l'estudi⁷⁴. En població obesa adulta, un estudi en què s'aplicava una dieta baixa en calories (20kcal/kg) va determinar que els nivells de FABP4 discriminaven entre els pacients amb pèrdua temporal i permanent de pes corporal⁸⁴.

En relació a l'activitat física, al nostre grup un estudi d'intervenció d'un any en pacients amb obesitat abdominal i risc cardiovascular moderat-alt ens va permetre determinar que l'augment en l'activitat física, independentment de la pèrdua de pes i sense variacions en la ingesta, anava acompanyat de disminucions en els nivells circulants de FABP4⁸⁶ (**Figura 13**).

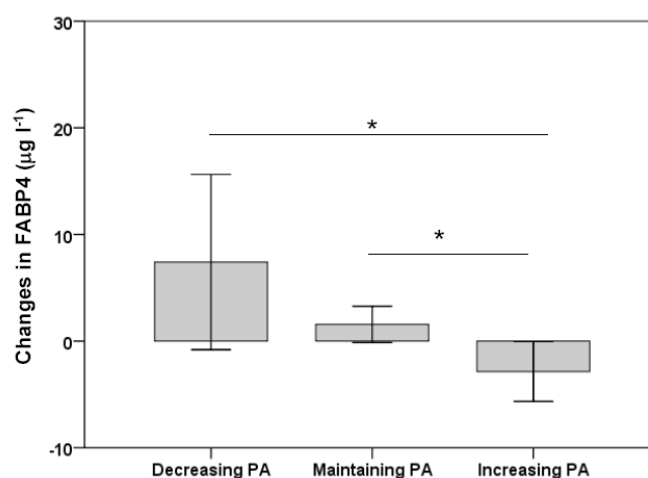


Figura 13. Efecte dels canvis en els nivells de FABP4 per efecte del canvi en l'activitat física en individus amb obesitat abdominal i risc cardiovascular moderat. Les columnes presenten el diferencial de les concentracions de FABP4 en plasma (temps final menys temps inicial) en els grups de disminució (n=19), manteniment (n=98) o l'augment (n=23) d'activitat física (PA) en què es va distribuir la població. *p<0.050 per comparació entre categories de l'evolució. (Manuscrit elaborat i sotmès per publicació Lázaro I *et al.* 2010).

2. Sistema de defensa antioxidant: Keap1-Nrf2-ARE

El sistema de defensa antioxidant cel·lular juga un paper clau en la protecció de les cèl·lules front a l'estrès exogen i endogen provocat per xenobiòtics, fàrmacs, inflamació o radiacions¹⁶⁶. La pertorbació de l'homeòstasi cel·lular com a resultat dels efectes produïts per aquests estressors causa l'acumulació de ROS o espècies electrofíliques que poden contribuir a la patogènesi de diferents malalties com són el càncer, la malaltia neurodegenerativa i l'arteriosclerosi^{167, 168}. La via de senyalització Keap1-Nrf2-ARE desenvolupa un paper clau en la protecció cel·lular contra el desafiament provocat per l'estrès oxidatiu. Coordina la resposta per la detoxificació a través de la regulació de l'expressió de proteïnes antioxidants i enzims detoxificadors de fase II que presenten llocs *Antioxidant Response Elements* (ARE) al promotor, als quals s'uneix el factor de transcripció Nrf2^{169, 170}.

2.1 Keap1-Nrf2-ARE: descripció del sistema

La inducció de la defensa antioxidant cel·lular requereix un sistema que es compon de tres elements clau¹⁷⁰:

1) ARE

Es tracta de la seqüència reguladora localitzada a *upstream* dels gens implicats en la defensa antioxidant.

2) Nrf2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*).

El factor de transcripció que heterodimeritza amb membres de la família de proteïnes *small Maf* per unir-se als llocs ARE i reclutar la maquinària de la transcripció per induir l'expressió dels gens controlats per ARE i implicats en la defensa antioxidant.

3) Keap1 (*Kelch ECH associating protein 1*).

La proteïna citosòlica repressora de Nrf2 que controla l'activació i la degradació de Nrf2. La seva composició en residus de cisteïna el converteix en un sensor ideal per la detecció de les senyals d'estrès.

2.1.1 *Antioxidant Response Element (ARE)*

La identificació dels llocs ARE va ser el pas inicial en l'elucidació del mecanisme molecular de la resposta quimioprotectora. Els llocs ARE són elements de resposta que es troben a la regió promotora dels gens que regulen. Prenen la denominació d'elements *cis-acting* perquè es troben a la mateixa seqüència que el gen que controlen¹⁷¹.

La seqüència consens dels llocs ARE descrita és: 5'-RTGACnnnGC-3', on 'n' representa qualsevol nucleòtid. Aquesta seqüència es va caracteritzar per mutagènesi dirigida del lloc ARE del promotor de la subunitat Ya de la glutatió S-transferasa¹⁷¹. La seqüència dels llocs ARE és reconeguda per diferents factors de transcripció¹⁷²⁻¹⁷⁶. S'ha vist que intervenen en la regulació de l'expressió basal i induïda d'una bateria de gens que comprèn la pràctica totalitat del sistema de resposta quimioprotectora, com per exemple els enzims de fase II. Una anàlisi més detallada va mostrar que les seqüències dels llocs ARE en elles mateixes eren insuficients per intervenir en la resposta quimioprotectora. Es va determinar que necessitaven de la presència d'una seqüència addicional adjacent¹⁷⁷.

Entre els factors de transcripció que reconeixen la seqüència dels llocs ARE es troben els membres de la família *basic leucine zipper* (bZip) NF-E2 com són Nrf1, Nrf2 i Nrf3, que heterodimeritzen amb les *small Maf* proteïnes. De tots aquests, Nrf2 és el més potent en la regulació de l'expressió basal i induïda dels gens de la defensa antioxidant¹⁷⁸ i la resistència front a la toxicitat produïda pels xenobiòtics¹⁷⁹⁻¹⁸². Aquest fet es va demostrar en diferents experiments amb models animals deficientes en Nrf2 (*nrf2*^{-/-}), en què es va avaluar l'expressió de gens amb llocs ARE (GST, NQO-1, HO-1) en resposta a compostos antioxidants^{175, 180, 183}.

2.1.2 Nrf2: descripció i activitat

Nrf2 és el principal factor de transcripció implicat en la defensa antioxidant cel·lular. Actua controlant l'expressió gènica constitutiva i induïble dels gens controlats per llocs ARE. Es va identificar com a resultat del *screening* de molècules que interaccionaven amb el lloc d'unió ARE¹⁸⁴. Nrf2 s'expressa quasi de manera ubiqua. Els models animals *nrf2*^{-/-} demostren que aquest factor de transcripció no és indispensable per al creixement i per al desenvolupament¹⁸⁵, ni en l'hematopoiesi^{175, 185}. En canvi, provoca que aquests animals siguin més susceptibles al dany causat per agents electròfils i oxidants exògens.

Nrf2 pertany a una família de proteïnes integrada per 5 membres que es caracteritza per estar estructuralment relacionada amb la subunitat p45 de la proteïna NF-E2 (*nuclear factor erythroid 2*). A nivell estructural, Nrf2 i els altres membres de la família es caracteritzen per presentar un domini *Cap' n' collar* (CNC) i un domini C-terminal que es compon d'una regió rica en residus bàsics adjacent a una conformació en "cremallera" formada per la repetició de 7 residus hidrofòbics, normalment, leucines (bZip). A nivell funcional, els membres de la família CNC-bZip es caracteritzen per la necessitat d'heterodimeritzar amb una proteïna *small Maf* a través de la regió bZip per unir-se al lloc de reconeixement del DNA¹⁸⁶⁻¹⁹⁰ (**Figura 14**).

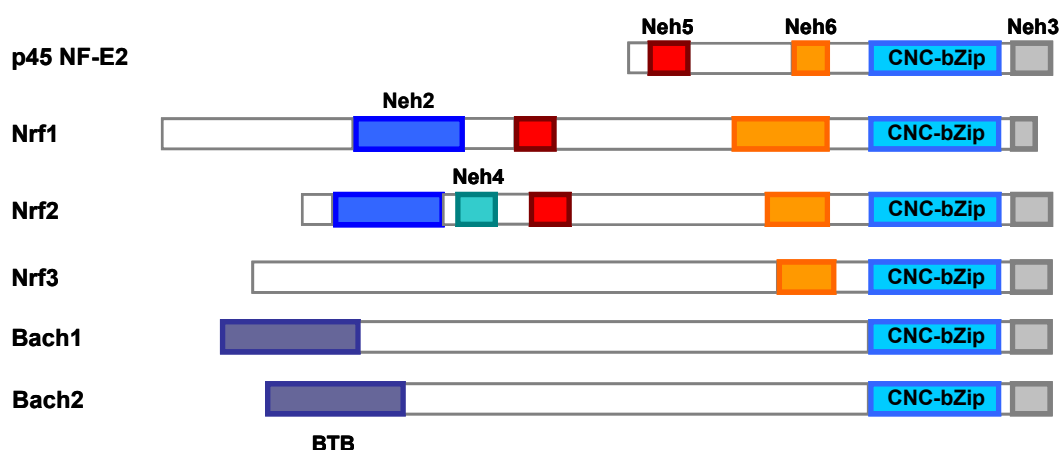


Figura 14. Propietats estructurals dels membres de la família de proteïnes CNC. Les proteïnes de la família CNC-bZip es componen de dominis Neh que es conserven entre les espècies de vertebrats. L'únic membre que conserva els 6 dominis Neh és Nrf2. Els altres membres de la família CNC no contenen la totalitat dels dominis Neh. Neh4 és l'únic domini específic de Nrf2. El domini Neh2 d'interacció amb el seu repressor també es troba a Nrf1. Mentre que no hi ha presència de dominis Neh a les proteïnes Bach (adaptada de Kobayashi M i Yamamoto M. *Advan Enzyme Regul* 2006; 46:113-140).

Les anàlisis estructura-funció de la molècula de Nrf2 han permès determinar la funcionalitat dels 6 dominis Neh (*Nrf2-ECH homology*, regions homòlogues entre Nrf2 humana i ECH, l'ortòleg de pollastre) (Neh1-Neh6) que la formen¹⁹¹. Neh1 conté els dominis CNC-bZip, que són els responsables de la dimerització de Nrf2 amb les *small Maf* i la unió al DNA. Neh2 és el domini de regulació negativa perquè és el que interacciona amb el repressor Keap1^{191, 192}. Neh4 i Neh5, i probablement Neh3, constitueixen els dominis de transactivació¹⁹³ (**Figura 15**).

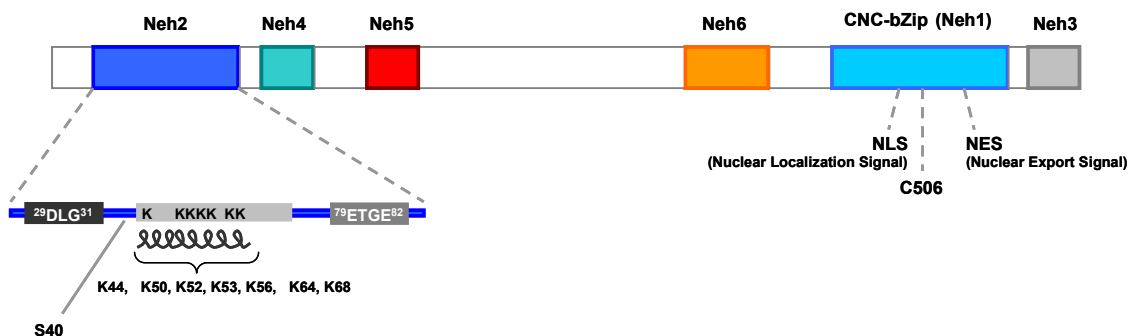


Figura 15. Dominis funcionals i d'interacció de Nrf2. Nrf2 s'uneix al seu repressor Keap1 a través dels motius ETGE i DLG del domini Neh2. La denominació d'aquests dos motius es correspon amb la nomenclatura de lletra dels aminoàcids. El motiu DGL es troba a la regió hidrofòbica i està format per àcid aspàrtic (D), leucina (L) i glicina (G). Mentre que el motiu ETGE està format per residus d'àcid glutàmic (E), treonina (T), glicina (G) i àcid glutàmic (E). Entre ETGE i DLG es troben 7 residus de lisina (K44, K50, K52, K53, K56, K64, K68) que són importants per la ubiquitinació i la degradació. Els dominis Neh4 i Neh5 formen els dominis d'activació transcripcional amb els quals interacciona CBP. Els dominis Neh6 i Neh2 són importants per la degradació de Nrf2. El domini Neh1 conté una estructura bZip i un residu de cisteïna (C506), crítics per la unió al DNA i la dimerització amb les *small Maf*. Neh1 també conté els NLS i NES (adaptada de Kobayashi M i Yamamoto M. *Advan Enzyme Regul* 2006; 46:113-140).

Com a factor de transcripció que és, els nivells i l'activitat de Nrf2 estan regulats a diversos nivells: transcripció, degradació, translocació i modificacions transcripcionals, com per exemple la fosforilació¹⁹⁴⁻¹⁹⁸. En cadascun d'aquests processos, participen de manera diferencial els dominis de la proteïna Nrf2 identificats.

L'activació de Nrf2 en resposta a estímuls oxidants és conseqüència de l'alliberament de la retenció a citoplasma, d'aquesta manera es possibilita la translocació a nucli on realitza la seva activitat transcripcional¹⁹¹. Nrf2 és una proteïna molt inestable (temps de vida mitjana inferior a 20 minuts) que està subjecta a degradació proteolítica catalitzada per la subunitat 26S del proteasoma a través de via dependent de la ubiquitinació. Se suggereix que l'activació de Nrf2 és dependent de mecanismes que augmenten la seva estabilitat i que permeten una certa acumulació cel·lular^{199, 200}.

2.1.2.1 Supressió de l'activitat de Nrf2 i promoció de la seva degradació per part de Keap1 en condicions homeostàtiques

En condicions d'homeòstasi redox, Nrf2 assegura els nivells basals d'expressió dels gens regulats per ARE; és a dir, es manté en un estat de funcionalitat constitutiva i permet detectar-ne la presència a nucli.

D'altra banda, en aquestes condicions, en la regulació de l'activitat de Nrf2 també pren part el seu repressor Keap1. Aquesta molècula s'uneix al factor de transcripció retenint-lo a nivell citoplasmàtic o recuperant-lo des del nucli per promoure'n la ubiquitinació i degradació via proteasoma²⁰¹.

Keap1 va ser caracteritzat per Yamamoto i col·laboradors¹⁹¹. Es compon de dos dominis canònics: el domini BTB (*Bric-a-brac*, *tramtrack*, *broad complex*) i el domini DGR (*double glycine repeat*, també anomenat domini Kelch); i tres dominis addicionals: la regió N-terminal (NTR), la *intervening region* (IVR) i la regió C-terminal (CTR) (**Figura 16**). El domini BTB és necessari per l'homodimerització de Keap1. El domini IVR conté els residus de cisteïna que li proporcionen les propietats de sensor cel·lular front als canvis en l'estat redox. La proteïna humana conté un total de 27 residus de cisteïna; d'aquestes, s'ha descrit que les funcionalment més crítiques són C151, C273 i C288^{191, 197, 202-204}.

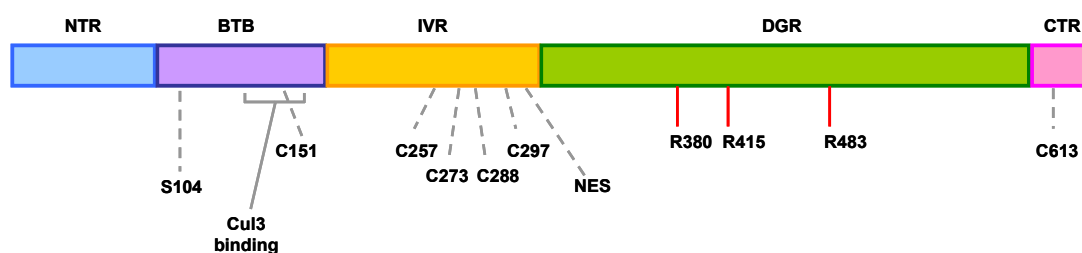


Figura 16. Dominis funcionals i d'interacció de Keap1. El domini DGR de Keap1 li proporciona el lloc d'unió per Nrf2 i actina. La unió amb Nrf2 es dona a través de tres residus d'arginina (R380, R415, R483). Cul3 interacciona amb els dominis IVR i/o BTB. La regió BTB també és important per la dimerització de Keap1. El domini IVR també conté una seqüència NES i els residus de cisteïna sensibles a l'estat oxidatiu de les cèl·lules (C151, C257, C273, C288, C297) (adaptada de Kobayashi M i Yamamoto M. *Advanced Enzyme Regul* 2006; 46:113-140).

Keap1 utilitza el domini canònic DGR per interaccionar amb el domini Neh2 de Nrf2 i retenir-lo a citoplasma. Per assegurar aquesta retenció, utilitza aquest mateix domini per associar-se amb l'actina del citoesquelet²⁰⁵. La interacció entre Keap1 i Nrf2 segueix el que s'anomena model de "hinge and latch" (que es podria traduir com model de "frontissa i pestell"). Segons aquest model, en condicions d'homeòstasi redox, una molècula de Nrf2 interacciona amb dues molècules de Keap1 a través de dos motius del domini Neh2, ETGE i DGL. El motiu ETGE actua com a element basculant del sistema (*latch* o frontissa). Es localitza entre els residus 79 i 82 de la seqüència aminoacídica de Nrf2 (⁷⁹ETGE⁸²) i té molta afinitat pel domini DGR de Keap1, cosa que produeix una unió forta entre les dues molècules. En canvi, el motiu DLG actua com a element de tancament del sistema (*hinge* o pestell). Se situa entre els residus 29 i 31 (²⁹DGL³¹) i l'afinitat per Keap1 és menor i es tradueix en una unió més feble²⁰⁶ (**Figura 17**).

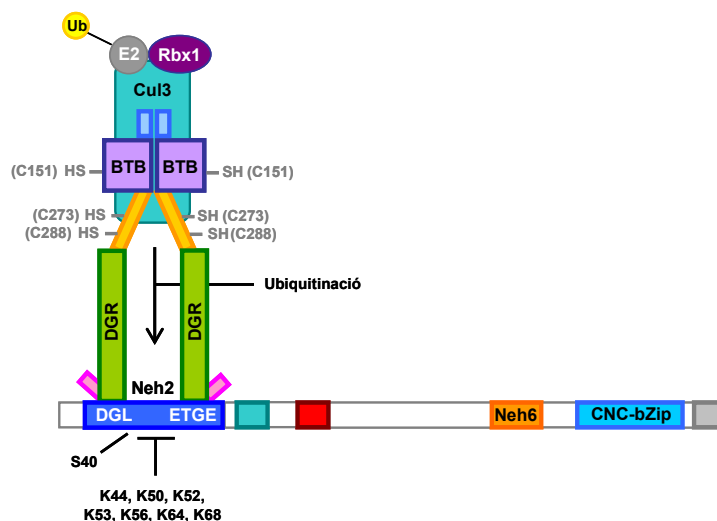


Figura 17. Esquema de la interacció entre Nrf2 i l'homodímer Keap1. En condicions d'homeòstasi redox, l'homodímer de Keap1 interacciona a través dels dominis DGR amb els motius DGL i ETGE del domini Neh2 de Nrf2.

Nrf2 és constantment degradat en condicions de no estrès cel·lular a través d'un mecanisme liderat per Keap1. Aquesta molècula promou la ubiquitinació i l'eliminació de Nrf2 de manera constitutiva a través del proteasoma. La unió Keap1-Nrf2 permet actuar a l'homodímer de Keap1 com a adaptador del complex Cullin 3 (Cul3)-based E3 ligasa que regula l'estabilitat de Nrf2. Cul3 actua com a proteïna base que forma el complex E3 ligasa amb Roc1/Rbx1/Hrt1 i recluta l'enzim E2. La interacció de Keap1 amb Cul3 es dona a través de l'extrem C-terminal de Cul3 i els dominis IVR i/o BTB de Keap1²⁰⁷⁻²¹⁰. Tres residus d'arginina (R380, R415 i R483) situats en el domini DGR de

Keap1 són els responsables de la unió amb Nrf2²¹¹ (veure **Figura 16**). La unió entre els motius ETGE i DLG de Nrf2 i DGR de l'homodímer Keap1 que es troba associat amb el complex E3 ligasa resulta en una conformació espacial del sistema, essencial per la presentació dels residus de lisina de Nrf2 en l'orientació adequada per acceptar les molècules d'ubiquitina²¹²⁻²¹⁴. D'aquesta manera, Nrf2 queda marcat per la seva degradació via la subunitat 26S del proteasoma^{196, 197, 208, 209, 215}. Recentment, un estudi ha descrit que una proteïna implicada en el remodelatge de la cromatina, la prothymosin- α , fa possible la importació a nucli del complex de degradació Keap1/Cul3/Rbx1. A nucli, el complex intercanvia la proteïna prothymosin- α per Nrf2, que recupera i en promou la degradació²¹⁶.

La unió Keap1-Nrf2 assegura una ràpida renovació de la proteïna Nrf2, que es tradueix en una vida mitjana no superior a 20 minuts²¹⁷. Cal esmentar que la degradació de Nrf2 és bàsicament dependent de Keap1, però n'existeix una altra de minoritària independent de Keap1 que està mediada pel domini Neh6 de Nrf2^{208, 218} (**Figura 18**).

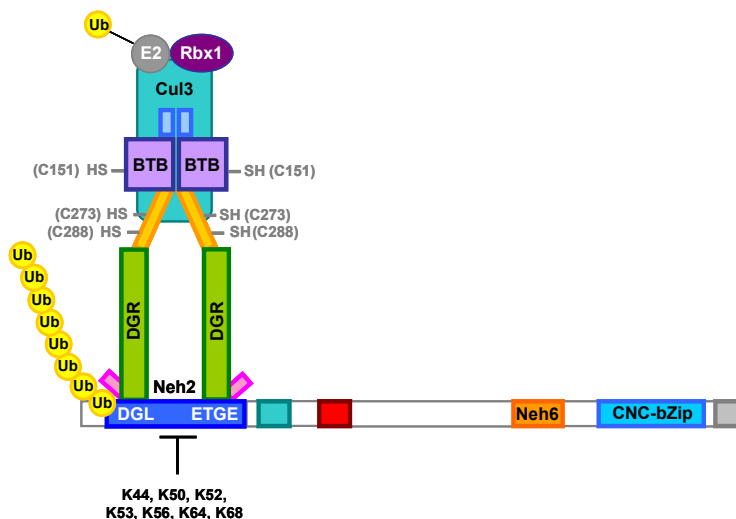


Figura 18. Esquema de la poliubiquitinació de Nrf2 induïda pel complex *Cul3-based ligase 3* associat a l'homodímer Keap1. La interacció entre els dominis BTB i IVR de l'homodímer de Keap1 amb Cul3 permet que aquest últim disposi de més facilitat d'accés a Nrf2 per poliubiquitinar-lo als residus de lisina (K44,K50,K52,K53,K56,K64,K68) i promoure'n la degradació via la subunitat 26S del proteasoma.

2.1.2.2 Activació de Nrf2: alliberament de la repressió de Keap1 en condicions d'estrès oxidatiu

L'estabilitat de molts factors de transcripció està lligada a la capacitat dels seus dominis de transactivació, que normalment se situen pròxims o superposats als seus degrons. En el cas de Nrf2, el domini Neh2 és el seu degró; ja que està associat amb la degradació de Nrf2 dependent de Keap1^{191, 192}. Nrf2 és molt inestable i posseeix un domini de transactivació potent adjacent al lloc d'interacció amb Keap1. S'ha determinat que la seva degradació està molt vinculada a la seva activitat transcripcional.

En una situació en què es trenca l'equilibri redox cel·lular, es desencadenen una sèrie de mecanismes que estableixen Nrf2 i en disminueixen la velocitat de degradació²¹⁹. La molècula sensor per la detecció dels estímuls oxidants i que inicia el procés de l'activació de Nrf2 és Keap1. L'elevada reactivitat als electròfils dels residus de cisteïna de Keap1 li proporciona una sensibilitat molt alta davant de l'amenaça de les espècies oxidants o electròfiles. En presència d'estrès oxidatiu, els residus de cisteïna de l'homodímer de Keap1 s'oxiden i formen ponts disulfur entre les dues molècules (principalment, C273 i C288). Com a resultat, es produeix un canvi conformacional que provoca el trencament de la unió entre una de les molècules de Keap1 i el motiu de baixa afinitat d'unió, ²⁹DLG³¹, al domini Neh2 de Nrf2. Addicionalment, la modificació oxidativa del residu C151 al domini BTB de Keap1 resulta en la inhibició de l'activitat E3 ubiquitin ligasa²²⁰. Ambdós processos de modificacions dels residus de cisteïna de Keap1 convergeixen en l'impediment del procés d'ubiquitinació de Nrf2, cosa que n'evita la degradació i en possibilita l'estabilització (**Figura 19**).

D'altra banda, la modificació oxidativa dels residus de Keap1 també afecta la seva unió als filaments d'actina del citoesquelet que es dona a través del domini DGR. La pèrdua de la rigidesa donada per l'associació amb l'actina facilita l'alliberament i la translocació a nucli de Nrf2²²¹ (**Figura 19**).

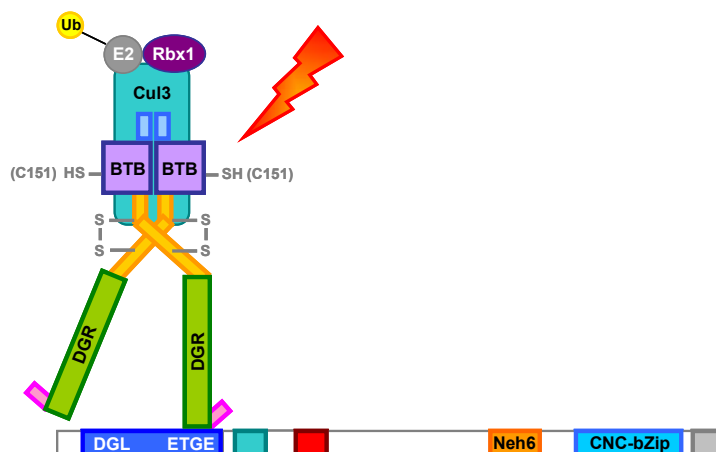


Figura 19. Esquema del primer pas en l'alliberament de Nrf2 com a resultat de l'exposició a l'estrès oxidatiu. En una situació de trencament de l'homeòstasi redox per la presència d'estímuls oxidants, es produeix l'oxidació dels residus de cisteïna del domini IVR de Keap1. Segons el model *hinge & latch*, el canvi conformacional resultant trenca la unió entre DGR-Keap1 i DGL-Nrf2. D'aquesta manera s'inhibeix la inducció de la degradació de Nrf2 via proteasoma i s'afavoreix la dissociació del Nrf2-Keap1.

L'activació de Nrf2 implica mecanismes complexos que van més enllà de l'alliberament físic de l'associació amb Keap1 com a resultat de la modificació oxidativa dels residus de cisteïna. Els mecanismes precisos que condueixen a l'estabilització estan encara per determinar²¹⁹.

El control de l'estabilitat de Nrf2 derivat de l'alliberament de Keap1 està regulat espacial i temporalment per mecanismes que restringeixen la seva interacció. Els inductors electrofílics posen en marxa sistemes que eviten o redueixen l'accés de Keap1 a la molècula de Nrf2²¹⁹.

Un exemple descrit recentment que va en aquest sentit és el que es produeix com a resultat de la interacció de la proteïna *sequestosome 1* (SQSTM1), o també anomenada p62, amb els 3 residus d'arginina del domini DGR de Keap1. En condicions d'estrès, es produeix una acumulació de SQSTM1 que competeix i desplaça a Nrf2 per la unió a Keap1, cosa que l'estabilitza perquè s'evita la seva degradació. La unió Keap1-SQSTM1 promou la degradació del primer via proteasoma^{220, 222-224}.

Un altre mecanisme que estabilitza Nrf2 ve donat per la molècula DJ-1. Aquesta proteïna, inicialment relacionada amb el càncer i la malaltia neurodegenerativa del Parkinson, estabilitza Nrf2 i n'evita la interacció amb el repressor Keap1²²⁵⁻²²⁷.

2.1.2.3 Activació de Nrf2: vies implicades en el mecanisme d'alliberament de Keap1 en condicions d'estrès oxidatiu

En la regulació de l'estabilització i l'activació de Nrf2 també estan implicades les principals cascades de senyalització intracel·lular: la proteïna quinasa C (PKC), la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI-3k/Akt) i les proteïnes quinases activadores del mitogen (MAPK). Aquestes proteïnes quinases podrien intervenir en la fosforilació directament sobre Nrf2 i també sobre mecanismes que facilitarien la translocació a nucli del factor de transcripció (**Figura 20**).

Nrf2 és fosforilat a residus de serina i/o treonina com a resultat de l'activació d'aquestes quinases²²⁸. Malgrat això, l'efecte de la fosforilació sobre l'estabilització i l'activació de Nrf2 no és clar i necessita ser estudiat més profundament²¹⁹. La possibilitat més acceptada és que, en presència d'estrès oxidatiu, el trencament de la interacció entre una molècula de l'homodímer Keap1 i el motiu DGL-Neh2 de Nrf2 permeti l'accés de les quinases per la fosforilació de Nrf2. D'aquesta manera, la forma fosforilada del factor de transcripció pot translocar-se a nucli per unir-se als llocs ARE dels promotors dels gens que regula. Una altra possibilitat és que la forma fosforilada de Nrf2 no es deslliuri totalment de Keap1 i que sigui la molècula repressora la que ajudi en el transport i translocació a nucli²²⁹.

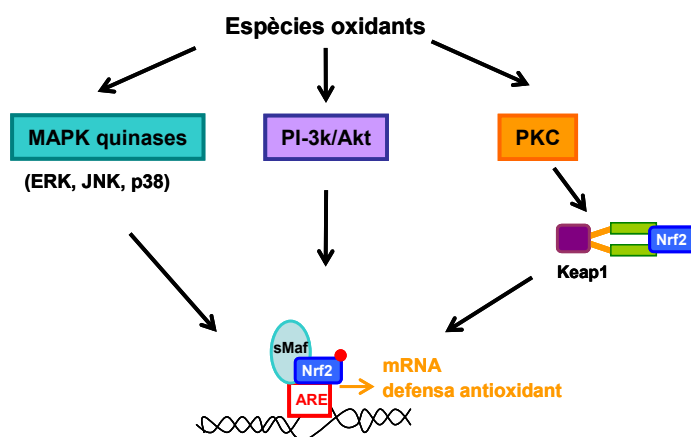


Figura 20. Cascades de senyalització intracel·lular implicades en l'alliberament de Nrf2 del repressor citoplasmàtic Keap1. Tres de les principals vies de senyalització intracel·lular estan implicades en la regulació de la resposta transcripcional mediada per ARE en resposta a l'estrès oxidatiu. PKC fosforila de manera directa a Nrf2 al residu Ser40 per promoure'n l'estabilització i la translocació nuclear. PI-3k/Akt actua sobre el citoesquelet d'actina per facilitar l'alliberament de Nrf2 del segrest de Keap1 i possibilitar la translocació de Nrf2 a nucli; però, pot també efectuar un paper secundari fosforilant directament Nrf2. Les proteïnes de la família MAPK intervenen en la fosforilació de residus de Ser/Thr de Nrf2.

La via de senyalització de PKC és molt important en la fosforilació de Nrf2. Estudis independents han demostrat que PKC fosforila Nrf2 al residu serina 40 (S40)²³⁰⁻²³². El residu S40 es troba al domini Neh2 de Nrf2, just després del motiu DLG i abans dels 7 residus de lisina. En condicions d'estrès oxidatiu, el canvi conformacional de l'homodímer de Keap1 i el trencament de la unió DGR-DLG, permet l'accés de PKC a la posició S40 per fosforilar-la. En els treballs en què es descriu la fosforilació de Nrf2 a S40, els autors proposen que la fosforilació suposa un pas que facilita la dissociació definitiva del repressor, que l'estabilitza i l'activa, produint-se la translocació a nucli on s'uneix a ARE²³⁰⁻²³³ (**Figura 20**).

La via de senyalització PI-3k/Akt està integrada en la via de senyalització de la insulina. La PI-3k és activada per fosforilació per part de tirosines (Tyr) quinases associades a receptors de membrana, com és el cas del receptor de la insulina, formant un complex amb els residus de fosfo-Tyr en el receptor activat. La PI-3k fosforilada inicia, per fosforilació, l'activació dels membres de la cascada que es troben a *downstream*; com és l'Akt, que és fosforilat a les posicions Thr308 i Ser473²³⁴ (**Figura 21**). La redistribució i el reordenament del citoesquelet d'actina depenen de les activitats d'aquestes quinases^{235, 236}.

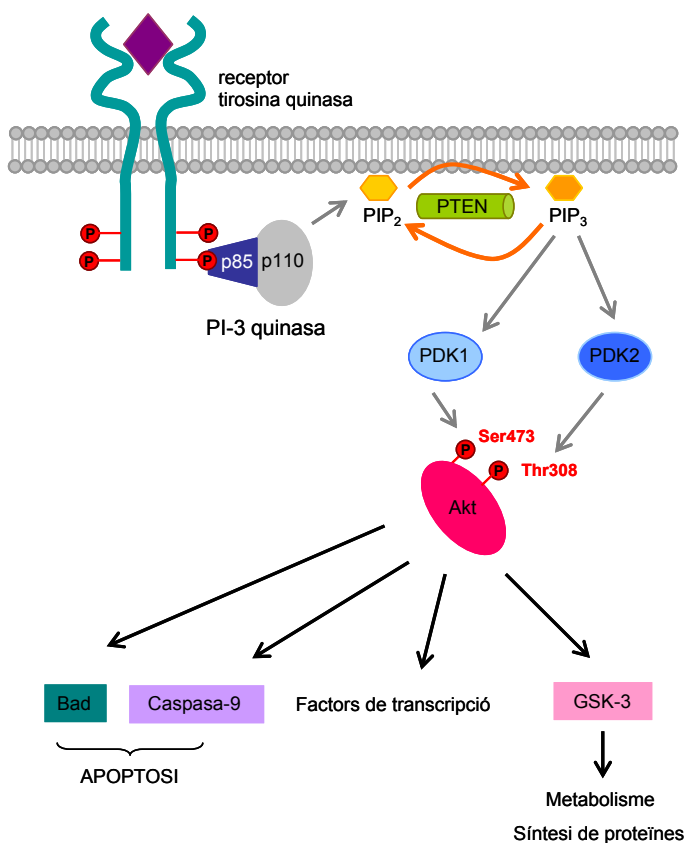


Figura 21. Via de senyalització PI-3k/Akt. L'activació per fosforilació del receptor tirosina quinasa provoca l'activació de la PI-3 quinasa que catalitza la fosforilació de la fosfatidilinositol difosfat (PIP₂) a fosfatidilinositol trifosfat (PIP₃). La PIP₃ recluta les proteïnes quinases PDK1 i PDK2 responsables de la fosforilació i activació de Akt. La fosforilació a Thr308 precedeix la fosforilació a Ser473 i està mediada per PDK1. El canvi conformacional resultant fa accessible el residu Ser473 a PDK2, que el fosforila, assolint el grau màxim d'activació d'Akt. Entre les dianes d'Akt a *downstream* es troben proteïnes implicades en la supressió de l'apoptosi, Bad i caspasa-9, factors de transcripció i proteïnes implicades en el metabolisme cel·lular i la síntesi proteica, com GSK-3.

Kang i col·laboradors van demostrar que la via de PI-3k/Akt és responsable de la translocació nuclear de Nrf2 a través de canvis en el citoesquelet d'actina²³⁷. La localització subcel·lular de Nrf2 depèn completament de la xarxa de microfilaments d'actina²³⁷. L'efecte de l'activació de PI-3k/Akt en resposta a l'estrès oxidatiu sobre el citoesquelet d'actina també afecta el repressor citoplasmàtic de Nrf2. Keap1 es troba ancorat al citoesquelet a través del domini DGR, per assegurar-ne la seva localització a la regió perinuclear i ajudar a la retenció de Nrf2^{170, 221}. En presència d'estímuls oxidants, la despolimerització dels microfilaments d'actina fa que la unió al citoesquelet sigui més laxa i permeti l'alliberament o la translocació de Nrf2 a nucli²²¹. L'efecte de l'activació d'aquesta via de senyalització sobre l'activitat transcripcional derivada de l'activació de Nrf2 ha estat determinat en diferents estudis en què s'inclouen inhibidors de la via tals com la *wortmannin* i LY294002²³⁷⁻²⁴¹. El bloqueig de la via anul·lava l'expressió de gens regulats per ARE en resposta a coneguts activadors de Nrf2, com és la tert-butylhydroquinone (tBHQ)²³⁷. En relació a aquest efecte, alguns treballs també suggereixen que l'activació d'aquesta via de senyalització també fosforilaria la molècula de Nrf2 a part de l'efecte sobre el reordenament del citoesquelet^{242, 243}.

Les *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) constitueixen una família de proteïnes quinases molt relacionades. En aquesta família trobem: *extracellular signal-regulated kinase* (ERK), *c-jun N-terminal kinase* (JNK), p38, i altres proteïnes quinases menys caracteritzades, que catalitzen la fosforilació a residus de serina o treonina adjacents a un residu de prolina. El sistema de senyalització MAPK respon a diversos estímuls, entre els que es troba l'estrès oxidatiu, i s'ha vist implicat en la inducció de Nrf2^{239, 241, 244-246}. Recentment, s'ha determinat que actuen en la fosforilació de residus de Ser/Thr de Nrf2 *in vivo*, però que aquest efecte produeix una contribució limitada en l'activitat de Nrf2. Constitueix una contribució indirecta a la seva activació²⁴⁷.

A part de la fosforilació per alliberar i estabilitzar a Nrf2, diferents estudis han determinat que la fosforilació de Nrf2 també és important per exportar-lo des del nucli a citoplasma un cop ha promogut l'expressió dels gens diana i evitar-ne la seva acumulació. La fosforilació a la Tyr568 és essencial per la unió a CRM1 (*export receptor for leucine-rich nuclear export signals*) que controla aquest procés d'exportació a nucli. La posició 568 es troba al domini CNC-bZip (Neh1) on es localitzen les seqüències NES i NLS de Nrf2²⁴⁸ (**Figura 22**).

El procés de fosforilació també afecta directament el funcionament propi de Keap1. Les molècules de Keap1 sintetitzades *de novo* són fosforilades a Tyr141 del domini per estabilitzar-les. La mutació de Tyr per Ala va provar que amb la subseqüent manca de fosforilació, el Keap1 era inestable, no funcional i era degradat ràpidament. La defosforilació de Keap1 a la posició 141 el fa inestable fins el punt de no poder retenir a Nrf2 i que aquest s'estabilitzi²⁴⁹.

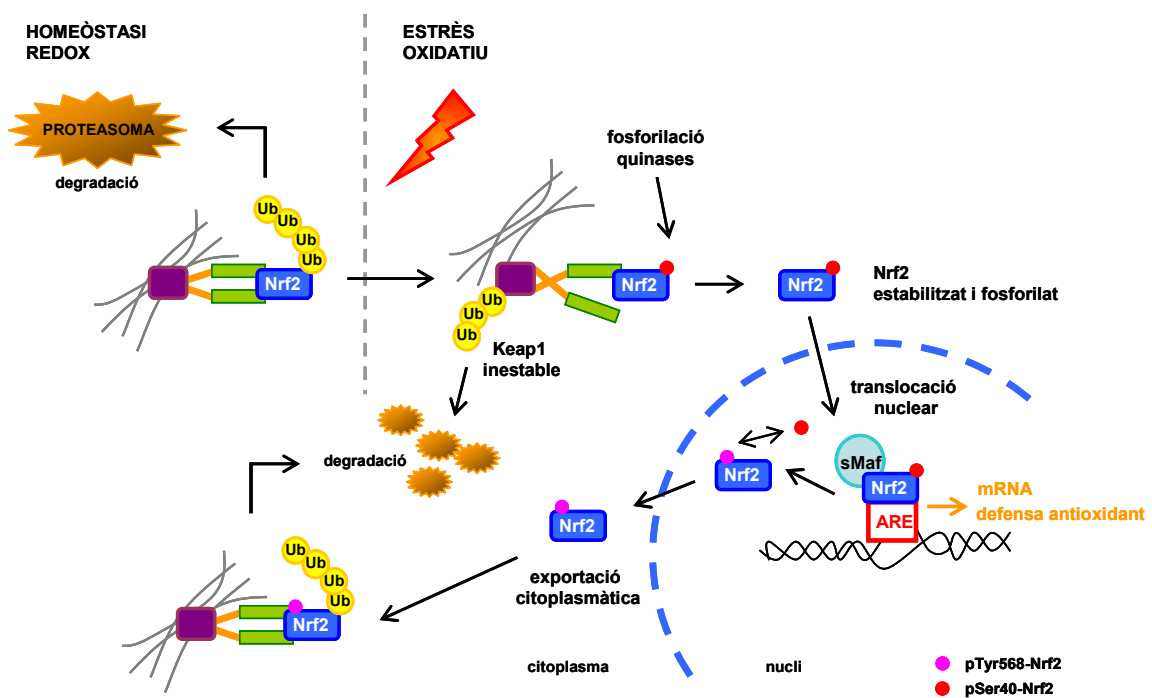


Figura 22. Model del funcionament de Nrf2 en condicions d'homeòstasi redox i en condicions d'estrès oxidatiu. En condicions d'homeòstasi redox, Nrf2 és poliubiquitinilat (Ub) i degradat via proteasoma. En presència d'estrès oxidatiu, els residus de cisteïna de l'homodímer de Keap1 són oxidats i es produeix un canvi conformacional que possibilita la dissociació del complex Nrf2-Keap1. Nrf2 s'estabilitza i és fosforilat per les proteïnes quinases (a la posició Ser40), es transloca a nucli on s'uneix als llocs ARE per promoure la transcripció dels gens implicats en la defensa antioxidant. La fosforilació a la posició Tyr568 es requereix per l'exportació citoplasmàtica de Nrf2 on és destinat a degradació via proteasoma.

2.1.2.4 *Loops* auto-regulatoris del sistema Keap1-Nrf2-ARE

El sistema de defensa antioxidant Keap1-Nrf2-ARE està estrictament controlat per una sèrie de *loops* autoregulatoris que fan que aquest sistema estigui finament mecanitzat i controlat pels elements que l'integren.

Kwak i col·laboradors van determinar que Nrf2 controla la seva pròpia expressió a través de llocs ARE que estan localitzats al promotor del seu gen. En una situació d'estrès oxidatiu, l'activació i acumulació a nucli de Nrf2, promou simultàniament l'expressió dels gens de la defensa antioxidant i, també, del propi factor de transcripció²⁵⁰. Aquest mecanisme assegura l'obtenció d'una ràpida i elevada resposta contra l'estímul oxidatiu a fer front, perquè es multiplica ràpidament la quantitat del factor de transcripció disponible.

A més de la seva pròpia expressió i dels gens antioxidants, Nrf2 controla la transcripció de Keap1, el seu repressor. Recentment, s'ha descrit la presència de llocs ARE al promotor del gen de Keap1²⁵¹. D'aquesta manera, Nrf2 controla indirectament la seva pròpia degradació i evita que es produeixi una acumulació excessiva a nivell de nucli. Promou l'expressió del seu repressor que s'encarrega de facilitar la ubiquitinació de Nrf2 i facilitar la seva degradació via proteasoma. La reducció dels nivells de Nrf2 autoinduïda s'acompanya del retorn als nivells d'expressió basal de Keap1²⁵¹.

En relació a la mediació de Nrf2 en la seva pròpia degradació, un treball recent de Kaspar i Jaiswal ha provat l'existència d'un *loop* autoregulatori de retroalimentació entre Cul3-Rbx1 i Nrf2²⁵². Cul3 i Rbx1 conformen el complex ubiquitin ligasa que s'acobla a Keap1 i que és responsable de la ubiquitinació i degradació de Nrf2. La presència de llocs ARE al promotor dels gens de Cul3 i Rbx1 permet que Nrf2 en reguli les seves transcripció i inducció i, al seu torn, que l'expressió d'aquestes proteïnes en controlin la de Nrf2 pel mecanisme de degradació.

2.2 Keap1-Nrf2-ARE: implicació en la regulació gènica de la defensa antioxidant sistèmica

L'organisme està constantment exposat a accions tòxiques, mutagèniques i carcinogèniques dutes a terme per espècies altament reactives com les ROS i els productes derivats de l'oxidació lipídica, que amenacen la seva integritat. Aquests agents electròfils poden causar dany a diferents òrgans que poden donar lloc a malalties com el càncer, complicacions cardiovasculars, inflamació aguda i crònica, malalties neurodegeneratives²⁵³. Per tant, resulta obvi que les cèl·lules estiguin constantment treballant per controlar els nivells de ROS, en prevenció de la seva acumulació. Per combatre aquestes ofenses, al llarg de l'evolució s'han desenvolupat mecanismes cel·lulars, en forma de la inducció dels enzims detoxificadors de fase II i enzims antioxidants, liderats pel sistema Keap1-Nrf2-ARE. Com s'ha esmentat anteriorment, Nrf2 constitueix l'actor principal d'aquest sistema, ja que és el factor de transcripció que controla l'expressió basal i induïble dels gens que codifiquen pels enzims citoprotectors.

La generació de models murins *nrf2*^{-/-} va evidenciar que l'expressió de Nrf2 no és necessària pel creixement i el desenvolupament, ja que els animals presentaven un desenvolupament normal¹⁸⁵. Aquest model animal va permetre evidenciar que la deficiència en Nrf2 provoca una susceptibilitat augmentada front a la toxicitat de xenobiòtics i estressors ambientals. Aquests animals presenten expressions basal i induïble baixes de gens citoprotectors en una gran varietat de teixits: fetge^{175, 254-256}, pulmons^{179, 257, 258}, tracte intestinal^{175, 180, 256}, cervell²⁵⁹⁻²⁶¹, pell²⁶², ronyó^{263, 264}, melsa^{265, 266}, eritròcits²⁶⁶ o epiteli retinal²⁶⁷ (**Figura 23**). Per tant, en els darrers anys, Nrf2 s'ha postulat com una potencial diana terapèutica interessant pel tractament o la prevenció de la malaltia^{170, 228, 268}; cal esmentar que aquestes aproximacions s'han dut a terme de manera especial en relació al càncer²⁶⁹.

Nrf2 s'ha suggerit també com un regulador crític de l'homeòstasi cardiovascular, a través de la supressió de l'estrès oxidatiu que constitueix el principal factor causant del desenvolupament i la progressió de les malalties cardiovasculars, com l'aterosclerosi¹⁶⁸. Per tant, també en aquest cas es postula com una atractiva diana terapèutica pel tractament de la malaltia cardiovascular¹⁶⁸. Nrf2 s'expressa de manera ubíqua al sistema cardiovascular¹⁶⁸.

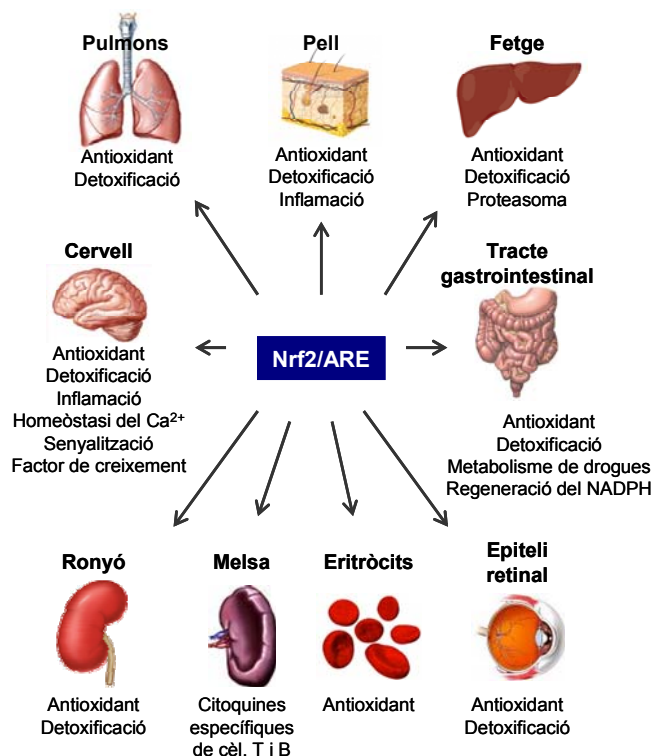


Figura 23. Nrf2, un protector multi-òrgan. Nrf2 protegeix diferents tipus cel·lulars (pulmons, fetge, ronyó, estómac, intestí prim, sistema nerviós central, cèl·lules de la melsa, macròfags, eritròcits i l'epiteli retinal) augmentant de manera coordinada l'expressió de gens clàssics de la detoxificació i l'antioxidació regulats per ARE. Nrf2 contribueix a la protecció cel·lular augmentant la resistència cel·lular als potencials insults perjudicials que es produeixen durant el funcionament normal cel·lular. (Figura adaptada de Lee JM *et al.* *FASEB J* 2005; 19: 1061-6).

A nivell de les cèl·lules endotelials, la inducció de la via Nrf2-ARE inhibeix l'expressió de citoquines proinflamatòries (com MCP-1 i VCAM-1) en resposta a diferents estímuls, així com l'adhesió monocítica²⁷⁰⁻²⁷². També, disminueix la citotoxicitat i l'apoptosi induïda per l'estrès oxidatiu. A més, l'activació de Nrf2 pot revertir la disfunció endotelial induïda per situacions com la hiperglicèmia²⁷³. En conjunt, els estudis trobats suggereixen que la via Nrf2-ARE desenvolupa un paper important en la regulació de la funció de l'endoteli.

A les cèl·lules musculars llises, l'activació de la via de senyalització Nrf2-ARE en resposta a estímuls de l'estrès oxidatiu provoca l'expressió de la bateria de gens de la defensa antioxidant, entre els que s'inclouen els habituals HO-1, A170 i Prx I^{274, 275}. La inducció de la via augmenta la supervivència d'aquestes cèl·lules, ja que no únicament es combat l'estrès oxidatiu, sinó també l'estrès del reticle endoplasmàtic²⁷⁶. Addicionalment, s'ha observat que l'activació de Nrf2 inhibeix la proliferació de les cèl·lules musculars llises^{277, 278}.

En relació a l'altre tipus cel·lular implicat en la formació de la lesió ateroscleròtica, els macròfags, la inducció de l'activació de Nrf2 controla l'expressió de la bateria de gens de la defensa antioxidant, que també inclou HO-1, A170 i Prx I¹⁸³. Nrf2 representa un factor de transcripció clau en la regulació de la defensa antioxidant en els macròfags, perquè els protegeix de les respostes proinflamatòries i els efectes oxidants²⁷⁹⁻²⁸¹.

Ishii i col·laboradors van observar que les LDLox i l'aldehid 4-HNE provocaven l'activació i l'acumulació a nucli de Nrf2 en macròfags murins. Com a resultat de l'activació de Nrf2, es promovia l'expressió de gens regulats per ARE, directament implicats en la maquinària de la defensa antioxidant. Però, també es va observar la inducció de l'expressió del receptor *scavenger* CD36, el principal receptor per la captació de les LDL modificades oxidativament²⁷⁴.

Estudis més recents amb models animals deficientes en Nrf2 han demostrat els potencials efectes antiaterogènics de Nrf2²⁸². La generació del model animal de ratolins doble *knockout* per Nrf2 i apoE (*apoE^{-/-} nrf2^{-/-}*), als quals se'ls induïa aterosclerosi per una dieta rica en greixos, va permetre observar que aquests animals presentaven una lesió atenuada en comparació amb els controls deficientes en apoE²⁸³ (**Figura 24**). Malgrat la reducció en la lesió ateroscleròtica, els animals *apoE^{-/-} nrf2^{-/-}* presentaven nivells augmentats d'estrès oxidatiu, hipertrigliceridèmia i hiperglicèmia²⁸³. Els autors d'aquest treball van atribuir la reducció en l'àrea de la lesió a la disminució en l'expressió de CD36 en la lesió i en els macròfags, cosa que provocava una menor captació de LDLox i, conseqüentment, frenava la formació de cèl·lules escumoses²⁸³. Segons aquest estudi, l'efecte net de Nrf2 seria proaterogènic.

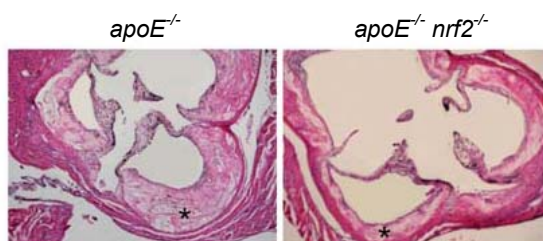


Figura 24. Imatges de lesions ateroscleròtiques a nivell aòrtic d'animals *apoE^{-/-}* i *apoE^{-/-} nrf2^{-/-}*. Els arteriscs de les imatges delimiten la presència de la lesió ateroscleròtica. Després de 20 setmanes d'estar sotmesos a una dieta rica en greixos, els ratolins del model animal *apoE^{-/-} nrf2^{-/-}* presentaven una àrea de lesió significativament menor en comparació amb els del model *apoE^{-/-}* (extret de Sussan TE i col·laboradors. *PLoS ONE* 2008; 3:e3791).

Un altre estudi més recent, va demostrar que la deleció de CD36 no suprimia la formació de cèl·lules escumoses, però induïa l'apoptosi dels macròfags presents a la lesió i la necrotització de la placa²⁸⁴. Per tant, no estaria clar que l'activació de Nrf2 sigui o no proaterogènica. D'altra banda, un fàrmac de sensibilització a la insulina amb efectes antiaterogènics, la rosiglitazona participa en l'expressió de gens antioxidants regulats per Nrf2 perquè també té efectes pròpiament sobre l'expressió de Nrf2¹⁶⁸. Aquests estudis indiquen que el paper precís de Nrf2 en la patogènesi de l'ateriosclerosi no està completament definit i necessitaria de la realització de més estudis.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
REGULACIÓ DE FABP4 DEPENDENT DE NRF2 EN MACRÒFAGS
Iolanda Lázaro López
ISBN:978-84-693-8852-5/DL:T.1952-2010

Hipòtesi i Objectius

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
REGULACIÓ DE FABP4 DEPENDENT DE NRF2 EN MACRÒFAGS
Iolanda Lázaro López
ISBN:978-84-693-8852-5/DL:T.1952-2010

HIPÒTESI

La FABP4 s'expressa en els macròfags durant la seva transformació a cèl·lules escumoses. Entre altres funcions, la FABP4 pot actuar com antioxidant lipídic atrapant àcids grassos oxidats i, probablement, les molècules que se'n deriven com els aldehids. Els aldehids provoquen la formació de cèl·lules escumoses. La resposta cel·lular a l'oxidació està dirigida per l'activació de diversos enzims antioxidants induïts pel factor de transcripció Nrf2. Tenint en compte aquests fets, plantegem la hipòtesi següent:

Els aldehids apolars que es formen com a productes finals de l'oxidació dels àcids grassos poliinsaturats presents a les LDL indueixen l'expressió de FABP4 a través de l'activació del factor de transcripció Nrf2 en macròfags humans, constituint una etapa inicial en la formació de cèl·lules escumoses liderada per FABP4 en resposta a la oxidació.

OBJECTIU GENERAL

Estudiar la implicació dels aldehids apolars resultants de l'oxidació dels àcids grassos poliinsaturats en la regulació de l'expressió gènica i proteica de la FABP4 en macròfags humans a través del factor de transcripció Nrf2 i les vies de senyalització intracel·lulars associades.

Objectius específics:

1. Demostrar que els aldehids apolars presents a les LDL oxidades augmenten l'expressió de FABP4 en macròfags.
2. Estudiar el promotor de la FABP4 per trobar possibles llocs d'unió pel factor de transcripció Nrf2.
3. Demostrar una implicació directa de Nrf2 en la regulació de FABP4.

4. Demostrar que els aldehids són activadors de Nrf2.
5. Determinar les vies de senyalització intracel·lular implicades en l'activació de Nrf2 en resposta als aldehids.
6. Comprovar aquesta via en un altre tipus cel·lular present a la placa i que també evoluciona a cèl·lula escumosa per l'acció de les LDLox.
7. Analitzar l'estat d'activació de Nrf2 a nivell sistèmic *ex vivo* i relacionar-ho amb els nivells circulants de FABP4.

Materials i mètodes

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
REGULACIÓ DE FABP4 DEPENDENT DE NRF2 EN MACRÒFAGS
Iolanda Lázaro López
ISBN:978-84-693-8852-5/DL:T.1952-2010

La Unitat de Recerca en Lípids i Arteriosclerosi (URLA) en què s'ha desenvolupat aquesta tesi treballa segons els requisits de la norma internacional ISO 9001:2008 (N. registre certificat 0.04.09025), dins l'abast del Sistema de Gestió de la Qualitat de Recerca, Desenvolupament i Innovació (SGQ d'R+D+I) de la Universitat Rovira i Virgili. L'objectiu d'aquesta política és el desenvolupament d'una recerca de qualitat que permeti assolir un grau més elevat de reconeixement i visibilitat a nivell internacional dins l'àmbit de la investigació.

En aquest apartat, es descriu la metodologia emprada en la realització de la tesi. Es presenta una descripció metodològica i s'inclouen els Procediments Normalitzats de Treball – Procediments Operatius 0709 (PNT-PO0709-URLA-xx), associats a les tècniques d'acord amb la norma ISO 9001:2008.

1. Estudi *in silico* de la seqüència del promotor del gen FABP4 humà

L'anàlisi del promotor d'un gen és un pas essencial per la caracterització dels seus mecanismes de regulació, ja que permet la identificació de potencials llocs d'unió per factors de transcripció. De la regulació del gen de la FABP4 humana està ben establert el paper dels activadors de PPAR γ ; i, també certa participació de NF- κ B, tot i que en aquest cas no s'han arribat a descriure llocs de reconeixement concrets al promotor del gen^{52, 62, 68, 285}. Conseqüentment, per estudiar els possibles factors de transcripció implicats en la regulació de la transcripció del gen FABP4 humà, es va realitzar un estudi *in silico* de la seqüència del promotor d'aquest gen.

La seqüència del promotor es va obtenir accedint a la base de dades *Nucleotide* a través de la pàgina web del PubMed. L'entrada de la seqüència del promotor del gen FABP4 de *Homo sapiens* es correspon amb el GenBank *accession number* AJ627200. La seqüència va ser dipositada al *European Molecular Biology Laboratory* per Rival i col·laboradors l'any 2004⁵². Situa el promotor a la localització cromosòmica 8q21 i consta de 5403bp en *upstream* al lloc d'inici de la transcripció del gen.

L'anàlisi es va efectuar mitjançant el programari MatInspector accessible *on-line* a través de la plataforma Genomatix (<http://www.genomatix.de>). El MatInspector identifica llocs d'unió per factors de transcripció en seqüències nucleotídiques utilitzant una biblioteca de seqüències consens per diferents matrius (vertebrats, insectes,

plantes, fongs, nemàtodes, bacteries)²⁸⁶. En el nostre cas, com es tractava de l'anàlisi del promotor d'un gen humà es va escollir la matriu de vertebrats. L'anàlisi de la seqüència del promotor de la FABP4 es va fer seguint el protocol especificat al PNT-PO0709-URLA-38. La biblioteca *Matrix Family Library* a partir de la qual realitza l'anàlisi s'actualitza periòdicament. L'anàlisi del promotor de la FABP4 s'ha repetit per cada nova versió de la biblioteca. La darrera versió de la biblioteca accessible amb què s'ha realitzat l'anàlisi és la versió 8.2 del gener de 2010.

En aquesta versió, la família en què s'inclou el factor de transcripció Nrf2 és la denominada V\$AP1R, i considera els factors AP1 i les proteïnes Maf. Concretament, aquesta família inclou 11 membres: V\$BACH1.01 (*BTB/POZ-bZip transcription factor BACH1 forms heterodimers with the small Maf protein family*), V\$BACH2.01 (*Bach2 bound TRE*), V\$MAFA.01 (*Lens-specific Maf/MafA-sites*), V\$MARE.01 (*Maf response elements, half sites*), V\$MARE.02 (*Binding sites for homodimers of large Maf-proteins*), V\$MARE.03 (*Binding sites for heterodimers with small Maf-proteins*), V\$MARE_ARE.01 (*Antioxidant response elements*), V\$NFE2.01 (*NF-E2 p45*), V\$NRL.01 (*Neural retinal basic leucine zipper factor (bZIP)*), V\$TCF11MAFG.01 (*TCF11/MafG heterodimers, binding to subclass of AP1 sites*), V\$VMAF.01 (*v-Maf*). La longitud de les seqüències en què es troben contingudes les seqüències consens pels factors de transcripció de la família V\$AP1R és de 21bp. En el cas de la seqüència específica pels llocs ARE, V\$MARE_ARE.01, les característiques de la base de dades són:

- *Random Expectation (re-value)* inferior a 0.01 coincidències per 1000bp (<0.01). Aquest valor proporciona un valor estimat del número de coincidències per cada 1.000 parells de bases d'una seqüència a l'atzar; un valor baix indica una matriu restrictiva. Per tant, es minimitzen els falsos positius.
- *Optimized matrix threshold*: 0.76. Mostra que el valor llindar del grau de similitud per la detecció d'un possible lloc d'unió és del 76%.

El registre gratuït al programari MatInspector no ens permet l'accés a la base de dades MatBase que és on es troba informació detallada de les seqüències amb què es realitza l'anàlisi. L'any 1991, Rushmore i col·laboradors van definir la seqüència consens dels llocs ARE com: 5'-TGACnnnGC-3'¹⁷¹.

2. Cultiu de cèl·lules THP-1

La línia cel·lular THP-1 de monòcits humans procedents d'una leucèmia monocítica aguda es va obtenir a partir de la *German Collection Microorganisms and Cell Cultures* – DSMZ (#ACC 16). A partir de l'alíquota original, les cèl·lules es van fer créixer en suspensió en flascons T75 (*Nunc EasYFlasks™ Nunclon Δ*, #156499) i es van fer alíquotes estoc per descongelar amb posterioritat per realitzar els subcultius i els diferents blocs d'experiments. Periòdicament, els cultius de cèl·lules THP-1 en estat de monòcit van ser testats per descartar possibles contaminacions per micoplasma amb el kit comercial *VenorGeM Mycoplasma Detection Kit (Minerva BioLab)* basat en una PCR convencional.

Els experiments que es presenten van ser realitzats en cèl·lules THP-1 en estat de macròfag. La diferenciació de monòcits a macròfags es va dur a terme seguint les especificacions indicades en el PNT-PO0709-URLA-13. El tipus de plaques en què s'induïa la diferenciació de les cèl·lules variava en funció del tipus de mostra a processar. En els experiments per valorar efectes sobre l'expressió gènica, les cèl·lules es cultivaven en plaques de 6 pous *Nunclon Δ Surface 6-wells multidishes* (#140675 – Nunc). A partir de les cèl·lules, s'obtenien els lisats cel·lulars per l'extracció del RNA total (PNT-PO0709-URLA-29) a partir del qual es determinava l'expressió gènica mitjançant RT i PCR a temps real (PNT-PO0709-URLA-33, PNT-PO0709-URLA-30). En els experiments per avaluar l'expressió proteica, les plaques utilitzades van ser de *10cm Ø Nunclon Δ* (#150350 – Nunc). Aquest tipus de plaques de tamany superior permetia l'obtenció d'extractes de proteïnes nuclears i citoplasmàtiques (PNT-PO0709-URLA-10) amb una concentració adequada per dur a terme els procediments experimentals associats. En ambdós tipus d'experiments, es recollia el medi de cultiu previ a l'inici del processament de les cèl·lules i es guardava en alíquotes convenientment etiquetades al congelador de -80°C. En el cas dels experiments d'immunoprecipitació de la cromatina, les cèl·lules es van diferenciar en 2 flascons T75 (*Nunc EasYFlasks™ Nunclon Δ*, #156499) per cada condició (150cm²/condició). Ja que aquesta tècnica requereix una quantitat elevada de cèl·lules perquè s'aïlli la fracció nuclear de la qual s'obté la cromatina.

Els diferents reactius amb què es realitzen totes les incubacions dels procediments experimentals que es presenten, tenien com a vehicle el *dimethyl sulfoxide* (més conegut per l'acrònim DMSO). Aquest compost organosulfur és d'ús molt freqüent com a dissolvent per la seva elevada capacitat de solubilització tant de compostos polars

com apolars, però pot esdevenir tòxic per les cèl·lules si se supera el percentatge líndar de 0.1%. En les diferents incubacions plantejades, es va tenir en compte aquest aspecte i es van preparar solucions mare 10.000 vegades concentrades. D'aquesta manera, en preparar el medi d'incubació calia realitzar una dilució 1:10.000 (per exemple, 1µl per cada 10ml de medi, un 0.01%). Amb aquesta mesura s'assegura que el percentatge de DMSO que s'afegeix al medi és inferior al límit. L'efecte de les diferents incubacions de cada condició experimental sobre la viabilitat cel·lular es va avaluar mitjançant un assaig quimioluminiscent que a través de la valoració de la presència d'ATP indicava el grau d'activació metabòlica cel·lular (PNT-PO0709-URLA-37). En aquest cas, el tipus de plaques que es van utilitzar van ser de 96 pous (*Nunclon Δ Surface 96-wells multidishes, #167008 – Nunc*) perquè permet testar un nombre més elevat de condicions en un mateix lot amb un relatiu baix nombre de cèl·lules. En cada disseny experimental, es van realitzar un mínim de tres experiments independents. Els diferents procediments experimentals d'incubació amb les diferents condicions dels macròfags THP-1 realitzats es presenten detalladament a continuació.

2.1. Incubacions amb aldehids apolars: DDE i hexanal

Com a resultat de la modificació oxidativa de les LDL, es produeixen una sèrie de molècules: oxisterols, lisofosfatidilcolina, hidroperòxids i, els productes finals de l'oxidació dels àcids grassos poliinsaturats, els aldehids²⁸⁷. El nostre grup disposa d'una gran experiència en l'estudi dels efectes dels aldehids apolars en la patogènia de l'ateriosclerosi. Els aldehids apolars es troben a les LDL oxidades i a les lesions aterioscleròtiques humanes¹¹⁶. Els aldehids apolars estudiats són el 2,4-decadienal (DDE) i l'hexanal (HEX), derivats principalment de l'oxidació dels àcids araquidònic i linoleic (**Figura 25**). L'hexanal és l'aldehid que es forma de manera majoritària en l'oxidació de les LDL. En canvi, el DDE, malgrat ser menys abundant, duu a terme més efectes perquè la seva activitat biològica és més elevada¹¹⁴⁻¹¹⁶.



Figura 25. Estructura química del 2,4-decadienal (DDE) (esquerra) i de l'hexanal (HEX) (dreta).

2.1.1. Valoració de l'efecte de la incubació amb aldehids sobre la transformació a cèl·lules escumoses

L'objectiu d'aquests experiments va consistir en valorar l'efecte en els macròfags d'una exposició perllongada als aldehids sobre l'evolució fenotípica a cèl·lula escumosa. Els macròfags THP-1 es van incubar amb DDE 5 μ M i HEX 10 μ M. El medi d'incubació de les cèl·lules es renovava diàriament: se substituïa per medi amb una nova dosi dels aldehids. Les concentracions d'incubació dels aldehids van ser més baixes en comparació amb les utilitzades en treballs previs del grup¹¹⁴⁻¹¹⁶. Però, es va considerar més adient treballar a concentracions baixes perquè es poguessin realitzar un número superior de renovacions de dosi a les cèl·lules, sense produir toxicitat. I, d'aquesta manera monitoritzar l'evolució de les cèl·lules per efecte de la incubació amb els aldehids. El nombre total de dosis que van rebre les cèl·lules va ser de 6. Després del tractament, les cèl·lules es van lisar per obtenir el RNA total.

2.1.2. Estudi dosi-resposta dels aldehids per definir la concentració per les incubacions dels experiments

Per definir la concentració dels aldehids per les incubacions a realitzar, es van confeccionar corbes dosi-resposta per valorar l'efecte de diferents concentracions de DDE i HEX sobre l'expressió proteica de FABP4. Els macròfags THP-1 es van incubar durant 24h amb les diferents concentracions, es van obtenir els extractes de proteïnes de la fracció citoplasmàtica. El rang de concentracions de DDE testades va ser: 5, 10 i 25 μ M; en el cas del HEX, va ser: 10, 25, 50 i 100 μ M.

2.1.3. Estudis temps-resposta a partir de la concentració definida dels aldehids

Es van realitzar diferents experiments en què es va valorar l'efecte de les incubacions amb els aldehids al llarg del temps.

Per valorar l'expressió de proteïna FABP4 al llarg del temps, els macròfags THP-1 es van incubar de 0-24h amb DDE 10 μ M. Les cèl·lules es van lisar i es van obtenir els extractes de proteïnes citoplasmàtiques.

Els nivells de mRNA de FABP4 es van determinar a partir de la incubació dels macròfags THP-1 amb DDE 10 μ M en una cinètica compresa entre 0 i 20h. El RNA total es va extreure per analitzar posteriorment. La diferència temporal existent entre les cinètiques de RNA i proteïna es correspon amb l'existent entre els processos de transcripció i traducció.

La cinètica de l'activació del Nrf2 es va dissenyar per estudiar temps curts, de 0 a 3 hores; ja que en tractar-se d'un factor de transcripció, l'activació es produeix de manera ràpida. Els macròfags THP-1 es van incubar amb DDE 10 μ M i HEX 100 μ M per a l'obtenció dels extractes de proteïnes nuclears i citoplasmàtiques.

En relació a la cinètica de les proteïnes quinases de les cascades de senyalització PI-3k/Akt i ERK-MAPK, els macròfags THP-1 es van incubar amb DDE 10 μ M conformant una cinètica que caracteritzés una activació molt ràpida (temps <1h), tan pròpia d'aquestes vies com la monitorització de l'evolució i el retorn a nivells basals de temps més llargs (màxim de 8h). Les cèl·lules es van processar per a l'obtenció dels extractes de proteïnes de la fracció citoplasmàtica.

2.1.4. Efecte de la inhibició de la transcripció i la traducció

Per determinar l'efecte sobre l'expressió gènica de FABP4, es va realitzar un pretractament de 1 hora amb un inhibidor de la transcripció o de la traducció (veure punts 2.4 i 2.5 de l'apartat de "**Materials i mètodes**"). Seguidament, es van incubar amb DDE 10 μ M durant 3h, per a l'obtenció del RNA total.

També es va fer servir el temps d'incubació de 3 hores amb DDE 10 μ M després del pretractament de 1 hora amb l'inhibidor de la traducció (veure punt 2.4 de l'apartat de "**Materials i mètodes**") realitzat sobre els macròfags THP-1 per valorar l'obtenció dels extractes de proteïnes nuclears i citoplasmàtiques on valorar l'efecte sobre la síntesi *de novo* de proteïna Nrf2.

2.1.5. Estabilització del mRNA de FABP4

L'estudi de l'estabilització del mRNA es va realitzar incubant els macròfags THP-1 amb DDE 10µM durant un temps fix de 3h. Passat aquest temps, es va incorporar al medi d'incubació l'inhibidor de la transcripció (veure punt 2.5 de l'apartat de "**Materials i mètodes**") fins un temps màxim de 4 hores. Les cèl·lules es van lisar per obtenir-ne el RNA total per analitzar posteriorment.

2.2. Incubacions amb el control positiu de l'expressió de FABP4: BRL

Una TZD prototípica és el BRL 49653 (també anomenat rosiglitazona) (**Figura 26**)¹⁶⁵. El BRL es va utilitzar com a control positiu de l'expressió de FABP4, perquè està ben establerta la seva regulació per part dels agonistes PPARγ^{285, 288, 289}. Les incubacions es van realitzar amb BRL 1µM. A continuació es presenten els experiments en què es va incubar amb l'agonista PPARγ.

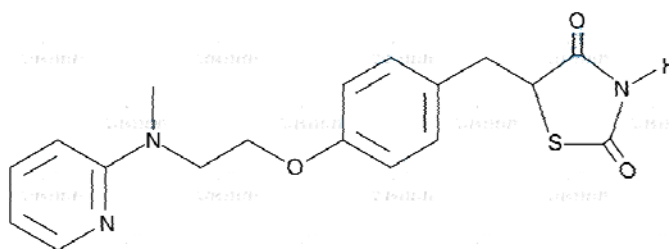


Figura 26. Estructura química del BRL 49653.

2.2.1. Valoració de l'efecte de la incubació sobre la transformació a cèl·lules escumoses

Paral·lelament a les incubacions amb els aldehids, es va utilitzar el BRL. El medi d'incubació de les cèl·lules es va renovar diàriament, fins un total de 6 dies. Per tant, les cèl·lules van rebre 6 dosis de BRL 1µM. Després del tractament, les cèl·lules es van lisar per obtenir el RNA total.

2.2.2. Efecte sobre l'expressió gènica i proteica de FABP4

Els macròfags THP-1 es van incubar amb BRL 1 μ M per tenir un control positiu en les expressions gènica i proteica de FABP4. Per l'expressió gènica, la incubació va ser de 20h i es van obtenir els lisats de RNA. En l'expressió de proteïna FABP4, els macròfags es van incubar durant 24h. Després de la incubació, les cèl·lules es van processar per obtenir els extractes de proteïnes citoplasmàtiques.

2.3. Incubacions amb el control positiu de l'activació de Nrf2: t-butyl hydroquinone

El *tert*-butylhydroquinone (tBHQ) és el principal metabolit del 3-*tert*-butylhydroxyanisole (BHA)²⁹⁰ (**Figura 27**), que ha estat àmpliament utilitzat durant anys com a antioxidant per preservar i estabilitzar les propietats dels aliments^{291, 292}. El tBHQ és un compost orgànic aromàtic que indueix els enzims detoxificadors de fase II a través de l'activació Nrf2. Per tant, en constitueix un control positiu i, com a tal, es va utilitzar en algun dels experiments que es van realitzar.

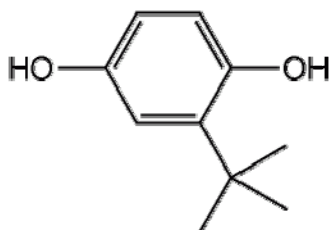


Figura 27. Estructura química del *tert*-butyl hydroquinone (tBHQ).

La concentració utilitzada per les incubacions amb el tBHQ es va extreure de la bibliografia i va ser 50 μ M. A continuació es presenten els experiments en què es va incubar amb el tBHQ.

2.3.1. Efecte sobre l'expressió gènica i proteica de FABP4

Els macròfags THP-1 es van incubar amb tBHQ 50µM per valorar l'efecte sobre les expressions gènica i proteica de FABP4. Per l'expressió gènica, la incubació va ser de 20h i les cèl·lules es van lisar per obtenir el RNA total. En l'expressió de proteïna FABP4, els macròfags es van incubar durant 24h i es van processar per a l'obtenció dels extractes de proteïnes citoplasmàtiques.

2.3.2. Efecte sobre l'activació de Nrf2

L'activació de Nrf2 induïda per la incubació amb tBHQ 50µM va ser utilitzada com a control positiu en 2 blocs d'experiments.

En els experiments per la determinació de l'activació del factor de transcripció i si aquesta requeria la síntesi *de novo*, els macròfags THP-1 eren pretractats o no amb CHX 10µg/ml durant 1 hora i, seguidament, en el mateix medi del pretractament s'incorporava el tBHQ 50µM durant 3 hores més. Després del temps d'incubació amb l'estímul, les cèl·lules es processaven per a l'obtenció d'extractes de proteïnes nuclears i citoplasmàtiques.

L'obtenció de la cromatina per l'experiment de la immunoprecipitació de la cromatina amb anticòs contra Nrf2 es va realitzar a partir de macròfags THP-1 cultivats en flascons T75 que es van incubar durant 3 hores amb tBHQ 50µM.

2.4. Incubacions amb l'inhibidor de la síntesi proteica: cicloheximida

La cicloheximida (CHX) és un inhibidor de la síntesi proteica en organismes eucariotes (**Figura 28**), que està produïda pel bacteri *Streptomyces griseus*. Actua bloquejant l'elongació de la cadena polipeptídica, perquè interfereix el pas de la translocació ribosomal, quan es produeix el moviment de dues molècules de RNA de transferència i una de RNA missatger en relació al ribosoma. La CHX es va utilitzar en dos experiments diferents.

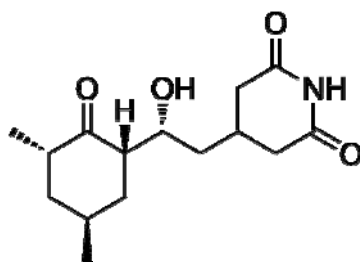


Figura 28. Estructura química del inhibidor de la síntesi proteica cicloheximida (CHX).

2.4.1. Valoració de la síntesi *de novo* de Nrf2

En aquest tipus d'experiment, es va determinar si la síntesi *de novo* de proteïna Nrf2 era necessària per l'activació d'aquest factor de transcripció induïda en resposta a l'estímul oxidant (tBHQ 50 μ M o DDE 10 μ M). Es va realitzar un pretractament dels macròfags amb CHX 10 μ g/ml durant 1 hora i, seguidament, en el mateix medi del pretractament s'incorporava l'estímul oxidant (DDE o tBHQ). Després del temps d'incubació amb l'estímul, les cèl·lules es processaven per a l'obtenció d'extractes de proteïnes nuclears i citoplasmàtiques.

2.4.2. Valoració de la síntesi *de novo* de proteïnes implicades en la transcripció

En aquest altre tipus d'experiment, la CHX es va utilitzar per determinar si l'efecte de les incubacions sobre l'expressió gènica de FABP4 requeria de la síntesi de les proteïnes implicades en la maquinària de la transcripció. Les cèl·lules es van pretractar durant 1 hora amb CHX 10 μ g/ml i, seguidament, es va incorporar l'estímul al medi de la preincubació durant 3 hores. Les cèl·lules es van lisar i per extreure'n el RNA total.

2.5. Incubacions amb l'inhibidor de la transcripció: actinomicina D

L'actinomicina D (Act D) és un antibiòtic polipeptídic que s'aïlla a partir dels bacteris del gènere *Streptomyces* (**Figura 29**). S'utilitza com a inhibidor de la transcripció perquè s'intercala al DNA, produeix una obstrucció física al complex transcripcional que dirigeix la RNA polimerasa i impedeix l'elongació de la cadena de RNA²⁹³. L'Act D es va utilitzar en dos dissenys experimentals diferents.

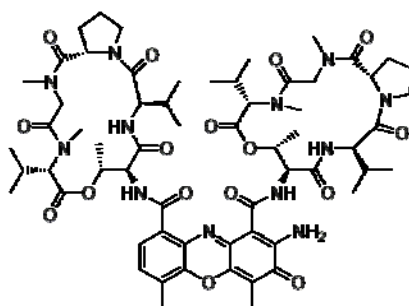


Figura 29. Estructura química de l'inhibidor de la transcripció actinomicina D (Act D).

2.5.1. Efecte de la inhibició de la transcripció sobre la inducció de mRNA de FABP4

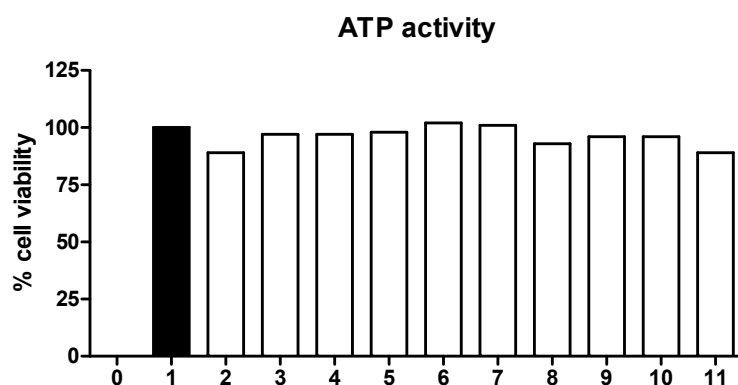
L'Act D es va utilitzar per bloquejar la transcripció i determinar l'efecte de la incubació de l'aldehid sobre l'expressió gènica de FABP4. Les cèl·lules es van pretractar durant 1 hora amb Act D 5µg/ml i, seguidament, es va incorporar al medi de la preincubació l'aldehid que es va incubar durant 3 hores més. El RNA total es va obtenir a partir de la lisi de les cèl·lules.

2.5.2. Estabilització del mRNA de FABP4.

En aquest experiment es va valorar l'increment de la vida mitjana/estabilitat del mRNA de FABP4 per efecte de l'aldehid. Els macròfags es van incubar durant un temps fix de 3 hores amb l'aldehid o el vehicle i, seguidament, es va incorporar l'Act D 5µg/ml al medi. Els temps d'incubació amb l'Act D van ser: 0.5, 1, 2 i 4 hores. En aquests punts, les cèl·lules es lisaven per a l'obtenció del RNA total.

3. Citotoxicitat

A l'apartat 2, s'han descrit les condicions amb què es van tractar les cèl·lules en els experiments realitzats. L'afectació sobre l'estat metabòlic de les cèl·lules es va determinar mitjançant el kit *Cell Titer-Glo Luminiscent Cell Viability Assay* (Promega) que és un assaig quimioluminiscent que detecta els nivells d'ATP (PNT-PO0709-URLA-37). A la **figura 30**, es presenten els resultats obtinguts en el test. Com es pot observar, es va evidenciar que cap de les condicions d'incubació afectava negativament el metabolisme cel·lular (**Figura 30**).



codi	condició d'incubació	codi	condició d'incubació
0	---	6	tBHQ 50µM, 24h
1	medi sense estímul afegit	7	Act D 5µg/ml, 1h + DMSO, 3h
2	DMSO	8	Act D 5µg/ml, 1h + DDE 10µM, 3h
3	DDE 10µM, 24h	9	CHX 10µg/ml, 1h + DMSO, 3h
4	HEX 100µM, 24h	10	CHX 10µg/ml, 1h + DDE 10µM, 3h
5	BRL 1µM, 24h	11	CHX 10µg/ml, 1h + tBHQ 50µM, 3h

Figura 30. Resultats de l'assaig de citotoxicitat amb el *Cell Titer-Glo Luminiscent Cell Viability Assay* (Promega). Els macròfags THP-1 es van incubar segons les condicions que es presenten a la taula superior. A la gràfica es representa el percentatge de viabilitat cel·lular per cada condició d'incubació. La condició 0 es correspon a la situació en absència de cèl·lules. Prenent com a referència la condició número 1 corresponent a les cèl·lules amb medi sense cap estímul afegit, no es van observar diferències significatives de cap de les condicions d'incubació en relació a la referència.

4. Determinació de l'expressió gènica. Aïllament del RNA. RT i PCR a temps real.

4.1. Aïllament i quantificació de RNA total

En els experiments destinats a la valoració de l'expressió gènica, després de realitzar les diferents incubacions segons el protocol de cada disseny experimental es van processar les cèl·lules per l'aïllament del RNA total. El procediment metodològic realitzat es detalla al PNT-PO0709-URLA-29. S'utilitza l'equip ABI PRISM™ 6100 Nucleic Acid PrepStation (*Applied Biosystems*) que és un sistema dissenyat per a l'aïllament i la purificació d'àcids nucleics a partir de diverses matrius biològiques. En aquest s'adapta una placa de 96 pous en què cada pou és realment una columna que

conté un filtre. Després d'hidratar el pou, es dispensa la mostra del lisat cel·lular i el RNA queda retingut al filtre per afinitat. Aleshores, s'inicia un procés de rentats amb dues solucions de rentat diferents amb l'objectiu de purificar-lo. L'aparell en què s'integren les columnes és un sistema de bomba de buit que facilita el procés de rentat i purificació. El RNA purificat es recupera eluint amb una solució que allibera la retenció al filtre.

La determinació de la concentració del RNA extret es va realitzar mitjançant la lectura de la fluorescència emesa pel fluorocrom del kit comercial Quant-iT RNA Assay (Invitrogen) en el fluorímetre Qubit (Invitrogen). El fonament de la tècnica rau en què el fluorocrom s'uneix de manera específica al RNA formant un complex que s'excita a 644nm i emet a 673nm. La fluorescència emesa és extremadament lineal en el rang 0-100ng. El procediment experimental es detalla al PNT-PO0709-URLA-31.

4.2. RT i PCR a temps real

La RT i PCR a temps real és una tècnica que permet valorar quantitativament l'expressió d'un determinat gen²⁹⁴⁻²⁹⁶. És una adaptació de la PCR tradicional, ja que el punt de partida de la reacció és RNA de cadena simple enlloc de DNA de doble cadena.

4.2.1. RT: transcripció inversa

La transcripció inversa (coneguda per l'abreviació RT de les inicials en anglès, *Reverse Transcription*) constitueix la primera etapa de la RT i PCR a temps real. El RNA de cadena simple inicial es transcriu inversament a cDNA de cadena doble. Aquesta reacció es produeix per l'acció d'un enzim, la transcriptasa inversa (*reverse transcriptase* o *RNA-dependent DNA polymerase*). Aquest enzim funciona com una DNA polimerasa, però amb la diferència que utilitza com a cadena motlle molècules de RNA de cadena simple enlloc de molècules de DNA. D'aquesta manera s'obtenen els DNA *templates* (motlles) a partir dels quals la DNA polimerasa produirà les còpies en la segona etapa de la tècnica. En el PNT-PO0709-URLA-33, es descriu detalladament el protocol per la realització de la tècnica.

4.2.2. PCR a temps real

Constitueix la segona etapa per a la determinació quantitativa de l'expressió d'un determinat gen. La RT proporciona els productes a partir dels quals es duu a terme la PCR. Aquesta PCR és a temps real perquè es visualitza a temps real l'estat de l'amplificació a mesura que aquesta es va produint. Aquest fet és possible gràcies a la utilització de sondes especials marcades amb fluorescència.

Com en una PCR tradicional, s'utilitzen un parell de *primers* complementaris a una seqüència definida en cada una de les cadenes del cDNA del gen d'interès. La doble cadena de cDNA es desnaturalitza, se separen les cadenes i cada *primer* s'uneix al lloc complementari de la respectiva seqüència. De manera addicional a la unió dels *primers*, es produeix la unió de la sonda marcada amb una molècula *reporter* fluorescent. Al mercat, existeixen diverses possibilitats, en el nostre cas s'empra la metodologia TaqMan.

El principi de les sondes TaqMan es basa en l'activitat 5'-3' nucleasa de la Taq polimerasa (DNA polimerasa), per hidrolitzar un oligonucleòtid hibridat a la zona d'amplificació. Les sondes TaqMan són oligonucleòtids doblement marcats: a l'extrem 5', porten unit de manera covalent un fluorocrom *reporter* (emissor de fluorescència de longitud d'ona baixa, normalment verda); i, a l'extrem 3', es troba unit un fluorocrom *quencher* (emissor de fluorescència de longitud d'ona alta, normalment vermella) (**Figura 31**). Mentre la sonda es troba hibridada al cadena motlle de DNA, la molècula *quencher* bloqueja l'emissió de fluorescència per part de la molècula *reporter*. Aquesta situació de bloqueig de l'emissió fluorescent fet es dona per un fenomen anomenat *Förster resonance energy transfer* (FRET) donat per la proximitat existent entre els dos fluorocroms (<10nm).

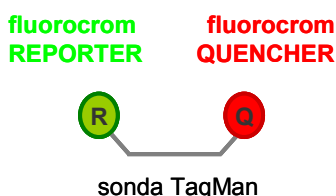


Figura 31. Esquematització de l'estructura de la sonda TaqMan.

Quan la Taq polimerasa, que van duent a terme la reacció d'amplificació a partir dels *primers* específics, arriba al punt en què es troba amb la sonda hibridada al DNA, per efecte de la seva activitat 5'-3' exonucleasa inherent, la degrada. La degradació de la sonda allibera el fluorocrom *reporter*, s'elimina el bloqueig exercit pel *quencher* i es permet l'emissió fluorescent (Figura 32). La fluorescència detectada és directament proporcional al fluorocrom *reporter* alliberat i a la quantitat de DNA motlle present a la PCR. El termociclador en què es realitza la PCR a temps real disposa d'un llinar de detecció de fluorescència, per sota del qual no pot discriminar entre l'amplificació produïda i el soroll de fons. D'altra banda, el senyal de fluorescència augmenta a mesura que es produeix l'amplificació i l'instrument adquireix dades durant el pas d'unió dels *primers* de cada cicle. El nombre d'amplicons assoliran el límit de detecció de fluorescència després d'un determinat cicle, que estarà en funció de la concentració inicial de la seqüència diana de DNA. Aquest cicle s'anomena *threshold cycle* (Ct). Com més alta és la concentració inicial de DNA diana, més baix és el valor del Ct.

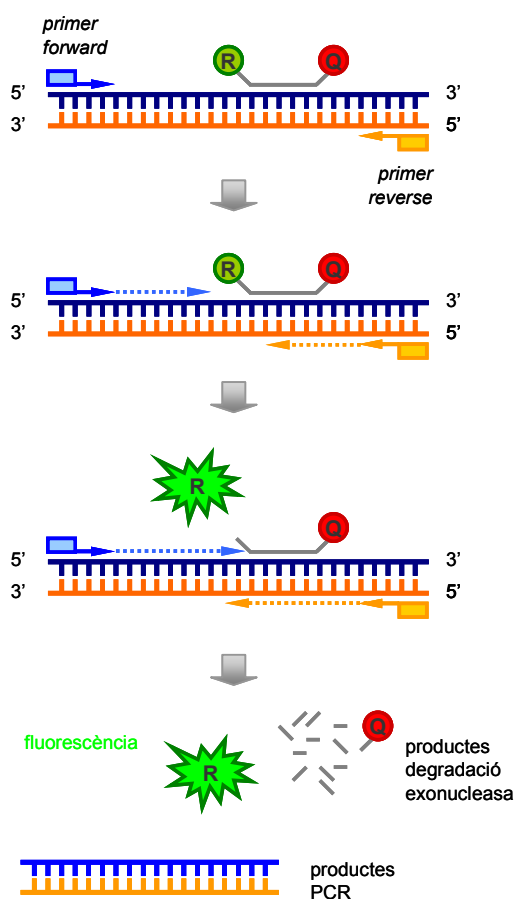


Figura 32. Esquema de la PCR a temps real mitjançant la metodologia TaqMan.

A la **Figura 33** es mostra la localització dels llocs on s'uneixen els *primers* i la sonda TaqMan en el gen de la FABP4.

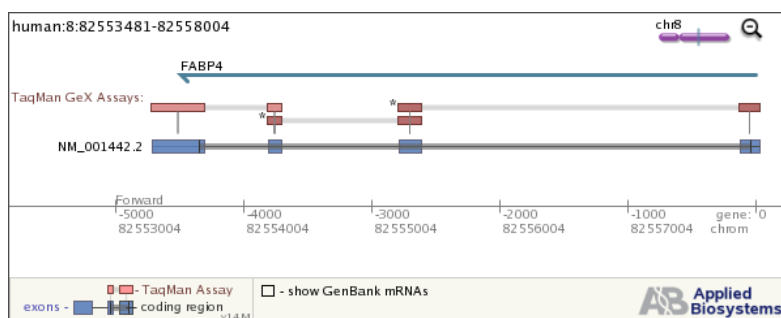


Figura 33. Esquema dels llocs d'unió dels *primers* de l'assay-on-demand de la FABP4 humana al cromosoma 8 (obtingut d'*Applied Biosystems*).

En el PNT-PO0709-URLA-30, es descriu detalladament el protocol per a la realització de la tècnica.

5. Determinació de l'expressió proteica. Extracció de proteïnes nuclears i citoplasmàtiques. Western blot. Immunofluorescència.

5.1. Extracció de proteïnes nuclears i citoplasmàtiques

En els experiments per valorar l'expressió proteica, les cèl·lules es van processar segons el protocol de l'extracció de proteïnes nuclears que es descriu al PNT-PO0709-URLA-10. Inicialment, aquest procediment experimental estava dissenyat específicament per a l'obtenció dels extractes de la fracció nuclear. Però, durant el procediment, és possible la recuperació de la fracció citoplasmàtica. A la **Taula 3**, s'indiquen les proteïnes que es determinaven específicament en cada fracció.

Taula 3. Relació de proteïnes detectades a les diferents fraccions subcel·lulars

	proteïna
fracció CITOPLASMÀTICA	FABP4
	Akt
	pThr308-Akt
	pSer473-Akt
	GSK-3 β
	pSer9-GSK-3 β
	ERK
	p(Thr202,Tyr204)-ERK
fraccions CITOPLASMÀTICA i NUCLEAR	α -TUBULIN
	ACTINA
	Nrf2
fracció NUCLEAR	LAMIN B receptor

Al punt 5.2.1 de l'apartat "**Materials i mètodes**", es presenta una comprovació de la bona praxi en la preparació de les diferents fraccions subcel·lulars que es demostra en absència de contaminació creuada entre elles.

La determinació de la concentració de proteïnes en ambdós tipus de fraccions es va realitzar per l'assaig colorimètric del mètode Bradford; que es basa en el canvi en l'absorbància màxima del colorant Coomassie (de 465 a 595nm) com a resultat de la formació d'un complex amb la proteïna²⁹⁷.

5.2. Western blot

El Western blot (o també anomenada Immunoblot de proteïnes) és la tècnica analítica que es va emprar per analitzar l'expressió de les diferents proteïnes estudiades en aquesta tesi, per valorar l'efecte dels diferents tractaments aplicats als macròfags.

Aquesta tècnica es compon de diferents passos: 1) preparació de la mostra i separació proteica per electroforesi en condicions desnaturalitzants (SDS-PAGE); 2) transferència de proteïnes de gel a membrana de nitrocel·lulosa; 3) hibridació de la membrana per la detecció de proteïnes específiques; i, 4) detecció de la quimioluminiscència. La descripció metodològica de cada un d'aquests passos es correspon amb els PNT-PO0709-URLA-03, 23, 46 i 12, respectivament.

Cal esmentar que al PNT-PO0709-URLA-03, s'indiquen els tipus de gels i tampons per l'òptima separació de la proteïna d'interès. I, en el PNT-PO0709-URLA-46 es presenta una taula amb les dilucions dels anticossos primaris i secundaris.

La quimioluminiscència emesa es va captar amb l'objectiu Nikon AF NIKKOR 50mm 1:1.4D de la càmera CCD acoblada a una cambra fosca (VersaDoc 4000 – Bio-Rad (PNT-PO0705-URLA-62)) i cada imatge va ser guardada en l'ordinador connectat a l'aparell pel processament posterior. En el procés de captació de les imatges, es fixa un temps total d'exposició i el nombre total d'imatges a captar, que determina la freqüència de captació.

El cas de l'optimització del Western blot per a la detecció del factor de transcripció Nrf2 a nivell citoplasmàtic i nuclear es tracta de manera individualitzada en un punt d'aquest apartat perquè va requerir un desenvolupament metodològic diferent a la resta dels altres Westerns per la detecció de les altres proteïnes de l'estudi.

5.2.1. Controls de càrrega en els Western blots

Al punt 7.2 de l'apartat de "**Materials i mètodes**", es detalla el tractament diferencial de les dades segons el Western blot concret per l'anàlisi semiquantitativa dels resultats. Com a controls de càrrega per la normalització de la quantitat de proteïna es van utilitzar l'actina, tant per proteïnes nuclears com citoplasmàtiques, i, la forma no fosforilada de les proteïnes quinases per referenciar la corresponent forma fosforilada.

En aquest punt es vol donar rellevància a l'optimització dels Western blots per la detecció de proteïnes específiques de fracció. En els experiments en què resulta vital l'expressió diferencial entre les fraccions citoplasmàtica i nuclear d'una determinada proteïna, com és el nostre cas amb el factor de transcripció Nrf2, cal confirmar l'absència de contaminació creuada en la preparació de les diferents fraccions subcel·lulars. En el punt 5.1 de "**Materials i mètodes**", s'ha descrit el protocol amb què es van obtenir els extractes de proteïnes nuclears i citoplasmàtiques. La integritat dels extractes preparats es va confirmar per la determinació de proteïnes específiques de localització subcel·lular: de citoplasma, α -tubulin; i, de nucli, lamin B receptor.

Com es pot observar a la **figura 34**, l'expressió de lamin B receptor era pràcticament indetectable a la fracció citoplasmàtica, mentre que resultava molt evident a la corresponent de nucli. L'efecte invers es va produir per l'expressió de α -tubulin, inapreciable a nucli i d'expressió notable a citoplasma. Aquesta comprovació confirmava l'absència de contaminació creuada en la preparació dels extractes. A la figura, també s'inclou la detecció d'actina en les mateixes mostres. Com es pot observar, aquesta proteïna s'expressa tant a nucli com a citoplasma. Per tant, resulta un control de càrrega general, però no serveix per discriminar entre diferents fraccions.

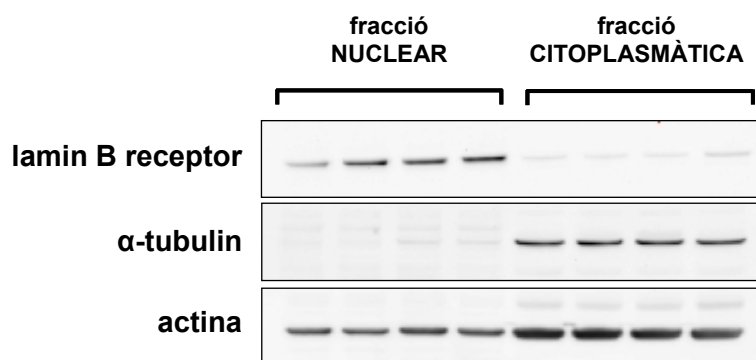


Figura 34. Western blots per la validació de la preparació dels extractes de proteïnes nuclears i citoplasmàtiques. Les mateixes mostres d'extractes de proteïnes de nucli i citoplasma es van fer servir per a la detecció de les proteïnes de control de càrrega: lamin B receptor (específica de nucli), α -tubulin (específica de citoplasma) i actina (no específica, detectable tant a nucli com a citoplasma, perquè és una proteïna de citoesquelet cel·lular).

5.2.2. Optimització de la tècnica de Western blot per a la detecció del factor de transcripció Nrf2 a nivell citoplasmàtic i nuclear

El factor de transcripció Nrf2 humà és una proteïna constituïda per 605 aminoàcids amb un pes molecular predit d'aproximadament 66kDa. D'acord amb aquestes característiques, en primer lloc es va considerar que les condicions més adients pel Western blot eren la utilització de gels comercials Tris-Bis 10% i el tampó d'electroforesi MES. El resultat obtingut es mostra a la imatge de la **condició 1** de la **figura 35**. Com es pot observar, la banda majoritària no s'observava al pes molecular teòric de 66kDa, sinó al voltant de 100kDa, un pes molecular sensiblement superior a l'esperat. En relació a aquesta discrepància, vam trobar que Moi i col·laboradors havien demostrat que la transcripció i la traducció del cDNA de Nrf2 produïa una banda d'aproximadament 96kDa quan es visualitzava en gels d'electroforesi¹⁸⁴. Per tant, el resultat obtingut en el Western blot coincidia amb l'esmentat a la bibliografia. En aquest article se suggeria que aquesta discrepància podria probablement venir donada per l'abundància de residus àcids de l'estructura primària de Nrf2, conduint a una migració anòmala en els gels d'electroforesi SDS-PAGE¹⁸⁴. En el següent pas, es va determinar la conveniència de variar la força iònica del tampó. Es va substituir el tampó MES per un de Tris-Glicina i el gel de gradient utilitzat va anar en consonància al tampó. La imatge del resultat es mostra a la **condició 2** de la **figura 35**. En ella es confirmava que la banda majoritària anteriorment observada es corresponia amb el pes molecular de 100kDa i era la corresponent a Nrf2, perquè el tipus de tampó la separava de manera més adequada. A més, s'intuïa que la banda anteriorment observada, no era una única banda sinó que possiblement dues bandes. Conseqüentment, podíem estar detectant les formes fosforilada i no fosforilada de Nrf2; però, calia provocar que aquestes bandes es resolguessin més per poder-les valorar. Aleshores, mantenint la força iònica constant, es va passar a utilitzar un gel del 8%. Aquesta actuació ens va permetre separar encara més les dues bandes que inicialment s'intuïen, però no estaven suficientment resoltes com perquè la quantificació que es realitzés fos correcta (**condició 3** de la **figura 35**). Finalment, la disminució del percentatge fins el 6% va resoldre perfectament les dues bandes (**condició 4** de la **figura 35**). L'estudi d'aquestes ens va permetre determinar que la banda superior corresponia amb Nrf2 fosforilat (>100kDa) i la inferior al no fosforilat (<100kDa).

Com a resultat del procés d'optimització les condicions fixades van ser les següents: gels no comercials de poliacrilamida al 6% i 1.5mm de gruix; tampó d'electroforesi comercial Tris-Glycine (Invitrogen Ltd., Paisley, UK).

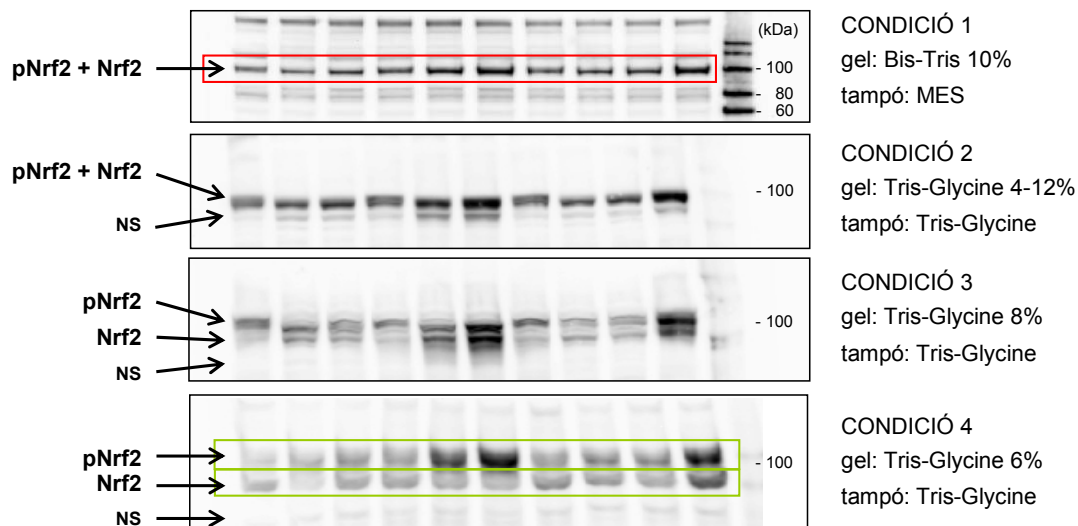


Figura 35. Imatges corresponents a les diferents proves realitzades per testat diferents combinacions de gels i tampons per l'optimització del Western blot de Nrf2. La condició 1 (imatge superior) es caracteritza per gels comercials Bis-Tris al 10% i tampó MES, i permet la detecció d'una única banda que engloba les formes fosforilada i no fosforilada de Nrf2. En la condició 2 (segona imatge començant per l'extrem superior), es van emprar gels comercials Tris-Glycine de gradient 4-12% i tampó Tris-Glycine. La banda única observada en la condició 1 es comença a desdoblir. La condició 3 (segona imatge començant per l'extrem inferior) es caracteritza per gels Tris-Glycine al 8% i tampó Tris-Glycine. En aquesta condició s'observen dues bandes, no suficientment resoltes com per ser analitzades. Finalment, en la condició 4 (imatge inferior) es van utilitzar gels Bis-Tris al 6% no comercials amb tampó Tris-Glycine i es va aconseguir resoldre suficientment les bandes com per ser analitzades.

5.3. Immunofluorescència

Els assaigs d'immunofluorescència es van realitzar en cèl·lules musculars llises d'artèria coronària humana (*Human Coronary Artery Smooth Muscle Cells*, HCASMC). Aquestes cèl·lules procedeixen d'un cultiu primari i es van obtenir a partir de la casa comercial Cascade Biologics (#C-017-5C, Invitrogen). Es van utilitzar cèl·lules després de 6 subcultius que es van fer créixer directament en *Lab-Tek II chamber slides* (#154526 - Nunc) amb medi 231 (#M231500) complementat amb *Smooth Muscle Growth Supplement* (SMGS) (#S00725) segons les indicacions recollides en el PNT-PO0709-URLA-18, fins assolir l'estat de confluència.

Les cèl·lules es van incubar amb vehicle o DDE 10µM a tres temps determinats 0.5, 3 i 24 hores, per reproduir els resultats de l'activació de la via senyalització PI-3k/Akt, la translocació de Nrf2 fosforilat a nucli i l'expressió de FABP4, respectivament (veure punt 2.1.3 de l'apartat de "**Materials i mètodes**"). El protocol realitzat pel marcatge d'immunofluorescència es descriu detalladament al PNT-PO0709-URLA-47. Breument, després de les incubacions, les cèl·lules es van rentar amb una solució de D-PBS + 0.1% BSA + 2% FBS, es van fixar amb paraformaldehid al 2% en D-PBS i permeabilitzar amb Tritó X-100 (D-PBS + 0.1% BSA + 2% FBS + 0.1% tritó). Els anticossos primaris es van incubar *overnight* en cambra humida i a 4°C. Els anticossos primaris i les corresponents dilucions van ser les següents: *goat polyclonal* anti-FABP4, 1:10 (#AF1443, R&D Systems); *rabbit monoclonal* anti-pSer40-Nrf2, 1:200 (#2073-1, Epitomics); *rabbit polyclonal* anti-pSer473-Akt, 1:50 (#4060, Cell Signaling). La incubació amb els anticossos secundaris es va realitzar durant 3 hores en cambra humida a temperatura ambient. Els anticossos secundaris i les corresponents dilucions van ser les següents: anti-*rabbit* FITC (#111-096 045) i anti-*goat* PE (#705-116 147), ambdós en dilució 1:50 (Jackson ImmunoResearch Laboratories). La tinció dels nuclis es va fer amb DAPI 300mM durant 5 minuts, just abans d'afegir el medi de muntatge. Com a medi de muntatge es va emprar el *mowiol*. Per captar les imatges es va emprar el microscopi invertit IX71 (Olympus). Aquest equip està adaptat per a la captació d'imatges de fluorescència perquè disposa dels filtres de fluorescència apropiats i porta acoblada una càmera digital CCD (DP-71-1-5, Olympus) associada amb un equip informàtic en què es troba el programari Cell-F mitjançant el qual es controla la captació.

6. Immunoprecipitació de la cromatina

La immunoprecipitació de la cromatina (en anglès, *Chromatin immunoprecipitation* (ChIP)) és un procediment experimental que s'utilitza per determinar si proteïnes, com els factors de transcripció, es troben associades a regions específiques del genoma *in vivo* en cèl·lules o teixits²⁹⁸. En el nostre cas, l'objectiu va consistir a demostrar la unió de Nrf2 al possible lloc d'unió trobat al promotor del gen FABP4. Al punt 2.3 de l'apartat de "**Materials i mètodes**", es descriu la incubació dels macròfags per l'assaig ChIP de Nrf2.

A partir de les cèl·lules tractades, el següent pas del procediment va consistir en el tractament amb formaldehid. Aquest reacciona amb amines primàries localitzades en els aminoàcids i les bases nitrogenades de les molècules de DNA o RNA, formant una reticulació entre les proteïnes específiques i el DNA a què es troba unit. Aleshores, les cèl·lules es lisen i es trenca la cromatina en fragments de mida petita. Tradicionalment, aquest procés es duu a terme mitjançant la sonicació. Però, recentment s'ha desenvolupat una nova metodologia que permet realitzar-lo per l'acció enzimàtica. Aquesta va ser la opció que es va fer servir en el nostre cas, utilitzant el kit comercial *EZ-Zyme™ chromatin prep kit* Upstate Biotechnology (Millipore, Bedford, MA, USA). El complex proteïna:DNA va ser immunoprecipitat utilitzant un anticòs específic contra Nrf2 o un anticòs contra RNA polimerasa II. La immunoprecipitació amb l'anticòs contra RNA polimerasa II es va fer servir com a control positiu del funcionament del kit. I, l'anticòs contra IgG control per descartar una unió inespecífica. El reticulat de DNA i proteïna es va revertir escalfant i les proteïnes es van eliminar pel tractament amb proteïnasa K. Seguidament, el fragment de DNA es va purificar. Aquests passos es van realitzar amb el kit *EZ ChIP chromatin immunoprecipitation kit* també de Upstate Biotechnology (Millipore, Bedford, MA, USA). El procediment realitzat es descriu de manera més detallada al PNT-PO0709-URLA-42.

Els *primers* dissenyats al voltant del possible lloc ARE (ARE_2) en el promotor del gen FABP4 van ser els següents: *forward*-ARE-FABP4, 5'-CTAACAGTTCATCTCAATTC-3'; i, *reverse*-ARE-FABP4, 5'-GATCCTCAATTCAGTACTG-3'. Les condicions de la PCR d'acord amb la temperatura d'*annealing* dels *primers* s'inclou al PNT-PO0709-URLA-42. El kit utilitzat proporcionava uns *primers* control per assegurar que el procediment de la immunoprecipitació havia estat dut a terme correctament. Els *primers* control es van fer servir amb la mostra immunoprecipitada amb l'anticòs contra RNA polimerasa II i amplifiquen una regió del gen GAPDH humà: *forward*, 5'-

TACTAGCGGTTTTACGGGCG-3'; i, *reverse*, 5'-TCGAACAGGAGGAGCAGAGAGCGA-3'. Les condicions de la PCR d'acord amb la temperatura d'*annealing* dels *primers* es detallen al PNT-PO0709-URLA-42.

Els productes de les PCRs es van separar en un gel PAGE del 15% i la presència de producte d'amplificació es va detectar tenyint amb el SYBR[®] Safe DNA gel stain (Invitrogen Ltd, Paisley, UK) (PNT-PO0709-URLA-32) i visualitzats utilitzant el VersaDoc 4000 Imaging System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Una confirmació del bon funcionament del kit es traduiria en la presència d'una banda de pes molecular 166bp en el GAPDH. I, un resultat positiu de la unió de Nrf2 al lloc ARE_2 del promotor de la FABP4 humana es confirmaria per la presència d'una banda de 153bp.

7. Estudi *ex vivo* per relacionar els nivells circulants de FABP4 amb l'activació sistèmica de Nrf2

7.1. Descripció dels pacients

Al grup disposem d'una població ben caracteritzada de pacients amb obesitat abdominal i un risc cardiovascular moderat-alt d'acord amb el Framingham Risk Score (CRV) (5 -20% als 10 anys), però sense events cardiovasculars previs. Els pacients eren atesos a la Unitat de Medicina Vascular i Metabolisme de l'Hospital Universitari Sant Joan de Reus i van ser reclutats per un estudi en què es valorava el risc cardiometabòlic i l'efecte de la intervenció terapèutica per dur a terme canvis en l'estil de vida. A partir dels individus inclosos en l'estudi es va crear una col·lecció de mostres que està dipositada al BioBanc de l'Hospital Universitari Sant Joan de Reus. L'estudi va ser aprovat pel Comitè d'Ètica i d'Investigació Clínica de l'Hospital, i tots els participants van signar un consentiment informat. En tot moment, se segueix la normativa vigent de protecció de dades. Es va demanar als custodis de la col·lecció accés a les mostres i ens va ser concedit. Aquesta col·lecció disposa de diferents tipus de mostres. Es van demanar al·lquotes de plasma i cèl·lules mononuclears aïllades a partir de sang perifèrica.

7.2. Determinació dels nivells circulants de FABP4

Els nivells en plasma de FABP4 es van determinar mitjançant un kit ELISA comercial (BioVendor Laboratory Medicine Inc., Brno, Czech Republic) segons es detalla al PNT-PO0709-URLA-11. La precisió de l'assaig es determina pels coeficients de variació intra- i inter-assaig, que van ser de 5.3% i 3.9%, respectivament. Els anticossos utilitzats en el kit són altament específics per la FABP4 humana, cosa que descarta la possibilitat de reactivitat creuada amb altres proteïnes de la família de les FABPs humanes (FABP1, FABP2, FABP3 o FABP5). La lectura de la placa es va realitzar en el lector ELISA BioWhittaker KINETIC a la longitud d'ona de 450nm.

És important indicar que vam determinar els nivells de FABP4 en plasma de totes les mostres recollides fins el moment d'aquesta col·lecció (N=257) per altres estudis que s'han dut a terme en el grup. Per tant, per a la realització del nostre estudi *ex vivo* en què es pretenia relacionar els nivells de FABP4 circulants amb l'activació sistèmica de Nrf2, ens vam servir de les dades de FABP4 prèviament obtingudes per l'elecció dels individus.

En un histograma, es van representar els nivells plasmàtics de FABP4 de tota la població, per estudiar la distribució que se seguia i establir uns punts on distingir entre nivells alts i baixos de concentració. Es van escollir 20 individus de la col·lecció d'acord amb els punts de tall establerts. Aquests individus es van distribuir en dos grups de 10: el primer grup amb nivells BAIXOS, FABP4 < 20 µg/l; i, el segon grup amb nivells ALTS, FABP4 > 45 µg/l.

7.3. Obtenció i processament de cèl·lules mononuclears de sang perifèrica

L'obtenció de les cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMCs) es va fer a partir de sang recollida en tubs de plasma-EDTA seguint el protocol que es descriu detalladament al PNT-PO0709-URLA-45. Les cèl·lules aïllades es van congelar i guardar al BioBanc fins el moment de processar-les.

El processament de les PBMCs va consistir en l'obtenció dels extractes de proteïnes nuclears i citoplasmàtiques. Per dur-ho a terme, es va adaptar el protocol del PNT-PO0709-URLA-10 a les característiques de la mostra. El tractament diferencial de la mostra va ser el següent:

- 1) Descongelar les cèl·lules i clavar en gel.
- 2) Traspassar les cèl·lules descongelades de cada criotub a un tub cònic de 15ml.
- 3) 1r rentat: afegir D-PBS fred fins a un volum de 12ml.
- 4) Centrifugar: 900rpm, 10min, 4°C, rotor oscil·lant.
- 5) Eliminar el sobrenedant.
- 6) 2n rentat: afegir D-PBS fred fins a un volum de 12ml.
- 7) Centrifugar: 900rpm, 10min, 4°C, rotor oscil·lant.
- 8) Eliminar el sobrenedant.
- 9) 3r rentat: afegir D-PBS fred fins a un volum de 12ml.
- 10) Centrifugar: 900rpm, 10min, 4°C, rotor oscil·lant.
- 11) Eliminar el sobrenedant.
- 12) Resuspendre el pellet amb 800µl de tampó hipotònic.

En aquest punt es continua segons el PNT enllaçant amb el punt de l'homogeneïtzació amb l'agulla de 26G_{1/2} per fer la disrupció mecànica de la membrana cel·lular. Els volums dels tampons es van adaptar a la quantitat de cèl·lules de què es disposava per obtenir una concentració de proteïna adequada. El volum de tampó hipotònic utilitzat va ser 800µl i el de tampó d'extracció, 80µl.

7.4. Determinació de l'activació sistèmica de Nrf2

La valoració de l'activació a nivell sistèmic de Nrf2 es va realitzar mitjançant el kit comercial TransAM Nrf2 d'Active Motif. El procediment experimental es descriu al PNT-PO0709-URLA-44. Aquest kit empra la metodologia ELISA adaptada a l'EMSA, i ens permet determinar en una determinada mostra la quantitat de Nrf2 activat, és a dir, fosforilat i capaç d'unir-se a la seqüència consens ARE que està immobilitzada a la placa. En l'estudi realitzat, es va pretendre avaluar aquesta activació a nivell sistèmic. Per aquesta raó, es van utilitzar els extractes de PBMCs dels pacients amb valors extrems de FABP4 circulant. La quantitat de proteïna utilitzada en la determinació va ser de 5µg d'extracte nuclear per mostra. La determinació en les mostres es va fer per duplicat, i es va incloure un control positiu del kit per assegurar que la mesura es realitzava correctament.

8. Processament de les dades. Anàlisi estadística.

8.1. Expressió gènica

8.1.1. Quantificació relativa de l'expressió gènica: mètode del $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Les dades obtingudes a partir de la RT i PCR a temps real es van analitzar per quantificació relativa utilitzant el mètode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ²⁹⁹. L'aplicació d'aquest mètode és possible perquè s'assumeix que les eficiències d'amplificació de FABP4 i GAPDH són iguals, d'acord amb el disseny dels assaigs realitzat per la pròpia casa comercial (*Applied Biosystems User Bulletin No.2 (P/N 4303859)*). Aquesta opció de quantificació descriu el canvi en l'expressió en el gen diana en relació a una referència. S'inclou un gen de control endogen d'expressió constitutiva que s'utilitza per normalitzar el producte de la PCR per la quantitat de RNA afegida a la reacció de transcripció reversa. Els resultats d'expressió gènica que es presenten en aquesta tesi avaluen l'efecte de diferent tipus d'incubacions sobre el gen d'interès que és la FABP4. Com a control endogen es va fer servir el GAPDH.

Com es calcula el $\Delta\Delta Ct$? Els valors Ct són proporcionats per l'equip en què es realitza la PCR a temps real. El Ct és el valor llindar de fluorescència en què l'aparell pot discriminar entre soroll de fons i senyal emesa per efecte de l'amplificació. Cada condició experimental ha d'estar feta com a mínim per triplicat; i, cada mesura es llegeix per triplicat, a partir del qual obtindrem un valor Ct mitjà. També, ens permet obtenir els valors de la desviació estàndard (SD) i el coeficient de variació (CV). Aleshores, a partir de la següent expressió es calcula el doble diferencial:

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{gen diana}} - Ct_{\text{gen control}})_X - (Ct_{\text{gen diana}} - Ct_{\text{gen control}})_0$$

on, gen diana: gen d'estudi; gen control: control endogen; X: qualsevol condició d'estudi; 0: condició de referència

i, el valor obtingut, es canvia de signe i actua d'exponent en base 2.

Amb el mètode $2^{-\Delta\Delta Ct}$, les dades es presenten com el canvi en número de vegades en l'expressió gènica normalitzat a un gen endogen de referència i relatiu a una condició control (per exemple, una mostra no tractada o un temps basal). Per aquesta condició control, $\Delta\Delta Ct$ s'igualava a zero i, per tant, 2^0 és 1. Aleshores, el canvi en número de vegades en l'expressió gènica prenent com a referència la condició control és sempre 1, per definició. Per a les altres condicions, l'avaluació de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ indica el canvi en número de vegades respecte a la condició control.

8.1.2. Tractament de les dades en funció de l'experiment

A partir dels resultats obtinguts amb la quantificació relativa pel mètode $2^{-\Delta\Delta Ct}$, l'anàlisi posterior de les dades va variar en funció del tipus de disseny experimental. Es va distingir entre dos models experimentals: 1) a temps únic; 2) cinètica temporal.

8.1.2.1. Model experimental a temps únic

En aquest tipus d'experiment es valora l'efecte d'una determinada incubació en un únic temps. La referència és la incubació amb el vehicle. Els experiments en què les dades es van analitzar segons aquest protocol van ser: 1) *Efecte de la repetició de dosi dels aldehids sobre l'expressió gènica de FABP4*; 2) *Expressió gènica de FABP4 induïda per la dosi definida dels aldehids*; i, 3) *Efecte del tBHQ sobre l'expressió gènica de FABP4*.

Cal fer una esmena especial en el cas de l'experiment en què es va avaluar si la inducció de l'expressió de FABP4 es donava a nivell transcripcional (DDE +/- CHX i +/- Act D: sobre l'expressió de RNA de FABP4). En aquest cas, les referències van ser dues: 1) el vehicle: per les incubacions de DDE, Act D+vehicle i CHX+vehicle; 2) el DDE: per les incubacions de DDE+Act D i DDE+CHX.

8.1.2.2. Model experimental de cinètica temporal

En la cinètica temporal, el punt de referència va ser el temps inicial. Els experiments que seguien aquest model es presenten a continuació. En la corba temps resposta al DDE, es van confeccionar dues cinètiques: una per al vehicle i una altra per al DDE. Com s'ha enunciat anteriorment, en ambdues corbes es va prendre com a referència el temps basal. Per tant, s'obtenia la informació referent a l'efecte de l'aldehid i del vehicle en el rang temporal considerat vers el temps basal. Per completar l'anàlisi i corregir el possible efecte del vehicle sobre l'expressió gènica de FABP4, es va referenciar cada valor d'expressió produït pel DDE pel corresponent del vehicle per cada temps. En l'experiment de l'estabilització del RNA induïda per l'aldehid, també es va confeccionar una corba per l'aldehid i una altra pel vehicle. Però en aquest cas es van considerar de manera independent. En ambdues cinètiques, cada temps es va referenciar al temps inicial.

8.2. Expressió proteica

L'anàlisi dels resultats dels diferents Western blots es va realitzar amb el programari Quantity One (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). El primer pas per la quantificació d'un Western blot és l'elecció de la imatge a partir de totes les captades per l'aparell d'imatge. Per fer l'elecció cal realitzar un estudi de la linealitat. El procediment de l'estudi de la linealitat s'explica amb l'exemple de la **figura 36**.

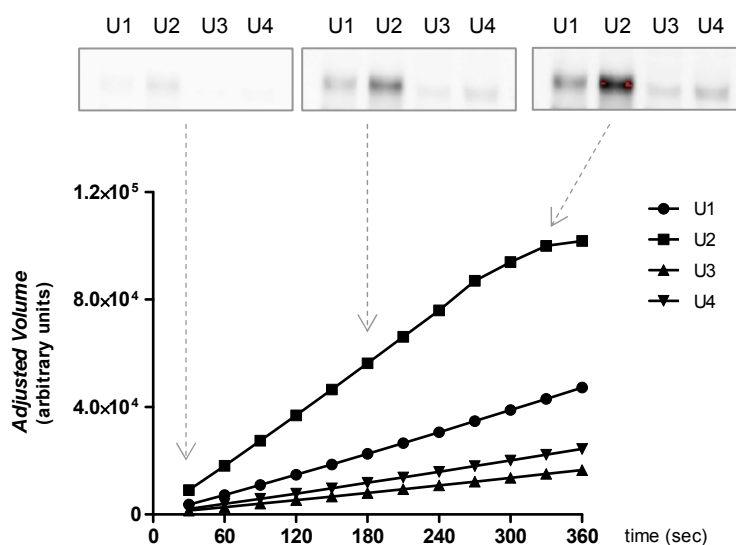


Figura 36. Exemple de l'estudi de linealitat d'un Western blot en què 4 mostres proporcionen 4 bandes amb diferent intensitat. A la part superior de la figura, es presenten tres imatges corresponents als temps de captació de 30, 180 i 330 segons d'un Western blot en què es valoren les mostres U1, U2, U3 i U4. A la gràfica es representa l'evolució temporal de cada una de les mostres. Es permet evidenciar el rang de linealitat en la intensitat de la senyal quimioluminiscent emesa per cada banda i captada pel detector. Les bandes corresponents a les mostres U1, U3 i U4 presenten un comportament lineal en el rang temporal presentat. En canvi, la intensitat de la banda corresponent a la mostra U2 se satura a partir del temps de 270 segons, i s'evidencia perquè la línia de assoleix un *plateau*.

En una membrana detectem 4 mostres (U1, U2, U3 i U4) que tenen diferent intensitat. Cal escollir la imatge idònia en què, malgrat la diferència, totes les bandes tinguin prou intensitat per realitzar la quantificació. Però, tenint en compte que cap de les bandes se satura. El concepte de saturació consisteix en el punt en què se supera el màxim d'intensitat de la senyal que el detector (la càmera CCD) és capaç de detectar. Cal representar el valor d'intensitat de les bandes (U1, U2, U3 i U4) en cada imatge captada i s'obté l'evolució temporal de la intensitat.

La imatge òptima és aquella en què totes les mostres presenten un creixement exponencial de la intensitat. De les tres imatges que es presenten en l'exemple, la imatge que s'escolliria seria la central. En la de l'esquerra, la intensitat és molt baixa; i, en la de la dreta, la banda U2 ja s'ha saturat i ha assolit un *plateau*.

Una vegada escollida la millor imatge, aquest programa ens proporciona els valors d'intensitat de les bandes d'interès en unitats arbitràries (*arbitrary units, au*) que representen el volum ajustat. El valor ajustat és el valor de la intensitat de la banda normalitzat per l'àrea d'aquesta, en què s'ha restat el valor corresponent al soroll de fons. Els resultats del processat de les dades obtingudes es mostren com a valoracions semiquantitatives, relatives sempre a una mostra control que varia en funció del disseny experimental. Distingim entre diferents dissenys experimentals i segons les proteïnes d'estudi.

8.2.1. FABP4 a temps únic

En els experiments en què es valorava l'expressió de proteïna FABP4 en un únic temps, es va utilitzar l'expressió d'actina per normalitzar. La normalització consistia en dividir els valors de FABP4 de cada condició pels corresponents d'actina. Per determinar l'efecte produït per la incubació, es prenia com mostra de referència la incubació amb el vehicle. Els experiments en què les dades es van analitzar segons aquest protocol van ser: 1) Corbes dosi-resposta dels aldehids sobre l'expressió proteica de FABP4; 2) Efecte del tBHQ sobre l'expressió proteica de FABP4.

8.2.2. FABP4 en cinètica temporal

En les cinètiques temporals de FABP4, també es va utilitzar l'expressió d'actina com a proteïna d'expressió constitutiva per normalitzar. El valor d'expressió de FABP4 de cada temps es va referenciar al corresponent d'actina. I, per avaluar l'evolució temporal, es va prendre com a referència el temps 0. D'aquesta manera, es va analitzar la cinètica de FABP4 en resposta a la incubació amb DDE.

8.2.3. Nrf2 fosforilat en cinètica temporal

Per avaluar l'efecte de les diferents incubacions sobre l'activació de Nrf2 al llarg del temps, al valor de Nrf2 fosforilat a nucli de cada condició se li va restar el valor de Nrf2 fosforilat del vehicle corresponent a cada temps. L'evolució temporal per efecte de les diferents incubacions es va determinar prenent com a referència el temps inicial.

8.2.4. Nrf2 fosforilat a temps únic

En aquest tipus de disseny experimental, es troben inclosos els experiments amb l'inhibidor de la síntesi proteica, CHX. Conseqüentment, es disposa dels següents tipus de mostres: DDE/tBHQ amb CHX, vehicle amb CHX, DDE/tBHQ i vehicle. L'anàlisi es va efectuar restant el valor de Nrf2 fosforilat del vehicle (amb o sense CHX) al valor de Nrf2 fosforilat de la incubació equivalent (amb o sense CHX). Per exemple, a la incubació de CHX+DDE se li restaria el valor de CHX+vehicle. Aleshores, per la quantificació relativa es va fixar com a valor de referència es va prendre el valor de la incubació de DDE/tBHQ sense CHX.

8.2.5. Proteïnes quinases

Les proteïnes quinases estudiades són: Akt, GSK-3 β i ERK. En tots els casos, es tracta d'una cinètica temporal en resposta a la incubació amb DDE. Els valors de les formes fosforilades de totes les proteïnes (pThr308-Akt, pSer473-Akt; pSer9-GSK-3 β ; i, p(Thr202,Tyr204)-ERK) es van normalitzar amb els valors de la corresponent forma no fosforilada (Akt; GSK-3 β ; i, ERK). Per determinar l'efecte produït al llarg del temps, el valor de cada temps es va referenciar al valor del temps basal.

8.3. MatInspector

El programari MatInspector accessible *on-line* a través de la plataforma Genomatix (<http://www.genomatix.de>) és l'eina bioinformàtica a través de la qual es va realitzar l'estudi del promotor del gen FABP4 com s'ha esmentat en el punt 1 de l'apartat de "**Materials i mètodes**". Com a resultat d'aquesta anàlisi, aquest programari proporciona un volum d'informació que s'ha de gestionar detingudament. L'*output* és un llistat amb les coincidències trobades d'acord amb la informació de què disposa a la biblioteca de famílies de matrius. Per cada una de les coincidències, el MatInspector proporciona una sèrie de paràmetres que indiquen la qualitat del possible lloc trobat. Els paràmetres més informatius es descriuen a continuació:

- 1) *Family*. Indica la família a la qual pertany el factor de transcripció coincident. En el nostre cas, la família d'interès s'identifica per V\$AP1R.
- 2) *Matrix*. Identifica el factor de transcripció concret que podria unir-se en aquest lloc. Segons la nomenclatura, Nrf2 és anomenat com a V\$MARE_ARE.01.
- 3) *Optimized matrix threshold (Opt. Threshold)*. Aquest indicador de similitud de matriu és un valor optimitzat definit de manera que es minimitza el nombre de coincidències que són falsos positius. El valor corresponent per V\$MARE_ARE.01 és de 0.76.
- 4) *Start position (Start Pos.)*. Posició d'inici de la coincidència en el promotor del gen d'estudi.
- 5) *End position (End Pos.)*. Posició en què finalitza la coincidència en el promotor del gen d'estudi.
- 6) *Strand*. Indica el sentit en què es troba el possible lloc d'unió. Un signe positiu (+) es correspon amb el sentit directe (*forward*). Mentre que el signe negatiu (-) indica que es troba en el sentit invers (*reverse*).
- 7) *Matrix similitude (Matrix Sim.)*. Constitueix el valor que proporciona el grau de qualitat del lloc trobat. A més de considerar les 4 posicions més conservades del *core similitude*, considera la seqüència al voltant d'aquests llocs i, mitjançant, l'algoritme del programa proporciona un valor. Un bon valor de *Matrix similitude* ha de ser >0.80.
- 8) *Core similitude (Core Sim.)*. La *core sequence* són els 4 posicions més conservades de la matriu. Per tant, la *core similitude* proporciona el grau de coincidència de la matriu teòrica amb el possible lloc trobat. El màxim valor és 1.0.
- 9) *Sequence*. Fragment de la seqüència en què troba la coincidència.

8.4. GraphPad PRISM

El GraphPad PRISM (versió 5.01) és un programari molt versàtil que ha estat utilitzat per a la confecció de totes les gràfiques dels resultats que es presenten en aquesta tesi.

Adicionalment, el GraphPad PRISM també es va emprar per analitzar els resultats obtinguts a partir de la determinació per ELISA de les concentracions en plasma de FABP4. Aquest programari ens permet aplicar el model matemàtic que és necessari pel tipus de corba d'aquest kit. A partir dels valors d'absorbància de la corba d'estàndards, s'aplica una funció paramètrica de quart ordre. Introduint els valors d'absorbància mitjans de les mostres després d'haver restat el valor mitjà del blanc, el programa proporciona el valor de concentració. Al qual, posteriorment, s'ha de tenir en compte el factor de dilució aplicat.

8.5. Anàlisi estadística - SPSS

El disseny experimental de tots els procediments *in vitro* a partir dels quals es presenten els resultats va considerar la realització de com a mínim tres experiments independents en cada cas. En l'estudi amb pacients es van comparar els valors mitjans dels dos grups (FABP4-BAIXOS vers FABP4-ALTS). L'anàlisi estadística es va efectuar amb el programari SPSS versió 17.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Els resultats que s'exposen tant a les diferents figures com al text s'expressen com a la mitjana dels experiments realitzats i la desviació estàndard associada. En cas contrari, s'indica específicament com s'expressa el resultat. El test Kolmogorov-Smirnov (K-S test) es va emprar per avaluar la normalitat de la distribució en les variables considerades. Les dades dels estudis *in vitro* i les de l'estudi amb pacients es van analitzar utilitzant el test no paramètric U de Mann-Whitney de dues mostres independents, desenvolupat l'any 1945 per Wilcoxon. Aquest test està indicat per variables quantitatives que pertanyen a mostres petites que no segueixen una distribució normal i sense homogeneïtat de variàncies. En tots els casos, un *two sided p-value* inferior a 0.05 es va considerar estadísticament significatiu.

9. Procediments Normalitzats de Treball (PNT)

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
REGULACIÓ DE FABP4 DEPENDENT DE NRF2 EN MACRÒFAGS
Iolanda Lázaro López
ISBN:978-84-693-8852-5/DL:T.1952-2010



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

Estudi del promotor d'un gen amb el programari MatInspector

PNT-PO0709-URLA-38

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 1 de 4

1. Fonament i objectiu

Estudiar el promotor d'un gen amb el programari MatInspector per determinar tots els possibles llocs de reconeixement de factors de transcripció que poden estar regulant-ne l'expressió.

El **MatInspector** és una aplicació que es troba dins la plataforma **Genomatix** (<http://www.genomatix.de>). El **MatInspector** analitza seqüències de qualsevol longitud per localitzar els possibles llocs d'unió per factors de transcripció, utilitzant la base de dades **MatBase**.

2. Espècimen

Seqüència del promotor del gen d'interès trobada a partir de la base de dades del GenBank.

3. Documentació relacionada

4. Definicions

5. Historial de revisions

Modificacions efectuades	No de Revisió	Data
Iolanda Lázaro López	01	30/04/2010

6. Solucions, reactius i materials

Nom de la solució:	Volum final:		
pH	Manipulació prèvia:	Conservació:	
Reactiu	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)

Material	Capacitat	Tractament Previ	Observacions

7. Instrumentació i equips:

Equip	Ubicació	Núm. Inventari	Núm. PNT-EE	Observacions

8. Precaucions



9. Procediment

9.1. Cerca de la seqüència del promotor del gen d'interès

Per realitzar la cerca, ens dirigim a la pàgina web del PubMed i seleccionem la base de dades Nucleotide. En el camp per introduir el paràmetre de cerca, escrivim: *xxxx* promoter (on *xxxx* és el nom del gen d'interès).

L'entrada corresponent a la seqüència del promotor del gen es correspon amb un determinat *accession number*.

En accedir al report que ens proporciona la base de dades, es pot obtenir la seqüència completa del promotor en format FASTA, a més d'altra informació addicional.

9.2. Registre al portal GENOMATIX

El portal GENOMATIX (<http://www.genomatix.de/>) és una plataforma permet l'accés a eines bioinformàtiques per analitzar i comprendre els mecanismes moleculars implicats en la regulació gènica com a part central dels sistemes biològics.

A la part inferior esquerra del portal, trobem l'apartat *Login*. La plataforma ens permet accedir a les diferents eines bioinformàtiques amb un compte d'accés gratis amb però serveis limitats ([Get a free evaluation account](#)). Cal omplir el formulari (<http://www.genomatix.de/cgi-bin/UMapps/register.pl>), immediatament ens proporcionen un codi identificador d'usuari i un password a través de correu electrònic. En el moment en què es disposi dels codis, ja es pot començar a utilitzar la plataforma accedint a través del *Login*.

9.3. Anàlisi de la seqüència amb el MatInspector

L'eina bioinformàtica que ens permet escanejar la seqüència del promotor per detectar tots els possibles llocs de reconeixement de FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ és el MatInspector. En el compte gratis d'accés limitat als serveis disposem de 10 oportunitats.

9.3.1 Introducció de la seqüència. Apartat: SEQUENCE INPUT.

- La seqüència es pot introduir de dues maneres: 1) copiant la seqüència en format FASTA; o, 2) introduint l'*Accession number* de la seqüència.
- Seleccionar el genoma HOMO SAPIENS amb què es compararà la seqüència a estudiar en l'apartat *Search corresponding promoters for your sequence(s)*.

9.3.2 Selecció de la biblioteca. Apartat: LIBRARY SELECTION.

- Seleccionar: *Transcription factor binding sites (Weight matrices)*.
- Prèmer CONTINUE.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI URLA

Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

Estudi del promotor d'un gen amb el programari MatInspector

PNT-PO0709-URLA-38 Revisió: 00 Data: 24-07-2008 Pàgina: 3 de 4

Gene Name Input

Search promoters by gene

Start typing a gene name and select a gene from the drop-down list to analyze its promoter

enter gene

or Sequence Input

Choose from your previously uploaded sequences

or enter the correctly formatted DNA sequence(s)

Supported formats: plain, EMBL, FASTA, GCG/RSF, GenBank, IG

Name for your sequence-file: ilazero_1.seq

or upload a file containing sequence(s) (max. 100 MB)

or enter accession number(s)

Check your sequence(s) against our genome database to find corresponding promoters for analysis

Homo sapiens

or Database Input

Library Selection

Please select one of the following libraries:

Transcription factor binding sites (Weight matrices)

User-defined IUPAC string

Plant IUPAC library (based on PLACE)

9.3.3 Selecció de la matriu. **Apartat: MATRIX SEARCH PARAMETERS.**

- Seleccionar les opcions: *General Core Promoter Elements* i *Vertebrates*.

9.3.4 Selecció dels paràmetres de sortida. **Apartat: OUTPUT PARAMETERS.**

- Seleccionar l'opció que mostri línies addicionals d'evidència.

9.3.5 Resultat. **Apartat: RESULT.**

- Introduir un nom pel resultat de l'anàlisi.
- Prèmer SUBMIT QUERY.

Matrix Search Parameters

Matrix_group

(Check transcription factor <-> matrix family assignment)

Fungi General Core Promoter Elements

Insects Plants

Miscellaneous Vertebrates

use all matrices from selected groups

use previously defined matrix subsets

continue with subset definition from selected groups

Output Parameters

Lines of evidence

show additional lines of evidence

Result

Result name (optional)

(special characters like "#\$%&+./:;<=>?@ not allowed)



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

Estudi del promotor d'un gen amb el programari MatInspector

PNT-PO0709-URLA-38

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 4 de 4

9.4. Anàlisi dels resultats

L'anàlisi ens proporciona una taula amb tots els possibles llocs de reconeixement pels factors de transcripció que ha trobat en les diferents posicions de la seqüència.

Com que l'accés que ens proporciona el compte gratuït és limitat, no ens genera cap arxiu que poguem exportar o guardar en un format útil per treballar i analitzar amb més profunditat totes les coincidències trobades. Una solució a aquest inconvenient és COPIAR la taula i enganxar-la en un document de WORD.

Search Results (1587 matches)

[\[Graphics\]](#) [\[Match tables\]](#)

MatInspector Release professional 8.01, July 2009 Wed Sep 2 09:48:25 2009

Solution parameters:

Sequence files: ilazaro020909.seq (1 sequence, 5403 bp)
 Family matches: yes
 MatInspector library: Matrix Family Library Version 8.1 (June 2009)
 Selected groups: General Core Promoter Elements (0.75/Optimized)
 (core/matrix sim) Vertebrates (0.75/Optimized)

Inspecting sequence ilazaro020909 (1 - 5403):

Show/Hide column Evidence [Need help on the interactive features?](#)

1587 matches found in this sequence

Check transcription factor <-> matrix family assignment			Tissue ?	Opt. ?	Position		Strand	Core sim. ?	Matrix sim. ?	#	Additional lines of evidence ?	Sequence (red: cc-value ? > 60 CAPITALS: core sequence ?)
Matrix Family	Detailed Family Information	Matrix			from	to						
VSOCT1	Octamer binding protein	VSOCT1.04	Antibody-Producing Cells Blastomeres Blood Cells Embryonic Structures Germ Cells Immune System Leukocytes Lymphocytes Urogenital System	0.80	3	19	11	(-)	0.846	0.801	0	atCATGccaaggcttc
VNRZF	Nuclear receptor subfamily 2 factors	VNR4.02	Adrenal Glands Digestive System Embryonic Structures Endocrine System Eye Islets of Langerhans Liver Nervous System Neurons Pancreas Testis Urogenital System	0.75	10	34	22	(-)	1.000	0.811	0	tgctcatAGGTtaaggatcatgccaa
VSPERQ	Peroxisome proliferator-activated receptor	VSPPAR_RXR.02	Adipose Tissue Connective Tissue Digestive System Liver	0.69	13	35	24	(-)	0.756	0.749	0	atgtcataggttAAGGatcatgpc

10. Verificació de la tècnica i interpretació de resultats

11. Guia de problemes

Problema	Possible causa	Solució

12. Referències

Cartharius K *et al. Bioinformatics* 2005; 21:2933-42.

13. Control de la documentació

14. Annexos

Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

Cèl·lules THP-1 (DSMZ)

PNT-PO0709-URLA-13

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 1 de 10

1. Fonament i objectiu

- 1.1. *Fonament*: Línia cel·lular d'origen humà. Són monòcits procedents d'una leucèmia monocítica aguda. Les cèl·lules es cultiven i divideixen en suspensió (Figura 1). Es poden diferenciar a cèl·lules macrofàgiques afegint al medi èsters de forbol (Figura 2). En estadi de macrofag, les cèl·lules s'adhereixen a la superfície de cultiu i no es divideixen.

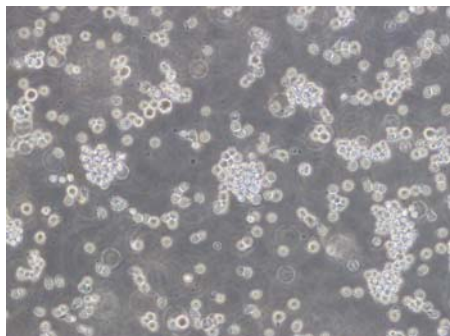


Fig 1. Cèl·lules THP-1 en estat de monòcit.

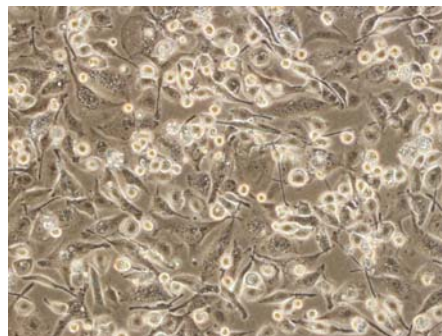


Fig 2. Cèl·lules THP-1 diferenciades a macrofag

- 1.2. *Objectiu*: Créixer i mantenir cèl·lules THP-1 en cultiu. Diferenciar cèl·lules THP-1 a macrofags.
- 1.3. *Utilitat*: La línia cel·lular THP-1 ens permet fer experiments *in vitro* que requereixin un model cel·lular humà amb característiques de cèl·lules proinflamàtòries. Com és una línia cel·lular, els experiments seran reproduïbles ja que les característiques cel·lulars es mantindran durant la seva divisió.

2. Espècimen

Cèl·lules línia monocítica humana de leucèmia aguda THP-1, ref. ACC 16 - DSMZ, $5 \cdot 10^6$ cèl/criotub.

Informació proporcionada per la pàgina web de la casa comercial DSMZ a la qual es compra aquest tipus cel·lular:

Cell line:	THP-1
Cell type:	human acute monocytic leukemia
DSMZ no.:	ACC 16
Origin:	established from the peripheral blood of a 1-year-old boy with acute monocytic leukemia (AML) at relapse in 1978; the cells can be used for induction of differentiation studies; the cells were described to produce lysozyme and to be phagocytic; carries t(9;11)(p21;q23) leading to MLL-AF9 fusion gene
References:	Tsuchiya et al., Int J Cancer 26: 171-176 (1980), PubMed ID 6970727 Tsuchiya et al., Cancer Res 42: 1530-1536 (1982), PubMed ID 6949641 review: Drexler et al., Leukemia 18: 227-232 (2004), PubMed ID 14671638
Depositor:	Dr. J. Minowada, Fujisaki Cell Center, Okayama, Japan



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

Cèl·lules THP-1 (DSMZ)

PNT-PO0709-URLA-13

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 2 de 10

DSMZ Cell Culture Data

Morphology: round, single cells in suspension, partly in clusters
Medium: 90% RPMI 1640 + 10% FBS
Subculture: maintain at $0.1-1.0 \times 10^6$ cells/ml; split 1:2 to 1:3 every 3-4 days; seed out at ca. 0.5×10^6 cells/ml
Incubation: at 37 °C with 5% CO₂
Doubling time: ca. 35-50 hours
Harvest: saturation density at about 1.0×10^6 cells/ml
Storage: frozen with 70% medium, 20% FBS, 10% DMSO at about 5×10^6 cells/ml

DSMZ Scientific Data

Mycoplasma: contamination was eliminated with Ciprobay (ciprofloxacin), then negative in DAPI, microbiological culture, PCR assays
Immunology: CD3 -, CD4 +, CD13 +, CD14 (+), CD15 +, CD19 -, CD33 (+), CD34 -, CD68 +, HLA-DR +
Fingerprint: multiplex PCR of minisatellite markers revealed a unique DNA profile
Species: confirmed as human with IEF of AST, MDH, NP
Cytogenetics: human near-tetraploid karyotype - $94(88-96)<4n>XY/XXY, -Y, +1, +3, +6, +6, -8, -13, -19, -22, -22, +2mar, add(1)(p11), del(1)(q42.2), i(2q), del(6)(p21)x2-4, i(7p), der(9)t(9;11)(p22;q23)i(9)(p10)x2, der(11)t(9;11)(p22;q23)x2, add(12)(q24)x1-2, der(13)t(8;13)(p11;p12), add(?18)(q21)$ - carries t(9;11) associated with AML M5
Molec. Genetics:
Viruses: ELISA: reverse transcriptase negative; PCR: EBV -, HBV -, HCV -, HHV-8 -, HIV -, HTLV-I/II -, SMRV -

3. Documentació relacionada

4. Definicions

5. Historial de revisions

Modificacions efectuades	No de Revisió	Data
Iolanda Lázaro López	01	30/04/2010



6. Solucions, reactius i materials

Nom de la solució:	Medi complet al 5% FBS	Volum final:	500ml
pH	Manipulació prèvia:	Conservació:	4°C
Reactiu	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)
RPMI 1640 + Glutamax - I, 1x	61870-010 / GIBCO (Invitrogen)	94%	470ml
Foetal Bovine Serum Gold	A15-151 / PAA (LabClinics)	5%	25ml
Penicillin/Streptomycin, 100x concentrate	P11-010 / PAA (LabClinics)	1%	5ml

Elaborat per: Iolanda Lázaro López

Aprovat per: Lab-Manager

Aquest document en suport paper es considera document no controlat

	UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI	
Procediment Normalitzat de Treball Metodològic		
Cèl·lules THP-1 (DSMZ)		
PNT-PO0709-URLA-13	Revisió: 00	Data: 24-07-2008
		Pàgina: 3 de 10



Nom de la solució:		Medi complet al 10% FBS		Volum final:		500ml	
pH	Manipulació prèvia:		Conservació:		4°C		
Reactiu		Referència / marca		Concentració final		Quantitat (unitats)	
RPMI 1640 + Glutamax - I, 1x		61870-010 / GIBCO (Invitrogen)		89%		445ml	
Foetal Bovine Serum Gold		A15-151 / PAA (LabClinics)		10%		50ml	
Penicillin/Streptomycin, 100x concentrate		P11-010 / PAA (LabClinics)		1%		5ml	

Nom de la solució:		Medi complet al 20% FBS		Volum final:		500ml	
pH	Manipulació prèvia:		Conservació:		4°C		
Reactiu		Referència / marca		Concentració final		Quantitat (unitats)	
RPMI 1640 + Glutamax - I, 1x		61870-010 / GIBCO (Invitrogen)		79%		395ml	
Foetal Bovine Serum Gold		A15-151 / PAA (LabClinics)		20%		100ml	
Penicillin/Streptomycin, 100x concentrate		P11-010 / PAA (LabClinics)		1%		5ml	

Nom de la solució:		Foetal Bovine Serum Gold		Volum final:		500ml		
pH	Manipulació prèvia:		Inactivació a 56°C durant 30min i filtrat en 0.2µm		Conservació:		-20°, en alíquotes de 20ml	
Solució Mare		Referència / marca		Concentració final		Quantitat (unitats)		
Foetal Bovine Serum Gold		A15-151 / PAA (LabClinics)				500ml		

Nom de la solució:		Medi de congelació		Volum final:		10ml	
pH	Manipulació prèvia:		Conservació:		-20°C, en alíquotes de 1ml		
Solució Mare		Referència / marca		Concentració final		Quantitat (unitats)	
RPMI 1640 + Glutamax - I, 1x		61870-010 / GIBCO (Invitrogen)		70%		7ml	
Foetal Bovine Serum Gold		A15-151 / PAA (LabClinics)		20%		2ml	
DMSO		154938-100ml / Sigma-Aldrich		10%		1ml	

Nom de la solució:		Medi de diferenciació		Volum final:		----	
pH	Manipulació prèvia:		Conservació:				
Solució Mare		Referència / marca		Concentració final		Quantitat (unitats)	
Estoc 2 - PMA 200µM				200nM		1µl	
Medi complet 10% FBS						1ml	
EI MEDI DE DIFERENCIACIÓ conté 1µl de solució de l'estoc 2 per cada 1ml de medi complet, per obtenir una concentració final de 200nM de PMA.							

	
	
Procediment Normalitzat de Treball Metodològic	
Cèl·lules THP-1 (DSMZ)	
PNT-PO0709-URLA-13	Revisió: 00
Data: 24-07-2008	
Pàgina: 4 de 10	

Nom de la solució:		Estoc 1 – PMA 2.5mM		Volum final:		650µl	
pH		Manipulació prèvia:				Conservació:	
						-80°C, en alíquotes de 10µl	
Solució Mare		Referència / marca		Concentració final		Quantitat (unitats)	
PMA		P8139-1MG / Sigma		2.5mM		1mg	
DMSO		154938-100ml / Sigma-Aldrich				650µl	

Nom de la solució:		Estoc 2 – PMA 200µM		Volum final:		125µl	
pH		Manipulació prèvia:				Conservació:	
						-80°C, en alíquotes de 10µl	
Solució Mare		Referència / marca		Concentració final		Quantitat (unitats)	
Estoc 1 – PMA 2.5mM						10µl	
DMSO		154938-100ml / Sigma-Aldrich				115µl	

Material	Capacitat	Tractament Previ	Observacions
puntes micropipeta amb filtre	0.5-10µl	----	Estèrils
puntes micropipeta amb filtre	2-200µl	----	Estèrils
puntes micropipeta amb filtre	100-1000µl	----	Estèrils
Pipetes pasteur estèrils	3.5ml	----	Estèrils
tubs eppendorf	0.5ml	autoclavat	Estèrils
tubs eppendorf	1.5ml	autoclavat	Estèrils
tubs cònics	15ml	----	Estèrils
tubs cònics	30ml	----	Estèrils
tubs cònics	50ml	----	Estèrils
flascons T-75	75cm ²	----	Estèrils
flascons T-25	25cm ²	----	Estèrils
plaques 10cm Ø	57.6cm ²	----	Estèrils
plaques 6 pous	9.6cm ² /pou	----	Estèrils

7. Instrumentació i equips:

Equip	Ubicació	Núm. Inventari	Núm. PNT-EE	Observacions
Cabina de flux laminar vertical – Telstar, CV-100	Laboratori de Cultius	012457	PNT-PO0705-URLA-12	
Cabina de flux laminar vertical de bioseguretat – Telstar, Bio-IIA	Laboratori de Cultius	077139	PNT-PO0705-URLA-02	
Incubador de CO ₂ – Thermo, model 3111	Laboratori de Cultius	----	PNT-PO0705-URLA-05	Indicat per les cèl·lules en creixement
Incubador de CO ₂	Laboratori de	085871	PNT-PO0705-URLA-48	Indicat per

Elaborat per: Iolanda Lázaro López

Aprovat per: Lab-Manager

Aquest document en suport paper es considera document no controlat

 UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI			
Procediment Normalitzat de Treball Metodològic			
Cèl·lules THP-1 (DSMZ)			
PNT-PO0709-URLA-13	Revisió: 00	Data: 24-07-2008	Pàgina: 5 de 10

- Heraeus, HeraCell 150	Cultius			les cèl·lules en diferenciació
Centrífuga Heraeus Multi3L	Laboratori de Cultius	0832557	PNT-PO0705-URLA-36	
Microscopi invertit de contrast de fases - Olympus 1IX71S8F3	Laboratori de Cultius	----	PNT-PO0705-URLA-26	

8. Precaucions

IMPORTANT

La densitat en què es mantenen les cèl·lules SEMPRE ha d'estar compresa en el següent rang: $>1 \cdot 10^5$ cèl/ml i $<1 \cdot 10^6$ cèl/ml. En el rang inferior, cal evitar una dilució excessiva perquè alentiria el creixement. En el rang superior, si s'excedeix es produeix una activació exagerada que provoca una acceleració en la taxa de proliferació cel·lular.

9. Procediment

9.1. Subcultius

Les cèl·lules es fan créixer i es mantenen en suspensió en flascons T-75 a una densitat inicial de 150000 cèl/ml amb medi THP-1 complert al 20% FBS, els dos primers dies després de descongelar. Després d'aquest període, es rebaixarà el percentatge de FBS al 10%.

La taxa de divisió cel·lular normal és de dividir-se cada dos dies. Cal tenir en compte, que la taxa de divisió s'accelera quan se supera una setmana després de la descongelació de l'alíquota. Quan les cèl·lules superen aquest temps, a densitats superiors a 300000 cèl/ml, la taxa de divisió s'accelera i canvia a dividir-se cada dia.

Important: les cèl·lules no poden superar mai la densitat de $1 \cdot 10^6$ cèl/ml. Quan això succeeixi, cal eliminar l'estoc.

Manteniment: deixar les cèl·lules inicialment a 150000 cèl/ml; 2 dies després, cal diluir-les 1:2; i, 2 dies després, cal comptar-les i deixar-les a la densitat inicial de 150000 cèl/ml.

9.2. Diferenciació dels monòcits a macròfags

Centrifugar les cèl·lules que estan en els flascons a 200g, 5min, TA, rotor oscil·lant. Resusprendre els pellets en un volum adequat amb medi THP-1 al 10%, comptar-les i determinar-ne la viabilitat.

Experiment en plaques de 6 pous: calcular $0.5 \cdot 10^6$ cèl/ml, amb un volum de 2ml/pou; o bé, $1 \cdot 10^6$ cèl/pou. Densitat: 104167 cèl/cm^2 .

Experiment en altre tipus de plaques: proporcional a la relació de cm^2 dels pous.

Immediatament abans de posar les cèl·lules a les plaques, cal afegir el PMA ($[\text{I}] = 200 \text{ nM}$) i sembrar en els pous. Temps de diferenciació amb el PMA: 72h. Passat aquest temps, retirar el medi de diferenciació (amb PMA) i posar medi complert fresc al 5% FBS per fer les incubacions.

9.3. Congelació

Medi de congelació. Conté: 70% medi RPMI glutamax, 20% FBS, 10% DMSO.

Procediment. Centrifugar les cèl·lules que estan en els flascons a 200g, 5min, TA, rotor oscil·lant. Resusprendre els pellets en un volum adequat amb medi THP-1 al 10%, comptar-les i determinar-ne la viabilitat.

Quan el nombre de cèl·lules a congelar s'hagi determinat, centrifugar les cèl·lules. Eliminar el sobrenedant i resusprendre el pellet en el volum adequat de medi de congelació (que ha d'estar fred) corresponent a les alíquotes que es vulguin fer. Dispensar 1ml de la suspensió cel·lular en medi de congelació als criotubs (més detalls al PNT de la congelació, PNT-PO0709-URLA-14).



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

Cèl·lules THP-1 (DSMZ)

PNT-PO0709-URLA-13

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 6 de 10

10. Verificació de la tècnica i interpretació de resultats

11. Guia de problemes

Problema	Possible causa	Solució

12. Referències

- Auwerx J. The human leukemia cell line, THP-1: A multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia* 1991;47: 22-30.
- Tsuchiya S, Kobayashi Y, Goto Y, Okumura H, Nakae S, Konno T, Tada K. Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Research* 1982;42:1530-1536. PubMed ID [6949641](#)
- Skubitz KM, Pessano S, Bottero L, Ferrero D, Rovera G, August T. Human granulocyte surface molecules identified by murine monoclonal antibodies. *The Journal of Immunology* 1983; 131:1882-1888.
- Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 1980;26:171-176. PubMed ID [6970727](#)
- Drexler HG, Quentmeier H, MacLeod RA. Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of MLL gene alterations. *Leukemia* 18: 227-232 (2004), PubMed ID [14671638](#)

13. Control de la documentació

14. Annexos

14.1 Incubacions de les cèl·lules THP-1 diferenciades a macròfag

A continuació es presenten productes amb què es realitzen les incubacions dels macròfags THP-1 en els diferents experiments.

14.1.1 DDE

Aldehid: trans,trans-2,4-decadienal (DDE)

180513, technical grade, 85% - ALDRICH; MW=152.23g/mol, d=0.872g/ml.

- solució estoc DDE 250mM = 5.1µl DDE + 94.9µl DMSO = 100µl
- solució de treball DDE 100mM (dilució 1:2.5 a partir de la solució estoc de 250mM):
10µl solució estoc 250mM + 15µl DMSO = 25µl
- medi incubació, **concentració final DDE 10µM**:
1µl solució treball DDE 100mM + 10ml medi THP-1 al 5%

Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

Cèl·lules THP-1 (DSMZ)

PNT-PO0709-URLA-13

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 7 de 10

14.1.2 HEXANAL

Aldehid: hexanal

#115606, technical grade, 98% - ALDRICH; MW=100.16g/mol, d=0.834g/ml.

- solució estoc HEXANAL 1000mM = 12.4µl HEXANAL + 87.6µl DMSO = 100µl
- medi incubació, **concentració final HEXANAL 100µM:**
1µl solució estoc HEXANAL 1000mM + 10ml medi THP-1 al 5%

14.1.3 tBHQ

Control positiu SINTÈTIC de l'activació de Nrf2: tert-butyl hydroquinone (tBHQ)

112941, technical grade, 97% - ALDRICH; MW=166.22g/mol

- solució estoc tBHQ 500mM: 83mg tBHQ + 1000µl DMSO
Es dissol ràpidament; es fan alíquotes de 50µl que es guarden al congelador de -80°C, ja que s'oxida fàcilment.
- medi incubació, **concentració final tBHQ 50µM:**
1µl solució treball tBHQ 500mM + 10ml medi THP-1 al 5%

14.1.4 SFN

Control positiu NATURAL de l'activació de Nrf2: L-sulforaphane (SFN)

S6317-5mg, >95% (GC) líquid - SIGMA; MW=177.29g/mol; solubilitat = >5mg/ml

- preparació de la solució estoc SFN 100mM: afegim directament al tub 282µl DMSO i es deixa en el roller; es fan alíquotes de 10µl que es guarden al -80°C.
- medi incubació, **concentració final SFN 10µM:**
1µl solució treball SFN 100mM + 10ml medi THP-1 al 5%

14.1.5 CYCLOHEXIMIDE

Inhibidor de la biosíntesi de proteïnes (el procés de la traducció).

100mg/ml en DMSO - estabilitat, T=2-8°C

C4859 - SIGMA; MW = 281.4g/mol

Concentració estoc: 100mg/ml

Concentració final incubació: 10µg/ml

La concentració en la que es troba és idònia per fer directament una dilució 1/10000 i tenir una concentració final de 10µg/ml en el medi d'incubació.

Medi d'incubació: 10ml medi THP-1 al 5% + 1µl CHX 100mg/ml

Condicions d'incubació: **PREINCUBACIÓ 1h**

Passat aquest temps, es retira un cert volum de medi en què es troba la CHX, s'afegeix el 1µl de reactiu que correspongui (DMSO/DDE/tBHQ) i el medi es retorna a les cèl·lules per incubar el temps que s'hagi establert.



14.1.6 ACTINOMYCIN D from *Streptomyces sp.*

Inhibidor de la transcripció.

A9415-5mg - SIGMA; MW = 1255.42

Estabilitat:

- en pols: higroscòpic, sensible a la llum; T=2-8°C durant 15 mesos
- en solució: dilucions molt sensibles a la llum; s'absorbeix a plàstic i vidre; cal descartar les dilucions que no es facin servir i no guardar-les després d'un ús. Estables a concentracions altes: mínim 1 mes, a -20°C.

Solubilitat en DMSO: mínim 1mg/ml

Concentració estoc: 50000µg/ml = 50mg/ml

- preparació de la solució estoc Act D 50mg/ml: afegim directament a l'ampolla de vidre 100µl DMSO (*cell culture*); tapem el tub i el segellem amb parafilm, tapem de la llum; i, deixem al roller perquè s'homogeneïtzi.
- fem alíquotes de 10µl i es guarden al congelador de -80°C.

Concentració final incubació: 5µg/ml

Condicions d'incubació: **5µg/ml, PREINCUBACIÓ 1h en medi THP-1 complet al 5%.**

14.1.7 WORTMANNIN

Inhibidor de la via PI-3kinasa: WORTMANNIN from *Penicillium funiculosum*

W1628-1mg, ≥98% - SIGMA; MW = 428,43g/mol.

Estabilitat:

- en pols:
- en solució: -80°C

Solubilitat: 10mg/ml en *ethyl acetate* (23,34mM)

Concentració estoc: 5mM

- preparació de la solució estoc 5mM: 1mg + 458µl DMSO (*cell culture*) afegim directament a l'ampolla de vidre 458µl DMSO (*cell culture*); tapem el tub i el segellem amb parafilm, tapem de la llum; i, deixem al roller perquè s'homogeneïtzi.
- preparació de la solució de treball 1mM: dilució 1:5 a partir de la solució de 5mM 2µl solució estoc 5mM wortmannin + 8µl DMSO (*cell culture*)
- fem alíquotes de 10µl i es guarden al congelador de -80°C

Concentració final incubació: 100nM

Medi d'incubació: 10ml medi THP-1 al 5% + 1µl WORTMANNIN 1mM

Condicions d'incubació: **100nM, PREINCUBACIÓ 1h en medi THP-1 complet al 5%.**



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

Cèl·lules THP-1 (DSMZ)

PNT-PO0709-URLA-13

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 9 de 10

14.1.8 LY 294002

Inhibidor de la via PI-3kinasa.

440202-1mg, $\geq 98\%$ (Calbiochem - VWR)

MW = 307,4g/mol

Inhibidors de la via PI-3 kinasa

Estabilitat: - en pols: -20°C
 - en solució: -20/-80°C, fins a 6 mesos

Solubilitat: 20mg/ml en DMSO (65,1mM)

Concentració estoc: 10mM

- preparació de la solució estoc 10mM: 1mg + 325µl DMSO (*cell culture*)

- fem alíquotes de 10µl i es guarden al congelador de -80°C.

Concentració final incubació: 5µM (1µl LY 294002/2ml medi THP-1 complet al 5%)
 1µM (1µl LY 294002/10ml medi THP-1 complet al 5%)

Condicions d'incubació: **1 ó 5µM, PREINCUBACIÓ 1h en medi THP-1 complet al 5%.**

14.1.9 RAPAMYCIN

Inhibidor de mTOR / PDK2 (responsable de la fosforilació a Ser473 d'Akt)

RAPAMYCIN *InSolution*

553211-500µg, $\geq 98\%$ (Calbiochem - VWR); MW = 914,2g/mol.

Estabilitat: - en pols: -20°C
 - en solució: -20/-80°C, fins a 6 mesos

Solubilitat: 5mM (500µg/109µl) en DMSO.

Concentració estoc: 5mM

- solució estoc 5mM, ja preparada: 500µg Rapamycin + 109µl DMSO

- fem una solució de treball de 1mM: dilució 1:5 a partir de la solució de 5mM
 2µl solució estoc 5mM RAPAMYCIN + 8µl DMSO (*cell culture*)

- fem alíquotes de 10µl i es guarden al congelador de -80°C.

Concentració final incubació: 100Nm

Condicions d'incubació: **100nM, PREINCUBACIÓ 1h en medi THP-1 complet al 5%.**

Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

Cèl·lules THP-1 (DSMZ)

PNT-PO0709-URLA-13

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 10 de 10

14.1.10 GW9662

Antagonista de PPAR γ

M6191-5mg, >98% - SIGMA; MW = 276.67g/mol

Estabilitat: - en pols: T=2-8°C

- en solució: -80°C

Solubilitat: 26mg/ml en DMSO (94mM); insoluble en H₂O

Concentració estoc: 100mM

- preparació de la solució estoc 100mM: 5mg + 178 μ l DMSO (*cell culture*)
afegim directament a l'ampolla de vidre 178 μ l DMSO (*cell culture*); tapem el tub i el
segellem amb parafilm, tapem de la llum; i, deixem al roller perquè s'homogeneïtzi.

- fem alíquotes de 10 μ l i es guarden al congelador de -80°C.

Concentració final incubació: 10 μ M

Medi d'incubació: 10ml medi THP-1 al 5% + 1 μ l GW9662 100mM

Condicions d'incubació: **10 μ M, PREINCUBACIÓ 1h en medi THP-1 complet al 5%.**

14.1.11 PARTHENOLIDE

Inhibidor de NF- κ B

P0667-5mg, \geq 90% - SIGMA; MW = 248.32g/mol.

Estabilitat: - en pols: T=2-8°C

- en solució: -80°C

Concentració estoc: 100mM

- preparació de la solució estoc 100mM: 5mg + 181,2 μ l DMSO (*cell culture*)
afegim directament a l'ampolla de vidre 181,2 μ l DMSO (*cell culture*); tapem el tub i el
segellem amb parafilm, tapem de la llum; i, deixem al roller perquè s'homogeneïtzi.

- fem alíquotes de 10 μ l i es guarden al congelador de -80°C.

Concentració final incubació: 10 μ M

Medi d'incubació: 10ml medi THP-1 al 5% + 1 μ l PARTHENOLIDE 100mM

Condicions d'incubació: **10 μ M, PREINCUBACIÓ 1h en medi THP-1 complet al 5%.**



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

CellTiter-Glo Luminiscent Cell Viability Assay

PNT-PO0709-URLA-37

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 1 de 4

1. Fonament i objectiu

El *CellTiter-Glo Luminiscent Cell Viability Assay* (Promega) és un mètode homogeni per la determinació del nombre de cèl·lules viables en cultiu.

Fonament. Es basa en la quantificació de la presència d'ATP, que és un indicador de cèl·lules metabòlicament actives. La quantitat d'ATP és directament proporcional al nombre de cèl·lules presents en el cultiu. L'assaig es fonamenta en les propietats d'una luciferasa termoestable que genera una senyal luminiscent estable.

La reacció de la luciferasa en l'assaig és la següent:



Objectiu. Determinar les cèl·lules metabòlicament actives en un cultiu cel·lular.

2. Espècimen

Cèl·lules en cultiu.

3. Documentació relacionada

Protocol en format .pdf proporcionat per Promega.

4. Definicions

5. Historial de revisions

Modificacions efectuades	No de Revisió	Data
Iolanda Lázaro López	01	30/04/2010

6. Solucions, reactius i materials

Nom de la solució:	CellTiter-Glo Substrate	Volum final:	(liofilitzat)
pH		Manipulació prèvia:	
		Conservació:	-20°C
Reactiu	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)

Nom de la solució:	CellTiter-Glo Buffer	Volum final:	10ml
pH		Manipulació prèvia:	
		Conservació:	-20°C
Reactiu	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)

Elaborat per: Iolanda Lázaro López

Aprovat per: Lab-Manager i Responsable de qualitat

Aquest document en suport paper es considera document no controlat

 UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI			
Procèdiment Normalitzat de Treball Metodològic			
CellTiter-Glo Luminiscent Cell Viability Assay			
PNT-PO0709-URLA-37	Revisió: 00	Data: 24-07-2008	Pàgina: 2 de 4

Nom de la solució mare:	CellTiter-Glo Reagent	Volum final:	10ml
pH	Manipulació prèvia:	Conservació:	4°C durant 48h després de la reconstitució (pèrdua del 5% activitat) 4°C durant 4 dies després de la reconstitució (pèrdua del 20% activitat)
Solució Mare	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)
CellTiter-Glo Substrate			liofilitzat
CellTiter-Glo Buffer			10ml
Es resuspèn el liofilitzat amb els 10ml de buffer i s'homogeneïtza molt bé en un roller.			

Material	Capacitat	Tractament Previ	Observacions
placa de 96 pous per luminiscència (blanca i opaca)	---	---	---
pipetes pasteur	3.5ml	---	---
puntes micropipeta amb filtre	2-200µl	---	(estèrils)
puntes micropipeta multicanal	50-350µl	---	No és necessari autoclavat

7. Instrumentació i equips:

Equip	Ubicació	Núm. Inventari	Núm. PNT-EE	Observacions
Lector de luminiscència SYNERGY	CRB	---	---	Ens el deixen fer servir cada vegada que el necessitem.
Micropipeta multicanal (LabSystems)	Laboratori 1/2	----	PNT-PO0705-URLA-93	
Agitador roller (Beckman-Coulter)	Laboratori 2	012416	PNT-PO0705-URLA-19	
Micropipeta 2-200µl (Eppendorf)	Laboratori 1/2	----	PNT-PO0705-URLA-25	

8. Precaucions

Consideracions prèvies. En les determinacions habituals, el protocol indica la realització de duplicats en el disseny experimental per obtenir una dada més fiable. Però, en aquest tipus de determinacions és convenient realitzar un nombre de repeticions superior (per exemple, 6 repeticions per mostra).

9. Procèdiment

9.1. Cèl·lules en cultiu

Preparem les cèl·lules sembrant-les en plaques de 96 pous i incubant-les segons el protocol de cada experiment.

Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

CellTiter-Glo Luminiscent Cell Viability Assay

PNT-PO0709-URLA-37

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 3 de 4

Macròfags THP-1:

- Cèl·lules per pou de placa de 96 pous: 33333cèl
- Total de cèl·lules per placa de 96 pous: $3,2 \cdot 10^6$ cèl
- Volum de medi per pou: 67µl (durant la diferenciació)
50µl (durant les incubacions)

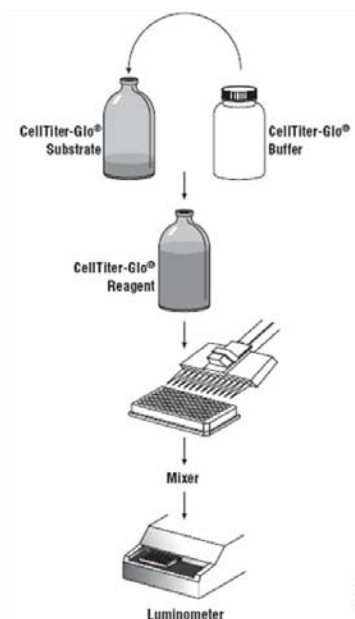
9.2. Preparació dels reactius

- 9.2.1. Descongelar el CellTiter-Glo Buffer i deixar atemperar abans d'utilitzar.
- 9.2.2. Atemporar el liofilitzat de CellTiter-Glo Substrate.
- 9.2.3. Transferir el volum de CellTiter-Glo Buffer al tub de CellTiter-Glo Substrate per reconstituir la mescla d'enzim i substrat liofilitzat. D'aquesta manera es forma el CellTiter-Glo Reagent.
- 9.2.4. Homogeneïtzar en un roller durant uns minuts per assegurar la total dissolució del liofilitzat.

9.3. Assaig de viabilitat cel·lular

- 9.3.1. Treure la placa de cèl·lules en cultiu de l'incubador i equilibrar-la a temperatura ambient durant 30 minuts.
- 9.3.2. Afegir el CellTiter-Glo Reagent: s'ha d'afegir un volum de reactiu equivalent al volum de medi de cultiu al pou amb les cèl·lules.
- 9.3.3. Posar la placa en un agitador orbital durant 2 minuts per induir la lisi cel·lular.
- 9.3.4. Equilibrar la placa a temperatura ambient durant 10 minuts perquè s'estabilitzi la senyal luminiscent.
- 9.3.5. Transferir els contingut dels pous de la placa de 96 de cultius a una placa de 96 blanca opaca (adient per la lectura de luminiscència).
- 9.3.6. Lectura de la senyal luminiscent en el lector de luminiscència SYNERGY.

Esquema del procediment:





Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

CellTiter-Glo Luminiscent Cell Viability Assay

PNT-PO0709-URLA-37

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 4 de 4

10. Verificació de la tècnica i interpretació de resultats

Càlculs:

La lectura de les mostres ens proporciona un valor corresponent a l'emissió quimioluminiscent donada per cada mostra. Aquest valor de quimioluminiscència és proporcional a la quantitat d'ATP de les cèl·lules; per tant, al grau de viabilitat metabòlica cel·lular.

Per valorar quantitativament, cal obtenir el valor mitjà de les repeticions de cada mostra. Per facilitar la visualització, és convenient representar gràficament els valors mitjans de cada condició.

Per avaluar si una condició és o no citotòxica per la cèl·lula, compararem estadísticament amb un test no paramètric el valor obtingut per cada mostra vers el valor de la mostra de referència.

11. Guia de problemes

Problema	Possible causa	Solució

12. Referències

13. Control de la documentació

14. Annexos



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

Extracció RNA 6100

PNT-PO0709-URLA-29

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 1 de 4

1. Fonament i objectiu

Fonament. ABI PRISM™ 6100 Nucleic Acid PrepStation és un sistema dissenyat per l'aïllament i la purificació d'àcids nucleics (RNA total, DNA genòmic i mRNA) a partir de diverses mostres biològiques (cèl·lules en cultiu, teixits, cèl·lules aïllades de teixit, sang total). L'aplicació pel qual es fa servir al nostre laboratori és per l'extracció de RNA. Consisteix en fer passar la mostra a través d'una columna que conté un filtre. En aquest filtre queda retengut el RNA. La columna està integrada en un sistema de buit que facilita els rentats i la purificació de l'àcid nucleic, i la seva recuperació, donant lloc a un rendiment elevat en l'extracció de l'àcid nucleic.

Objectiu. Obtenció de RNA total a partir d'una mostra biològica amb un elevat rendiment i un grau alt de purificació (evitant al màxim la contaminació creuada entre àcids nucleics).

2. Espècimen

Mostres biològiques: teixits, cèl·lules en cultiu adherides o en suspensió, cèl·lules aïllades de teixit, sang total.

3. Documentació relacionada

4. Definicions

5. Historial de revisions

Modificacions efectuades	No de Revisió	Data
Iolanda Lázaro López	01	30/04/2010

6. Solucions, reactius i materials

Nom de la solució:	Lysis buffer 1x	Volum final:	---		
pH	---	Manipulació prèvia:	Dilució 1:2	Conservació:	T ambient
Reactiu	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)		
Lysis buffer 2x	4305895 / Applied Biosystems	1x	La meitat del volum total del <i>lysis buffer</i> .		
D-Phosphate Buffered Saline (D-PBS) (1x) w/o Ca ²⁺ and Mg ²⁺	14190-169/GIBCO		La meitat del volum total de <i>lysis buffer</i> .		

Nom de la solució:	Solució de rentat I	Volum final:	---		
pH	---	Manipulació prèvia:	---	Conservació:	T ambient
Reactiu	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)		
Solució de rentat I	4305891 / Applied Biosystems				



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

Extracció RNA 6100

PNT-PO0709-URLA-29

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 2 de 4

Nom de la solució:	Solució de rentat II		Volum final:	---
pH	---	Manipulació prèvia:	---	Conservació: T ambient
Reactiu	Referència / marca		Concentració final	Quantitat (unitats)
Solució de rentat II	4305890 / Applied Biosystems			

Nom de la solució:	Solució d'elució		Volum final:	---
pH	---	Manipulació prèvia:	----	Conservació: T ambient
Reactiu	Referència / marca		Concentració final	Quantitat (unitats)
Solució d'elució	4305893 / Applied Biosystems			

Material	Capacitat	Tractament Previ	Observacions
Tubs	200µl	Lliures Rnases	---
Tubs	1,5-2ml	Lliures Rnases	---
Puntes micropipeta	100-1000µl	Lliures Rnases	Amb filtre
Tisores	---	Esterilitzar 180°C- 5h	---
Pinces	---	Esterilitzar 180°C- 5h	---
Paper d'alumini	---	Esterilitzar 180°C- 5h	---
Splash guard - Applied Biosystems (ref. 4311758)	---	---	---
Total RNA purification tray - Applied Biosystems (ref. 4305673)	---	---	---
96-well optical reaction plate - Applied Biosystems (ref. 4306737)	---	---	---

7. Instrumentació i equips:

Equip	Ubicació	Núm. Inventari	Núm. PNT-EE	Observacions
Extractor d'àcids nucleics 6100 (Applied Biosystems)	Laboratori 1	---	PNT-PO0705-URLA-64	
Micropipetes (Eppendorf)	Laboratori 1	---	PNT-PO0705-URLA-25	
Balança analítica (AND)	Laboratori 2	012415	PNT-PO0705-URLA-76	
Homogeneïtzador (Heidolph)	Laboratori Nutrició	---	PNT-PO0705-URLA-69	
Centrífuga Multifuge 3L-R (Heraeus)	Laboratori 1	---	PNT-PO0705-URLA-37	

8. Precaucions



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

Extracció RNA 6100

PNT-PO0709-URLA-29

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 3 de 4

9. Procediment

9.1. Extracció de RNA a partir de TEIXIT

- 9.1.1. Agafar els tubs de 2ml lliures de RNases necessaris i afegir-hi 650µL de solució de lisi 1x (veure Annex 1) i posar-los en una gradeta en gel.
- 9.1.2. Treure les mostres de teixit del congelador i posar-les en una gradeta amb gel.
- 9.1.3. Pesar la quantitat de teixit necessària (veure Taula I), i posar la mostra ràpidament dins la solució de lisi 1x i clavar en gel.
- 9.1.4. Homogeneïtzar la mostra durant 35 seg. a màxima velocitat (veure Annex 2) i tornar-la a posar en gel.
- 9.1.5. Centrifugar les mostres: 1000rpm, 3min.
- 9.1.6. Engregar l'aparell l'extractor d'àcid nucleics, posar les plaques al seu lloc (veure PNT funcionament 6100 Nucleic Acid PrepStation, PNT-PO0705-URLA-64), i afegir a les columnes que s'hagin d'utilitzar 40µl de solució de rentat I, per hidratar-les.
- 9.1.7. Afegir 200µl de mostra a les columnes i apretar *start*.
- 9.1.8. Afegir 500µl de solució de rentat I i apretar el botó *start*.
- 9.1.9. Afegir 400µl de solució de rentat II i apretar el botó *start*.
- 9.1.10. Dispensar 300µl més de solució de rentat II i apretar el botó *start*.
- 9.1.11. Dispensar 300µl més de solució de rentat II i apretar el botó *start*.
- 9.1.12. Apretar el botó *start*.
- 9.1.13. Fer un *touch off*.
- 9.1.14. Posar la 96-well *optical reaction plate* en la posició *collection*.
- 9.1.15. Moure el rack a la posició *collection*.
- 9.1.16. Afegir-hi 150µl de la solució d'elució i apretar el botó *start*.
- 9.1.17. Fer un *touch off*.
- 9.1.18. Transferir les mostres de RNA a un tub lliure de RNases.
- 9.1.19. Determinar la concentració del RNA extret (veure PNT determinació de la concentració de RNA amb el Qubit, PNT-PO0705-URLA-31).
- 9.1.20. Congelar a -80°C.

9.2. Lisi i extracció de RNA a partir de cèl·lules

9.2.1. LISI - Cèl·lules en SUSPENSÍO

- 9.2.1.1. Si el medi en que estan les cèl·lules, no conté ni calci ni magnesi, llavors es pot afegir directament el mateix volum en què estan les cèl·lules de solució de lisi 2x.
- 9.2.1.2. En cas contrari, caldrà eliminar el medi perquè la presència dels ions Mg^{2+} i Ca^{2+} pot interferir en l'extracció. Centrifugar les cèl·lules en cultiu: <1000rpm, 5-10min, velocitat de fre 1.
- 9.2.1.3. Descartar el sobrenedant.
- 9.2.1.4. Afegir 250µl de solució de lisi 1x al pellet i homogeneïtzar amb la pipeta.
- 9.2.1.5. Deixar a 4°C durant 1 hora.

9.2.2. LISI - Cèl·lules ADHERIDES

- 9.2.2.1. Si el medi de cultiu és lliure de Ca^{2+} i Mg^{2+} , es pot afegir directament al pou el mateix volum de solució de lisi 2x que de medi de cultiu.
- 9.2.2.2. En cas contrari, aspirar el medi de cultiu de tots els pous vigilant no tocar les cèl·lules. I, afegir, el volum de solució de lisi 1x. El volum utilitzat està en funció del tipus cel·lular. Homogeneïtzar amb la pipeta.
- 9.2.2.3. Per lisar amb la pipeta, cal aspirar i deixar anar el volum del pou 10 vegades procurant no fer molta escuma.
- 9.2.2.4. Deixar a 4°C durant 1 hora.

(* En aquest punt, hi ha dues opcions: 1) continuar l'extracció, o 2) congelar a -20°C, per continuar el procés un altre dia.

Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

Extracció RNA 6100

PNT-PO0709-URLA-29

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 4 de 4

9.2.3. Extracció de RNA – Cèl·lules en suspensió o adherides

- 9.2.3.1. Seleccionar en l'aparell el programa d'extracció de RNA de cèl·lules.
- 9.2.3.2. Situar la *total RNA purification tray* a la posició de *waste*.
- 9.2.3.3. Mullar els pous que s'hagin d'utilitzar amb 40µl de la solució de rentat I.
- 9.2.3.4. Afegir la mostra, el volum variarà en funció del tipus cel·lular (10-650µl) i premer el botó *start*.
És important controlar que les mostres s'absorbeixin completament a la columna. Això es determinarà observant que no quedi volum al pou. Si no passés completament la mostra, es pot repetir l'operació del pas 9.2.3.4. Aquest pas és crucial perquè d'ell en depèn el rendiment de l'extracció: menys mostra absorbida, menys quantitat de RNA total extret.
- 9.2.3.5. Afegir 500µl de la solució de rentat I i apretar *start*.
- 9.2.3.6. Afegir 400µl de la solució de rentat II i premer *start*.
- 9.2.3.7. Afegir 400µl de la solució de rentat II i tornar a apretar *start*.
- 9.2.3.8. Afegir 300µl de la solució de rentat II i apretar *start*.
- 9.2.3.9. Apretar *start* per assecar el pou.
- 9.2.3.10. Fer un *touch off*.
- 9.2.3.11. Canviar de posició la *total RNA purification tray* i situar-la a *collection*.
- 9.2.3.12. Afegir 150µl de la solució d'elució i apretar *start*.
- 9.2.3.13. Fer un *touch off*.
- 9.2.3.14. La mostra queda en la placa de 96, llavors es transfereix a un tub de 200µl lliure de RNases.
- 9.2.3.15. Determinar la concentració del RNA extret (veure PNT determinació de la concentració de RNA amb el Qubit, PNT-PO0705-URLA-31).
- 9.2.3.16. Congelar a -80°C.

10. Verificació de la tècnica i interpretació de resultats

11. Guia de problemes

Problema	Possible causa	Solució
Obstrucció d'una columna	Excés en la quantitat de RNA	Posar menys quantitat d'homogeneïtzat
	Homogeneïtzat massa brut	Centrifugar a 1000rpm durant 3'

12. Referències

13. Control de la documentació

14. Annexos

14.1. Esterilització pinces i tisores

Les pinces, tisores i els trossets de paper d'alumini s'han de posar embolicats amb paper d'alumini a una estufa a 150°C durant 4h, ja que d'aquesta manera eliminem les RNases.

14.2. Homogeneïtzació

Les mostres per homogeneïtzar han d'estar dins el tub amb la solució de lisi. El braç de l'homogeneïtzador s'ha d'haver netejat amb *RNase Zap* (Am9780 – Ambion, AB) per eliminar les RNases. Posar el braç de l'homogeneïtzador fins al fons del tub i engagar-lo (veure instruccions en el manual de l'aparell i el corresponent PNT, PNT-PO0705-URLA-69): velocitat màxima durant 35 segons. Rentar el braç amb lleixiu, aigua destil·lada, etanol i aigua destil·lada cada vegada que es canviï de mostra.

14.3. Especificacions per la lisi cel·lular i l'extracció de RNA en macròfags THP-1

- tipus de plaques: multiplaques de 6 pous
- número de cèl·lules per pou: $1 \cdot 10^6$ cèls.
- volum de solució de lisi 1x: 400µl/pou
- volum de lisat cel·lular per l'extracció en el 6100: 300µl/columna



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic
Transcripció inversa (RT)

PNT-PO0709-URLA-33

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 1 de 4

1. Fonament i objectiu

Fonament. La transcripció inversa constitueix el primer pas de la RT-rtPCR. En aquest pas, el RNA es transcriu inversament a cDNA mitjançant l'enzim transcriptasa inversa (*reverse transcriptase* o *RNA-dependent DNA polymerase*). Aquest enzim va ser descobert simultàniament l'any 1970 per H. Temin i D. Baltimore. Es tracta d'una DNA polimerasa que transcriu RNA de cadena simple a DNA de doble cadena. Aquest pas és vital per la posterior PCR perquè la DNA polimerasa només funciona sobre DNA templates.

Objectiu. Obtenició del cDNA partir d'una mostra de RNA.

2. Espècimen

Mostres de RNA (procedents de teixits, cèl·lules en cultiu adherides o en suspensió, cèl·lules aïllades de teixit, sang total).

3. Documentació relacionada

4. Definicions

5. Historial de revisions

Modificacions efectuades	No de Revisió	Data
Iolanda Lázaro López	01	30/04/2010

6. Solucions, reactius i materials

Nom de la solució mare:	SuperScript® II Reverse Transcriptase	Volum final:	---		
pH	---	Manipulació prèvia:		Conservació:	-20°C
Solució Mare	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)		
SuperScript® II Reverse Transcriptase (200U/µl)	18064-071/Invitrogen	5U/µl	---		
Nom de la solució mare:	RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor	Volum final:	---		
pH	---	Manipulació prèvia:	---	Conservació:	-20°C
Solució Mare	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)		
RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40U/µl)	10777-019/Invitrogen	1U/µl	---		
Nom de la solució mare:	Random hexamers	Volum final:	---		
pH	---	Manipulació prèvia:	---	Conservació:	-20° C
Solució Mare	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)		
Random Hexamers 50µM	N8080127/Invitrogen	2.5µM	---		
Nom de la solució mare:	Mg	Volum final:			
pH	---	Manipulació prèvia:	---	Conservació:	-20° C
Solució Mare	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)		
1M MgCl ₂ (60mM -100ml)	AM9530G/Ambion	2-5mM	---		



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic
Transcripció inversa (RT)

PNT-PO0709-URLA-33

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 2 de 4

Nom de la solució mare:	DTT	Volum final:	---
pH	---	Manipulació prèvia:	---
		Conservació:	-20° C
Solució Mare	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)
100mM DTT	Inclòs al kit de la SuperScript II Reverse Transcriptase (ref. 18064-071) / Invitrogen	5mM	---

Nom de la solució mare:	Buffer	Volum final:	---
pH	---	Manipulació prèvia:	S'han de barrejar
		Conservació:	-20°C
Solució Mare	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)
5X first-strand buffer [250mM Tris-HCl (pH 8.3), 375mM KCl, 15mM MgCl ₂]	Inclòs al kit de la SuperScript II Reverse Transcriptase (ref. 18064-071) / Invitrogen	1x	---

Nom de la solució mare:	dNTPs	Volum final:	---
pH	---	Manipulació prèvia:	S'han de barrejar
		Conservació:	-20°C
Solució Mare	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)
100mM dNTPs Set (4x25µmol)	10297-018/Invitrogen	500µM	---

Material	Capacitat	Tractament Previ	Observacions
Tubs	0,2 ml	Lliures de RNases	guardats en un pot marcat com RT
Puntes micropipeta amb filtre	0.5-10µl	Lliures de RNases	---
Puntes micropipeta amb filtre	2-200µl	Lliures de RNases	---
Puntes micropipeta amb filtre	100-200µl	Lliures de RNases	---

7. Instrumentació i equips:

Equip	Ubicació	Núm. Inventari	Núm. PNT-EE	Observacions
Cabina RNA (Cruma)	Laboratori 1	003533	PNT-PO0705-URLA-66	
Micropipeta 0.5-10µl (Eppendorf)	Cabina RNA	----	PNT-PO0705-URLA-25	
Micropipeta 10-100µl (Eppendorf)	Cabina RNA	----	PNT-PO0705-URLA-25	
Micropipeta 100-1000µl (Eppendorf)	Cabina RNA	----	PNT-PO0705-URLA-25	
Centrífuga multifuge 3L-R (Heraeus)	Laboratori 1	----	PNT-PO0705-URLA-37	
Picofuge (STRATAGENE)	Laboratori 1	----	PNT-PO0705-URLA-70	
Termociclador 2400 (AB)	Laboratori 2	038481	PNT-PO0705-URLA-31	
Termociclador 2720 (AB)	Laboratori 2	----	PNT-PO0705-URLA-111	

Elaborat per: Roser Rosales

Aprovat per: Lab-Manager i Responsable de qualitat

Aquest document en suport paper es considera document no controlat



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

Transcripció inversa (RT)

PNT-PO0709-URLA-33

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 3 de 4

8. Precaucions

- 1) Cal tenir en compte que les mostres de RNA han d'estar en fred perquè aquest és molt làbil i es degrada amb molta facilitat.
- 2) La reacció s'ha de fer en gel o sobre un rack de fred, ja que la SuperScript es pot degradar. Ambdós enzims (SuperScript i RNasa out) han d'estar fora del congelador el mínim temps possible.
- 3) S'han de homogeneïtzar molt bé les mostres.
- 4) Important, dispensar el mateix volum de mix a cada tub.
- 5) Treballar amb guants per evitar les RNases.

9. Procediment

- 9.1. Determinar la quantitat de cDNA necessari sintetitzar.
El volum de cDNA variarà en funció del número de reaccions de *real time* PCR s'hagin de fer per cada mostra.

Exemple: Valoració d'un gen d'interès + gen control endogen.

Es necessita: 1µl per reacció per mostra, i per cada mostra es fan triplicats (per tant, 3 reaccions).

Considerant els dos gens (el gen d'interès + el gel de control endogen):
són 6 reaccions, 6 reaccions x 1µl/reacció = 6 µl de reacció de RT.

El volum mínim dels termocicladors de què disposem és de 10µl; per tant, aquest és el volum que farem servir. També, cal considerar un volum suficient per possibles pèrdues per evaporació i error en el pipeteig.

- 9.2. Càlcul dels volums. Utilitzem un full excel per calcular el volum de cada reactiu segons el número de mostres que tinguem i el volum de cDNA que necessitem (*veure el full excel inclòs*).
- 9.3. En primer lloc, treiem els reactius del congelador (excepte la SuperScript i la RNasa out, que ho farem just en el moment de posar-los al mix); els deixem descongelar, els homogeneïtzem bé, els fem un pols i els posem en gel.
- 9.4. Seguidament, dispensem l'aigua lliure de RNases que necessiti cada tub.
- 9.5. En un tub a part fem el mix dels reactius i després dispensem la quantitat necessària per a cada mostra.
- 9.6. Finalment, afegim el volum necessari de cada mostra per posar 0,5 µg.
- 9.7. Fem un pols perquè baixi tot.
- 9.8. Posem els tubs al termociclador. El programa està indicat a la fulla excel.
- 9.9. Quan s'hagi acabat el programa, s'agafen els tubs, es fa un pols i es guarden a -20°C. Les mostres estan preparades per continuar amb la *real time* PCR.



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic
Transcripció inversa (RT)

PNT-PO0709-URLA-33

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 4 de 4

RT feta amb el kit d'Invitrogen

Reactius	Concentració	Concent. Final	Vf = x ul	Vol segons nº mostres
5 X Buffer		X 1 *	7	21
DTT	0,1M		1,75	5,25
dNTPs (Mix)	25 mM	500 uM	0,7	2,1
Random Hexamers	50 uM	2,5 uM	1,75	5,25
RNase Out	40 U/ul	1U/ul	0,875	2,625
Mg	60 mM	2 mM (*) - 5 mM	1,17	3,51
SuperScript II	200 U/ul	5U/ul	0,875	2,625
			14,12	42,36
Volum que s'hi pot afegir (RNA+H2O) en ul			20,88	

ul de la reacció: 35

Número de mostres 2 3

* el 5 X Buffer té una [Mg⁺⁺] de 15 mM dóna una [Mg⁺⁺] final de 3 mM que junt amb el que nosaltres afegim de [Mg⁺⁺] final és de 5 mM

De RNA s'hi afegeix 0,5 ug

Programa RT: 10 min. → 25°C
50 min. → 42°C
5 min. → 95°C

mg : 0,5

MOSTRA	CONCENTRACIÓ	QUANTITAT RNA (ul)	QUANTITAT AIGUA ul
34	25	20,00	0,88
35	1010,4	0,49	20,39

10. Verificació de la tècnica i interpretació de resultats

11. Guia de problemes

12. Referències

13. Control de la documentació

14. Annexos

- 14.1. Valoració de l'expressió gènica de FABP4 en macròfags THP-1
Cal tenir en compte que en els experiments en què es valori l'expressió gènica de FABP4 en els macròfags THP-1, el volum òptim de reacció per la RT ha de ser de: 10µl. Si se supera aquest volum, es dilueix en excés i, donada la relativament baixa expressió de FABP4 en aquest tipus cel·lular, es retarden els cicles de la PCR a temps real.

Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

PCR a temps real

PNT-PO0709-URLA-30

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

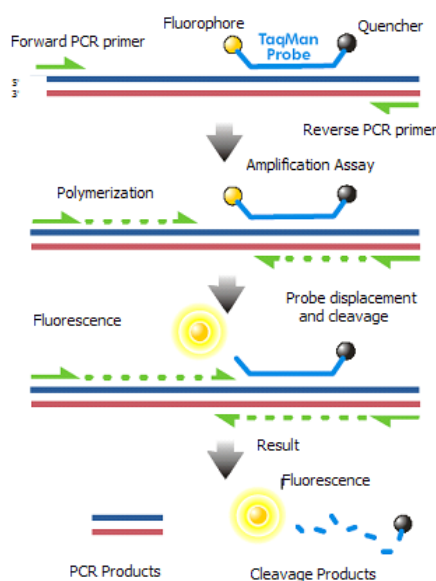
Pàgina: 1 de 4

1. Fonament i objectiu

Fonament. La *real-time PCR* utilitza un parell de *primers* complementaris a una seqüència definida en cada una de les dues cadenes del cDNA obtingut a partir de la transcripció inversa. La doble cadena de cDNA és desnaturalitzada i se separen les cadenes, d'aquesta manera es permet la unió de cada *primer* a la respectiva seqüència complementària. La DNA polimerasa extén els *primers* i es produeix una còpia de cada cadena en cada cicle, donant lloc a una amplificació exponencial.

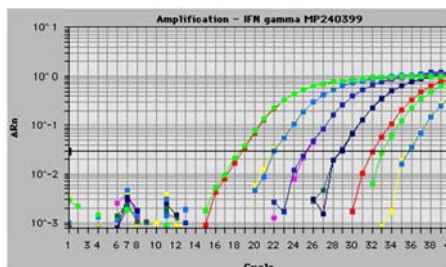
La *real-time PCR* permet la visualització a temps real del procés d'amplificació a través d'una molècula *reporter* fluorescent. Existeixen diverses possibilitats, en el nostre cas utilitzem la metodologia TaqMan.

Esquema de la metodologia TaqMan:



El termociclador de la *real-time PCR* té un llindar de detecció de fluorescència, per sota del qual no pot discriminar entre l'amplificació produïda i el soroll de fons. D'altra banda, la senyal de fluorescència augmenta a mesura que es produeix l'amplificació i l'instrument adquireix dades durant el pas d'*annealing* de cada cicle. El nombre d'amplicons assoliran la detecció el límit de detecció després d'un determinat cicle, que estarà en funció de la concentració inicial de la seqüència diana de DNA. Aquest cicle s'anomena *threshold cycle* (Ct). Com més alta és la concentració inicial de DNA diana, més baix és el valor del Ct.

Imatge de la monitorització a temps real de l'amplificació per la PCR:



Objectiu. Determinar l'expressió d'un determinat gen.

2. Espècimen

Mostres de cDNA obtingudes a partir de la transcripció inversa (RT) (veure PNT-PO0709-URLA-33).

3. Documentació relacionada



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

PCR a temps real

PNT-PO0709-URLA-30

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 2 de 4

4. Definicions

5. Historial de revisions

Modificacions efectuades	No de Revisió	Data
Iolanda Lázaro López	01	30/04/2010

6. Solucions, reactius i materials

Nom de la solució mare:	TaqMan MasterMix	Volum final:	---
pH	---	Manipulació prèvia:	---
		Conservació:	-20° C
Solució Mare	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)
TaqMan MasterMix	4366072/Applied Biosystems	---	---

Nom de la solució mare:	Nuclease-free water (not DEPC-treated)	Volum final:	---
pH	---	Manipulació prèvia:	---
		Conservació:	---
Solució Mare	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)
Nuclease-free water (not DEPC-treated)	AM9937/Ambion	---	---

Nom de la solució mare:	Assay-on-demand (gen d'interès)	Volum final:	---
pH	---	Manipulació prèvia:	---
		Conservació:	-20° C
Solució Mare	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)
Assay-on-demand (gen d'interès)	Applied Biosystems	---	---

Material	Capacitat	Tractament Previ	Observacions
Tubs	1.5ml	Lliures de RNases	Per fer el mix
Puntes micropipeta amb filtre	0.5-10µl	Lliures de RNases	---
Puntes micropipeta amb filtre	2-200µl	Lliures de RNases	---
Puntes micropipeta amb filtre	100-200µl	Lliures de RNases	---
MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 ml – Applied Biosystems ref. 4346906	---	---	---
MicroAmp® Optical Adhesive Film – Applied Biosystems ref. 4311971	---	---	---

7. Instrumentació i equips:

Equip	Ubicació	Núm. Inventari	Núm. PNT-EE	Observacions
7900HT Fast Real-Time PCR System	SRCiT	---	---	---
Centrífuga per plaques	SRCiT	---	---	---
Centrífuga per tubs	SRCiT	---	---	---
Pipeta electrònica 5-100µl (Eppendorf)	Laboratori 1	055020	PNT-PO0705-URLA-58	---

8. Precaucions

La placa s'ha de muntar damunt el taulell sense gel, ja que els pous mullats (per fora) podrien fer malbé el bloc de temperatura del 7900.

9. Procediment

9.1. Preparació de la placa

- 9.1.1. Dissenyar la placa, ja que facilita el procés de muntatge.
 Cal recordar que sempre s'hi ha de posar com a mínim un control endogen. Exemple: en aquest cas el control endogen és el 18s.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC	01 18s	01 18s	01 18s	02 18s	02 18s	02 18s	03 18s	03 18s	03 18s		
B	NTC	01 MMP1	01 MMP1	01 MMP1	02 MMP1	02 MMP1	02 MMP1	03 MMP1	03 MMP1	03 MMP1		
C	NTC	01 MMP2	01 MMP2	01 MMP2	02 MMP2	02 MMP2	02 MMP2	03 MMP2	03 MMP2	03 MMP2		
D	NTC	01 MMP3	01 MMP3	01 MMP3	02 MMP3	02 MMP3	02 MMP3	03 MMP3	03 MMP3	03 MMP3		
E	NTC	01 Fbln1	01 Fbln1	01 Fbln1	02 Fbln1	02 Fbln1	02 Fbln1	03 Fbln1	03 Fbln1	03 Fbln1		
F	NTC	01 Fbln2	01 Fbln2	01 Fbln2	02 Fbln2	02 Fbln2	02 Fbln2	03 Fbln2	03 Fbln2	03 Fbln2		
G	NTC	01 Fbln4	01 Fbln4	01 Fbln4	02 Fbln4	02 Fbln4	02 Fbln4	03 Fbln4	03 Fbln4	03 Fbln4		
H	NTC	01 Fbln5	01 Fbln5	01 Fbln5	02 Fbln5	02 Fbln5	02 Fbln5	03 Fbln5	03 Fbln5	03 Fbln5		

- 9.1.2. Fer un mix per cada gen del qual s'hagi de valorar l'expressió. Cal tenir en compte que per cada mostra s'han de fer triplicats i, a més, s'ha d'incloure un control negatiu (NTC) per comprovar que no hi ha cap reactiu caducat. Per tant, si tenim 12 mostres, el càlcul que hem de fer s'exemplifica a la següent taula:

PCR tr fet amb el kit d'applied Biosystems

Reactius	Volum ul	Vol segons n° mostres
TaqMan Buffer	5	195
AOD (primer)	0,5	19,5
H2O lliure de Rnases	3,5	136,5
	9	351
Número de mostres	12	39

Programa de la PCRtr:

10 min. —→	95°C	}	40 Cicles
15 seg. —→	95°C		
1 min. —→	60°C		

- 9.1.3. Quan s'hagi fet el mix de cada gen, homogeneïtzar-lo i fer un pols.



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

PCR a temps real

PNT-PO0709-URLA-30

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 4 de 4

- 9.1.4. Dispensar 9µl del mix de cada gen als pous en què es correspongui segons el disseny de la placa realitzat prèviament.
- 9.1.5. Dispensar a cada pou 1µl de cDNA de cada mostra (seguint el disseny de la placa).
- 9.1.6. Dispensar 1µl d'aigua lliure de nucleases en els pous control. En els pous dels controls posar la mateixa quantitat que de mostra.
- 9.1.7. Tapar amb un *adhesive cover* amb l'espàtula de plàstic; mai amb els dits, perquè l'aparell llegeix la fluorescència per la part de superior de la placa i podríem interferir aquesta senyal.
- 9.1.8. Centrifugar les plaques amb la centrifuga de plaques.
- 9.1.9. La placa ja està preparada per posar a l'aparell.

9.2. Utilització del programa

- 9.2.1. Obrir el programa SDS 2.3, seleccionar: File → new, i dins d'aquí, seleccionar 96 wells i $\Delta\Delta Ct(RQ)$ i apretar a OK.
- 9.2.2. Add markers, que és dir-li al programa quins gens estem utilitzant; si ja estan entrats, cal escollir els markers i apretar "copy to the plate document". En cas contrari, apretar *new* i omplir les caselles amb el nom del corresponent marcador.
- 9.2.3. Dissenyar la placa.
- 9.2.4. Una vegada dissenyada, indicar quin dels gens és el control endogen.
- 9.2.5. Quan estigui fet, anar a "Instrument", apareixeran 3 pestanyetes.
- 9.2.6. A la "**Thermal Cycler**": canviar els microlitres de la reacció (posar 10) i mirar que estigui marcat fast. Guardar el fitxer dins la carpeta.
- 9.2.7. A la pestanyeta "**Real Time**": clicar "connect to the instrument" i quan estigui connectat, apretar "open/close" s'obrirà l'aparell i posarem la placa (el codi de barres cap al davant) tornar a clicar "open/close" i es tancarà l'aparell. Apretar **Start**.
- 9.2.8. L'aparell està corrent uns 30'.
- 9.2.9. Quan hagi acabat posarà un missatge dient que el *run* és OK.
- 9.2.10. Ara es pot analitzar el resultat apretant la fletxa verda. En aquesta primera anàlisi es poden veure si els triplicats són bons o no.
- 9.2.11. Tornar a la pestanya de Real Time i tornar a open/close per treure la placa de dins l'aparell i tornar a tancar.
- 9.2.12. A partir d'aquí es poden fer altres plaques o tancar el programa i grabar el resultat per analitzar-lo

9.3. Anàlisi dels resultats

- 9.3.1. Obrir el programa RQ manager.
- 9.3.2. Afegir totes les plaques que vulguem analitzar juntes. Quan les tinguem totes juntes, analitzar (es pot fer tant manualment com de manera automàtica per part del software). Quan l'anàlisi hagi finalitzat, cal exportar els resultats.
- 9.3.3. Exportant els resultats es genera un document en format text. Que es pot obrir amb un excel, on es processaran els resultats dins el document d'anàlisi.

10. Verificació de la tècnica i interpretació de resultats

11. Guia de problemes

12. Referències

13. Control de la documentació

14. Annexos

- 14.1. Valoració de l'expressió gènica de FABP4 en macròfags THP-1
Per valorar l'expressió gènica de FABP4, utilitzarem el GAPDH com a control endogen.

Procediment Normalitzat de Treball Metodològic
EXTRACTES DE PROTEÏNES NUCLEARS CEL·LULARS

PNT-PO0709-URLA-10

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 1 de 8

1. Fonament i objectiu

- 1.1. *Fonament.* El protocol per l'obtenció dels extractes de proteïnes nuclears es compon de diferents passos. En primer lloc, la utilització d'un tampó hipotònic i la disrupció mecànica permet el trencament de la membrana cel·lular. En segon lloc, es realitza un pas de fraccionament subcel·lular que permet precipitar els nuclis. I, finalment, el tractament de la fracció nuclear amb un tampó adequat provoca l'alliberament de les proteïnes.
- 1.2. *Objectiu:* Preparar extractes de proteïnes nuclears cel·lulars a partir de cèl·lules en cultiu.
- 1.3. *Utilitat:* Els extractes nuclears cel·lulars es podran utilitzar en tècniques com Western blot, ELISA, EMSA i TransAM (ELISA-EMSA).

2. Espècimen

Cèl·lules, procedents de cultius en suspensió o adherides, o aïllades a partir de teixit o de sang perifèrica.

3. Documentació relacionada

4. Definicions

5. Historial de revisions

Modificacions efectuades	No de Revisió	Data
Iolanda Lázaro López	01	30/04/2010

6. Solucions, reactius i materials

Nom de la solució:	DTT 1M	Volum final:	5ml
pH		Manipulació prèvia:	
		Conservació:	-20°C, en alíquotes de 20µl
Reactiu	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)
DTT (dithiothreitol)	161-0611/Bio-Rad	1M	0.771g
H ₂ O Milli-Q	----	----	5ml

Nom de la solució:	0.5M HEPES	Volum final:	30ml
pH	7.9	Manipulació prèvia:	autoclau
		Conservació:	4°C
Reactiu	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)
HEPES	H9136 / Sigma	0.5M	3.57g
H ₂ O Milli-Q	----	----	30ml

Nom de la solució:	0.5M EDTA	Volum final:	30ml
pH	7.9	Manipulació prèvia:	autoclau
		Conservació:	T ambient
Solució Mare	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)
EDTA	131669 / Panreac	0.5M	5.58g
H ₂ O Milli-Q	----	----	30ml

Nom de la solució:	0.1M EGTA	Volum final:	30ml
pH		Manipulació prèvia:	autoclau
		Conservació:	T ambient
Solució Mare	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)
EGTA	E8145 / Sigma	0.1M	1.41g
H ₂ O Milli-Q	----	----	30ml



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic
EXTRACTES DE PROTEÏNES NUCLEARS CEL·LULARS

PNT-PO0709-URLA-10

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 2 de 8

Nom de la solució:	KCl 1M	Volum final:	30ml
pH		Manipulació prèvia:	autoclau
		Conservació:	T ambient
Solució Mare	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)
KCl	60133 / Fluka	1M	2.24g
H ₂ O Milli-Q	----	----	30ml

Nom de la solució:	NaCl 5M	Volum final:	50ml
pH		Manipulació prèvia:	autoclau
		Conservació:	T ambient
Solució Mare	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)
NaCl	121659 / Panreac	5M	14.61g
H ₂ O Milli-Q	----	----	50ml

Nom de la solució:	TAMPÓ HIPOTÒNIC – solució estoc	Volum final:	100ml
pH		Manipulació prèvia:	
		Conservació:	4°C
Solució Mare	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)
0.5M HEPES	----	10mM	2ml
0.5M EDTA	----	0.1mM	20µl
0.1M EGTA	----	0.1mM	100µl
1M KCl	----	10mM	1ml
Spermidine	S2501 / Sigma	0.75mM	0.019095g
Spermine	S1141 / Sigma	0.15mM	0.00522g
H ₂ O Milli-Q	----	----	fins a Vf=100ml

Nom de la solució:	TAMPÓ HIPOTÒNIC – solució treball	Volum final:	10ml
pH		Manipulació prèvia:	
		Conservació:	en fred
Solució Mare	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)
Tampó HIPOTÒNIC – solució estoc	----	----	10ml
Llet en pols desnatada	----	5mg/ml = 0.5%	50mg
DTT 1M	----	1mM	10µl
Pastilla Complete Mini Protease Inhibitor	11 836 153 001 / Roche	----	1

-) Cal dissoldre la solució amb el vòrtex, perquè la pastilla d'inhibidors de proteases costa molt de desfer.

Nom de la solució:	TAMPÓ D'EXTRACCIÓ – solució estoc	Volum final:	100ml
pH		Manipulació prèvia:	
		Conservació:	4°C
Solució Mare	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)
0.5M HEPES	----	20mM	4ml
0.5M EDTA	----	1mM	200µl
0.1M EGTA	----	1mM	1ml
5M NaCl	----	0.42M	8.4ml
Glicerol 100%	G5516 / Sigma	25%	25ml
H ₂ O Milli-Q	----	----	fins a Vf=100ml



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic
EXTRACTES DE PROTEÏNES NUCLEARS CEL·LULARS

PNT-PO0709-URLA-10

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 3 de 8

Nom de la solució:	TAMPÓ D'EXTRACCIÓ – solució treball		Volum final:	10ml
pH		Manipulació prèvia:	Conservació:	-20°C, alíquotes de 1ml
Solució Mare	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)	
Tampó HIPOTÒNIC – solució estoc	----	----	10ml	
Pastilla Complete Mini Protease Inhibitor	11 836 153 001 / Roche	----	1	

- (2) Cal dissoldre la solució amb el vòrtex, perquè la pastilla d'inhibidors de proteases costa molt de desfer.
 (3) En el moment d'utilitzar, cal treure una alíquota de 1ml del congelador i afegir 1µl DTT 1M (concentració final 1mM).

Reactiu	Referència	Casa Comercial	Codi URL
D-PBS w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺	149190-094	GIBCO	323
EDTA	131669	Panreac	17
EGTA	E8145	Sigma	54
HEPES	H9136	Sigma	84
KCl	8544	Probus	22
Complete Mini Protease Inhibitor	11 836 153 001	Roche	497
Spermidine	S2501	Sigma	414
Spermine	S1141	Sigma	415
DTT	161-0611	BioRad	371
Glicerol	G5516	Sigma	119
NaCl	131659	Panreac	220
Llet desnatada en pols	----	----	15

Material	Capacitat	Tractament Previ	Observacions
puntes micropipeta	0.5-10µl	autoclavat	4°C
puntes micropipeta	2-200µl	autoclavat	4°C
puntes micropipeta	100-1000µl	autoclavat	4°C
Pipetes pasteur estèrils	3.5ml	----	Estèrils
tubs eppendorf	1.5ml	autoclavat	4°C
tubs cònics	15ml	----	Estèrils
Cell lifters – COSTAR (Cultek), #3008	----	----	----
Xeringues 1ml – BD Plastipak, #300014	1ml	----	----
Agulles 18G1/2 (rosa) – Microlance BD, #304622	18G1/2	----	----
Xeringues 1ml amb agulla 26G1/2 - BD Plastipak 1ml SUB-Q, #305501	1ml + 26G1/2	----	----
Paper de filtre que no deixi fibres - TORK	----	-----	----



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic
EXTRACTES DE PROTEÏNES NUCLEARS CEL·LULARS

PNT-PO0709-URLA-10

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 4 de 8

7. Instrumentació i equips:

Equip	Ubicació	Núm. Inventari	Núm. PNT-EE	Observacions
Cabina de flux laminar vertical, CV-100 (Telstar)	Laboratori de Cultius	012457	PNT-PO0705-URLA-12	
Microscopi invertit de contrast de fases, 1IX71S8F3 (Olympus)	Laboratori de Cultius	----	PNT-PO0705-URLA-26	
Centrífuga Multi3LR (Heraeus)	Laboratori 1. Gènetica i biologia molecular	----	PNT-PO0705-URLA-37	
Vòrtex (Ika)	Laboratori 1. Gènetica i biologia molecular	055054	PNT-PO0705-URLA-33	
Agitador circular (Heidolph)	Cambra freda	012472	PNT-PO0705-URLA-114	

8. Precaucions

9. Procediment

Nota #1. Cal tenir en compte que per efectuar el procediment per l'obtenció dels extractes de proteïnes nuclears a partir de cèl·lules en cultiu, seran necessàries 2 plaques de Petri de 10cm Ø amb densitat elevada en determinats tipus cel·lulars per obtenir un rendiment i una concentració de proteïnes suficient per posteriors procediments.

Nota #2. Si les cèl·lules a processar estan en suspensió, obviarem els passos de rascat de les plaques (passos 9.3-9.6). A partir del número de cèl·lules que marqui el tipus cel·lular i segons proves d'optimització prèvies, recuperarem les cèl·lules de la suspensió centrifugant; s'eliminarà el SN (medi) i es realitzaran els tres passos de rentat amb PBS fred (per centrifugació i eliminació de SN). I, seguidament, se li afegirà el volum necessari de tampó d'homogeneïtzació i procedirà seguint a partir del pas 9.7. d'homogeneïtzació amb agulla de 26G1/2.

Nota #3. Tot el material que es faci servir en el procediment experimental ha d'estar fred, tant les solucions com el material plàstic (puntes de pipetes, pipetes pasteurs, xeringues, agulles, etc.).

Nota #4. No és necessari mantenir l'esterilitat durant el procediment, perquè les cèl·lules que es manipulen estan destinades a la seva lisi. Però, es recomana, per la seguretat del propi manipulador, realitzar els passos 9.2-9.9 dins la cabina de flux laminar vertical pels possibles aerosols que es generin durant el procediment.

Nota #5. En el procediment, hi ha dos passos de centrífuga. Per tant, necessitarem que estigui a 4°C. S'utilitzarà la centrífuga Heraeus Multi3R que es troba al laboratori 1 (Genètica i biologia molecular). Cal tenir en compte que aquesta centrífuga necessita aproximadament 1 hora per refredar-se. I, també, ens assegurarem que el rotor que contingui sigui el rotor fix per tubs de 1.5ml. Ja que en el procés de refredament de la centrífuga també es refredarà el rotor.

Nota #6. Els passos de procediment del 9.5. fins el 9.12. s'han de realitzar en un temps total que no superi els **60 minuts**. Aquest pas és crític perquè si se supera aquest temps, la solució hipotònica podria arribar a travessar la membrana nuclear i es perdrien els factors de transcripció. Per tant, en el moment en què es dispensi el volum de solució de treball de tampó hipotònic, es posarà un TIMER en compte enrera amb 1 hora de temps.

Elaborat per: Iolanda Lázaro López

Aprovat per: Lab-Manager i Responsable de qualitat

Aquest document en suport paper es considera document no controlat

Procediment Normalitzat de Treball Metodològic
EXTRACTES DE PROTEÏNES NUCLEARS CEL·LULARS

PNT-PO0709-URLA-10

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 5 de 8

- 9.1. Observem les cèl·lules al microscopi.
Amb l'observació de les cèl·lules al microscopi, determinarem l'estat en què es troben les cèl·lules a partir de les quals s'obtidran els extractes de proteïnes nuclears; valorarem el grau d'afectació de les cèl·lules per efecte de la incubació.
- 9.2. Posem les plaques en gel.
- 9.3. Eliminem el medi de les plaques.
Nota. Aquest medi es pot conservar per si es vol fer servir en posteriors estudis. Caldrà processar-lo adequadament per la seva conservació just després de ser recuperat. El procediment a efectuar és el següent: centrifugar el medi a 4°C a 3000rpm durant 5 minuts; recuperar el sobrenedant i descartar el possible pellet que hi pugui quedar. És important fer alíquotes i guardar-les ràpidament a -70°C.
- 9.4. Rentem 3 vegades amb PBS fred. No és necessari mantenir l'esterilitat durant el procediment. Cal procurar que al darrer rentat s'elimini completament el PBS afegit; ja que si no, diluirem la mostra i la concentració final de proteïna serà inferior a l'òptima.
- 9.5. Afegim la solució de treball de tampó hipotònic. El volum depèn del tipus cel·lular a processar. Es recomana realitzar proves per optimitzar el procediment i determinar el volum necessari.
Per exemple:
- macròfags THP-1: 800µl per 1 placa
- musculars llires HCASMC: 800µl per 2 plaques
- endotelials HUVECP: 800µl per 2 plaques
- 9.6. Rasquem amb el cell-lifter la superfície del fons de la placa; cal que ens assegurem que sigui homogeni i que s'ha recuperat el màxim possible, per aquest motiu es recomana fer repetides passades amb el cell-lifter i observar la placa al microscopi per veure el que pugui haver quedat. En el cas de disposar de dues plaques, transferim l'homogenat de la primera placa a la segona amb una xeringa de 1ml amb agulla 18G1/2 i repetim el procediment de rascat amb el cell-lifter.
- 9.7. Recuperem l'homogenat cel·lular amb la xeringa de 1ml amb agulla 18G1/2, transferim a un tub eppendorf i ho deixem cobert de gel.
- 9.8. Realitzem les operacions anteriors amb totes les plaques de les altres condicions.
- 9.9. Homogeneïtzació.
Amb una xeringa amb agulla de 26G1/2, homogeneïtzem 10 vegades la suspensió cel·lular. El procés d'homogeneïtzació consisteix en fer passar tot el volum de la suspensió cel·lular per la xeringa i, seguidament, deixar-lo anar al tub. Cada pas de **captació del volum + deixat anar** és una vegada (↑↓ ≡ 1). S'ha de repetir 10 vegades.
- Nota. Cal realitzar el procediment sense treure els tubs del gel. Cal que tot estigui constantment a 4°C.
I, s'ha d'evitar tenir molt de temps els tubs a la mà, per evitar que s'escalfin i es desnaturalitzin les proteïnes.
- Nota. Cal evitar pujar i baixar molt ràpidament l'èmbol de la xeringa, perquè d'aquesta manera es genera escuma i no s'homogeneïtza bé la suspensió cel·lular.
- 9.10. Centrifugar: 16000g, 10 min, 4°C, rotor fix, velocitat de frenat=3.
- 9.11. Treure els tubs immediatament de la centrífuga i clavar-los en gel; sinó, el pellet es podria resusprendre.

Procediment Normalitzat de Treball Metodològic
EXTRACTES DE PROTEÏNES NUCLEARS CEL·LULARS

PNT-PO0709-URLA-10

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 6 de 8

9.12. Recuperar el sobrenedant de cada un dels tubs, sense apurar molt el volum que queda just per damunt del pellet. Aquesta fracció recuperada correspon a les proteïnes citoplasmàtiques. És important fer alíquotes i guardar-les ràpidament a -70°C .
Acabem de treure el volum que hem deixat just per damunt del pellet, procurant deixar-lo el màxim sec possible sense arribar a tocar-lo.

Seguidament, amb un paper de filtre que no deixi fibres (TORK), cal assecar el tub, també procurant de no tocar el pellet i mantenint els dits a la part superior del tub (per no escalfar la mostra i evitar desnaturalitzar les proteïnes que seguidament s'extreuran).

És important assegurar-nos que el pellet queda molt sec perquè a continuació es dissoldrà amb el mínim volum possible i qualsevol petit volum restant, podria diluir de manera important el tampó d'extracció.

A més, cal evitar la possible contaminació creuada entre proteïnes de nucli i citoplasma.

9.13. Nota de procediment molt IMPORTANT:

Fins aquest punt de procediment, el temps total transcorregut no ha de superar els **60 MINUTS**.

Aquest pas és crític perquè si se supera aquest temps, la solució hipotònica podria arribar a travessar la membrana nuclear i es perdrien els factors de transcripció.

9.14. Resuspendre el pellet amb el mínim volum possible de la solució de treball de tampó d'extracció. Com en el cas del tampó hipotònic, variarà en funció del tipus cel·lular i és un paràmetre a optimitzar, ja que depèn del número de cèl·lules.

Un cop dispensat un determinat volum de tampó, tapem el tub i el girem. D'aquesta manera comprovem si la suspensió es remenarà o no. Si no es mou, cal afegir més volum.

Aquest punt és crític i fonamental per aconseguir una bona extracció \Rightarrow tenir factors de transcripció / proteïnes nuclears \Rightarrow poder treballar.

9.15. Un cop resuspès el pellet de tots els tubs. Fem un pas de vòrtex de pocs segons i tornem els tubs al gel.

9.16. Deixem en agitació circular a la cambra freda durant 45 minuts.

La velocitat de l'agitació ha de ser la mínima possible.

Durant els 45 minuts, farem passos de vòrtex cada 15 minuts. Entrem un vòrtex a la cambra freda, repetim el procés de vòrtex realitzat previ a l'inici de l'agitació circular.

Quan finalitzi el procés d'agitació, clavarem els tubs en gel per portar-los a centrifugar.

9.17. Centrifugar: 16000g, 60 min, 4°C , rotor fix, velocitat de frenat=3.

9.18. Treure els tubs immediatament de la centrífuga i clavar-los en gel; sinó, el pellet es podria resuspendre.

9.19. Recuperar el sobrenedant de cada un dels tubs, sense apurar molt el volum que queda just per damunt del pellet. Aquesta fracció recuperada correspon a les proteïnes nuclears. És important fer alíquotes i guardar-les ràpidament a -70°C .

9.20. Determinar la quantitat de proteïna total de cada mostra pel mètode de Bradford.

10. Verificació de la tècnica i interpretació de resultats

11. Guia de problemes

Problema	Possible causa	Solució

Procediment Normalitzat de Treball Metodològic
EXTRACTES DE PROTEÏNES NUCLEARS CEL·LULARS

PNT-PO0709-URLA-10

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 7 de 8

12. Referències

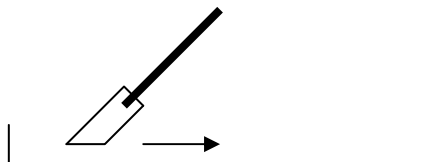
- Ohlsson BG, Englund MC, Karlsson AL, Knutsen E, Erixon C, Skribeck H, Liu Y, Bondjers G, Wiklund O. Oxidized low density lipoprotein inhibits lipopolysaccharide-induced binding of nuclear factor-kappaB to DNA and the subsequent expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta in macrophages. *J Clin Invest.* 1996;98:78-89.

13. Control de la documentació

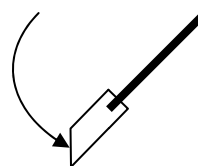
14. Annexos

14.1 Anotacions i limitacions del procediment:

- 14.1.1 En una mateixa bateria d'extraccions només podem fer 8 plaques per persona.
- 14.1.2 Cal vigilar molt amb l'etiquetat dels tubs. S'ha de tenir en compte que estaran molta estona en gel, que es guardaran a -70°C i seran descongelats varies vegades (màxim 8).
- 14.1.3 El procés de descongelació-congelació ha de ser molt ràpid \Rightarrow farem alíquotes petites.
- 14.1.4 Cal fer una marca al tub cada cop que ha estat congelat/descongelat. No excedir de 8 vegades.
- 14.1.5 Podem congelar les mostres i calcular la proteïna un altre moment. És molt important que el resultat sigui acurat perquè hem de carregar la mateixa quantitat de proteïna a cada carril del gel.
- 14.1.6 No guardem les solucions de treball dels tampons d'extracció i hipotònic. Cada vegada cal preparar-ne de noves.
- 14.1.7 Fer servir el cell-lifter sempre per la mateixa cara i millor per:



Si es fes per l'altra, les cèl·lules quedarien aquí:



- 14.1.8 Anar ràpid amb els rentats.
- 14.1.9 Cal anar amb compte de no confondre les plaques perquè quan es treu la tapa no queda cap marca. Una possible solució és marcar la base de les plaques amb la condició que correspongui.
- 14.1.10 Cal assegurar-nos que retirem tot el D-PBS dels rentats.
- 14.1.11 Totes les solucions estan autoclavades. Per tant, cal fer servir puntes autoclavades.
- 14.1.12 La solució final no ha de ser estèril.
- 14.1.13 Els reactius *Spermin* i *Spermidine* es guarden a -20°C , segellats amb parafilm.
- 14.1.14 La solució de DTT es prepara i es guarda en alíquotes de petit volum a -20°C . Només es pot congelar una única vegada. No es pot reutilitzar.



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic
EXTRACTES DE PROTEÏNES NUCLEARS CEL·LULARS

PNT-PO0709-URLA-10

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 8 de 8

14.2 Especificacions per l'obtenció dels extractes de proteïnes nuclears pels experiments amb MACRÒFAGS THP-1:

- 14.2.1 Els macròfags THP-1 són cèl·lules adherides; per tant, el procediment es realitzarà d'acord amb les especificacions donades per aquest tipus de cèl·lules en el PNT.
- 14.2.2 Tipus de plaques: Nunclon Δ , #150350 (Nunc), 56.7cm²
- 14.2.3 Número de cèl·lules per placa: 6·10⁶
- 14.2.4 Número de plaques per condició: 1
- 14.2.5 Volum de tampó HIPOTÒNIC: 800µl/placa
- 14.2.6 Volum de tampó d'EXTRACCIÓ: 80µl/placa.



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

SDS-PAGE

PNT-PO0709-URLA-03

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 1 de 7

1. Fonament i objectiu

Fonament. Separació de proteïnes en un gel de poliacrilamida comercial o de confecció manual en base a la seva mobilitat electroforètica (donada per la longitud de la cadena polipeptídica o el pes molecular). Les proteïnes són tractades amb un detergent aniónic (dodecil sulfat sòdic o SDS) que proporciona una mateixa relació càrrega/massa per totes les proteïnes. Per tant, les proteïnes són separades en funció del seu pes molecular. En el gel, les proteïnes corren de manera inversament proporcional al seu pes (com més petites més corren, més mobilitat electroforètica).

Objectiu. Separar d'una barreja de proteïnes en funció del seu pes molecular (de la mobilitat electroforètica).

Utilitat. Sovint una electroforesi és un pas previ a una altra tècnica, com per exemple el Western blot.

2. Espècimen

Extractes de proteïnes aïllades o amb altres substàncies.

Per exemple: extractes de proteïnes cel·lulars o de teixit, medi de cultiu, plasma, sèrum, orina. Cal tenir present que el procés de tractament de les mostres desnatura les proteïnes i, per tant, aquestes perden les propietats dependents de la seva estructura.

3. Documentació relacionada

4. Definicions

SDS = dodecil sulfat sòdic

PAGE = electroforesi en gels de poliacrilamida



5. Historial de revisions

Modificacions efectuades	No de Revisió	Data
Iolanda Lázaro López	01	30/04/2010

6. Solucions, reactius i materials

Nom de la solució:	Tampó d'electroforesi Tris-Acetate	Volum final:	800ml		
pH	---	Manipulació prèvia:	---	Conservació:	4°C
Reactiu	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)		
Nu®PAGE Tris -Acetate SDS Running Buffer 20X	LA0041 / Invitrogen	1X	40 ml		
H ₂ O Milli-Q	---	---	760ml		

Nom de la solució:	Tampó d'electroforesi MOPS	Volum final:	800ml		
pH	---	Manipulació prèvia:	---	Conservació:	4°C
Reactiu	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)		
Nu®PAGE MOPS SDS Running Buffer 20X	NP0001 / Invitrogen	1X	40 ml		
H ₂ O Milli-Q	---	---	760ml		

	UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI	
Procediment Normalitzat de Treball Metodològic		
SDS-PAGE		
PNT-PO0709-URLA-03	Revisió: 00	Data: 24-07-2008
		Pàgina: 2 de 7

Nom de la solució:		Tampó d'electroforesi MES		Volum final:		800ml	
pH	---	Manipulació prèvia:		---	Conservació:		4°C
Reactiu		Referència / marca		Concentració final		Quantitat (unitats)	
Nu®PAGE MES SDS Running Buffer 20X		NP0002 / Invitrogen		1X		40 ml	
H ₂ O Milli-Q		---		---		760ml	

Nom de la solució:		Tampó d'electroforesi Tris-Glycine		Volum final:		800ml	
pH	---	Manipulació prèvia:		---	Conservació:		4°C
Reactiu		Referència / marca		Concentració final		Quantitat (unitats)	
Nu®PAGE Tris-Glycine SDS Running Buffer 20X		LC 2675 / Invitrogen		1X		40 ml	
H ₂ O Milli-Q		---		---		760ml	

Nom de la solució:		1.5M Tris-HCl		Volum final:		100ml	
pH	8.8	Manipulació prèvia:		ajustar pH amb HCl 6N		Conservació: 4°C	
Reactiu		Referència / marca		Concentració final		Quantitat (unitats)	
Trizma Base		T1503-100G/SIGMA		1.5M		18.165g	
H ₂ O Milli-Q		---		---		Fins a Vf=100ml	

Nom de la solució:		SDS al 10%		Volum final:		100ml	
pH	---	Manipulació prèvia:		---	Conservació:		T ambient
Reactiu		Referència / marca		Concentració final		Quantitat (unitats)	
SDS		L3771-25G/SIGMA		10%		10g	
H ₂ O Milli-Q		---		---		Fins a Vf=100ml	

Reactiu	Referència/Marca	Concentració final	Quantitat (unitats)	Conservació
NuPAGE® LDS Sample Buffer 4x	NP0007/ Invitrogen	1x	---	4°C
NuPAGE® Sample Reducing Agent 10X	NP0004/ Invitrogen	1x	---	4°C
NuPAGE® Antioxidant	NP0005 /Invitrogen	---	---	4°C
Gels NuPAGE® Novex 3.8% Tris-Acetate (1mm, 10 wells)	EA0375BOX/ Invitrogen	---	---	4°C
Gels NuPAGE® Novex 10% Bis-Tris (1mm, 10 wells)	NP0302BOX/ Invitrogen	---	---	4°C
Gels NuPAGE® Novex 4.12% Tris-Glycine (1mm, 12 wells)	EC60352BOX/ Invitrogen	---	---	4°C
NOVEX® Tris-Glycine SDS Sample Buffer (2x)	LC2676 / Invitrogen	1x	---	4°C
HiMark™ Pre-Stained High Molecular (HMW) Weight Protein Standard	LC5699/ Invitrogen	---	---	-20°C
BenchMARK™ Pre-Stained Protein Ladder	10748-010/ Invitrogen	---	---	-20°C
MagicMark	LC5602/Invitrogen	---	---	-20°C



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

SDS-PAGE

PNT-PO0709-URLA-03

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 3 de 7

Precision Plus Protein WesternC standards	161-0376/ Invitrogen	---	---	-20°C
Trizma Base	T1503 / Sigma	---	---	T ambient
Acril/Bisacrilamida 40%	161-0146 / Bio-Rad	---	---	4°C
SDS	L3771 / Sigma	---	---	T ambient
TEMED	T8133 / Sigma	---	---	T ambient
Persulfat amònic	161-0700 / Bio-Rad	---	---	T ambient (al dessecador)

7. Instrumentació i equips:

Equip	Ubicació	Núm. Inventari	Núm. PNT-EE	Observacions
Micropipeta 0.5-10µl (Eppendorf)	Laboratori 1/2	---	PNT-PO0705-URLA-25	
Micropipeta 10-100µl (Eppendorf)	Laboratori 1/2	---	PNT-PO0705-URLA-25	
Micropipeta 100-1000µl (Eppendorf)	Laboratori 1/2	---	PNT-PO0705-URLA-25	
Centrífuga multifuge 3L-R (Heraeus)	Laboratori 1	---	PNT-PO0705-URLA-37	
Font d'alimentació PowerPac 200 (Bio-Rad)	Laboratori 1	---	PNT-PO0705-URLA-45	
Font d'alimentació PowerPac HC (Bio-Rad)	Laboratori 1	---	PNT-PO0705-URLA-46	
Font d'alimentació EPS3500 (Amersham-Pharmacia)	Laboratori 1	---	PNT-PO0705-URLA-47	
Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad)	Laboratori 1	---	PNT-PO0705-URLA-63	
Mini-Protean 3 Cell (Bio-Rad)	Laboratori 1	---	PNT-PO0705-URLA-65	
Agitador magnètic HC1202 (Bibby)	Laboratori 2	---	PNT-PO0705-URLA-75	
Thermomixer confort (Eppendorf)	Laboratori 1	---	PNT-PO0705-URLA-95	
Cubeta electroforesi Xcell SureLock (Invitrogen)	Laboratori 1	---	PNT-PO0705-URLA-98	

8. Precaucions

9. Procediment

9.1. Preparació dels diferents tampons d'electroforesi NuPAGE® SDS Running Buffer 1x

9.1.1. Proteïnes entre 60-250kDa: NuPAGE® Tris-Acetate SDS Running Buffer 1x

Preparar 800ml a partir de NuPAGE® Tris-Acetate SDS Running Buffer 20x:

NuPAGE Tris-Acetate SDS Buffer (20x)	40ml
H ₂ O Milli-Q	760ml



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

SDS-PAGE

PNT-PO0709-URLA-03

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 4 de 7

9.1.2. Proteïnes entre 20-80kDa: NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer 1x

Preparar 800 ml a partir de NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer 20x:

NuPAGE® MOPS SDS Buffer (20x)	40ml
H ₂ O Milli-Q	760ml

9.1.3. Proteïnes entre 20-80kDa: NuPAGE® MES SDS Running Buffer 1x

Preparar 800 ml a partir de NuPAGE® MES SDS Running Buffer 20x:

NuPAGE® MES SDS Buffer (20x)	40ml
H ₂ O Milli-Q	760ml

9.1.4. Proteïnes entre 31-200kDa: NuPAGE® Tris-Glycine Running Buffer 1x

Preparar 800 ml a partir de NuPAGE® Tris-Glycine SDS Running Buffer 20x:

NuPAGE® Tris-Glycine SDS Buffer (20x)	40ml
H ₂ O Milli-Q	760ml

9.2. Preparació i desnaturalització de les mostres

9.2.1. Preparació de les mostres pels tampons d'electroforesi: Tris-Acetate SDS, MOPS i MES

9.2.1.1. En tubs eppendorfs estèrils de 1.5ml, preparar les mostres.
Cal tenir en compte: 1) els micrograms de proteïna necessaris; 2) el volum final de la mostra, que estarà supeditat a la quantitat de proteïna necessària i al volum màxim que es permeti carregar en els pous del gel; la dilució dels diferents tampons utilitzats en la preparació de la mostra.

Per exemple, en un volum total de 10µl, amb una mostra de proteïna amb una concentració de 5,53µg/µl i que són necessaris 20µg de proteïna per mostra:

4*)	Protein Sample (20µg)	3.62µl
3*)	NuPAGE® Sample Reducing Agent 10x	1.00µl
2*)	NuPAGE® LDS Sample Buffer 4x	2.50µl
1*)	Deionized Water	10-3.62-2.5-1.0=2.88µl

**Nota.* Es recomana dispensar els diferents components per la preparació de la mostra segons l'ordre que s'indica: primer, l'aigua; en segon lloc, el tampó de mostra; en tercer lloc, l'agent reductor; i, finalment, la mostra.

- 9.2.1.2. Fer un pols amb la centrífuga a 4°C, perquè baixi la mostra.
- 9.2.1.3. Escalfar les mostres al bloc de temperatura Thermomixer Comfort (PNT-PO0705-URLA-95): 70°C, 10 minuts.
- 9.2.1.4. Fer un pols amb la centrífuga a 4°C i deixar les mostres clavades en gel fins el moment de carregar-les al gel.

Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

SDS-PAGE

PNT-PO0709-URLA-03

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 5 de 7

9.2.2. Preparació de les mostres pel tampó d'electroforesi: Tris-Glycine

9.2.2.1. En tubs eppendorfs estèrils de 1.5ml, preparar les mostres.

Cal tenir en compte: 1) els micrograms de proteïna necessaris; 2) el volum final de la mostra, que estarà supeditat a la quantitat de proteïna necessària i al volum màxim que es permeti carregar en els pous del gel; la dilució dels diferents tampons utilitzats en la preparació de la mostra.

Seguint l'exemple anterior, en un volum total de 10 μ l, amb una mostra de proteïna amb una concentració de 4,53 μ g/ μ l i que són necessaris 20 μ g de proteïna per mostra:

4*)	Protein Sample (20 μ g)	3.62 μ l
3*)	NuPAGE [®] Sample Reducing Agent 10x	1.00 μ l
2*)	NOVEX [®] TRIS-Glycine SDS Sample Buffer (2x)	5.00 μ l
1*)	Deionized Water	10-4.42-5.0-1.0=0.38 μ l

*Nota. Es recomana dispensar els diferents components per la preparació de la mostra segons l'ordre que s'indica: primer, l'aigua; en segon lloc, el tampó de mostra; en tercer lloc, l'agent reductor; i, finalment, la mostra.

9.2.2.2. Fer un pols amb la centrifuga a 4 $^{\circ}$ C, perquè baixi la mostra.

9.2.2.3. Escalfar les mostres al bloc de temperatura Thermomixer Comfort (PNT-PO0705-URLA-95): 85 $^{\circ}$ C, 2 minuts.

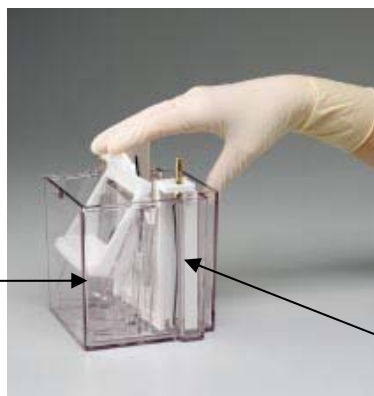
9.2.2.4. Fer un pols amb la centrifuga a 4 $^{\circ}$ C i deixar les mostres clavades en gel fins el moment de carregar-les al gel.

9.3. Muntatge de la cubeta

9.3.1. Muntar els gels comercials NuPAGE[®] Novex en la cubeta d'electroforesi XCell SureLock Mini-Cell (PNT-PO0705-URLA-98) o muntar els gels en la cubeta Mini-PROTEAN[®] 3 Cell de Bio-Rad (PNT-PO0705-URLA-65), si el gel es confecciona manualment (veure annex 14.1: **Confecció manual de gels al 6%**). (*) Si només es fa córrer un gel utilitzar el "Buffer Dam" on aniria el 2n gel.

9.3.2. Afegir 600ml de tampó d'electroforesi NuPAGE[®] SDS Running Buffer 1x al compartiment exterior i 200ml de tampó d'electroforesi NuPAGE[®] SDS Running Buffer 1X amb 500 μ l antioxidant al compartiment interior (*preparar immediatament abans de fer el muntatge de la cubeta per l'electroforesi*). (*) En el cas d'utilitzar gels Tris-Glycine, no és necessari separar 200ml de tampó 1x per afegir els 500 μ l d'antioxidant. Aquests gels no necessiten antioxidant.

Outer chamber(600ml)



Inner chamber
(200ml + 500 μ l
antioxidant)



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

SDS-PAGE

PNT-PO0709-URLA-03

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 6 de 7

9.3.3. Carregar el volum de mostra al gel i carregar el marcador de pes molecular pretenyit.

9.3.4. Connectar els elèctrodes a la font d'alimentació.

9.4. Electroforesi SDS-PAGE – condicions

9.4.1. Proteïnes entre 60-250kDa: gels Tris-Acetate 3-8% + tampó NuPAGE® Tris-Acetate SDS Running Buffer 1x:

- voltatge constant: **150V**
- potència aproximada: **10-11W**
- intensitat esperada: **40-55mA/gel** a l'inici i de **25-40mA/gel** al final.
- temps d'electroforesi: **~1 hora**

9.4.2. Proteïnes entre 20-80kDa: gels Bis-Tris 10%+ tampó NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer 1x:

- voltatge constant: **200V**
- potència aproximada: **10-11W**
- intensitat esperada: **100-115mA/gel** a l'inici i de **60-70mA/gel** al final.
- temps d'electroforesi: **50 minuts**

9.4.3. Proteïnes entre 20-80kDa: gels Bis-Tris 10%+ tampó NuPAGE® MES SDS Running Buffer 1x:

- voltatge constant: **200V**
- potència aproximada: **10-11W**
- intensitat esperada: **100-115mA/gel** a l'inici i de **60-70mA/gel** al final.
- temps d'electroforesi: **35 minuts**

9.4.4. Proteïnes entre 31-200kDa: gels Tris-Glycine comercials o manuals* + Bis-Tris 10%+ tampó NuPAGE® Tris-Glycine Running Buffer 1x:

- voltatge constant: **125V**
- potència aproximada: **10-11W**
- intensitat esperada: **30-40mA/gel** a l'inici i de **8-12mA/gel** al final.
- temps d'electroforesi: **90 minuts**

(*) Veure annex 14.1: **Confecció manual de gels al 6%.**

10. Verificació de la tècnica i interpretació de resultats

11. Guia de problemes

Problema	Possible causa	Solució

12. Referències

13. Control de la documentació

14. Annexos

14.1. Confecció manual de gels al 6% amb el sistema Mini-PROTEAN® 3 Cell (Bio-Rad)

Com a consideració prèvia important per la confecció dels gels d'acrilamida al 6% s'ha de tenir en compte que s'han d'utilitzar els vidres i els separadors de 1.5mm de gruix, ja que el percentatge d'acrilamida és molt baix i es necessita que els gels siguin més gruixuts perquè els puguem manipular adequadament (PNT-PO0705-URLA-65).



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

SDS-PAGE

PNT-PO0709-URLA-03

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 7 de 7

Volums per 2 gels:

1.5M Tris-HCl, pH=8.8	6.25ml
Acril/Bisacrilamida 40%	3.75ml
SDS 10%	250µl
APS	125µl
TEMED	25µl
Fins a volum final = 25ml amb H ₂ O Milli-Q	

Temps mínim de polimerització: 1 hora

14.2. Quadre resum de les especificacions per cada proteïna

	GEL	TAMPÓ	PROTEÏNA
ACTINA (43kDa)	Bis/Tris 10%	MES/MOPS	CPE=NPE=20µg
Akt, pThr308-Akt, pSer473-Akt (60kDa)	Bis/Tris 10%	MES/MOPS	CPE=20µg
ERK, p(Thr202/Tyr204)-ERK	Bis/Tris 10%	MES/MOPS	CPE=20µg
FABP4 (15kDa)	Bis/Tris 10%	MES	CPE=40µg
GSK-3β, pSer9-GSK-3β (50kDa)	Bis/Tris 10%	MES/MOPS	CPE=20µg
LAMIN B receptor (71kDa)	Bis/Tris 10%	MES/MOPS	NPE=15µg
Nrf2 (98, 118kDa)	Bis/Tris 6% (gels de confecció manual, gruix 1.5mm)	Tris-Glycine	CPE=NPE=15µg
α-TUBULIN (50kDa)	Bis/Tris 10%	MES/MOPS	CPE=15µg
eNOS, peNOS (140kDa)	Bis/Tris 10%	MOPS	Lisat total=25µg



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

Transferència de proteïnes de gel a membrana de nitrocel·lulosa

PNT-PO0709-URLA-23

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 1 de 6

1. Fonament i objectiu

Fonament. Aquesta tècnica és una aplicació de l'electroforesi SDS-PAGE (veure PNT-PO0709-URLA03). Les proteïnes separades mitjançant electroforesi SDS-PAGE són transferides des del gel a una membrana de nitrocel·lulosa, per capil·laritat o mitjançant l'aplicació de corrent elèctric, on posteriorment poden ser detectades i identificades per hibridació amb anticossos específics. La membrana constitueix una rèplica del patró de separació de proteïnes en el gel. Metodologia que s'engloba en la tècnica del Western blot com continuació al pas de l'electroforesi, per assolir l'objectiu final de la detecció de proteïnes específiques a partir d'un extracte o homogenat proteic.

Objectiu. Transferir del gel a membrana de nitrocel·lulosa proteïnes separades per electroforesi i procedents d'un homogenat de teixit o un extracte cel·lular.

2. Espècimen

Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) on prèviament hem separat pel seu pes molecular proteïnes d'extractes cel·lulars, homogenats de teixit, orina, plasma, etc.

3. Documentació relacionada

PNT AP69. iBlot™. Sistema de transferència en sec.
(Laboratoris Clínics - CRB. Hospital Universitari Sant Joan de Reus)

4. Definicions

5. Historial de revisions

Modificacions efectuades	No de Revisió	Data
Iolanda Lázaro López	01	30/04/2010

6. Solucions, reactius i materials

Nom de la solució:	Tampó de transferència	Volum final:	1000ml
pH	---	Manipulació prèvia:	---
		Conservació:	4°C
Reactiu	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)
NuPAGE Transfer Buffer (20x)	NP00061 / Invitrogen	1x (v/v)	50ml
NuPAGE Antioxidant	NP0005 / Invitrogen		1ml
MeOH ⁽¹⁾	1.06009.1000/ Merck	10% (v/v)	100ml
H ₂ O Milli-Q	----	---	849ml

⁽¹⁾ Preparam NuPAGE Transfer Buffer 1x amb un 20% de MeOH si es transfereixen 2 gels per obtenir una transferència òptima.



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

Transferència de proteïnes de gel a membrana de nitrocel·lulosa

PNT-PO0709-URLA-23

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 2 de 6

Nom de la solució:	TBS 10x ⁽¹⁾			Volum final:	1l
pH	7.4	Manipulació prèvia:	Ajustar a pH amb HCl 6N	Conservació:	4°C
Reactiu	Referència / marca	Concentració final		Quantitat (unitats)	
KCl	60133 / Fluka	250mM (p/v)		30g	
NaCl	121659 / Panreac	1.5M (p/v)		80g	
Trizma base	T1503 / Sigma	27mM (p/v)		2g	
H ₂ O Milli-Q ⁽²⁾				800ml	

⁽¹⁾ En el moment d'utilitzar-lo, el necessitem a concentració TBS 1x, per tant hem de diluir-lo 1:10. Relació: 100 ml TBS 10X + 900 ml aigua Milli-Q

⁽²⁾ Pesem tots els reactius i els dissolem en 800ml d'aigua Milli-Q, llavors ajustem el pH de la dissolució amb HCl fins a 7.4 i, finalment, afegim aigua Milli-Q fins a 1l.

Nom de la solució:	Solució de bloqueig al 2%			Volum final:	50ml ⁽¹⁾
pH	---	Manipulació prèvia:	---	Conservació:	---
Reactiu	Referència / marca	Concentració final		Quantitat (unitats)	
Reactiu de bloqueig ECL	CPK1075 / GE-Amersham	2% ⁽²⁾ (p/v)		1g	
Tween 20	17-1316-01/ Amersham	0.1 % (v/v)		0.05ml	
TBS 1x	---	---		50ml	

⁽¹⁾ Depèn del tamany de la membrana que volem bloquejar

⁽²⁾ El percentatge del bloqueig dependrà de l'estratègia de bloqueig de la membrana que es vulgui utilitzar:

- Solució de bloqueig al 2%: bloqueig *overnight* a 4°C o 1h a temperatura ambient.
- Solució de bloqueig al 4%: bloqueig 20 minuts a temperatura ambient.

Material	Capacitat	Tractament Previ	Observacions
Pipetes pasteur no estèrils	3.5ml	---	---
Pinces per la membrana	---	---	---
Tisores per la membrana	---	---	---
Cubetes de plàstic	---	---	---
Bosses de plàstic	---	---	---

7. Instrumentació i equips:

Equip	Ubicació	Núm. Inventari	Núm. PNT-EE	Observacions
pH-metre	Laboratori 2	012409	PNT-PO0705-URLA-07	---
Agitador (Heidolph)	Laboratori 1	012472	PNT-PO0705-URLA-14	---
Agitador roller (Beckman Coulter)	Laboratori 2	012416	PNT-PO0705-URLA-19	---
Micropipeta 0.5-10µl (Eppendorf)	Laboratori 1/2	---	PNT-PO0705-URLA-25	---



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

Transferència de proteïnes de gel a membrana de nitrocel·lulosa

PNT-PO0709-URLA-23

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 3 de 6

Micropipeta 10-100µl (Eppendorf)	Laboratori 1/2	---	PNT-PO0705-URLA-25	---
Micropipeta 100-1000µl (Eppendorf)	Laboratori 1/2	---	PNT-PO0705-URLA-25	---
Font d'alimentació PowerPac 200 (Bio-Rad)	Laboratori 1	---	PNT-PO0705-URLA-45	---
Font d'alimentació PowerPac HC (Bio-Rad)	Laboratori 1	---	PNT-PO0705-URLA-46	---
Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad)	Laboratori 1	---	PNT-PO0705-URLA-63	---
Mini-Protean 3 Cell (Bio-Rad)	Laboratori 1	---	PNT-PO0705-URLA-65	---
Agitador orbital (Stuart Scientific)	Cambra freda	003559	PNT-PO0705-URLA-74	---
Agitador magnètic HC1202 (Bibby)	Laboratori 2	---	PNT-PO0705-URLA-75	---
Balança analítica (AND)	Laboratori 2	012415	PNT-PO0705-URLA-76	---
Cubeta electroforesi XCell SureLock (Invitrogen)	Laboratori 1	---	PNT-PO0705-URLA-98	---
XCell Blot Module (Invitrogen)	Laboratori 1	---	PNT-PO0705-URLA-109	---
iBlot™ (sistema de transferència en sec (Invitrogen))	CRB	---	PNT AP69	---

8. Precaucions

9. Procediment

9.1. Transferència (del gel a la membrana)

9.1.1. Transferència en el sistema SEMI-WET (XCell Blot Module – Invitrogen (PNT-PO0705-URLA-109))

- 9.1.1.1. Preparar el tampó de transferència.
- 9.1.1.2. Submergir els *Sponge Pads* en el tampó de transferència.
- 9.1.1.3. Mullar els papers de filtre i la membrana en el tampó de transferència (Important: **Utilitzar les pinces especials de membrana per manipular tant els papers com la membrana**).
- 9.1.1.4. Muntar el sandvitx de la transferència al XCell Blot Module:
 - 9.1.1.4.1. Col·locar 2 *Sponge pads* mullats damunt de l'ànode. Passar el roller mullat amb tampó de transferència per damunt per treure possibles bombolles.
 - 9.1.1.4.2. Col·locar un paper de transferència mullat damunt dels *Sponge pads*.
 - 9.1.1.4.3. Posar la membrana damunt del paper de filtre (s'ha de mantenir el sandvitx tota l'estona moll).

Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

Transferència de proteïnes de gel a membrana de nitrocel·lulosa

PNT-PO0709-URLA-23

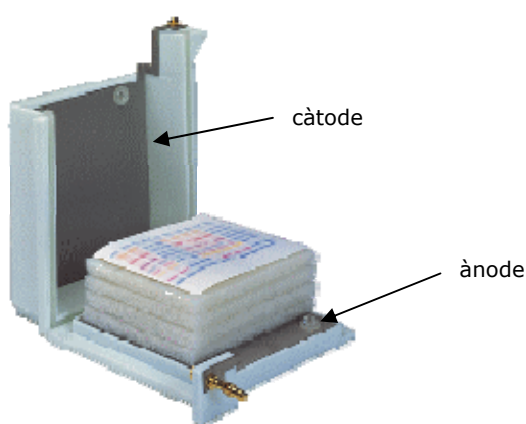
Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 4 de 6

- 9.1.1.4.4. Posar el gel damunt de la membrana i passar el roller mullat per eliminar bombolles.
- 9.1.1.4.5. Col·locar l'altre paper de transferència.**
- 9.1.1.4.6. Col·locar 2 o 3 *Sponge pads* mullats i remullar totes les esponges amb tampó.
- 9.1.1.4.7. Col·locar el càtode damunt del sandvitx i introduir-lo a la cubeta XCell Sure Lock Mini Cell (PNT-PO0705-URLA-98)
- 9.1.1.4.8. Afegir 200ml de tampó de transferència a l'interior de la cambra de transferència i 600ml d'aigua Milli-Q freda a la cubeta per ajudar a dissipar la calor generada pel pas de corrent mentre es realitza la transferència.

**Si volem transferir dos gels en aquest punt posem una *Sponge pads* i llavors repetim els passos (9.1.1.4.1., 9.1.1.4.2., 9.1.1.4.3., 9.1.1.4.4. i 9.1.1.4.5.).



- 9.1.1.5. Connectar a la font d'alimentació.
- 9.1.1.6. Encendre la font d'alimentació.
- 9.1.1.7. Condicions de la transferència:

Proteïnes entre 20-80kDa

(fonts de Bio-Rad PNT-PO0705-URLA-45 i PNT-PO0705-URLA-46)

- voltatge constant: 30V
- potència aproximada: 10-11W
- intensitat de corrent esperada: 170mA/gel al inici i de 110mA/gel al final
- temps de transferència a temperatura ambient: aprox 1 hora.

Proteïnes entre 60-250kDa

(fonts de Bio-Rad PNT-PO0705-URLA-45 i PNT-PO0705-URLA-46)

- voltatge constant: 30V
- potència aproximada: 10-11 W
- intensitat de corrent esperada: 220mA/gel al inici i de 180mA/gel al final
- temps de transferència a temperatura ambient: aprox 1 hora.

- 9.1.1.8. Un cop finalitzat el temps de transferència, apaguem l'aparell i obtenim la membrana per continuar el procediment.

Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

Transferència de proteïnes de gel a membrana de nitrocel·lulosa

PNT-PO0709-URLA-23

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 5 de 6

9.1.2. Transferència en el sistema iBlot Dry Blotting System - Invitrogen (PNT AP69-CRB)

Com a procediment alternatiu a la transferència en un sistema semi-wet mitjançant el XCell Blot Module (Invitrogen), existeix el sistema iBlot (Invitrogen) en què la transferència es realitza en sec i en només 6 minuts (veure PNT **AP69**. del CRB, adjunt a aquest document). Aquest equip de transferència es troba al laboratori del Centre de Recerca Biomèdica (CRB) de l'Hospital Universitari Sant Joan de Reus.



Les proteïnes de les quals s'ha optimitzat la transferència mitjançant l'iBlot són les següents: actina, Akt, pThr308-Akt, pSer473-Akt, ERK, p(Thr202,Tyr204)-ERK, FABP4, GSK-3 β , pSer9-GSK-3 β , Lamin B receptor, Nrf2, α -tubulin.

- 9.1.2.1. Encendre l'aparell perquè es vagi estabilitzant.
- 9.1.2.2. Treure de l'envàs el *iBlot Anode Stack-Bottom* i situar-lo al *iBlot Dry Blotting System*.
- 9.1.2.3. Posar el gel o gels per transferir sobre la membrana del *iBlot Anode Stack*. Amb un roller procurem que no ens quedin bombolles.
- 9.1.2.4. Mular el *iBlot Filter Paper* amb aigua Milli-Q, de manera que quedi completament mullat però no en excès.
- 9.1.2.5. Situar el paper de filtre mullat sobre els gels. Passar un roller per damunt del paper de filtre ja col·locat per eliminar possibles bombolles.
- 9.1.2.6. Treure de l'envàs el *iBlot Cathode Stack-Top* i situar-lo al damunt del paper de filtre. També és convenient passar el roller perquè el sistema quedi homogeni i sense bombolles.
- 9.1.2.7. Col·locar la *Disposable Sponge* a la tapa del *iBlot Dry Blotting System* i tancar el sistema.
- 9.1.2.8. Iniciar la transferència.



- 9.1.2.9. Un cop finalitzat el temps de transferència, apaguem l'aparell i obtenim la membrana per continuar el procediment.

9.2. En aquest punt és important no deixar assecar la membrana acabada de transferir. Hi ha dues opcions: 1) mantenir en TBS 1x; o, 2) passar al PNT-PO0709-URLA-46, en el pas de bloqueig.



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

Transferència de proteïnes de gel a membrana de nitrocel·lulosa

PNT-PO0709-URLA-23

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 6 de 6

10. Verificació de la tècnica i interpretació de resultats

11. Guia de problemes

Problema	Possible causa	Solució

12. Referències

- NuPAGE® Large Protein Analysis System:
http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/large_protein_analysis_man.pdf
- NuPAGE® Technical Guide
http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/nupage_tech_man.pdf
- XCell SureLock™ Mini-Cell
http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/surelock_man.pdf
- XCell™ Blot Module
http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/blotmod_pro.pdf

13. Control de la documentació

14. Annexos



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

Hibridació de membranes per la detecció de proteïnes

PNT-PO0709-URLA-46

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 1 de 5

1. Fonament i objectiu

Fonament. Tècnica analítica per la detecció de proteïnes específiques a partir d'un extracte o homogenat proteic. Aquesta tècnica és una aplicació de l'electroforesi SDS-PAGE (PNT-PO0709-URLA-03) i la transferència a membrana (PNT-PO0709-URLA-23) i, també, de la tècnica del dot blot. Les proteïnes separades mitjançant electroforesi SDS-PAGE són transferides des del gel a una membrana de nitrocel·lulosa, per capil·laritat o mitjançant l'aplicació de corrent elèctric, on poden ser detectades i identificades per hibridació amb anticossos específics. La membrana constitueix una rèplica del patró separació de proteïnes en el gel.

Aquesta és una tècnica qualitativa perquè l'anàlisi dels resultats es basa en l'aparició i visualització de bandes que corresponen a la proteïna estudiada. També pot ser una tècnica semiquantitativa si les bandes visualitzades es processen en un programa d'anàlisi d'imatge en el que es pugui fer una comparativa de la intensitat relativa d'aquestes.

Objectiu. Identificar proteïnes específiques procedents d'un homogenat de teixit o un extracte cel·lular.

2. Espècimen

Membrana de nitrocel·lulosa procedent de la transferència a partir de gel SDS-PAGE o de dot blot.

3. Documentació relacionada

4. Definicions

5. Historial de revisions

Modificacions efectuades	No de Revisió	Data
Iolanda Lázaro López	01	30/04/2010

6. Solucions, reactius i materials

Nom de la solució:	TBS 10x ⁽¹⁾	Volum final:	1l		
pH	7.4	Manipulació prèvia:	Ajustar a pH amb HCl 6N	Conservació:	4°C
Reactiu	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)		
KCl	60133 / Fluka	250mM (p/v)	30g		
NaCl	121659 / Panreac	1.5M (p/v)	80g		
Trizma base	T1503 / Sigma	27mM (p/v)	2g		
H ₂ O Milli-Q ⁽²⁾			800ml		

⁽¹⁾ En el moment d'utilitzar-lo, el necessitem a concentració TBS 1x, per tant hem de diluir-lo 1:10.
Relació: 100 ml TBS 10X + 900 ml aigua Milli-Q

⁽²⁾ Pesem tots els reactius i els dissolem en 800ml d'aigua Milli-Q, llavors ajustem el pH de la dissolució amb HCl fins a 7.4 i, finalment, afegim aigua Milli-Q fins a 1l.



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

Hibridació de membranes per la detecció de proteïnes

PNT-PO0709-URLA-46

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 2 de 5

Nom de la solució:	Solució de bloqueig al 2%		Volum final:	50ml ⁽¹⁾	
pH	---	Manipulació prèvia:	---	Conservació:	---
Reactiu	Referència / marca		Concentració final	Quantitat (unitats)	
Reactiu de bloqueig ECL	CPK1075 / GE-Amersham		2% (p/v)	1g	
Tween 20	17-1316-01/Amersham		0.1 % (v/v)	0.05ml	
TBS 1x	---		---	50ml	

⁽¹⁾ Depèn del tamany de la membrana que volem bloquejar.

Nom de la solució:	Solució de rentat		Volum final:	500ml ⁽¹⁾	
pH	---	Manipulació prèvia:	---	Conservació:	---
Reactiu	Referència / marca		Concentració final	Quantitat (unitats)	
SDS	L3771/Sigma		1% (v/v)	5ml	
Nonidet P40	74385/Fluka		0.5%	2.5ml	
TBS 1x	---		---	450ml	

Material	Capacitat	Tractament Previ	Observacions
Pipetes pasteur no estèrils	3.5ml	---	---
Pinces per la membrana	---	---	---
Tisores per la membrana	---	---	---
Cubetes de plàstic	---	---	---
Bosses de plàstic	---	---	---

7. Instrumentació i equips:

Equip	Ubicació	Núm. Inventari	Núm. PNT-EE	Observacions
pH-metre	Laboratori 2	012409	PNT-PO0705-URLA-07	---
Agitador (Heidolph)	Laboratori 1	012472	PNT-PO0705-URLA-14	---
Agitador magnètic HB502 (Bibby)	Laboratori 2	003528	PNT-PO0705-URLA-18	---
Agitador roller (Beckman Coulter)	Laboratori 2	012416	PNT-PO0705-URLA-19	---
Micropipeta 0.5-10µl (Eppendorf)	Laboratori 1/2	---	PNT-PO0705-URLA-25	---
Micropipeta 10-100µl (Eppendorf)	Laboratori 1/2	---	PNT-PO0705-URLA-25	---
Micropipeta 100-1000µl (Eppendorf)	Laboratori 1/2	---	PNT-PO0705-URLA-25	---
VersaDoc 4000 (Bio-Rad)	Laboratori 1	083271	PNT-PO0705-URLA-62	---
Agitador orbital (Stuart Scientific)	Cambra freda	003559	PNT-PO0705-URLA-74	---
Agitador magnètic HC1202 (Bibby)	Laboratori 2	---	PNT-PO0705-URLA-75	---
Balança analítica (AND)	Laboratori 2	012415	PNT-PO0705-URLA-76	---



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

Hibridació de membranes per la detecció de proteïnes

PNT-PO0709-URLA-46

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 3 de 5

8. Precaucions

Cal tenir en compte iniciem el procediment a partir d'una membrana per bloquejar, que cal evitar que s'assequi (veure PNT-PO0709-URLA-23).

9. Procediment

9.1. Bloqueig de la membrana

- 9.1.1. Preparar la solució de bloqueig 15 minuts abans de que finalitzi la transferència.
- 9.1.2. Recuperar la membrana de nitrocel·lulosa.
- 9.1.3. Bloquejar la membrana amb la solució de bloqueig. Hi ha diferents opcions possibles:
 - *overnight* a 4°C (a la cambra freda) amb agitació constant.
 - 1h a temperatura ambient amb agitació constant.
- 9.1.4. 20min a temperatura ambient amb agitació constant.

9.2. Hibridació amb els anticossos primari i secundari

- 9.2.1. Preparar la dilució de l'anticòs primari amb solució de bloqueig al 2% (veure taula de dilucions de l'annex).
- 9.2.2. Preparem una bossa de plàstic de mida ajustada a la membrana o bé un recipient i afegim l'anticòs primari diluït en solució de bloqueig. El volum de la dilució de l'anticòs estarà en funció de la mida de la membrana.
- 9.2.3. Incubació de l'anticòs primari: 1h a temperatura ambient o *overnight* a 4°C (si es vol augmentar la senyal), ambdues en agitació constant.
- 9.2.4. Rentar amb solució de rentat: 6 rentats de 5 minuts a temperatura ambient i amb agitació.
- 9.2.5. Eliminem les restes de detergent que puguin haver quedat a la membrana després dels rentats, fent dos rentats de posar-i-treure amb TBS 1x.
- 9.2.6. Preparar la dilució de l'anticòs secundari amb solució de bloqueig al 2% (veure taula de dilucions de l'annex).
- 9.2.7. Preparem una bossa de plàstic de mida ajustada a la membrana o bé un recipient i afegim la dilució de l'anticòs secundari. El volum de la dilució de l'anticòs estarà en funció de la mida de la membrana.
- 9.2.8. Incubació de l'anticòs secundari: 30 minuts a temperatura ambient amb agitació suau.
- 9.2.9. Rentar amb solució de rentat: 6 rentats de 5 minuts a temperatura ambient i amb agitació.
- 9.2.10. Rentats de TBS 1x: 2 rentats de 10 minuts amb agitació suau.
- 9.2.11. La membrana està preparada per ser revelada. Si es manté en TBS 1x sense agitació, pot estar una estona abans de ser revelada.

9.3. Revelat de la membrana

- 9.3.1. En el moment en què s'inicia els rentats després de la incubació amb l'anticòs primari, cal treure de la nevera els reactius de revelat ECL Advance (GE-Amersham) perquè s'atemperin.
- 9.3.2. Preparar la solució de revelat: barrejar a parts iguals les solucions A i B del kit en un tub apropiat pel volum final de la solució i folrat amb paper d'alumini per preservar de la llum la solució final.
- 9.3.3. Treure la membrana del TBS, escórrer l'excés sense que s'assequi i posar-la en una safata on es procedirà a impregnar-la amb el reactiu ECL. Dispensem el reactiu ECL per damunt de la membrana amb l'ajuda d'una pipeta pasteur i anem remullant la superfície amb el reactiu durant 5min, procurant fer-ho homogèniament i sense fer escuma.
- 9.3.4. Escórrer la membrana damunt d'un tros de paper de filtre.
- 9.3.5. Posar la membrana sobre un tros de plàstic i a la safata del VersaDoc 4000 (PNT-PO0705-URLA-62) i captem les imatges de la quimioluminiscència emesa.



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

Hibridació de membranes per la detecció de proteïnes

PNT-PO0709-URLA-46

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 4 de 5

10. Verificació de la tècnica i interpretació de resultats

S'obtenen bandes de diferents pesos moleculars i amb diferents intensitats. Hem d'interpretar les bandes segons el tractament que s'ha fet a les mostres.

Bandes de pesos superiors al pes molecular d'interès poden significar proteïna fosforilada, acetilada, etc.

O bé, la formació de dímers, trimers, etc.

Podem fer la quantificació de les bandes amb el software Quantity One (PNT-PO0709-URLA-12) del VERSADOC (BioRad) (PNT-PO0705-URLA-62).

11. Guia de problemes

Problema	Possible causa	Solució
Si apareix brutícia de fons a la membrana al revelar	No s'ha bloquejat la membrana de manera adequada	Diluir l'anticòs secundari
		Augmentar el temps de rentat i l'astringència de la solució (posar més detergent, augmentar la força iònica, etc.)
		Augmentar el bloqueig de la membrana
Apareixen bandes inespecífiques	Anticòs primari inespecífic	Disminuir la quantitat de proteïna que s'ha carregat
	Membrana poc bloquejada	Augmentar el bloqueig de la membrana.
Hi ha poca intensitat de les bandes	Poca quantitat de proteïna	Augmentar la quantitat de proteïna que s'ha carregat
	Temps de incubació del secundari molt curt	Incubar amb secundari <i>o/n</i>
Si la transferència no és homogènia	Les esponges poden estar gastades i no fan prou pressió entre la membrana i el gel.	Afegir més esponges o bé canviar les que hi ha per esponges noves
Bandes molt grans, com taques en poc temps d'exposició.	Massa proteïna	Carregar menys proteïna
		Diluir més l'anticòs primari
		Diluir més l'anticòs secundari

12. Referències

13. Control de la documentació



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

Hibridació de membranes per la detecció de proteïnes

PNT-PO0709-URLA-46

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 5 de 5

14. Annexos

14.1. Quadre resum de les especificacions per cada proteïna:

	Anticòs PRIMARI		Anticòs SECUNDARI		
	DILUCIÓ	INCUBACIÓ	TIPUS	DILUCIÓ	INCUBACIÓ
ACTINA	1:20000	1h, TA	anti-GOAT	1:10000	30min, TA
Akt	1:5000	o/n, 4°C	anti-RABBIT	1:10000	30min, TA
pThr308-Akt	1:2000	o/n, 4°C	anti-RABBIT	1:10000	30min, TA
pSer473-Akt	1:2000	o/n, 4°C	anti-RABBIT	1:10000	30min, TA
ERK	1:10000	o/n, 4°C	anti-RABBIT	1:10000	30min, TA
p(Thr202,Tyr204)-ERK	1:10000	o/n, 4°C	anti-RABBIT	1:10000	30min, TA
FABP4	1:500	o/n, 4°C	anti-GOAT	1:10000	30min, TA
GSK-3β	1:5000	o/n, 4°C	anti-RABBIT	1:10000	30min, TA
pSer9-GSK-3β	1:2000	o/n, 4°C	anti-RABBIT	1:10000	30min, TA
LAMIN B receptor	1:2500	o/n, 4°C	anti-RABBIT	1:10000	30min, TA
Nrf2	1:1000	o/n, 4°C	anti-RABBIT	1:10000	30min, TA
α-TUBULIN	1:5000	o/n, 4°C	anti-MOUSE	1:10000	30min, TA
eNOS	1:1000	o/n, 4°C	anti-RABBIT	1:10000	30min, TA
peNOS	1:1000	o/n, 4°C	anti-RABBIT	1:10000	30min, TA



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

Cèl·lules HCASMC

PNT-PO0709-URLA-18

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 1 de 2

1. Fonament i objectiu

1.1 Fonament. Cultiu cel·lular primari d'origen humà. Són cèl·lules musculars llises d'artèria coronària humana. Les cèl·lules es cultiven i divideixen adherides a la superfície del flascó de cultiu.

1.2 Objectiu. Creïxer i mantenir cèl·lules HCASMC en cultiu.

2. Espècimen

Cèl·lules HCASMC procedents de Cascade Biologics, C-017-5C

3. Documentació relacionada

4. Definicions

5. Historial de revisions

Modificacions efectuades	No de Revisió	Data

6. Solucions, reactius i materials

Nom de la solució:	Medi 231 suplementat	Volum final:	500 ml
pH	Manipulació prèvia:	Conservació:	4°C
Reactiu	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)
SMGS	M-231-500		25 ml
Gentamicin/Amphotericin	R-015-10		1 ml

7. Instrumentació i equips:

Equip	Ubicació	Núm. Inventari	Núm. PNT-EE	Observacions
Bany tèrmic	Laboratori de cultius	012458		
Cabina de flux laminar vertical - Telstar, CV-100	Laboratori de cultius	012457	PNT-PO0705-URLA-12	
Incubador de CO ₂ - Heraeus (HeraCell150)	Laboratori de cultius	085871	PNT-PO0705-URLA-48	

Elaborat per: Noemí Serra

Aprovat per: Lab-Manager

Aquest document en suport paper es considera document no controlat



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

Marcatge per IMMUNOFLUORESCÈNCIA en cèl·lules

PNT-PO0709-URLA-47

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 1 de 4

1. Fonament i objectiu

1.1. *Fonament.* La immunofluorescència és una tècnica que permet la visualització d'una proteïna específica o un antigen a cèl·lules o a seccions de teixit a través de la unió a un anticòs específic conjugat químicament a un fluorocrom, com per exemple *fluoresceïn isothiocyanate* (FITC). Existeixen dos tipus principals de marcatge per immunofluorescència: 1) el marcatge per **immunofluorescència directa**, en què l'anticòs primari està marcat amb un fluorocrom; i, 2) el marcatge per immunofluorescència indirecta en què l'anticòs secundari està marcat amb el fluorocrom i s'utilitza per reconèixer l'anticòs primari no marcat.

El marcatge per immunofluorescència es pot realitzar en cèl·lules fixades en portaobjectes i en seccions de teixits. Les mostres marcades per immunofluorescència s'observen mitjançant un microscopi de fluorescència o un microscopi confocal.

En aquest protocol es descriu el procediment pel marcatge per immunofluorescència indirecta de cèl·lules.

1.2. *Objectiu.* Marcar per immunofluorescència indirecta determinades proteïnes en cèl·lules fixades per valorar-ne qualitativament l'expressió com a resultat de les diferents condicions d'incubació.

1.3. *Utilitat.* Valoració *in situ* de l'expressió diferencial de determinades proteïnes per efecte de les condicions d'incubació aplicades.

2. Espècimen

Cèl·lules adherides cultivades en Lab-Tek II chamber slides.

3. Documentació relacionada

4. Definicions

5. Historial de revisions

Modificacions efectuades	No de Revisió	Data
Iolanda Lázaro López	01	30/04/2010

6. Solucions, reactius i materials

Nom de la solució:	D-PBS+2%FBS+0.1%BSA	Volum final:	50ml
pH	Manipulació prèvia:	Conservació:	4°C
Reactiu	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)
Foetal Bovine Serum Gold	A15-151/PAA (LabClinics)	2%	1ml
BSA	A3059/Sigma	0.1%	0.050g
D-PBS w/o Ca ²⁺ Mg ²⁺	14040-091 / GIBCO (Invitrogen)	1X	49ml

Nom de la solució:	Solució de permeabilització D-PBS+2%FBS+0.1%BSA+0.1% tritó	Volum final:	50ml
pH	Manipulació prèvia:	Conservació:	4°C
Reactiu	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)
Foetal Bovine Serum	A15-151/PAA (LabClinics)	2%	1ml

Elaborat per: Iolanda Lázaro López

Aprovat per: Lab-Manager

Aquest document en suport paper es considera document no controlat

	UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI	
Procediment Normalitzat de Treball Metodològic		
Marcatge per IMMUNOFLUORESCÈNCIA en cèl·lules		
PNT-PO0709-URLA-47	Revisió: 00	Data: 24-07-2008
		Pàgina: 2 de 4

Gold			
BSA	A3059 / Sigma	0.1%	0.050g
Tritó X-100	161-0407 / Bio-Rad	0.1%	0.050ml
D-PBS w/o Ca ²⁺ Mg ²⁺	14040-091 / GIBCO	1X	5ml

Nom de la solució:		Solució de fixació		Volum final:		10ml	
pH		Manipulació prèvia:		Conservació:		4°C	
Solució Mare		Referència / marca		Concentració final		Quantitat (unitats)	
Paraformaldehid al 4%				2%		5ml	
D-PBS w/o Ca ²⁺ Mg ²⁺		14040-091 / GIBCO		1X		5ml	

Material	Capacitat	Tractament Previ	Observacions
Lab-Tek II chamber slides – Nunc (#154526)	1.8cm ² /well	(estèrils)	---
puntes micropipeta	0.5-10µl	----	----
puntes micropipeta	2-200µl	----	----
puntes micropipeta	100-1000µl	----	----
Pipetes pasteur	3.5ml	----	----
tubs eppendorf	1.5ml	----	----
Xeringues 5ml – BD Plastipak	5ml	----	----
Agulles 21G1/2 (verds) – Microlance BD,	21G1/2	----	----
Paper de filtre que no deixi fibres - TORK	----	-----	----

7. Instrumentació i equips:

Equip	Ubicació	Núm. Inventari	Núm. PNT-EE	Observacions
Microscopi invertit de contrast de fases, 1IX71S8F3 amb mòdul de fluorescència (Olympus)	Laboratori de Cultius	----	PNT-PO0705-URLA-26	
Agitador roller (Beckman-Coulter)	Laboratori 2	012416	PNT-PO0705-URLA-19	

8. Precaucions

9. Procediment

- 9.1. Observem les cèl·lules al microscopi. Amb l'observació de les cèl·lules al microscopi, determinarem l'estat en què es troben les cèl·lules a partir de les quals es realitzarà el marcatge per immunofluorescència de la proteïna o les proteïnes d'interès.
- 9.2. Eliminem el medi d'incubació de cada pouet de chamber.
- 9.3. Rentats amb D-PBS w/o Ca²⁺ Mg²⁺ fred: 2 rentats per pouet, 500µl/rentat.

Elaborat per: Iolanda Lázaro López
Aprovat per: Lab-Manager

Aquest document en suport paper es considera document no controlat

Procediment Normalitzat de Treball Metodològic
Marcatge per IMMUNOFLUORESCÈNCIA en cèl·lules

PNT-PO0709-URLA-47

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 3 de 4

- 9.4. Fixació amb paraformaldehid al 2% en D-PBS: 20 minuts, a 4°C, 500µl/pouet.
(Important: cal realitzar el procés de fixació en una nevera en què no hi hagi anticossos)
- 9.5. Eliminem el fixador.
(Important: cal gestionar de manera separada els residus derivats de la fixació i els posteriors rentats de la resta de residus; per la toxicitat del paraformaldehid).
- 9.6. Rentats amb D-PBS+2% FBS+0.1% BSA: 1 rentat per pouet, 500µl/rentat.
- 9.7. Permeabilització amb D-PBS+2% FBS+0.1% BSA+0.1% tritó: 500µl/pouet, 5 minuts, temperatura ambient.
- 9.8. Eliminem la solució de permeabilització de cada pouet.
- 9.9. Rentats amb D-PBS+2% FBS+0.1% BSA: 1 rentat per pouet, 500µl/rentat.
- 9.10. Preparació de les dilucions dels anticossos primaris.
La dilució dels anticossos primaris es realitza en la solució D-PBS+2% FBS+0.1% BSA. Cal considerar un volum de 80µl per pou de chamber (1.8cm²).

Les dilucions dels anticossos primaris dels marcatges per immunofluorescència realitzats fins el moment són les següents:

Anticòs primari		Dilució
goat polyclonal anti-FABP4	#AF1443 – R&D Systems	1:10
rabbit polyclonal anti-FABP4	#RD181037050 – BioVendor	1:500
rabbit monoclonal anti-phospho-Akt (Ser473)	#4060 – Cell Signaling	1:50
rabbit monoclonal anti-phospho-Nrf2 (Ser40)	#2073-1 - Epitomics	1:200

- 9.11. Eliminar la solució de D-PBS+2% FBS+0.1% BSA de cada pou.
- 9.12. Afegir la corresponent dilució d'anticòs primari a cada pouet.
- 9.13. Incubació amb l'anticòs primari: *overnight*, 4°C, en cambra humida.
- 9.14. Eliminar la dilució de l'anticòs primari de cada pouet.
- 9.15. Rentats amb D-PBS+2% FBS+0.1% BSA: 3 rentats per pouet, 500µl/rentat.
- 9.16. Preparació de les dilucions dels anticossos secundaris (a les fosques).
La dilució dels anticossos secundaris es realitza en la solució D-PBS+2% FBS+0.1% BSA. Cal considerar un volum de 80µl per pou de chamber (1.8cm²).

Les dilucions dels anticossos secundaris dels marcatges per immunofluorescència realitzats fins el moment són les següents:

Anticòs secundari		Dilució
anti-rabbit-FITC	#111-096 045 – Jackson ImmunoResearch Laboratories	1:50
anti-goat-PE	#705-116 147 – Jackson ImmunoResearch Laboratories	1:50



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

Marcatge per IMMUNOFLUORESCÈNCIA en cèl·lules

PNT-PO0709-URLA-47

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 4 de 4

- 9.17. Eliminar la solució de D-PBS+2% FBS+0.1% BSA de cada pou.
- 9.18. Afegir la corresponent dilució d'anticòs secundari a cada pou.
- 9.19. Incubació amb l'anticòs secundari: 4 hores, temperatura ambient, en cambra humida i a les fosques.
- 9.20. Eliminar la dilució de l'anticòs primari de cada pouet.
- 9.21. Rentats amb D-PBS w/o Ca^{2+} Mg^{2+} : 3 rentats per pouet, 500µl/rentat.
- 9.22. Marcatge de nuclis amb DAPI: 80µl sol DAPI/pou, 5 minuts, temperatura ambient, a les fosques.
- 9.23. Eliminar la solució del marcatge de nuclis.
- 9.24. Rentats amb D-PBS w/o Ca^{2+} Mg^{2+} : 3 rentats per pouet, 500µl/rentat.
- 9.25. Eliminar la solució del darrer rentat.
- 9.26. Desmuntar la peça de conforma les parets de les chambers i obtenir el portaobjectes en què es troben les cèl·lules.
- 9.27. Assecar de costat sobre un paper que no deixi fibres, el possible excés de la solució de rentat.
- 9.28. Afegir una gota de medi de muntatge (mowiol) a l'espai que delimitava cada pouet. Cobrir els pouets amb un cobreobjectes.
- 9.29. Deixar solidificar el medi de muntatge durant 24 hores previ a l'observació al microscopi de fluorescència.

10. Verificació de la tècnica i interpretació de resultats

11. Guia de problemes

Problema	Possible causa	Solució

12. Referències

13. Control de la documentació

14. Annexos

Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

Immunoprecipitació de la cromatina (Nrf2)

PNT-PO0709-URLA-42

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 1 de 6

1. Fonament i objectiu

La immunoprecipitació de la cromatina permet detectar factors de transcripció units al promotor d'un gen *in vivo*.

Amb aquesta tècnica es fixen les cèl·lules, s'obté la cromatina, es fragmenta, mitjançant un anticòs específic contra la proteïna d'interès (en el nostre cas un anticòs contra Nrf2) s'immunoprecipita el fragment de la cromatina unit al factor de transcripció d'interès i, finalment, es detecta per PCR si hi ha unió d'aquest factor de transcripció.

2. Espècimen

2 flascons de 75cm² de macròfags THP-1 amb 7.8125·10⁶ cèl·lules/flascó per cada condició.

3. Documentació relacionada

Manual d'instruccions:

EZ-Zyme™ chromatin prep kit, ref. 17-375 (Upstate, Millipore)

EZ ChIP™ chromatin immunoprecipitation kit, ref. 17-371 (Upstate, Millipore)

4. Definicions

5. Historial de revisions

Modificacions efectuades	No de Revisió	Data
Iolanda Lázaro López	01	30/04/2010

6. Solucions, reactius i materials

Nota: com es tracta de kits comercials, totes les solucions i reactius que són necessaris, venen inclosos en el propi kit, excepte del formaldehid al 37%. Només cal seguir les indicacions del protocol proporcionat per la casa comercial. Tots els reactius proporcionats estan preparats per fer-los servir.

Nom de la solució:	Volum final:		
pH	Manipulació prèvia:	Conservació:	
Reactiu	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)

Nom de la solució:	Volum final:		
pH	Manipulació prèvia:	Conservació:	
Reactiu	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)

Material	Capacitat	Tractament Previ	Observacions
tubs eppendorf	1,5ml	----	No és necessari autoclavat
puntes micropipeta	2-200µl	----	No és necessari autoclavat
puntes micropipeta	100-1000µl	----	No és necessari autoclavat



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

Immunoprecipitació de la cromatina (Nrf2)

PNT-PO0709-URLA-42

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 2 de 6

7. Instrumentació i equips:

Equip	Ubicació	Núm. Inventari	Núm. PNT-EE	Observacions
Vòrtex (Ika)	Laboratori 1	055054	PNT-PO0705-URLA-33	
Centrífuga Multifuge 3L-R (Heraeus)	Laboratori 1	---	PNT-PO0705-URLA-37	
Centrífuga (Hettich)	Laboratori 2	003532	PNT-PO0705-URLA-67	
Agitador de rotació (Heidolph)	Cambra freda	012483	PNT-PO0705-URLA-114	
Termociclador 2400 (Applied Biosystems)	Laboratori 2	038481	PNT-PO0705-URLA-31	
Termociclador 2720 (Applied Biosystems)	Laboratori 2	---	PNT-PO0705-URLA-111	
Bany Tèrmic 320 OR (Selecta)	Laboratori 2	012590	PNT-PO0705-URLA-80	
Pipetes automàtiques 0.5-10µl (Eppendorf)	Laboratori 1	---	PNT-PO0705-URLA-25	
Pipetes automàtiques 10-100µl (Eppendorf)	Laboratori 1	---	PNT-PO0705-URLA-25	
Pipetes automàtiques 100-1000µl (Eppendorf)	Laboratori 1	---	PNT-PO0705-URLA-25	

8. Precaucions

És imprescindible llegir-se el protocol de la casa comercial que ve amb el kit abans d'iniciar el procediment.

9. Procediment

Nota #1. Aquests kits comercials inclouen un protocol proporcionat per la casa comercial; s'indica seguir les instruccions de procediment proporcionades per la casa comercial.

Obtenció i fragmentació de la cromatina

- 9.1. Partim de 2 flascons de 75cm² de macròfags THP-1 (2 T75 \approx 15.625 10⁶ cèl·lules) amb 15ml de medi per flascó i per condició. Treiem les cèl·lules de l'incubador, les observem al microscopi i portem els flascons a la campana extractora. Treiem 4.4ml de medi de cada flascó i hi afegim 294µl de formaldehid 37%.
- 9.2. Incubem els flascons 10min a temperatura ambient.
- 9.3. Afegim 1ml de glicina 10x a cada flascó.
- 9.4. Incubem els flascons 5min a temperatura ambient.
- 9.5. Posem els flascons sobre gel picat.
- 9.6. Eliminem el medi.
- 9.7. Rentem els flascons 2 vegades amb D-PBS fred utilitzant 8.5ml per cada rentat.
- 9.8. Eliminem el D-PBS.
- 9.9. Posem 1ml de D-PBS fred amb anti-proteases (2ml DPBS + 10µl anti-proteases).
- 9.10. Rasquem els flascons amb un cell-lifter.
- 9.11. Recuperem les cèl·lules dels 2 flascons i les traspassem totes a un tub de 15ml.
- 9.12. Centrifuguem les cèl·lules a 720g, 4°C, 10min en un rotor oscil·lant.
- 9.13. Eliminem el sobrenedant.
- 9.14. Congelem els pellets en N₂ líquid o en un bany d'etanol i gel sec.
- 9.15. Guardem els pellets congelats a -80°C.
- 9.16. Descongelem el pellet en gel picat.
- 9.17. Resuspenem el pellet en 312.5µl ice-cold EZ-zyme lysis buffer amb anti-proteases (3.125µl anti-proteases + 309.4µl ice-cold EZ-zyme lysis buffer).



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

Immunoprecipitació de la cromatina (Nrf2)

PNT-PO0709-URLA-42

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 3 de 6

- 9.18. Ho passem a un tub eppendorf de 1.5ml
- 9.19. Incubem 30min en gel.
- 9.20. Congelem en N₂ líquid o en un bany d'etanol i gel sec.
- 9.21. Descongelem en un bany 37°C fins que està totalment descongelat, no esperar més.
- 9.22. Repetir cong/descong 2 vegades més.
- 9.23. Centrifugar a 2500g, 10min, 4°C.
- 9.24. Durant la centrifugació preparar: (234.4µl ice-cold EZ-zyme digestion buffer + 2.3µl anti-proteases + 1.6µl EZ-zyme enzymatic cocktail = 238.3µl), ho guardem en gel i ho pre-escalfem 5min a 37°C.
- 9.25. Eliminem el sobrenedant.
- 9.26. Afegim 234.4µl EZ-zyme enzymatic cocktail pre-escalfat i resuspenem el pellet amb la pipeta automàtica.
- 9.27. Incubem a 37°C, 10min, mentre anem agitant el tub.
- 9.28. Clavem el tub en gel
- 9.29. Afegim 234.4µl EZ-zyme stop buffer.
- 9.30. Incubem 10min en gel.
- 9.31. Centrifuguem 13500g, 15min, 4°C.
- 9.32. Recollim el sobrenedant (on hi ha la cromatina).
- 9.33. Guardem 9 ml en gel i fem 6 alíquotes de 100µl, les guardem a -80°C.
- 9.34. Si es vol comprovar la digestió de la cromatina es pot fer en aquest pas preparant un gel d'acrilamida-bisacrilamida del 12% (2.05ml 40% bis/acril + 0.68ml TBE 10x, 4.06ml H₂O destil·lada, 60µl APS + 3.85µl TEMED).
Fer electroforesi a 200V. Utilitzar el marcador de PM de DNA (2µl), 9µl de mostra i afegir 4 µltampó de càrrega. Veure PNTs d'equips: font d'electroforesi PowerPac HC (Bio-Rad) (PNT-PO0705-URLA-46) i Mini Protean II 3 Cell (Bio-Rad) (PNT-PO0705-URLA-65).
Tenyir amb Sybr-Safe (PNT-PO0709-URLA-32) i visualitzar el resultat amb el VersaDoc4000 (PNT-PO0705-URLA-62).

Immunoprecipitació dels complexos Nrf2/DNA

- 9.35. Barrejar 100µl cromatina digerida + 900µl dilution buffer + 4.5µl inhibidors proteases + 60µl proteïna G agarosa en un tub eppendorf de 1.5ml en gel (per cada condició, és a dir per cada anticòs que es vulgui utilitzar, en el nostre cas 1. anti-Nrf2, 2. anti-RNApolII com a control positiu, 3. IgG normal rabbit com a control negatiu)
- 9.36. Incubar 1h a 4°C en rotació.
- 9.37. Centrifugar a 10000g, 2min, rotor fix, (Heraeus, PNT-PO0705-URLA-37).
- 9.38. Guardar 10µl del sobrenedant a 4°C i passar la resta del sobrenedant a un tub nou.
- 9.39. Afegir a aquest sobrenedant l'anticòs corresponent:
 - 25µl anticòs-anti-Nrf2 (5µg)
 - 1µl anticòs-anti-RNApolII (1µg)
 - IgG normal rabbit (1µg)
- 9.40. Incubar O/N a 4°C en rotació al agitador en rotació Heidolph (PNT-PO0705-URLA-114).
- 9.41. Afegir 60µl proteïna G agarosa.
- 9.42. Incubar 1h a 4°C en rotació.
- 9.43. Centrifugar a 10000g, 2min, rotor fix (Heraeus, PNT-PO0705-URLA-37).
- 9.44. Eliminar sobrenedant.
- 9.45. Afegir 1ml del low salt immune complex wash buffer fred.
- 9.46. Incubar 5min en rotació.
- 9.47. Centrifugar a 10000g, 2min, rotor fix (Heraeus, PNT-PO0705-URLA-37).
- 9.48. Eliminar sobrenedant.
- 9.49. Afegir 1ml del high salt immune complex wash buffer fred.
- 9.50. Incubar 5min en rotació.
- 9.51. Centrifugar a 10000g, 2min, rotor fix (Heraeus, PNT-PO0705-URLA-37).
- 9.52. Eliminar sobrenedant.
- 9.53. Afegir 1ml del LiCl immune complex wash buffer fred.
- 9.54. Incubar 5min en rotació.
- 9.55. Centrifugar a 10000g, 2min, rotor fix (Heraeus, PNT-PO0705-URLA-37).
- 9.56. Eliminar sobrenedant.



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

Immunoprecipitació de la cromatina (Nrf2)

PNT-PO0709-URLA-42

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 4 de 6

- 9.57. Afegir 1ml del TE buffer fred.
- 9.58. Incubar 5min en rotació.
- 9.59. Centrifugar a 10000g, 2min, rotor fix (Heraeus, PNT-PO0705-URLA-37).
- 9.60. Eliminar sobrenedant.
- 9.61. Afegir 1ml del TE buffer fred.
- 9.62. Incubar 5min en rotació.
- 9.63. Centrifugar a 10000g, 2min, rotor fix (Heraeus, PNT-PO0705-URLA-37).
- 9.64. Eliminar sobrenedant.

Elució complexos Nrf2/DNA

- 9.65. Preparar 200µl d'elution buffer/tub (10µl SDS 20% + 20µl 1M NaHCO₃ + 170ml H₂O destil·lada).
- 9.66. Afegir 100µl elution buffer/tub.
- 9.67. Barrejar suaument.
- 9.68. Incubar 15min a temperatura ambient.
- 9.69. Centrifugar a 10000g, 2min, rotor fix (Heraeus, PNT-PO0705-URLA-37).
- 9.70. Recollir el sobrenedant en tubs nous.
- 9.71. Repetir els passos 9.66-9.70 i combinar els sobrenedants.

Revertir unions complexes proteïna/DNA per obtenir el DNA lliure

- 9.72. Afegir 8µl 5M NaCl/tub. Repartir en tubs de PCR 0.2ml.
- 9.73. Incubar 65°C O/N en el termociclador 2400 (PNT-PO0705-URLA-31).
- 9.74. Afegir 1µl RNAsa A.
- 9.75. Incubar 30min a 37°C en el termociclador 2400 (PNT-PO0705-URLA-31).
- 9.76. Afegir 4µl 0.5M EDTA, 8µl 1M Tris-HCl i 1µl proteïnasa K.
- 9.77. Incubar 2h a 45°C.

Purificació DNA mitjançant *spin columns*

- 9.78. Barrejar 200µl DNA amb 1ml bind reagent A.
- 9.79. Transferir 600µl de la barreja a una *spin filter* en un tub de recollida.
- 9.80. Centrifugar a 13500g, 50 segons, rotor fix (Hettich, PNT-PO0705-URLA-67).
- 9.81. Eliminar el filtrat, recuperar el tub recollida i transferir a la *spin filter* els 600µl restants.
- 9.82. Centrifugar a 13500g, 50 segons, rotor fix (Hettich, PNT-PO0705-URLA-67).
- 9.83. Eliminar el filtrat, recuperar el tub recollida.
- 9.84. Afegir 500µl del wash reagent B.
- 9.85. Centrifugar a 13500g, 50 segons, rotor fix (Hettich, PNT-PO0705-URLA-67).
- 9.86. Eliminar el filtrat, recuperar el tub recollida.
- 9.87. Centrifugar a 13500g, 50 segons, rotor fix (Hettich, PNT-PO0705-URLA-67).
- 9.88. Eliminar el filtrat, canviar el tub recollida.
- 9.89. Afegir 50µl elution buffer C al centre del filtre.
- 9.90. Centrifugar a 13500g, 50 segons, rotor fix (Hettich, PNT-PO0705-URLA-67).
- 9.91. Eliminar la columna i guardar l'eluit (DNA purificat) en alíquotes a -20°C.

PCR promotor FABP4 amb primers lloc ARE (lloc d'unió de Nrf2)

- 9.92. Fer la PCR.

#control *primers* kit (GAPDH)

- 1. sense DNA
- 2. DNA (anti-RNApolII)

primers ARE promotor FABP4

- 3. DNA (anti-Nrf2)



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

Immunoprecipitació de la cromatina (Nrf2)

PNT-PO0709-URLA-42

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 5 de 6

Tub 1.

6.4µl H₂O
1µl 10x PCR buffer
1.2µl MgCl₂
0.8µl dNTPs
0.4µl *primers* control kit
0.2µl Taq

Tub 2.

2.4µl H₂O
1µl 10x PCR buffer
1.2µl MgCl₂
0.8µl dNTPs
0.4µl *primers* control kit
0.2µl Taq
4µl DNA (anti-RNAPolII)

Tub 3.

2µl H₂O
1µl 10x PCR buffer
1.2µl MgCl₂
0.8µl dNTPs
0.4µl *primer* R-ARE FABP4
0.4µl *primer* F-ARE FABP4
0.2µl Taq
4µl DNA (anti-Nrf2)

Programa PCR primers control kit

94°C 3 min

40 cicles:

94°C 20 segons

59°C 30 segons

72°C 30 segons

72°C 2min

Termociclador 96 pous

Programa PCR primers ARE promotor FABP4

94°C 3 min

40 cicles:

94°C 20 segons

40°C 30 segons

72°C 30 segons

72°C 2min

Termociclador 24 pous

9.93. Preparar un gel d'acrilamida-bisacrilamida del 15% (2.25ml 40% bis/acril + 0.6ml TBE 10x, 3.09ml H₂O destil·lada, 60µl APS + 2.5µl TEMED). Fer electroforesi a 200V. Utilitzar el marcador de PM de DNA (2µl), 9µl de mostra i afegir 4µl tampó de càrrega. Veure PNTs d'equips: font d'electroforesi PowerPac HC (Bio-Rad) (PNT-PO0705-URLA-46) i Mini Protean II 3 Cell (Bio-Rad) (PNT-PO0705-URLA-65).

9.94. Tenyir amb Sybr-Safe (PNT-PO0709-URLA-32) i visualitzar el resultat amb el VersaDoc4000 (PNT-PO0705-URLA-62).

10. Verificació de la tècnica i interpretació de resultats

- El tub que no conté DNA no ha de donar cap banda, és el control negatiu de la PCR.
- El tub que conté DNA (anti-RNAPolII) i primers control del kit, és el control positiu de la tècnica de ChIP, ja que GAPDH s'expressa constitutivament i RNAPolII sempre està en el complex transcripcional. La banda obtinguda en el gel final ha d'estar entre 150-200bp (≈166bp).
- El tub que conté DNA (anti-Nrf2) i els *primers* del lloc ARE de la FABP4 pot ser que doni una banda (≈153bp), això vol dir que Nrf2 s'uneix a aquest lloc *in vivo* en les condicions en les que tenim les cèl·lules i si no dona banda és que no és un lloc d'unió de Nrf2.

Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

Immunoprecipitació de la cromatina (Nrf2)

PNT-PO0709-URLA-42

Revisió: 00

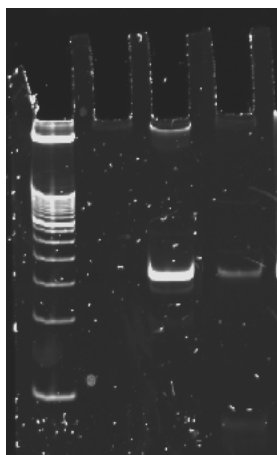
Data: 24-07-2008

Pàgina: 6 de 6

- Si posem tub amb DNA (IgG normal rabbit) no hauria de donar cap banda, ja que seria el control negatiu que la immunoprecipitació és específica, ja que és el mateix anticòs que Nrf2 sense l'epítip.

Exemple de resultat. Carrils (d'esquerra a dreta):

1. Marcador de pes molecular
2. Mostra tub 1
3. Mostra tub 2.
4. Mostra tub 3.



11. Guia de problemes

Problema	Possible causa	Solució

12. Referències

13. Control de la documentació

14. Annexos

Manual d'instruccions:

EZ-Zyme™ chromatin prep kit, ref. 17-375 (upstate, Millipore)

EZ ChIP™ chromatin immunoprecipitation kit, ref. 17-371 (upstate, Millipore)

Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

Human Adipocyte FABP ELISA - FABP4

PNT-PO0709-URLA-11

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 1 de 8

1. Fonament i objectiu

1.1. *Fonament*: L'ELISA de l'*adipocyte fatty acid binding protein* humana (A-FABP – Cat. No. RD191036200R) de BioVendor és un *biotin labelled antibody based sandwich enzyme immunoassay* per la determinació quantitativa d'A-FABP humana en sèrum, plasma i extractes de teixits i medi de cultiu.

A l'ELISA, els calibradors i les mostres són incubats amb un anticòs *goat polyclonal* anti-A-FABP humana retintut en pous de placa de 96 pous. Després d'una hora d'incubació i una sèrie de rentats, s'afegeix un anticòs policlonal anti-A-FABP marcat amb biotina i s'incuba amb l'A-FABP capturada durant una hora. Després d'una segona sèrie de rentats, s'afegeix un conjugat *streptavidin-horseradish* peroxidase. Després de 30 minuts d'incubació i l'última sèrie de rentats, el conjugat remanent permet reaccionar amb el substrat H_2O_2 -*tetramethylbenzidine*. La reacció s'atura per l'addició d'una solució àcida i l'absorbància del producte groc resultant es mesura a 450nm. L'absorbància és proporcional a la concentració d'A-FABP. La corba estàndard es construeix representant els valors d'absorbància vers les concentracions d'A-FABP, i les concentracions de les mostres desconegudes es determinen utilitzant la corba estàndard.

1.2. *Objectiu*. Determinar quantitativament l'A-FABP humana en sèrum, plasma i extractes de teixits i medi de cultiu.

2. Espècimen

Sèrum o plasma humà, extractes de teixits o medi de cultiu.

3. Documentació relacionada

Document adjunt: protocol del kit ELISA de BioVendor en format pdf.

4. Definicions

5. Historial de revisions

Modificacions efectuades	No de Revisió	Data
Iolanda Lázaro López	01	30/04/2010

6. Solucions, reactius i materials

Nota: com es tracta d'un kit ELISA comercial, totes les solucions i reactius que són necessaris, venen inclosos en el propi kit. Només cal seguir les indicacions del protocol proporcionat per la casa comercial. Tots els reactius proporcionats estan preparats per fer-los servir, excepte el *A-FABP Master Calibrator*, els *Quality Controls* i el *Wash Solution Concentrate (10x)*. A l'apartat número 9, s'indica la seva preparació.

Nom de la solució:		Volum final:	
pH		Manipulació prèvia:	
		Conservació:	
Reactiu	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

Human Adipocyte FABP ELISA - FABP4

PNT-PO0709-URLA-11

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 2 de 8

Material	Capacitat	Tractament Previ	Observacions
tubs eppendorf	1,5ml	----	No és necessari autoclavat
probeta	1l	----	----
puntes micropipeta	2-200µl	----	No és necessari autoclavat
puntes micropipeta	100-1000µl	----	No és necessari autoclavat
puntes micropipeta multicanal	50-350µl	----	No és necessari autoclavat

7. Instrumentació i equips:

Equip	Ubicació	Núm. Inventari	Núm. PNT-EE	Observacions
Lector ELISA BioWhittaker KINETIC-QCL	Laboratori 2	012592	PNT-PO0705-URLA-57	
Agitador roller (Beckman-Coulter)	Laboratori 2	012416	PNT-PO0705-URLA-19	
Agitador orbital	(propietat de Psiquiatria)	----	----	Ens el deixen fer servir cada vegada que el necessitem.
Micropipeta multicanal (LabSystems)	Laboratori 1/2	----	PNT-PO0705-URLA-93	
Micropipeta 2-200µl (Eppendorf)	Laboratori 1/2	----	PNT-PO0705-URLA-25	
Micropipeta 100-1000µl (Eppendorf)	Laboratori 1/2	----	PNT-PO0705-URLA-25	

8. Precaucions

És imprescindible llegir-se el protocol de la casa comercial que ve amb el kit abans d'iniciar el procediment. Cada lot sol tenir una actualització del protocol i en cada compra ens arriba un lot diferent.

9. Procediment

Nota #1. Aquest kit ELISA comercial inclou un protocol proporcionat per la casa comercial; s'indica seguir les instruccions de procediment proporcionades per la casa comercial.

Nota #2. Tots els reactius s'han d'atemperar previ a fer-los servir; també, s'han de portar a temperatura ambient, les mostres de plasma i sèrum previ a ser pipetejades.

Nota #3. Per realitzar aquest kit es necessita 1 litre d'aigua Milli-Q per placa, que sigui recent. És a dir, del mateix dia o del dia anterior.

Nota #4. Si no es necessita tota la placa, es poden retirar les tires que no siguin necessàries i guardar-les en un altre marc de placa de 96 pous dins la bossa d'alumini proporcionada amb la bosseta dessecant i segellar-la. Cal guardar-la a 2-8°C, preservant-la de la humitat.

Elaborat per: Iolanda Lázaro López

Aprovat per: Lab-Manager i Responsable de qualitat

Aquest document en suport paper es considera document no controlat



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

Human Adipocyte FABP ELISA - FABP4

PNT-PO0709-URLA-11

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 3 de 8

9.1. Preparació dels reactius

9.1.1. Wash solution

Diluir els 100ml de *Wash Solution Concentrate* amb 900ml d'aigua Milli-Q en una probeta de 1l. Estabilitat i emmagatzematge: la *Wash solution* diluïda és estable durant un mes a 2-8°C.

9.1.2. Human A-FABP Calibrators

IMPORTANT: per la reconstitució del *Master Calibrator* liofilitzat amb el *Dilution Buffer*, cal consultar en cada cas el *Certificate of Analysis* que va inclòs en cada kit (fulla groga).

Reconstituir el *Master Calibrator* liofilitzat amb el *Dilution Buffer* previ a l'inici de l'assaig. Afegir el volum indicat de *Dilution Buffer* i deixar dissoldre com a mínim 15 minuts, en el *roller*. La concentració resultant de la solució estoc d'AFABP humana és de 25ng/ml.

Estabilitat i emmagatzematge: els calibradors són estables fins a la data de caducitat indicada si es conserven a -20°C.

9.1.3. Quality Controls

IMPORTANT: per la reconstitució dels *Quality Controls* liofilitzats amb aigua Milli-Q, cal consultar en cada cas el *Certificate of Analysis* que va inclòs en cada kit.

Reconstituir els *Quality Controls (HIGH i LOW)* liofilitzats amb el aigua Milli-Q previ a l'inici de l'assaig.

Cal tractar els controls com a mostres; per tant, cal diluir-los 1:10 amb *Dilution Buffer* abans de ser utilitzats.

Per exemple: 30µl *Quality Control* + 270µl *Dilution Buffer*

Estabilitat i emmagatzematge: els controls de qualitat reconstituïts però no diluïts, són estables fins a la data de caducitat indicada si es conserven a -20°C.

9.2. Preparació de la corba estàndard

El *Master Calibrator* reconstituït constitueix la solució estoc d'AFABP de 25ng/ml. La corba estàndard es prepara a partir de l'estoc per dilucions seriades amb *dilution buffer* segons la següent taula:

	Volum estàndard	Volum <i>Dilution Buffer</i>	Concentració
Estàndard 6	solució estoc <i>Master Calibrator</i>	---	25 ng/ml
Estàndard 5	500µl estàndard 6	750µl	10 ng/ml
Estàndard 4	500µl estàndard 5	500µl	5 ng/ml
Estàndard 3	500µl estàndard 4	500µl	2.5 ng/ml
Estàndard 2	500µl estàndard 3	750µl	1 ng/ml
Estàndard 1	500µl estàndard 2	500µl	0.5 ng/ml

Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

Human Adipocyte FABP ELISA - FABP4

PNT-PO0709-URLA-11

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 4 de 8

9.3. Preparació de les mostres

La dilució recomanada per les mostres de sèrum o plasma és de 1:10 amb *Dilution Buffer*. Depenent del tipus de població d'estudi es podria requerir una altra dilució.

Es recomana: 30µl mostra + 270µl *dilution buffer*.

Estabilitat i emmagatzematge: no guardar les mostres diluïdes.

9.4. Procediment experimental

- 9.4.1. Preparar una plantilla amb el disseny de la placa ELISA, en què a cada pou de la placa s'indiqui què hi correspon (blancs, estàndards, controls i mostres).
- 9.4.2. Pipetejar 100µl dels estàndards, els controls de qualitat, el blanc (*dilution buffer*) i les mostres; preferiblement per duplicat d'acord amb la plantilla prèviament dissenyada. Quan s'hagin dispensat totes les mostres, cal eliminar les bombolles generades en dispensar amb una agulla de xeringa. Seguidament, cal segellar la placa amb un film adhesiu transparent.
- 9.4.3. Incubar la placa a temperatura ambient durant 1 hora, en un agitador orbital a 100rpm.
- 9.4.4. Primera sèrie de rentats.
Eliminar el volum dels pous i picar la placa sobre un bloc de papers de filtre, perquè quedi ben seca.
Rentar amb la micropipeta multicanal amb wash solution 1x: 300µl/pou.
Omplir la placa, buidar-la i picar-la sobre papers de filtre.
Realitzar aquesta operació 5 vegades.
Després del darrer rentat, cal eliminar les bombolles amb una agulla de xeringa.
- 9.4.5. Pipetejar 100µl de *Biotin Labelled Anti-A-FABP Antibody Solution* a cada pou.
- 9.4.6. Incubar la placa a temperatura ambient durant 1 hora, en un agitador orbital a 100rpm.
- 9.4.7. Segona sèrie de rentats.
Eliminar el volum dels pous i picar la placa sobre un bloc de papers de filtre, perquè quedi ben seca.
Rentar amb la micropipeta multicanal amb wash solution 1x: 300µl/pou.
Omplir la placa, buidar-la i picar-la sobre papers de filtre.
Realitzar aquesta operació 5 vegades.
- 9.4.8. Després del darrer rentat, cal eliminar les bombolles amb una agulla de xeringa.
- 9.4.9. Pipetejar 100µl de *Streptavidin-HRP Conjugate* a cada pou.
- 9.4.10. Incubar la placa a temperatura ambient durant 30 minuts, en un agitador orbital a 100rpm.
- 9.4.11. Tercera sèrie de rentats.
Eliminar el volum dels pous i picar la placa sobre un bloc de papers de filtre, perquè quedi ben seca.
Rentar amb la micropipeta multicanal amb wash solution 1x: 300µl/pou.
Omplir la placa, buidar-la i picar-la sobre papers de filtre.
Realitzar aquesta operació 5 vegades.
- 9.4.12. Pipetejar 100µl de *Substrate Solution* a cada pou. Cal realitzar aquesta operació preservant el reactiu de l'exposició a la llum. Un cop dispensat el volum de reactiu als pous de la placa, cal cobrir-la amb un paper d'alumini durant el temps d'incubació.
- 9.4.13. Incubar la placa a temperatura ambient durant 10 minuts; important, SENSE AGITACIÓ. Durant aquest temps, els pous adquireixen una coloració blava, en diferent grau segons la concentració d'AFABP.
- 9.4.14. Aturar la reacció afegint 100µl de *Stop Solution* per pou. En aquest punt, la coloració blava es torna groga en afegir la solució de stop.
- 9.4.15. Esperar 5 minuts després d'haver afegit la solució de stop i, seguidament, determinar l'absorbància llegint a 450nm en un lector ELISA. Si algun valor excedeix el límit que pot llegir el lector ELISA, la lectura que s'obtindrà serà OVERFLOW. En aquest cas, es pot fer una segona lectura a 405nm.



10. Verificació de la tècnica i interpretació de resultats

10.1. Càlculs

A partir dels valors d'absorbància obtinguts pels estàndards i pel blanc, es confeccionarà una corba estàndard. Es recomana utilitzar el programari *GraphPad Prism 5*. El model matemàtic que cal aplicar és una funció paramètrica de quart ordre. Si aquest model no s'ajustés adequadament, és possible aplicar una funció paramètrica de tercer ordre.

Els estàndards no estan diluïts, mentre que les mostres i els controls de qualitat sí ho estan; la dilució aplicada que es recomana d'inici és 1:10. Cal tenir en compte el factor de dilució a l'hora de fer els càlculs.

10.2. Límits de l'assaig

Els resultats que excedeixin el valor d'absorbància de l'estàndard corresponent a la concentració de 25ng/ml malgrat la dilució 1:10 aplicada haurien de ser repetits aplicant una dilució més gran. També s'haurien de repetir aquelles mostres que el seu valor d'absorbància estigui per sota del valor més baix de la corba aplicant una dilució més petita o si es donés el cas, sense diluir la mostra. El factor de dilució a aplicar ha de decidir-se en funció a l'absorbància obtinguda i les absorbàncies observades per la corba estàndard.

10.3. Controls de qualitat

Cal validar els valors de concentració obtinguts pels controls de qualitat HIGH i LOW. Per fer-ho, cal recórrer al *Certificate of Analysis* que va inclòs en cada kit (fulla groga). En aquest document, es presenten uns rangs de valors de concentració en els que s'haurien de trobar les concentracions obtingudes pels controls en el nostre assaig.

11. Guia de problemes

Problema	Possible causa	Solució
1. Senyal FEBLE a tots els pous	Omissió d'algun reactiu en algun dels passos del kit.	
	Preparació no adequada d'algun reactiu o mala conservació.	
	Realització del procediment abans que els reactius es trobessin a temperatura ambient.	
2. Senyal MOLT ALTA o ELEVAT soroll de fons	Procediment de rentats no realitzat de manera adequada.	
	Sobree xposició; temps d'incubació amb el substrat excessiu abans d'afegir la solució de stop.	



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

Human Adipocyte FABP ELISA - FABP4

PNT-PO0709-URLA-11

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 6 de 8

3. Elevat coeficient de variació (CV)	Procediment de rentats no realitzat de manera adequada.	
4. Efecte del procés de congelació/descongelació en la concentració d'AFABP en les mostres	No s'observa cap deriva significativa en la determinació de la concentració d'A-FABP en mostres de sèrum i plasma després de tres cicles de congelació/descongelació.	
5. Estabilitat de les mostres a 4°C	Les mostres haurien de ser conservades a -20°C. Però, no s'observa una deriva significativa en la concentració d'A-FABP en mostres de sèrum i plasma quan aquestes s'emmagatzemen a 4°C durant 2 setmanes.	
6. Efecte de la matriu de la mostra (sèrum/plasma)	No s'observen diferències significatives en les concentracions d'A-FABP en mostres de sèrum, plasma citrat, plasma EDTA i plasma Heparina.	

12. Referències

Referències a l'*adipocyte fatty acid binding protein (A-FABP)*:

- Makowski L, Brittingham KC, Reynolds JM, Suttles J and Hotamisligil GS: The Fatty Acid Binding Protein, aP2, Coordinates Macrophage Cholesterol Trafficking and Inflammatory Activity. *J Biol Chem.* Apr 1; **280**(13): 12888-95 (2005).
- Maeda K, Cao H, Kono K, Gorgun CZ, Furuhashi M, Uysal KT, Cao Q, Atsumi G, Malone H, Krishnan B, Minokoshi Y, Kahn BB, Parker RA and Hotamisligil GS: Adipocyte/macrophage fatty acid binding proteins control integrated metabolic responses in obesity and diabetes. *Cell Metabolism.* February; **1**(2): 107-19 (2005).
- Boord JB, Maeda K, Makowski L, Babaev VR, Fazio S, Linton MF, Hotamisligil GS: Combined adipocyte-macrophage fatty acid-binding protein deficiency improves metabolism, atherosclerosis, and survival in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation.* Sep 14; **110**(11): 1492-8 (2004).
- Lehmann F, Haile S, Axen E, Medina C, Uppenberg J, Svensson S, Lundback T, Rondahl L, Barf T: Discovery of inhibitors of human adipocyte fatty acid-binding protein, a potential type 2 diabetes target. *Bioorg Med Chem Lett.* Sep 6; **14**(17): 4445-8 (2004).
- Damcott CM, Moffett SP, Feingold E, Barmada MM, Marshall JA, Hamman RF, Ferrell RE: Genetic variation in fatty acid-binding protein-4 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma interactively influence insulin sensitivity and body composition in males. *Metabolism.* Mar; **53**(3): 303-9 (2004).



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

Human Adipocyte FABP ELISA - FABP4

PNT-PO0709-URLA-11

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 7 de 8

- Jenkins-Kruchten AE, Bennaars-Eiden A, Ross JR, Shen WJ, Kraemer FB, Bernlohr DA: Fatty acid-binding protein-hormone-sensitive lipase interaction. Fatty acid dependence on binding. *J Biol Chem.* Nov 28; **278**(48): 47636-43 (2003).
- Hertzell AV, Bennaars-Eiden A, Bernlohr DA: Increased lipolysis in transgenic animals overexpressing the epithelial fatty acid binding protein in adipose cells. *J Lipid Res.* Dec; **43**(12): 2105-11 (2002).
- Fu Y, Luo N, Lopes-Virella MF, Garvey WT: The adipocyte lipid binding protein (ALBP/aP2) gene facilitates foam cell formation in human THP-1 macrophages. *Atherosclerosis.* Dec; **165**(2): 259-69 (2002).
- Storch J, Veerkamp JH, Hsu KT: Similar mechanisms of fatty acid transfer from human and rodent fatty acid-binding proteins to membranes: liver, intestine, heart muscle, and adipose tissue FABPs. *Mol Cell Biochem.* Oct; **239**(1-2): 25-33 (2002).
- Fisher RM, Hoffstedt J, Hotamisligil GS, Thorne A, Ryden M: Effects of obesity and weight loss on the expression of proteins involved in fatty acid metabolism in human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord.* Oct; **26**(10): 1379-85 (2002).
- Boord JB, Maeda K, Makowski L, Babaev VR, Fazio S, Linton MF, Hotamisligil GS: Adipocyte fatty acid-binding protein, aP2, alters late atherosclerotic lesion formation in severe hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Oct 1; **22**(10): 1686-91(2002).
- Fisher RM, Eriksson P, Hoffstedt J, Hotamisligil GS, Thorne A, Ryden M, Hamsten A, Arner P: Fatty acid binding protein expression in different adipose tissue depots from lean and obese individuals. *Diabetologia.* Oct; **44**(10): 1268-73 (2001).
- Scheja L, Makowski L, Uysal KT, Wiesbrock SM, Shimshek DR, Meyers DS, Morgan M, Parker RA, Hotamisligil GS: Altered insulin secretion associated with reduced lipolytic efficiency in aP2^{-/-} mice. *Diabetes.* Oct; **48**(10): 1987-94 (1999).
- Coe NR, Simpson MA, Bernlohr DA: Targeted disruption of the adipocyte lipid-binding protein (aP2 protein) gene impairs fat cell lipolysis and increases cellular fatty acid levels. *J Lipid Res.* May; **40**(5): 967-72 (1999).
- Baxa CA, Sha RS, Buelte MK, Smith AJ, Matarese V, Chinander LL, Boundy KL and Bernlohr DA: Human adipocyte lipid-binding protein: purification of the protein and cloning of its complementary DNA. *Biochemistry.* **28**(22): 8683-90 (1989).

Referències a aquest producte:

- Xu A, Tso AW, Cheung BM, Wang Y, Wat NM, Fong CH, Yeung DC, Janus ED, Sham PC, Lam KS: Circulating adipocyte-fatty acid binding protein levels predict the development of the metabolic syndrome: a 5-year prospective study. *Circulation.* Mar 27; **115**(12): 1537-43 (2007).
- Bronsky J, Karpisek M, Bronska E, Pechova M, Jancikova B, Kotolova H, Stejskal D, Prusa R, Nevoral J: Adiponectin, adipocyte fatty acid binding protein, and epidermal fatty acid binding protein: Proteins newly identified in human breast milk. *Clin Chem.* Sep; **52**(9):



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

Human Adipocyte FABP ELISA - FABP4

PNT-PO0709-URLA-11

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 8 de 8

1763-70 (2006).

- von Eynatten M, Schneider JG, Allolio B: Adipocyte fatty acid binding protein (A-FABP) ist ein neuer Serum-Marker für Adipositas, Insulinresistenz und Metabolisches Syndrom. *Diabetologie*. **1**: S23-S172 (2006).
- Xu A, Wang Y, Xu JY, Stejskal D, Tam S, Zhang J, Wat NM, Wong WK, Lam KS: Adipocyte fatty acid-binding protein is a plasma biomarker closely associated with obesity and metabolic syndrome. *Clin Chem*. Mar; **52**(3): 405-13 (2006).
- Stejskal D and Karpisek M: Adipocyte fatty acid binding protein (A-FABP) in Caucasian population: a new marker of metabolic syndrome? *Eur J Clin Invest*. Sep; **36**(9): 621-5 (2006).
- Cabré A, Lázaro I, Girona J, Manzanares JM, Marimón F, Plana N, Heras M, Masana L: Fatty acid binding protein 4 is increased in metabolic syndrome and with thiazolidinedione treatment in diabetic patients. *Atherosclerosis*. 2007; 195:e150-8. PMID: 17553506
- Coll B, Cabré A, Alonso-Villaverde C, Lázaro I, Aragonés G, Parra S, Girona J, Masana L. The fatty acid binding protein-4 (FABP4) is a strong biomarker of metabolic syndrome and lipodystrophy in HIV-infected patients. *Atherosclerosis*. 2008;199(1):147-53. PMID: 17983623
- Cabré A, Lázaro I, Girona J, Manzanares JM, Marimón F, Plana N, Heras M, Masana L. Plasma fatty acid-binding protein 4 increases with renal dysfunction in type 2 diabetic patients without microalbuminuria. *Clin Chem*. 2008;54:181-7. PMID: 18024526
- Cabré A, Lázaro I, Girona J, Manzanares JM, Marimón F, Plana N, Heras M, Masana L. Plasma fatty acid binding protein 4 is associated with atherogenic dyslipidemia in diabetes. *J Lipid Res*. 2008;49: 1746-51. PMID: 18421072

13. Control de la documentació

14. Annexos

Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

Aïllament i congelació de cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMCs)

PNT-PO0709-URLA-45

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 1 de 5

1. Fonament i objectiu

Fonament. Aquest és un mètode que utilitza dues solucions de densitat HISTOPAQUE-1119 i HISTOPAQUE-1077 per la separació de cèl·lules mononuclears i granulòcits.

Al 1968, Böyum va descriure mètodes de centrifugació amb gradient de densitat per l'aïllament de cèl·lules mononuclears de sang perifèrica i medul·la òssia. Les solucions de densitat consisteixen en un medi de polisucrosa i radioopac. La solució HISTOPAQUE-1077 és aquest tipus de solució ajustada a una densitat de 1.077g/l, mentre que la HISTOPAQUE-1119 ho està a 1.119g/l.

Quan se centrifuga la sang amb la solució HISTOPAQUE-1077, les cèl·lules mononuclears queden situades com a interfase entre el plasma i la solució de densitat, mentre que els eritròcits i els granulòcits queden situats al fons del tub (figura 1). El procediment de doble gradient mitjançant la utilització de les dues solucions de densitat, HISTOPAQUE-1077 i HISTOPAQUE-1119, permet la recuperació d'aquestes cèl·lules granulocítiques (figura 2).

Figura 1:

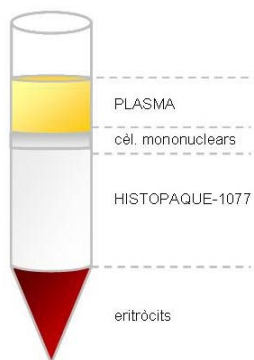
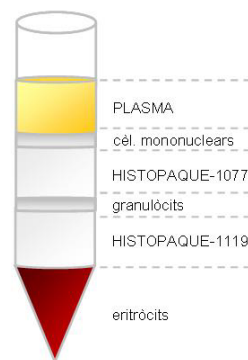


Figura 2:



Objectius. Separar i obtenir cèl·lules mononuclears a partir de sang total.

2. Espècimen

Sang total recollida en tubs de plasma-EDTA.

3. Documentació relacionada

4. Definicions

PBMCs = *peripheral blood mononuclear cells*

5. Historial de revisions

Modificacions efectuades	No de Revisió	Data
Iolanda Lázaro López	01	30/04/2010



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

Aïllament i congelació de cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMCs)

PNT-PO0709-URLA-45

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 2 de 5

6. Solucions, reactius i materials

Nom de la solució:	Histopaque 1077	Volum final:	100ml		
pH	---	Manipulació prèvia:	---	Conservació:	4°C
Reactiu	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)		
Histopaque-1077	10771 / Sigma				

Nom de la solució:	Histopaque 1119	Volum final:	100ml		
pH	---	Manipulació prèvia:	---	Conservació:	4°C
Reactiu	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)		
Histopaque-1119	11191 / Sigma				

Nom de la solució mare:	D-PBS w/o Ca ²⁺ and Mg ²⁺	Volum final:	500ml		
pH	---	Manipulació prèvia:	---	Conservació:	T ambient
Solució Mare	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)		
D-Phosphate Buffered Saline (D-PBS) (1x)	14190-169 / GIBCO (Invitrogen)				

Nom de la solució mare:	Medi de congelació	Volum final:	10ml		
pH	---	Manipulació prèvia:	---	Conservació:	4°C
Solució Mare	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)		
Foetal Bovine Serum Gold	A15-151 / PAA	90%	9ml		
DMSO	154938-100ml / Sigma-Aldrich	10%	1ml		

Material	Capacitat	Tractament Previ	Observacions
Tubs còncs estèrils de 15ml	15ml	----	----
Tubs còncs estèrils de 30ml	30ml	----	----
Pipetes pasteurs estèrils 3.5ml	3.5ml	----	----
Criotubs	1.8ml	----	----

7. Instrumentació i equips:

Equip	Ubicació	Núm. Inventari	Núm. PNT-EE	Observacions
Cabina de flux laminar CV-100 (Telstar)	Laboratori de cultius	012457	PNT-PO0705-URLA-12	
Centrífuga Multifuge 3L (Heraeus)	Laboratori de cultius	0832527	PNT-PO0705-URLA-36	
Agitador roller (Beckman-Coulter)	Laboratori 2	012416	PNT-PO0705-URLA-19	

8. Precaucions

Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

Aïllament i congelació de cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMCs)

PNT-PO0709-URLA-45

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 3 de 5

9. Procediment

Previ a l'inici del procediment, cal treure les solucions de densitat de la nevera i deixar que s'atemperin.

- 9.1. Determinar el volum exacte de sang total extreta a partir de la qual es realitzarà el procediment per l'aïllament de les cèl·lules.
Aquest punt és molt important perquè el volum total ens determinarà el volum de les solucions de densitat.
El volum total de sang es compensarà amb el mateix volum de les solucions de densitat al 50%: un 50% del volum total de la solució HISTOPAQUE-1077 i un altre 50% del volum total de la solució HISTOPAQUE-1119.

Exemple: volum total de sang = 6ml,
volums de solucions de densitat: 3ml HISTOPAQUE-1077 + 3ml HISTOPAQUE-1119.
- 9.2. Posar el volum que es correspongui de la solució HISTOPAQUE-1119 al fons d'un tub cònic (serà de 15 o 30ml en funció del volum total que tinguem).
- 9.3. Posar el volum equivalent de la solució HISTOPAQUE-1077 en *overlayer* sobre el volum de HISTOPAQUE-1119 anteriorment afegit.
És recomanable inclinar el tub mentre s'està afegint la solució de densitat 1077 sobre la 1119 (veure imatge figura 3).
- 9.4. Posar amb molta cura el volum de sang en *overlayer* sobre la solució de densitat HISTOPAQUE-1077 afegit en el pas 9.3.
Com en el cas anterior, és molt recomanable inclinar el tub mentre s'afegeix la sang sobre la solució de densitat 1077 (veure imatge figura 3).

Figura 3:

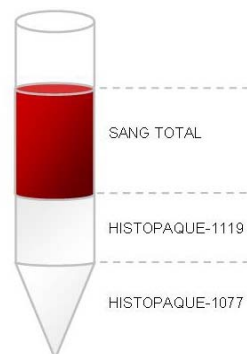


- 9.5. Al tub s'ha de visualitzar dues fases diferenciades (veure imatge figura 4), malgrat realment n'hi hagin tres (veure esquema figura 5).

Figura 4:



Figura 5:



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

Aïllament i congelació de cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMCs)

PNT-PO0709-URLA-45

Revisió: 00

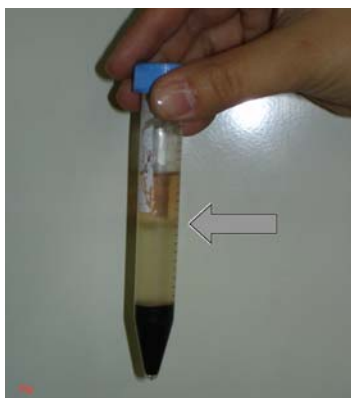
Data: 24-07-2008

Pàgina: 4 de 5

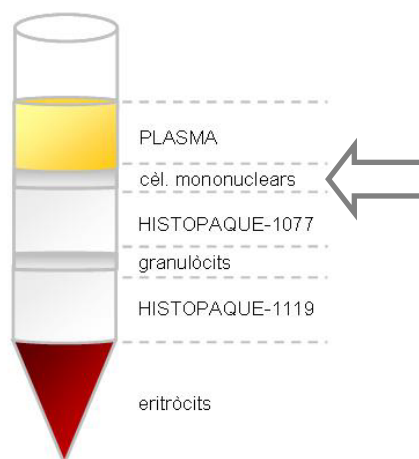
9.6. Centrifugar: 700g, 30 minuts, T ambient, rotor oscil·lant.

9.7. Després de centrifugar, hauríem d'observar una separació com la de la imatge de la figura 6.

Figura 6:



El procés de centrifugació produeix la separació de les següents fases:



De totes les fases obtingudes, la d'interès és la corresponent a les cèl·lules mononuclears (assenyalada amb una fletxa a l'esquema).

9.8. Amb l'ajuda d'una pipeta pasteur, s'ha d'aspirar la fase de l'extrem superior corresponent al plasma i descartar-la.

És important no aspirar tot el volum d'aquesta fase, cal deixar un volum mort de seguretat per evitar endur-nos part de la següent capa o fase, que és la d'interès.

9.9. Amb una altra pipeta pasteur, aspirar completament la següent fase, corresponent a les cèl·lules mononuclears i dipositar el volum aspirat en un tub cònic de 15ml nou.

En cas contrari a què interressi recollir la fracció corresponent als granulòcits, descartar la resta del tub. Procedirem el protocol amb el tub de 15ml estèril i cònic en què hem posat les cèl·lules mononuclears.

9.10. Primer rentat de les cèl·lules. Afegir D-PBS estèril al tub en què hi ha les cèl·lules mononuclears, fins a tenir un volum final 12-14ml. Tapar el tub i invertir-lo suaument varies vegades per homogeneïtzar.

9.11. Centrifugar: 200g, 10 minuts, T ambient, rotor oscil·lant.

Elaborat per: Iolanda Lázaro López

Aprovat per: Lab-Manager i Responsable de qualitat

Aquest document en suport paper es considera document no controlat



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

Aïllament i congelació de cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMCs)

PNT-PO0709-URLA-45

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 5 de 5

- 9.12. Aspirar el sobrenedant amb una pipeta pasteur i descartar-lo.
- 9.13. Segon rentat de les cèl·lules. Tornar a afegir D-PBS estèril al tub en què hi ha les cèl·lules mononuclears, fins a tenir un volum de 5ml i resuspendre les cèl·lules suaument amb una pipeta pasteur. Acabar d'omplir el tub fins un volum de 12-14ml. Tapar el tub i invertir-lo suaument varies vegades per homogeneïtzar.
- 9.14. Centrifugar: 200g, 10 minuts, T ambient, rotor oscil·lant.
- 9.15. Aspirar el sobrenedant amb una pipeta pasteur i descartar-lo.
- 9.16. Tercer rentat de les cèl·lules. Tornar a afegir D-PBS estèril al tub en què hi ha les cèl·lules mononuclears, fins a tenir un volum de 5ml i resuspendre les cèl·lules suaument amb una pipeta pasteur. Acabar d'omplir el tub fins un volum de 12-14ml. Tapar el tub i invertir-lo suaument varies vegades per homogeneïtzar.
- 9.17. Aspirar el sobrenedant amb una pipeta pasteur i descartar-lo.
- 9.18. Resuspendre el pellet en el volum que s'escaigui de medi de congelació (en funció del nombre de cèl·lules que hi hagi al tub). Posar les cèl·lules en els criotubs, prèviament marcats i refredats.
- 9.19. Congelar les cèl·lules (veure PNT-PO0709-URLA-14).

10. Verificació de la tècnica i interpretació de resultats

11. Guia de problemes

Problema	Possible causa	Solució

12. Referències

- Böyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand J Clin Lab Invest* 1968; 97:7.
- English D, Andersen BR. Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradient of ficoll-hypaque. *J Immunol Methods* 1974; 5:249-252.

13. Control de la documentació

14. Annexos

Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

TransAM Nrf2 (Active Motif)

PNT-PO0709-URLA-44

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

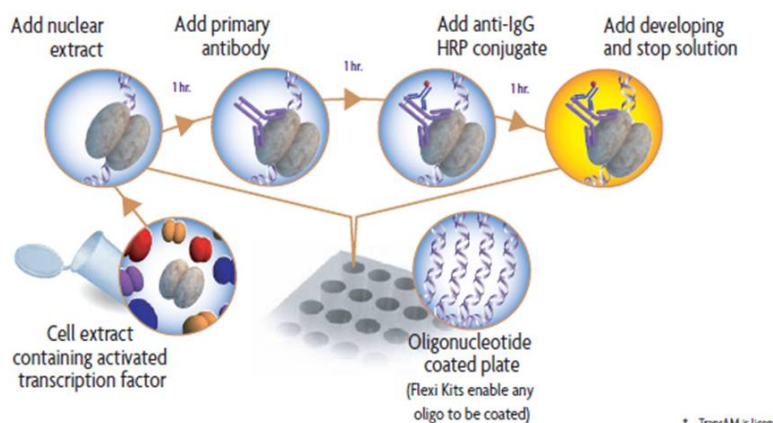
Pàgina: 1 de 9

1. Fonament i objectiu

Fonament. Els kits TransAM apliquen la metodologia ELISA en l'EMSA per l'estudi de l'activació de factors de transcripció en extractes proteics de teixits i cultius cel·lulars.

Els factors de transcripció són proteïnes que s'uneixen al DNA per regular l'expressió gènica. Consten de dos dominis diferents: un amb elevada afinitat per una seqüència específica de DNA i un altre que proporciona l'activitat transcripcional. Els factors de transcripció són activats per la fosforilació de residus específics o pel tractament de proteïnes inhibidores que s'hi uneixen. La comprensió i la quantificació dels factors de transcripció són essencials per l'estudi de funcions cel·lulars tals com la diferenciació, la resposta immunitària o la inflamació.

El kit TransAM inclou una placa de 96 pous en què estan immobilitzades còpies d'un oligonucleòtid de doble cadena específic que conté un lloc ARE. Quan s'afegeix l'extracte nuclear o total, el factor de transcripció Nrf2 present a la mostra s'uneix a la seqüència consens continguda a l'oligonucleòtid i és detectat mitjançant un anticòs primari específic contra Nrf2. Seguidament, s'afegeix un anticòs secundari conjugat amb HRP, que reconeix l'anticòs primari. La reacció colorimètrica es dona quan s'afegeix el substrat de l'HRP. La mesura es realitza mitjançant un espectrofotòmetre i la senyal és directament proporcional a la quantitat del factor de transcripció present, proporcionant informació sensible i quantitativa de l'activació del factor de transcripció.



Objectiu. Detectar i quantificar l'activació de Nrf2 en mostres d'origen humanà, de rata o ratolí.

Característiques del kit:

- Límit de detecció: <0.15µg extracte de proteïnes nuclears/pou.
- Rang de detecció: 0.15-2.5µg d'extracte de proteïna nuclear per pou.
- Reactivitat creuada: detecció específica de Nrf2 d'origen humà, de rata i ratolí.
- Temps total de l'assaig: 3.5h.

2. Espècimen

Extractes de proteïnes nuclears, citoplasmàtiques o lisats cel·lulars totals.

3. Documentació relacionada

Document adjunt: protocol del kit TransAM Nrf2 d'Active Motif en format pdf.

4. Definicions



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

TransAM Nrf2 (Active Motif)

PNT-PO0709-URLA-44

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 2 de 9

5. Historial de revisions

Modificacions efectuades	No de Revisió	Data
Iolanda Lázaro López	01	30/04/2010

6. Solucions, reactius i materials

Excepte l'extracte nuclear utilitzat com a control positiu que ha de ser guardat a -80°C , tots els components del kit poden ser emmagatzemats a -20°C abans de la primera vegada que es facin servir. Després, es recomana emmagatzemar a la temperatura que s'indica als següents apartats. Tots els components del kit són estables durant 6 mesos desde la data d'arribada si són emmagatzemats adequadament.

Nom de la solució:	Nrf2 antibody	Volum final:	10 μl		
pH	---	Manipulació prèvia:	---	Conservació:	4 $^{\circ}\text{C}$
Reactiu	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)		
Indicat per la preparació dilució 1:1000 de l'anticòs primari contra Nrf2 amb 1x Antibody Binding Buffer.					

Nom de la solució:	Anti-rabbit HRP-conjugated antibody	Volum final:	10 μl		
pH	---	Manipulació prèvia:	---	Conservació:	4 $^{\circ}\text{C}$
Reactiu	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)		
Indicat per la preparació dilució 1:1000 de l'anticòs secundari amb 1x Antibody Binding Buffer.					

Nom de la solució:	Wild-type oligonucleotide AM29 (10pmol/ μl)	Volum final:	100 μl		
pH	---	Manipulació prèvia:	---	Conservació:	-20 $^{\circ}\text{C}$
Reactiu	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)		

Nom de la solució:	Mutated oligonucleotide AM29 (10pmol/ μl)	Volum final:	100 μl		
pH	---	Manipulació prèvia:	---	Conservació:	-20 $^{\circ}\text{C}$
Reactiu	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)		

Nom de la solució:	Cos-7 nuclear extract (Nrf2 transfected) (2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Volum final:	20 μl		
pH	---	Manipulació prèvia:	---	Conservació:	---
Reactiu	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)		

Nom de la solució:	Dithiothreitol (DTT) 1M	Volum final:	100 μl		
pH	---	Manipulació prèvia:	---	Conservació:	-20 $^{\circ}\text{C}$
Reactiu	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)		



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

TransAM Nrf2 (Active Motif)

PNT-PO0709-URLA-44

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 3 de 9

Nom de la solució:	Protease Inhibitor Cocktail	Volum final:	100µl		
pH	---	Manipulació prèvia:	---	Conservació:	-20°C
Reactiu	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)		

Nom de la solució:	Herring Sperm DNA	Volum final:	100µl		
pH	---	Manipulació prèvia:	----	Conservació:	-20°C
Reactiu	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)		

Nom de la solució:	Lysis Buffer AM1	Volum final:	10ml		
pH	---	Manipulació prèvia:	---	Conservació:	4°C
Reactiu	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)		
Indicat per la preparació del <i>Complete Lysis Buffer</i> (veure taula de preparació dels reactius - apartat 9.1).					

Nom de la solució:	Binding Buffer AM1	Volum final:	10ml		
pH	---	Manipulació prèvia:	---	Conservació:	4°C
Reactiu	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)		
Indicat per la preparació del <i>Complete Binding Buffer</i> (veure taula de preparació dels reactius - apartat 9.1).					

Nom de la solució:	10x Wash Buffer AM2	Volum final:	22ml		
pH	---	Manipulació prèvia:	---	Conservació:	4°C
Reactiu	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)		
Indicat per la preparació del <i>1x Wash Buffer</i> (veure taula de preparació dels reactius - apartat 9.1).					

Nom de la solució:	10x Antibody Binding Buffer AM3	Volum final:	10ml		
pH	---	Manipulació prèvia:	---	Conservació:	4°C
Reactiu	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)		
Indicat per la preparació del <i>1x Antibody Binding Buffer</i> (veure taula de preparació dels reactius - apartat 9.1) amb què es diluiran els anticossos primari i secundari.					

Nom de la solució:	Developing Solution	Volum final:	11ml		
pH		Manipulació prèvia:		Conservació:	4°C
Reactiu	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)		

Nom de la solució:	Stop Solution	Volum final:	11ml		
pH		Manipulació prèvia:		Conservació:	4°C
Reactiu	Referència / marca	Concentració final	Quantitat (unitats)		



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

TransAM Nrf2 (Active Motif)

PNT-PO0709-URLA-44

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 4 de 9

Material	Capacitat	Tractament Previ	Observacions
Placa de 96 pous: 96-well Nrf2 assay plate	----	----	Conservar a 4°C si no es fa servir en una única vegada dins la butxaca d'alumini amb la bosseta de dessecant.
Adhesiu de placa	----	----	(Inclòs al kit)
tubs eppendorf	1.5ml	----	No és necessari autoclavat
probeta	100ml	----	----
puntes micropipeta	0.5-10µl	----	No és necessari autoclavat
puntes micropipeta	2-200µl	----	No és necessari autoclavat
puntes micropipeta	100-1000µl	----	No és necessari autoclavat
puntes micropipeta multicanal	50-350µl	----	No és necessari autoclavat

7. Instrumentació i equips:

Equip	Ubicació	Núm. Inventari	Núm. PNT-EE	Observacions
Micropipeta 0.5-10µl (Eppendorf)	Laboratori 1/2	----	PNT-PO0705-URLA-25	
Micropipeta 10-100µl (Eppendorf)	Laboratori 1/2	----	PNT-PO0705-URLA-25	
Micropipeta 100-1000µl (Eppendorf)	Laboratori 1/2	----	PNT-PO0705-URLA-25	
Micropipeta multicanal	Laboratori 1/2	----	PNT-PO0705-URLA-93	
Agitador roller (Beckman-Coulter)	Laboratori 2	012416	PNT-PO0705-URLA-19	
Lector ELISA BioWhittaker KINETIC-QCL	Laboratori 2	012592	PNT-PO0705-URLA-57	

8. Precaucions

És imprescindible llegir-se el protocol de la casa comercial que ve amb el kit abans d'iniciar el procediment. Cada lot diferent podria tenir una actualització del protocol.

Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

TransAM Nrf2 (Active Motif)

PNT-PO0709-URLA-44

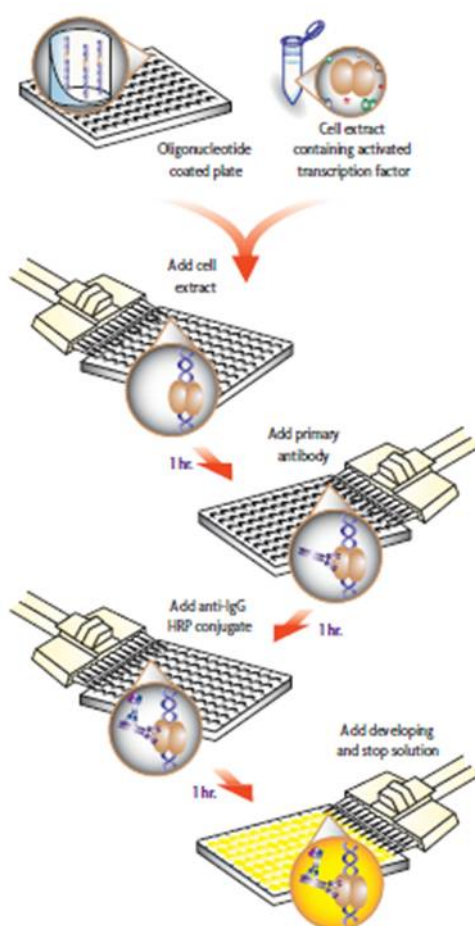
Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 5 de 9

9. Procediment

Esquema resum del procediment:



Consideracions prèvies:

- Determinar el número de tires de la placa que són necessàries d'acord amb les mostres de què es disposa, els controls i els blancs, per duplicat. Si en una tira no són necessaris tots els pous, es poden deixar coberts amb el film adhesiu. El contingut dels pous és estable a temperatura ambient si els pous es mantenen secs i, per tant, poden ser utilitzats en un altre assaig. Guardar les tires no utilitzades a l'envoltori d'alumini a 4°C.
- Cal preparar el *Complete Lysis Buffer*, *Complete Binding Buffer*, *Wash Buffer 1x* i el *Antibody Binding Buffer* com es descriu en els següents apartats.



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

TransAM Nrf2 (Active Motif)

PNT-PO0709-URLA-44

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 6 de 9

9.1. Preparació dels reactius

Veure la següent taula:

Reactius a preparar	Components	1 pou	1 tira (8 pous)	6 tires (48 pous)	12 tires (96 pous)
<i>Complete Lysis Buffer</i>	DTT	0.01µl	0.1µl	0.6µl	1.2µl
	<i>Protease Inhibitor Cocktail</i>	0.12µl	0.9µl	5.4µl	10.8µl
	<i>Lysis Buffer</i>	11.12µl	89.0µl	534.0µl	1.07ml
	Total necessari	11.25µl	90.0µl	540.0µl	1.08ml
<i>Complete Binding Buffer</i>	DTT	0.04µl	0.3µl	2.16µl	4.3µl
	<i>Herring Sperm DNA</i>	0.45µl	3.6µl	21.60µl	43.2µl
	<i>Binding Buffer</i>	44.50µl	356.1µl	2.14ml	4.27ml
	Total necessari	45.00µl	360.0µl	2.16ml	4.32ml
<i>Binding Buffer with Nrf2 wt or mut oligont</i>	<i>wt or mut oligont</i>	2.0µl	18.0µl	108µl	N/A
	<i>Complete Binding Buffer</i>	43.0µl	342.0µl	2.052ml	N/A
	Total necessari	45.0µl	360.0µl	2.16ml	N/A
<i>1x Wash Buffer</i>	<i>Distilled water</i>	2.025ml	16.2ml	97.2ml	194.4ml
	<i>10x Washing Buffer</i>	225.0µl	1.8ml	10.8ml	21.6ml
	Total necessari	2.25ml	18.0ml	108.0ml	216.0ml
<i>1x Antibody Binding Buffer⁽¹⁾</i>	<i>Distilled water</i>	202.5µl	1.62ml	9.72ml	19.44µl
	<i>10x Antibody Binding Buffer</i>	22.5µl	180.0µl	1.08ml	2.16ml
	Total necessari	225.0µl	1.8ml	10.8ml	21.6ml
<i>Developing Solution</i>	Total necessari	112.5µl	900.0µl	5.4ml	10.8ml
<i>Stop Solution</i>	Total necessari	112.5µl	900.0µl	5.4ml	10.8ml

(1) volums vàlids per preparar les dilucions dels anticossos primari i secundari.

9.2. Preparació de les mostres

Es recomana utilitzar 2-10µg de proteïna de l'extracte nuclear per pou.
La mostra es prepara diluint aquests µg de proteïna en *Complete Lysis Buffer*.

9.3. Incubació de la mostra per promoure la unió de Nrf2 a la seqüència consens

- 9.3.1. Dispensar 40µl de *Complete Binding Buffer* a cada un dels pous que siguin necessaris. Si es pretenen fer experiments de competició d'unió, dispensar 40µl de *Complete Binding Buffer* que contingui 20pmol (2µl) de l'oligonucleòtid *wild-type* o mutat.
- 9.3.2. **Mostres.** Afegir 10µl de mostra diluïda en *Complete Lysis Buffer* per pou.
- 9.3.3. **Control positiu.** Afegir 10µl del control positiu diluït en *Complete Lysis Buffer* per pou ((0.5µl *Cos-7 nuclear extract* + 9.5µl *Complete Lysis Buffer*) per pou).
- 9.3.4. **Blancs.** Afegir 10µl de *Complete Lysis Buffer* per pou.
- 9.3.5. Segellar la placa amb l'adhesiu.
- 9.3.6. Incubar la placa a temperatura ambient durant 1 hora, en un agitador orbital a 100rpm.
- 9.3.7. Primera sèrie de rentats.
Eliminar el volum dels pous i picar la placa sobre un bloc de papers de filtre, perquè quedi ben seca.
Rentar amb la micropipeta multicanal amb *1x Wash Solution*: 200µl/pou.
Omplir la placa, buidar-la i picar-la sobre papers de filtre.



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

TransAM Nrf2 (Active Motif)

PNT-PO0709-URLA-44

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 7 de 9

Realitzar aquesta operació 3 vegades.

9.3.8. Després del darrer rentat, cal eliminar les bombolles amb una agulla de xeringa.

9.4. Incubació amb l'anticòs primari

9.4.1. Pipetejar 100µl de la dilució de l'anticòs Nrf2 (dilució 1:1000 en el *1x Antibody Binding Buffer*) a cada pou

9.4.2. Cobrir la placa amb l'adhesiu.

9.4.3. Incubar la placa a temperatura ambient durant 1 hora, sense agitació.

9.4.4. Segona sèrie de rentats.

Eliminar el volum dels pous i picar la placa sobre un bloc de papers de filtre, perquè quedi ben seca.

Rentar amb la micropipeta multicanal amb *1x Wash Solution*: 200µl/pou.

Omplir la placa, buidar-la i picar-la sobre papers de filtre.

Realitzar aquesta operació 3 vegades.

9.4.5. Després del darrer rentat, cal eliminar les bombolles amb una agulla de xeringa.

9.5. Incubació amb l'anticòs secundari

9.5.1. Pipetejar 100µl de la dilució de l'anticòs conjugat amb HRP (dilució 1:1000 en el *1x Antibody Binding Buffer*) a cada pou.

9.5.2. Cobrir la placa amb l'adhesiu.

9.5.3. Incubar la placa a temperatura ambient durant 1 hora, sense agitació.

9.5.4. Durant la incubació amb el secundari, és convenient treure de la nevera la *Developing Solution* perquè s'atemperi.

9.5.5. Tercera sèrie de rentats.

Eliminar el volum dels pous i picar la placa sobre un bloc de papers de filtre, perquè quedi ben seca.

Rentar amb la micropipeta multicanal amb *1x Wash Solution*: 200µl/pou.

Omplir la placa, buidar-la i picar-la sobre papers de filtre.

Realitzar aquesta operació 4 vegades.

9.5.6. Després del darrer rentat, cal eliminar les bombolles amb una agulla de xeringa.

9.6. Reacció colorimètrica

9.6.1. Pipetejar 100µl de *Developing Solution* als pous utilitzats.

9.6.2. Incubar la placa a temperatura ambient durant un temps de 2-15 minuts, protegint-la de l'exposició a la llum. Cal anar controlant l'aparició del color en els pous, perquè no s'assoleixi una senyal excessiva que no ens permeti ser llegida.

9.6.3. Pipetejar 100µl de *Stop Solution* als pous utilitzats. El color blau dels pous es tornarà groc per efecte de l'àcid de la solució stop.

9.6.4. Esperar 5 minuts després d'haver afegit la solució de stop i, seguidament, determinar l'absorbància llegint en un lector ELISA a 450nm i prenent com a filtre de referència el de 655nm. Si algun valor excedeix el límit que pot llegir el lector ELISA, la lectura que s'obindrà serà OVERFLOW.

10. Verificació de la tècnica i interpretació de resultats

10.1. Càlculs

Segons el disseny de la placa, cada mostra ha de valorar-se per duplicat. Per tant, en primer lloc cal obtenir el valor mitjà de les lectures corresponents a cada mostra. A aquest valor, se li ha de restar el valor de l'absorbància mitjana del blanc. Aleshores, es representen els valors d'absorbància obtinguts i d'aquesta manera es valora el grau d'activació de Nrf2, prenent com a referència el control que s'escaigui.

Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

TransAM Nrf2 (Active Motif)

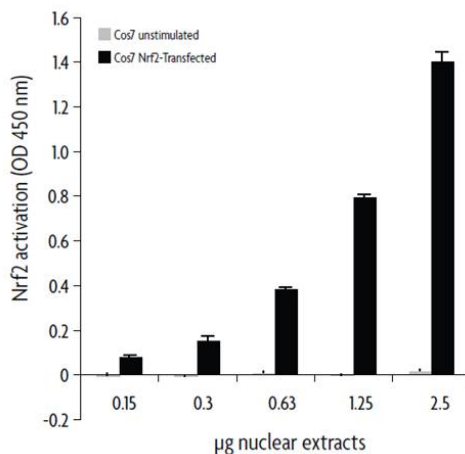
PNT-PO0709-URLA-44

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 8 de 9

Veure gràfica exemple:



11. Guia de problemes

Problema	Possible causa	Solució
Absència de senyal o senyal molt feble.	Omissió d'algun reactiu.	Comprovar si s'han afegit els reactius a tots els pous i en l'ordre indicat.
	Substrat o conjugat caducats.	Comprovar l'activitat del conjugat i el substrat.
	Presència d'un enzim inhibidor.	L'azida sòdica pot inhibir la reacció peroxidasa, cal seguir les recomanacions del kit per preparar els tampons.
	El lector de plaques no funciona correctament.	Verificar les longituds d'ona i els settings dels filtres en el lector de plaques.
	Temperatura incorrecta.	Atemperar el substrat.
Soroll de fons molt alt a tots els pous.	Volum inadequat de <i>Developing Solution</i> .	Verificar el volum dispensat per la pipeta.
	Temps excessiu en el revelat.	Aturar la reacció enzimàtica tan aviat com els pous positius prenguin una coloració blau intens.
	La concentració dels anticossos és excessivament alta.	Diluir més els anticossos.
Presència desigual de color.	Procediment de rentats inadequat.	Assegurar que els pous queden plens de solució de rentat i seguir les recomanacions de rentat del protocol.
	No completat el rentat dels pous.	Assegurar que els pous queden plens de solució de rentat i seguir les recomanacions de rentat del protocol.



Procediment Normalitzat de Treball Metodològic

TransAM Nrf2 (Active Motif)

PNT-PO0709-URLA-44

Revisió: 00

Data: 24-07-2008

Pàgina: 9 de 9

	Contaminació creuada entre pous.	Seguir les recomanacions de rentat.
Soroll de fons alt en els pous de les mostres.	Massa quantitat d'extracte nuclear per pou.	Disminuir la quantitat d'extracte nuclear per pou 1-2µg/pou.
	La concentració dels anticossos és excessivament alta.	Fer una titració de l'anticòs per determinar les condicions òptimes de treball. Començar utilitzant 1:1000 per l'anticòs primari i 1:1000 per l'anticòs secundari. La sensibilitat de l'assaig disminuirà.
Absència de senyal o senyal molt feble als pous de les mostres.	Quantitat insuficient d'extracte nuclear per pou.	Augmentar la quantitat d'extracte nuclear a 50µg/pou.
	Nrf2 està poc activat o inactivat a les fraccions nuclears testades.	Realitzar una corba temps-resposta per l'activació de Nrf2 a la línia cel·lular estudiada.
	Els extractes nuclears pertanyen a espècies per les que no està indicat el kit.	

12. Referències

13. Control de la documentació

14. Annexos

Resultats

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
REGULACIÓ DE FABP4 DEPENDENT DE NRF2 EN MACRÒFAGS
Iolanda Lázaro López
ISBN:978-84-693-8852-5/DL:T.1952-2010

1. Efecte de la repetició de dosi dels aldehyds sobre l'expressió gènica de FABP4

En aquest primer punt, es va determinar l'efecte de l'exposició perllongada als aldehyds sobre l'expressió de FABP4 (**Figura 37**).

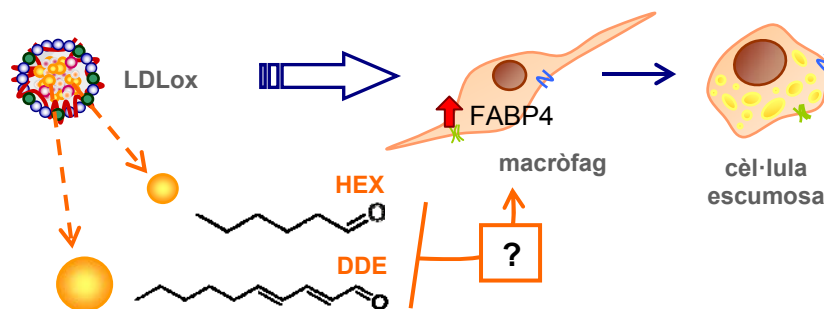


Figura 37. Esquema de la hipòtesi inicial. Els aldehyds apolars DDE i hexanal (HEX), integrants de les LDL oxidades (LDLox), podrien participar en la inducció de l'expressió gènica i proteica de FABP4 en els macròfags, pas inicial de la transformació a cèl·lules escumoses.

Els macròfags es van incubar amb DDE 5µM i HEX 10µM renovant diàriament el medi d'incubació fins a un total de 6 dies. A l'experiment, es va incloure la condició d'incubació amb BRL 1µM, perquè d'acord al seu paper d'agonista PPARγ actués com a control positiu de l'expressió de FABP4. A la **figura 38** es presenten els resultats obtinguts mitjançant l'anàlisi per RT i PCR a temps real de l'expressió gènica de FABP4. La repetició de dosi de DDE va induir una expressió 5 vegades augmentada en els nivells de mRNA de FABP4 vers el vehicle. En canvi, la incubació amb l'hexanal no va produir cap efecte. Els nivells d'expressió eren pràcticament iguals als observats per efecte de la incubació amb el vehicle. La repetició de dosi amb BRL va induir l'efecte esperat. Els nivells observats van ser 10 vegades superiors als de la incubació amb el vehicle.

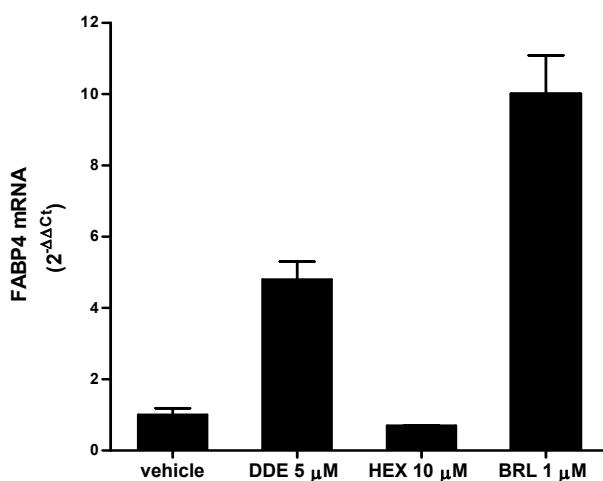


Figura 38. Inducció de la transformació de macròfag a cèl·lula escumosa per exposició perllongada als aldehyds.

Anàlisi de l'expressió gènica de FABP4 per efecte de la renovació diària de les diferents condicions al medi d'incubació de les cèl·lules. Els macròfags THP-1 van rebre diàriament una dosi fins un total de 6. L'expressió de mRNA FABP4 es va valorar per RT i PCR a temps real, prenent com a gen de control endogen el GAPDH.

2. Corbes dosi-resposta dels aldehids sobre l'expressió proteica de FABP4

Les corbes dosi-resposta dels aldehids sobre l'expressió de proteïna FABP4 es van confeccionar per determinar la concentració de treball dels aldehids en què s'observés més efecte sobre l'expressió sense resultar tòxica per les cèl·lules després de 24 hores. En el cas del DDE, les concentracions avaluades van ser: 5 i 10 μ M. Cal esmentar que també es va testar la concentració de 25 μ M, però aquesta condició va resultar tòxica per les cèl·lules i no es mostren els resultats. Les incubacions amb DDE 5 i 10 μ M van produir augments en l'expressió proteica superiors a 2 i 3 vegades, respectivament, en comparació a l'expressió induïda pel vehicle (2.4 \pm 0.4 (5 μ M), 3.3 \pm 0.3 (10 μ M) vs. vehicle, ambdues p=0.037) (**Figura 39**). Entre les dues concentracions no es van produir diferències significatives. A partir dels resultats obtinguts, es va determinar que la concentració de treball del DDE havia de ser 10 μ M.

La corba de l'hexanal es va confeccionar amb les concentracions de 10, 25, 50 i 100 μ M. A la **figura 39** es pot observar que l'expressió de proteïna va augmentar en relació directa amb la concentració de l'hexanal, assolint el màxim d'expressió a la concentració de 100 μ M (1.8 \pm 0.5 (10 μ M), 2.3 \pm 0.7 (25 μ M), 3.1 \pm 1.1 (50 μ M), 5.2 \pm 1.8 (100 μ M) vs. vehicle, totes p=0.037). En aquesta corba, l'augment en l'expressió de proteïna FABP4 a la concentració de 100 μ M va ser significativament més elevada que la produïda per la incubació amb 10 μ M (p=0.037). No es van observar diferències significatives entre les expressions de les altres concentracions. Per tant, la concentració de 100 μ M era la més indicada per continuar el treball experimental.

L'efecte del BRL 1 μ M sobre l'expressió de proteïna FABP4 observat va ser l'esperat d'acord amb el seu paper com a control positiu. La incubació va produir un augment de 45 vegades en la proteïna en comparació amb la incubació amb el vehicle (p=0.037).

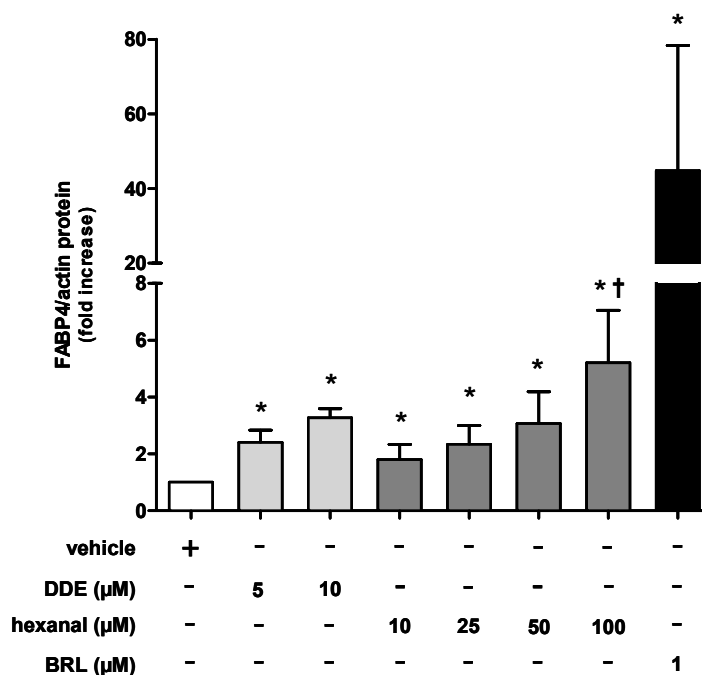


Figura 39. Corbes dosi-reposta als aldehids sobre l'expressió de proteïna FABP4 en macròfags THP-1. Representació dels resultats obtinguts sobre l'expressió de proteïna FABP4 a partir de la incubació durant 24h dels macròfags THP-1 amb diferents concentracions de DDE i hexanal. Els nivells d'expressió de proteïna FABP4 es van determinar per Western blot i es van normalitzar per actina. Els resultats representen el canvi en número de vegades; i es presenten com la mitjana±SD (n=3). * p<0.050 vs. *vehicle*. † p<0.050 vs. hexanal 10µM.

3. Expressió gènica de FABP4 induïda per la dosi definida dels aldehids

Les corbes dosi-resposta de proteïna FABP4 van servir per establir les concentracions de treball dels aldehids. A partir d'aquestes concentracions, es va valorar l'efecte sobre l'expressió de mRNA FABP4 després de 20 hores d'incubació. A la **figura 40** es presenten els resultats obtinguts. Les dues incubacions amb els aldehids, DDE 10µM i hexanal 100µM, van augmentar l'expressió gènica més de 5 vegades en comparació a l'expressió produïda per la incubació amb el vehicle (DDE 10µM, 5.5±1.8; hexanal 100µM, 5.6±1.2 vers vehicle, en ambdós casos p=0.037).

La incubació amb el BRL 1µM va produir un augment d'un ordre de magnitud superior a l'efecte dels aldehids (81.5±10.6 vs. vehicle, p=0.037). L'augment en els nivells de mRNA de FABP4 concordava amb la inducció de proteïna FABP4 observada prèviament (**Figura 39**).

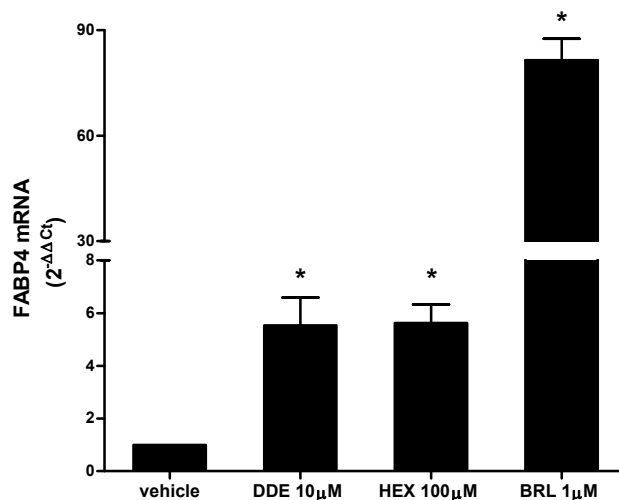


Figura 40. Efecte sobre els nivells de mRNA de FABP4 per efecte de la incubació amb concentració definida dels aldehyds. Anàlisi de l'expressió gènica FABP4 resultant de la incubació durant 20h amb les concentracions definides dels aldehyds (DDE 10μM i HEX 100μM). L'expressió de mRNA FABP4 es va valorar per RT i PCR a temps real, es va prendre el GAPDH com a gen de control endogen. Els resultats representen el canvi en número de vegades; i es presenten com la mitjana±SD (n=3). * p<0.050 vs. *vehicle*.

4. Efecte del tBHQ sobre l'expressió gènica i proteica de FABP4

D'acord amb la hipòtesi inicial que intenta implicar la via del factor de transcripció Nrf2 en la inducció de l'expressió de FABP4 per part dels aldehyds apolars, es va comprovar l'efecte d'un conegut activador de Nrf2, el tBHQ, sobre l'expressió de FABP4.

L'anàlisi de l'expressió gènica per RT i PCR a temps real va demostrar que la incubació durant 20h amb tBHQ 50μM produïa un marcat augment en els nivells de mRNA de FABP4 (10.6±1.7 vers el vehicle, p=0.037) (**Figura 41**). Els resultats en proteïna van anar en el mateix sentit. El tractament amb tBHQ 50μM durant 24 hores va augmentar en 2 vegades els nivells de proteïna FABP4 en els macròfags (1.9±0.4 vegades vs. vehicle, p=0.037) (**Figura 42**). Aquestes dades mostren que la inducció de l'expressió de FABP4 a nivell de mRNA i proteïna resultant de incubació amb tBHQ seria d'un ordre comparable a les produïdes pels aldehyds.

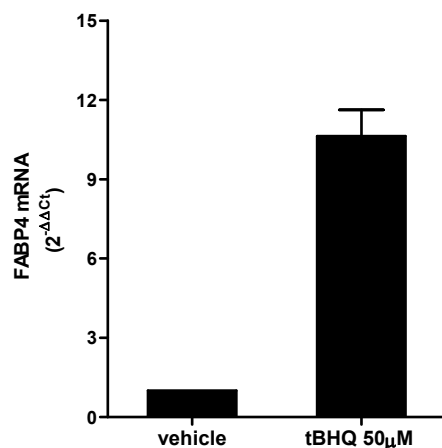


Figura 41. El tBHQ indueix l'expressió gènica de FABP4 en macròfags. Efecte de la incubació amb el control positiu de l'activació de Nrf2, tBHQ, sobre l'expressió gènica de FABP4. Els macròfags THP-1 es van incubar durant 20 hores amb tBHQ 50µM. L'ànalisi de l'efecte de la incubació sobre els nivells de mRNA de FABP4 es va dur a terme per RT i PCR a temps real, prenent com a gen de control endogen el GAPDH. Els resultats representen el canvi en número de vegades; com la mitjana±SD (n=3). * p<0.050 vs. vehicle.

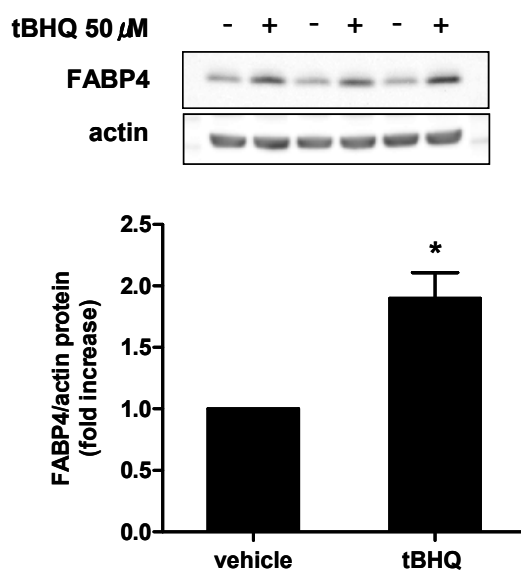


Figura 42. El tBHQ indueix l'expressió proteica de FABP4 en macròfags. Efecte de la incubació amb el control positiu de l'activació de Nrf2, tBHQ, sobre l'expressió proteïna FABP4 en els macròfags THP-1. Les cèl·lules es van incubar amb tBHQ 50µM durant 24h, es van obtenir els extractes de proteïnes citoplasmàtiques i l'expressió de FABP4 es va valorar per Western blot, normalitzant per actina (imatge superior de la figura). A la gràfica es representa el resultat de la quantificació (en número de vegades, mitjana±SD, n=3). * p<0.050 vs. vehicle.

5. Efecte del tBHQ sobre la fosforilació de Nrf2

El tBHQ és un reconegut activador de Nrf2. Aquest compost actua com agent oxidant i permet l'alliberament de Nrf2 del seu repressor citoplasmàtic, Keap1. Com a resultat, el Nrf2 lliure és susceptible de ser fosforilat i, consegüentment, activat. La forma activa i fosforilada es transloca a nucli on s'uneix als llocs ARE dels gens que regula.

A la **figura 43**, es presenten els resultats de la incubació de macròfags THP-1 amb tBHQ 50µM durant 3h de tres experiments independents. Com es pot observar a les tres imatges, a nivell nuclear (N) la incubació amb tBHQ va produir una banda molt intensa en el Western blot, corresponent a la forma fosforilada de Nrf2 (pNrf2). A la gràfica adjacent, es representa la quantificació d'aquesta banda per les dues condicions. De la comparació estadística s'extreu que l'augment de pNrf2 causat pel tBHQ va ser significativament diferent al produït per la incubació amb el vehicle (p=0.050). La figura també permet apreciar que la banda de pNrf2 era pràcticament indistingible a nivell de citoplasma (C), tant en la incubació amb el vehicle com en la del tBHQ. En ambdues fraccions, es va detectar la presència de Nrf2 no fosforilat.

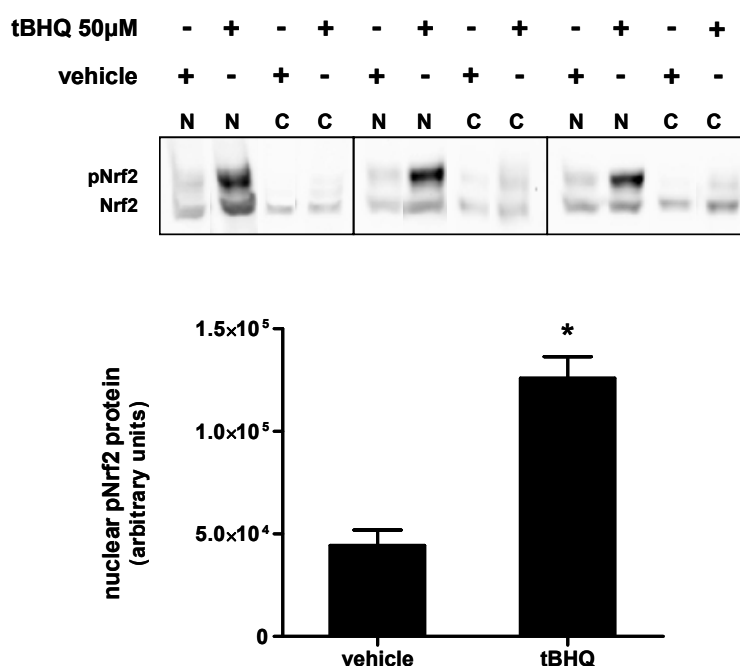


Figura 43. El tBHQ indueix la translocació a nucli de la forma fosforilada de Nrf2 (pNrf2). Els macròfags THP-1 es van incubar durant 3h amb tBHQ 50µM. En les imatges dels Western blots de Nrf2 es mostren els resultats del triplicat d'experiments; s'evidencia l'expressió diferencial de pNrf2 entre nucli i citoplasma. En la figura es representa la quantificació dels nivells de pNrf2 a nivell de nucli induïts pel tBHQ (en unitats arbitràries, mitjana±SD, n=3). * p<0.050 vs. *vehicle*.

La inducció de la translocació a nucli de la forma fosforilada de Nrf2 va ser pràcticament suprimida en presència de l'inhibidor de la síntesi proteica CHX (**Figura 44**). Es va observar una reducció del 88% en la presència de pNrf2 nuclear per efecte de la incubació de tBHQ amb pretractament amb CHX en comparació amb la incubació única amb l'activador de Nrf2 ($p=0.037$). A nivell de la fracció citoplasmàtica, la incorporació de la CHX no va produir cap efecte ni sobre la forma fosforilada i ni la no fosforilada pel fet de no incloure-la.

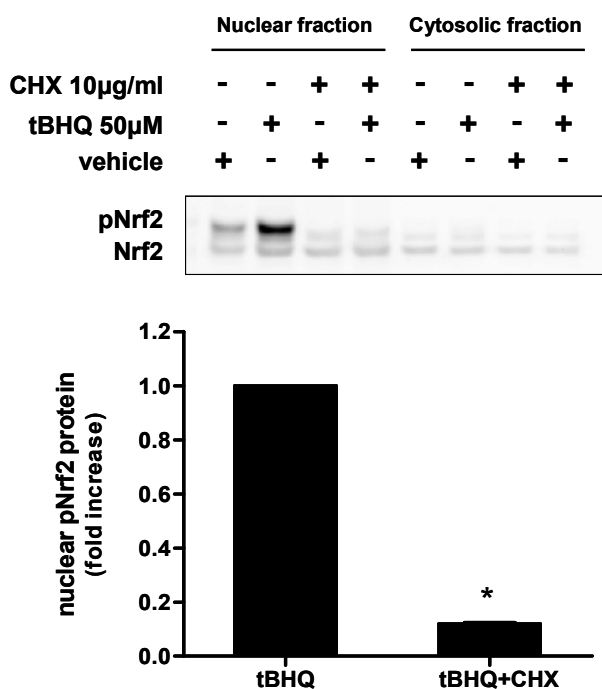


Figura 44. L'activació de Nrf2 per efecte de tBHQ requereix la síntesi *de novo* de proteïna Nrf2. El pretractament de 1h dels macròfags THP-1 amb l'inhibidor de la síntesi de proteïna, CHX 10µg/ml, va precedir la incubació amb tBHQ 50µM durant 3h. La imatge mostra un Western blot de Nrf2 representatiu d'un dels experiments realitzats. La gràfica representa el resultat de la quantificació de l'expressió de pNrf2 diferencial per efecte de la CHX (en número de vegades, mitjana±SD, n=3). * $p<0.050$ vs. tBHQ.

6. Nrf2 s'uneix a un lloc ARE localitzat al promotor de la FABP4 humana

L'anàlisi de la seqüència del promotor de la FABP4 amb el MatInspector va trobar un total de 1598 coincidències de possibles llocs de reconeixement per factors de transcripció. Únicament 8 d'aquestes van pertànyer a la família V\$AP1R i, més específicament, 3 van ser V\$MARE_ARE.01 que és la nomenclatura amb què el programa identifica els ARE (**Taula 4**).

Taula 4. Resum de les coincidències de la família V\$AP1R resultants de l'anàlisi de la seqüència del promotor de la FABP4 humana amb l'algoritme MatInspector.

	Matriu	Opt. threshold	Start pos.	End pos.	Strand	Matrix sim.	Core sim.	Seqüència
Familia: V\$AP1R	V\$MARE.02	0.88	599	619	-	0.901	1.0	atcTGCTcacaaggcaggagt
	V\$MARE_ARE.01	0.76	1319	1339	-	0.775	0.75	aaatccTCACtaagcattaat
	V\$MARE.03	0.82	2579	2599	+	0.848	1.0	cctgGCTGgctcactgttgaa
	V\$MARE_ARE.01	0.76	2992	3012	+	0.785	1.0	gtagatTGACatagccacatt
	V\$TCF11MAFG.01	0.81	3098	3118	-	0.865	1.0	ctagtaTGACtgagaaattga
	V\$BACH2.01	0.89	3570	3590	+	0.925	0.813	ggcgagTGGGtcacctgaggt
	V\$MARE_ARE.01	0.76	4069	4089	-	0.785	1.0	taaaagTGACaatcttaata
	V\$BACH2.01	0.89	5249	5269	-	0.954	1.0	tttctcTGAGtcatgtttta

A la taula, les posicions dels llocs trobats s'indiquen en sentit positiu d'acord amb la seva posició dins els 5403 parells de bases de la seqüència del promotor. La nomenclatura que normalment s'utilitza per la seqüència d'un promotor indica la posició en negatiu i comença a comptar a partir del lloc d'inici de la transcripció. En el cas del promotor de la FABP4 aniria des de -5403 a -1bp. Indiquem amb la doble nomenclatura els llocs trobats a la seqüència.

Dels tres elements trobats, només es va trobar un en la cadena *sense*. Aquest lloc estava localitzat a la posició 2992/-**2411** (ARE_2) i la seva similitud de matriu era del 79%. Els altres dos elements trobats eren a la cadena *reverse* en les posicions 1319/-**4084** (ARE_1) i 4069/-**1334** (ARE_3) a partir del lloc d'inici de la transcripció del gen, amb similituds de seqüència de 78 i 79%, respectivament (veure l'esquema de la **Figura 45**).

Els llocs ARE_1 i ARE_3 es van descartar per trobar-se en la cadena *reverse*. La localització en aquesta cadena implica que la cadena del DNA ha de replegar-se de tal manera que la conformació espacial resultant apropi el lloc d'unió del factor de transcripció a la posició d'inici de la transcripció. Conseqüentment, aquest fet faria més improbable la funcionalitat del lloc ARE_3 que se situa molt proper al lloc d'inici de la transcripció i no permetria adoptar la conformació idònia per la unió del factor de transcripció. El lloc ARE_1 es troba a una distància suficientment allunyada del lloc d'inici de la transcripció per permetre el replegament de la cadena necessari. Malgrat aquest fet, es va descartar perquè la seva viabilitat davant d'un possible lloc d'unió en *sense* és inferior. Conseqüentment, es va decidir proseguir l'estudi únicament amb el lloc ARE_2. La decisió es justifica per la localització del lloc a la cadena *sense* i per la posició en què es troba dins el promotor, no molt allunyada del lloc d'inici de la transcripció.

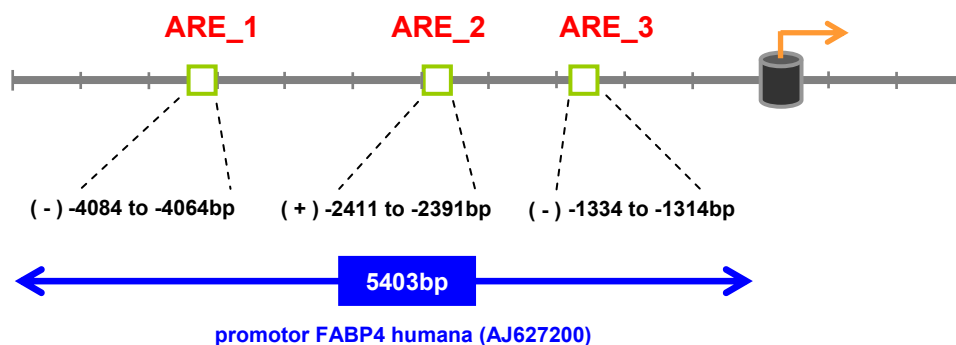


Figura 45. Esquema de la localització dels 3 llocs ARE trobats (V\$MARE_ARE.01) al promotor del gen de la FABP4 humana (GenBank accession number: AJ627200).

A la **figura 46** es mostren els resultats obtinguts amb l'assaig del ChIP. La immunoprecipitació amb l'anticòs específic contra Nrf2 i l'amplificació amb els *primers* al voltant del lloc ARE_2 van produir la banda esperada (153bp). Aquest producte d'amplificació demostrava la unió *in vivo* de Nrf2 al lloc ARE_2 (-2411, -2391bp) del promotor del gen FABP4 humà en macròfags THP-1. El bon funcionament del procediment de la immunoprecipitació es va confirmar per la presència d'una banda amb una migració electroforètica lleugerament inferior (que es podria correspondre amb 166bp), resultat de l'amplificació amb els primers de la GAPDH del producte de la immunoprecipitació de la cromatina amb l'anticòs contra la RNA polimerasa II.

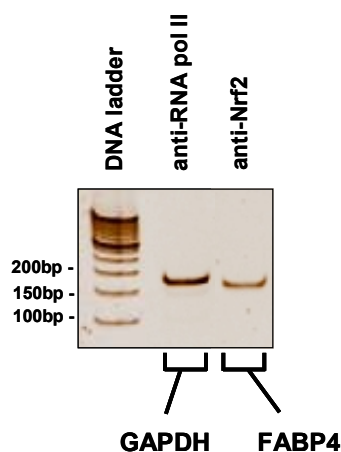


Figura 46. Nrf2 s'uneix al lloc ARE_2 del promotor de la FABP4 humana. La imatge mostra el resultat de l'assaig de la immunoprecipitació de la cromatina (ChIP). Els macròfags es van incubar amb tBHQ 50µM durant 3h. La cromatina es va immunoprecipitar amb anticòs contra Nrf2 i contra RNA polimerasa II. L'immunoprecipitat amb l'anticòs contra RNA polimerasa II es va amplificar amb *primers* específics per GAPDH (banda de 166bp). L'immunoprecipitat amb l'anticòs contra Nrf2 es va amplificar amb *primers* dissenyats al voltant del lloc ARE_2 (banda de 153bp).

7. L'activació de Nrf2 és necessària per la inducció de l'expressió de FABP4 mediada per DDE però no per la de l'hexanal

L'estat de coneixement assolit a través dels resultats obtinguts es mostra en l'esquema de la **figura 47**.

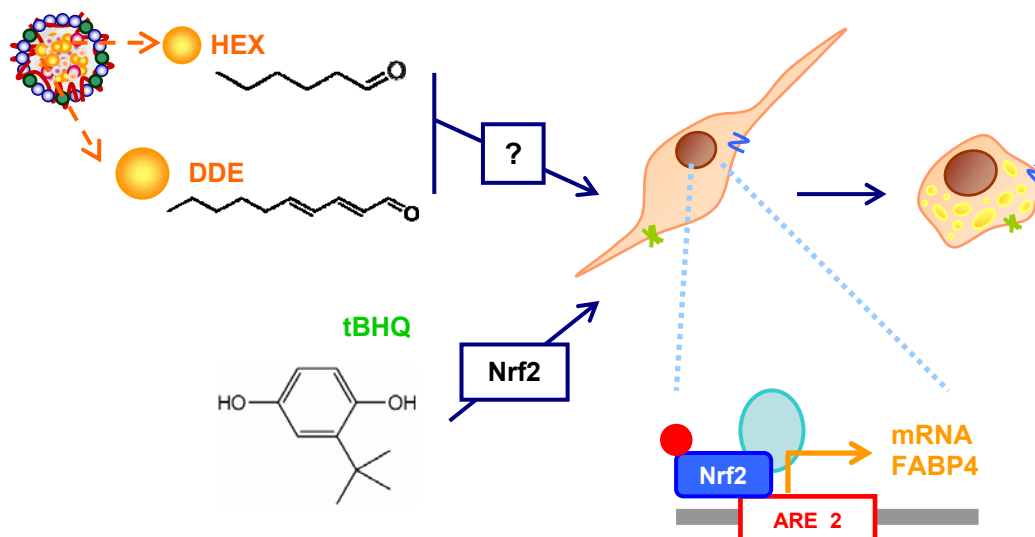


Figura 47. Els aldehids, DDE i hexanal (HEX), indueixen l'expressió de FABP4 a nivell de RNA i proteïna, i que aquesta inducció constituiria un pas inicial en l'evolució fenotípica dels macròfags a cèl·lules escumoses. Un control positiu de l'activació de Nrf2, tBHQ, indueix l'expressió gènica i proteica de FABP4. Nrf2 s'uneix *in vivo* al promotor de la FABP4.

El següent pas va consistir a avaluar l'efecte dels aldehids sobre l'activació i la translocació a nucli de Nrf2. Els macròfags es van incubar amb DDE 10µM i hexanal 100µM en una cinètica curta de tres punts amb un màxim d'incubació de 3h; ja que en tractar-se d'un factor de transcripció, l'activació és ràpida i s'ha d'estudiar a temps curts. Com s'ha explicat a l'apartat de "**Materials i mètodes**", es van obtenir els extractes de proteïnes nuclears i citoplasmàtiques, a partir dels quals es va determinar l'activació de Nrf2 per Western blot.

Com es presenta a la **imatge A** de la **figura 48**, el DDE va potenciar l'acumulació de la forma fosforilada de Nrf2 a nucli al llarg del temps de forma significativa (3.3 ± 0.6 (1h) i 4.4 ± 0.5 (3h) ambdues dades en número de vegades vers el temps inicial de 0.25h, $p=0.037$). L'evolució temporal del DDE sobre l'activació de Nrf2 es visualitza a la **gràfica C** de la **figura 48** (quadres negres). A nivell de citoplasma, la incubació no va produir cap efecte en la forma fosforilada de Nrf2. Aquesta va ser inapreciable en totes les condicions i no es van produir diferències amb la incubació amb el vehicle.

El comportament de l'hexanal va ser radicalment diferent a l'observat pel DDE. L'hexanal no va provocar cap efecte sobre l'activació de Nrf2 (imatge B de la figura 48). Es va detectar la presència de Nrf2 fosforilat a nucli, però en una quantitat molt inferior a la del DDE i no superior a la de la incubació amb el vehicle, i no es va apreciar cap canvi al llarg del temps. La representació gràfica dels nivells de Nrf2 fosforilat a nucli d'un i altre aldehids evidencia la diferència tant en els valors com en el comportament (gràfica C de la figura 48, cercles blancs).

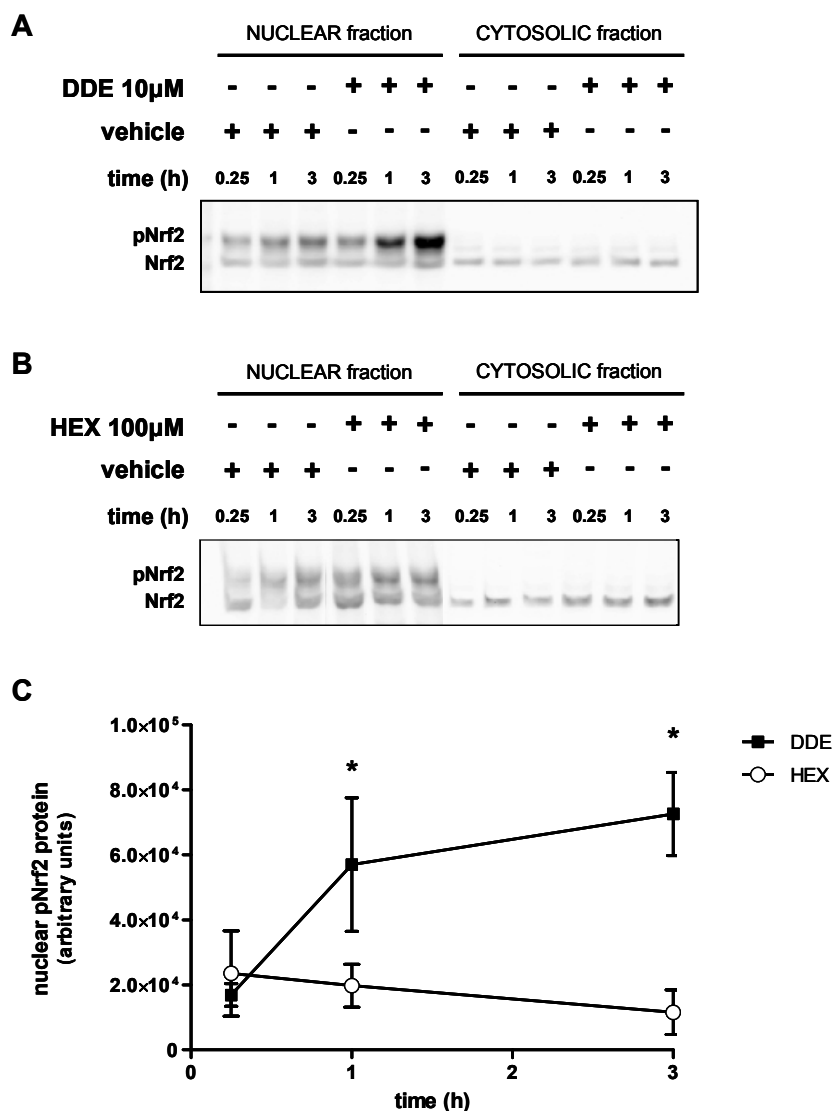


Figura 48. Efecte dels aldehids DDE i hexanal sobre l'activació del factor de transcripció Nrf2. (A) Imatge representativa d'un Western blot en què es valora l'efecte de la incubació dels macròfags THP-1 amb DDE 10µM sobre la presència de pNrf2 a nivell de nucli i citoplasma. (B) Imatge representativa d'un Western blot en què es valora l'efecte de la incubació amb HEX 100µM sobre la presència de pNrf2 a nivell de nucli i citoplasma. (C) Representació gràfica de les quantificacions de la forma pNrf2 a nucli producte de les incubacions amb DDE (quadres negres) i hexanal (cercles blancs) (en unitats arbitràries, mitjana±SD, n=3). * p<0.050 vs. temps inicial (0.25h).

Per tant, és possible que el Nrf2 fosforilat que es va detectar es tracti de l'expressió constitutiva pròpia del factor de transcripció. L'únic aspecte comú amb la incubació amb el DDE va raure en el fet que tampoc es van trobar evidències de Nrf2 fosforilat a citoplasma.

En aquest punt del treball i considerant que l'hexanal no afectava l'activació de Nrf2, es va continuar l'estudi únicament amb el DDE. Com en el cas del tBHQ (apartat 5 de "Resultats"), es va realitzar un experiment en què es va incloure la CHX en les incubacions amb DDE per caracteritzar l'activació de Nrf2 produïda. Els resultats obtinguts van reproduir el comportament de l'experiment amb el tBHQ. La incubació amb pretractament amb CHX va reduir els nivells de la forma fosforilada de Nrf2 a nucli en un 81% en comparació amb la mostra sense pretractament ($p=0.037$) (Figura 49). En primer lloc, aquest resultat indicaria que en aquest cas també resulta necessària la nova síntesi de proteïna Nrf2 per observar activació. I, en segon lloc, evidencia el comportament paral·lel existent entre el DDE i el tBHQ en relació l'activació del factor de transcripció.

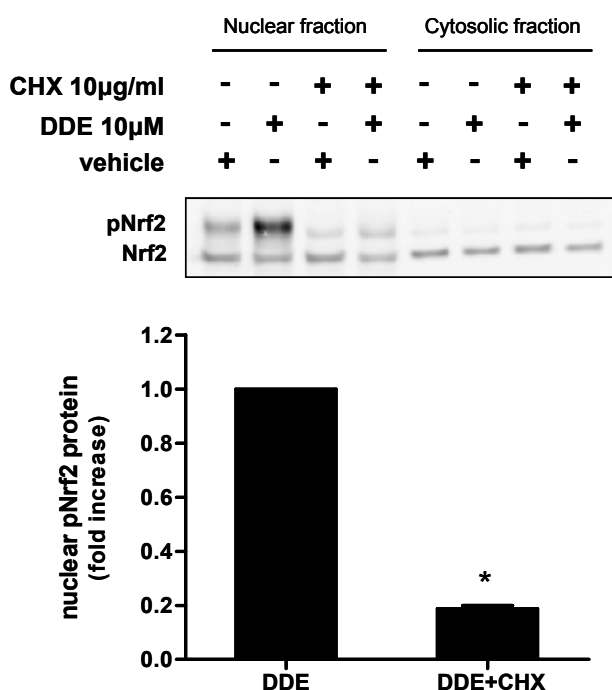


Figura 49. L'activació de Nrf2 per efecte del DDE requereix la síntesi de novo de proteïna Nrf2. El pretractament de 1h dels macròfags THP-1 amb l'inhibidor de la síntesi de proteïna, CHX 10µg/ml, previ a la inducció amb DDE 10µM durant 3h. La imatge mostra un Western blot de Nrf2 representatiu d'un dels experiments realitzats. La figura representa el resultat de la quantificació de l'expressió de pNrf2 diferencial per efecte de la CHX (en número de vegades, mitjana±SD, n=3). * $p<0.050$ vs. DDE.

8. Temps-resposta DDE: proteïna i RNA FABP4

L'efecte al llarg del temps del DDE 10 μ M sobre l'expressió gènica i proteica de FABP4 es va caracteritzar amb la confecció de corbes temps-resposta. A la **figura 50** es presenta la corba temps-resposta de proteïna FABP4.

La incubació amb el DDE es va estendre des de l'estat basal fins a les 24 hores i els resultats obtinguts van evidenciar un augment en els nivells de proteïna al llarg del temps, assolint un màxim d'expressió a les 24 hores (3.8 \pm 0.8 vegades vers l'expressió en estat basal, $p=0.037$) (**Figura 50**). A la imatge del Western blot d'un experiment corresponent a una cinètica de FABP4 es pot comprovar l'evident increment de l'expressió proteica al llarg del temps per efecte de la incubació amb l'aldehid (**Figura 51**).

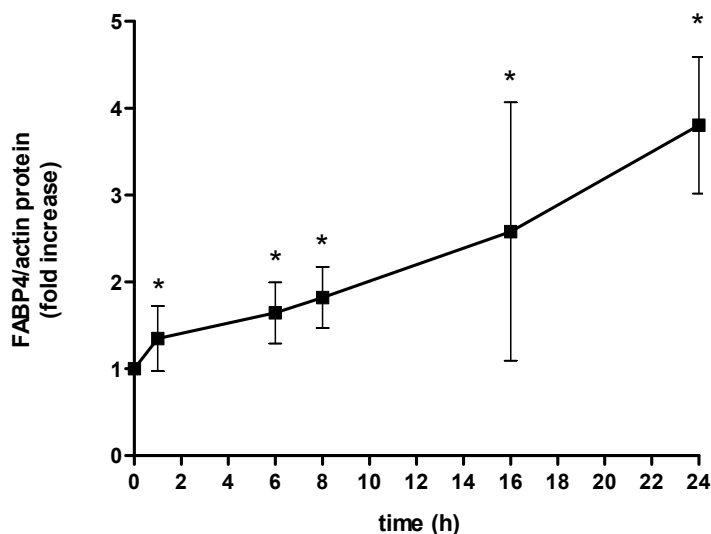


Figura 50. Cinètica temporal de l'expressió de proteïna FABP4 per efecte de la incubació amb DDE.

Els macròfags THP-1 es van incubar amb DDE 10 μ M de 0-24h. L'expressió proteica de FABP4 a citoplasma es va valorar per Western blot normalitzant per actina. La figura representa el resultat de la quantificació de l'expressió en número de vegades respecte a l'estat basal (mitjana \pm SD) (n=3). * $p<0.050$ vs. *basal*.

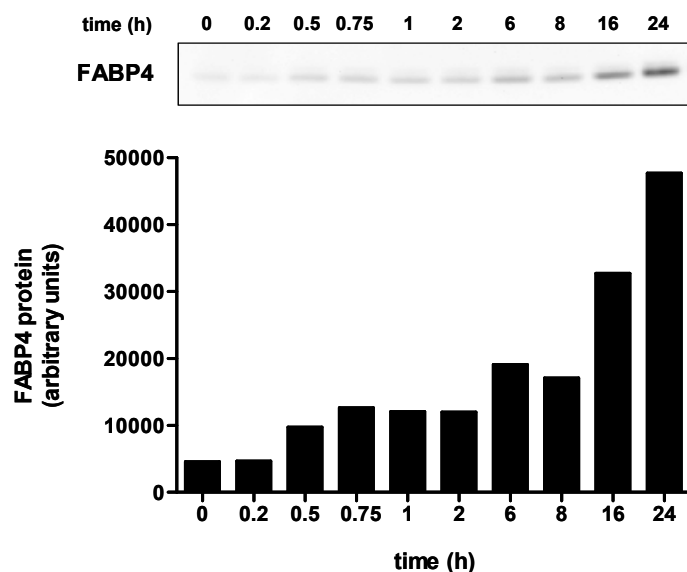


Figura 51. Experiment representatiu de la inducció per part del DDE de l'expressió de proteïna FABP4 al llarg del temps. La imatge superior correspon a un Western blot de FABP4 representatiu d'un dels experiments realitzats. A la figura es representa la quantificació del Western blot de la imatge superior (en unitats arbitràries).

A la cinètica de l'expressió gènica, els temps estudiats van anar des de l'estat basal a les 20 hores. Els resultats de la RT i PCR a temps real van mostrar que els nivells de mRNA de FABP4 van augmentar al llarg del temps arribant a un *plateau* d'expressió màxima que s'estenia des de les 8 a les 20 hores (en número de vegades prenent com a referència el temps basal: 5.4 ± 0.2 (8h); 5.6 ± 0.0 (12h); 5.1 ± 0.8 (20h), en tots els casos $p=0.037$) (**Figura 52**).

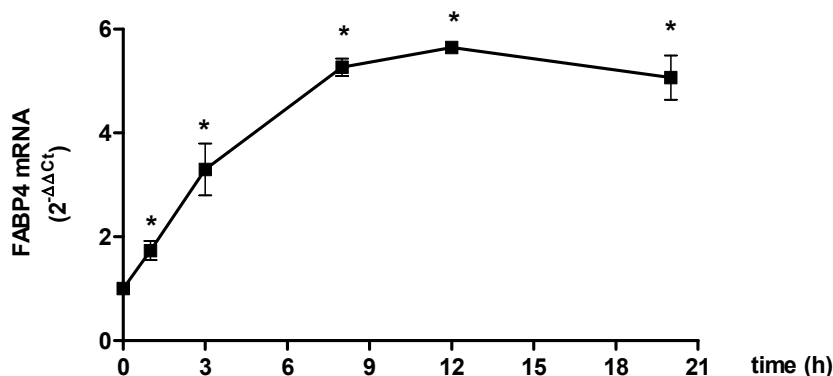


Figura 52. Cinètica de l'expressió gènica de FABP4 per efecte de la incubació amb DDE. Els macròfags es van incubar amb DDE $10\mu\text{M}$ de 0-20h. A partir del RNA total extret, l'expressió de mRNA FABP4 es va valorar per RT i PCR a temps real, prenent com a gen de control endogen el GAPDH. Els resultats representen el canvi en número de vegades; i es presenten com la mitjana \pm SD (n=3). * $p < 0.050$

9. La inducció de FABP4 a nivell transcripcional mediada per DDE es dona per l'estabilització del mRNA de FABP4 en els macròfags THP-1

La inducció de l'expressió gènica de FABP4 en resposta al DDE es va estudiar per caracteritzar-ne el mecanisme concret. En primer lloc, es va valorar si l'expressió del mRNA de FABP4 era dependent de la síntesi *de novo*. Com es descriu en detall a l'apartat de "**Materials i mètodes**", els macròfags es van preincubar durant 1 hora amb inhibidors de la transcripció (Act D) i la traducció (CHX) abans de la incubació de 3 hores més amb el DDE o el vehicle. A la **figura 53** es presenten els resultats obtinguts a partir de la RT-PCR a temps real. La incubació amb el DDE va produir un augment superior a 3 vegades en els nivells de mRNA (3.3 ± 0.5 en comparació amb el vehicle, $p=0.037$). Aquest augment en l'expressió del mRNA de FABP4 es va anul·lar com a resultat del pretractament amb Act D (en número de vegades: 0.2 ± 0.0 (Act D+DDE) vs. 3.3 ± 0.5 (DDE), $p=0.037$). Per tant, es comprova que el DDE augmenta els nivells de mRNA de FABP4 i en potencia la transcripció. El pretractament amb CHX també va reduir notablement l'expressió induïda pel DDE (en número de vegades: 1.1 ± 0.2 (CHX+DDE) vs. 3.3 ± 0.5 (DDE), $p=0.037$). Aquest resultat indica que la síntesi *de novo* de les proteïnes implicades en el procés de la transcripció es requereix per l'augment de l'expressió de mRNA de FABP4 induït pel DDE. Els resultats demostren que la inducció de l'expressió gènica de FABP4 per l'aldehid depèn de la síntesi *de novo* tant del RNA com de les proteïnes implicades en la maquinària de la transcripció.

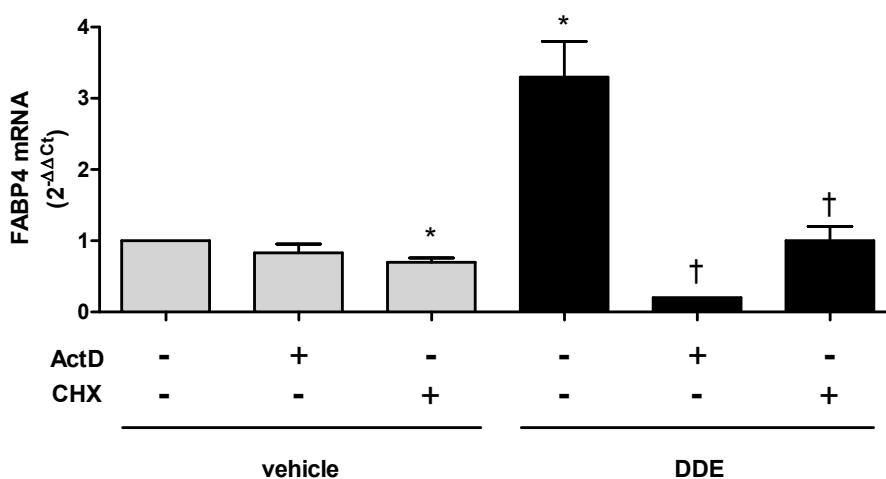


Figura 53. La inducció de l'expressió gènica de FABP4 mediada pel DDE es dona a nivell transcripcional. Els macròfags es van pretractar durant 1h amb els inhibidors de la transcripció (Act D 5µg/ml) i la traducció (CHX 10µg/ml), seguidament es van incubar amb DDE 10µM durant 3h. L'efecte produït sobre els nivells de mRNA FABP4 es va determinar per RT i PCR a temps real, normalitzant amb el control endogen GAPDH. La figura representa l'expressió en número de vegades (mitjana±SD) (n=3). * $p<0.050$ vs. *vehicle alone*. † $p<0.050$ vs. *DDE alone*.

Un altre mecanisme que podria explicar l'augment observat en els nivells de mRNA de FABP4 resultant de la incubació amb el DDE, seria que l'aldehid contribuís en l'estabilització del mRNA produït i que n'incrementés la vida mitjana. Per avaluar la contribució del DDE en l'estabilització del mRNA, es van incubar els macròfags amb DDE i, posteriorment, es va incloure Act D i es van anar obtenint mostres a diferents temps. En els resultats obtinguts es va observar que l'aldehid va allargar l'estabilitat del mRNA de FABP4 i, conseqüentment, la seva vida mitjana. En la incubació amb el vehicle, es va evidenciar el comportament contrari. Els nivells de mRNA de FABP4 van caure de manera significativa en relació al punt inicial de la cinètica. Aquestes observacions van demostrar que el DDE potencia l'estabilització del mRNA de FABP4. I, conseqüentment, que l'estabilitat del mRNA forma part de la inducció de l'expressió gènica de FABP4 mediada pel DDE (**Figura 54**).

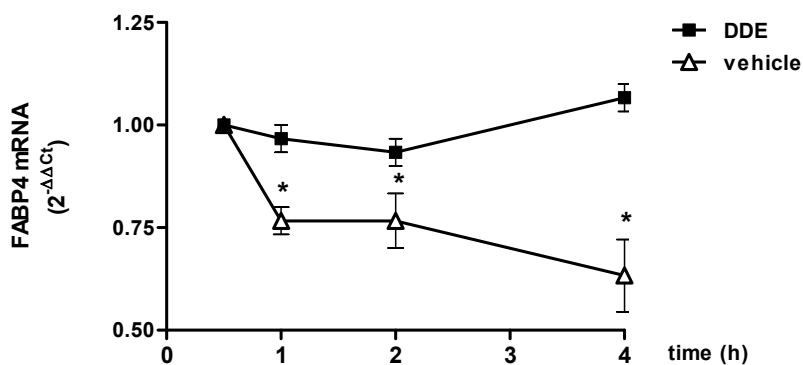


Figura 54. Estudi de l'estabilització del mRNA de FABP4 induïda pel DDE en els macròfags. Els macròfags THP-1 es van incubar durant un temps fix de 3h amb l'estímul (DDE 10μM o vehicle) i, posteriorment, es va incloure l'Act D 5μg/ml al medi d'incubació fins un temps màxim de 4h. En aquesta figura es representen els valors de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ d'expressió diferencial de mRNA FABP4 per efecte de l'aldehid (quadres negres) i el vehicle (triangles blancs) en els temps estudiats. Els valors es van normalitzar amb el GAPDH com a control endogen; i, en ambdós casos, es va prendre com a valor de referència el temps inicial. (n=3). *p<0.050 vs. temps inicial.

10. Vies senyalització implicades en la fosforilació de Nrf2 induïda pel DDE

La fosforilació de Nrf2 és un pas crucial per a l'activació dels gens regulats per la via Nrf2-ARE en resposta als insults oxidants o electrofílics. Diferents cascades de senyalització s'han vist implicades en l'activació d'aquesta via, entre elles: PI-3k/Akt i les proteïnes MAPK. Per identificar les vies de senyalització activades pel DDE que participarien en la fosforilació de Nrf2, els macròfags THP-1 es van incubar amb DDE 10μM i va conformar una cinètica que caracteritzés una activació ràpida (temps <1h), tan pròpia d'aquestes vies, com la monitorització de l'evolució i el retorn a nivells

basals de temps més llargs (màxim de 8h). En primer lloc, es va estudiar la via de senyalització de la PI-3k/Akt; concretament, la fosforilació en els residus Thr308 i Ser473 de l'Akt. El DDE va produir una resposta ràpida i marcada en la fosforilació de les dues formes de l'Akt que es va traduir en una activació màxima de dues vegades després de 0.5h d'incubació amb l'aldehid (en número de vegades: 2.0 ± 0.6 (pThr308-Akt) i 2.0 ± 0.3 (pSer473-Akt), vs. temps basal, i ambdues $p=0.014$). Els nivells de fosforilació van retornar a nivells basals entre les 6 i 8 hores després de l'estimulació (Figura 55).

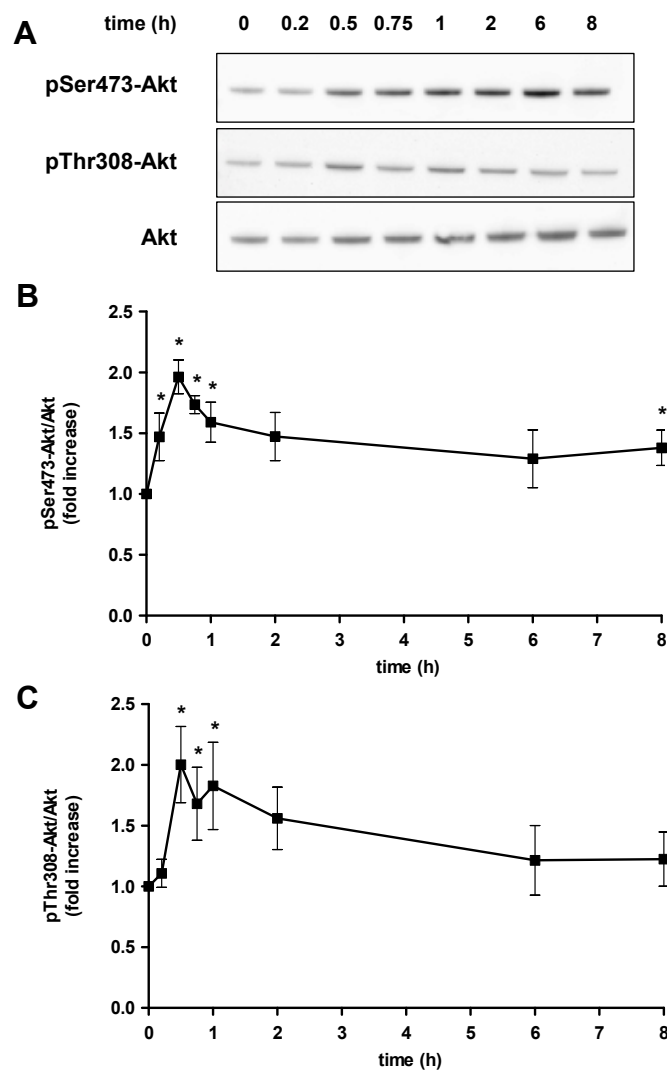


Figura 55. Cinètica de l'activació de la via de senyalització PI-3k/Akt per efecte de la incubació amb DDE. Els macròfags THP-1 es van incubar amb DDE $10\mu\text{M}$ en una corba temporal de 0 a 8 hores, per l'obtenció dels extractes de proteïnes de la fracció citoplasmàtica en què valorar l'expressió de les proteïnes implicades en la via de senyalització PI-3k/Akt per Western blot. (A) Imatges representatives dels Western blots de les proteïnes de la via de senyalització de la PI-3k/Akt d'un experiment concret. (B) Representació dels resultats de la cinètica de l'activació d'Akt per la valoració de la fosforilació en la Ser473. (C) Representació dels resultats de la cinètica de l'activació d'Akt per la valoració de la fosforilació en la Thr308. En ambdues gràfiques (B i C), el valor de la forma fosforilada (p-Akt) està normalitzat per la forma no fosforilada (Akt). Els valors presentats es corresponen amb l'increment en número de vegades vers el temps basal. (n=4). * $p<0.050$ vs. temps basal.

El GSK-3 β és una diana de fosforilació de la PI-3k/Akt. L'activació per fosforilació de l'Akt produeix la fosforilació de GSK-3 β i, en aquest cas, la seva repressió. Els resultats obtinguts mostren una clara correspondència amb la fosforilació de l'Akt. L'estimulació amb el DDE va augmentar els nivells de pSer9-GSK-3 β en els macròfags THP-1. El perfil de la fosforilació de GSK-3 β va reproduir el perfil de l'Akt, amb el màxim al mateix temps de 0.5h (**Figura 56**).

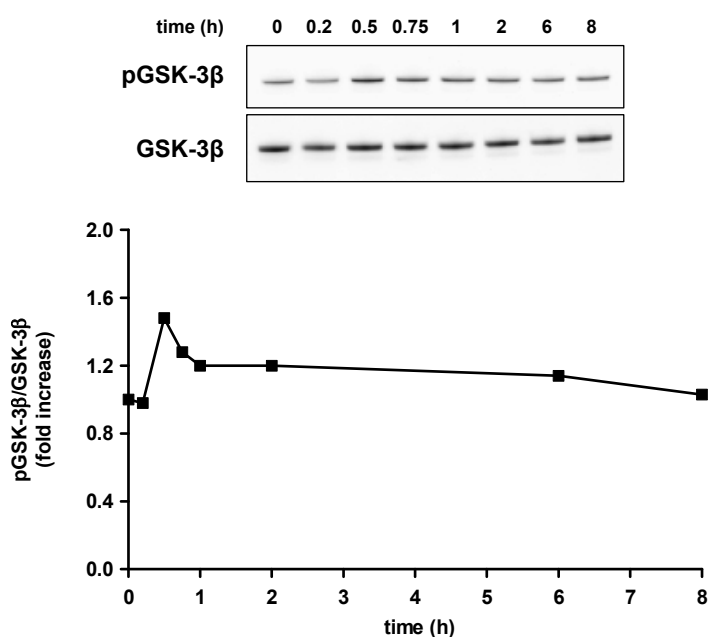


Figura 56. Confirmació de l'activació de la via PI-3k/Akt per la cinètica de la fosforilació de GSK-3 β .

En les mostres de la fracció citoplasmàtica de la corba de 0 a 8 hores de la incubació en què es va valorar l'activació de la via de senyalització PI-3k/Akt es va determinar l'efecte sobre la fosforilació de GSK-3 β . Les imatges superiors són representatives dels Western blots de les formes fosforilada i no fosforilada de la GSK-3 β d'un experiment concret. La figura és una representació dels resultats de la cinètica de la fosforilació de GSK-3 β : el valor de la forma fosforilada (p-GSK-3 β) està normalitzat per la forma no fosforilada (GSK-3 β). Els valors presentats es corresponen amb l'increment en número de vegades vers el temps basal. *p<0.050 vs. temps basal.

Finalment, es va estudiar la proteïna ERK de la cascada de proteïnes MAPK. Com es pot observar a la **figura 57**, la incubació amb el DDE també va produir una ràpida activació d'ERK assolint un màxim al temps de 0.75h (en número de vegades: 2.1 ± 0.3 vs. l'estat basal, $p=0.037$), lleugerament retardat en comparació amb el màxim observat en la via de la PI-3k/Akt. Els nivells de p(Thr202,Tyr204)-ERK van tornar a nivells basals després de 6-8 hores de l'inici de la incubació (**Figura 57**).

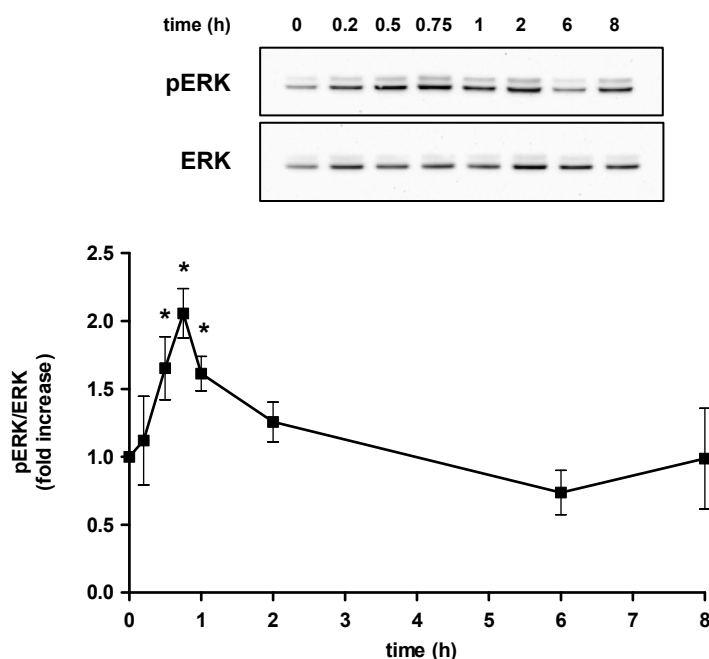


Figura 57. Cinètica de l'activació de la via de senyalització ERK-MAPK per efecte de la incubació amb DDE. En les mostres de la fracció citoplasmàtica de la corba de 0 a 8 hores de la incubació en què es va valorar l'activació de la via de senyalització PI-3k/Akt i la fosforilació de GSK-3 β , es va determinar l'expressió de les formes fosforilada i no fosforilada de la proteïna ERK-MAPK per Western blot. Les imatges a la part superior de la figura són representatives dels Western blots de les formes fosforilada i no fosforilada d'ERK d'un experiment concret. A la gràfica es representen els resultats de la cinètica de l'activació d'ERK valorant el grau de fosforilació en Thr202 i Tyr204. El valor de la forma fosforilada (p-ERK) està normalitzat per la forma no fosforilada (ERK). Els valors presentats es corresponen amb l'increment en número de vegades vers el temps basal. (n=4). * $p<0.050$ vs. temps basal.

11. Assaigs d'immunofluorescència

Els assaigs d'immunofluorescència ens van permetre reproduir i visualitzar els resultats anteriorment presentats en relació a l'efecte del DDE sobre l'expressió de FABP4, la translocació a nucli de Nrf2 fosforilat i l'activació de la via de senyalització PI-3k/Akt.

11.1 Efecte de la incubació amb el DDE sobre l'expressió proteica de FABP4 (Figura 58A).

El tractament amb el DDE 10µM va augmentar de manera evident els nivells d'expressió de FABP4 de les cèl·lules en relació a la incubació amb el vehicle. Les imatges ens permeten observar com en les cèl·lules incubades amb el vehicle, l'emissió fluorescent era inapreciable, corresponent a una nul·la expressió de FABP4. En canvi, en la incubació amb l'aldehid l'expressió era notable. Addicionalment, tenint en compte la tinció de nuclis amb el DAPI, es va observar com l'expressió de FABP4 donada per l'aldehid era molt evident a nivell de citoplasma, però també es detectava una certa expressió a nivell de nucli, com a producte de la translocació. La presència a nucli de FABP4 és una evidència coneguda que suggereix que aquestes proteïnes podrien realitzar la seva funció en ambdues localitzacions subcel·lulars^{19, 300}.

11.2 Efecte de la incubació amb el DDE sobre la translocació a nucli de la forma fosforilada de Nrf2 (Figura 58B).

L'ús de l'anticòs contra la forma fosforilada de Nrf2 ens va permetre detectar únicament la forma estabilitzada i activa del factor de transcripció; i, d'aquesta manera focalitzar l'efecte de l'aldehid sobre la seva activació. A la imatge corresponent a la incubació de 3h amb el vehicle, es pot observar un senyal fluorescent difús a nivell de citoplasma que es correspon amb un grau d'expressió baixa de Nrf2 fosforilat. També, es detecta expressió a nucli. Aquest perfil es correspon amb l'expressió i un nivell d'activació constitutius del factor de transcripció pròpia d'un estat d'homeòstasi redox. La incubació amb el DDE durant 3h va proporcionar una imatge clarament diferent a l'anterior. La fluorescència donada per p-Nrf2 es concentra totalment a nucli. I, la intensitat de

fluorescència és notablement més elevada a la que s'observa en la imatge del vehicle; malgrat aquesta valoració sigui merament qualitativa. Cal destacar que les imatges de la tinció amb p-Nrf2 i DAPI se superposen perfectament. A nivell de citoplasma, s'observa una expressió nul·la de la forma fosforilada de Nrf2. Per tant, la imatge es correspon amb una situació en què la presència d'un estímul oxidant trenca l'homeòstasi redox i provoca l'activació de la maquinària del sistema de defensa antioxidant liderada per l'activació de Nrf2.

11.3 Efecte de la incubació amb el DDE sobre l'activació de la via de senyalització PI-3k/Akt (Figura 58C).

L'activació de la via de senyalització PI-3k/Akt es va valorar amb l'anticòs contra p-Ser473-Akt, que es correspon amb la forma de màxima activació d'aquesta proteïna quinasa. A nivell basal, la imatge obtinguda evidencia expressió de la forma fosforilada de la quinasa, tant a nivell de citoplasma com de nucli, pròpia d'una expressió constitutiva. En incubar durant 0.5h amb DDE 10 μ M, la imatge obtinguda mostra una expressió augmentada en comparació amb l'observada basalment. La fluorescència emesa permet delimitar perfectament les cèl·lules. Per tant, es visualitza una activació d'Akt per efecte de la incubació amb l'aldehid.

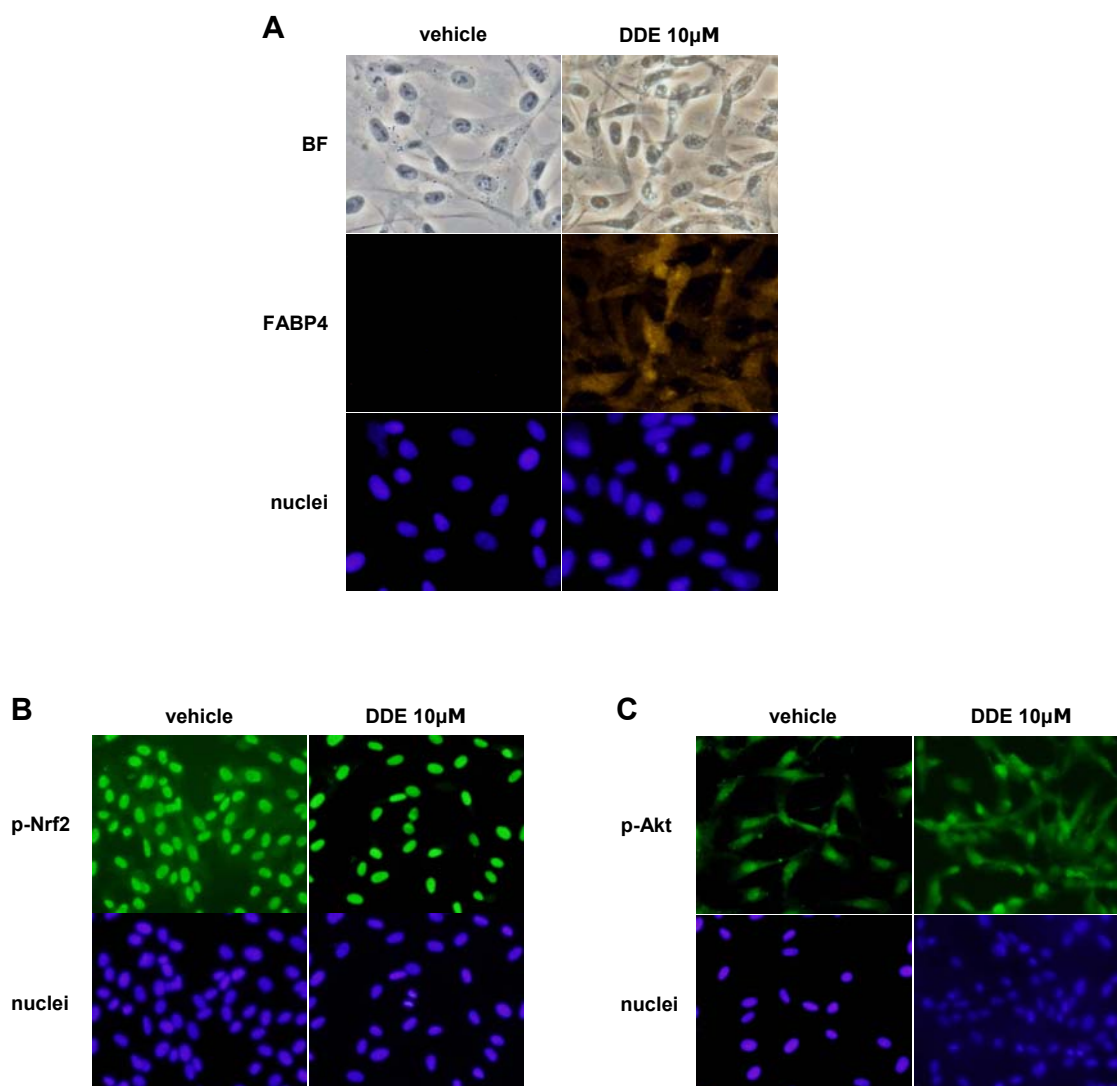


Figura 58. Imatges dels assaigs d'immunofluorescència. Les cèl·lules HCASMC es van incubar amb vehicle o DDE 10µM als temps de 0.5, 3 i 24 hores, per reproduir els resultats de l'efecte del DDE sobre l'expressió de FABP4 (A), l'activació i translocació a nucli de Nrf2 (B) i l'activació de la via senyalització PI-3k/Akt (C). (A) Les imatges superiors es corresponen amb la captació en camp clar (BF, *Bright Field*) de les cèl·lules tenyides per la detecció de l'expressió de FABP4 (imatges centrals) i de nucli (imatges inferiors). La incubació durant 24h amb el DDE clarament va augmentar els nivells d'expressió de FABP4. (B) La incubació amb l'aldehid durant 3h va provocar l'augment de l'expressió i la translocació a nucli de la forma fosforilada de Nrf2 (p-Nrf2). Les imatges de la tinció per p-Nrf2 i de nucli de les cèl·lules incubades amb el DDE se superposen perfectament. (C) L'aldehid clarament produïa l'activació de la via de senyalització PI-3k/Akt, perquè els nivells de Akt fosforilat a la posició 473 (p-Akt) augmentaven notablement després de la incubació durant 0.5h vers el vehicle.

12. Relació entre els nivells circulants de FABP4 i l'activació sistèmica de Nrf2 *ex vivo*

La relació trobada entre el sistema de defensa antioxidant i la FABP4 a nivells *in vitro* va plantejar el repte de l'extrapolació a nivell *ex vivo*. A l'apartat 7 de **Materials i mètodes** es descriu el procediment realitzat. Com es pot observar a la **figura 59**, els valors mitjans de FABP4 circulant entre els 2 grups de pacients confeccionats van ser significativament diferents: LOW-FABP4, $15.3 \pm 2.3 \mu\text{g/l}$; HIGH-FABP4, $52.9 \pm 6.9 \mu\text{g/l}$ ($p < 0.001$).

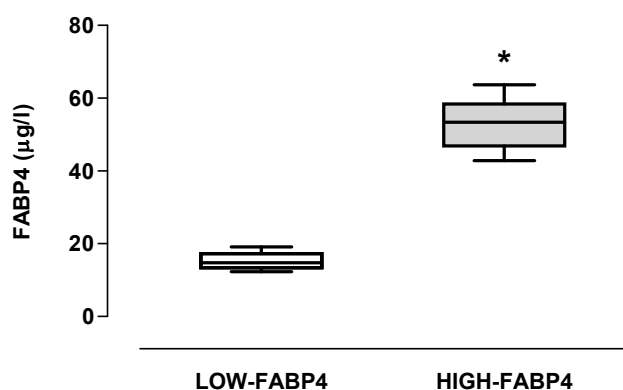


Figura 59. Nivells circulants de FABP4. Representació en un *box-and-whisker plot* de les concentracions circulants de FABP4 en els grups d'estudi confeccionats, LOW-FABP4 (n=10) i HIGH-FABP4 (n=10). Els dos grups es van comparar per un test no paramètric U de Mann-Whitney. * $p=0.050$.

La valoració de l'activació sistèmica de Nrf2 en els 2 grups amb l'ELISA-EMSA de Nrf2 va demostrar que el grup amb nivells circulants elevats de FABP4 (HIGH-FABP4) presentava una activació sistèmica de Nrf2 en els PBMCs més elevada en comparació amb els individus del grup LOW-FABP4 (0.021 ± 0.026 vs. 0.005 ± 0.007 , $p=0.029$) (**Figura 60**).

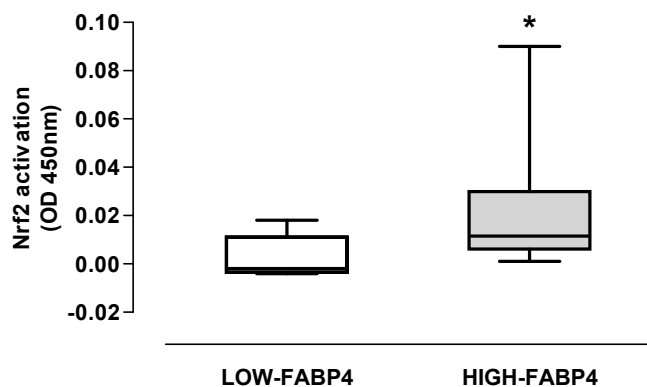


Figura 60. Activació sistèmica de Nrf2. Representació en un *box-and-whisker plot* del nivell d'activació de Nrf2 en els grups d'estudi confeccionats, LOW-FABP4 (n=10) i HIGH-FABP4 (n=10). Els dos grups es van comparar per un test no paramètric U de Mann-Whitney. * $p=0.050$.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
REGULACIÓ DE FABP4 DEPENDENT DE NRF2 EN MACRÒFAGS
Iolanda Lázaro López
ISBN:978-84-693-8852-5/DL:T.1952-2010

Discussió

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
REGULACIÓ DE FABP4 DEPENDENT DE NRF2 EN MACRÒFAGS
Iolanda Lázaro López
ISBN:978-84-693-8852-5/DL:T.1952-2010

En els darrers anys, el coneixement assolit a través dels diferents treballs trobats a la literatura sobre l'estudi de la FABP4 ha permès que el concepte inicial que es tenia d'aquesta proteïna evolucioni. La FABP4 ha passat de ser el membre específic d'adipòcit de la família de xaperones intracel·lulars FABP, encarregat de transportar molècules lipídiques (principalment, àcids grassos de cadena llarga)⁴, a ser postulat com un marcador circulant de desordres metabòlics que vincula els metabolismes lipídic i glucídic^{33, 39, 51, 119}. L'estudi de l'expressió de la FABP4 en el macròfag està proporcionant un nou coneixement de la funcionalitat d'aquesta proteïna. S'ha determinat que la FABP4 incideix sobre dues funcions clau del macròfag implicades en l'aterogènesi: el transport de colesterol i l'activitat inflamatòria⁶⁸. En aquesta tesi s'ha avaluat la vinculació de la FABP4 amb el sistema de defensa antioxidant cel·lular en una etapa inicial en l'evolució fenotípica del macròfag a cèl·lula escumosa. S'ha determinat per primera vegada que l'expressió de la FABP4 en macròfags en resposta al DDE, un aldehyd apolar present a les LDLox, està regulada per Nrf2, el factor de transcripció que lidera la defensa antioxidant.

Les LDLox i els aldehyds apolars en l'augment de l'expressió de FABP4 que promou l'evolució fenotípica del macròfag a cèl·lula escumosa

L'activació dels macròfags desenvolupa un paper essencial en la immunitat i l'homeòstasi lipídica. Però, una activació excessivament perllongada pot promoure l'aparició d'un estat patològic. Un exemple clar és el procés de *scavenging* de lipoproteïnes modificades. Una excessiva captació de lipoproteïnes modificades satura la capacitat dels macròfags i dispara el canvi d'aquestes cèl·lules al fenotip de cèl·lula escumosa, esdeveniment clau en la progressió de la lesió ateroscleròtica.

Les lipoproteïnes modificades per l'oxidació, LDLox, promouen l'expressió de FABP4 a nivell de RNA i proteïna en macròfags THP-1⁶². L'atorvastatina reverteix la inducció de l'expressió de FABP4 en macròfags en resposta a les LDLox⁶⁷. Aquest augment en l'expressió de FABP4 en resposta a les LDLox constitueix un esdeveniment clau en la transformació dels macròfags a cèl·lules escumoses³⁷ (**Figura 61**).

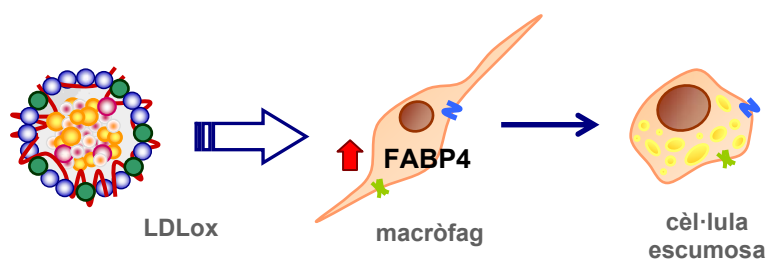


Figura 61. Les LDLs oxidades (LDLox) indueixen l'expressió de FABP4 en macròfags, promovent l'evolució fenotípica d'aquests a cèl·lula escumosa.

En el procés de formació de cèl·lules escumoses, l'augment de l'expressió intracel·lular de FABP4 va acompanyat de la seva secreció extracel·lular, de forma quantitativament molt important segons les observacions obtingudes en un model *in vitro*⁴⁰. Aquesta secreció postularia la FABP4 com una proteïna candidata a ser biomarcador de l'aterogènesi⁴⁰. Aquesta concepció es va consolidant si es consideren els estudis amb models animals. La deficiència en aP2 en el model animal d'aterosclerosi (*apoE*^{-/-}) provoca una disminució en la formació de la lesió³⁵. La contribució de la FABP4 de macròfags és clau en el desenvolupament de l'aterosclerosi i és independent de la FABP4 d'adipòcit³¹. Als macròfags es promou una acumulació de colesterol i triglicèrids accelerada, perquè l'expressió de la FABP4 afecta l'expressió de gens clau del metabolisme lipídic: positivament en el cas de l'*acyl-coenzyme A: cholesterol-acyltransferase 1* (ACAT) i, negativament, sobre ABCA1 i HSL³⁰¹. Els macròfags deficients en aP2 presenten defectes en l'acumulació de colesterol. La deficiència altera la composició lipídica, es produeix un augment en l'expressió de CD36 que provoca un augment en la captació de les LDLox. I, també, s'estimula de manera significativa la via LXR α -ABCA1 que promou l'eflux⁶⁸. L'expressió de FABP4 ha estat detectada en placa d'ateroma humana³⁷ i de ratolí⁶⁸, i aquesta expressió s'ha comprovat que colocalitza amb la presència de macròfags^{37, 68}.

La reducció en la lesió ateroscleròtica observada en els animals *apoE*^{-/-} *aP2*^{-/-}³⁵, es reproduïx en el model animal *apoE*^{-/-} *nrf2*^{-/-}²⁸³. Contràriament al que passa al model *apoE*^{-/-} *aP2*^{-/-}⁶⁸, en els animals *apoE*^{-/-} *nrf2*^{-/-} la menor àrea de lesió s'atribuïa a una reducció en l'expressió de CD36 en macròfags aïllats²⁸³. Malgrat la diferència mecànica existent entre els dos models animals, en ambdós casos s'arribava a un resultat coincident. En aquest triangle, caldria per resoldre com es veuria afectada l'expressió de FABP4/aP2 en el model animal *apoE*^{-/-} *nrf2*^{-/-}. Seria interessant, ja que

les LDLox i el 4-HNE regulen l'expressió de CD36 en macròfags a través de Nrf2, de manera parcial i no independent d'altres factors de transcripció²⁷⁴. En canvi, en els preadipòcits aquesta regulació es dona únicament per efecte de l'activació de Nrf2, independent de PPAR γ ³⁰². CD36 i FABP4 presenten un cert paral·lelisme funcional i de regulació.

De forma global, els estudis presentats evidencien que les LDLox promouen el desenvolupament de la lesió ateroscleròtica, activen la maquinària gènica que desencadena l'evolució dels macròfags a cèl·lula escumosa. FABP4 i CD36 es trobarien entre els gens implicats, amb una aparent dependència de l'activació de Nrf2. Les LDLox són una entitat resultant de la modificació oxidativa de les LDL natives, que engloba una sèrie de compostos producte de l'oxidació d'àcids grassos poliinsaturats, fosfolípids i colesterol. Resulta interessant determinar la contribució d'algun dels components oxidats de les LDLox, com els aldehids, sobre l'expressió de FABP4. I aquest ha estat un dels objectius vertebradors d'aquesta tesi.

En primer lloc, es va valorar l'efecte de l'exposició continuada dels macròfags THP-1 als aldehids apolars, DDE i hexanal, sobre l'expressió de FABP4. Les concentracions utilitzades van ser de 5 μ M DDE i 10 μ M hexanal. Aquestes concentracions d'incubació van ser sensiblement més baixes a les utilitzades en treballs previs del grup¹¹⁴⁻¹¹⁶. La raó que ho justifica és que es va considerar més adient treballar a concentracions baixes perquè es poguessin realitzar un nombre superior de renovacions de dosi a les cèl·lules, amb la qual cosa s'evita la toxicitat cel·lular i es juga amb el concepte de l'hormesi¹¹³. D'aquesta manera, es va pretendre caracteritzar l'evolució de les cèl·lules per efecte de la incubació amb els aldehids en valorar l'expressió de FABP4 a un temps final després d'una sèrie de repeticions de dosi dels aldehids. Els resultats obtinguts van demostrar inducció de l'expressió gènica de FABP4 per part del DDE i el control positiu de l'activació de PPAR γ , el BRL. En canvi, l'hexanal no va produir cap efecte sobre els nivells de mRNA de FABP4. Possiblement, aquesta absència de resposta va ser deguda al fet que la concentració d'hexanal utilitzada va ser excessivament baixa. Si considerem que l'expressió de FABP4 està específicament induïda en la transformació de macròfag a cèl·lula escumosa, els resultats obtinguts donarien suport a la hipòtesi que una exposició persistent als aldehids promouria aquesta evolució fenotípica. Els aldehids apolars, integrants de les LDLox, participarien o explicarien de manera parcial, l'efecte que aquestes provoquen sobre l'expressió de FABP4 a nivell de mRNA com de proteïna observat a la bibliografia^{37, 62}.

En l'estudi de Fu i col·laboradors, la transformació a cèl·lula escumosa es valora a través de la determinació de l'acumulació d'èsters de colesterol intracel·lular³⁷. Seria interessant ratificar que la inducció de l'expressió de FABP4 per part dels aldehids promou la transformació dels macròfags a cèl·lules escumoses en valorar l'acumulació lipídica intracel·lular. Aquesta valoració podria realitzar-se bé per la determinació dels èsters de colesterol intracel·lulars bé, amb una tinció lipídica, com l'Oil Red O³⁰³.

L'absència de resposta obtinguda per l'hexanal en l'experiment de les repeticions de dosi va requerir realitzar un estudi per determinar la concentració de treball dels aldehids. La confecció de corbes dosi-resposta va permetre continuar el procediment experimental amb una concentració definida per cada aldehyd, adequada per produir efectes sobre l'expressió proteica de la FABP4 en els macròfags. Les concentracions de treball dels aldehids que es van establir van ser 10µM pel DDE i 100µM per l'hexanal. Amb aquestes concentracions es va observar una resposta màxima sobre l'expressió de FABP4 sense provocar citotoxicitat. Tant el DDE com l'hexanal van induir un augment significatiu en l'expressió de mRNA de FABP4 vers la condició control.

Nrf2: factor de transcripció implicat en el mecanisme a través del qual el DDE però no l'hexanal indueix l'expressió de FABP4 en macròfags

El mecanisme que els autors dels treballs presentats han suggerit com a explicació de l'augment de l'expressió gènica i proteica de FABP4 per efecte de les LDLox indicaria la participació de PPAR γ ³⁷. La justificació rau que diferents compostos resultants de l'oxidació de les molècules lipídiques, majoritàriament àcids poliinsaturats i fosfolípids, i que es troben presents a les LDLox són lligands endògens de PPAR γ . Entre aquests compostos es troben *9-hydroxyoctadecadienoic acid* (9-HODE), *13-hydroxyoctadecadienoic acid* (13-HODE) i *15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂* (15d-PGJ₂).

Altres estudis trobats a la bibliografia han determinat que aquests compostos lipídics oxidats també són activadors d'un altre factor de transcripció, Nrf2. Els derivats oxidats d'àcids grassos linoleic (C18:2 n-6), eicosapentaenoic (EPA, C20:5n-3) i docosahexaenoic (DHA, C22:6n-3) indueixen l'activació de Nrf2 i el sistema de defensa antioxidant en cèl·lules de neuroblastoma³⁰⁴ i HepG2³⁰⁵. Als macròfags, la 15d-PGJ₂ i els fosfolípids oxidats activen Nrf2 i, conseqüentment, es produeix la inducció de la bateria de gens de la defensa antioxidant regulats per aquest factor de

transcripció²⁸¹. A més, s'ha proposat un nou fenotip de macròfag (Mox) derivat de l'exposició a fosfolípids oxidats que és sorprenentment diferent als fenotips convencionals. El macròfag Mox presenta un patró d'expressió gènica diferent, així com disminucions en les capacitats fagocítiques i quimiotàctiques, en què Nrf2 n'és un regulador clau³⁰⁶. I, finalment, un hidroxialquenal, concretament el 4-HNE, indueix l'expressió de CD36 a través de l'activació de Nrf2 en macròfags murins²⁷⁴.

Tenint en compte el fet que els productes derivats de la peroxidació lipídica presents a les LDLox poden regular l'expressió de diferents gens a través de l'activació de Nrf2, calia determinar si l'activació dirigida de Nrf2 afectava l'expressió de la FABP4 en els macròfags. Per activar específicament a Nrf2, es va utilitzar un conegut activador d'aquest factor de transcripció, el tBHQ. Els resultats obtinguts van evidenciar que l'activació de Nrf2 produïa augments en l'expressió gènica i proteica de FABP4 en els macròfags THP-1. Per tant, aquests resultats constituïen una evidència indirecta de la regulació de l'expressió de FABP4 per part de Nrf2.

L'evidència indirecta va conduir a plantejar l'existència d'una regulació directa de FABP4 per part de Nrf2. L'estudi *in silico* del promotor de la FABP4 humana per cercar possibles llocs ARE va constituir una primera actuació per provar-ho. Com a resultat de l'anàlisi realitzada, es van trobar tres possibles llocs ARE a la seqüència del promotor del gen de la FABP4 humana. Entre aquests tres llocs, l'interès va recaure en el lloc ARE_2 situat a la posició 2992/-2414bp en la cadena *sense* i amb un grau elevat d'homologia amb la seqüència consens dels llocs ARE. Donades aquestes característiques, es va decidir prosseguir l'estudi únicament amb el lloc ARE_2. En el següent pas de l'estudi, es va comprovar la unió *in vivo* de Nrf2 a aquest lloc ARE_2 del promotor del gen de la FABP4 humana. Es va dur a terme un assaig ChIP amb un anticòs específic i amb un parell d'oligonucleòtids dissenyats específicament per cobrir la regió en què s'havia detectat el possible lloc d'unió ARE_2. L'obtenció de la banda d'amplificació de PCR confirmava la unió de Nrf2 al promotor de la FABP4 *in vivo*. L'existència del lloc ARE al promotor possibilitava que la regulació de l'expressió de FABP4 es donés a través de Nrf2. El següent pas de la caracterització de la via va consistir a determinar la implicació dels aldehids apolars d'estudi, DDE i hexanal, en l'activació de Nrf2.

Previ a valorar l'efecte dels aldehids sobre l'activació de Nrf2, es va estudiar el comportament del factor de transcripció en els macròfags mitjançant el control positiu tBHQ. Aquest compost antioxidant fenòlic sintètic activa el factor de transcripció Nrf2,

actua sobre les vies de senyalització intracel·lular implicades en la fosforilació directa sobre el factor de transcripció i aquelles que participen en l'ancoratge als microfilaments d'actina del citoesquelet del repressor homodimèric Keap1²³⁷. En ambdós casos, l'efecte resultant és l'alliberament de Nrf2 de Keap1, la fosforilació i estabilització, i la translocació a nucli on pot dur a terme la seva activitat transcripcional. La incubació dels macròfags THP-1 amb tBHQ 50µM es va realitzar a un temps curt, 3h, d'acord amb el caràcter d'un factor de transcripció i a la informació trobada a la bibliografia²³⁷. Els resultats obtinguts en el nostre treball van reflectir el coneixement trobat a la bibliografia. La forma fosforilada i activa de Nrf2 induïda per tBHQ únicament era detectada a nivell nuclear, pràcticament no s'apreciava a nivell de citoplasma. En canvi, la forma no fosforilada i no activa era detectada en ambdues localitzacions cel·lulars.

Per caracteritzar l'origen de la presència a nucli de Nrf2, es va realitzar un experiment en què es va incloure un inhibidor de la síntesi proteica (CHX) juntament amb l'estímul de tBHQ. La pràctica supressió de la forma fosforilada de Nrf2 a nucli per efecte de la incorporació de la CHX a la incubació amb el control positiu de l'activació de Nrf2 ens indicava que era necessari que se sintetitzés nova proteïna Nrf2 perquè es pogués activar i translocar-se a nucli per realitzar la seva funció. La concepció inicial del funcionament de Nrf2 es basava en el fet que per a la seva activació simplement era necessari l'alliberament del repressor i la translocació a nucli. Aquest resultat indicava que era necessària la síntesi proteica. Aquestes dues idees en relació a l'activació de Nrf2 són complementàries. En un primer moment, el Nrf2 segrestat a citoplasma per Keap1 és el que es transloca a nucli i realitza una primera activació de la transcripció dels gens que regula. Com Nrf2 s'autoregula, indueix la síntesi *de novo* de la seva pròpia proteïna²⁵⁰, que s'activa i actua com a relleu de les primeres molècules de Nrf2 que han actuat en primera instància.

Un cop caracteritzat el comportament de Nrf2, es van estudiar els aldehyds. El resultat obtingut ens va sorprendre, perquè va evidenciar un comportament completament diferent entre els dos aldehyds testats. El DDE reproduïa el comportament del tBHQ en relació a l'augment de la forma fosforilada a nivell nuclear. Cosa que significava que el DDE activava el factor de transcripció. En canvi, l'hexanal no va induir canvis en els nivells de fosforilació vers la incubació control i tampoc no es produïa la translocació augmentada a nucli. En la incubació amb l'hexanal únicament s'evidenciava l'activació constitutiva de Nrf2.

D'aquests resultats es va extreure una conclusió important: la diferència en el mecanisme d'acció de DDE i hexanal sobre la regulació de l'expressió de FABP4. El factor de transcripció Nrf2 induiria l'expressió de FABP4 en resposta al DDE com a mínim, de manera parcial o en col·laboració amb altres factors de transcripció, que estarien per determinar, com en el treball de Ishii i col·laboradors²⁷⁴. En canvi, en la inducció de l'expressió de FABP4 donada l'hexanal es podria estar donant un efecte competitiu entre Nrf2 i altres factors de transcripció, en detriment del primer. El factor de transcripció més probable que estaria al càrrec de la regulació de la FABP4 en resposta a l'hexanal seria PPAR γ .

A la bibliografia existeixen treballs en què s'ha determinat que Nrf2 pot treballar en col·laboració amb altres factors de transcripció en la regulació gènica: NF- κ B³⁰⁷, AP-1³⁰⁷, C/EBP³⁰⁸, AHR^{309, 310}. PPAR γ constituïria un bon candidat en la participació en un procés en coordinació o competició amb Nrf2 en la regulació de FABP4. La regulació de FABP4 per part de PPAR γ i agonistes PPAR γ , com les TZDs, està ben establerta⁴⁹⁻⁵¹. En un estudi prospectiu en pacients T2D naïf per al tractament amb TZDs es va observar un augment en els nivells circulants de FABP4, i aquest augment anava en paral·lel amb un increment en l'activitat PPAR γ a nivell sistèmic, determinada en PBMCs⁵¹. Recentment, Pi i col·laboradors han determinat un vincle entre PPAR γ i Nrf2. Aquests autors van observar que l'expressió de PPAR γ és dependent de Nrf2, perquè s'uneix *in vivo* a llocs ARE del promotor del gen de PPAR γ i n'estimula l'activitat³⁰⁸. L'adipogènesi i el desenvolupament d'obesitat induïda per la dieta, que són processos regulats per PPAR γ i els seus *downstream targets*, es veuen impeditos per la deficiència en Nrf2³⁰⁸. Tradicionalment, la FABP4 ha estat utilitzada com un marcador en la diferenciació adipocitària^{45, 51}, i la seva expressió es troba augmentada tant a nivell circulant³³ com en el teixit adipós en presència d'obesitat⁴³. La deficiència en Nrf2 afectaria a l'expressió de FABP4 i els processos en què participa.

El *loop* regulatori entre Nrf2 i PPAR γ es completaria si aquest últim participés en la regulació del primer. Per confirmar-ho caldria estudiar el promotor del gen de Nrf2 per tal de trobar llocs PPRE funcionals. Tot indicaria que aquest fet és més que probable perquè en un estudi realitzat amb ratolins *Id1*^{-/-} sotmesos a una dieta rica en greixos, el tractament amb una TZD, la rosiglitazona, augmentava l'expressió de Nrf2 i d'enzims antioxidants vasculars³¹¹.

D'acord amb la conclusió extreta a partir dels resultats obtinguts, es va decidir que la continuació del treball experimental de la tesi es duria a terme únicament amb el DDE,

ja que l'hexanal no actuava a través de la via d'interès i no ens permetia provar la vinculació entre el sistema antioxidant i la FABP4.

El paral·lisme del comportament entre el DDE i el tBHQ es va evidenciar encara més en la reproducció amb l'aldehid de l'experiment amb l'inhibidor de la síntesi proteica, CHX, realitzat prèviament amb el tBHQ. La inducció de la forma fosforilada de Nrf2 per efecte del DDE era abolida per la CHX. En aquest cas també era necessària la síntesi de nova proteïna per observar l'activació del factor de transcripció.

Un dels factors determinants en l'activació de Nrf2 és l'afavoriment de mecanismes que juguen a favor de potenciar l'estabilitat de la proteïna. És a dir, que es produís un augment en la fosforilació de Nrf2 i en la vida mitjana del factor de transcripció per efecte de l'estímul afegit³¹². Els resultats obtinguts en el nostre treball es troben en el mateix sentit. El DDE augmenta la forma fosforilada de Nrf2 i en promou la seva acumulació a nivell nuclear. Existeixen altres mecanismes que faciliten l'estabilització de Nrf2 com són els donats per les molècules SQSTM1^{220, 222-224} i DJ-1²²⁵⁻²²⁷. Tenint en compte aquests mecanismes i l'efecte del DDE sobre l'estabilització de Nrf2 fosforilat, l'avaluació de l'efecte de l'aldehid sobre l'expressió de SQSTM1 o DJ-1 resultaria interessant per completar l'estudi realitzat.

Un cop evidenciat que l'activació de Nrf2 està implicada en l'augment de l'expressió de FABP4 i que DDE pot produir aquesta activació de Nrf2, es va voler caracteritzar l'efecte sobre l'expressió de la FABP4. Es van dissenyar corbes temps-resposta per avaluar l'expressió gènica i proteica de FABP4 producte de l'aldehid. Tant en un cas com en l'altre, el DDE va augmentar els nivells al llarg del temps. Si considerem de manera global els resultats de l'evolució temporal de RNA i proteïna FABP4, és possible observar com el màxim en l'expressió gènica, que es manté fins a les 20 hores, es correspon amb el màxim en l'expressió proteica a les 24 hores. La diferència temporal entre mRNA i proteïna es correspon amb els temps utilitzats en altres experiments per valorar l'efecte sobre els processos de transcripció i traducció.

D'acord amb la inducció de l'expressió gènica de FABP4 per efecte de l'aldehid, es va pretendre caracteritzar-ne el mecanisme segons la referència de dissenys experimentals trobats a la bibliografia^{312, 313}. La incubació amb inhibidors de la transcripció i la traducció ens va permetre determinar que perquè es produís l'augment en els nivells de mRNA de FABP4 eren necessàries tant la producció de nou mRNA de

FABP4 com de les proteïnes que fan possible la transcripció. Però, a més, l'aldehid estabilitzava el mRNA de FABP4 produït.

Els resultats obtinguts en relació a l'efecte del DDE sobre l'estabilització del mRNA de FABP4 podrien suggerir un efecte equivalent a nivell de proteïna de FABP4. En un estudi similar realitzat amb 4-HNE, es valora l'efecte d'aquest sobre l'estabilitat proteica del receptor *scavenger* SR-A, implicat en la transformació dels macròfags a cèl·lules escumoses, com a explicació a l'augment en els nivells de proteïna observats³¹⁴. Conseqüentment, seria d'interès contrastar aquesta hipòtesi i valorar si el DDE contribueix a l'augment en els nivells de proteïna FABP4 de forma dual: allargant-ne la vida mitja i potenciant-ne la síntesi.

Les vies de senyalització intracel·lulars PI-3k/Akt i ERK-MAPK estan implicades en l'activació de Nrf2 per efecte del DDE en macròfags

En presència de l'estímul oxidant que amenaça l'equilibri redox cel·lular, s'inicia el mecanisme a través del qual Nrf2 s'allibera del segrest citoplasmàtic que duu a terme el repressor Keap1 i que promou la seva degradació via proteasoma. Diferents estudis han comprovat que el propi estímul de l'estrès oxidatiu promou canvis conformationals en l'estructura de l'homodímer de Keap, ja sigui de manera directa o indirecta^{232, 249}. L'accessibilitat facilitada a la molècula de Nrf2 resultant en permet la fosforilació per part de proteïnes quinases. Sembla que la fosforilació de Nrf2 és un mecanisme que per una part l'estabilitza i, també, l'activa i possibilita la translocació a nucli^{230, 232}.

La participació de les principals vies de senyalització intracel·lular en el procés d'activació de Nrf2 és coneguda³¹⁵. En aquest treball, es va estudiar la implicació de les vies de senyalització PI-3k/Akt i ERK-MAPK en la inducció de l'activació de Nrf2 donada per l'aldehid apolar DDE, d'acord amb diferents estudis recent trobats a la bibliografia^{239-241, 307, 316}. Recentment, s'ha determinat que l'activació de Nrf2 a través de la via PI-3k/Akt explicaria l'efecte antioxidant associat a la simvastatina^{317, 318}.

Els resultats obtinguts ens van mostrar que el DDE induïa l'activació de la via de la PI-3k/Akt, ja que s'obtenia un màxim de fosforilació en les dues formes fosforilades de Akt (Thr308 i Ser473) als 30 minuts després de la incubació amb l'aldehid. L'activació de la via era confirmada per la fosforilació d'una diana de fosforilació a *downstream* de l'Akt,

el GSK-3 β ³¹⁹. Als 30 minuts, GSK-3 β també presentava un màxim de fosforilació. De la família de les proteïnes MAPK, es va estudiar la ERK. En aquest cas, el DDE també produïa un màxim d'activació de la proteïna quinasa lleugerament retardat, al cap de 45 minuts. Les evidències obtingudes suggereixen que el DDE induiria una resposta ràpida que promouria l'activació de les vies PI-3k/Akt i ERK-MAPK, que en últim terme actuarien sobre Nrf2, catalitzant-ne la fosforilació que l'estabilitzaria i l'activaria.

En aquest punt, els resultats obtinguts ens permeten proposar una aproximació de la via a través de la qual el DDE actuaria sobre l'expressió de FABP4 implicant la participació del sistema de defensa antioxidant (veure esquema de la **Figura 62**).

Proposem que part de l'efecte de les LDLox sobre la inducció de l'expressió de FABP4 en els macròfags vindria donat per l'aldehid apolar DDE que es troba present en aquestes lipoproteïnes modificades. El DDE induiria l'activació de dues de les cascades de senyalització intracel·lular, PI-3k/Akt i ERK-MAPK que actuarien en la fosforilació i activació de Nrf2. Les evidències trobades a la bibliografia indiquen que PI-3k/Akt estaria actuant en la regulació del reordenament de microfilaments d'actina del citoesquelet²³⁷ i en la fosforilació pròpia del factor de transcripció. Mentre que l'activació d'ERK-MAPK que observem, estaria fosforilant la proteïna Nrf2 a diferents posicions Ser/Thr²⁴⁷. A la bibliografia s'ha trobat que la fosforilació de Nrf2 a Ser/Thr per part de les MAPKs constitueix una contribució limitada a la resposta antioxidant mediada per Nrf2. Segons aquests autors les MAPKs regularien la via de Nrf2 a través de mecanismes indirectes²⁴⁷. La fosforilació del factor de transcripció és possible perquè els canvis conformacionals en l'estructura de l'homodímer de Keap1 faciliten l'accés de les quinases³¹⁵. Aleshores, en aquest punt, Nrf2 seria més estable i estaria activat, en faria possible la seva translocació a nucli on s'uniria al lloc ARE trobat al promotor del gen de la FABP4 humana. L'augment en l'activitat transcripcional seria la responsable dels augments en els nivells de mRNA i de proteïna FABP4 a nivell de citoplasma (**Figura 62**).

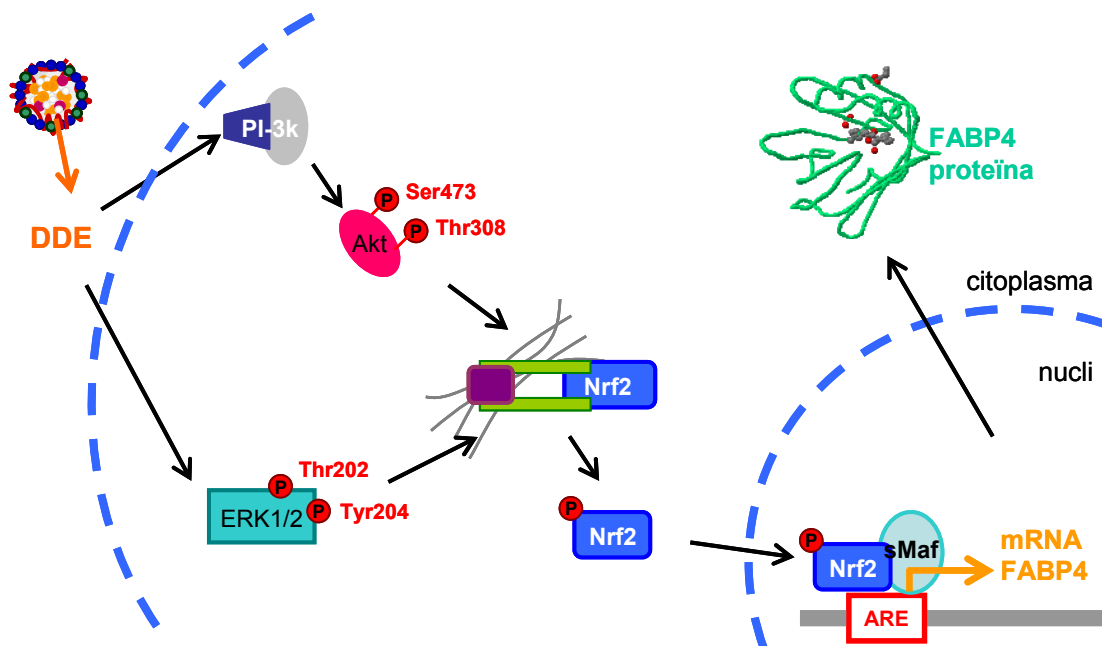


Figura 62. Esquema del mecanisme proposat per la inducció d'expressió de FABP4 en resposta al DDE a través de la via Nrf2-ARE en macròfags.

Comprovació per immunofluorescència de la via en un altre tipus cel·lular que evoluciona a cèl·lules escumoses, HCASMC

Els assaigs d'immunofluorescència ens van permetre reproduir les evidències trobades en la caracterització de la via a través de la qual el DDE indueix l'expressió de FABP4 en un altre tipus cel·lular present a la placa ateroscleròtica, les cèl·lules SMCs³²⁰. Les cèl·lules escumoses que es troben a la lesió ateroscleròtica poden derivar tant de macròfags com de SMCs³²¹. Aquest fenomen s'ha evidenciat a través de colocalització de marcatge de SMCs i lípid en estudis *in vitro* i *in vivo*³²²⁻³²⁵.

En la captació de colesterol per part de les SMCs, l'expressió de receptors *scavenger* no és tan necessària com ho és en els macròfags. Les SMCs la poden realitzar a través dels receptors de les LDLs³²⁶ i les VLDLs³²⁷, CD36^{328, 329}; i el CXCL16/SR-PSOX, associat específicament amb la captació de les LDLox³³⁰. El paral·lelisme funcional existent entre les SMCs i els macròfags en relació a la captació de colesterol, també es produeix en l'eflux de colesterol. Com en el cas dels macròfags, les SMCs també expressen els components necessaris en el transport revers de colesterol, com el ABCA1³³¹. L'expressió dels transportadors implicats en l'eflux de colesterol està

disminuïda en la formació de les cèl·lules escumoses. Fu i col·laboradors van observar que la inducció de la formació de cèl·lules escumoses per efecte de la sobreexpressió de FABP4, produïa una inhibició en l'expressió de ABCA1³⁰¹.

Els resultats de la immunofluorescència en les SMCs van reproduir els experiments realitzats en els macròfags per la caracterització de la via i que s'han mostrat en l'esquema anterior. En primer lloc, la incubació amb el DDE va produir un augment en l'expressió de FABP4 molt evident. Aquest resultat és especialment interessant perquè l'única evidència trobada a la bibliografia en relació a l'expressió de FABP4 en SMCs era el resultat de la incubació de les cèl·lules en medi amb inductors de la diferenciació adipocitària³³². Amb el medi de diferenciació adipocitària, aquests autors induïen la transformació a cèl·lules escumoses de les SMCs³³². En el nostre cas, els resultats obtinguts ens permeten determinar que en estat basal, les SMCs no expressen FABP4. La incubació amb el DDE augmentava de manera molt evident l'expressió de la FABP4 en aquestes cèl·lules. No es pot confirmar que la incubació amb l'aldehid transformés les cèl·lules al fenotip d'escumosa, perquè no es va determinar l'expressió de marcadors d'escumosa. Possiblement, aquestes cèl·lules estarien en una etapa inicial del mecanisme que promouria l'evolució fenotípica a cèl·lula escumosa per efecte del DDE.

En les imatges d'immunofluorescència també s'evidencia com l'aldehid promovia la translocació a nucli de la forma fosforilada de Nrf2. La colocalització entre el marcador de nucli (DAPI) i el marcatge de Nrf2 fosforilat era perfecta. Cosa que no es donava en la imatge de la incubació control.

En el treball realitzat per Ishii i col·laboradors es presenta la primera evidència de l'expressió de Nrf2 en cèl·lules musculars²⁷⁴. En aquest treball, mentre que les LDL mínimament modificades i oxidades produïen un efecte limitat en les SMCs, el tractament amb 4-HNE potenciava l'acumulació nuclear de Nrf2 i promovia l'expressió de gens de la resposta antioxidant (A170, HO-1 i Prx I)²⁷⁴. Aquest resultat coincideix amb els nostres resultats obtinguts amb l'aldehid apolar DDE en el tractament de les SMCs. La inducció de Nrf2 en les SMCs en resposta a l'estrès oxidatiu indueix l'expressió de gens antioxidants per restablir l'homeòstasi redox; i, posseeix efectes antiproliferatius sobre les SMCs^{277, 333}, esdeveniment promogut per les ROS i que és crucial per la iniciació i la progressió de l'aterosclerosi²⁷⁰.

A la bibliografia es troben treballs que mostren l'activació de Nrf2 per efecte de l'activació de la via PI-3k/Akt en SMCs³³⁴. El marcatge amb un anticòs específic contra la p-Ser473-Akt ens va permetre observar que la incubació amb el DDE augmentava de manera evident la forma de màxima activació de la proteïna quinasa Akt, tant a nivell citoplasmàtic com nuclear; cosa que no havia estat tinguda en consideració en les valoracions anteriors, ja que només s'havia estudiat l'efecte a nivell de la fracció citoplasmàtica. L'activació de la quinasa participaria de l'activació del factor de transcripció Nrf2.

FABP4 circulant i activació de Nrf2 a nivell sistèmic

El model *in vitro* descrit en aquest treball ens ha permès postular una via mecànica que relacionaria el principal factor de transcripció de la defensa antioxidant cel·lular, Nrf2, amb l'expressió de FABP4 en macròfags com a resultat de l'estímul provocat per un aldehyd apolar, el DDE. El lloc ARE identificat al promotor del gen de la FABP4 humana evidencia la participació de Nrf2 en la regulació de l'expressió de FABP4. La relació trobada entre Nrf2 i FABP4 a nivell cel·lular, en el model *in vitro*, ens va plantejar l'ampliació de la hipòtesi inicial i extrapolar-la a nivell sistèmic en estudi *ex vivo*.

La presència en plasma de FABP4 es va detectar per primera vegada l'any 2006 en l'estudi de Xu i col·laboradors³³. Resten encara per determinar, però, el mecanisme que motiva i a través del qual es produeix l'alliberament, i la pròpia funcionalitat de la seva presència en plasma. L'estudi del secretoma per proteòmica d'un model *in vitro* de generació de cèl·lules escumoses va observar no només que la FABP4 se secretava al medi de cultiu, sinó que era una de les proteïnes secretades quantitativament més importants⁴⁰. En aquest article van relacionar la secreció de FABP4 amb el desenvolupament de la lesió ateroscleròtica⁴⁰. Però, com s'ha esmentat, no existeixen més evidències de la funcionalitat a plasma, sinó estudis d'associació com a biomarcador de desordres metabòlics.

D'acord amb un dels objectius plantejats en l'estudi, es va intentar relacionar els nivells circulants de FABP4 amb l'antioxidació sistèmica, representada pel sistema Nrf2-ARE. Com s'ha esmentat anteriorment, les úniques associacions trobades a la bibliografia entre els nivells en plasma de FABP4 i marcadors d'oxidació pertanyen a treballs realitzats en el nostre grup en població amb risc cardiovascular moderat-alt^{51, 109}.

L'estrès oxidatiu és clau en la patogènesi de la T2D i les complicacions associades, com l'aterosclerosi. En població T2D, els nivells de FABP4 circulant es van associar positivament amb els nivells plasmàtics de LPO⁵¹, un marcador primerenc d'oxidació lipídica. I, també, amb els nivells d'anticossos contra LDLox (Ab LDLox)¹⁰⁹.

En l'extrapolació *ex vivo* realitzada en aquesta part del treball experimental de la tesi, els individus estudiats pertanyien a una població amb obesitat abdominal i un risc cardiovascular moderat-alt, i que podien presentar o no T2D. Com s'ha detallat a l'apartat de "**Materials i mètodes**", es van escollir 2 grups de 10 pacients amb valors extrems de FABP4 circulant (valors inferiors a 20µg/l vers valors superiors a 45µg/l).

La valoració de l'activació sistèmica de la defensa antioxidant Nrf2-ARE es va dur a terme en PBMCs. A la bibliografia es van trobar dos estudis en què també es valora l'activació sistèmica de Nrf2 en PBMCs. En ambdós casos, s'obtenen les fraccions proteiques de nucli i citoplasma, i es determina l'activació de Nrf2 a la fracció nuclear per Western blot. Malgrat que en aquests treballs únicament va ser analitzada la fracció nuclear, on es concentra la forma fosforilada i activa de Nrf2, els anticossos utilitzats en aquests Western blots detecten tant la forma activa com la no activa del factor de transcripció. Per tant, no tenen en compte la discriminació entre ambdues formes de Nrf2 i els resultats obtinguts poden aparèixer emmascarats^{335, 336}. A diferència d'aquests estudis, en el nostre treball es va avaluar el grau d'activació sistèmica del factor de transcripció Nrf2 mitjançant un ELISA-EMSA. Aquesta metodologia és més eficient, perquè únicament detecta la forma activa del factor de transcripció; ja que únicament aquesta queda retinguda perquè en unir-se directament a la seqüència consens ARE immobilitzada en els pous d'una placa en què es realitza la determinació.

Els resultats obtinguts ens van permetre observar que els individus del grup amb els nivells de FABP4 en plasma més elevats coincidien amb aquells que presentaven un grau d'activació sistèmica de Nrf2 més elevat. Encara que aquests resultats no ens permeten establir un paper causal entre les dues observacions, l'associació observada entre FABP4 i Nrf2 es veu reforçada. I, d'aquesta manera, la FABP4 circulant es relacionaria amb el principal factor de transcripció del sistema de defensa antioxidant a nivell sistèmic. Caldria tenir en compte dos punts que permetrien consolidar els resultats obtinguts. En primer lloc, seria convenient reproduir l'estudi en una població amb una mida mostral superior, ja que aquest s'ha realitzat únicament en dos grups de 10 individus. I, en segon lloc, també seria interessant relacionar els nivells circulants

de FABP4 i l'activació de Nrf2 sistèmica amb un marcador plasmàtic del grau d'oxidació; com per exemple, les activitats enzimàtiques de la superòxid dismutasa (SOD) i la paraoxonasa-1 (PON 1). D'acord amb les observacions obtingudes en l'estudi amb pacients, es podria suggerir un paper de la FABP4 circulant vers l'oxidació sistèmica. La FABP4 actuaria com a quelant de productes derivats de l'oxidació lipídica que es deriven d'un estat d'estrès oxidatiu augmentat característic de situacions amb alteració metabòlica. Aquestes observacions estarien d'acord amb el proposat per dos estudis trobats a la bibliografia realitzats a nivell intracel·lular^{26, 117}.

Objectius a desenvolupar en el futur

Fins aquest punt de la tesi, s'han presentat i discutit els coneixements assolits. A partir de la seva valoració, és possible detectar certes limitacions que s'han anat plantejant al llarg de la discussió realitzada. Però el que en aquest moment són limitacions poden ser enteses com a objectius a realitzar en un futur pròxim per completar el treball iniciat i caracteritzar completament la via que es descriu. En primer lloc caldria bloquejar les vies de senyalització intracel·lular que hem vist que actuen en l'activació de Nrf2 donada per l'aldehid, PI-3k/Akt i ERK-MAPK, i valorar l'efecte sobre FABP4. En segon lloc, seria convenient bloquejar els factors de transcripció, que juntament amb Nrf2, podrien estar intervenint en la regulació de l'expressió de FABP4 en resposta a l'aldehid. Creiem que caldria bloquejar l'acció de PPAR γ i NF- κ B, mitjançant la incubació amb els agents GW9662 i *parthenolide*, respectivament. En tercer lloc, seria interessant silenciar l'expressió del gen Nrf2 en els macròfags mitjançant la metodologia *siRNA* i valorar l'expressió de FABP4 en resposta a l'aldehid. En quart lloc, i de manera complementària a l'anterior, seria d'interès treballar amb un model animal *nrf2*^{-/-}, aïllar-ne els macròfags per incubar-los amb l'aldehid i valorar l'expressió de FABP4. I, finalment, per complementar l'estudi en pacients, caldria valorar un marcador d'oxidació sistèmica per relacionar-lo amb els nivells circulants de FABP4 i l'activació sistèmica de Nrf2.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
REGULACIÓ DE FABP4 DEPENDENT DE NRF2 EN MACRÒFAGS
Iolanda Lázaro López
ISBN:978-84-693-8852-5/DL:T.1952-2010

Conclusions

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
REGULACIÓ DE FABP4 DEPENDENT DE NRF2 EN MACRÒFAGS
Iolanda Lázaro López
ISBN:978-84-693-8852-5/DL:T.1952-2010

Tenint en compte els resultats obtinguts i la discussió realitzada, podem extreure una sèrie de conclusions del treball que s'ha presentat en aquesta tesi.

Les conclusions extretes s'enumeren a continuació:

1. *Els aldehids apolars, DDE i hexanal, indueixen l'expressió gènica i proteica de FABP4 en macròfags humans.*

L'augment en l'expressió de FABP4 en els macròfags per efecte dels aldehids podria constituir un pas inicial en l'evolució fenotípica del macròfag a cèl·lula escumosa.

2. *El DDE promou l'expressió de FABP4 en macròfags a través de la inducció de la via Nrf2-ARE.*

El mecanisme de regulació cel·lular a través del qual els aldehids DDE i hexanal promouen l'expressió de FABP4 en els macròfags és diferent. DDE actuaria induint l'activació del factor de transcripció Nrf2, imitant el comportament d'un activador de Nrf2, el tBHQ. Mentre que la inducció de l'expressió de FABP4 per l'hexanal no implicaria l'activació de Nrf2.

L'efecte del DDE sobre l'expressió de FABP4 com a resultat, en últim terme, de l'activació del factor de transcripció Nrf2 podria explicar-se per la presència d'un lloc ARE a la seqüència del promotor de la FABP4 humana, al qual Nrf2 s'uneix *in vivo*. Dues de les principals vies de senyalització intracel·lular, PI-3k/Akt i ERK-MAPK, participarien en l'activació i estabilització de Nrf2 per efecte del DDE.

3. *Dos tipus cel·lulars presents a la placa d'ateroma i que evolucionen al fenotip de cèl·lula escumosa, macròfags i cèl·lules musculars llises, responen de la mateixa manera a la incubació amb DDE.*

El tractament de les cèl·lules musculars llises amb l'aldehid reproduïx els resultats obtinguts en la incubació dels macròfags: augmenten l'expressió de FABP4 i promouen l'activació de Nrf2 i PI-3k/Akt. La hipòtesi inicial de la inducció de FABP4 a través de sistema Nrf2-ARE es veu confirmada també en cèl·lules musculars llises.

4. *Nivells elevats de FABP4 circulant s'associen amb una activació sistèmica de la defensa antioxidant.*

La valoració *ex vivo* dels nivells circulants de FABP4 s'ha associat amb l'activació sistèmica de la defensa antioxidant per part de Nrf2. L'estudi amb pacients ens ha permès observar que els individus amb nivells de FABP4 en plasma més elevats, presenten un nivell més alt en l'activació de Nrf2 a nivell sistèmic.

Conclusió global:

L'expressió augmentada de FABP4 en macròfags induïda per les LDLox podria ser parcialment deguda als aldehids apolars derivats de l'oxidació dels àcids grassos poliinsaturats, com és el DDE. El principal factor de transcripció de la defensa antioxidant, Nrf2, podria contribuir en la modulació de l'expressió de FABP4 en macròfags en resposta al DDE. D'aquesta manera, es proposa un nou mecanisme d'acció de Nrf2 en relació al desenvolupament de l'aterosclerosi.

Referències

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
REGULACIÓ DE FABP4 DEPENDENT DE NRF2 EN MACRÒFAGS
Iolanda Lázaro López
ISBN:978-84-693-8852-5/DL:T.1952-2010

1. Spiegelman BM, Frank M, Green H. Molecular cloning of mRNA from 3T3 adipocytes. Regulation of mRNA content for glycerophosphate dehydrogenase and other differentiation-dependent proteins during adipocyte development. *J Biol Chem.* 1983;258:10083-10089.
2. Bernlohr DA, Angus CW, Lane MD, Bolanowski MA, Kelly TJ, Jr. Expression of specific mRNAs during adipose differentiation: identification of an mRNA encoding a homologue of myelin P2 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81:5468-5472.
3. Bernlohr DA, Doering TL, Kelly TJ, Jr., Lane MD. Tissue specific expression of p422 protein, a putative lipid carrier, in mouse adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1985;132:850-855.
4. Hertzel AV, Bernlohr DA. The mammalian fatty acid-binding protein multigene family: molecular and genetic insights into function. *Trends Endocrinol Metab.* 2000;11:175-180.
5. Zimmerman AW, Veerkamp JH. New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59:1096-1116.
6. Prinsen CF, de Bruijn DR, Merx GF, Veerkamp JH. Assignment of the human adipocyte fatty acid-binding protein gene (FABP4) to chromosome 8q21 using somatic cell hybrid and fluorescence in situ hybridization techniques. *Genomics.* 1997;40:207-209.
7. Baxa CA, Sha RS, Buelt MK, Smith AJ, Matarese V, Chinander LL, Boundy KL, Bernlohr DA. Human adipocyte lipid-binding protein: purification of the protein and cloning of its complementary DNA. *Biochemistry.* 1989;28:8683-8690.
8. Ross SR, Graves RA, Greenstein A, Platt KA, Shyu HL, Mellovitz B, Spiegelman BM. A fat-specific enhancer is the primary determinant of gene expression for adipocyte P2 in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:9590-9594.
9. Graves RA, Tontonoz P, Ross SR, Spiegelman BM. Identification of a potent adipocyte-specific enhancer: involvement of an NF-1-like factor. *Genes Dev.* 1991;5:428-437.
10. Graves RA, Tontonoz P, Platt KA, Ross SR, Spiegelman BM. Identification of a fat cell enhancer: analysis of requirements for adipose tissue-specific gene expression. *J Cell Biochem.* 1992;49:219-224.
11. Chmurzynska A. The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism. *J Appl Genet.* 2006;47:39-48.
12. Banaszak L, Winter N, Xu Z, Bernlohr DA, Cowan S, Jones TA. Lipid-binding proteins: a family of fatty acid and retinoid transport proteins. *Adv Protein Chem.* 1994;45:89-151.
13. Glatz JF, van der Vusse GJ. Cellular fatty acid-binding proteins: their function and physiological significance. *Prog Lipid Res.* 1996;35:243-282.
14. Reese-Wagoner A, Thompson J, Banaszak L. Structural properties of the adipocyte lipid binding protein. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1441:106-116.
15. Furuhashi M, Hotamisligil GS. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7:489-503.

16. Bernlohr DA, Simpson MA, Hertzell AV, Banaszak LJ. Intracellular lipid-binding proteins and their genes. *Annu Rev Nutr.* 1997;17:277-303.
17. Coe NR, Bernlohr DA. Physiological properties and functions of intracellular fatty acid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1391:287-306.
18. Duttaroy A, Spener F. Cellular Proteins and their Fatty Acids in Health and Disease. *Ed. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, Germany.* 2003.
19. Tan NS, Shaw NS, Vinckenbosch N, Liu P, Yasmin R, Desvergne B, Wahli W, Noy N. Selective cooperation between fatty acid binding proteins and peroxisome proliferator-activated receptors in regulating transcription. *Mol Cell Biol.* 2002;22:5114-5127.
20. Scheja L, Makowski L, Uysal KT, Wiesbrock SM, Shimshek DR, Meyers DS, Morgan M, Parker RA, Hotamisligil GS. Altered insulin secretion associated with reduced lipolytic efficiency in aP2^{-/-} mice. *Diabetes.* 1999;48:1987-1994.
21. Coe NR, Simpson MA, Bernlohr DA. Targeted disruption of the adipocyte lipid-binding protein (aP2 protein) gene impairs fat cell lipolysis and increases cellular fatty acid levels. *J Lipid Res.* 1999;40:967-972.
22. Shen WJ, Sridhar K, Bernlohr DA, Kraemer FB. Interaction of rat hormone-sensitive lipase with adipocyte lipid-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:5528-5532.
23. Jenkins-Kruchten AE, Bennaars-Eiden A, Ross JR, Shen WJ, Kraemer FB, Bernlohr DA. Fatty acid-binding protein-hormone-sensitive lipase interaction. Fatty acid dependence on binding. *J Biol Chem.* 2003;278:47636-47643.
24. Smith AJ, Sanders MA, Thompson BR, Londos C, Kraemer FB, Bernlohr DA. Physical association between the adipocyte fatty acid-binding protein and hormone-sensitive lipase: a fluorescence resonance energy transfer analysis. *J Biol Chem.* 2004;279:52399-52405.
25. Hertzell AV, Smith LA, Berg AH, Cline GW, Shulman GI, Scherer PE, Bernlohr DA. Lipid metabolism and adipokine levels in fatty acid-binding protein null and transgenic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006;290:E814-823.
26. Grimsrud PA, Picklo MJ, Sr., Griffin TJ, Bernlohr DA. Carbonylation of adipose proteins in obesity and insulin resistance: identification of adipocyte fatty acid-binding protein as a cellular target of 4-hydroxynonenal. *Mol Cell Proteomics.* 2007;6:624-637.
27. Hellberg K, Grimsrud PA, Kruse AC, Banaszak LJ, Ohlendorf DH, Bernlohr DA. X-ray crystallographic analysis of adipocyte fatty acid binding protein (aP2) modified with 4-hydroxy-2-nonenal. *Protein Sci.* 2010.
28. Hresko RC, Hoffman RD, Flores-Riveros JR, Lane MD. Insulin receptor tyrosine kinase-catalyzed phosphorylation of 422(aP2) protein. Substrate activation by long-chain fatty acid. *J Biol Chem.* 1990;265:21075-21085.
29. Bernier M, Laird DM, Lane MD. Insulin-activated tyrosine phosphorylation of a 15-kilodalton protein in intact 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84:1844-1848.

30. Bernier M, Laird DM, Lane MD. Effect of vanadate on the cellular accumulation of pp15, an apparent product of insulin receptor tyrosine kinase action. *J Biol Chem.* 1988;263:13626-13634.
31. Layne MD, Patel A, Chen YH, Rebel VI, Carvajal IM, Pellacani A, Ith B, Zhao D, Schreiber BM, Yet SF, Lee ME, Storch J, Perrella MA. Role of macrophage-expressed adipocyte fatty acid binding protein in the development of accelerated atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Faseb J.* 2001;15:2733-2735.
32. Makowski L, Hotamisligil GS. Fatty acid binding proteins--the evolutionary crossroads of inflammatory and metabolic responses. *J Nutr.* 2004;134:2464S-2468S.
33. Xu A, Wang Y, Xu JY, Stejskal D, Tam S, Zhang J, Wat NM, Wong WK, Lam KS. Adipocyte fatty acid-binding protein is a plasma biomarker closely associated with obesity and metabolic syndrome. *Clin Chem.* 2006;52:405-413.
34. Fischer H, Gustafsson T, Sundberg CJ, Norrbom J, Ekman M, Johansson O, Jansson E. Fatty acid binding protein 4 in human skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;346:125-130.
35. Makowski L, Boord JB, Maeda K, Babaev VR, Uysal KT, Morgan MA, Parker RA, Suttles J, Fazio S, Hotamisligil GS, Linton MF. Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis. *Nat Med.* 2001;7:699-705.
36. Boord JB, Maeda K, Makowski L, Babaev VR, Fazio S, Linton MF, Hotamisligil GS. Adipocyte fatty acid-binding protein, aP2, alters late atherosclerotic lesion formation in severe hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1686-1691.
37. Fu Y, Luo N, Lopes-Virella MF, Garvey WT. The adipocyte lipid binding protein (ALBP/aP2) gene facilitates foam cell formation in human THP-1 macrophages. *Atherosclerosis.* 2002;165:259-269.
38. Hotamisligil GS, Johnson RS, Distel RJ, Ellis R, Papaioannou VE, Spiegelman BM. Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein. *Science.* 1996;274:1377-1379.
39. Xu A, Tso AW, Cheung BM, Wang Y, Wat NM, Fong CH, Yeung DC, Janus ED, Sham PC, Lam KS. Circulating adipocyte-fatty acid binding protein levels predict the development of the metabolic syndrome: a 5-year prospective study. *Circulation.* 2007;115:1537-1543.
40. Fach EM, Garulacan LA, Gao J, Xiao Q, Storm SM, Dubaquié YP, Hefta SA, Opitck GJ. In vitro biomarker discovery for atherosclerosis by proteomics. *Mol Cell Proteomics.* 2004;3:1200-1210.
41. Fisher RM, Eriksson P, Hoffstedt J, Hotamisligil GS, Thorne A, Ryden M, Hamsten A, Arner P. Fatty acid binding protein expression in different adipose tissue depots from lean and obese individuals. *Diabetologia.* 2001;44:1268-1273.

42. Van Harmelen V, Lonnqvist F, Thorne A, Wennlund A, Large V, Reynisdottir S, Arner P. Noradrenaline-induced lipolysis in isolated mesenteric, omental and subcutaneous adipocytes from obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1997;21:972-979.
43. Fisher RM, Thorne A, Hamsten A, Arner P. Fatty acid binding protein expression in different human adipose tissue depots in relation to rates of lipolysis and insulin concentration in obese individuals. *Mol Cell Biochem*. 2002;239:95-100.
44. Vural B, Atalar F, Ciftci C, Demirkan A, Susleyici-Duman B, Gunay D, Akpınar B, Sagbas E, Ozbek U, Buyukdevrim AS. Presence of fatty-acid-binding protein 4 expression in human epicardial adipose tissue in metabolic syndrome. *Cardiovasc Pathol*. 2008;17:392-398.
45. Boord JB, Fazio S, Linton MF. Cytoplasmic fatty acid-binding proteins: emerging roles in metabolism and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 2002;13:141-147.
46. Amri EZ, Bertrand B, Ailhaud G, Grimaldi P. Regulation of adipose cell differentiation. I. Fatty acids are inducers of the aP2 gene expression. *J Lipid Res*. 1991;32:1449-1456.
47. Melki SA, Abumrad NA. Expression of the adipocyte fatty acid-binding protein in streptozotocin-diabetes: effects of insulin deficiency and supplementation. *J Lipid Res*. 1993;34:1527-1534.
48. Distel RJ, Robinson GS, Spiegelman BM. Fatty acid regulation of gene expression. Transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J Biol Chem*. 1992;267:5937-5941.
49. Kletzien RF, Foellmi LA, Harris PK, Wyse BM, Clarke SD. Adipocyte fatty acid-binding protein: regulation of gene expression in vivo and in vitro by an insulin-sensitizing agent. *Mol Pharmacol*. 1992;42:558-562.
50. Perera RJ, Marcusson EG, Koo S, Kang X, Kim Y, White N, Dean NM. Identification of novel PPARgamma target genes in primary human adipocytes. *Gene*. 2006;369:90-99.
51. Cabre A, Lázaro I, Girona J, Manzanares JM, Marimon F, Plana N, Heras M, Masana L. Fatty acid binding protein 4 is increased in metabolic syndrome and with thiazolidinedione treatment in diabetic patients. *Atherosclerosis*. 2007;195:e150-158.
52. Rival Y, Stenvein A, Puech L, Rouquette A, Cathala C, Lestienne F, Dupont-Passelaigue E, Patoiseau JF, Wurch T, Junquero D. Human adipocyte fatty acid-binding protein (aP2) gene promoter-driven reporter assay discriminates nonlipogenic peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;311:467-475.
53. Schachtrup C, Emmler T, Bleck B, Sandqvist A, Spener F. Functional analysis of peroxisome-proliferator-responsive element motifs in genes of fatty acid-binding proteins. *Biochem J*. 2004;382:239-245.
54. Shin J, Li B, Davis ME, Suh Y, Lee K. Comparative analysis of fatty acid-binding protein 4 promoters: conservation of peroxisome proliferator-activated receptor binding sites. *J Anim Sci*. 2009;87:3923-3934.

55. Hunt CR, Ro JH, Dobson DE, Min HY, Spiegelman BM. Adipocyte P2 gene: developmental expression and homology of 5'-flanking sequences among fat cell-specific genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83:3786-3790.
56. Phillips M, Djian P, Green H. The nucleotide sequence of three genes participating in the adipose differentiation of 3T3 cells. *J Biol Chem*. 1986;261:10821-10827.
57. Distel RJ, Ro HS, Rosen BS, Groves DL, Spiegelman BM. Nucleoprotein complexes that regulate gene expression in adipocyte differentiation: direct participation of c-fos. *Cell*. 1987;49:835-844.
58. Rauscher FJ, 3rd, Sambucetti LC, Curran T, Distel RJ, Spiegelman BM. Common DNA binding site for Fos protein complexes and transcription factor AP-1. *Cell*. 1988;52:471-480.
59. Christy RJ, Yang VW, Ntambi JM, Geiman DE, Landschulz WH, Friedman AD, Nakabeppu Y, Kelly TJ, Lane MD. Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes: CCAAT/enhancer binding protein interacts with and activates the promoters of two adipocyte-specific genes. *Genes Dev*. 1989;3:1323-1335.
60. Cousin B, Munoz O, Andre M, Fontanilles AM, Dani C, Cousin JL, Laharrague P, Casteilla L, Penicaud L. A role for preadipocytes as macrophage-like cells. *Faseb J*. 1999;13:305-312.
61. Charriere G, Cousin B, Arnaud E, Andre M, Bacou F, Penicaud L, Casteilla L. Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity. *J Biol Chem*. 2003;278:9850-9855.
62. Fu Y, Luo N, Lopes-Virella MF. Oxidized LDL induces the expression of ALBP/aP2 mRNA and protein in human THP-1 macrophages. *J Lipid Res*. 2000;41:2017-2023.
63. Pelton PD, Zhou L, Demarest KT, Burriss TP. PPARgamma activation induces the expression of the adipocyte fatty acid binding protein gene in human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;261:456-458.
64. Kazemi MR, McDonald CM, Shigenaga JK, Grunfeld C, Feingold KR. Adipocyte fatty acid-binding protein expression and lipid accumulation are increased during activation of murine macrophages by toll-like receptor agonists. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:1220-1224.
65. Hui X, Li H, Zhou Z, Lam KS, Xiao Y, Wu D, Ding K, Wang Y, Vanhoutte PM, Xu A. Adipocyte fatty acid binding protein mediates inflammatory responses in macrophages through a positive feedback loop involving c-Jun N-terminal kinases and activator protein-1. *J Biol Chem*. 2010;285:10273-10280.
66. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420:868-874.
67. Llaverias G, Noe V, Penuelas S, Vazquez-Carrera M, Sanchez RM, Laguna JC, Ciudad CJ, Alegret M. Atorvastatin reduces CD68, FABP4, and HBP expression in oxLDL-treated human macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;318:265-274.
68. Makowski L, Brittingham KC, Reynolds JM, Suttles J, Hotamisligil GS. The fatty acid-binding protein, aP2, coordinates macrophage cholesterol trafficking and inflammatory

- activity. Macrophage expression of aP2 impacts peroxisome proliferator-activated receptor gamma and I κ B kinase activities. *J Biol Chem.* 2005;280:12888-12895.
69. Erbay E, Babaev VR, Mayers JR, Makowski L, Charles KN, Snitow ME, Fazio S, Wiest MM, Watkins SM, Linton MF, Hotamisligil GS. Reducing endoplasmic reticulum stress through a macrophage lipid chaperone alleviates atherosclerosis. *Nat Med.* 2009;15:1383-1391.
70. Perrella MA, Pellacani A, Layne MD, Patel A, Zhao D, Schreiber BM, Storch J, Feinberg MW, Hsieh CM, Haber E, Lee ME. Absence of adipocyte fatty acid binding protein prevents the development of accelerated atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Faseb J.* 2001;15:1774-1776.
71. Boord JB, Maeda K, Makowski L, Babaev VR, Fazio S, Linton MF, Hotamisligil GS. Combined adipocyte-macrophage fatty acid-binding protein deficiency improves metabolism, atherosclerosis, and survival in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation.* 2004;110:1492-1498.
72. Haider DG, Schindler K, Bohdjalian A, Prager G, Luger A, Wolzt M, Ludvik B. Plasma adipocyte and epidermal fatty acid binding protein is reduced after weight loss in obesity. *Diabetes Obes Metab.* 2007;9:761-763.
73. Choi KM, Kim TN, Yoo HJ, Lee KW, Cho GJ, Hwang TG, Baik SH, Choi DS, Kim SM. Effect of exercise training on A-FABP, lipocalin-2 and RBP4 levels in obese women. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2009;70:569-574.
74. Reinehr T, Stoffel-Wagner B, Roth CL. Adipocyte fatty acid-binding protein in obese children before and after weight loss. *Metabolism.* 2007;56:1735-1741.
75. Aeberli I, Beljean N, Lehmann R, l'Allemand D, Spinass GA, Zimmermann MB. The increase of fatty acid-binding protein aP2 in overweight and obese children: interactions with dietary fat and impact on measures of subclinical inflammation. *Int J Obes (Lond).* 2008;32:1513-1520.
76. Yun KE, Kim SM, Choi KM, Park HS. Association between adipocyte fatty acid-binding protein levels and childhood obesity in Korean children. *Metabolism.* 2009;58:798-802.
77. Stejskal D, Karpisek M. Adipocyte fatty acid binding protein in a Caucasian population: a new marker of metabolic syndrome? *Eur J Clin Invest.* 2006;36:621-625.
78. Haluzik MM, Anderlova K, Dolezalova R, Adamikova A, Haluzikova D, Housova J, Svacina S, Haluzik M. Serum adipocyte fatty acid binding protein levels in patients with type 2 diabetes mellitus and obesity: the influence of fenofibrate treatment. *Physiol Res.* 2009;58:93-99.
79. Coll B, Cabre A, Alonso-Villaverde C, Lazaro I, Aragones G, Parra S, Girona J, Masana L. The fatty acid binding protein-4 (FABP4) is a strong biomarker of metabolic syndrome and lipodystrophy in HIV-infected patients. *Atherosclerosis.* 2008;199:147-153.
80. Cabre A, Lazaro I, Cofan M, Jarauta E, Plana N, Garcia-Otin AL, Ascaso JF, Ferre R, Civeira F, Ros E, Masana L. FABP4 plasma levels are increased in familial combined hyperlipidemia. *J Lipid Res.* 2010;51:1173-1178.

81. Mohlig M, Weickert MO, Ghadamgadai E, Machlitt A, Pfuller B, Arafat AM, Pfeiffer AF, Schofl C. Adipocyte fatty acid-binding protein is associated with markers of obesity, but is an unlikely link between obesity, insulin resistance, and hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome women. *Eur J Endocrinol.* 2007;157:195-200.
82. Lazaro I, Diaz M, Cabre A, Masana L, Ibañez L. Fatty Acid-Binding Protein-4 plasma levels are associated to metabolic abnormalities and response to therapy in girls and young women with androgen excess. (*submitted*). 2010.
83. Hsu BG, Chen YC, Lee RP, Lee CC, Lee CJ, Wang JH. Fasting serum level of fatty-acid-binding protein 4 positively correlates with metabolic syndrome in patients with coronary artery disease. *Circ J.* 2010;74:327-331.
84. Stejskal D, Karpisek M, Bronsky J. Serum adipocyte-fatty acid binding protein discriminates patients with permanent and temporary body weight loss. *J Clin Lab Anal.* 2008;22:380-382.
85. Engl J, Ciardi C, Tatarczyk T, Kaser S, Laimer M, Laimer E, Weiss H, Aigner F, Molnar C, Tilg H, Patsch JR, Ebenbichler CF. A-FABP--a biomarker associated with the metabolic syndrome and/or an indicator of weight change? *Obesity (Silver Spring).* 2008;16:1838-1842.
86. Lazaro I, Ferre R, Plana N, Aragonés G, Girona J, Merino J, Heras M, Masana L, Cabre A. Lifestyle changes lower Adipocyte Fatty Acid-Binding Protein plasma concentration in obese patients at cardiovascular risk. (*submitted*). 2010.
87. Matsuzawa Y. Therapy Insight: adipocytokines in metabolic syndrome and related cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2006;3:35-42.
88. Despres JP, Lemieux I, Bergeron J, Pibarot P, Mathieu P, Larose E, Rodes-Cabau J, Bertrand OF, Poirier P. Abdominal obesity and the metabolic syndrome: contribution to global cardiometabolic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:1039-1049.
89. Gale EA. The myth of the metabolic syndrome. *Diabetologia.* 2005;48:1679-1683.
90. Kahn R, Buse J, Ferrannini E, Stern M. The metabolic syndrome: time for a critical appraisal: joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care.* 2005;28:2289-2304.
91. Reaven GM. The metabolic syndrome: requiescat in pace. *Clin Chem.* 2005;51:931-938.
92. Alberti KG, Zimmet PZ. New diagnostic criteria and classification of diabetes--again? *Diabet Med.* 1998;15:535-536.
93. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *Jama.* 2001;285:2486-2497.
94. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet.* 2005;366:1059-1062.
95. Taskinen MR. Diabetic dyslipidaemia: from basic research to clinical practice. *Diabetologia.* 2003;46:733-749.

96. Cabre A, Lazaro I, Girona J, Manzanares JM, Marimon F, Plana N, Heras M, Masana L. Plasma fatty acid binding protein 4 is associated with atherogenic dyslipidemia in diabetes. *J Lipid Res.* 2008;49:1746-1751.
97. Engl J, Tschoner A, Willis M, Schuster I, Kaser S, Laimer M, Biebl W, Patsch JR, Mangweth B, Ebenbichler CF. Adipocyte fatty acid binding protein during refeeding of female patients with anorexia nervosa. *Eur J Nutr.* 2009;48:403-408.
98. Siahianidou T, Margeli A, Davradou M, Apostolakou F, Papassotiriou I, Roma E, Mandyla H, Chrousos G. Circulating adipocyte fatty acid binding protein levels in healthy preterm infants: Positive correlation with weight gain and total-cholesterol levels. *Early Hum Dev.* 2010;86:197-201.
99. Ciardi C, Tatarczyk T, Tschoner A, Kranebitter M, Niederwanger A, Ebenbichler CF, Patsch JR, Pedrini MT. Effect of postprandial lipemia on plasma concentrations of A-FABP, RBP-4 and visfatin. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2009.
100. Cabre A, Lazaro I, Plana N, Ferre R, Merino J, Masana L. Concentraciones plasmáticas de FABP4 y evolución del síndrome metabólico. (*submitted to Clin Invest Arterioscler.*) 2010.
101. Milner KL, van der Poorten D, Xu A, Bugianesi E, Kench JG, Lam KS, Chisholm DJ, George J. Adipocyte fatty acid binding protein levels relate to inflammation and fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2009;49:1926-1934.
102. Koh JH, Shin YG, Nam SM, Lee MY, Chung CH, Shin JY. Serum adipocyte fatty acid-binding protein levels are associated with nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* 2009;32:147-152.
103. Kim YC, Cho YK, Lee WY, Kim HJ, Park JH, Park DI, Sohn CI, Jeon WK, Kim BI, Park SE, Rhee EJ, Park CY, Oh KW, Park SW, Kim SW, Ryu SH. Serum adipocyte-specific fatty acid-binding protein is associated with nonalcoholic fatty liver disease in apparently healthy subjects. *J Nutr Biochem.* 2010;xx:xx-xx.
104. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation.* 2004;109:III27-32.
105. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340:115-126.
106. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature.* 2000;407:233-241.
107. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell.* 2001;104:503-516.
108. Stocker R, Keaney JF, Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev.* 2004;84:1381-1478.
109. Aragonés G, Ferre R, Lazaro I, Cabre A, Plana N, Merino J, Heras M, Girona J, Masana L. Fatty acid binding protein 4 is associated with endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis.* (2010);doi:10.1016/j.atherosclerosis.2010.07.026.
110. Han Q, Yeung SC, Ip MS, Mak JC. Effects of intermittent hypoxia on A-/E-FABP expression in human aortic endothelial cells. *Int J Cardiol.* 2010.

111. Lamounier-Zepter V, Look C, Alvarez J, Christ T, Ravens U, Schunck WH, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR, Morano I. Adipocyte fatty acid-binding protein suppresses cardiomyocyte contraction: a new link between obesity and heart disease. *Circ Res*. 2009;105:326-334.
112. Sies H. Oxidative Stress: introductory remarks. . *Oxidative Stress, edited by Sies H.* . 1985;New York: Academic:1-8.
113. Hill BG, Bhatnagar A. Beyond reactive oxygen species: aldehydes as arbitrators of alarm and adaptation. *Circ Res*. 2009;105:1044-1046.
114. Girona J, La Ville AE, Heras M, Olive S, Masana L. Oxidized lipoproteins including HDL and their lipid peroxidation products inhibit TNF-alpha secretion by THP-1 human macrophages. *Free Radic Biol Med*. 1997;23:658-667.
115. Girona J, Vallve JC, Ribalta J, Heras M, Olive S, Masana L. 2,4-Decadienal downregulates TNF-alpha gene expression in THP-1 human macrophages. *Atherosclerosis*. 2001;158:95-101.
116. Cabre A, Girona J, Vallve JC, Heras M, Masana L. Cytotoxic effects of the lipid peroxidation product 2,4-decadienal in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 2003;169:245-250.
117. Bennaars-Eiden A, Higgins L, Hertzell AV, Kapphahn RJ, Ferrington DA, Bernlohr DA. Covalent modification of epithelial fatty acid-binding protein by 4-hydroxynonenal in vitro and in vivo. Evidence for a role in antioxidant biology. *J Biol Chem*. 2002;277:50693-50702.
118. Park J, Chung JJ, Kim JB. New evaluations of redox regulating system in adipose tissue of obesity. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007;77 Suppl 1:S11-16.
119. Tso AW, Xu A, Sham PC, Wat NM, Wang Y, Fong CH, Cheung BM, Janus ED, Lam KS. Serum adipocyte fatty acid binding protein as a new biomarker predicting the development of type 2 diabetes: a 10-year prospective study in a Chinese cohort. *Diabetes Care*. 2007;30:2667-2672.
120. Haluzikova D, Dostalova I, Kavalkova P, Roubicek T, Mraz M, Papezova H, Haluzik M. Serum concentrations of adipocyte fatty acid binding protein in patients with anorexia nervosa. *Physiol Res*. 2009;58:577-581.
121. Fasshauer M, Seeger J, Waldeyer T, Schrey S, Ebert T, Kratzsch J, Lossner U, Bluher M, Stumvoll M, Faber R, Stepan H. Serum levels of the adipokine adipocyte fatty acid-binding protein are increased in preeclampsia. *Am J Hypertens*. 2008;21:582-586.
122. Shum BO, Mackay CR, Gorgun CZ, Frost MJ, Kumar RK, Hotamisligil GS, Rolph MS. The adipocyte fatty acid-binding protein aP2 is required in allergic airway inflammation. *J Clin Invest*. 2006;116:2183-2192.
123. Kim CW, Cho EH, Lee YJ, Kim YH, Hah YS, Kim DR. Disease-specific proteins from rheumatoid arthritis patients. *J Korean Med Sci*. 2006;21:478-484.

124. Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome. *Circulation*. 2005;112:2660-2667.
125. Lam DC, Xu A, Lam KS, Lam B, Lam JC, Lui MM, Ip MS. Serum adipocyte-fatty acid binding protein level is elevated in severe OSA and correlates with insulin resistance. *Eur Respir J*. 2009;33:346-351.
126. Kahn BB. Type 2 diabetes: when insulin secretion fails to compensate for insulin resistance. *Cell*. 1998;92:593-596.
127. Eriksson J, Franssila-Kallunki A, Ekstrand A, Saloranta C, Widen E, Schalin C, Groop L. Early metabolic defects in persons at increased risk for non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1989;321:337-343.
128. DeFronzo RA, Ferrannini E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care*. 1991;14:173-194.
129. Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2000;106:473-481.
130. Perseghin G, Ghosh S, Gerow K, Shulman GI. Metabolic defects in lean nondiabetic offspring of NIDDM parents: a cross-sectional study. *Diabetes*. 1997;46:1001-1009.
131. Uysal KT, Scheja L, Wiesbrock SM, Bonner-Weir S, Hotamisligil GS. Improved glucose and lipid metabolism in genetically obese mice lacking aP2. *Endocrinology*. 2000;141:3388-3396.
132. Baar RA, Dingfelder CS, Smith LA, Bernlohr DA, Wu C, Lange AJ, Parks EJ. Investigation of in vivo fatty acid metabolism in AFABP/aP2(-/-) mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005;288:E187-193.
133. Maeda K, Cao H, Kono K, Gorgun CZ, Furuhashi M, Uysal KT, Cao Q, Atsumi G, Malone H, Krishnan B, Minokoshi Y, Kahn BB, Parker RA, Hotamisligil GS. Adipocyte/macrophage fatty acid binding proteins control integrated metabolic responses in obesity and diabetes. *Cell Metab*. 2005;1:107-119.
134. Cao H, Maeda K, Gorgun CZ, Kim HJ, Park SY, Shulman GI, Kim JK, Hotamisligil GS. Regulation of metabolic responses by adipocyte/macrophage Fatty Acid-binding proteins in leptin-deficient mice. *Diabetes*. 2006;55:1915-1922.
135. Furuhashi M, Tuncman G, Gorgun CZ, Makowski L, Atsumi G, Vaillancourt E, Kono K, Babaev VR, Fazio S, Linton MF, Sulsky R, Robl JA, Parker RA, Hotamisligil GS. Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2. *Nature*. 2007;447:959-965.
136. Furuhashi M, Fucho R, Gorgun CZ, Tuncman G, Cao H, Hotamisligil GS. Adipocyte/macrophage fatty acid-binding proteins contribute to metabolic deterioration through actions in both macrophages and adipocytes in mice. *J Clin Invest*. 2008;118:2640-2650.

137. Yeung DC, Xu A, Cheung CW, Wat NM, Yau MH, Fong CH, Chau MT, Lam KS. Serum Adipocyte Fatty Acid-Binding Protein Levels Were Independently Associated With Carotid Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:1796-1802.
138. Rhee EJ, Lee WY, Park CY, Oh KW, Kim BJ, Sung KC, Kim BS. The association of serum adipocyte fatty acid-binding protein with coronary artery disease in Korean adults. *Eur J Endocrinol.* 2009;160:165-172.
139. Graham TE, Yang Q, Bluher M, Hammarstedt A, Ciaraldi TP, Henry RR, Wason CJ, Oberbach A, Jansson PA, Smith U, Kahn BB. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N Engl J Med.* 2006;354:2552-2563.
140. Cho YM, Youn BS, Lee H, Lee N, Min SS, Kwak SH, Lee HK, Park KS. Plasma retinol-binding protein-4 concentrations are elevated in human subjects with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2006;29:2457-2461.
141. Yang Q, Graham TE, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolotny JM, Kotani K, Quadro L, Kahn BB. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature.* 2005;436:356-362.
142. Tuncman G, Erbay E, Hom X, De Vivo I, Campos H, Rimm EB, Hotamisligil GS. A genetic variant at the fatty acid-binding protein aP2 locus reduces the risk for hypertriglyceridemia, type 2 diabetes, and cardiovascular disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:6970-6975.
143. Damcott CM, Moffett SP, Feingold E, Barmada MM, Marshall JA, Hamman RF, Ferrell RE. Genetic variation in fatty acid-binding protein-4 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma interactively influence insulin sensitivity and body composition in males. *Metabolism.* 2004;53:303-309.
144. Franks S. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med.* 1995;333:853-861.
145. Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev.* 1997;18:774-800.
146. Wild S, Pierpoint T, McKeigue P, Jacobs H. Cardiovascular disease in women with polycystic ovary syndrome at long-term follow-up: a retrospective cohort study. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2000;52:595-600.
147. Legro RS. Polycystic ovary syndrome. Long term sequelae and management. *Minerva Ginecol.* 2002;54:97-114.
148. Barber TM, McCarthy MI, Wass JA, Franks S. Obesity and polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2006;65:137-145.
149. Wang J, Tang J, Wang B, Song J, Liu J, Wei Z, Zhang F, Ma X, Cao Y. FABP4: a novel candidate gene for polycystic ovary syndrome. *Endocrine.* 2009.
150. Cabre A, Lázaro I, Girona J, Manzanares JM, Marimon F, Plana N, Heras M, Masana L. Plasma fatty acid-binding protein 4 increases with renal dysfunction in type 2 diabetic patients without microalbuminuria. *Clin Chem.* 2008;54:181-187.
151. Yeung DC, Xu A, Tso AW, Chow WS, Wat NM, Fong CH, Tam S, Sham PC, Lam KS. Circulating levels of adipocyte and epidermal fatty acid-binding proteins in relation to

- nephropathy staging and macrovascular complications in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2009;32:132-134.
152. Miyoshi T, Onoue G, Hirohata A, Hirohata S, Usui S, Hina K, Kawamura H, Doi M, Kusano KF, Kusachi S, Ninomiya Y. Serum adipocyte fatty acid-binding protein is independently associated with coronary atherosclerotic burden measured by intravascular ultrasound. *Atherosclerosis*. 2010.
153. Lehmann F, Haile S, Axen E, Medina C, Uppenberg J, Svensson S, Lundback T, Rondahl L, Barf T. Discovery of inhibitors of human adipocyte fatty acid-binding protein, a potential type 2 diabetes target. *Bioorg Med Chem Lett*. 2004;14:4445-4448.
154. Ringom R, Axen E, Uppenberg J, Lundback T, Rondahl L, Barf T. Substituted benzylamino-6-(trifluoromethyl)pyrimidin-4(1H)-ones: a novel class of selective human A-FABP inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2004;14:4449-4452.
155. Sulsky R, Magnin DR, Huang Y, Simpkins L, Taunk P, Patel M, Zhu Y, Stouch TR, Bassolino-Klimas D, Parker R, Harrity T, Stoffel R, Taylor DS, Lavoie TB, Kish K, Jacobson BL, Sheriff S, Adam LP, Ewing WR, Robl JA. Potent and selective biphenylazole inhibitors of adipocyte fatty acid binding protein (aFABP). *Bioorg Med Chem Lett*. 2007;17:3511-3515.
156. Barf T, Lehmann F, Hammer K, Haile S, Axen E, Medina C, Uppenberg J, Svensson S, Rondahl L, Lundback T. N-Benzyl-indolo carboxylic acids: Design and synthesis of potent and selective adipocyte fatty-acid binding protein (A-FABP) inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2009;19:1745-1748.
157. Hertzell AV, Hellberg K, Reynolds JM, Kruse AC, Juhlmann BE, Smith AJ, Sanders MA, Ohlendorf DH, Suttles J, Bernlohr DA. Identification and characterization of a small molecule inhibitor of Fatty Acid binding proteins. *J Med Chem*. 2009;52:6024-6031.
158. Cai H, Yan G, Zhang X, Gorbenko O, Wang H, Zhu W. Discovery of highly selective inhibitors of human fatty acid binding protein 4 (FABP4) by virtual screening. *Bioorg Med Chem Lett*. 2010;20:3675-3679.
159. Qin B, Polansky MM, Anderson RA. Cinnamon extract regulates plasma levels of adipose-derived factors and expression of multiple genes related to carbohydrate metabolism and lipogenesis in adipose tissue of fructose-fed rats. *Horm Metab Res*. 2010;42:187-193.
160. Karpisek M, Stejskal D, Kotolova H, Kollar P, Janoutova G, Ochmanova R, Cizek L, Horakova D, Yahia RB, Lichnovska R, Janout V. Treatment with atorvastatin reduces serum adipocyte-fatty acid binding protein value in patients with hyperlipidaemia. *Eur J Clin Invest*. 2007;37:637-642.
161. Schneider J, Erren T, Zofel P, Kaffarnik H. Metformin-induced changes in serum lipids, lipoproteins, and apoproteins in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 1990;82:97-103.
162. Schneider J. Effects of metformin on dyslipoproteinemia in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabete Metab*. 1991;17:185-190.

163. Abbasi F, Chu JW, McLaughlin T, Lamendola C, Leary ET, Reaven GM. Effect of metformin treatment on multiple cardiovascular disease risk factors in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*. 2004;53:159-164.
164. Song J, Ren P, Zhang L, Wang XL, Chen L, Shen YH. Metformin reduces lipid accumulation in macrophages by inhibiting FOXO1-mediated transcription of fatty acid-binding protein 4. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;393:89-94.
165. Yki-Jarvinen H. Thiazolidinediones. *N Engl J Med*. 2004;351:1106-1118.
166. Kaspar JW, Niture SK, Jaiswal AK. Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2009;47:1304-1309.
167. Copple IM, Goldring CE, Kitteringham NR, Park BK. The Nrf2-Keap1 defence pathway: role in protection against drug-induced toxicity. *Toxicology*. 2008;246:24-33.
168. Li J, Ichikawa T, Janicki JS, Cui T. Targeting the Nrf2 pathway against cardiovascular disease. *Expert Opin Ther Targets*. 2009;13:785-794.
169. Nguyen T, Sherratt PJ, Pickett CB. Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2003;43:233-260.
170. Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2007;47:89-116.
171. Rushmore TH, Morton MR, Pickett CB. The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J Biol Chem*. 1991;266:11632-11639.
172. Rushmore TH, King RG, Paulson KE, Pickett CB. Regulation of glutathione S-transferase Ya subunit gene expression: identification of a unique xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by planar aromatic compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:3826-3830.
173. Li Y, Jaiswal AK. Regulation of human NAD(P)H:quinone oxidoreductase gene. Role of AP1 binding site contained within human antioxidant response element. *J Biol Chem*. 1992;267:15097-15104.
174. Venugopal R, Jaiswal AK. Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:14960-14965.
175. Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, Oyake T, Hayashi N, Satoh K, Hatayama I, Yamamoto M, Nabeshima Y. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;236:313-322.
176. Moinova HR, Mulcahy RT. An electrophile responsive element (EpRE) regulates beta-naphthoflavone induction of the human gamma-glutamylcysteine synthetase regulatory

- subunit gene. Constitutive expression is mediated by an adjacent AP-1 site. *J Biol Chem.* 1998;273:14683-14689.
177. Wasserman WW, Fahl WE. Functional antioxidant responsive elements. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:5361-5366.
178. Jaiswal AK. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic Biol Med.* 2004;36:1199-1207.
179. Chan K, Kan YW. Nrf2 is essential for protection against acute pulmonary injury in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:12731-12736.
180. McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, Chanas SA, Henderson CJ, McLellan LI, Wolf CR, Cavin C, Hayes JD. The Cap'n'Collar basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (NF-E2 p45-related factor 2) controls both constitutive and inducible expression of intestinal detoxification and glutathione biosynthetic enzymes. *Cancer Res.* 2001;61:3299-3307.
181. Enomoto A, Itoh K, Nagayoshi E, Haruta J, Kimura T, O'Connor T, Harada T, Yamamoto M. High sensitivity of Nrf2 knockout mice to acetaminophen hepatotoxicity associated with decreased expression of ARE-regulated drug metabolizing enzymes and antioxidant genes. *Toxicol Sci.* 2001;59:169-177.
182. Aoki Y, Sato H, Nishimura N, Takahashi S, Itoh K, Yamamoto M. Accelerated DNA adduct formation in the lung of the Nrf2 knockout mouse exposed to diesel exhaust. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2001;173:154-160.
183. Ishii T, Itoh K, Takahashi S, Sato H, Yanagawa T, Katoh Y, Bannai S, Yamamoto M. Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. *J Biol Chem.* 2000;275:16023-16029.
184. Moi P, Chan K, Asunis I, Cao A, Kan YW. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:9926-9930.
185. Chan K, Lu R, Chang JC, Kan YW. NRF2, a member of the NFE2 family of transcription factors, is not essential for murine erythropoiesis, growth, and development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:13943-13948.
186. Kataoka K, Nishizawa M, Kawai S. Structure-function analysis of the maf oncogene product, a member of the b-Zip protein family. *J Virol.* 1993;67:2133-2141.
187. Oyake T, Itoh K, Motohashi H, Hayashi N, Hoshino H, Nishizawa M, Yamamoto M, Igarashi K. Bach proteins belong to a novel family of BTB-basic leucine zipper transcription factors that interact with MafK and regulate transcription through the NF-E2 site. *Mol Cell Biol.* 1996;16:6083-6095.
188. Kobayashi A, Ito E, Toki T, Kogame K, Takahashi S, Igarashi K, Hayashi N, Yamamoto M. Molecular cloning and functional characterization of a new Cap'n' collar family transcription factor Nrf3. *J Biol Chem.* 1999;274:6443-6452.
189. Toki T, Itoh J, Kitazawa J, Arai K, Hatakeyama K, Akasaka J, Igarashi K, Nomura N, Yokoyama M, Yamamoto M, Ito E. Human small Maf proteins form heterodimers with

- CNC family transcription factors and recognize the NF-E2 motif. *Oncogene*. 1997;14:1901-1910.
190. Motohashi H, O'Connor T, Katsuoka F, Engel JD, Yamamoto M. Integration and diversity of the regulatory network composed of Maf and CNC families of transcription factors. *Gene*. 2002;294:1-12.
191. Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, Yamamoto M. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev*. 1999;13:76-86.
192. Katoh Y, Iida K, Kang MI, Kobayashi A, Mizukami M, Tong KI, McMahon M, Hayes JD, Itoh K, Yamamoto M. Evolutionary conserved N-terminal domain of Nrf2 is essential for the Keap1-mediated degradation of the protein by proteasome. *Arch Biochem Biophys*. 2005;433:342-350.
193. Nioi P, Nguyen T, Sherratt PJ, Pickett CB. The carboxy-terminal Neh3 domain of Nrf2 is required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*. 2005;25:10895-10906.
194. Huang HC, Nguyen T, Pickett CB. Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:12475-12480.
195. Kong AN, Owuor E, Yu R, Hebbar V, Chen C, Hu R, Mandlekar S. Induction of xenobiotic enzymes by the MAP kinase pathway and the antioxidant or electrophile response element (ARE/EpRE). *Drug Metab Rev*. 2001;33:255-271.
196. Kwak MK, Wakabayashi N, Greenlaw JL, Yamamoto M, Kensler TW. Antioxidants enhance mammalian proteasome expression through the Keap1-Nrf2 signaling pathway. *Mol Cell Biol*. 2003;23:8786-8794.
197. Zhang DD, Hannink M. Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Mol Cell Biol*. 2003;23:8137-8151.
198. Nioi P, Hayes JD. Contribution of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 to protection against carcinogenesis, and regulation of its gene by the Nrf2 basic-region leucine zipper and the arylhydrocarbon receptor basic helix-loop-helix transcription factors. *Mutat Res*. 2004;555:149-171.
199. Nguyen T, Sherratt PJ, Huang HC, Yang CS, Pickett CB. Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element. Degradation of Nrf2 by the 26 S proteasome. *J Biol Chem*. 2003;278:4536-4541.
200. Stewart D, Killeen E, Naquin R, Alam S, Alam J. Degradation of transcription factor Nrf2 via the ubiquitin-proteasome pathway and stabilization by cadmium. *J Biol Chem*. 2003;278:2396-2402.
201. Sun Z, Zhang S, Chan JY, Zhang DD. Keap1 Controls Post-Induction Repression of the Nrf2-Mediated Antioxidant Response by Escorting Nuclear Export of Nrf2. *Mol Cell Biol*. 2007.

202. Levonen AL, Landar A, Ramachandran A, Ceaser EK, Dickinson DA, Zanoni G, Morrow JD, Darley-Usmar VM. Cellular mechanisms of redox cell signalling: role of cysteine modification in controlling antioxidant defences in response to electrophilic lipid oxidation products. *Biochem J.* 2004;378:373-382.
203. Eggler AL, Liu G, Pezzuto JM, van Breemen RB, Mesecar AD. Modifying specific cysteines of the electrophile-sensing human Keap1 protein is insufficient to disrupt binding to the Nrf2 domain Neh2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:10070-10075.
204. Wakabayashi N, Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Kang MI, Kobayashi A, Yamamoto M, Kensler TW, Talalay P. Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:2040-2045.
205. Li X, Zhang D, Hannink M, Beamer LJ. Crystal structure of the Kelch domain of human Keap1. *J Biol Chem.* 2004;279:54750-54758.
206. Tong KI, Padmanabhan B, Kobayashi A, Shang C, Hirotsu Y, Yokoyama S, Yamamoto M. Different electrostatic potentials define ETGE and DLG motifs as hinge and latch in oxidative stress response. *Mol Cell Biol.* 2007;27:7511-7521.
207. Geyer R, Wee S, Anderson S, Yates J, Wolf DA. BTB/POZ domain proteins are putative substrate adaptors for cullin 3 ubiquitin ligases. *Mol Cell.* 2003;12:783-790.
208. Kobayashi A, Kang MI, Okawa H, Ohtsui M, Zenke Y, Chiba T, Igarashi K, Yamamoto M. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol.* 2004;24:7130-7139.
209. Zhang DD, Lo SC, Cross JV, Templeton DJ, Hannink M. Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex. *Mol Cell Biol.* 2004;24:10941-10953.
210. Furukawa M, Xiong Y. BTB protein Keap1 targets antioxidant transcription factor Nrf2 for ubiquitination by the Cullin 3-Roc1 ligase. *Mol Cell Biol.* 2005;25:162-171.
211. Padmanabhan B, Tong KI, Ohta T, Nakamura Y, Scharlock M, Ohtsui M, Kang MI, Kobayashi A, Yokoyama S, Yamamoto M. Structural basis for defects of Keap1 activity provoked by its point mutations in lung cancer. *Mol Cell.* 2006;21:689-700.
212. Zipper LM, Mulcahy RT. The Keap1 BTB/POZ dimerization function is required to sequester Nrf2 in cytoplasm. *J Biol Chem.* 2002;277:36544-36552.
213. Seibenhener ML, Babu JR, Geetha T, Wong HC, Krishna NR, Wooten MW. Sequestosome 1/p62 is a polyubiquitin chain binding protein involved in ubiquitin proteasome degradation. *Mol Cell Biol.* 2004;24:8055-8068.
214. McMahon M, Thomas N, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD. Dimerization of substrate adaptors can facilitate cullin-mediated ubiquitylation of proteins by a "tethering" mechanism: a two-site interaction model for the Nrf2-Keap1 complex. *J Biol Chem.* 2006;281:24756-24768.

215. Kobayashi A, Kang MI, Watai Y, Tong KI, Shibata T, Uchida K, Yamamoto M. Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Mol Cell Biol.* 2006;26:221-229.
216. Niture SK, Jaiswal AK. Prothymosin-alpha mediates nuclear import of the INrf2/Cul3 Rbx1 complex to degrade nuclear Nrf2. *J Biol Chem.* 2009;284:13856-13868.
217. Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, O'Connor T, Yamamoto M. Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. *Genes Cells.* 2003;8:379-391.
218. McMahon M, Thomas N, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD. Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox-sensitive Neh2 degron and the redox-insensitive Neh6 degron. *J Biol Chem.* 2004;279:31556-31567.
219. Nguyen T, Nioi P, Pickett CB. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem.* 2009;284:13291-13295.
220. Lau A, Wang XJ, Zhao F, Villeneuve NF, Wu T, Jiang T, Sun Z, White E, Zhang DD. A Noncanonical mechanism of Nrf2 activation by autophagy deficiency: direct interaction between Keap1 and p62. *Mol Cell Biol.* 2010;30:3275-3285.
221. Kang MI, Kobayashi A, Wakabayashi N, Kim SG, Yamamoto M. Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:2046-2051.
222. Plafker KS, Nguyen L, Barneche M, Mirza S, Crawford DF, Plafker SM. The ubiquitin conjugating enzyme, UbcM2, can regulate the stability and activity of the anti-oxidant transcription factor, Nrf2. *J Biol Chem.* 2010.
223. Copple IM, Lister A, Obeng AD, Kitteringham NR, Jenkins RE, Layfield R, Foster BJ, Goldring CE, Park BK. Physical and functional interaction of sequestosome 1 with Keap1 regulates the Keap1-Nrf2 cell defense pathway. *J Biol Chem.* 2010;285:16782-16788.
224. Komatsu M, Kurokawa H, Waguri S, Taguchi K, Kobayashi A, Ichimura Y, Sou YS, Ueno I, Sakamoto A, Tong KI, Kim M, Nishito Y, Iemura S, Natsume T, Ueno T, Kominami E, Motohashi H, Tanaka K, Yamamoto M. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat Cell Biol.* 2010;12:213-223.
225. Clements CM, McNally RS, Conti BJ, Mak TW, Ting JP. DJ-1, a cancer- and Parkinson's disease-associated protein, stabilizes the antioxidant transcriptional master regulator Nrf2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:15091-15096.
226. Malhotra D, Thimmulappa R, Navas-Acien A, Sandford A, Elliott M, Singh A, Chen L, Zhuang X, Hogg J, Pare P, Tuder RM, Biswal S. Decline in NRF2-regulated antioxidants in chronic obstructive pulmonary disease lungs due to loss of its positive regulator, DJ-1. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;178:592-604.
227. Gan L, Johnson DA, Johnson JA. Keap1-Nrf2 activation in the presence and absence of DJ-1. *Eur J Neurosci.* 2010;31:967-977.

228. Lee JS, Surh YJ. Nrf2 as a novel molecular target for chemoprevention. *Cancer Lett.* 2005;224:171-184.
229. Velichkova M, Hasson T. Keap1 regulates the oxidation-sensitive shuttling of Nrf2 into and out of the nucleus via a Crm1-dependent nuclear export mechanism. *Mol Cell Biol.* 2005;25:4501-4513.
230. Huang HC, Nguyen T, Pickett CB. Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. *J Biol Chem.* 2002;277:42769-42774.
231. Bloom DA, Jaiswal AK. Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by protein kinase C in response to antioxidants leads to the release of Nrf2 from INrf2, but is not required for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response element-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 gene expression. *J Biol Chem.* 2003;278:44675-44682.
232. Niture SK, Jain AK, Jaiswal AK. Antioxidant-induced modification of INrf2 cysteine 151 and PKC-delta-mediated phosphorylation of Nrf2 serine 40 are both required for stabilization and nuclear translocation of Nrf2 and increased drug resistance. *J Cell Sci.* 2009;122:4452-4464.
233. McNally SJ, Harrison EM, Ross JA, Garden OJ, Wigmore SJ. Curcumin induces heme oxygenase 1 through generation of reactive oxygen species, p38 activation and phosphatase inhibition. *Int J Mol Med.* 2007;19:165-172.
234. Carnero A. The PKB/AKT pathway in cancer. *Curr Pharm Des.* 2010;16:34-44.
235. Heldman AW, Kandzari DE, Tucker RW, Crawford LE, Fearon ER, Koblan KS, Goldschmidt-Clermont PJ. EJ-Ras inhibits phospholipase C gamma 1 but not actin polymerization induced by platelet-derived growth factor-BB via phosphatidylinositol 3-kinase. *Circ Res.* 1996;78:312-321.
236. Hooshmand-Rad R, Claesson-Welsh L, Wennstrom S, Yokote K, Siegbahn A, Heldin CH. Involvement of phosphatidylinositide 3'-kinase and Rac in platelet-derived growth factor-induced actin reorganization and chemotaxis. *Exp Cell Res.* 1997;234:434-441.
237. Kang KW, Lee SJ, Park JW, Kim SG. Phosphatidylinositol 3-kinase regulates nuclear translocation of NF-E2-related factor 2 through actin rearrangement in response to oxidative stress. *Mol Pharmacol.* 2002;62:1001-1010.
238. Martin D, Rojo AI, Salinas M, Diaz R, Gallardo G, Alam J, De Galarreta CM, Cuadrado A. Regulation of heme oxygenase-1 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and the Nrf2 transcription factor in response to the antioxidant phytochemical carnosol. *J Biol Chem.* 2004;279:8919-8929.
239. Choi BM, Kim BR. Upregulation of heme oxygenase-1 by brazilin via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and ERK pathways and its protective effect against oxidative injury. *Eur J Pharmacol.* 2008;580:12-18.
240. Ma ZC, Hong Q, Wang YG, Tan HL, Xiao CR, Liang QD, Zhang BL, Gao Y. Ferulic acid protects human umbilical vein endothelial cells from radiation induced oxidative stress

- by phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways. *Biol Pharm Bull.* 2010;33:29-34.
241. Kim KC, Kang KA, Zhang R, Piao MJ, Kim GY, Kang MY, Lee SJ, Lee NH, Surh YJ, Hyun JW. Up-regulation of Nrf2-mediated heme oxygenase-1 expression by eckol, a phlorotannin compound, through activation of Erk and PI3K/Akt. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42:297-305.
242. Kang KW, Ryu JH, Kim SG. The essential role of phosphatidylinositol 3-kinase and of p38 mitogen-activated protein kinase activation in the antioxidant response element-mediated rGSTA2 induction by decreased glutathione in H4IIE hepatoma cells. *Mol Pharmacol.* 2000;58:1017-1025.
243. Zhang H, Liu H, Iles KE, Liu RM, Postlethwait EM, Laperche Y, Forman HJ. 4-Hydroxynonenal induces rat gamma-glutamyl transpeptidase through mitogen-activated protein kinase-mediated electrophile response element/nuclear factor erythroid 2-related factor 2 signaling. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006;34:174-181.
244. Owuor ED, Kong AN. Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways. *Biochem Pharmacol.* 2002;64:765-770.
245. Zipper LM, Mulcahy RT. Erk activation is required for Nrf2 nuclear localization during pyrrolidine dithiocarbamate induction of glutamate cysteine ligase modulatory gene expression in HepG2 cells. *Toxicol Sci.* 2003;73:124-134.
246. McCubrey JA, Lahair MM, Franklin RA. Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways. *Antioxid Redox Signal.* 2006;8:1775-1789.
247. Sun Z, Huang Z, Zhang DD. Phosphorylation of Nrf2 at multiple sites by MAP kinases has a limited contribution in modulating the Nrf2-dependent antioxidant response. *PLoS One.* 2009;4:e6588.
248. Jain AK, Jaiswal AK. Phosphorylation of tyrosine 568 controls nuclear export of Nrf2. *J Biol Chem.* 2006;281:12132-12142.
249. Jain AK, Mahajan S, Jaiswal AK. Phosphorylation and dephosphorylation of tyrosine 141 regulate stability and degradation of INrf2: a novel mechanism in Nrf2 activation. *J Biol Chem.* 2008;283:17712-17720.
250. Kwak MK, Itoh K, Yamamoto M, Kensler TW. Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the nrf2 promoter. *Mol Cell Biol.* 2002;22:2883-2892.
251. Lee OH, Jain AK, Papusha V, Jaiswal AK. An auto-regulatory loop between stress sensors INrf2 and Nrf2 controls their cellular abundance. *J Biol Chem.* 2007;282:36412-36420.
252. Kaspar JW, Jaiswal AK. An auto-regulatory loop between Nrf2 and Cul3-Rbx1 controls their cellular abundance. *J Biol Chem.* 2010;285:21349-21359.
253. Breimer LH. Molecular mechanisms of oxygen radical carcinogenesis and mutagenesis: the role of DNA base damage. *Mol Carcinog.* 1990;3:188-197.

254. Chan JY, Kwong M. Impaired expression of glutathione synthetic enzyme genes in mice with targeted deletion of the Nrf2 basic-leucine zipper protein. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1517:19-26.
255. Chanas SA, Jiang Q, McMahon M, McWalter GK, McLellan LI, Elcombe CR, Henderson CJ, Wolf CR, Moffat GJ, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD. Loss of the Nrf2 transcription factor causes a marked reduction in constitutive and inducible expression of the glutathione S-transferase Gsta1, Gsta2, Gstm1, Gstm2, Gstm3 and Gstm4 genes in the livers of male and female mice. *Biochem J*. 2002;365:405-416.
256. Ramos-Gomez M, Kwak MK, Dolan PM, Itoh K, Yamamoto M, Talalay P, Kensler TW. Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:3410-3415.
257. Cho HY, Jedlicka AE, Reddy SP, Kensler TW, Yamamoto M, Zhang LY, Kleeberger SR. Role of NRF2 in protection against hyperoxic lung injury in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002;26:175-182.
258. Ishii Y, Itoh K, Morishima Y, Kimura T, Kiwamoto T, Iizuka T, Hegab AE, Hosoya T, Nomura A, Sakamoto T, Yamamoto M, Sekizawa K. Transcription factor Nrf2 plays a pivotal role in protection against elastase-induced pulmonary inflammation and emphysema. *J Immunol*. 2005;175:6968-6975.
259. Lee JM, Calkins MJ, Chan K, Kan YW, Johnson JA. Identification of the NF-E2-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis. *J Biol Chem*. 2003;278:12029-12038.
260. Shih AY, Imbeault S, Barakauskas V, Erb H, Jiang L, Li P, Murphy TH. Induction of the Nrf2-driven antioxidant response confers neuroprotection during mitochondrial stress in vivo. *J Biol Chem*. 2005;280:22925-22936.
261. Kraft AD, Lee JM, Johnson DA, Kan YW, Johnson JA. Neuronal sensitivity to kainic acid is dependent on the Nrf2-mediated actions of the antioxidant response element. *J Neurochem*. 2006;98:1852-1865.
262. Xu C, Huang MT, Shen G, Yuan X, Lin W, Khor TO, Conney AH, Kong AN. Inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced skin tumorigenesis in C57BL/6 mice by sulforaphane is mediated by nuclear factor E2-related factor 2. *Cancer Res*. 2006;66:8293-8296.
263. Tanaka Y, Maher JM, Chen C, Klaassen CD. Hepatic ischemia-reperfusion induces renal heme oxygenase-1 via NF-E2-related factor 2 in rats and mice. *Mol Pharmacol*. 2007;71:817-825.
264. Aleksunes LM, Goedken MJ, Rockwell CE, Thomale J, Manautou JE, Klaassen CD. Transcriptional Regulation of Renal Cytoprotective Genes by Nrf2 and its Potential Use as a Therapeutic Target to Mitigate Cisplatin-Induced Nephrotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010;(ahead of pub).

265. Li J, Stein TD, Johnson JA. Genetic dissection of systemic autoimmune disease in Nrf2-deficient mice. *Physiol Genomics*. 2004;18:261-272.
266. Lee JM, Chan K, Kan YW, Johnson JA. Targeted disruption of Nrf2 causes regenerative immune-mediated hemolytic anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:9751-9756.
267. Gao X, Talalay P. Induction of phase 2 genes by sulforaphane protects retinal pigment epithelial cells against photooxidative damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:10446-10451.
268. Yates MS, Kensler TW. Chemopreventive promise of targeting the Nrf2 pathway. *Drug News Perspect*. 2007;20:109-117.
269. Giudice A, Montella M. Activation of the Nrf2-ARE signaling pathway: a promising strategy in cancer prevention. *Bioessays*. 2006;28:169-181.
270. Chen XL, Varner SE, Rao AS, Grey JY, Thomas S, Cook CK, Wasserman MA, Medford RM, Jaiswal AK, Kunsch C. Laminar flow induction of antioxidant response element-mediated genes in endothelial cells. A novel anti-inflammatory mechanism. *J Biol Chem*. 2003;278:703-711.
271. Hosoya T, Maruyama A, Kang MI, Kawatani Y, Shibata T, Uchida K, Warabi E, Noguchi N, Itoh K, Yamamoto M. Differential responses of the Nrf2-Keap1 system to laminar and oscillatory shear stresses in endothelial cells. *J Biol Chem*. 2005;280:27244-27250.
272. Chen XL, Dodd G, Thomas S, Zhang X, Wasserman MA, Rovin BH, Kunsch C. Activation of Nrf2/ARE pathway protects endothelial cells from oxidant injury and inhibits inflammatory gene expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;290:H1862-1870.
273. Xue M, Qian Q, Adaikalakoteswari A, Rabbani N, Babaei-Jadidi R, Thornalley PJ. Activation of NF-E2-related factor-2 reverses biochemical dysfunction of endothelial cells induced by hyperglycemia linked to vascular disease. *Diabetes*. 2008;57:2809-2817.
274. Ishii T, Itoh K, Ruiz E, Leake DS, Unoki H, Yamamoto M, Mann GE. Role of Nrf2 in the regulation of CD36 and stress protein expression in murine macrophages: activation by oxidatively modified LDL and 4-hydroxynonenal. *Circ Res*. 2004;94:609-616.
275. Anwar AA, Li FY, Leake DS, Ishii T, Mann GE, Siow RC. Induction of heme oxygenase 1 by moderately oxidized low-density lipoproteins in human vascular smooth muscle cells: role of mitogen-activated protein kinases and Nrf2. *Free Radic Biol Med*. 2005;39:227-236.
276. Liu XM, Peyton KJ, Ensenat D, Wang H, Schafer AI, Alam J, Durante W. Endoplasmic reticulum stress stimulates heme oxygenase-1 gene expression in vascular smooth muscle. Role in cell survival. *J Biol Chem*. 2005;280:872-877.
277. Levonen AL, Inkala M, Heikura T, Jauhiainen S, Jyrkkanen HK, Kansanen E, Maatta K, Romppanen E, Turunen P, Rutanen J, Yla-Herttuala S. Nrf2 gene transfer induces antioxidant enzymes and suppresses smooth muscle cell growth in vitro and reduces oxidative stress in rabbit aorta in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:741-747.

278. Villacorta L, Zhang J, Garcia-Barrio MT, Chen XL, Freeman BA, Chen YE, Cui T. Nitro-linoleic acid inhibits vascular smooth muscle cell proliferation via the Keap1/Nrf2 signaling pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293:H770-776.
279. Bea F, Hudson FN, Chait A, Kavanagh TJ, Rosenfeld ME. Induction of glutathione synthesis in macrophages by oxidized low-density lipoproteins is mediated by consensus antioxidant response elements. *Circ Res*. 2003;92:386-393.
280. Li N, Alam J, Venkatesan MI, Eiguren-Fernandez A, Schmitz D, Di Stefano E, Slaughter N, Killeen E, Wang X, Huang A, Wang M, Miguel AH, Cho A, Sioutas C, Nel AE. Nrf2 is a key transcription factor that regulates antioxidant defense in macrophages and epithelial cells: protecting against the proinflammatory and oxidizing effects of diesel exhaust chemicals. *J Immunol*. 2004;173:3467-3481.
281. Itoh K, Mochizuki M, Ishii Y, Ishii T, Shibata T, Kawamoto Y, Kelly V, Sekizawa K, Uchida K, Yamamoto M. Transcription factor Nrf2 regulates inflammation by mediating the effect of 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin j(2). *Mol Cell Biol*. 2004;24:36-45.
282. Jyrkkanen HK, Kansanen E, Inkala M, Kivela AM, Hurttala H, Heinonen SE, Goldsteins G, Jauhainen S, Tiainen S, Makkonen H, Oskolkova O, Afonyushkin T, Koistinaho J, Yamamoto M, Bochkov VN, Yla-Herttuala S, Levonen AL. Nrf2 regulates antioxidant gene expression evoked by oxidized phospholipids in endothelial cells and murine arteries in vivo. *Circ Res*. 2008;103:e1-9.
283. Sussan TE, Jun J, Thimmulappa R, Bedja D, Antero M, Gabrielson KL, Polotsky VY, Biswal S. Disruption of Nrf2, a key inducer of antioxidant defenses, attenuates ApoE-mediated atherosclerosis in mice. *PLoS One*. 2008;3:e3791.
284. Manning-Tobin JJ, Moore KJ, Seimon TA, Bell SA, Sharuk M, Alvarez-Leite JI, de Winther MP, Tabas I, Freeman MW. Loss of SR-A and CD36 activity reduces atherosclerotic lesion complexity without abrogating foam cell formation in hyperlipidemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29:19-26.
285. Han J, Hajjar DP, Zhou X, Gotto AM, Jr., Nicholson AC. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated gene expression. A new mechanism of action for high density lipoprotein. *J Biol Chem*. 2002;277:23582-23586.
286. Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A, Frisch M, Bayerlein M, Werner T. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics*. 2005;21:2933-2942.
287. Esterbauer H, Ramos P. Chemistry and pathophysiology of oxidation of LDL. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 1996;127:31-64.
288. Park KS, Ciaraldi TP, Lindgren K, Abrams-Carter L, Mudaliar S, Nikoulina SE, Tufari SR, Veerkamp JH, Vidal-Puig A, Henry RR. Troglitazone effects on gene expression in human skeletal muscle of type II diabetes involve up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83:2830-2835.
289. Cabrero A, Cubero M, Llaverias G, Jove M, Planavila A, Alegret M, Sanchez R, Laguna JC, Carrera MV. Differential effects of peroxisome proliferator-activated receptor

- activators on the mRNA levels of genes involved in lipid metabolism in primary human monocyte-derived macrophages. *Metabolism*. 2003;52:652-657.
290. Nakamura Y, Kumagai T, Yoshida C, Naito Y, Miyamoto M, Ohigashi H, Osawa T, Uchida K. Pivotal role of electrophilicity in glutathione S-transferase induction by tert-butylhydroquinone. *Biochemistry*. 2003;42:4300-4309.
291. Williams GM, Iatropoulos MJ, Whysner J. Safety assessment of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene as antioxidant food additives. *Food Chem Toxicol*. 1999;37:1027-1038.
292. Li J, Lee JM, Johnson JA. Microarray analysis reveals an antioxidant responsive element-driven gene set involved in conferring protection from an oxidative stress-induced apoptosis in IMR-32 cells. *J Biol Chem*. 2002;277:388-394.
293. Hollstein U, Breitmaier E, Jung G. 13-C nuclear magnetic resonance study of actinomycin D. *J Am Chem Soc*. 1974;96:8036-8040.
294. Murphy LD, Herzog CE, Rudick JB, Fojo AT, Bates SE. Use of the polymerase chain reaction in the quantitation of mdr-1 gene expression. *Biochemistry*. 1990;29:10351-10356.
295. Noonan KE, Beck C, Holzmayer TA, Chin JE, Wunder JS, Andrulis IL, Gazdar AF, Willman CL, Griffith B, Von Hoff DD, et al. Quantitative analysis of MDR1 (multidrug resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:7160-7164.
296. Horikoshi T, Danenberg KD, Stadlbauer TH, Volkenandt M, Shea LC, Aigner K, Gustavsson B, Leichman L, Frosing R, Ray M, et al. Quantitation of thymidylate synthase, dihydrofolate reductase, and DT-diaphorase gene expression in human tumors using the polymerase chain reaction. *Cancer Res*. 1992;52:108-116.
297. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-254.
298. Das PM, Ramachandran K, vanWert J, Singal R. Chromatin immunoprecipitation assay. *Biotechniques*. 2004;37:961-969.
299. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25:402-408.
300. Helledie T, Antonius M, Sorensen RV, Hertzog AV, Bernlohr DA, Kolvraa S, Kristiansen K, Mandrup S. Lipid-binding proteins modulate ligand-dependent trans-activation by peroxisome proliferator-activated receptors and localize to the nucleus as well as the cytoplasm. *J Lipid Res*. 2000;41:1740-1751.
301. Fu Y, Luo L, Luo N, Garvey WT. Lipid metabolism mediated by adipocyte lipid binding protein (ALBP/aP2) gene expression in human THP-1 macrophages. *Atherosclerosis*. 2006;188:102-111.
302. D'Archivio M, Scazzocchio B, Filesi C, Vari R, Maggiorella MT, Sernicola L, Santangelo C, Giovannini C, Masella R. Oxidised LDL up-regulate CD36 expression by the Nrf2 pathway in 3T3-L1 preadipocytes. *FEBS Lett*. 2008;582:2291-2298.

303. Persson J, Degerman E, Nilsson J, Lindholm MW. Perilipin and adipophilin expression in lipid loaded macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;363:1020-1026.
304. Wang R, Kern JT, Goodfriend TL, Ball DL, Luesch H. Activation of the antioxidant response element by specific oxidized metabolites of linoleic acid. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2009;81:53-59.
305. Gao L, Wang J, Sekhar KR, Yin H, Yared NF, Schneider SN, Sasi S, Dalton TP, Anderson ME, Chan JY, Morrow JD, Freeman ML. Novel n-3 fatty acid oxidation products activate Nrf2 by destabilizing the association between Keap1 and Cullin3. *J Biol Chem.* 2007;282:2529-2537.
306. Kadl A, Meher AK, Sharma PR, Lee MY, Doran AC, Johnstone SR, Elliott MR, Gruber F, Han J, Chen W, Kensler T, Ravichandran KS, Isakson BE, Wamhoff BR, Leitinger N. Identification of a Novel Macrophage Phenotype That Develops in Response to Atherogenic Phospholipids via Nrf2. *Circ Res.* 2010;(ahead of pub).
307. Granado-Serrano AB, Martin MA, Haegeman G, Goya L, Bravo L, Ramos S. Epicatechin induces NF-kappaB, activator protein-1 (AP-1) and nuclear transcription factor erythroid 2p45-related factor-2 (Nrf2) via phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) and extracellular regulated kinase (ERK) signalling in HepG2 cells. *Br J Nutr.* 2010;103:168-179.
308. Pi J, Leung L, Xue P, Wang W, Hou Y, Liu D, Yehuda-Shnaidman E, Lee C, Lau J, Kurtz TW, Chan JY. Deficiency in the nuclear factor E2-related factor-2 transcription factor results in impaired adipogenesis and protects against diet-induced obesity. *J Biol Chem.* 2010;285:9292-9300.
309. Shin S, Wakabayashi N, Misra V, Biswal S, Lee GH, Agoston ES, Yamamoto M, Kensler TW. NRF2 modulates aryl hydrocarbon receptor signaling: influence on adipogenesis. *Mol Cell Biol.* 2007;27:7188-7197.
310. Hayes JD, Dinkova-Kostova AT, McMahon M. Cross-talk between transcription factors AhR and Nrf2: lessons for cancer chemoprevention from dioxin. *Toxicol Sci.* 2009;111:199-201.
311. Collins AR, Lyon CJ, Xia X, Liu JZ, Tangirala RK, Yin F, Boyadjian R, Bikineyeva A, Pratico D, Harrison DG, Hsueh WA. Age-accelerated atherosclerosis correlates with failure to upregulate antioxidant genes. *Circ Res.* 2009;104:e42-54.
312. Tanigawa S, Fujii M, Hou DX. Action of Nrf2 and Keap1 in ARE-mediated NQO1 expression by quercetin. *Free Radic Biol Med.* 2007;42:1690-1703.
313. Wright MM, Schopfer FJ, Baker PR, Vidyasagar V, Powell P, Chumley P, Iles KE, Freeman BA, Agarwal A. Fatty acid transduction of nitric oxide signaling: nitrooleic acid potently activates endothelial heme oxygenase 1 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:4299-4304.
314. Yun MR, Im DS, Lee SJ, Woo JW, Hong KW, Bae SS, Kim CD. 4-hydroxynonenal contributes to macrophage foam cell formation through increased expression of class A scavenger receptor at the level of translation. *Free Radic Biol Med.* 2008;45:177-183.

315. Kobayashi M, Yamamoto M. Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Adv Enzyme Regul.* 2006;46:113-140.
316. Kim JS, Song HJ, Ko SK, Whang WK, Sohn UD. Quercetin-3-O-beta-D-glucuronopyranoside (QGC)-induced HO-1 expression through ERK and PI3K activation in cultured feline esophageal epithelial cells. *Fitoterapia.* 2010;81:85-92.
317. Habeos IG, Ziros PG, Chartoumpakis D, Psyrogiannis A, Kyriazopoulou V, Papavassiliou AG. Simvastatin activates Keap1/Nrf2 signaling in rat liver. *J Mol Med.* 2008;86:1279-1285.
318. Chartoumpakis D, Ziros PG, Psyrogiannis A, Kyriazopoulou V, Papavassiliou AG, Habeos IG. Simvastatin lowers reactive oxygen species level by Nrf2 activation via PI3K/Akt pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;396:463-466.
319. Martin M, Rehani K, Jope RS, Michalek SM. Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. *Nat Immunol.* 2005;6:777-784.
320. Doran AC, Meller N, McNamara CA. Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:812-819.
321. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb.* 1994;14:840-856.
322. Faggiotto A, Ross R, Harker L. Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I. Changes that lead to fatty streak formation. *Arteriosclerosis.* 1984;4:323-340.
323. Wolfbauer G, Glick JM, Minor LK, Rothblat GH. Development of the smooth muscle foam cell: uptake of macrophage lipid inclusions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83:7760-7764.
324. Klouche M, Rose-John S, Schmiedt W, Bhakdi S. Enzymatically degraded, nonoxidized LDL induces human vascular smooth muscle cell activation, foam cell transformation, and proliferation. *Circulation.* 2000;101:1799-1805.
325. Rong JX, Shapiro M, Trogan E, Fisher EA. Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:13531-13536.
326. Ruan XZ, Moorhead JF, Tao JL, Ma KL, Wheeler DC, Powis SH, Varghese Z. Mechanisms of dysregulation of low-density lipoprotein receptor expression in vascular smooth muscle cells by inflammatory cytokines. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:1150-1155.
327. Takahashi M, Takahashi S, Suzuki C, Jia L, Morimoto H, Ise H, Iwasaki T, Hattori H, Suzuki J, Miyamori I, Kobayashi E, Ikeda U. Interleukin-1beta attenuates beta-very low-

- density lipoprotein uptake and its receptor expression in vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2005;38:637-646.
328. Matsumoto K, Hirano K, Nozaki S, Takamoto A, Nishida M, Nakagawa-Toyama Y, Janabi MY, Ohya T, Yamashita S, Matsuzawa Y. Expression of macrophage (Mphi) scavenger receptor, CD36, in cultured human aortic smooth muscle cells in association with expression of peroxisome proliferator activated receptor-gamma, which regulates gain of Mphi-like phenotype in vitro, and its implication in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1027-1032.
329. Lim HJ, Lee S, Lee KS, Park JH, Jang Y, Lee EJ, Park HY. PPARgamma activation induces CD36 expression and stimulates foam cell like changes in rVSMCs. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2006;80:165-174.
330. Wagsater D, Olofsson PS, Norgren L, Stenberg B, Sirsjo A. The chemokine and scavenger receptor CXCL16/SR-PSOX is expressed in human vascular smooth muscle cells and is induced by interferon gamma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;325:1187-1193.
331. Nagao S, Murao K, Imachi H, Cao WM, Yu X, Li J, Matsumoto K, Nishiuchi T, Ahmed RA, Wong NC, Ueda K, Ishida T. Platelet derived growth factor regulates ABCA1 expression in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 2006;580:4371-4376.
332. Davies JD, Carpenter KL, Challis IR, Figg NL, McNair R, Proudfoot D, Weissberg PL, Shanahan CM. Adipocytic differentiation and liver x receptor pathways regulate the accumulation of triacylglycerols in human vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2005;280:3911-3919.
333. Hur KY, Kim SH, Choi MA, Williams DR, Lee YH, Kang SW, Yadav UC, Srivastava SK, Jung M, Cho JW, Kim SG, Kang ES, Lee EJ, Lee HC. Protective effects of magnesium lithospermate B against diabetic atherosclerosis via Nrf2-ARE-NQO1 transcriptional pathway. *Atherosclerosis.* 2010;211:69-76.
334. Zhang HS, Wang SQ. Nrf2 is involved in the effect of tanshinone IIA on intracellular redox status in human aortic smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol.* 2007;73:1358-1366.
335. Thimmulappa RK, Fuchs RJ, Malhotra D, Scollick C, Traore K, Bream JH, Trush MA, Liby KT, Sporn MB, Kensler TW, Biswal S. Preclinical evaluation of targeting the Nrf2 pathway by triterpenoids (CDDO-Im and CDDO-Me) for protection from LPS-induced inflammatory response and reactive oxygen species in human peripheral blood mononuclear cells and neutrophils. *Antioxid Redox Signal.* 2007;9:1963-1970.
336. Garbin U, Fratta Pasini A, Stranieri C, Cominacini M, Pasini A, Manfro S, Lugoboni F, Mozzini C, Guidi G, Faccini G, Cominacini L. Cigarette smoking blocks the protective expression of Nrf2/ARE pathway in peripheral mononuclear cells of young heavy smokers favouring inflammation. *PLoS One.* 2009;4:e8225.

Annexos

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
REGULACIÓ DE FABP4 DEPENDENT DE NRF2 EN MACRÒFAGS
Iolanda Lázaro López
ISBN:978-84-693-8852-5/DL:T.1952-2010

A1. Treballs publicats

El treball realitzat pròpiament pel desenvolupament d'aquesta tesi s'ha basat en la caracterització del mecanisme cel·lular a través del qual els aldehyds apolars presents a les LDLox indueixen l'expressió de FABP4 en macròfags. A causa del caràcter oxidant d'aquestes espècies, la hipòtesi de la regulació va pretendre determinar la implicació del sistema de defensa antioxidant cel·lular Nrf2-ARE.

En paral·lel a l'estudi de la regulació intracel·lular de FABP4, s'ha dut a terme l'estudi de la funcionalitat de la FABP4 com a biomarcador d'alteracions metabòliques en diferents poblacions. Dels resultats obtinguts, se n'han derivat 8 treballs: 5 d'aquests treballs han estat publicats en revistes internacionals de primer quartil, i els 3 restants estan sotmesos per publicació.

La relació dels treballs publicats i sotmesos per publicació que s'adjunten com a annexos d'aquesta tesi és la següent:

Cabré A, Lázaro I, Girona J, Manzanares JM, Marimón F, Plana N, Heras M, Masana L. Fatty acid binding protein 4 is increased in metabolic syndrome and with thiazolidinedione treatment in diabetic patients. *Atherosclerosis* 2007; 195:e150-e158.

Coll B, Cabré A, Alonso-Villaverde C, Lázaro I, Aragonès G, Parra S, Girona J, Masana L. The fatty acid binding protein 4 (FABP4) is a strong biomarker of metabolic syndrome and lipodystrophy in HIV-infected patients. *Atherosclerosis* 2008; 199:147-153.

Cabré A, Lázaro I, Girona J, Manzanares JM, Marimón F, Plana N, Heras M, Masana L. Plasma fatty acid binding protein 4 is associated with atherogenic dyslipidemia in diabetes. *J Lipid Res* 2008; 49:1746-1751.

Cabré A, Lázaro I, Cofán M, Jarauta E, Plana N, García-Otín AL, Ascaso JF, Ferré R, Civeira F, Ros E, Masana L. FABP4 plasma levels are increased in familial combined hyperlipidemia. *J Lipid Res* 2010; 51:1173-1178.

Cabré A, Lázaro I, Girona J, Manzanares JM, Marimón F, Plana N, Heras M, Masana L. Plasma fatty acid-binding protein 4 increases with renal dysfunction in type 2 diabetic patients without microalbuminuria. *Clin Chem* 2008; 54:181-187.

Lázaro I, Ferré R, Plana N, Aragonès G, Girona J, Merino J, Heras M, Masana L, Cabré A. Lifestyle changes lower adipocyte fatty acid-binding protein plasma concentration in obese patients at cardiovascular risk (*sotmès per publicació*).

Lázaro I, Díaz M, Cabré A, Masana L, Ibáñez L. Fatty acid-binding protein-4 plasma levels are associated to metabolic abnormalities and response to therapy in girls and young women with androgen excess (*sotmès per publicació*).

Cabré A, Lázaro I, Plana N, Ferré R, Merino J, Masana L. Concentraciones plasmáticas de FABP4 y evolución del síndrome metabólico (*sotmès per publicació*).



Fatty acid binding protein 4 is increased in metabolic syndrome and with thiazolidinedione treatment in diabetic patients

A. Cabré*, I. Lázaro, J. Girona, J.M. Manzanares, F. Marimón,
N. Plana, M. Heras, L. Masana

Research Unit on Lipids and Atherosclerosis, Faculty of Medicine and Health Sciences, IRCIS,
Department of Internal Medicine, Sant Joan University Hospital, Reus, Spain

Received 31 January 2007; received in revised form 26 April 2007; accepted 27 April 2007
Available online 5 June 2007

Abstract

Objective: To study the role of FABP4 in the plasma of type 2 diabetic (T2D) subjects with and without metabolic syndrome (MS) and the impact of thiazolidinedione (TZD) treatment.

Methods and results: FABP4 was analyzed in 274 individuals (169 T2D subjects and 105 controls). MS-T2D subjects had higher FABP4 levels than non-MS-T2D subjects and controls (53% and 76% increase, respectively, $p < 0.005$). FABP4 levels in T2D subjects were positively correlated to the number of MS elements, obesity degree, adiponectin, triglycerides, lipoperoxides, C-reactive protein, age, systolic blood pressure and diabetes duration ($p < 0.05$). Neither clinical or subclinical atherosclerosis, nor plasma levels of insulin, glucose or RBP4 were associated to FABP4. TZD-treated T2D subjects showed $> 30\%$ higher FABP4 levels ($p < 0.05$) than non-TZD-treated T2D. A subgroup study confirmed that TZD treatment prospectively increased FABP4 levels ($p < 0.05$) along with an increase of peripheral blood mononuclear cell PPAR γ activity ($p < 0.05$). Furthermore, *in vitro* studies showed that TZD treatment increased FABP4 mRNA, intracellular protein levels and extracellular secretion from human adipocytes.

Conclusions/interpretation: FABP4 plasma concentrations are increased with the early presence of MS components, as well as inflammation and oxidation markers in T2D subjects. TZD increases FABP4 plasma concentrations, reflecting PPAR γ activation. FABP4 plasma measurements could be useful in the management of T2D subjects.

© 2007 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: FABP4; Inflammation; Lipid oxidation; Metabolic syndrome; Type 2 diabetes

1. Introduction

Metabolic syndrome (MS), defined as the clustering of several metabolic disorders, including obesity, dyslipidemia, hypertension and hyperglycemia [1], increases the cardiovascular risk of the general population and its clinical impact on diabetic subjects is currently under discussion [2]. Common metabolic pathways involved in the development of MS components are under active investigation. Several studies

have proposed a central role of adipose tissue (AT). AT is an endocrine organ which produces and secretes bioactive molecules referred to as adipokines which regulate paracrine and endocrine mechanisms, predominantly the pathways of fat storage and insulin action [3]. A dysregulation in the production of these adipokines could upset metabolic homeostasis. Adipokines are delivered to the blood and some have been suggested as plasma biomarkers of MS [4].

Recent studies have described that the adipocyte fatty acid binding protein, also known as FABP4, which is highly expressed in AT, especially during its differentiation, is released into the circulation [5,6]. Although, its physiological functions in the bloodstream remain to be elucidated, FABP4 has been proposed as a plasma biomarker of obesity

* Corresponding author at: Unitat de Recerca de Lípids i Arteriosclerosi, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, C.Sant Llorenç 21, 43201 Reus, Spain. Tel.: +34 977759367; fax: +34 977759322.

E-mail address: anna.cabre@urv.cat (A. Cabré).

and MS in a prediabetic Asian population [5]. A more recent study indicates that FABP4 might be a promising independent marker of MS in a Caucasian population [6].

FABP4 belongs to the fatty acid binding protein super family, which consists of low molecular weight and tissue-specific proteins that bind and transport fatty acids through the cytoplasm [7]. *In vitro* studies in adipocytes show that FABP4 mRNA is regulated by fatty acids, PPAR γ and insulin [8–10]. Traditionally, FABP4 has been considered a major cytoplasmic protein of differentiated adipocytes and its function has been correlated to glucose and lipid metabolism [11,12]. However, recent studies indicate that PPAR γ agonists such as thiazolidinediones (TZD) increase FABP4 in human adipocytes and monocytes [9,13]. Oxidized LDL in macrophages also induces FABP4 and its expression is linked to foam cell formation [14–16]. Macrophages and adipocytes share some biological mechanisms during intracellular fat accumulation. The role of FABP4 in macrophages is unknown although it might be involved in cholesterol transport and storage and in the inflammatory response [12]. Indeed, recent studies have shown that mice containing a disrupted FABP4 gene exhibit a phenotype, which protects from insulin resistance, hyperglycemia and atherosclerosis [11,17]. This protection is due to the ablation of FABP4 expression in macrophages and independent from its expression in adipocytes, and also independent of its role in glucose and lipid metabolism [17].

Hence, FABP4 is a promising key link between different metabolic pathways of adiposity and inflammation, which are both altered in MS. This highlights the relevance of elucidating the clinical significance of FABP4.

The aim of the present work was to study the clinical correlation between circulating levels of FABP4 with the presence of MS components, inflammation markers, lipid peroxidation and cardiovascular disease in type 2 diabetic (T2D) subjects. We also investigated the effect of TZD on plasma FABP4 levels and also in human adipocytes *in vitro*.

2. Subjects and methods

2.1. Clinical study

We studied 274 individuals: 169 non-smoking, T2D subjects and 105 non-diabetics and non-MS controls (36–79 years old). The T2D patients were diagnosed in accordance with criteria from the American Diabetes Association [18] and were recruited in the *Hospital Universitari Sant Joan de Reus*. The control group was randomly selected among those individuals with neither diabetes nor MS, representing the same age range, from a general population sample collection obtained from the same geographical area. Anamnesis, clinical examination, including anthropometrics, blood pressure and retinal examination were carried out. The presence of arteriosclerosis was assessed by clinical history of coronary heart disease, stroke or peripheral vascular disease.

EKG, carotid and femoral Eco-Doppler as well as ankle-brachial index (ABI) were measured. Subjects diagnosed with type 1 diabetes mellitus, secondary diabetes mellitus, morbid obesity (BMI > 40 kg/m²), familial hypercholesterolemia, diabetic retinopathy and/or nephropathy, malignancy, liver disorder, acute or chronic inflammation and smokers were all excluded from the study. The ethical committee of the hospital approved the study. Written informed consent was obtained from all subjects. We distributed the population according to the presence of components of MS, which was defined by the association to diabetes with at least two of the following factors: BMI \geq 30 kg/m²; systolic blood pressure > 130 mmHg; diastolic blood pressure > 85 mmHg or pharmacological treatment; triglycerides > 1.69 mmol/l; HDL < 1.03 mmol/l (men) or < 1.29 mmol/l (women) or pharmacological treatment.

Because FABP4 showed a strong positive association with the use of TZDs, we prospectively studied the effect of pioglitazone on FABP4 plasma levels in a subgroup of six (five men and one woman) T2D subjects. Patients were similar to the general diabetic group in age, diabetes duration, and other clinical variables. Subjects were on oral hypoglycemic monotherapy, naïve for TZDs, and considered for pioglitazone add-on therapy because they had suboptimal glycemic control. Leukocyte nuclear PPAR γ and plasma FABP4 were measured prior to and 12 weeks after pioglitazone (30 mg/day) was started.

2.2. Analytical methods

After a 12 h overnight fasting period, 20 ml of venous blood was taken into EDTA-tubes and centrifuged immediately for 15 min at 4 °C 1500 \times g. Plasma lipids and apolipoprotein levels were measured using enzymatic and immunoturbidimetric assays adapted for the Cobas-Mira autoanalyzer (Roche, Basel, Switzerland). LDL cholesterol was calculated using the Friedewald formula [19]. HbA_{1c} was measured by high performance liquid chromatography on the Hi-auto A1c HA-8140 (Arkray KDR Corporation-Menarini Diagnostics, Florence, Italy). Glucose, insulin and high-sensitive C-reactive protein (CRP) were measured using the automatic autoanalyzer Synchron LXi 725-Synchron Access Clinical Systems (Beckman Coulter, Fullerton, California, USA) using enzymatic assays, chemiluminescent immunoassays or immunoturbidimetric assays adapted to this system.

We used a colorimetric assay OxyStat (Biomedica, Wien, Austria) for the quantitative determination of lipoperoxides in plasma in order to evaluate the lipid peroxidation state. Results are expressed in μ mol/l. The performance characteristics for this assay were <4% CV intra-assay and <6% CV inter-assay.

Plasma levels of FABP4, adiponectin and retinol-binding protein 4 (RBP4) were assessed by commercial ELISA kits (BioVendor Laboratory Medicine Inc., Brno, Czech Republic and AdipoGen Inc., Seoul, Korea). Results were calculated using the computerized data reduction of absorbance

for the standards versus the concentration using a four-parameter polynomial regression model and expressed as $\mu\text{g/l}$ (for FABP4 and adiponectin) and using a four-parameter logistic function and expressed as mg/l (RBP4). The performance characteristics of these assays were <5 , <7 and $<10\%$ CV intra-assay and <8 , <6 and $<11\%$ CV inter-assay for adiponectin, FABP4 and RBP4, respectively. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated following the manufacturer's protocol for BD Vacutainer CPT Cell Preparation Tubes (BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA). Nuclear proteins were extracted from PBMCs as described previously [20]. PPAR γ activity was assessed using the TransAM PPAR γ Transcription factor Assay kit (Active Motif, Carlsbad, California, USA) according to the manufacturer's instructions. This test is based on a modification of the traditional ELISA principle. Briefly, nuclear activated PPAR γ is captured by a double-stranded oligonucleotide probe containing a consensus PPRE sequence bound in microwell plates. Thus, only the activated PPAR γ form in each protein extract sample is detected. Optical densities obtained at $\lambda = 450\text{ nm}$ for each individual were expressed as a comparison between the two samples: before and after 12 weeks of pioglitazone treatment.

2.3. Cell culture study

Human preadipocytes (Advancell, Barcelona, Spain) were maintained in culture with DMEM/Ham's F-12 medium (Gibco, Invitrogen Ltd., Paisley, UK) containing 10% fetal bovine serum, penicillin/streptomycin 1%, and glutamine 1% (Gibco). Two days post-confluence, adipocyte differentiation was initiated by addition of isobutylmethylxanthine 0.5 mmol/l , insulin 5 mg/l , dexamethasone 1 $\mu\text{mol/l}$, biotin 33 $\mu\text{mol/l}$ and pantothenate 17 $\mu\text{mol/l}$ (Sigma–Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) for 72 h. After initial adipocyte differentiation, cells were given fresh medium containing fetal bovine serum 3%, biotin 33 $\mu\text{mol/l}$, pantothenate 17 $\mu\text{mol/l}$, insulin 10 mg/l and TZD (rosiglitazone 0.1 $\mu\text{mol/l}$; Glaxo-SmithKline, UK) or vehicle alone (DMSO; Sigma–Aldrich) once daily for up to 6 days. Total cellular RNA, cell lysates and culture media were obtained from cultured adipocytes in order to measure FABP4 mRNA, intracellular and extracellular FABP4 protein levels. Total cellular RNA was obtained from cells using the ABI PRISM 6100 Nucleic Acid Prep-Station (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) following the manufacturer's protocol. Cell lysates were obtained from cells using cell lysis buffer (Takara, Kyoto, Japan).

2.4. Adipocyte FABP4 mRNA and protein analysis

Detection of FABP4 mRNA levels by real-time RT-PCR was performed using TaqMan primers and probes for human FABP4 and GAPDH obtained from validated and pre-developed assays for the ABI PRISM 5700 (Applied Biosystems). GAPDH mRNA levels were used to normalize

the obtained results in each sample. Because of amplification efficiencies of FABP4 and GAPDH were equal, results were expressed as $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ according to manufacturer instructions [21]. FABP4 protein concentrations in cell lysates and culture media were quantified by ELISA as described above.

2.5. Statistical analysis

Analysis was performed using SPSS (version 13.0, SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). All data are presented as the mean \pm S.D. unless otherwise stated. A comparison of variables between groups of the cross-sectional study was performed using one-way analysis of variance (ANOVA). Category distributions were compared between groups using the χ^2 -test. A binary logistic regression model was used to identify the predictive role of FABP4 for the presence of MS. This model included age, diabetes duration in years, diabetes control expressed as $\text{HbA}_{1\text{c}} \geq$ or $<7\%$, TZD treatment and gender-adjusted tertiles of FABP4, adiponectin and insulin as independent variables. Adjusted odds ratios (OR) and their 95% confidence intervals (CI) were obtained. Spearman correlation coefficients between FABP4 and other variables were determined using a bivariate correlation test. The nonparametric Wilcoxon matched pairs test was used to compare mean values for each individual in the prospective study. In all cases, a p -value of less than 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Clinical characteristics of subjects

Clinical data of the cross-sectional study are given in Table 1. Subjects were stratified according to the presence or absence of T2D and MS. Among the subjects with T2D, those with MS were more obese, had higher triglyceride levels and lower levels of total cholesterol, LDL-cholesterol and HDL-cholesterol ($p < 0.05$). We found no difference in the HOMA index, fasting glucose, insulin and $\text{HbA}_{1\text{c}}$ levels, diabetes control duration, arteriosclerosis presence or pharmacological treatment.

3.2. Metabolic syndrome was associated with increased circulating FABP4 levels

FABP4 plasma concentrations were strikingly higher in T2D subjects with MS compared to T2D subjects without MS (53%) and the general population group (76%), (41.32 ± 23.15 versus 26.97 ± 14.02 and 23.40 ± 12.23 $\mu\text{g/l}$, respectively, $p < 0.001$), after adjustment for age and gender. These differences were observed both in men and women with MS compared to their respective groups of T2D subjects without MS (30.27 ± 19.43 versus 20.62 ± 7.27 $\mu\text{g/l}$, $p = 0.021$ and 49.53 ± 22.37 versus 36.34 ± 16.36 $\mu\text{g/l}$, $p = 0.024$, respectively), and to their respective groups of

Table 1
 Clinical characteristics of the study group (n = 274)

	nonT2D-nonMS	T2D-nonMS	T2D-MS
N (% women)	105(52)	47(40)	122(57)#
Age (years)	60 ± 9	61 ± 10	64 ± 9
BMI (kg/m ²)	29.0 ± 4.4	27.2 ± 3.1*	31.4 ± 4.1##
Systolic blood pressure (mmHg)	138 ± 19	136 ± 14	142 ± 20
Diastolic blood pressure (mmHg)	83 ± 14	78 ± 10*	80 ± 11
Diabetes duration (years)	–	13 ± 7	15 ± 8
Glucose (mmol/l)	5.1 ± 0.8	9.4 ± 3.6**	9.6 ± 2.7
Insulin (pmol/l)	–	62.4 ± 82.6	79.7 ± 88.6
HOMA index	–	3.3 ± 4.1	4.7 ± 4.8
HbA _{1c} (%)	–	7.0 ± 1.3	7.0 ± 1.1
Triglycerides (mmol/l)	1.28 ± 0.73	1.25 ± 0.47	1.96 ± 1.09##
Cholesterol (mmol/l)	5.72 ± 0.82	4.93 ± 0.71**	4.61 ± 0.77#
LDL-cholesterol (mmol/l)	3.63 ± 0.79	3.04 ± 0.69**	2.72 ± 0.69#
HDL-cholesterol (mmol/l)	1.52 ± 0.37	1.32 ± 0.25**	1.01 ± 0.25##
CHD, n (%)	–	5(11)	21(17)
Cerebral vascular disease, n (%)	–	1(2)	8(7)
Peripheral vascular disease, n (%)	–	7(15)	21(17)
Atherosclerosis, n (%)	–	16(34)	57(47)
Statin treatment, n (%)	–	19(40)	69(57)
Fibrate treatment, n (%)	–	3(6)	14(11)
Biguanide treatment, n (%)	–	27(57)	62(51)
Sulphonylurea treatment, n (%)	–	20(43)	47(39)
TZD treatment, n (%)	–	14(30)	26(21)

Data are reported as mean ± S.D. Group comparisons by one-way ANOVA or χ^2 -test for continuous and categorical variables, respectively. (*) $p < 0.05$ and (**) $p < 0.005$ for T2D-nonMS vs. nonT2D-nonMS; (#) $p < 0.05$ and (##) $p < 0.005$ for T2D-MS versus T2D-nonMS. nonT2D-nonMS, general population subjects without type 2 diabetes and metabolic syndrome; T2D-nonMS, type 2 diabetic subjects without metabolic syndrome; T2D-MS, type 2 diabetic subjects with metabolic syndrome.

subjects with neither diabetes nor MS ($p < 0.001$ in both cases), after adjustment for age (Fig. 1). We observed that FABP4 levels were almost two-fold higher in women compared to men independent of their age and their clinical status ($p < 0.001$). Comparing diabetic subjects to non-diabetic subjects, FABP4 levels were only increased in men (20.62 ± 7.27 versus $16.00 \pm 6.66 \mu\text{g/l}$, $p = 0.006$), after adjustment for age (Fig. 1). To further explore the relationship between FABP4 and MS components, we stratified the mean concentrations of FABP4 by the number of components of the MS as defined in the methods section and by the quartiles of BMI. Results show that FABP4 concentrations increased with the number of MS components (Fig. 2A) in both T2D subjects ($p < 0.001$) and in the general population ($p < 0.001$). FABP4 concentrations also increased across BMI quartiles in both T2D subjects ($p < 0.001$) and in the general population ($p = 0.001$) (Fig. 2B). These results were consistent for both genders.

A binary logistic regression model, including age, diabetes duration, diabetes control, TZD treatment and gender-adjusted tertiles of FABP4, adiponectin and insulin as independent variables, revealed that FABP4 concentrations in the highest tertile were associated with adjusted OR of 3.45 (1.13–10.53, $p = 0.030$) and 7.12 (2.16–23.41, $p = 0.001$) of having metabolic syndrome compared with the middle and the lowest tertile, respectively.

FABP4 levels were positively correlated with BMI, adiponectin levels, triglycerides, lipoperoxides and CRP levels, age, systolic blood pressure and diabetes duration ($p < 0.05$). On the other hand, FABP4 levels were inversely

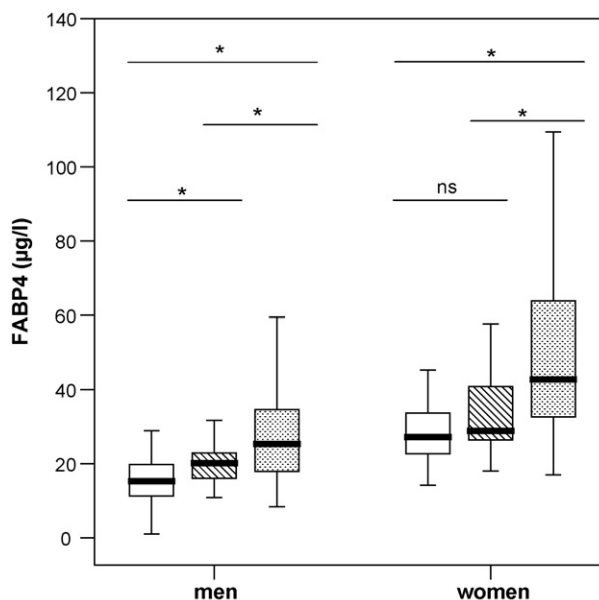


Fig. 1. Circulating FABP4 concentrations in general population and type 2 diabetic men and women. Data are presented as a box-and-whisker plot. Group comparisons were analyzed by one-way ANOVA. White boxes = general population subjects; striped boxes = type 2 diabetic subjects without metabolic syndrome; dotted boxes = type 2 diabetic subjects with metabolic syndrome.

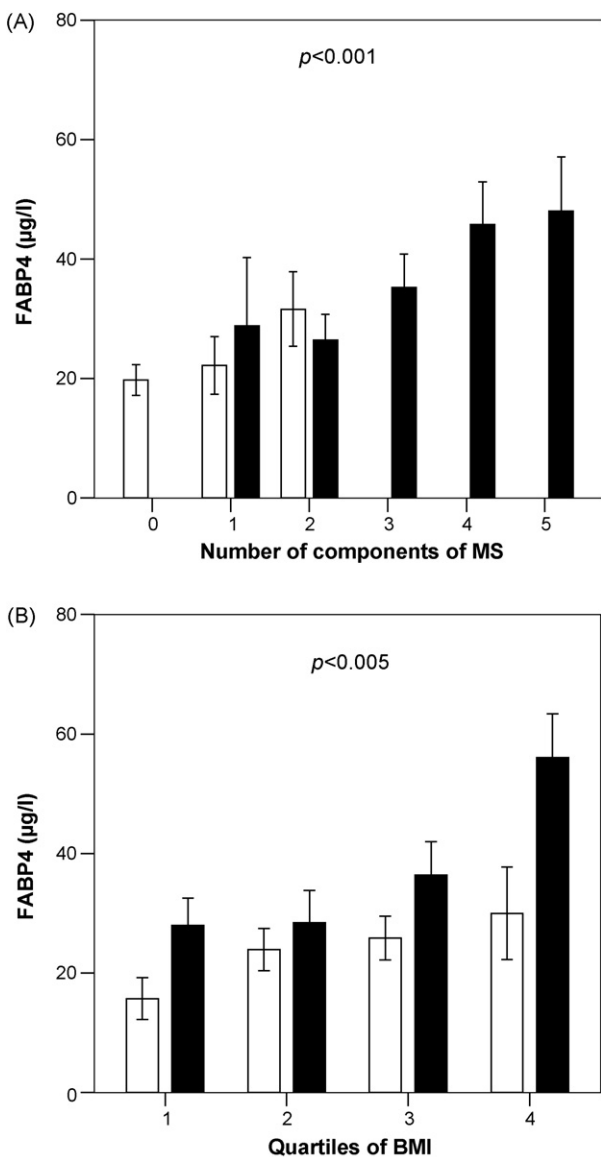


Fig. 2. Circulating FABP4 concentrations stratified by the number of components of MS (A) and the quartiles of BMI (B). Data are means \pm SEM. Group comparisons by one-way ANOVA. Overall p -value < 0.001 for general population and for type 2 diabetic subjects in (A); overall p -value = 0.001 for general population and $p < 0.001$ for type 2 diabetic subjects in (B). White bars = general population subjects; black bars = type 2 diabetic subjects. Components of MS: diabetes, BMI ≥ 30 kg/m²; systolic blood pressure > 130 mmHg; diastolic blood pressure > 85 mmHg or pharmacological treatment; triglycerides > 1.69 mmol/l; HDL < 1.03 mmol/l (men) or < 1.29 mmol/l (women) or pharmacological treatment.

correlated with height and hematocrit, ($p < 0.001$). No correlation was observed between FABP4 and fasting basal insulin, glucose and RBP4 levels and HOMA index (Table 2).

3.3. Circulating FABP4 was not associated with clinical or subclinical atherosclerosis in type 2 diabetic subjects

FABP4 plasma concentrations showed no statistical differences between the groups of T2D subjects with and

Table 2

Variable	Rho de Spearman	p
Age (years)	0.204	0.008
Height (m)	-0.489	< 0.001
BMI (kg/m ²)	0.485	< 0.001
Systolic blood pressure (mmHg)	0.194	0.013
Diastolic blood pressure (mmHg)	-0.076	0.338
Diabetes duration (years)	0.162	0.037
Glucose (mmol/l)	0.014	0.854
Insulin (pmol/l)	0.105	0.176
HOMA-IR	0.088	0.256
HbA _{1c} (%)	0.147	0.057
Triglycerides (mmol/l)	0.252	0.001
Total Cholesterol (mmol/l)	0.246	0.001
LDL-Cholesterol (mmol/l)	0.118	0.128
HDL-Cholesterol (mmol/l)	0.026	0.741
Lipoperoxides (µmol/l)	0.249	0.001
Adiponectin (µg/l)	0.367	< 0.001
RBP4 (mg/l)	-0.028	0.717
CRP (mg/l)	0.242	0.002
Hematocrit (%)	-0.424	< 0.001

Spearman correlation coefficients were calculated by a bivariate correlation test.

without atherosclerosis, in both men (26.76 ± 15.48 versus 27.06 ± 18.65 µg/l, $p = 0.938$) and women (46.91 ± 20.93 versus 45.30 ± 21.37 µg/l, $p = 0.743$). Furthermore, no association was found between FABP4 and individual components of atherosclerosis such as the ABI, carotid ultrasound survey, or clinical manifestations of cerebral, coronary or peripheral artery disease.

3.4. Thiazolidinedione treatment increased circulating FABP4 levels in type 2 diabetic subjects

Diabetic subjects were undergoing several pharmacological treatments including lipid lowering drugs such as statins and fibrates, and oral antidiabetic agents such as biguanides, sulphonylureas and TZDs. Neither statin treatment nor other lipid lowering drugs, nor sulphonylureas, nor metformin treatment yielded changes in FABP4 levels (data not shown). However, TZD-treated subjects (40 T2D subjects were on TZDs and 95% received rosiglitazone) had significantly increased levels of FABP4 (45.43 ± 23.15 versus 34.79 ± 20.94 µg/l, $p = 0.007$) even after adjustment for gender, age, BMI, metformin and sulphonylurea treatment ($p < 0.001$). This difference was stronger among those subjects with MS (52.19 ± 22.13 versus 38.13 ± 22.64 µg/l, $p = 0.006$) and remained significant after adjustment for gender, age, BMI, metformin and sulphonylurea treatment ($p = 0.005$).

In the prospective study, pioglitazone treatment resulted in a significant increase of plasma FABP4 levels (36.43 ± 25.46 versus 25.04 ± 18.58 µg/l, $p = 0.028$) (Fig. 3A). In parallel a significant increase of PPAR γ activity in PBMCs isolated from these subjects ($p = 0.028$) was observed (Fig. 3B).

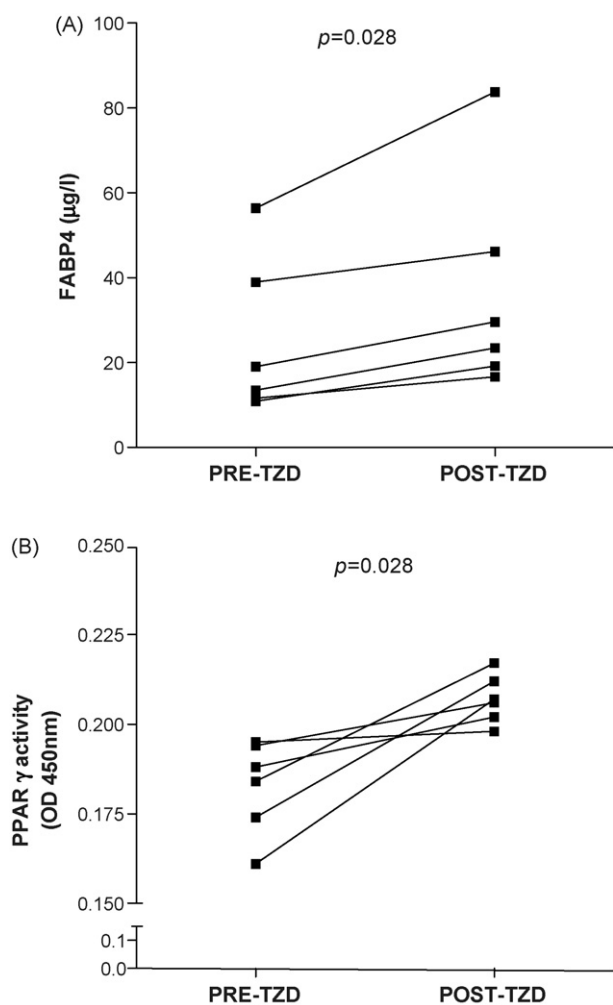


Fig. 3. Changes in circulating FABP4 concentrations (A), and PPAR γ activity (B), after thiazolidinedione treatment in type 2 diabetic subjects. Levels for each individual before and after thiazolidinedione treatment were compared by a non parametric Wilcoxon matched pairs test. PRE-TZD, before thiazolidinedione treatment; POST-TZD, after twelve weeks of thiazolidinedione treatment.

3.5. Thiazolidinedione treatment increased FABP4 mRNA and protein levels in adipocytes

Fig. 4A shows that FABP4 mRNA levels were extremely increased (more than twothousand-fold increase) by the effect of TZD in cultured adipocytes. In parallel, a 29-fold increase in intracellular FABP4 protein levels was observed in lysates of adipocytes exposed to TZD compared to those treated with vehicle alone (Fig. 4B). FABP4 secretion from adipocytes was close to 100-fold increase by TZD compared to vehicle alone (Fig. 4C).

4. Discussion

In this paper we report for the first time that FABP4 plasma concentrations are strikingly elevated in T2D sub-

jects with MS in comparison to those without MS and to non-T2D, non-MS subjects. This observation was maintained both in men and women when the results were analyzed independently. FABP4 was higher in women regardless of the group analyzed. This difference has been already observed by other authors [5,6,22]. FABP4 was previously postulated as a plasma biomarker of MS in non-T2D subjects and also as a marker of predisposition to this clinical situation [5,6]. Beyond this data, we have observed that plasma FABP4 is also elevated in T2D subjects with MS. This observation is of interest because there is an important debate among clinicians about the significance of MS in T2D subjects, some even denying the existence of such an association as a differential clinical manifestation [2]. The fact that some molecules, such as FABP4, are increased in AT and plasma in the presence of MS in T2D subjects suggests that this group of individuals has additional metabolic alterations associated with diabetes. Diabetes, itself, led to a moderate increase of FABP4 which was only observed in men. In our study, FABP4 plasma levels were associated with obesity, but also increased with the number of other MS components, and were correlated with triglycerides, markers of oxidation and inflammation, and systolic blood pressure. These results suggest that FABP4 might be involved in the pathogenesis of MS, and it might be considered an early marker of additional metabolic disturbances in this clinical setting.

How FABP4 is released from cells to plasma and its physiological functions in the bloodstream remain to be elucidated. Recent studies demonstrated that FABP4, traditionally thought as an adipocyte cytoplasmic protein, is released into circulation [6,7] although in substantially lower levels than other major adipokines. Macrophages also express FABP4 during lipid accumulation [12,16]; moreover, obesity is characterized by macrophage infiltration and accumulation in AT [23]. The main source of plasma FABP4 might be the adipocyte since it expresses FABP4 at high levels, although the inflammatory cells might also contribute to circulating FABP4 levels.

We detected a strong association of FABP4 with triglycerides, which is not surprising since FABP4 has a predominant role in fatty-acid intracellular transport and is probably linked to the storage and movement of fatty-acids and triglyceride-rich lipoproteins (TRL).

Therefore, FABP4 seems to not only be indicative of adiposity but a complex and dangerous clinical clustering of MS, TRL accumulation, inflammation and lipid oxidation.

Previous studies in animals have demonstrated that FABP4 is involved in insulin signalling [10,24]. FABP4 deficient mice present a profoundly reduced insulin response and might be protected from the development of obesity-induced diabetes [25]. Xu et al. reported that circulating FABP4 levels were positively correlated to the HOMA index in prediabetics [5]. Interesting enough, in our T2D population, FABP4 levels were correlated neither with fasting basal insulin or glucose levels nor HOMA index. Remarkably, FABP4 was not correlated to RBP4 plasma concentrations, recently associated

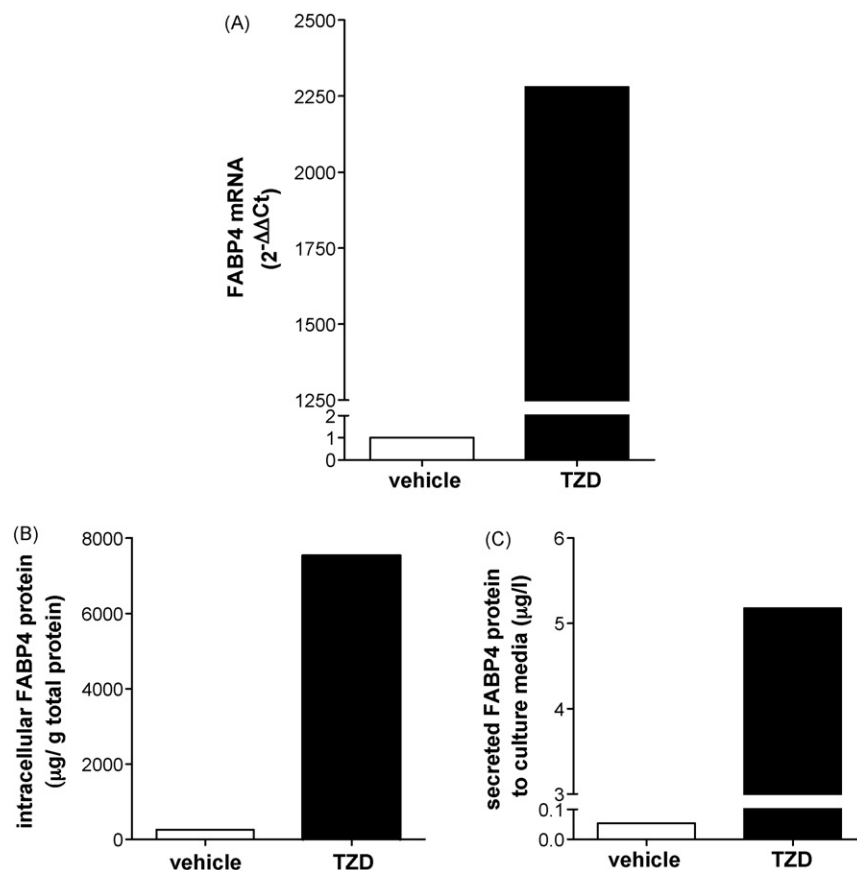


Fig. 4. Effect of thiazolidinedione on FABP4 mRNA and protein in human adipocytes. FABP4 mRNA was analyzed by RT-PCR (A); Intracellular FABP4 protein (B) and secreted FABP4 protein to culture media (C) were analyzed by ELISA (C). TZD, thiazolidinedione; AU, arbitrary units.

to MS and insulin resistance [26,27], suggesting that FABP4 plasma levels are not associated with insulin resistance markers in T2D subjects. Although plasma glucose and insulin are not good markers of insulin resistance, especially in diabetic subjects, our hypothesis is that molecules derived from AT like FABP4 will induce metabolic effects independently of those associated to insulin resistance. FABP4 and other molecules could induce metabolic manifestations of MS independently of insulin resistance, reinforcing the fact that MS in diabetic patients is something else than just a cluster of clinical manifestations but a more complex pathogenic process.

Surprisingly, circulating FABP4 levels were positively correlated with adiponectin plasma concentration in contrast to previous studies [5]. Recent reports have shown that adiponectin clinical correlations depend on the degree of adiposity [28]. Differences in the adiposity between populations could, in part, explain this discrepancy.

Animal studies show that FABP4 deficiency in Apolipoprotein E knock-out mice produces dramatic reductions in atheromatous lesions suggesting an important role of FABP4 in atherosclerosis development [11,17]. Moreover, the carriers of a genetic variant at the FABP4 locus (T-87C FABP4 polymorphism) exhibited reduced triglyceride levels, and significantly reduced risks for developing either

diabetes or cardiovascular disease [29]. Our study provides evidence that circulating FABP4 levels do not discriminate between T2D subjects with and without clinical or subclinical atherosclerosis. We have not analyzed the impact of the above genetic variation due to the low prevalence of the mutation; however, in our hands FABP4 was not associated with atherosclerosis in T2D subjects.

An interesting observation of our study was that TZD treatment was associated with higher plasma concentrations of FABP4. This effect was not observed with the use of other antidiabetic drugs. FABP4 expression is regulated by PPAR γ through the PPRE element present in the FABP4 gene promoter [30]. *In vitro* studies have demonstrated that treatment with TZDs, PPAR γ agonists, increases FABP4 expression in human macrophages and adipocytes *in vitro* [9,13]. However, no clinical data are available in relation to TZD effects on circulating FABP4 levels. Our results show that FABP4 circulating levels are higher in T2D subjects receiving TZD treatment. To further corroborate this observation, we prospectively studied the effect of pioglitazone treatment in a small group and observed that it was clearly associated with an increase in plasma FABP4 levels in all cases as well as with an increase of intra-nuclear PPAR γ in peripheral leukocytes, which suggests systemic PPAR γ activation. The clinical relevance of this fact is dif-

ficult to interpret. TZDs are drugs used to reverse insulin resistance but conversely, through animal research, we know that FABP4, which increases with TZDs [31], seems to be associated to insulin sensitivity impairment [25]. This paradox could be explained by the fact that TZD, through PPAR γ activation, induces adipocyte differentiation and intracellular fat accumulation. Both circumstances are associated with an increase of FABP4 intracellular expression [13]. We also communicate for the first time, that TZD induced human adipocyte differentiation *in vitro* is associated with a striking increase of extracellular FABP4 secretion. We think that these experiments strongly suggest that PPAR γ agonists will increase FABP4 plasma concentration by inducing its genetic activation in humans.

This new observation brings into question the physiological role of FABP4 in this clinical setting. These results are controversial in regard to other data that show high FABP4 plasma concentration in MS or knock-out animals resistant to obesity and insulin resistance. It was suggested that blocking FABP4 activity might constitute a powerful therapeutic approach to ameliorate insulin resistance [25]. We communicate that FABP4 concentration is increased by drugs that are associated with insulin metabolism improvement, such as TZDs.

We speculate that conditions such as obesity, MS or diabetes; where fatty-acid mobilization is high, FABP4 concentration can increase in order to ameliorate a relative deficiency in metabolism.

We have demonstrated for the first time that FABP4 plasma concentrations increase in T2D subjects with additional components of MS. These concentrations are associated with TRL, inflammation and lipid oxidation. FABP4 plasma concentrations are elevated in T2D subjects treated with TZDs due to PPAR γ activation. Although more studies are needed to determine the role of FABP4 in this clinical setting, we suggest the use of FABP4 plasma concentrations as early markers for additional metabolic dysregulation in T2D subjects.

Acknowledgments

This work was supported in part by grants from the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS 01/0398, FIS PI02/1051, FIS PI05/1954 and Red de Centros RCMN (C03/08)) Madrid, Spain. Iolanda Lázaro is a recipient of a predoctoral fellowship (*DURSI-Generalitat de Catalunya* and the European Social Funding (2005FIC 00463)).

References

- [1] Singh B, Mallika V, Goswami B. Metabolic syndrome: diagnosis, potential markers and management—an update. *Clin Chim Acta* 2007;380:4–12.
- [2] Kahn R, Buse J, Ferrannini E, Stern M. The metabolic syndrome: time for a critical appraisal: joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* 2005;28:2289–304.

- [3] Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2548–56.
- [4] Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 2004;92:347–55.
- [5] Xu A, Wang Y, Xu JY, et al. Adipocyte fatty acid-binding protein is a plasma biomarker closely associated with obesity and metabolic syndrome. *Clin Chem* 2006;52:405–13.
- [6] Stejskal D, Karpisek M. Adipocyte fatty acid binding protein in a Caucasian population: a new marker of metabolic syndrome? *Eur J Clin Invest* 2006;36:621–5.
- [7] Boord JB, Fazio S, Linton MF. Cytoplasmic fatty acid-binding proteins: emerging roles in metabolism and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2002;13:141–7.
- [8] Distel RJ, Robinson GS, Spiegelman BM. Fatty acid regulation of gene expression. Transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J Biol Chem* 1992;267:5937–41.
- [9] Pelton PD, Zhou L, Demarest KT, Burris TP. PPAR γ activation induces the expression of the adipocyte fatty acid binding protein gene in human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;261:456–8.
- [10] Melki SA, Abumrad NA. Expression of the adipocyte fatty acid-binding protein in streptozotocin-diabetes: effects of insulin deficiency and supplementation. *J Lipid Res* 1993;34:1527–34.
- [11] Boord JB, Maeda K, Makowski L, et al. Combined adipocyte-macrophage fatty acid-binding protein deficiency improves metabolism, atherosclerosis, and survival in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2004;110:1492–8.
- [12] Makowski L, Brittingham KC, Reynolds JM, Suttles J, Hotamisligil GS. The fatty acid-binding protein, aP2, coordinates macrophage cholesterol trafficking and inflammatory activity. Macrophage expression of aP2 impacts peroxisome proliferator-activated receptor gamma and I κ B kinase activities. *J Biol Chem* 2005;280:12888–95.
- [13] Perera RJ, Marcusson EG, Koo S, et al. Identification of novel PPAR γ target genes in primary human adipocytes. *Gene* 2006;369:90–9.
- [14] Fu Y, Luo N, Lopes-Virella MF. Oxidized LDL induces the expression of ALBP/aP2 mRNA and protein in human THP-1 macrophages. *J Lipid Res* 2000;41:2017–23.
- [15] Fu Y, Luo N, Lopes-Virella MF, Garvey WT. The adipocyte lipid binding protein (ALBP/aP2) gene facilitates foam cell formation in human THP-1 macrophages. *Atherosclerosis* 2002;165:259–69.
- [16] Fu Y, Luo L, Luo N, Garvey WT. Lipid metabolism mediated by adipocyte lipid binding protein (ALBP/aP2) gene expression in human THP-1 macrophages. *Atherosclerosis* 2006;188:102–11.
- [17] Makowski L, Boord JB, Maeda K, et al. Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis. *Nat Med* 2001;7:699–705.
- [18] Peters AL, Schriger DL. The new diagnostic criteria for diabetes: the impact on management of diabetes and macrovascular risk factors. *Am J Med* 1998;105:15S–9S.
- [19] Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499–502.
- [20] Ohlsson BG, Englund MC, Karlsson AL, et al. Oxidized low density lipoprotein inhibits lipopolysaccharide-induced binding of nuclear factor-kappaB to DNA and the subsequent expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta in macrophages. *J Clin Invest* 1996;98:78–89.
- [21] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 2001;25:402–8.
- [22] Xu A, Tso AW, Cheung BM, et al. Circulating adipocyte-fatty acid binding protein levels predict the development of the metabolic syndrome: a 5-year prospective study. *Circulation* 2007;115:1537–43.
- [23] Xu H, Barnes GT, Yang Q, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 2003;112:1821–30.

- [24] Scheja L, Makowski L, Uysal KT, et al. Altered insulin secretion associated with reduced lipolytic efficiency in aP2^{-/-} mice. *Diabetes* 1999;48:1987–94.
- [25] Maeda K, Cao H, Kono K, et al. Adipocyte/macrophage fatty acid binding proteins control integrated metabolic responses in obesity and diabetes. *Cell Metab* 2005;1:107–19.
- [26] Graham TE, Yang Q, Bluher M, et al. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N Engl J Med* 2006;354:2552–63.
- [27] Cho YM, Youn BS, Lee H, et al. Plasma retinol-binding protein-4 concentrations are elevated in human subjects with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2006;29:2457–61.
- [28] Kantartzis K, Rittig K, Balletshofer B, et al. The relationships of plasma adiponectin with a favorable lipid profile, decreased inflammation, and less ectopic fat accumulation depend on adiposity. *Clin Chem* 2006;52:1934–42.
- [29] Tuncman G, Erbay E, Hom X, et al. A genetic variant at the fatty acid-binding protein aP2 locus reduces the risk for hypertriglyceridemia, type 2 diabetes, and cardiovascular disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:6970–5.
- [30] Schachtrup C, Emmeler T, Bleck B, Sandqvist A, Spener F. Functional analysis of peroxisome-proliferator-responsive element motifs in genes of fatty acid-binding proteins. *Biochem J* 2004;382:239–45.
- [31] Coort SL, Coumans WA, Bonen A, et al. Divergent effects of rosiglitazone on protein-mediated fatty acid uptake in adipose and in muscle tissues of Zucker rats. *J Lipid Res* 2005;46:1295–302.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
REGULACIÓ DE FABP4 DEPENDENT DE NRF2 EN MACRÒFAGS
Iolanda Lázaro López
ISBN:978-84-693-8852-5/DL:T.1952-2010



The fatty acid binding protein-4 (FABP4) is a strong biomarker of metabolic syndrome and lipodystrophy in HIV-infected patients

Blai Coll^{a,b,*,1}, Anna Cabre^{c,1}, Carlos Alonso-Villaverde^b, Iolanda Lazaro^c,
Gerard Aragonés^a, Sandra Parra^b, Josefa Girona^c, Lluís Masana^{b,c}

^a Centre de Recerca Biomèdica, Hospital Universitari Sant Joan, Universitat Rovira i Virgili, 43201 Reus, Tarragona, Spain

^b Servei de Medicina Interna, Hospital Universitari Sant Joan, Universitat Rovira i Virgili, 43201 Reus, Tarragona, Spain

^c Unitat de Recerca Lípids i Arteriosclerosi, Universitat Rovira i Virgili, 43201 Reus, Tarragona, Spain

Received 23 May 2007; received in revised form 18 September 2007; accepted 24 September 2007

Available online 5 November 2007

Abstract

Background: The incidence of metabolic abnormalities in HIV-infected patients is increasing. Fatty acid binding protein-4 (FABP4) is an emerging biomarker for metabolic-related disturbances. We aimed to study FABP4 as a marker of metabolic syndrome (MS) or lipodystrophy (LD) in HIV patients.

Methods: FABP4 plasma concentrations were measured by enzyme-linked immunoassays in 183 HIV-infected patients, enrolled as part of a study aimed at identifying predictors of atherosclerosis. The presence of MS or LD was diagnosed according to standard clinical methods. Univariate and multivariate statistical analyses were performed.

Results: FABP4 concentration was significantly higher in those patients with either MS or LD criteria than those without any metabolic disturbance. Similarly, FABP4 concentration significantly increased with an increasing of MS features and was strongly correlated with body-mass index, triglycerides, HDL-cholesterol concentrations, insulin and blood pressure. Patients in the highest quartile of FABP4 presented a six-fold increased odds ratio for MS and a three-fold increased odds for LD, adjusted by age, sex, body-mass index and the antiretroviral therapy.

Conclusions: FABP4 is a strong plasma marker of metabolic disturbances in HIV-infected patients, and therefore, could serve to guide therapeutic intervention in this group of patients.

© 2007 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: FABP4; HIV infection; Lipodystrophy; Metabolic syndrome; Metabolic biomarkers

1. Introduction

The use of highly active antiretroviral therapy (HAART) in HIV-infected patients has been associated with insulin resistance [1], unfavorable fat distribution [2] and dyslipidemia [3]. This cluster of metabolic disturbances represents a well-known cardiovascular risk situation, the metabolic syndrome (MS) [4]. The prevalence of MS among the HIV-

infected population ranges from 17 to 41% [5,6] and several factors have been implicated, including the direct effect of the virus itself on special features of the MS [2]. Additionally, some HIV-infected patients present with lipodystrophy (LD), that essentially relies on metabolic disturbances (hypertriglyceridemia [7], insulin resistance [8] and low levels of HDL-cholesterol [9]). Therefore, LD may worsen both metabolic variables and atherosclerosis development [10] and tools for its early identification are warranted, since, most of them are prone to be modified by therapeutic strategies.

Recently, several molecules derived from adipose tissue and referred to as adipokines have been proposed to be biomarkers of MS. The adipocyte fatty acid binding protein (FABP4) is a new adipokine that functions by carrying fatty

* Corresponding author. Centre de Recerca Biomèdica, Hospital Universitari Sant Joan, Universitat Rovira i Virgili, 43201 Reus, Tarragona, Spain. Tel.: +34 977 310 300; fax: +34 977 319 984.

E-mail address: bcoll@grupsagessa.com (B. Coll).

¹ Both authors contributed equally.

acids (FA) from the cytoplasm to the nucleus, where the FA act as PPAR γ ligands [11]. FABP4 protects against obesity-related insulin resistance in mice [12], and it is also involved in inflammatory responses [13]. Recent studies have linked the plasma concentration of FABP4 with obesity and some components of the metabolic syndrome [14], and with the development of MS in diabetic patients [15].

We, therefore, aimed to study the role of plasma FABP4 as a marker of MS or LD in HIV-infected patients.

2. Patients and methods

The study was performed in a cohort of HIV-infected patients receiving medical assistance in Hospital Universitari Sant Joan, Reus, Spain. These patients were enrolled and blood samples were taken in 2002, with the aim of investigating atherosclerosis and its related factors [16]. We defined the presence of MS based on the ATPIII criteria, i.e., participants with three or more of the following criteria at recruitment were diagnosed of MS: obesity assessed by body-mass index ≥ 30 kg/m²; triglycerides ≥ 1.6 mmol/L; HDL-cholesterol < 1.04 mmol/L in men and < 1.29 mmol/L in women; blood pressure \geq or 130/85 mmHg and/or pharmacological treatment and fasting glucose ≥ 5.6 mmol/L and/or pharmacological treatment [17]. Lipodystrophy was defined as the presence of body-fat changes that could be clearly recognized by the patient and confirmed by the doctor. Body-fat changes included subcutaneous lipoatrophy (hollow cheeks, prominent superficial veins in the limbs or flattening of the buttocks) and central obesity (increased abdominal girth, breast enlargement or dorsocervical fat pad) [18]. Outside of laboratory and genetic analyses, the carotid intima-media thickness (CMT) was performed and some of these data have already been published [16]. Briefly, we used a GE Logiq 700 with an ultrasound probe of 7–10 MHz, and we identified three segments in the carotid arteries: the common carotid artery (1 cm proximal to the bifurcation), the carotid bulb (in the bifurcation), and the internal carotid artery (1 cm distal to the bifurcation). The far wall IMT images were obtained and digitalized for each participant and the image processing software AnaliSYS TM (Soft Imaging System, Münster, Germany) was applied. IMT measurements on each arterial segment were averaged and used in the statistical analyses as combined IMT.

We recorded data regarding HIV infection, such as opportunistic infections, mode of HIV transmission, CD4 cell count and HIV viral load, and a detailed recording of the antiretroviral medication. Similarly, data concerning classical cardiovascular risk factors and laboratory variables were also included. Blood pressure was determined according to standardized methods. Body-mass index was determined by weight (kg)/height (m²). Fasting plasma glucose, serum insulin and serum total cholesterol, HDL-cholesterol and triglycerides were measured using the automatic autoanalyzer Synchron LXi 725-Synchron Access

Clinical Systems (Beckman Coulter, Fullerton, California, USA) using enzymatic assays and chemiluminescent immunoassays adapted to this system. LDL-cholesterol was calculated using the Friedewald formula. HOMA insulin resistance index was calculated with the following formula: (fasting plasma glucose (mmol/L) \times fasting insulin (mIU/L))/22.5.

CD4+ and CD8+ T cells were determined using FAC scan flow cytometry (Becton Dickinson, Madrid, Spain).

FABP4 plasma concentration was measured using the human FABP4 ELISA kit (Biovendor Laboratory Medicine Inc., Brno, Czech Republic). The assay was conducted according to the manufacturer's instructions. The performance characteristics of these assays were $< 7\%$ variability intra-assay and $< 6\%$ inter-assay. Results were calculated using the computerized data reduction of absorbance for the standards versus the concentration, using a four-parameter function and expressed as $\mu\text{g/L}$.

The independent ethics committee of Hospital Sant Joan approved the study protocol.

2.1. Statistical analyses

Results are expressed as mean (S.D.) or in percentages. The Kolmogorov–Smirnov test was applied to check the normality of the variables. ANOVA was used to test the differences in continuous variables and the chi-square test for those categorical items. We defined the diagnoses of metabolic syndrome or lipodystrophy as dependent variables. We performed forward and backward stepwise multivariate analyses, in which the independent variables were: age, sex, body-mass index and time taking HAART therapy. We also included the plasma concentration of FABP4 in the model.

All *p*-values reported are two-tailed and those < 0.05 denote statistical significance. The SPSS 13.0 package was used to perform the statistical analyses.

3. Results

3.1. Clinical characteristics of participants

The main characteristics of patients enrolled are summarized in Table 1. One hundred and eighty-three HIV-infected patients were included in this study. Twelve fulfilled the criteria for MS, 32 for LD and 17 (9.3%) patients fulfilled both criteria (MS and LD), and they were significantly older than the other groups. Groups with any of the metabolic disturbances, showed significant differences in terms of lipid profile, blood pressure and insulin resistance, although these were not translated in a significant increase in the carotid intima-media thickness.

In Table 2, we summarized the different treatments prescribed. Patients with LD or with LD and MS were exposed to nucleoside reverse transcriptase inhibitors (*p* = 0.03) for

Table 1
 Characteristics of HIV-infected patients

	MS-/LD- (N=122)	MS+/LD- (N=12)	MS-/LD+ (N=32)	MS+/LD+ (N=17)	p-value
Age, years	37.9 (7.18)	40.0 (7.54)	41.0 (6.28)	43.3 (8.32)*	0.011
Sex, male (%)	86 (69.4)	12 (6.6)	15 (12.1)	14 (11.3)	0.03
BMI (kg/m ²)	22.6 (2.9)	25.4 (4.0)*	23.0 (3.2)	24.6 (2.9)	0.005
Metabolic syndrome definition					
Glucose ≥5.6 mmol/L (%)	8 (6.6)	6 (50)	1 (3.1)	12 (70.6)	<0.001
Blood pressure ≥130/85 mmHg (%)	33 (27.5)	9 (75)	8 (26.7)	14 (82.4)	<0.001
HDL-cholesterol <1.04 in men or <1.29 in women (%)	37 (30.3)	10 (83.3)	13 (40.6)	14 (82.4)	<0.001
Triglycerides >1.6 mmol/L (%)	43 (35.2)	11 (91.7)	18 (56.3)	17 (100)	<0.001
BMI ≥30 kg/m ²	2 (1.6)	2 (16.7)	1 (3.1)	1 (6.3)	0.16
Metabolic and atherosclerosis related variables					
Systolic blood pressure (mmHg)	115 (14)	125 (11)	117 (15)	141 (25)*	<0.001
Diastolic blood pressure (mmHg)	75 (11)	82 (10)	75 (8)	89 (16)*	<0.001
Total cholesterol (mmol/L)	4.87 (1.39)	5.12 (1.23)	5.21 (1.17)	5.44 (1.26)	0.31
HDL-cholesterol (mmol/L)	1.29 (0.54)	1.11 (0.36)*	0.85 (0.21)*	0.84 (0.17)*	<0.001
LDL-cholesterol (mmol/L)	2.68 (0.99)	3.01 (1.03)	3.24 (0.98)	2.99 (1.10)	0.15
Triglycerides (mmol/L)	1.88 (1.92)	3.50 (2.93)*	2.19 (1.08)	4.62 (2.76)*	<0.001
Glucose (mmol/L)	5.18 (0.58)	6.18 (0.92)*	5.10 (0.52)	6.86 (2.04)*	<0.001
Insulin (pmol/L)	62.44 (55.02)	102.38 (85.54)	75.08 (72)	139.11 (140)*	<0.001
HOMA-IR	1.16 (0.99)	1.97 (1.61)	1.38 (1.24)	2.69 (2.67)*	<0.001
FABP4 (μg/L)	17.58 (13.69)	27.75 (22.50)	24.74 (17.40)	38.99 (23.86)*	<0.001
C-reactive protein (mg/L)	4.13 (6.60)	4.55 (4.44)	4.80 (5.04)	4.16 (3.87)	0.95
CIMT (mm)	0.75 (0.18)	0.67 (0.14)	0.83 (0.21)	0.82 (0.21)	0.05

Note: Patients have been divided in four groups: (1) MS-/LD-: patients with neither metabolic syndrome nor lipodystrophy; (2) MS+/LD-: patients with metabolic syndrome but without lipodystrophy; (3) MS-/LD+: patients with clinical criteria of lipodystrophy, but not metabolic syndrome; (4) MS+/LD+: both conditions are present in this group of patients. BMI indicates body-mass index; CIMT is carotid intima-media thickness. HOMA-IR is homeostasis model assessment-estimated insulin resistance.

* $p < 0.005$ in a post hoc analyses (Bonferroni test) in comparison with the group of MS-/LD-.

a longer duration relative to those without metabolic alterations. The prescription of statins and/or fibrates was significantly higher in those groups of LD or MS+/LD+. None of the participants were receiving insulin sensitizers at the moment of being included.

We found higher rates of AIDS-related conditions in those MS or LD-affected patients than those without.

We did not find any significant correlation between FABP4 concentration and HIV-related variables. The time under each of the antiretroviral therapies, the HIV viral load and CD4 cell counts, and the time since HIV diagnoses were not associated with the FABP4 concentration.

3.2. Correlation between FABP4 and metabolic syndrome traits

Those patients with either MS or LD or with both conditions presented with higher plasma concentration of FABP4 relative to those patients without any metabolic abnormality (Table 1).

The concentration of FABP4 was significantly correlated with components of the metabolic syndrome. Body-mass index, triglyceride concentration and blood pressure were significantly and positively correlated with FABP4. Similarly, we found a positive and significant correlation

Table 2
 Treatments prescribed to HIV-infected patients

	MS-/LD- (N=122)	MS+/LD- (N=12)	MS-/LD+ (N=32)	MS+/LD+ (N=17)	p-value
Nucleoside analogue reverse transcriptase Inhibitors	112 (91.8)	10 (83.3)	32 (100)	17 (100)	0.03
Protease inhibitors	86 (70.5)	9 (75)	25 (78.1)	14 (82.4)	0.64
Non-nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors	71 (58.2)	3 (25)	18 (56.3)	8 (47.1)	0.14
Statins	1 (0.9)	–	2 (6.3)	3 (17.6)	0.01
Fibrates	7 (5.7)	2 (16.7)	3 (9.4)	7 (41.2)	<0.001

Note: Results indicate N (%). Patients have been divided in four groups: (1) MS-/LD-: patients with neither metabolic syndrome nor lipodystrophy; (2) MS+/LD-: patients with metabolic syndrome but without lipodystrophy; (3) MS-/LD+: patients with clinical criteria of lipodystrophy, but not metabolic syndrome; (4) MS+/LD+: both conditions are present in this group of patients.

Table 3
 Spearman rank correlation of metabolic syndrome traits, cardiovascular risk assessment variables and FABP4

	Age	BMI	TG	HDL	SBP	DBP	Glucose	Insulin	CRP	CIMT	FABP4
Age	1.00	-0.03	0.07	-0.16*	0.17*	0.11	0.09	0.06	-0.03	0.33†	0.02
BMI	-	1.00	0.20†	-0.18*	0.28†	0.24†	0.12	0.35†	0.10	0.05	0.40†
TG	-	-	1.00	-0.48†	0.07	0.08	0.16*	0.37†	-0.08	-0.01	0.35†
HDL	-	-	-	1.00	-0.03	0.01	-0.10	-0.30†	0.04	-0.02	-0.33†
SBP	-	-	-	-	1.00	0.71†	0.34†	0.17*	-0.006	0.14*	0.24†
DBP	-	-	-	-	-	1.00	0.27†	0.15*	-0.006	0.04	0.16*
Glucose	-	-	-	-	-	-	1.00	0.26†	-0.01	-0.04	0.008
Insulin	-	-	-	-	-	-	-	1.00	0.08	0.04	0.42†
CRP	-	-	-	-	-	-	-	-	1.00	-0.002	0.05
CIMT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.00	0.08
FABP4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.00

Note: BMI: body-mass index; TG: triglyceride; SBP: systolic blood pressure and DBP: diastolic blood pressure; CRP: C-reactive protein; CIMT: carotid intima-media thickness and FABP4: fatty acid binding protein-4.

* $p \leq 0.02$.
 † $p \leq 0.001$.

between insulin concentration and FABP4. Conversely, HDL-cholesterol concentration was inversely correlated with FABP4. We did not find significant correlations between FABP4 and fasting glucose, hs-CRP and CIMT (Table 3).

When we analyzed the distribution of FABP4 concentration according to the number of metabolic syndrome traits, we found that the FABP4 concentration progressively increased with an increasing number of MS traits (overall p -value < 0.001 , Fig. 1a). The same pattern was observed when we analyzed patients separately according to gender (Fig. 1b).

Because of the strong association between body-mass index and FABP4, we analyzed those non-obese patients separately (Fig. 1c), with similar results (overall p -value = 0.001).

We then analyzed the distribution of FABP4 plasma concentration according to the diagnoses of lipodystrophy and the presence of MS traits. Those patients without lipodystrophy (Fig. 1d) presented with a similar pattern to that observed in the overall study population ($p < 0.001$). Conversely, when we analyzed those lipodystrophy patients separately, we did not observe a statistically significant relationship between the FABP4 concentration and the presence of MS traits.

3.3. Predictors of metabolic abnormalities in HIV-infected patients

We studied the predictive role of FABP4 for the presence of MS in these patients (Table 4). FABP4 plasma

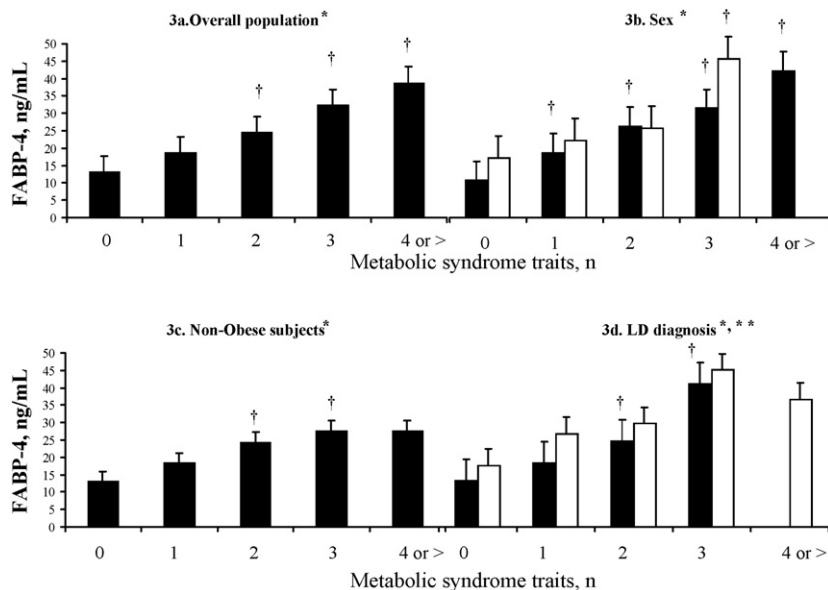


Fig. 1. Distribution of FABP4 plasma concentration according to the number of metabolic syndrome traits. (a) Overall population. (b) According to sex (filled bars represent male and blanked bars, women). (c) Non-obese subjects (BMI $< 30 \text{ kg/m}^2$). (d) According to the diagnostic of LD (filled bars denote those without lipodystrophy and blanked bars those with lipodystrophy). * Overall p -value, ANOVA, $p < 0.001$. ** $p = 0.13$ for those patients with lipodystrophy. † Post hoc Bonferroni p -value < 0.05 , when compared to 0 traits of metabolic syndrome.

Table 4
 Multivariate adjusted odds ratios for metabolic syndrome or lipodystrophy according to FABP4 top quartile

		Age, sex, BMI and ART adjusted		Age, sex and BMI adjusted in non-obese subjects*	
		Odds ratio (95% CI)	<i>p</i> -value	Odds ratio (95% CI)	<i>p</i> -value
Metabolic syndrome		<i>N</i> = 183		<i>N</i> = 169	
FABP4 (μg/L)	≤25.62	1.00		1.00	
	≥25.63	6.31 (2.67–14.92)	<0.001	4.56 (1.83–11.34)	0.001
Lipodystrophy		<i>N</i> = 154		<i>N</i> = 150	
FABP4 (μg/L)	≤25.62	1.00		1.00	
	≥25.63	3.39 (1.33–8.63)	0.01	2.84 (1.03–7.79)	0.04

Note: BMI indicates body-mass index and ART, antiretroviral therapy. Multivariate analyses were performed taking in consideration, separately, time (years) of exposure to protease inhibitors, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors and nucleoside reverse transcriptase inhibitors.

* BMI <30 kg/m².

concentration was significantly associated with a higher likelihood of MS in HIV-infected patients; those patients in the top quartile of detected FABP4 concentrations were associated with an adjusted odds ratio for metabolic syndrome of 6.31 (2.67–14.92, *p* < 0.001). As part of the multivariate analysis, we adjusted for age, sex, body-mass index, and antiretroviral therapy (by years of exposure to each of the antiretroviral agents grouped by classes) (Table 4).

These results remained unchanged when non-obese patients (BMI < 30) were analyzed separately (*N* = 169) with an odds ratio for the top quartile of 4.56 (1.83–11.34) as compared to the bottom quartile (*p* = 0.001, Table 4).

To analyze the role of FABP4 on lipodystrophy, we excluded those patients with MS (remaining *N* = 154). The results showed that patients in the top quartile of FABP4 had a 3.3-fold increased odds ratio for lipodystrophy (*p* = 0.01) compared to the bottom quartile. This relationship remained unchanged (O.R. 2.84 (1.03–7.79), *p* = 0.04) when we analyzed non-obese subjects (*N* = 150).

4. Discussion

The occurrence of atherosclerosis-related events in HIV-infected patients has increased since the generalization of highly active antiretroviral therapy [19] and this is especially relevant since it usually affects young people, whose life expectancy has been significantly increased with the antiretroviral therapies. Therefore, the control of metabolic and inflammatory cardiovascular risk factors has recently become of great concern.

Our results showed a consistent and relevant association between FABP4 plasma concentrations and the presence of either metabolic syndrome or lipodystrophy in HIV-infected patients. The higher the FABP4 plasma concentration, the greater the likelihood of experiencing metabolic disturbances.

Our results are in accordance with previous data from a non-infected population [14,15], in which the serum concentration of FABP4 was closely associated with obesity and other features of the metabolic syndrome. Several mechanisms could explain this association. FABP4 is

involved in the intracellular trafficking of lipid mediators, which have been highly involved in lipid metabolism, the inflammatory response, and the appearance of insulin resistance resulting in the development of metabolic syndrome [20,21]. In patients with MS several factors, such as insulin resistance, obesity and the chronic inflammatory state promoted by the adipose tissue, might induce the over expression of FABP4 by adipocytes and macrophages [22]. Similarly, LD-affected patients experienced a significant accumulation of fat in the visceral compartment and decreased subcutaneous fat, resulting in activation of the inflammatory response [23], which may contribute to the significant increase in circulating FABP4. Although the mechanisms implicated in FABP4 secretion from cells and its significance are not fully understood, according to our previous results, is secreted during adipocyte differentiation [15].

The role of FABP4 is not limited to lipid metabolism and intracellular fatty acid carrier. FABP4 might be involved in the inflammatory response derived by macrophages in the artery wall. In fact, knockout animals for FABP4, showed a significant decrease in the aortic atheroma lesion [24]. This influence was independent of any beneficial effects on metabolic variables, suggesting that the local actions of macrophage FABP4 are critical to the formation of atherosclerotic lesions. Recently, circulating FABP4 protein levels have been proposed as an independent determinant of carotid atherosclerosis in Chinese women [25]. We performed a measurement of carotid intima-media thickness in our patients to directly assess the presence of subclinical atherosclerosis. We did not find any significant correlation between CIMT and the plasma concentration of FABP4. This discrepancy may be explained by the small number of patients included, and further and larger studies should be performed.

We acknowledged several limitations in our study. The definition of the metabolic syndrome was based on BMI and not on waist circumference, as currently advised [4], although we used the BMI criterion similarly as it has been used in other large clinical studies [26]. In this particular group of patients, BMI could be a better indicator of metabolic syndrome because the concomitant fat redistribution phenotype

in some of the HIV participants makes the measurement of the waist circumference rather controversial. Moreover, the prevalence of metabolic syndrome in our cohort of patients did not substantially differ from other cohorts of the same area [5].

The influence of the types of antiretrovirals used in the metabolic disturbances is a focus of concern. Although, *in vitro* studies have concluded that protease inhibitors interfere with adipocyte differentiation, thereby, decreasing FABP4 expression [27], we did not identify antiretroviral drugs as either being correlated with FABP4 or being independent predictors of the development of either MS or LD.

The identification of new variables highly implicated in the development of the metabolic syndrome may imply a better knowledge of the defective metabolic cascade. The progressive increase in FABP4 concentrations according to the number of metabolic syndrome traits indicate that FABP4 might be considered a marker of future metabolic syndrome development. Patients with one or two of the metabolic syndrome traits and with a FABP4 concentration in the top quartile should be encouraged to receive therapeutic interventions.

Little is known about drug specific FABP4 modulation. Atorvastatin is able to significantly reduce the expression of FABP4 in macrophages treated with oxidized LDL-cholesterol [28] and also reduces FABP4 levels in serum of hyperlipidemic patients [29]. Further, rosiglitazone is widely used in patients with insulin resistance mainly due to its role as PPAR γ agonist and rats treated with rosiglitazone experienced higher uptake of fatty acids into adipocytes, which was associated with a higher concentration of FABP4 [30]. Adipocyte differentiation *in vitro* in the presence of rosiglitazone is associated with an increase of intracellular FABP4 production and FABP4 secretion to the medium [15]. Rosiglitazone and pioglitazone treatment increase FABP4 plasma levels in type 2 diabetic patients [15]. The relationship of these drugs with FABP4 and their role in treating metabolic disturbances in HIV-infected patients should be further explored.

In summary, we report for the first time that circulating FABP4 concentrations are strikingly associated with the presence of metabolic syndrome or lipodystrophy in HIV-infected patients, suggesting that FABP4 plasma levels should be confirmed in future studies as an early detector of metabolic disturbances in HIV-infected patients.

Acknowledgements

This work was financially supported by grants from the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS PI041752), RC/MN (C03/08) and ISCIII-RETIC RD06.

Blai Coll is the recipient of a career development award from the Instituto de Salud Carlos III.

References

- [1] Grinspoon SK. Metabolic syndrome and cardiovascular disease in patients with human immunodeficiency virus. *Am J Med* 2005;118(Suppl. 2):23S–8S.
- [2] Grinspoon SK, Carr A. Cardiovascular risk and body-fat abnormalities in HIV-infected adults. *N Engl J Med* 2005;352:48–62.
- [3] Umeh OC, Currier JS. Lipids, metabolic syndrome, and risk factors for future cardiovascular disease among HIV-infected patients. *Curr HIV/AIDS Rep* 2005;2:132–9.
- [4] National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the NCEP final report. *Circulation* 2002;106:3143–3421.
- [5] Jerico C, Knobel H, Montero M, et al. Metabolic syndrome among HIV-infected patients: prevalence, characteristics, and related factors. *Diabetes Care* 2005;28:132–7.
- [6] van Wijk JP, de Koning EJ, Cabezas MC, et al. Functional and structural markers of atherosclerosis in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:1117–23.
- [7] Baril L, Beucler I, Valantin MA. Low lipolytic enzyme activity in patients with severe hypertriglyceridemia on highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 2001;15:415–7.
- [8] Carr A, Samaras K, Burton S, et al. A syndrome of peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia and insulin resistance in patients receiving HIV protease inhibitors. *AIDS* 1998;12:F51–8.
- [9] Fessel WJ, Follansbee SE, Rego J. High-density lipoprotein cholesterol is low in HIV-infected patients with lipodystrophic fat expansions: implications for pathogenesis of fat redistribution. *AIDS* 2002;16:1785–9.
- [10] Coll B, Parra S, Alonso-Villaverde C, et al. HIV-infected patients with lipodystrophy have higher rates of carotid atherosclerosis: the role of monocyte chemoattractant protein-1. *Cytokine* 2006;34:51–5.
- [11] Wootan MG, Bernlohr DA, Storch J. Mechanism of fluorescent fatty acid transfer from adipocyte fatty acid binding protein to membranes. *Biochemistry* 1993;32:8622–7.
- [12] Hotamisligil GS, Johnson RS, Distel RJ, et al. Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein. *Science* 1996;274:1377–9.
- [13] Layne MD, Patel A, Chen YH, et al. Role of macrophage-expressed adipocyte fatty acid binding protein in the development of accelerated atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *FASEB J* 2001;15:2733–5.
- [14] Tuncman G, Erbay E, Hom X, et al. A genetic variant at the fatty acid-binding protein aP2 locus reduces the risk for hypertriglyceridemia, type 2 diabetes, and cardiovascular disease. *PNAS* 2006;103:6970–5.
- [15] Cabre A, Lazaro I, Girona J, et al. Fatty acid binding protein-4 is increased in metabolic syndrome and with thiazolidinedione treatment in diabetic patients. *Atherosclerosis* 2007;195:e150–8.
- [16] Alonso-Villaverde C, Coll B, Parra S, et al. Atherosclerosis in patients infected with HIV is influenced by a mutant monocyte chemoattractant protein-1 allele. *Circulation* 2004;110:2204–9.
- [17] Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* 2005;112:2735–52.
- [18] Martinez E, Mocroft A, Garcia-Viejo MA, et al. Risk of lipodystrophy in HIV-1-infected patients treated with protease inhibitors: a prospective cohort study. *Lancet* 2001;357:592–8.
- [19] The Data Collection on Adverse Events of Anti-HIV Drugs (DAD) Study Group. Combination antiretroviral therapy and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 2003;349:1993–2003.
- [20] Hertzler AV, Bernlohr DA. The mammalian fatty acid-binding protein multigene family: molecular and genetic insights into function. *Trends Endocrinol Metab* 2000;11:175–80.

- [21] Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005;365:1415–28.
- [22] Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res* 2005;46:2347–55.
- [23] Bruun JM, Lihn AS, Pedersen SB, Richelsen B. MCP-1 release is higher in visceral than subcutaneous human adipose tissue. Implication of macrophages resident in the adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;25:2282–9.
- [24] Boord JB, Maeda K, Makowski L, et al. Adipocyte fatty acid-binding protein, aP2, alters late atherosclerotic lesion formation in severe hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1686–91.
- [25] Yeung DCY, Xu A, Cheung CWS, et al. Serum adipocyte fatty acid-binding protein levels were independently associated with carotid atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:1796–802.
- [26] Treating to New Targets Investigators. Reduction of low-density lipoprotein cholesterol in patients with coronary heart disease and metabolic syndrome: analysis of the treating to New Targets Study. *Lancet* 2006;368:919–28.
- [27] Zhang B, Macnaul K, Szalkowski D, et al. Inhibition of adipocyte differentiation by HIV protease inhibitors. *J Clinical Endocrinol Metabol* 1999;84:4274–7.
- [28] Llaverias G, Noe V, Penuelas S, et al. Atorvastatin reduces CD68, FABP4, and HBP expression in oxLDL-treated human macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;318:265–74.
- [29] Karpisek M, Stejskal D, Kotolova H, et al. Treatment with atorvastatin reduces serum adipocyte-fatty acid binding protein value in patients with hyperlipidaemia. *Eur J Clin Invest* 2007;37:637–42.
- [30] Coort SLM, Coumans WA, Bonen A, et al. Divergent effects of rosiglitazone on protein-mediated fatty acid uptake in adipose and in muscle tissues of Zucker rats. *J Lipid Res* 2005;46:1295–302.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
REGULACIÓ DE FABP4 DEPENDENT DE NRF2 EN MACRÒFAGS
Iolanda Lázaro López
ISBN:978-84-693-8852-5/DL:T.1952-2010

Plasma fatty acid binding protein 4 is associated with atherogenic dyslipidemia in diabetes

Anna Cabré, Iolanda Lázaro, Josefa Girona, Josep Maria Manzanares, Francesc Marimón, Núria Plana, Mercedes Heras, and Lluís Masana¹

Research Unit on Lipids and Atherosclerosis, CIBER of Diabetes and Associated Metabolic Diseases (CIBERDEM), Faculty of Medicine and Health Sciences, Department of Internal Medicine, Saint Joan University Hospital, Reus, Spain

Abstract The aim of this study was to evaluate the impact of adipocyte fatty acid binding protein 4 (FABP4) on the lipid profile in type 2 diabetic subjects. Plasma levels of FABP4 and adiponectin and an extensive lipid profile were analyzed in 169 type 2 diabetic subjects and 105 controls. Type 2 diabetic subjects were categorized according to the presence of atherogenic dyslipidemia. Univariate statistical analyses, partial correlation tests, and binary logistic regression models were applied. In type 2 diabetic subjects, FABP4 was positively correlated with plasma triglycerides ($P = 0.007$), apolipoprotein C-III (apoC-III) ($P = 0.009$), and all the components of triglyceride-rich lipoproteins, including VLDL triglycerides ($P = 0.002$), VLDL-cholesterol ($P = 0.001$), and VLDL apoB ($P = 0.001$). FABP4 was inversely correlated with apoA-I ($P = 0.038$), HDL-cholesterol ($P = 0.002$), and HDL apoA-I ($P = 0.010$) in type 2 diabetic subjects. These correlations are not significantly affected by age, gender, body mass index, adiponectin, insulin, or any pharmacological treatment. The associations are even stronger when the FABP4/adiponectin ratio is considered. None of these associations were observed in controls. High FABP4 and low adiponectin levels are independent predictors of atherogenic dyslipidemia. **In conclusion, FABP4 plasma concentrations hold strong potential for development as a clinical biomarker for atherogenic dyslipidemia, independent of obesity and insulin resistance, in type 2 diabetic subjects.**—Cabré, A., I. Lázaro, J. Girona, J. M. Manzanares, F. Marimón, N. Plana, M. Heras, and L. Masana. **Plasma fatty acid binding protein 4 is associated with atherogenic dyslipidemia in diabetes.** *J. Lipid Res.* 2008. 49: 1746–1751.

Supplementary key words insulin • lipids • type 2 diabetes

The typical lipid profile for type 2 diabetic patients includes high triglycerides and low HDL-cholesterol, which

This work was supported by grants from the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS 01/0398, FIS PI02/1051, FIS PI05/1954, and CIBERDEM), Madrid, Spain. I.L. is a recipient of a predoctoral fellowship from the DURSI of the Generalitat de Catalunya and the European Social Funding (2005FIC 00303).

Manuscript received 27 February 2008 and in revised form 10 April 2008.

*Published, JLR Papers in Press, April 17, 2008.
DOI 10.1194/jlr.M800102-JLR200*

leads to small and dense LDL known as atherogenic dyslipidemia (1). It is thought that a state of insulin resistance leads to this alteration in the lipid profile (1, 2). These mechanisms seem to be influenced by both environmental factors and genetic susceptibility. Once a patient becomes insulin resistant, there is a reduction in plasma triglyceride-rich lipoprotein (TRL) clearance and an increase in FFA delivery from the adipose tissue to the plasma. This change produces a higher lipid influx into the hepatocytes and leads to VLDL overproduction associated with vascular disease (3).

Adipose tissue is an actively metabolic organ that produces a variety of factors including adipokines, which are required for endocrine and paracrine metabolic actions (4). Adipokines are associated with increased inflammation, thrombogenicity, insulin resistance, and other metabolic effects (4). The increased likelihood that obese patients will develop glucose intolerance and diabetes has been linked to several adipokines (5). Adipose fatty acid binding protein 4 (FABP4) has similarly been proposed as a biochemical mediator of insulin resistance in obese patients, and patient plasma levels are predictors of metabolic syndrome development (6–9). Knock-out mice studies suggest that FABP4 may modulate fat mass and lipolysis through its action on hormone-sensitive lipase (HSL), perilipin, and LPL, among others (10, 11). FABP4 belongs to the intracellular lipid binding protein (iLBP) family. Both iLBPs and lipocalins, such as retinol binding protein (RBP4) and lipocalin-2, which are also linked to insulin resistance, are small, extracellular proteins sharing several common molecular recognition properties. These properties include the binding of small, principally hydrophobic molecules, which makes them ideal transporters of lipid molecules (12). Because of their involvement in lipid metabolism, they may play a role in the lipid profile alterations observed in individuals with adipose tissue derangements like diabetes, metabolic syndrome, and

¹To whom correspondence should be addressed.
e-mail: luis.masana@urv.cat

obesity. Adiponectin is also secreted by the adipose tissue, where it primarily functions as a counterbalance to other adipose tissue-derived signaling molecules. The balance between the insulin-sensitizer, adiponectin, and the insulin-resistance inducer molecules may be an important homeostatic controller of metabolic status. We hypothesize that adipose tissue-derived FABP4 induces a direct insulin resistance-independent effect on lipid metabolism in diabetes and that the plasma FABP4/adiponectin balance determines the presence of atherogenic dyslipidemia in type 2 diabetic patients. This study measures the statistical relationship between plasma FABP4 and atherogenic dyslipidemia and aims to address the clinical relevance of these plasma measurements in humans with diabetes, metabolic syndrome, and/or obesity to determine the usefulness of FABP4 as a disease progression biomarker.

MATERIALS AND METHODS

Clinical study

We studied 169 nonsmoking, type 2 diabetic subjects diagnosed using the American Diabetes Association criteria (13) and 105 gender-matched, nondiabetic controls (age range 36 to 79 years). Patients were recruited at Saint Joan University Hospital, Reus. Plasma samples for control populations were obtained from a Biobanc collection and are representative of the general population from the same geographic area. In type 2 diabetic patients, anamnesis and clinical examinations including anthropometrics were performed, and blood pressure and the presence of macro- or microvascular diseases were recorded. Measurements via carotid and femoral echo-Doppler as well as ankle-brachial index (ABI) were taken. Macrovascular disease was defined as a clinical history of at least one of the following criteria: coronary heart disease, stroke, peripheral vascular disease,

≥ 1 significant arteriosclerotic plaque ($>40\%$ stenosis), or an ABI index ≤ 0.9 or ≥ 1.3 . Microvascular disease was defined in the clinical history as the presence of at least one of the following criteria: nephropathy, retinopathy, or neuropathy. Microalbuminuria was defined as albuminuria ≥ 30 mg/24 h. Atherogenic dyslipidemia was defined as triglycerides >1.69 mmol/l and either HDL <1.03 mmol/l (men) or HDL <1.29 mmol/l (women). Patients with albuminuria, type 1 diabetes mellitus, secondary diabetes mellitus, morbid obesity, body mass index (BMI) >40 kg/m², familial hypercholesterolemia, malignancy, liver disorder, or acute or chronic inflammation were excluded from this analysis. All subjects provided written informed consent for this study, which was approved by the hospital ethics committee.

Analytical methods

Lipoproteins (VLDL, IDL, LDL, and HDL) were subfractionated from EDTA-treated blood plasma by sequential preparative ultracentrifugation as described previously (14). Plasma, fraction lipids, and apolipoproteins were measured using enzymatic assays adapted for the Cobas-Mira autoanalyzer (Roche; Basel, Switzerland). In the control group, only the basic lipid profile (total cholesterol, HDL-cholesterol, total triglycerides, and Friedewald-calculated LDL-cholesterol) was available. HbA_{1c} was measured by HPLC on a Hi-auto A1c HA-8140 (Arkray KDR Corporation-Menarini Diagnostics; Florence, Italy). Glucose and insulin were measured on an automatic autoanalyzer Synchron LXi 725-Synchron Access Clinical Systems (Beckman Coulter; Fullerton, CA) using enzymatic assays or chemiluminescent immunoassays adapted to this system. Commercial ELISA kits (BioVendor Laboratory Medicine, Inc.; Brno, Czech Republic) were used to assess the plasma levels of adiponectin and FABP4 in both the type 2 diabetic group and the control group. Results are shown in "Système International" units.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the SPSS platform (version 14.0, SPSS, Inc.; Chicago, IL). All data are presented

TABLE 1. Lipid profile of the type 2 diabetes group divided into gender-adjusted quartiles based on plasma FABP4 concentrations

Variable	FABP4				P
	Quartile 1	Quartile 2	Quartile 3	Quartile 4	
n	42	42	43	42	
Plasma cholesterol (mmol/l)	4.72 ± 0.76	4.70 ± 0.84	4.63 ± 0.80	4.73 ± 0.69	ns
Plasma triglycerides (mmol/l)	1.66 ± 1.16	1.54 ± 0.87	1.66 ± 0.75	2.20 ± 1.10	0.001
Plasma apoA-I (mg/dl)	142.1 ± 21.8	139.2 ± 17.6	138.8 ± 23.3	135.2 ± 21.9	ns
Plasma apoB (mg/dl)	83.0 ± 13.5	87.4 ± 16.3	82.7 ± 18.7	85.7 ± 14.7	ns
Plasma apoC-III (mg/dl)	17.4 ± 4.8	16.5 ± 4.0	17.2 ± 3.5	20.7 ± 6.0	0.017
Plasma apoE (mg/dl)	3.8 ± 1.6	3.5 ± 0.9	3.6 ± 0.8	3.9 ± 1.0	ns
VLDL-cholesterol (mmol/l)	0.42 ± 0.50	0.37 ± 0.39	0.42 ± 0.33	0.66 ± 0.44	0.001
VLDL triglycerides (mmol/l)	0.93 ± 0.97	0.82 ± 0.68	0.92 ± 0.62	1.38 ± 0.97	0.001
VLDL apoB (mg/dl)	6.6 ± 4.4	6.1 ± 4.4	6.3 ± 3.7	10.2 ± 5.4	<0.001
IDL-cholesterol (mmol/l)	0.23 ± 0.15	0.22 ± 0.12	0.23 ± 0.09	0.27 ± 0.11	ns
IDL triglycerides (mmol/l)	0.17 ± 0.06	0.18 ± 0.07	0.18 ± 0.06	0.21 ± 0.06	ns
IDL apoB (mg/dl)	3.8 ± 2.1	4.3 ± 2.0	3.8 ± 1.8	4.6 ± 1.8	ns
LDL-cholesterol (mmol/l)	2.41 ± 0.55	2.51 ± 0.61	2.37 ± 0.57	2.24 ± 0.56	ns
LDL triglycerides (mmol/l)	0.23 ± 0.05	0.25 ± 0.07	0.23 ± 0.05	0.24 ± 0.06	ns
LDL apoB (mg/dl)	58.2 ± 12.4	63.9 ± 13.4	58.2 ± 14.2	58.1 ± 13.7	ns
HDL-cholesterol (mmol/l)	1.26 ± 0.28	1.25 ± 0.28	1.23 ± 0.30	1.15 ± 0.32	ns
HDL triglycerides (mmol/l)	0.15 ± 0.06	0.14 ± 0.04	0.14 ± 0.05	0.15 ± 0.04	ns
HDL apoA-I (mg/dl)	119.0 ± 20.4	116.5 ± 16.3	114.2 ± 22.1	110.5 ± 19.8	ns

ApoA-I, apolipoprotein AI; FABP4, fatty acid binding protein 4. Data are shown as mean ± SD. Gender-adjusted FABP4 quartiles were compared by one-way ANOVA. P values shown correspond to those variables with $P < 0.05$ adjusted for age, body mass index, plasma insulin and adiponectin concentrations, and thiazolidinedione and statin therapy from a univariate linear general model. ns, not significant.

as the mean \pm SD, except where otherwise stated. A comparison of variables between FABP4 gender-adjusted quartiles was performed using a one-way ANOVA.

Univariate linear general models were used to adjust the results of continuous variables for age, pharmacological treatment, BMI, insulin, and adiponectin levels. Category distributions were compared between groups using the Fisher test. Binary logistic regression models were used to adjust the results of the categorical variables for age, diabetes duration and control, obesity, insulin concentrations, and pharmacological treatment. FABP4, adiponectin, and insulin concentrations were categorized and grouped as high and low concentrations by using the geometric mean of each variable for men and women. Partial Pearson correlation coefficients between FABP4 and other continuous variables were determined using a partial correlation test adjusted for age, gender, BMI, insulin, adiponectin levels, and pharmacological treatment. A binary logistic regression model was used to identify the predictive roles of high gender-adjusted FABP4 or adiponectin levels for the presence of atherogenic dyslipidemia. This model includes age, diabetes duration in years, diabetes control expressed as $HbA_{1c} \geq$ or $<7\%$, the presence of obesity, and categorized and gender-adjusted levels of FABP4, adiponectin, and insulin as independent variables. The adjusted odds ratios and their 95% confidence intervals were obtained and represented as a Forest plot. In all cases, a *P* value of less than 0.05 is considered statistically significant.

RESULTS

A total of 169 type 2 diabetic subjects (80 men and 89 women) participated in this study. The control group, which included 105 nondiabetic subjects (50 men and 55 women), has been previously described (9). For the diabetic group, the mean age was 63 ± 9 years (range from 36 to 79 years). The mean BMI was 30.2 ± 4.3 kg/m² (range from 21.0 to 40.0 kg/m²), and 86 subjects were clinically obese. The mean diabetes history duration was 14 ± 8 years (range from 1 to 36 years), and the mean HbA_{1c} was $7.0 \pm 1.1\%$ (range from 4.1% to 10.4%). The mean glucose and insulin concentrations were 9.6 ± 2.9 mmol/l (range from 3.5 to 19.8 mmol/l) and 75.0 ± 87.1 pmol/l (range from 10.4 to 744.8 pmol/l), respectively. Eighty-eight subjects were on lipid-lowering drugs (78 on statins), 116 were on oral antidiabetic drugs (40 on thiazolidinediones), and 76 were on insulin treatment. In summary, 56 subjects fulfilled the criteria for atherogenic dyslipidemia and became the focus group for this analysis.

FABP4 plasma levels for men in the control group were strikingly lower than those in type 2 diabetic subjects with or without atherogenic dyslipidemia (16.00 ± 6.66 vs. 31.80 ± 19.54 and 24.10 ± 14.55 μ g/l, respectively; overall *P* < 0.001). FABP4 plasma levels for women in the control group were also lower than those in type 2 diabetic subjects with or without atherogenic dyslipidemia (30.13 ± 12.29 vs. 46.56 ± 22.03 and 47.07 ± 21.81 μ g/l, respectively; overall *P* < 0.001).

We next investigated the statistical relationship between FABP4 and atherogenic dyslipidemia in type 2 diabetics. **Table 1** shows the levels of lipids, apolipoproteins, and lipoprotein components divided by gender-adjusted quar-

tiles of FABP4 serum levels from the type 2 diabetic subjects. The differences between quartiles were significant, even after adjustment for age, BMI, adiponectin, insulin concentrations, and pharmacological treatment with thiazolidinediones and statins. Plasma FABP4 concentrations, after adjustment for age, gender, BMI, adiponectin, insulin concentrations, and pharmacological treatment (thiazolidinediones and statins), were positively correlated with triglycerides ($r = 0.229$; *P* = 0.007), VLDL triglycerides ($r = 0.266$; *P* = 0.002), VLDL cholesterol ($r = 0.286$; *P* = 0.001), VLDL apolipoprotein B (apoB) ($r = 0.287$; *P* = 0.001), and apoC-III ($r = 0.225$; *P* = 0.009). Plasma FABP4 concentrations, after adjustment for the above parameters, were also inversely correlated with apoA-I ($r = -0.178$; *P* = 0.038), HDL-cholesterol ($r = -0.267$; *P* = 0.002), and HDL apoA-I ($r = -0.220$; *P* = 0.010). None of the differences listed above were observed in lipids from the control group, and the correlations were not significantly different between plasma FABP4 and lipid levels [triglycerides (*P* =

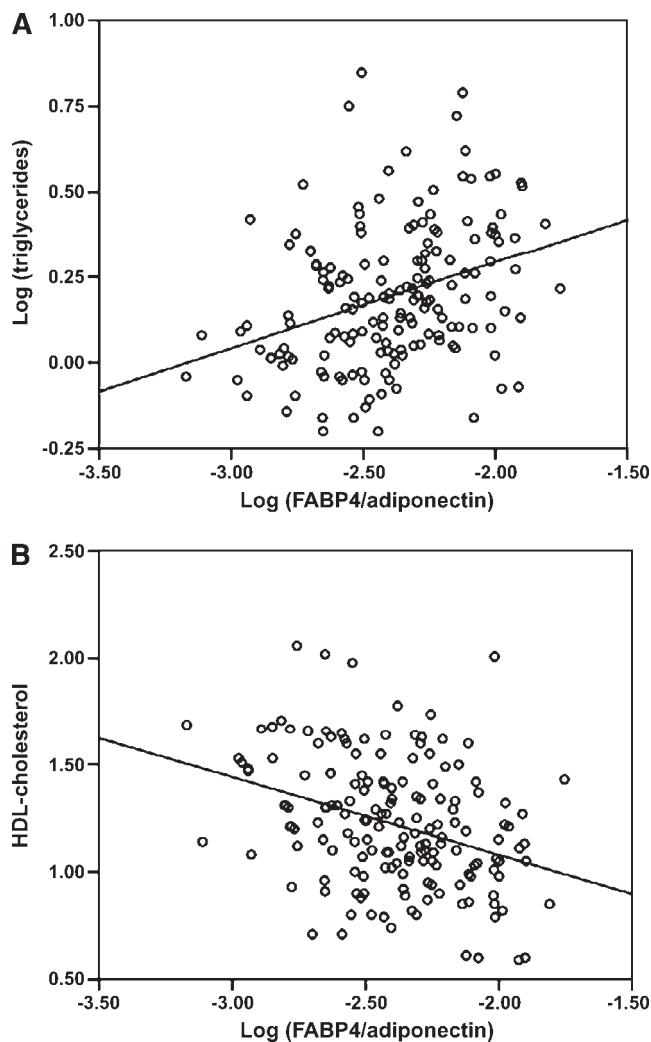


Fig. 1. Relationship of the fatty acid binding protein 4 (FABP4)/adiponectin ratio with triglycerides (A) and HDL-cholesterol (B) in type 2 diabetic subjects.

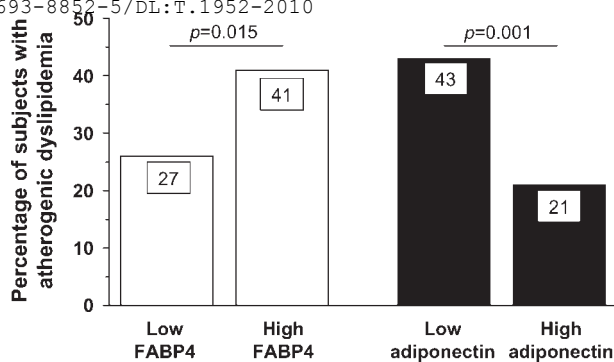


Fig. 2. Percentage of type 2 diabetic subjects with atherogenic dyslipidemia in groups with high and low gender-adjusted FABP4 or adiponectin plasma concentrations. *P* values shown for group comparisons are adjusted for age, obesity, diabetes duration and control, insulin concentrations, and thiazolidinedione and statin therapy from a binary regression model.

0.596), total cholesterol (*P* = 0.940), LDL-cholesterol (*P* = 0.714), and HDL-cholesterol (*P* = 0.329)].

The following analyses were performed only in type 2 diabetic subjects. Because adiponectin levels are a possible confounding variable, we also investigated the FABP4/adiponectin ratio to further study the effects on lipid metabolism. Correlations observed with FABP4 were stronger when the FABP4/adiponectin ratio was used for analyses (Fig. 1). Furthermore, using this ratio approach, we also found correlations to atherogenic dyslipidemia in subjects who were not obese or treated with lipid-lowering drugs. After adjustment for diabetes duration and control, age, obesity, high insulin, and pharmacological treatment, the prevalence of atherogenic dyslipidemia was higher in subjects with high gender-adjusted FABP4 (*P* = 0.015) and lower in subjects with high adiponectin concentrations (*P* = 0.001) (Fig. 2). To test the predictive value of plasma FABP4 concentrations on atherogenic dyslipidemia, we applied a logistic regression model. Independent of diabetes duration and control, age, obesity, high insulin,

high adiponectin levels, or pharmacological treatment (thiazolidinediones, statins, or fibrates), high plasma concentrations of FABP4 [$\geq 23.28 \mu\text{g/l}$ (men) and $\geq 42.43 \mu\text{g/l}$ (women)] were associated with an odds ratio of 2.72 (1.16–6.37; *P* = 0.021) for having atherogenic dyslipidemia. High adiponectin levels [$\geq 6.74 \text{ mg/l}$ (men) and $\geq 9.08 \text{ mg/l}$ (women)] predicted protection from atherogenic dyslipidemia with an odds ratio of 0.17 (0.07–0.45; *P* < 0.001) (Fig. 3). FABP4 concentrations did not correlate with insulin levels.

DISCUSSION

We have found that FABP4, which is predominantly secreted by the adipose tissue, is correlated with lipid metabolism disturbances in diabetic patients. This protein was strongly associated with hypertriglyceridemia, which leads to atherogenic dyslipidemia, a condition that is clinically characterized by high triglycerides and low HDL-cholesterol levels. It is well accepted that the main mechanism associated with atherogenic dyslipidemia is insulin resistance (1). However, other molecular indicators of disease state should be considered for this complex disease. Some adipokine expression levels are linked with obesity and insulin resistance. Our results support the hypothesis that some metabolic effects observed in type 2 diabetic patients are directly mediated by molecules secreted from the adipose tissue in parallel to the insulin resistance. The direct relationship between adiponectin and serum lipids has already been described. High levels of adiponectin reduce triglycerides and VLDL formation and increase HDL levels (15–17). Several lipocalins have been proposed as biomarkers of several diseases (18). Lipocalin-2 has recently been associated with metabolic syndrome (19). RBP4 is produced both in fat cells and in the liver and it influences insulin resistance by modulating the expression of GLUT4 in the muscle, liver, and adipose tissue of mice (20). In humans, elevated RBP4 plasma levels have been linked to renal dysfunction (21).

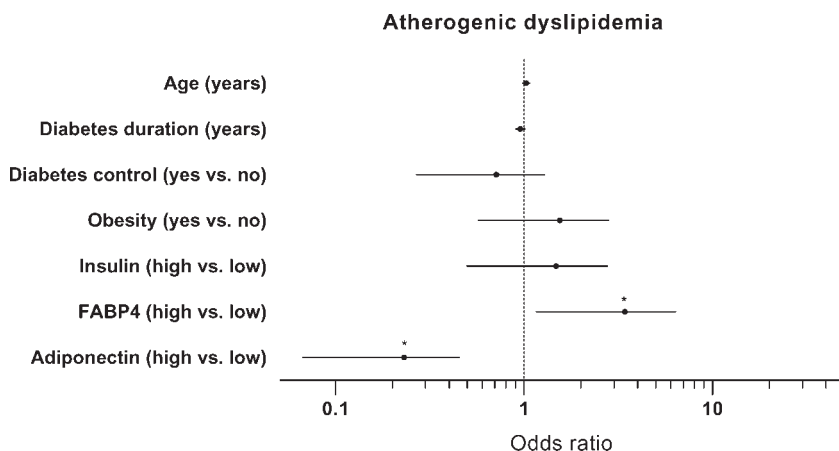


Fig. 3. Forest plot for atherogenic dyslipidemia in type 2 diabetic subjects. Horizontal lines represent the adjusted odds ratios and 95% confidence intervals obtained from a binary regression model. * *P* < 0.05.

FABP4 is expressed in adipose tissue (22) and macrophages when they become overloaded with fat (23–25). Its function is proposed to affect the transport of intracellular fatty acids (26). Elevated FABP4 plasma levels are associated with prediabetic states and obesity and they predict metabolic syndrome development (6–9). From studies in the same population, we have found that FABP4 is associated with metabolic syndrome components in type 2 diabetic subjects and that FABP4 plasma levels are increased by thiazolidinediones, which are peroxisome proliferator-activated receptor γ agonist drugs (9).

Because the association between FABP4 and lipids has potential as a predictive clinical biomarker, we have characterized the correlation between FABP4 and the complete lipid profile in diabetic patients. Our results show that high plasma FABP4 concentrations were consistently associated with hypertriglyceridemia, elevated apoC-III, and all the components of TRL, such as cholesterol, triglycerides and apoB in VLDL. Conversely, there was an inverse correlation with apoA-I and HDL-cholesterol. Although roughly 50% of subjects were being treated with statins, the correlations remained unchanged when we analyzed only those individuals who were not taking lipid-lowering drugs. Animal studies have shown that FABP4 influences lipid metabolism and that FABP4 seems to act on LPL, perilipin, and HSL to induce increases in plasma FFA concentrations, which promote hypertriglyceridemia (11). Interestingly, the observed relationships were reinforced when adiponectin concentrations were taken into account. Under these conditions, the correlations between the lipid profile and the FABP4/adiponectin ratio become stronger. Whereas lipocalins are thought to induce insulin resistance, adiponectin is the main insulin sensitizer adipokine, and the ratio between them may provide a more complete view of a patient's metabolic state. These observations are important because all of the correlations were maintained even after adjustment for BMI, insulin, and other confounding variables.

Because 46% of patients were treated with statins, any conclusion about the effect of FABP4 on LDL particles will be inaccurate; however, all of the correlations were maintained when only those patients without statin treatment were taken into consideration. Although our results demonstrate statistically significant correlations between FABP4 and lipid factors, our sample size is relatively small; therefore, additional studies using independent and larger sample groups are warranted. Regardless, FABP4 seems to modulate lipid metabolism in diabetic patients independent of its action on insulin resistance.

Our results contribute to a better understanding of the metabolic mechanisms involved in the development of atherogenic dyslipidemia in diabetic patients. We found that increased levels of FABP4 are associated with increased VLDL apoB levels. This association indicates that hypertriglyceridemia is associated with an increased number of TRL particles, which may suggest an increased synthesis. On the other hand, we observed a strong correlation between increased FABP4 and apoC-III levels. Although this may be explained by the fact that apoC-III

is transported by TRL (27), it is also possible that FABP4 inhibits LPL and thereby promotes hypertriglyceridemia and low HDL-cholesterol levels. Therefore, FABP4 might modulate both anabolic and catabolic parts of the TRL metabolism independent of insulin action. In summary, our results suggest that the classic lipid profile alterations observed in type 2 diabetic patients might be mediated not only by insulin resistance but by a balance in the adipose tissue-derived molecules as well. In addition to influencing insulin sensitivity, these adipose tissue-derived molecules, such as FABP4, may directly modulate lipid metabolism. ■

The authors would like to thank A. Ameijide for statistical help.

REFERENCES

- Taskinen, M. R. 2003. Diabetic dyslipidaemia: from basic research to clinical practice. *Diabetologia*. **46**: 733–749.
- McTernan, P. G., A. L. Harte, L. A. Anderson, A. Green, S. A. Smith, J. Holder, A. H. Barnett, M. C. Eggo, and S. Kumar. 2002. Insulin and rosiglitazone regulation of lipolysis and lipogenesis in human adipose tissue in vitro. *Diabetes*. **51**: 1493–1498.
- Adiels, M., M. R. Taskinen, C. Packard, M. J. Caslake, A. Soropaaonon, J. Westerbacka, S. Vehkavaara, A. Hakkinen, S. O. Olofsson, H. Yki-Jarvinen, et al. 2006. Overproduction of large VLDL particles is driven by increased liver fat content in man. *Diabetologia*. **49**: 755–765.
- Kershaw, E. E., and J. S. Flier. 2004. Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**: 2548–2556.
- Lau, D. C., B. Dhillon, H. Yan, P. E. Szmitko, and S. Verma. 2005. Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **288**: H2031–H2041.
- Xu, A., Y. Wang, J. Y. Xu, D. Stejskal, S. Tam, J. Zhang, N. M. Wat, W. K. Wong, and K. S. Lam. 2006. Adipocyte fatty acid-binding protein is a plasma biomarker closely associated with obesity and metabolic syndrome. *Clin. Chem.* **52**: 405–413.
- Stejskal, D., and M. Karpisek. 2006. Adipocyte fatty acid binding protein in a Caucasian population: a new marker of metabolic syndrome? *Eur. J. Clin. Invest.* **36**: 621–625.
- Xu, A., A. W. K. Tso, B. M. Y. Cheung, Y. Wang, N. M. S. Wat, C. H. Y. Fong, D. C. Y. Yeung, E. D. Janus, P. C. Sham, and K. S. L. Lam. 2007. Circulating adipocyte - fatty acid binding protein levels predict the development of the metabolic syndrome: a 5-year prospective study. *Circulation*. **115**: 1537–1543.
- Cabrè, A., I. Lázaro, J. Girona, J. M. Manzaneres, F. Marimón, N. Plana, M. Heras, and L. Masana. 2007. Fatty acid binding protein 4 is increased in metabolic syndrome and with thiazolidinedione treatment in diabetic patients. *Atherosclerosis*. **195**: e150–e158.
- Coe, N. R., M. A. Simpson, and D. A. Bernlohr. 1999. Targeted disruption of the adipocyte lipid-binding protein (aP2 protein) gene impairs fat cell lipolysis and increases cellular fatty acid levels. *J. Lipid Res.* **40**: 967–972.
- Hertzel, A. V., L. A. Smith, A. H. Berg, G. W. Cline, G. I. Shulman, P. E. Scherer, and D. A. Bernlohr. 2006. Lipid metabolism and adipokine levels in fatty acid-binding protein null and transgenic mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **290**: E814–E823.
- Flower, D. R., A. C. North, and C. E. Sansom. 2000. The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochim. Biophys. Acta*. **1482**: 9–24.
- Peters, A. L., and D. L. Schriger. 1998. The new diagnostic criteria for diabetes: the impact on management of diabetes and macrovascular risk factors. *Am. J. Med.* **105**: 15S–19S.
- Schumaker, V. N., and D. L. Puppione. 1986. Sequential flotation ultracentrifugation. *Methods Enzymol.* **128**: 155–170.
- von Eynatten, M., A. Hamann, D. Twardella, P. P. Nawroth, H. Brenner, and D. Rothenbacher. 2006. Relationship of adiponectin with markers of systemic inflammation, atherogenic dyslipidemia, and heart failure in patients with coronary heart disease. *Clin. Chem.* **52**: 853–859.

16. Okada, T., E. Saito, Y. Kufonori, M. Miyashita, F. Iwata, M. Hara, and K. Harada. 2006. Relationship between serum adiponectin level and lipid composition in each lipoprotein fraction in adolescent children. *Atherosclerosis*. **188**: 179–183.
17. Kantartzis, K., K. Rittig, B. Balletshofer, J. Machann, F. Schick, K. Porubka, A. Fritsche, H. U. Haring, and N. Stefan. 2006. The relationships of plasma adiponectin with a favorable lipid profile, decreased inflammation, and less ectopic fat accumulation depend on adiposity. *Clin. Chem.* **52**: 1934–1942.
18. Xu, S., and P. Venge. 2000. Lipocalins as biochemical markers of disease. *Biochim. Biophys. Acta*. **1482**: 298–307.
19. Wang, Y., K. S. Lam, E. W. Kraegen, G. Sweeney, J. Zhang, A. W. Tso, W. S. Chow, N. M. Wat, J. Y. Xu, R. L. Hoo, et al. 2007. Lipocalin-2 is an inflammatory marker closely associated with obesity, insulin resistance, and hyperglycemia in humans. *Clin. Chem.* **53**: 34–41.
20. Yang, Q., T. E. Graham, N. Mody, F. Preitner, O. D. Peroni, J. M. Zabolotny, K. Kotani, L. Quadro, and B. B. Kahn. 2005. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature*. **436**: 356–362.
21. Cabre, A., I. Lazaro, J. Girona, J. M. Manzanares, F. Marimón, N. Plana, M. Heras, and L. Masana. 2007. Retinol-binding protein 4 as a plasma biomarker of renal dysfunction and cardiovascular disease in type 2 diabetes. *J. Intern. Med.* **262**: 496–503.
22. Fisher, R. M., P. Eriksson, J. Hoffstedt, G. S. Hotamisligil, A. Thorne, M. Ryden, A. Hamsten, and P. Arner. 2001. Fatty acid binding protein expression in different adipose tissue depots from lean and obese individuals. *Diabetologia*. **44**: 1268–1273.
23. Fu, Y., N. Luo, M. F. Lopes-Virella, and W. T. Garvey. 2002. The adipocyte lipid binding protein (ALBP/aP2) gene facilitates foam cell formation in human THP-1 macrophages. *Atherosclerosis*. **165**: 259–269.
24. Fu, Y., L. Luo, N. Luo, and W. T. Garvey. 2006. Lipid metabolism mediated by adipocyte lipid binding protein (ALBP/aP2) gene expression in human THP-1 macrophages. *Atherosclerosis*. **188**: 102–111.
25. Makowski, L., K. C. Brittingham, J. M. Reynolds, J. Suttles, and G. S. Hotamisligil. 2005. The fatty acid-binding protein, aP2, coordinates macrophage cholesterol trafficking and inflammatory activity. Macrophage expression of aP2 impacts peroxisome proliferator-activated receptor gamma and I κ B kinase activities. *J. Biol. Chem.* **280**: 12888–12895.
26. Boord, J. B., S. Fazio, and M. F. Linton. 2002. Cytoplasmic fatty acid-binding proteins: emerging roles in metabolism and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* **13**: 141–147.
27. Fredenrich, A. 1998. Role of apolipoprotein CIII in triglyceride-rich lipoprotein metabolism. *Diabetes Metab.* **24**: 490–495.

FABP4 plasma levels are increased in familial combined hyperlipidemia

Anna Cabré,^{*,††} Iolanda Lázaro,^{*,††} Montserrat Cofán,^{†,§§} Estibaliz Jarauta,[§] Núria Plana,^{*,††} Angel L. Garcia-Otín,[§] Juan F. Ascaso,^{*,**††} Raimón Ferré,^{*,††} Fernando Civeira,[§] Emilio Ros,^{†,§§} and Lluís Masana^{1,*,††}

Unitat de Recerca de Lípids i Arteriosclerosi,^{*} Universitat Rovira i Virgili, Servei de Medicina Interna, Hospital Universitari Sant Joan de Reus, Reus, Spain; Unitat de Lípids,[†] Servei d'Endocrinologia i Nutrició, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Hospital Clínic, Barcelona, Spain; Unidad de Lípidos y Riesgo Cardiovascular,[§] Laboratorio de Investigación Molecular, Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario Miguel Servet, Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud, Zaragoza, Spain; Servicio de Endocrinología y Nutrición,^{**} Hospital Clínico Universitario, Universitat de Valencia, Valencia, Spain; and CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM)^{††} and CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN),^{§§} Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

Abstract The lipid profile of familial combined hyperlipidemia (FCHL) shares some characteristics with atherogenic dyslipidemia seen in diabetes, metabolic syndrome, and obesity. Adipocyte fatty acid-binding protein 4 (FABP4) appears to be a determinant of atherogenic dyslipidemia. We examined relationships between FABP4 plasma concentrations, dyslipidemia, and metabolic variables in patients with FCHL. We studied 273 unrelated FCHL patients and 118 control subjects. FABP4 was higher in FCHL than controls, with mean levels of 21.8 (10.1) $\mu\text{g/l}$ and 19.2 (9.2) $\mu\text{g/l}$, respectively (adjusted $P = 0.012$). In FCHL, FABP4 correlated to body mass index (BMI), waist circumference, insulin levels, and homeostasis model assessment (HOMA) index (all $P < 0.05$), but not to lipid levels, whereas in obese patients, FABP4 correlated to triglyceride levels ($r = 0.303$, $P = 0.014$) and very low density lipoprotein size ($r = 0.502$, $P = 0.001$), as determined by nuclear magnetic resonance. Associations of FABP4 with BMI and waist circumference, but not with insulin levels, persisted in this subgroup. **FF** Plasma FABP4 does not influence the lipid phenotype of FCHL. In a small subgroup of obese FCHL, FABP4 levels were associated with triglyceride-rich lipoproteins independent of insulin resistance. These results support a hyperlipidemic mechanism of FCHL different from similar metabolic conditions where fat mass is strongly related to FABP4 and hypertriglyceridemia.—Cabré, A., I. Lázaro, M. Cofán, E. Jarauta, N. Plana, A. L. Garcia-Otín, J. F. Ascaso, R. Ferré, F. Civeira, E. Ros, and L. Masana. **FABP4 plasma levels are increased in familial combined hyperlipidemia.** *J. Lipid Res.* 2010. 51: 1173–1178.

Supplementary key words dyslipidemia • FCHL • insulin resistance • obesity

Familial combined hyperlipidemia (FCHL) is a common dyslipidemia that carries a high risk of cardiovascular disease. Indeed, it is estimated that about one in five patients surviving a premature myocardial infarction is a FCHL bearer (1). FCHL is a complex genetic disorder clinically characterized by variable phenotypic expression in both index cases and family members. Although hereditary transmission follows a dominant autosomic pattern, a unique gene or set of genes has not been identified for FCHL. Metabolic studies suggest that the main defect in FCHL is an increased production rate of triglyceride-rich lipoproteins, mainly liver-derived very low-density lipoproteins (VLDL) (2), with ensuing hyperlipidemia characterized by plasma increases of both triglycerides and cholesterol.

Hypertriglyceridemia is usually associated with the production of atherogenic small and dense low-density lipoproteins (LDL) and a tendency toward reduced high-density lipoprotein (HDL) cholesterol levels. Altogether, these metabolic derangements promote an increase in the number of circulating apolipoprotein B (apoB)-containing particles, which is reflected by an increased apoB plasma level (3). This lipid profile, referred to as atherogenic dyslipidemia, is similar to that observed in patients with insulin resistance syndromes, such as diabetes, obesity, metabolic syndrome, and primary and secondary lipodystrophies

This work was supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain (FIS 01/0398, PI02/1051, PI05/1954, PI06/1238, and PI06/0365). CIBERDEM and CIBEROBN are initiatives of ISCIII.

Manuscript received 13 February 2009 and in revised form 7 April 2009.

Published, JLR Papers in Press, April 24, 2009

DOI 10.1194/jlr.M900066

Abbreviations: apoB, apolipoprotein B; FABP4, fatty acid-binding protein 4; FCHL, familial combined hyperlipidemia; HOMA, homeostasis model assessment.

¹To whom correspondence should be addressed.
e-mail: luis.masana@urv.cat

(4). Because of this apparently common lipid phenotype, FCHL is considered to share a pathogenic basis with the above-mentioned diseases. Additionally, many FCHL patients fulfill the criteria for metabolic syndrome because they already have the necessary lipid defects. Several studies have implicated metabolic alterations of adipose tissue in the pathogenesis of FCHL (5–8). Among these studies, it has been reported that preadipocytes from patients with FCHL have upregulated CD36/FAT, which has been associated with an insulin resistance state (6). On the other hand, low levels of circulating adiponectin have been observed in patients with FCHL (7). Furthermore, differential expression of genes from subcutaneous adipose tissue in FCHL indicates overexpression of genes associated with inflammation and insulin resistance, such as tumor necrosis factor α , interleukin-6, and intercellular adhesion molecule-1. These data suggest an involvement of adipose tissue in the FCHL clinical phenotype (8).

The fatty acid-binding protein 4, also known as FABP4, is highly expressed in adipose tissue, especially during adipocyte differentiation (9). FABP4 has been considered as a major cytoplasmic protein related to glucose and lipid metabolic functions (10, 11). FABP4-deficient mice are protected from insulin resistance, hyperglycemia, and atherosclerosis (12, 13). Recently, it has been demonstrated that FABP4 is released into the human blood stream (14). The circulating FABP4 level has been associated with central adiposity, insulin resistance, and subclinical atherosclerosis (12, 14, 15). FABP4 has been postulated to be an early marker of metabolic syndrome and the future development of type 2 diabetes (16, 17). In our previous studies, FABP4 plasma levels have been associated with metabolic syndrome in diabetic patients (9) as well as with the presence of metabolic syndrome and lipodystrophy in HIV-infected patients (18). We have also reported that FABP4 is a strong determinant of atherogenic dyslipidemia in diabetes (19). Although the mechanisms involved in this effect are unknown, they are probably linked to the hyperlipolytic state of these dysmetabolic conditions. Therefore, because FABP4 is currently considered a primary marker of adipose tissue metabolism derangement influencing the lipid profile, we hypothesized that if adipose tissue alterations have an important role in the clinical expression of FCHL, then FABP4 plasma levels will be associated with dyslipidemia in FCHL. In this study, we determined for the first time the FABP4 plasma levels in a large cohort of FCHL patients and related them to metabolic alterations.

METHODS

Study participants

Two hundred seventy-three patients with FCHL were included in the study. The criteria for FCHL diagnosis was based on the presence of primary combined hyperlipidemia, with off treatment serum LDL cholesterol (or total cholesterol if triglycerides > 3.38 mmol/l) > 90th percentile of the reference population or > 4.90 mmol/l (non-HDL cholesterol > 5.67 mmol/l if triglycerides >

3.38 mmol/l); triglycerides > 90th percentile of reference values or > 2.25 mmol/l; and at least one first-degree relative with hyperlipidemia (total cholesterol and/or triglycerides > 90th percentile) or a first-degree relative with premature coronary heart disease. Participants were recruited from four lipid clinics in Spain. Patients with unstable angina, myocardial infarction within the last 3 months, daily alcohol intake > 30 g, a weight change > 10% in the last 3 months, or those participating in intensive physical training or a weight-loss program were excluded a priori from entering the study. Demographic and anthropometric data and prior history of cardiovascular disease were recorded. A full physical examination was performed, and fasting blood samples were collected. Any lipid-lowering treatment was discontinued at least 4 weeks (6 weeks in the case of fibrates) before blood extraction. For purposes of comparing FABP4 levels in FCHL and in healthy subjects, we randomly selected a control group of 118 healthy subjects among those matched for age, gender, and body mass index (BMI) from a general population database and plasma library (BIOBANC, Reus) belonging to the same geographical area. To assess the impact of adiposity on the FCHL phenotype, patients were subdivided by obesity status (BMI < 30 kg/m² or \geq 30 kg/m²) for further analyses. Metabolic syndrome in FCHL patients was defined according to National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (ATP-III) criteria (20). FCHL patients were categorized as having metabolic syndrome when they presented at least three of the following features: (a) central obesity (waist circumference \geq 88 cm in women or \geq 102 cm in men); (b) fasting glucose level \geq 5.6 mmol/l or treatment with oral hypoglycemic agents; (c) hypertriglyceridemia (fasting triglycerides \geq 1.69 mmol/l); (d) low HDL cholesterol (< 1.29 mmol/l in women or < 1.03 mmol/l in men); and (e) hypertension (blood pressure \geq 130/85 mm Hg or antihypertensive treatment).

Biochemical analyses

The basic biochemical parameters, including the standard lipid profile and glucose, insulin, apoB, and high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP) were measured locally in fasting sera using standard enzymatic, immunoturbidimetric, chemiluminescent, RIA, and immunonephelometric assays, respectively. The precision of these techniques, as described by coefficients of variation (CV) were < 5%, < 5%, < 8%, and < 8% interassay, respectively. Non-HDL cholesterol was calculated and used for clinical purposes and for the analyses included in this study instead of LDL cholesterol because, by definition, the majority of FCHL patients had hypertriglyceridemia (19% with triglyceride levels > 4.5 mmol/l), which precludes the estimation of LDL cholesterol by the Friedewald equation. Insulin resistance (IR) was estimated by using the homeostasis model assessment (HOMA) index (HOMA-IR), calculated as fasting glucose (in mmol/l) times fasting insulin (in mIU/l) divided by 22.5 (21). IR definition was established to be within the 75th percentile of our population (HOMA-IR \geq 3.2). Plasma samples sent from each center to the Reus laboratory were used for measurement of FABP4 levels by a commercial ELISA kit (BioVendor Laboratory Medicine Inc., Brno, Czech Republic). The precision of this assay was 5.3% CV intra-assay and 3.9% CV interassay. The antibodies used in the human FABP4 ELISA are highly specific for human FABP4, with no detectable cross-reactivity to human FABP1, FABP2, FABP3, or FABP5. Results are expressed in "Système International" (SI) units.

Nuclear magnetic resonance lipid profile

Plasma samples from the first 167 FCHL patients included in the study were used for the nuclear magnetic resonance (NMR) lipid profile study. Detailed lipoprotein subclassification (type,

concentration, and size) was performed on plasma using NMR spectroscopy (NMR LipoProfile, Raleigh, NC) (22). Data are presented as molar particle concentrations and sizes are given in nanometers. NMR data resulted in the following spectra: three subclasses of VLDL, including large VLDL and chylomicrons, medium VLDL, and small VLDL; intermediate-density lipoprotein (IDL); four subclasses of LDL, including large LDL, medium LDL, small LDL, and very small LDL; and three subclasses of HDL, including large HDL, medium HDL, and small HDL.

Statistical analyses

Analyses were performed using SPSS (version 15.0, SPSS Inc., Chicago, IL). All data are presented as means (SD) except when otherwise stated. Normality distribution was assessed with the Kolmogorov-Smirnov test. Log transformation was performed before analyses when variables had a skewed distribution. The FCHL samples were divided into two subgroups of nonobese and obese patients according to BMI of < 30 or ≥ 30 kg/m². One-way ANOVA and Fisher tests were used for comparisons between two groups for continuous and categorical variables, respectively. Univariate linear general models were used to adjust FABP4 values for waist circumference, and multiple testing was corrected with Bonferroni testing by multiplying the univariate *P* value by the number of comparisons. Spearman correlation coefficients between FABP4 and other continuous variables were determined using a bivariate correlation test. FABP4 concentrations were categorized into sex-adjusted tertiles. A multiple linear regression analysis, including age, gender, waist circumference, insulin, cholesterol, and FABP4 plasma levels was performed to find the variables with an independent association with triglycerides in the obese FCHL subgroup. A binary logistic regression analysis was used to calculate the odds ratio (OR) for the association of raised FABP4 plasma concentrations (third tertile versus second or first tertile) with the presence of metabolic syndrome. FABP4 first tertile was the reference group. The model included age, IR, hsCRP, apoB, LDL cholesterol and FABP4 in sex-adjusted tertiles. Metabolic syndrome components were not included. *P* values shown, associated with the ORs, were obtained from a likelihood ratio test. A *P* value < 0.05 was considered statistically significant.

Statement of ethics

We certify that all applicable institutional and governmental regulations concerning the ethical use of human volunteers were followed during this research. All subjects gave written informed consent, and each hospital's ethics committee approved the protocol design and the use of previously recorded databases and stored plasma samples for this study when necessary.

RESULTS

The clinical characteristics of study groups are summarized in **Table 1**. FABP4 plasma levels in FCHL were significantly higher than in controls (Table 1). Women had significantly higher FABP4 levels than men, both in the FCHL group [25.5 (9.5) $\mu\text{g/l}$ versus 20.0 (9.9) $\mu\text{g/l}$, respectively; $P < 0.001$ after Bonferroni correction] and in the control group [25.7 (9.3) $\mu\text{g/l}$ versus 15.1 (6.4) $\mu\text{g/l}$, respectively; $P < 0.001$ after Bonferroni correction]. When subdivided by gender, FCHL men had higher FABP4 levels than controls [20.0 (9.9) $\mu\text{g/l}$ versus 15.1 (6.4) $\mu\text{g/l}$, respectively; $P < 0.001$ after Bonferroni correction], while

FCHL and control women had similar levels [25.5 (9.5) $\mu\text{g/l}$ versus 25.7 (9.3) $\mu\text{g/l}$, respectively; $P = 0.947$].

Even though the control subjects were matched for BMI with the FCHL patients, the waist circumference of the FCHL group was significantly greater than that of the control group (Table 1). This was due to differences in the waist circumference of men [98.1 (8.0) cm in FCHL and 95.0 (10.6) cm in controls; $P = 0.028$ after Bonferroni correction]. Nevertheless, the differences in FABP4 observed between FCHL men and control men persisted after adjustment for waist circumference ($P < 0.001$ after Bonferroni correction).

Table 1 also shows basic clinical and biochemical characteristics of the FCHL population distributed according to the presence of obesity. FABP4 was higher in the obese group of FCHL patients compared with nonobese FCHL (Table 1).

In FCHL patients, FABP4 plasma levels were positively correlated with BMI, waist circumference, insulin levels, and HOMA index (**Table 2**). No significant correlations existed between FABP4 and serum lipids in the overall FCHL group, but FABP4 levels were significantly correlated with triglyceride levels in the obese FCHL subgroup. The results of multiple linear regression analysis showed that FABP4 accounted for 17% of the variation in triglyceride levels in the obese FCHL subgroup ($P = 0.008$), independently of insulin levels.

In the obese subgroup, FABP4 correlated to BMI and waist circumference, but not to insulin or the HOMA index (Table 2).

Table 3 shows the correlations between FABP4 and the nuclear magnetic resonance (NMR) lipid profile in all FCHL patients for whom NMR data were available and also for obese FCHL patients. No correlations were observed between FABP4 and any of the NMR lipid fractions when considering all the FCHL patients. However, FABP4 levels significantly correlated to large VLDL and chylomicron concentrations and to VLDL size in the obese subgroup (Table 3).

Among the 273 subjects included in the study, 121 subjects (44%) fulfilled the ATP-III criteria for metabolic syndrome. FABP4 plasma levels were significantly higher in subjects with than in subjects without metabolic syndrome [23.9 (9.3) $\mu\text{g/l}$ versus 20.4 (10.5) $\mu\text{g/l}$, respectively; $P = 0.001$ after Bonferroni correction]. By logistic regression analysis, FABP4 tertiles adjusted for gender, age, hsCRP, apoB, LDL cholesterol, and insulin resistance, were independently associated with the presence of metabolic syndrome ($P < 0.05$). Subjects with FABP4 plasma concentrations in the highest tertile (≥ 21.6 $\mu\text{g/l}$ for men and ≥ 28.0 $\mu\text{g/l}$ for women) had a significantly increased likelihood of having the metabolic syndrome compared with those in the lowest tertile (OR 2.91; 95% CI, 1.32 to 6.41; $P = 0.007$).

DISCUSSION

The main finding of our work is that FABP4 plasma levels are higher in FCHL patients than in controls. FABP4

TABLE 1. Clinical characteristics of study groups

	Control Group (n = 118)	All FCHL Patients (n = 273)	<i>P</i> ^b	Non-Obese FCHL Patients (n = 208)	Obese FCHL Patients (n = 65)	<i>P</i> ^b
Women, %	38	32	ns	33	29	NS
Age, years	48 (14)	47 (11)	ns	48 (11)	47 (10)	NS
BMI, kg/m ²	27.4 (3.6)	27.8 (3.4)	ns	26.3 (2.3)	32.4 (2.1)	< 0.001
Waist circumference, cm	93.2 (10.8)	96.0 (9.9)	0.024	93.0 (8.8)	105.2 (6.8)	< 0.001
Glucose, mmol/l	5.0 (0.9)	5.5 (1.0)	< 0.001	5.4 (0.8)	5.9 (1.4)	0.001
Insulin, pmol/l ^a	57.3 (40.5)	74.8 (61.5)	0.014	70.8 (59.5)	87.5 (66.2)	0.037
HOMA index ^a	1.8 (1.6)	2.4 (1.9)	0.001	2.2 (1.9)	2.9 (2.0)	0.005
hsCRP, mg/l ^a	—	3.4 (4.4)	—	2.9 (3.5)	5.0 (6.4)	< 0.001
Apolipoprotein B, mg/dl	105 (24)	153 (32)	< 0.001	154 (31)	152 (33)	NS
Triglycerides, mmol/l ^a	1.32 (0.69)	3.27 (3.06)	< 0.001	3.33 (3.31)	3.07 (2.09)	NS
Total cholesterol, mmol/l	5.40 (1.00)	7.42 (1.36)	< 0.001	7.49 (1.41)	7.21 (1.14)	NS
HDL cholesterol, mmol/l	1.46 (0.37)	1.13 (0.29)	< 0.001	1.13 (0.28)	1.12 (0.31)	NS
Non-HDL cholesterol, mmol/l	3.95 (1.03)	6.30 (1.31)	< 0.001	6.36 (1.37)	6.09 (1.09)	NS
FABP4, µg/l ^a	19.2 (9.2)	21.8 (10.1)	0.011	21.2 (10.5)	23.7 (8.6)	0.031

Values are means (SD) or frequencies.
 Abbreviations: BMI, body mass index; hsCRP, high-sensitivity C-reactive protein; HDL, high-density lipoprotein; HOMA, homeostasis model assessment; FABP4, fatty acid-binding protein 4; FHCL, familial combined hyperlipidemia; NS, not significant.

^a Log-transformed before analysis.

^b *P* values corrected for multiple testing by Bonferroni correction.

was associated to obesity, metabolic syndrome, and insulin resistance markers. The FABP4 levels had no clear impact on the lipid profile when the whole FCHL population was considered, but they were associated with hypertriglyceridemia in the presence of obesity. These results have interesting implications for the pathogenic mechanisms of

dyslipidemia in FCHL. This primary alteration of lipid metabolism has been linked to other conditions showing a similarly disturbed lipid profile, including obesity, diabetes, and metabolic syndrome (4). In fact, there is a large body of evidence suggesting that alterations in adipose tissue play a crucial role in all of these conditions (23). FABP4 is considered a good plasma marker of adipose tissue dysfunction in these metabolic situations, being associated with central adiposity, metabolic syndrome, and insulin resistance (9, 14, 16). FABP4 plasma levels are clearly high in obesity, type 2 diabetes, and metabolic syndrome (9, 14, 16), and we have previously reported that they are associated with triglyceride-rich lipoprotein components leading to atherogenic dyslipidemia (19). The lack of association between FABP4 and the lipid abnormalities of FCHL suggests that the pathogenic and metabolic bases of atherogenic dyslipidemia seen in these metabolic diseases are different. In FCHL various molecular defects likely contribute to similar clinical phenotypes. The abnormal lipid phenotype of FCHL has been attributed to defects in lipoprotein lipase (24), the APOA1-C3-A4-A5 gene cluster (25), or USF-1 (26), among others.

FCHL has also been reported to be associated with an increased prevalence of insulin resistance, as measured by the minimal model (27). In our study, the presence of insulin resistance did not influence the impact of FABP4 on the hyperlipidemia of FCHL. The clinical characteristic that most influenced the associations of FABP4 with FHCL was obesity. Obese FCHL patients had higher FABP4 levels, which contributed to higher triglycerides and to larger circulating VLDL, leading to a more abnormal lipid profile. In fact, obese FCHL patients have a dual mechanism accounting for hyperlipidemia, including the still unknown genetic

TABLE 2. Correlations of plasma FABP4 levels in patients with FCHL

	Control Group (n = 118)	All FCHL Patients (n = 273)	Obese FCHL Patients (n = 65)
	<i>r</i>	<i>r</i>	<i>r</i>
Age, years	0.451 ^c	0.110	0.124
BMI, kg/m ²	0.489 ^c	0.269 ^c	0.250 ^a
Waist circumference, cm	0.252 ^b	0.241 ^c	0.254 ^a
Glucose, mmol/l	0.202 ^a	0.055	0.142
Insulin, pmol/l	0.251	0.153 ^a	0.130
HOMA index	0.284 ^b	0.172 ^b	0.193
hsCRP, mg/l	—	0.192	0.136 ^a
Apolipoprotein B, mg/ dl	0.272 ^b	-0.012	0.118
Triglycerides, mmol/l	0.049	0.101	0.303 ^a
Total cholesterol, mmol/l	0.241 ^b	-0.010	0.013
HDL cholesterol, mmol/l	0.106	-0.004	-0.001
Non-HDL cholesterol, mmol/l	0.199 ^a	-0.011	0.033

Abbreviations: BMI, body mass index; hsCRP, high-sensitivity C-reactive protein; HDL, high-density lipoprotein; HOMA, homeostasis model assessment; FABP4, fatty acid-binding protein 4; FHCL, familial combined hyperlipidemia; NS, not significant; *r*, Spearman correlation coefficient.

^a *P* < 0.05.

^b *P* < 0.01.

^c *P* < 0.001.

TABLE 3. FABP4 correlations with the nuclear magnetic resonance lipid profile in a subgroup of FCHL patients

		All FCHL Patients (n = 167)		Obese FCHL Patients (n = 35)	
		r	P	r	P
VLDL and chylomicron concentrations, nmol/l	VLDL and chylomicrons	0.012	NS	-0.182	NS
	Large VLDL and chylomicrons	0.022	NS	0.383	0.023
	Medium VLDL	0.000	NS	-0.191	NS
LDL concentrations, nmol/l	Small VLDL	0.017	NS	-0.138	NS
	Total LDL	-0.061	NS	0.088	NS
	IDL	0.003	NS	0.221	NS
	Large LDL	0.000	NS	0.007	NS
	Small LDL	-0.043	NS	0.064	NS
	Medium LDL	-0.045	NS	0.021	NS
HDL concentrations, μmol/l	Very small LDL	-0.039	NS	0.074	NS
	Total HDL	-0.075	NS	-0.015	NS
	Large HDL	-0.046	NS	-0.140	NS
	Medium HDL	0.017	NS	-0.039	NS
Mean sizes, nm	Small HDL	-0.078	NS	0.120	NS
	VLDL	0.034	NS	0.522	0.001
	LDL	-0.004	NS	-0.057	NS
	HDL	0.004	NS	-0.279	NS

Abbreviations: FABP4, fatty acid-binding protein 4; FCHL, familial combined hyperlipidemia; HDL, high-density lipoprotein; IDL, intermediate-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; NS, not significant; r, Spearman correlation coefficient; VLDL, very low-density lipoprotein.

defect plus the acquired effects of adiposity. Interestingly, the association between FABP4 and triglycerides in the obese FCHL subgroup was independent of insulin resistance markers. Similar results have been reported in obesity, diabetes, and the metabolic syndrome (9, 19), suggesting that FABP4 levels are markers of an adipocytic derangement paralleled by, but not dependent on, insulin resistance. That FABP4 levels are associated with large VLDL in obese FCHL patients is also interesting. Lipoprotein kinetic studies have shown that VLDL is secreted in two differentiated pools, large and small VLDL, according to the amount of fat it carries. In type 2 diabetic patients, greater visceral adipose tissue is associated with larger VLDL particles and higher VLDL particle numbers independently of BMI (28), and this lipoprotein pattern has been associated with an increased risk for atherosclerosis and cardiovascular disease (29). In this respect, the presence of obesity in FCHL patients could play a detrimental role for their lipid profile. Multifactorial analysis showed that 17% of the variation in triglyceride levels in the obese group could be attributed to FABP4. Another consideration derived from our results is the definition of metabolic syndrome in these patients. By definition, many FCHL patients fulfill the lipid criteria; therefore, the additional presence of hypertension, high blood glucose levels, or obesity permits the clinical diagnosis of metabolic syndrome. However, the pathogenesis behind this cluster of risk factors is quite different in FCHL than in, for example, obese patients. Considering that FCHL is a cardiovascular risk factor per se and that its metabolic basis is different from that of other conditions associated with metabolic syndrome, the diagnosis of metabolic syndrome in the presence of this genetic lipid alteration should be restricted. Our data suggest that elevated FABP4 plasma levels could aid in the identification of the metabolic

abnormalities associated with FCHL that lead to metabolic syndrome.

FABP4 was associated with hypertriglyceridemia only in the presence of obesity, defined both by BMI and waist circumference, and independently of insulin resistance markers. However, because of the small number of obese patients in this group, these results need to be verified in larger cohorts. We have previously described a similar finding in diabetic patients (19), suggesting that FABP4 elevation is a metabolic defect parallel to, but not dependent on, insulin resistance.

CONCLUSION

The dyslipidemia seen in FCHL, although sharing many characteristics with obesity, diabetes, and the metabolic syndrome, is not associated with the adipose tissue alterations of which plasma levels of FABP4 are a marker. Although these data need to be replicated in larger populations, our data suggest that the presence of obesity in FCHL patients results in additional metabolic derangements leading to a greater triglyceride increase and larger VLDL signaled by increased plasma FABP4 levels. ■

REFERENCES

1. Brunzell, J. D., H. G. Schrott, A. G. Motulsky, and E. L. Bierman. 1976. Myocardial infarction in the familial forms of hypertriglyceridemia. *Metabolism*. **25**: 313-320.
2. Cabezas, M. C., T. W. de Bruin, H. Jansen, L. A. Kock, W. Kortland, and D. W. Erkelens. 1993. Impaired chylomicron remnant clearance in familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler. Thromb.* **13**: 804-814.
3. Janus, E. D., A. M. Nicoll, P. R. Turner, P. Magill, and B. Lewis. 1980. Kinetic bases of the primary hyperlipidemias: studies of apolipoprotein B turnover in genetically defined subjects. *Eur. J. Clin. Invest.* **10**: 161-172.

4. Ayyobi, A. F., and J. D. Brunzell. 2003. Lipoprotein distribution in the metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and familial combined hyperlipidemia. *Am. J. Cardiol.* **92**: 27J–33J.
5. de Graaf, J., M. J. Veerkamp, and A. F. Stalenhoef. 2002. Metabolic pathogenesis of familial combined hyperlipidaemia with emphasis on insulin resistance, adipose tissue metabolism and free fatty acids. *J. R. Soc. Med.* **95**: 46–53.
6. Meex, S. J., C. J. van der Kallen, M. M. van Greevenbroek, P. M. Eurlings, M. El Hasnaoui, C. T. Evelo, P. J. Lindsey, J. J. Luiken, J. F. Glatz, and T. W. de Bruin. 2005. Up-regulation of CD36/FAT in preadipocytes in familial combined hyperlipidemia. *FASEB J.* **19**: 2063–2065.
7. van der Vleuten, G. M., L. J. van Tits, M. den Heijer, H. Lemmers, A. F. Stalenhoef, and J. de Graaf. 2005. Decreased adiponectin levels in familial combined hyperlipidemia patients contribute to the atherogenic lipid profile. *J. Lipid Res.* **46**: 2398–2404.
8. Eurlings, P. M., C. J. van der Kallen, J. M. Geurts, P. Kouwenberg, W. D. Boeckx, and T. W. de Bruin. 2002. Identification of differentially expressed genes in subcutaneous adipose tissue from subjects with familial combined hyperlipidemia. *J. Lipid Res.* **43**: 930–935.
9. Cabré, A., I. Lázaro, J. Girona, J. Manzanera, F. Marimón, N. Plana, M. Heras, and L. Masana. 2007. Fatty acid binding protein 4 is increased in metabolic syndrome and with thiazolidinedione treatment in diabetic patients. *Atherosclerosis.* **195**: e150–e158.
10. Cao, H., K. Gerhold, J. R. Mayers, M. M. Wiest, S. M. Watkins, and G. S. Hotamisligil. 2008. Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. *Cell.* **134**: 933–944.
11. Makowski, L., K. C. Brittingham, J. M. Reynolds, J. Suttles, and G. S. Hotamisligil. 2005. The fatty acid-binding protein, aP2, coordinates macrophage cholesterol trafficking and inflammatory activity. Macrophage expression of aP2 impacts peroxisome proliferator-activated receptor gamma and IkappaB kinase activities. *J. Biol. Chem.* **280**: 12888–12895.
12. Boord, J. B., K. Maeda, L. Makowski, V. R. Babaev, S. Fazio, M. F. Linton, and G. S. Hotamisligil. 2004. Combined adipocyte-macrophage fatty acid-binding protein deficiency improves metabolism, atherosclerosis, and survival in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation.* **110**: 1492–1498.
13. Makowski, L., J. B. Boord, K. Maeda, V. R. Babaev, K. T. Uysal, M. A. Morgan, R. A. Parker, J. Suttles, S. Fazio, G. S. Hotamisligil, et al. 2001. Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis. *Nat. Med.* **7**: 699–705.
14. Xu, A., Y. Wang, J. Y. Xu, D. Stejskal, S. Tam, J. Zhang, N. M. Wat, W. K. Wong, and K. S. Lam. 2006. Adipocyte fatty acid-binding protein is a plasma biomarker closely associated with obesity and metabolic syndrome. *Clin. Chem.* **52**: 405–413.
15. Yeung, D. C., A. Xu, C. W. Cheung, N. M. Wat, M. H. Yau, C. H. Fong, M. T. Chau, and K. S. Lam. 2007. Serum adipocyte fatty acid-binding protein levels were independently associated with carotid atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**: 1796–1802.
16. Xu, A., A. W. Tso, B. M. Cheung, Y. Wang, N. M. Wat, C. H. Fong, D. C. Yeung, E. D. Janus, P. C. Sham, and K. S. Lam. 2007. Circulating adipocyte-fatty acid binding protein levels predict the development of the metabolic syndrome: a 5-year prospective study. *Circulation.* **115**: 1537–1543.
17. Tso, A. W., A. Xu, P. C. Sham, N. M. Wat, Y. Wang, C. H. Fong, B. M. Cheung, E. D. Janus, and K. S. Lam. 2007. Serum adipocyte fatty acid binding protein as a new biomarker predicting the development of type 2 diabetes: a 10-year prospective study in a Chinese cohort. *Diabetes Care.* **30**: 2667–2672.
18. Coll, B., A. Cabré, C. Alonso-Villaverde, I. Lázaro, G. Aragonés, S. Parra, J. Girona, and L. Masana. 2008. The fatty acid binding protein-4 (FABP4) is a strong biomarker of metabolic syndrome and lipodystrophy in HIV-infected patients. *Atherosclerosis.* **199**: 147–153.
19. Cabré, A., I. Lázaro, J. Girona, J. M. Manzanera, F. Marimón, N. Plana, M. Heras, and L. Masana. 2008. Plasma fatty acid binding protein 4 is associated with atherogenic dyslipidemia in diabetes. *J. Lipid Res.* **49**: 1746–1751.
20. Grundy S. M., H. B. Brewer, Jr., J. I. Cleeman, S. C. Smith, Jr., and C. Lenfant. 2004. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation.* **109**: 433–438.
21. Matthews, D. R., J. P. Hosker, A. S. Rudenski, B. A. Naylor, D. F. Treacher, and R. C. Turner. 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* **28**: 412–419.
22. Negrodo, E., J. Ribalta, R. Ferré, J. Salazar, C. Rey-Joly, G. Sirera, L. Masana, and B. Clotet. 2004. Efavirenz induces a striking and generalized increase of HDL-cholesterol in HIV-infected patients. *AIDS.* **18**: 819–821.
23. Hajer, G. R., T. W. van Haefen, and F. L. Visseren. 2008. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur. Heart J.* **29**: 2959–2971.
24. Miesenbock, G., B. Holz, B. Foger, E. Brandstatter, B. Paulweber, F. Sandhofer, and J. R. Patsch. 1993. Heterozygous lipoprotein lipase deficiency due to a missense mutation as the cause of impaired triglyceride tolerance with multiple lipoprotein abnormalities. *J. Clin. Invest.* **91**: 448–455.
25. Eichenbaum-Voline, S., M. Olivier, E. L. Jones, R. P. Naoumova, B. Jones, B. Gau, H. N. Patel, M. Seed, D. J. Betteridge, D. J. Galton, et al. 2004. Linkage and association between distinct variants of the APOA1/C3/A4/A5 gene cluster and familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**: 167–174.
26. Zeggini E., C. M. Damcott, R. L. Hanson, M. A. Karim, N. W. Rayner, C. J. Groves, L. J. Baier, T. C. Hale, A. T. Hattersley, G. A. Hitman, et al. 2006. Variation within the gene encoding the upstream stimulatory factor 1 does not influence susceptibility to type 2 diabetes in samples from populations with replicated evidence of linkage to chromosome 1q. *Diabetes.* **55**: 2541–2548.
27. Ascaso, J. F., A. Merchante, R. I. Lorente, J. T. Real, J. Martinez-Valls, and R. Carmena. 1998. A study of insulin resistance, using the minimal model, in non-diabetic familial combined hyperlipidemic patients. *Metabolism.* **47**: 508–513.
28. Sam, S., S. Haffner, M. H. Davidson, R. B. D'Agostino, S. Feinstein, G. Kondos, A. Perez, and T. Mazzone. 2008. Relationship of abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue with lipoprotein particle number and size in type 2 diabetes. *Diabetes.* **57**: 2022–2027.
29. Carmena, R., P. Duriez, and J. C. Fruchart. 2004. Atherogenic lipoprotein particles in atherosclerosis. *Circulation.* **109**(suppl III): III-2–III-7.

Plasma Fatty Acid-Binding Protein 4 Increases with Renal Dysfunction in Type 2 Diabetic Patients without Microalbuminuria

Anna Cabré, Iolanda Lázaro, Josefa Girona, Josep M. Manzanares, Francesc Marimón, Núria Plana, Mercedes Heras, and Lluís Masana*

BACKGROUND: Fatty acid-binding protein 4 (FABP4) has been linked to metabolic syndrome development, diabetes, and arteriosclerosis, but the role of FABP4 in target organ damage has not been assessed. We evaluated whether plasma FABP4 is associated with renal dysfunction in type 2 diabetic patients.

METHODS: In 263 individuals (161 type 2 diabetic patients and 102 healthy nondiabetic controls), we analyzed the correlation between FABP4 and creatinine or glomerular filtration index (MDRD-GFR) regarding the presence or absence of microalbuminuria. Patients with severe chronic kidney disease (MDRD-GFR <30 mL/min/1.73 m²) or albuminuria were not included.

RESULTS: FABP4 concentrations were higher in diabetic patients with MDRD-GFR <60 mL/min/1.73 m² ($P < 0.001$). We observed a significant, direct correlation between FABP4 and creatinine ($r = 0.446$, $P < 0.001$) and an inverse correlation between FABP4 and MDRD-GFR ($r = -0.511$, $P < 0.001$) in type 2 diabetic patients, but not in nondiabetic individuals. These correlations were sustained when only those patients without microalbuminuria were analyzed ($r = 0.414$, $P < 0.001$ and $r = -0.510$, $P < 0.001$, respectively). Type 2 diabetic patients with FABP4 in the highest tertile compared with those in the lower tertiles had increased adjusted odds ratios for moderate renal dysfunction [7.5 (95%CI 1.8–30.7), $P = 0.005$ and 15.3 (3.1–76.4), $P = 0.001$; respectively], independent of microalbuminuria.

CONCLUSIONS: High FABP4 plasma concentrations are associated with high plasma creatinine and low MDRD-GFR in patients with type 2 diabetes even in the absence of microalbuminuria or clinically relevant

alterations of creatinine and MDRD-GFR values. FABP4 concentrations should be taken into consideration as an early marker of kidney damage in patients with type 2 diabetes.

© 2007 American Association for Clinical Chemistry

It is becoming increasingly evident that several molecules derived from adipose tissue are not only associated with adiposity and inflammation, but are also involved in the development of insulin resistance. Among them, some members of the lipocalin family—retinol-binding protein 4 (RBP4),² lipocalin-2, and fatty acid-binding protein 4 (FABP4)—have been suggested to play important roles in the mechanisms of insulin resistance. They have been proposed as early markers for adiposity associated with metabolic syndrome (1–5). FABP4 is produced by adipocytes and macrophages during their differentiation and intracellular lipid accumulation (6–10). Its main role seems to be intracellular fatty acid transport. Recently, our group and others have communicated that FABP4 plasma concentrations correlate to metabolic syndrome components in diabetic and nondiabetic individuals (3, 4, 6, 11). Furthermore, plasma FABP4 is considered an early marker of metabolic risk for metabolic syndrome development (11). Although FABP4 concentrations seem to be associated with adiposity, other factors such as inflammation status could also influence its concentrations (6). Our group has observed that FABP4 plasma concentrations in type 2 diabetic patients are also associated with high triglycerides, increased lipid peroxidation, and inflammation markers (6); however, the role of FABP4 in target organ damage has not been fully assessed. The pres-

¹ Research Unit on Lipids and Atherosclerosis, Faculty of Medicine and Health Sciences, IRCIS, Department of Internal Medicine, Saint Joan University Hospital, Reus, Spain.

* Address correspondence to this author at: Unitat de Recerca de Lipids i Arteriosclerosi, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, C. Sant Llorenç, 21, 43201 Reus, Spain. Fax 34977759322; e-mail luis.masana@urv.cat.

Received July 10, 2007; accepted October 24, 2007.

Previously published online at DOI: 10.1373/clinchem.2007.094672

² Nonstandard abbreviations: RBP4, retinol-binding protein 4; FABP4, fatty acid-binding protein 4; GFR, glomerular filtration rate; MDRD, Modification of Diet in Renal Disease; BMI, body mass index; OR, odds ratio.

ence of a genetic variation (T-87C) at the FABP4 locus results in reduced triglyceride concentrations and significantly reduces the risk for developing either diabetes or cardiovascular disease (12). Furthermore, plasma FABP4 concentrations are independent determinants of carotid IMT in Chinese women (13) but are not associated with macrovascular disease in type 2 diabetic patients (6). It has been observed that human liver- and heart-type FABP (FABP1 and FABP3) are expressed in the proximal and distal renal tubular cells, respectively (14, 15), and increased amounts of FABP1 in urine have been postulated as a clinical marker of renal tubulointerstitial damage (16, 17). No data have been published associating FABP4 with renal function, however. The members of the lipocalin family are low-molecular-weight proteins that normally undergo glomerular filtration and tubular reabsorption and could accumulate in plasma during alterations of renal function (18). Lipocalin-2 has been suggested to be a good marker of glomerular dysfunction (19, 20), and we have communicated that high RBP4 plasma concentrations are associated with the early stages of chronic kidney disease in type 2 diabetic patients (21). In this study, we investigated whether FABP4 plasma concentrations are also associated with renal damage in type 2 diabetic patients.

Materials and Methods

CLINICAL STUDY

We studied 263 individuals: 161 type 2 diabetic patients and 102 nondiabetic controls (36–79 years old). The type 2 diabetic patients were diagnosed via criteria from the American Diabetes Association (22) and were recruited in the Hospital Universitari Sant Joan de Reus. The control group was randomly selected among individuals with neither diabetes nor metabolic syndrome from a general population sample collection obtained from the same geographic area. Both groups were within the same age interval and matched for sex. Anamnesis and clinical examination, including anthropometrics and blood pressure measurements, were carried out, and we assessed renal dysfunction by estimated glomerular filtration rate (GFR) using the Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) equation (23). We also calculated the estimated creatinine clearance by the Cockcroft-Gault equation (24); the data are presented as GFR by the MDRD equation (MDRD-GFR). We defined renal dysfunction according to the recommendations of the National Kidney Foundation (25). Patients with MDRD-GFR <60 mL/min/1.73 m² were considered to have moderately decreased GFR; type 2 diabetic patients and controls with severely decreased GFR (MDRD-GFR <30 mL/min/1.73 m²) according to chronic kidney disease classifica-

tion by the National Kidney Foundation were not included, and all control group participants had GFR >60 mL/min/1.73 m². Carotid and femoral echodoppler as well as ankle-brachial index (ABI) were also performed; arteriosclerosis was defined as clinical history of at least one of the following: coronary heart disease, stroke, peripheral vascular disease, ≥1 significant arteriosclerotic plaque (>40% stenosis), or ABI index ≤0.9 or ≥1.3. Microalbuminuria was defined as albuminuria ≥30 mg/24 h. Patients with albuminuria (≥300 mg/24 h), type 1 diabetes, secondary diabetes, morbid obesity [body mass index (BMI) >40 kg/m²], familial hypercholesterolemia, malignancy, liver disorder, or acute or chronic inflammation were not included. All participants gave written informed consent, and the hospital ethics committee approved the study.

ANALYTICAL METHODS

We measured plasma lipids using enzymatic assays adapted for the Cobas-Mira autoanalyzer (Roche); HbA_{1c} by HPLC on the Hi-auto A1c HA-8140 (Arkray KDR Corporation-Menarini Diagnostics); and glucose, insulin, and creatinine on the automatic autoanalyzer Synchron LXi 725-Synchron Access Clinical Systems (Beckman Coulter) using enzymatic assays, chemiluminescent immunoassays, or colorimetric assays that were adapted to this system. We assessed plasma concentrations of FABP4 by commercial ELISA (BioVendor Laboratory Medicine Inc.) (4, 11, 13). The performance characteristics for this assay were 5.3% CV intraassay and 3.9% CV interassay. The antibodies in human FABP4 ELISA are highly specific for human FABP4, with no detectable cross-reactivity to human FABP1, FABP2, FABP3, or FABP5.

STATISTICAL ANALYSIS

All data are presented as the mean (SD) except where otherwise stated. Statistical analysis used SPSS software (version 13.0, SPSS Inc.). We compared variables between groups using 1-way ANOVA and used univariate linear general models for adjusting results of continuous variables for age and sex. We compared category distributions between groups using the Fisher test and binary logistic regression models for adjusting results of categorical variables for age, sex, and BMI. FABP4 concentrations were categorized into sex-adjusted tertiles. We determined partial Pearson correlation coefficients between FABP4 and other continuous variables using a partial correlation test adjusted for age, sex, and BMI. A binary logistic regression model was used to identify the predictive role of being classified in the highest sex-adjusted FABP4 tertile for the presence of renal dysfunction (MDRD-GFR <60 mL/min/1.73 m²). Adjusted odds ratios (ORs) and their 95% CIs were rep-

Table 1. Clinical and biochemical parameters of type 2 diabetic patients and nondiabetic controls according to MDRD-GFR status.

	MDRD-GFR ≥ 60		MDRD-GFR < 60
	Nondiabetic	Type 2 diabetes	Type 2 diabetes
n (% women)	102 (51)	130 (50)	31 (58)
Age, years	59 (9)	62 (10)	67 (6) ^b
Weight, kg	74.2 (12.0)	77.7 (13.3) ^c	79.8 (10.3)
BMI, kg/m ²	28.8 (4.3)	30.0 (4.3) ^c	31.1 (4.6)
Systolic blood pressure, mmHg ^a	139 (19)	140 (19)	144 (17)
Diastolic blood pressure, mmHg ^a	83 (14)	80 (11)	79 (11)
Hypertension, n (%)	32 (31)	77 (59) ^d	29 (94) ^b
Diabetes duration, years ^a	0	13 (7) ^d	19 (8) ^b
Glucose, mmol/L	5.1 (0.8)	9.5 (3.0) ^d	9.6 (3.3)
Insulin, pmol/L ^a	—	74.0 (94.6)	74.8 (49.7)
HOMA-IR ^a	—	4.2 (4.8)	4.2 (3.1)
HbA _{1c} , %	—	6.9 (1.1)	7.5 (1.2) ^b
Triglycerides, mmol/L ^a	1.3 (0.7)	1.7 (1.0) ^d	1.9 (1.2)
Total cholesterol, mmol/L	5.8 (0.8)	4.7 (0.8) ^d	4.7 (0.8)
LDL cholesterol, mmol/L	3.7 (0.8)	2.8 (0.7) ^d	2.7 (0.7)
HDL cholesterol, mmol/L	1.5 (0.4)	1.1 (0.3) ^d	1.1 (0.3)
FABP4, $\mu\text{g/L}$ ^a	22.7 (10.9)	33.7 (20.0) ^d	53.3 (23.6) ^e
Serum creatinine, $\mu\text{mol/L}$ ^a	71 (12)	78 (11) ^d	116 (24) ^e
MDRD-GFR, mL/min/1.73 m ²	92 (15)	82 (13) ^d	51 (8) ^e
Clinical or subclinical arteriosclerosis, n (%)	—	51 (39)	19 (61) ^b
Nephropathy, n (%)	—	39 (30)	16 (52)
Retinopathy, n (%)	—	26 (20)	19 (61) ^b
Polyneuropathy, n (%)	—	34 (26)	16 (52) ^b
Insulin treatment, n (%)	—	52 (40)	21 (68) ^b
Lipid-lowering treatment, n (%)	—	69 (53)	17 (55)
Oral antidiabetic treatment, n (%)	—	73 (56)	10 (32)

Data are mean (SD) unless otherwise noted. Group comparisons by 1-way ANOVA (continuous variables) or Fisher test (categorical variables) were adjusted for age and sex by a univariate linear general model or by binary logistic regression, respectively. ^a Log transformed before analysis. ^c $P < 0.05$ and ^d $P < 0.001$ for comparisons between type 2 diabetic patients and nondiabetic controls with MDRD-GFR > 60 ; ^b $P < 0.05$ and ^e $P < 0.001$ for comparisons between type 2 diabetic patients with MDRD-GFR < 60 and MDRD-GFR ≥ 60 . HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance.

resented as a Forest plot. In all cases, a P value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Clinical and biochemical characteristics are presented in Table 1 according to diabetes and renal function. Among type 2 diabetic patients, those with MDRD-GFR < 60 had 1.6-fold higher concentrations of FABP4 in plasma than those with MDRD-GFR ≥ 60 [53.3 (23.6) vs 33.7 (20.0) $\mu\text{g/L}$, $P < 0.001$], after adjustment for age and sex (Table 1). Both groups had significantly higher FABP4 concentrations than the

nondiabetic control group ($P < 0.001$) after adjustment for age and sex (Table 1). FABP4 concentrations in the diabetic group significantly increased ($P < 0.001$) across chronic kidney disease stages as defined by the National Kidney Foundation (17% of participants were in stage 1, 66% in stage 2, and 17% in stage 3) after adjustment for age and sex. This association was not observed in the control group ($P = 0.460$; 53% were in stage 1 and 47% in stage 2) (Fig. 1A).

Serum creatinine concentrations increased ($P < 0.001$) and MDRD-GFR decreased ($P < 0.001$) along with sex-adjusted tertiles of FABP4 in type 2 diabetic patients, but not in nondiabetic controls (Fig. 1B).

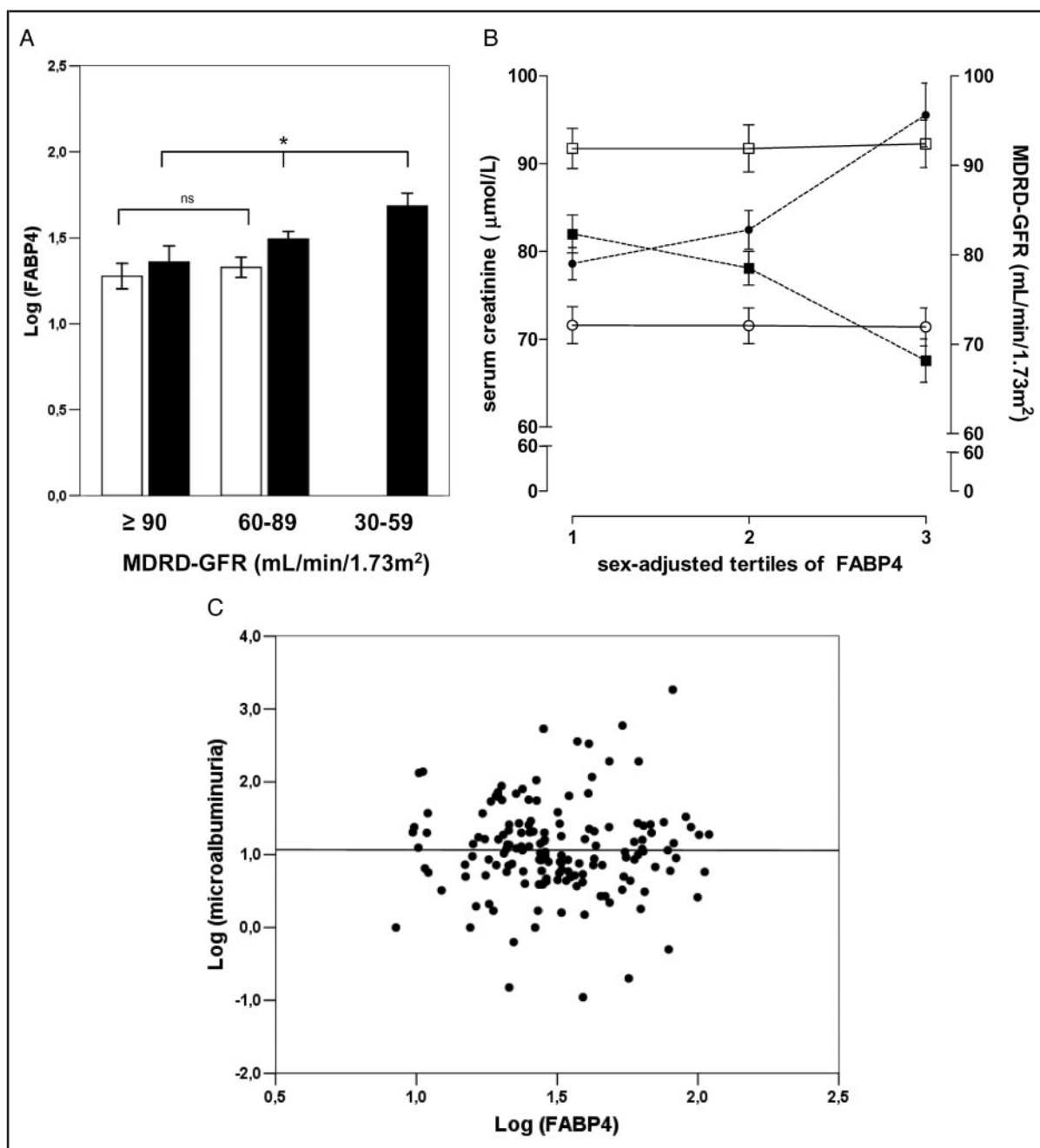


Fig. 1. A. Plasma FABP4 values stratified by stage of chronic kidney disease for nondiabetic controls (white bars) and type 2 diabetic patients (black bars).

Data are means \pm SE. Group comparisons by 1-way ANOVA were adjusted for age and sex using a univariate linear general model $*P < 0.001$. NS, non significant. B. Serum creatinine concentrations (circles) and MDRD-GFR values (squares) stratified by sex-adjusted tertiles of plasma FABP4 for nondiabetic controls (solid lines and white symbols) and type 2 diabetic patients (dotted lines and black symbols). Data are means \pm SE. Group comparisons by 1-way ANOVA and Bonferroni post hoc analysis. $*P < 0.001$. C. Relation of microalbuminuria and plasma FABP4 in type 2 diabetic patients. The solid line represents the regression line.

Table 2. FABP4 correlations in participants without microalbuminuria.

	All				Type 2 diabetic			
	Nondiabetic		Type 2 diabetic		MDRD-GFR ≥60		MDRD-GFR <60	
	<i>Rho</i>	<i>P</i>	<i>Rho</i>	<i>P</i>	<i>Rho</i>	<i>P</i>	<i>Rho</i>	<i>P</i>
Serum creatinine ^a	0.074	0.502	0.414	<0.001	0.151	0.135	0.188	0.427
MDRD-GFR	-0.153	0.159	-0.510	<0.001	-0.336	0.001	-0.204	0.363
Microalbuminuria ^a	—	—	0.060	0.511	0.057	0.576	0.057	0.812

Partial Pearson correlation coefficients were calculated using a partial correlation test adjusted for age, sex, and BMI.

^a Log transformed before analyses.

Among type 2 diabetic patients, 17% had microalbuminuria. Microalbuminuria was not correlated with FABP4 concentrations in all diabetic patients (Fig. 1C) or according to their renal function state (Table 2). We observed a significant direct correlation between plasma FABP4 and serum creatinine concentrations ($r = 0.446$, $P < 0.001$) and an inverse correlation between plasma FABP4 concentrations and MDRD-GFR values ($r = -0.511$, $P < 0.001$) in type 2 diabetic patients, but not in nondiabetic controls. These correlations remained when only those nonmicroalbuminuric type 2 diabetic patients were taken into consideration, after adjustment for age, sex, and BMI (Table 2). Both correlations remained after adjustment for the presence of hypertension, diabetes control, diabetes duration, plasma concentrations of triglycerides, LDL cholesterol, and HDL cholesterol ($r = -0.444$, $P < 0.001$ for MDRD-GFR and $r = 0.381$, $P < 0.001$ for creatinine). These correlations also remained in the presence of vascular disease and thiazolidinedione treatment in the statistical adjustment ($r = -0.485$, $P < 0.001$ for MDRD-GFR and $r = 0.424$, $P < 0.001$ for creatinine).

A binary logistic regression model—including age, BMI, diabetes duration, diabetes control, hypertension, vascular disease, high triglycerides, high LDL cholesterol, low HDL cholesterol cutoffs, and sex-adjusted tertiles of FABP4 as independent variables—revealed that type 2 diabetic patients in the highest sex-adjusted tertile of FABP4 concentrations had significantly higher adjusted ORs for having abnormal renal function (defined as moderately decreased GFR or stage 3 of chronic kidney disease) than those in the lower 2 tertiles [OR 7.5, (95%CI 1.8–30.7), $P = 0.005$ for highest vs middle tertile and OR 15.3 (3.1–76.4), $P = 0.001$ for highest vs lowest tertile] (Fig. 2).

Discussion

In this study, we report for the 1st time that FABP4 plasma concentrations are inversely associated with

GFR in a diabetic population but not in a healthy nondiabetic population. Interestingly, this association was observed even in those participants with MDRD-GFR concentrations >60 and without microalbuminuria. These findings suggest that FABP4 plasma concentrations could be an early clinical marker of renal function derangement in type 2 diabetic patients.

The physiological function of plasma FABP4 is not known. FABP4 plasma concentrations are associated with adiposity and metabolic syndrome and have been shown to be markers for metabolic risk (3, 4, 6, 11). Those individuals with higher FABP4 concentrations have a higher rate of metabolic syndrome development (11). Although there is a lot of recent information about FABP4 concentrations and metabolic syndrome, obesity, and type 2 diabetes, the association between FABP4 plasma concentrations and target organ damage has not been fully investigated. Recent studies show contradictory results about the role of plasma FABP4 on macrovascular disease (6, 12, 13, 26, 27); however, the association between plasma FABP4 and renal function has not been reported.

Because our diabetic group was selected between individuals not suffering from severe kidney disease, we cannot analyze the role of FABP4 as a marker of renal failure. However and more interestingly, we have observed a striking association with glomerular filtration markers. Lipocalins are small proteins that undergo glomerular filtration and subsequent tubular reabsorption (18), although specific data on FABP4 renal metabolism is lacking. Regarding our observations, small functional changes in renal filtration mechanisms could diminish the filtration rate of FABP4 or increase its reabsorption, leading to an increase in plasma concentrations. Microalbuminuria is the most reliable marker of kidney damage risk in diabetic and hypertensive patients (28–30). It has been considered an indicator of renal endothelial function and clearly predicts the development of chronic kidney disease in diabetic patients (31). However, as has

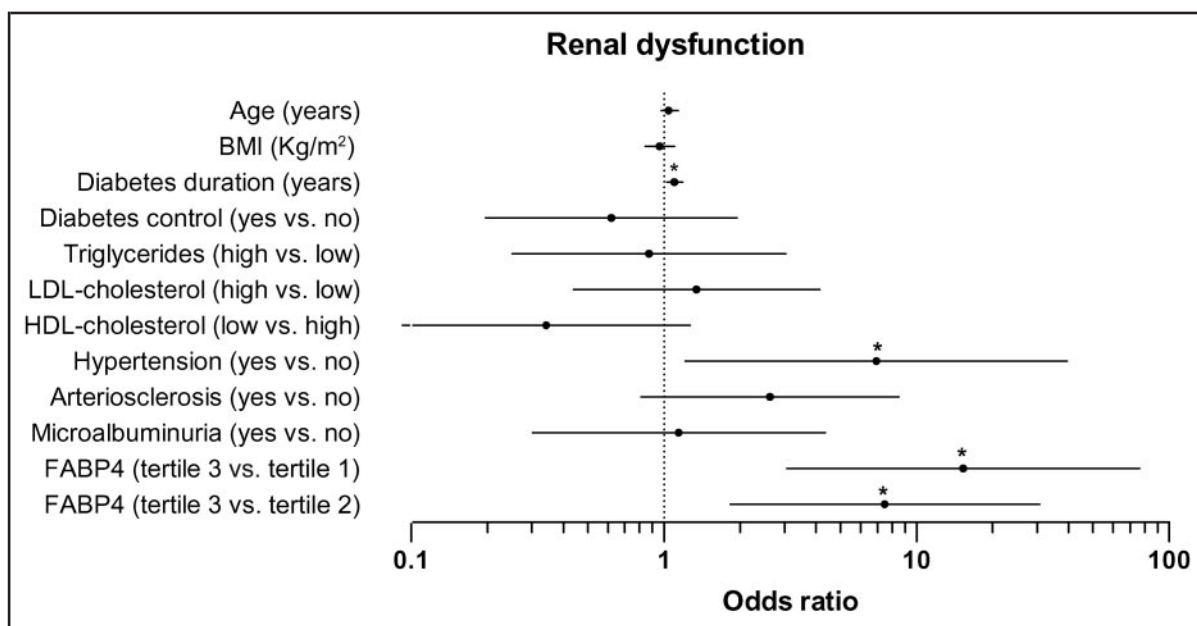


Fig. 2. Forrest plot for renal dysfunction (MDRD-GFR <60 mL/min/1.73 m²).

Horizontal lines represent adjusted ORs and 95% CIs obtained by binary regression. **P* < 0.05. Diabetes control (HbA_{1c} < 7%); hypertension (systolic blood pressure > 130 mm Hg, diastolic blood pressure > 85 mm Hg, or pharmacological treatment); high triglycerides (> 1.69 mmol/L); low HDL cholesterol [< 1.03 mmol/L (men) or < 1.29 mmol/L (women) or pharmacological treatment]; high LDL cholesterol (> 2.57 mmol/L). FABP4 tertiles were adjusted for sex.

been observed in our work, microalbuminuria is not related to glomerular function during the early stages of kidney disease. FABP4 concentrations were associated with glomerular filtration parameters and their plasma concentrations were, along with high blood pressure, the main determining factors for a reduced MDRD-GFR value independent of microalbuminuria. Moreover, FABP4 was inversely correlated with MDRD-GFR even in the absence of microalbuminuria in diabetic patients. This finding suggests that FABP4 and microalbuminuria are probably expressed during different forms of kidney dysfunction, as we have recently observed for RBP4 (21), another member of the lipocalin family. Because FABP4 is highly synthesized in obese individuals and those with metabolic syndrome, its biomarker utility could be higher in this group of patients.

We have no evidence about any direct deleterious effects of FABP4 on target organs. As mentioned above, in animal experiments, the deletion of the *FABP4* gene seems to be associated with vascular protection (26, 27); however, no data on effects in other organs are available. Although we have observed that high FABP4 concentrations are associated with increased oxidative stress and inflammatory markers in diabetes (6), the hypothesis that FABP4 could be an

etiological agent for renal disease would be rather speculative. FABP1 has been shown to be expressed by NEFA in renal tubular cells (14, 15), and its urine concentrations are considered a marker of renal interstitial damage (16, 17). There is no evidence about FABP4 expression in renal tissue.

High FABP4 plasma concentrations are associated with high plasma creatinine and low glomerular filtration rates (MDRD-GFR) in patients with type 2 diabetes even in the absence of microalbuminuria or clinically relevant alterations in creatinine and MDRD-GFR values. Along with its role as a metabolic derangement marker, plasma FABP4 concentrations should be taken into consideration as an early marker of kidney damage in type 2 diabetes.

Grant/funding Support: This study was supported by grants from the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS 01/0398, FIS PI02/1051, FIS PI05/1954 and RETIC RD06) Madrid, Spain. Iolanda Lázaro is a recipient of a predoctoral fellowship from the DURSI of the Generalitat de Catalunya and the European Social Funding (2005FIC 00303).

Financial Disclosures: None declared.

Acknowledgments: We thank A. Martínez-Vea, Professor of Nephrology, who provided successful advice regarding this work, and A. Ameijide for help with statistics.

References

1. Graham TE, Yang Q, Blucher M, Hammarstedt A, Ciaraldi TP, Henry RR, et al. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N Engl J Med* 2006;354:2552–63.
2. Wang Y, Lam KS, Kraegen EW, Sweeney G, Zhang J, Tso AW, et al. Lipocalin-2 is an inflammatory marker closely associated with obesity, insulin resistance, and hyperglycemia in humans. *Clin Chem* 2007;53:34–41.
3. Xu A, Wang Y, Xu JY, Stejskal D, Tam S, Zhang J, et al. Adipocyte fatty acid-binding protein is a plasma biomarker closely associated with obesity and metabolic syndrome. *Clin Chem* 2006;52:405–13.
4. Stejskal D, Karpisek M. Adipocyte fatty acid binding protein in a Caucasian population: a new marker of metabolic syndrome? *Eur J Clin Invest* 2006;36:621–5.
5. Yang Q, Graham TE, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolotny JM, et al. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature (Lond)* 2005;436:356–62.
6. Cabre A, Lazaro I, Girona J, Manzanares J, Marimon F, Plana N, et al. Fatty acid binding protein 4 is increased in metabolic syndrome and with thiazolidinedione treatment in diabetic patients. *Atherosclerosis* 2007;195:e150–8.
7. Fisher RM, Eriksson P, Hoffstedt J, Hotamisligil GS, Thorne A, Ryden M, et al. Fatty acid binding protein expression in different adipose tissue depots from lean and obese individuals. *Diabetologia* 2001;44:1268–73.
8. Fu Y, Luo N, Lopes-Virella MF, Garvey WT. The adipocyte lipid binding protein (ALBP/aP2) gene facilitates foam cell formation in human THP-1 macrophages. *Atherosclerosis* 2002;165:259–69.
9. Fu Y, Luo L, Luo N, Garvey WT. Lipid metabolism mediated by adipocyte lipid binding protein (ALBP/aP2) gene expression in human THP-1 macrophages. *Atherosclerosis* 2006;188:102–11.
10. Makowski L, Brittingham KC, Reynolds JM, Suttles J, Hotamisligil GS. The fatty acid-binding protein, aP2, coordinates macrophage cholesterol trafficking and inflammatory activity. Macrophage expression of aP2 impacts peroxisome proliferator-activated receptor gamma and Ikap-paB kinase activities. *J Biol Chem* 2005;280:12888–95.
11. Xu A, Tso AW, Cheung BM, Wang Y, Wat NM, Fong CH, et al. Circulating adipocyte-fatty acid binding protein levels predict the development of the metabolic syndrome: a 5-year prospective study. *Circulation* 2007;115:1537–43.
12. Tuncman G, Erbay E, Hom X, De Vivo I, Campos H, Rimm EB, Hotamisligil GS. A genetic variant at the fatty acid-binding protein aP2 locus reduces the risk for hypertriglyceridemia, type 2 diabetes, and cardiovascular disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:6970–5.
13. Yeung DC, Xu A, Cheung CW, Wat NM, Yau MH, Fong CH, et al. Serum adipocyte fatty acid-binding protein levels were independently associated with carotid atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:1796–1802.
14. Maatman RG, Van Kuppevelt TH, Veerkamp JH. Two types of fatty acid-binding protein in human kidney: isolation, characterization and localization. *Biochem J* 1991;273(Pt 3):759–66.
15. Maatman RG, van de Westerlo EM, van Kuppevelt TH, Veerkamp JH. Molecular identification of the liver- and the heart-type fatty acid-binding proteins in human and rat kidney. Use of the reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Biochem J* 1992;288(Pt 1):285–90.
16. Kamijo A, Sugaya T, Hikawa A, Okada M, Okumura F, Yamanouchi M, et al. Urinary excretion of fatty acid-binding protein reflects stress overload on the proximal tubules. *Am J Pathol* 2004;165:1243–55.
17. Kamijo A, Sugaya T, Hikawa A, Yamanouchi M, Hirata Y, Ishimitsu T, et al. Urinary liver-type fatty acid binding protein as a useful biomarker in chronic kidney disease. *Mol Cell Biochem* 2006;284:175–82.
18. Flower DR, North AC, Sansom CE. The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochim Biophys Acta* 2000;1482:9–24.
19. Mori K, Nakao K. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as the real-time indicator of active kidney damage. *Kidney Int* 2007;71:967–70.
20. Pitashny M, Schwartz N, Qing X, Hojaili B, Arnow C, Mackay M, Putterman C. Urinary lipocalin-2 is associated with renal disease activity in human lupus nephritis. *Arthritis Rheum* 2007;56:1894–903.
21. Cabre A, Lazaro I, Girona J, Manzanares J, Marimon F, Plana N, et al. Retinol-binding protein 4 as a plasma biomarker of renal dysfunction and cardiovascular disease in type 2 diabetes. *J Intern Med* 2007;262:496–503.
22. Peters AL, Schriger DL. The new diagnostic criteria for diabetes: the impact on management of diabetes and macrovascular risk factors. *Am J Med* 1998;105:155–9S.
23. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* 1999;130:461–70.
24. Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 1976;16:31–41.
25. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis* 2002;39:S1–266.
26. Makowski L, Boord JB, Maeda K, Babaev VR, Uysal KT, Morgan MA, et al. Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis. *Nat Med* 2001;7:699–705.
27. Boord JB, Maeda K, Makowski L, Babaev VR, Fazio S, Linton MF, et al. Combined adipocyte-macrophage fatty acid-binding protein deficiency improves metabolism, atherosclerosis, and survival in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2004;110:1492–8.
28. Lambers Heerspink HJ, Brinkman JW, Bakker SJ, Gansevoort RT, de Zeeuw D. Update on microalbuminuria as a biomarker in renal and cardiovascular disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2006;15:631–6.
29. Reboli G, Gentile G, Angeli F, Verdecchia P. Microalbuminuria and hypertension. *Minerva Med* 2005;96:261–75.
30. Barri YM. Hypertension and kidney disease: a deadly connection. *Curr Cardiol Rep* 2006;8:411–7.
31. Ochodnický P, Vettoretti S, Henning RH, Buikema H, Van Dokkum RP, de Zeeuw D. Endothelial dysfunction in chronic kidney disease: determinant of susceptibility to end-organ damage and therapeutic response. *J Nephrol* 2006;19:246–58.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
REGULACIÓ DE FABP4 DEPENDENT DE NRF2 EN MACRÒFAGS
Iolanda Lázaro López
ISBN:978-84-693-8852-5/DL:T.1952-2010

Lifestyle changes lower Adipocyte Fatty Acid-Binding Protein plasma concentration in obese patients at cardiovascular risk

Iolanda Lázaro, MPHIL; Raimón Ferré, MD; Núria Plana, MD, PHD; Gemma Aragonès, MPHIL; Josefa Girona, PHD; Jordi Merino, MPHIL; Mercedes Heras, BS; Lluís Masana, MD, PHD & Anna Cabré, PHD.

Unitat de Medicina Vasculat i Metabolisme, Unitat de Recerca de Lípids i Arteriosclerosi, Departament de Medicina Interna, Hospital Universitari Sant Joan, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain. CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Barcelona, Spain.

Running headline: FABP4 and lifestyle changes

Correspondence to: Lluís Masana, PhD, MD, Unitat de Medicina Vasculat i Metabolisme, Unitat de Recerca de Lípids i Arteriosclerosi, Hospital Universitari Sant Joan, Universitat Rovira i Virgili. C. Sant Joan s/n, 43201 Reus, Spain. Tel.: +34 977759366; fax: +34 977759322

E-mail: luis.masana@urv.cat

Objective: To analyze the impact of lifestyle changes on FABP4 plasma levels in patients with central obesity and moderate cardiovascular (CV) risk.

Methods: 140 patients without previous CV disease with central obesity and intermediate CV risk were enrolled in a one year prospective study to evaluate the impact of therapeutic lifestyle changes on CV risk, focusing on tobacco, nutritional education and physical activity (PA). FABP4 was determined before and after one-year intervention period. Anthropometry, general biochemical and vascular imaging variables were also assessed.

Results: FABP4 variation was inversely associated to PA changes (MET·h wk⁻¹). FABP4 significantly decreased in patients with increased PA, whereas it increased with PA reduction. FABP4 changes were also associated with modifications in body mass index and insulin resistance parameters; however, the correlations between PA and FABP4 remained after adjusting for these confounding variables. Changes in PA were the main predictors of FABP4 modifications. FABP4 reductions were directly associated with LDL-cholesterol and APOB variations. Neither tobacco cessation nor diet composition modified FABP4 concentrations.

Conclusion: FABP4 plasma levels can be decreased by increasing aerobic PA. PA acts independently of weight reduction on FABP4 concentrations. If a causal role of FABP4 on metabolic and vascular alterations could be established, our results would add new positive effects of both PA and avoiding obesity on metabolic and CV risk.

Keywords: FABP4, body weight loss, physical activity

Introduction

The adipocyte fatty acid-binding protein, also known as FABP4 or aP2, is predominantly expressed in the adipose tissue, and it is one of the most abundant proteins in the cytoplasm of adipocytes and macrophages¹. FABP4 deficiency in animal models is linked to reduced lipolysis^{2,3} and protects from hyperinsulinemia, hyperglycemia and insulin resistance in induced-obesity models⁴ and from atherosclerosis in hypercholesterolemic mouse models.⁵⁻⁷ Additionally, Furuhashi *et al.* demonstrated that an inhibitor of FABP4 improves type 2 diabetes control and protects against severe atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice.⁸ In humans, FABP4 has been detected in the

circulation,⁹ but its biological function is not yet clearly understood. Circulating FABP4 concentrations are associated with anthropometric parameters and body fat distribution and are increased in overweight and obese compared to lean subjects.^{9,10} Paradoxically, circulating FABP4 levels increase during profound fat mass loss induced by bariatric surgery.¹¹ It has been proposed that FABP4 is a marker of increased lipolytic activity in this situation. FABP4 levels have also been suggested to be a predictor of type 2 diabetes and metabolic syndrome development, independent of obesity and insulin resistance.^{12,13} There is indirect evidence that circulating FABP4 could mediate insulin resistance, atherogenic dyslipidemia and

promote inflammation.^{14,15} Increased circulating FABP4 has been associated with carotid intima-media thickening,^{16,17} with the number of stenotic coronary arteries¹⁸ and with a greater coronary plaque burden assessed by intravascular sonography.¹⁹ Moreover, a FABP4 genetic variant has been associated with reduced risk of cardiovascular (CV) disease.²⁰

Considering that high FABP4 plasma levels could contribute to metabolic and vascular alterations, investigating the mechanisms associated with FABP4 plasma level reductions is warranted. Little research has addressed the impact of drugs on circulating FABP4 levels. In diabetic subjects, thiazolidinedione treatment has been linked to increases in FABP4 levels.¹⁵ Fenofibrate treatment has no effect,²¹ whereas atorvastatin reduces FABP4 levels in hyperlipidemic subjects.²² Despite the observation that FABP4 seems to be closely associated to adiposity and fat distribution, data about the impact of lifestyle changes on FABP4 are scarce. FABP4 reductions have been shown during early refeeding of female subjects with anorexia nervosa in parallel to weight gain and concomitant gain in fat mass.²³ One study postulated that changes in FABP4 levels may discriminate between permanent and temporary body weight loss in response to diet restriction.²⁴ Only two studies conducted in healthy Asian women²⁵ and obese children²⁶ have prospectively investigated the impact of physical activity (PA) and diet on FABP4, and they showed that weight loss was linked to FABP4 reduction. However, a similar study in obese PCOS women produced no effects on circulating FABP4.²⁷

No studies concerning the impact of a global lifestyle change on FABP4 levels have been performed in adult men and women with elevated CV risk. Considering the effect of FABP4 on metabolic and vascular processes, therapeutic actions that decrease their levels would be of great clinical interest.

Subjects and Methods

Patients and study design

One hundred and forty patients, 105 men and 35 women, aged 22-79 years, with abdominal obesity and increased global CV risk attending the vascular medicine and metabolism unit of our hospital and participating in a prospective

study on the impact of therapeutic lifestyle changes on CV risk²⁸ were included in the study. Patients were advised to follow a therapeutic lifestyle change focusing on increasing leisure PA, proper nutrition and smoking cessation. They were evaluated before and after a one-year intervention period. The inclusion criteria were abdominal obesity (≥ 102 cm men; ≥ 88 cm women) and increased global CV risk because of type 2 diabetes or a global CV risk according to a 10-year Framingham Risk Score between 5-20%. Patients with previous CV disease, neoplasm antecedents or other severe chronic disease were not included. The usual pharmacological treatment was maintained or modified if necessary according to clinical indications.

A complete physical, anthropometry, general biochemical and vascular evaluation were performed before and after the intervention period. FABP4 plasma levels were measured before and after a one-year follow-up. The ethical committee of the hospital approved the study and all subjects gave written informed consent.

Therapeutic lifestyle changes

Diet was evaluated by frequency questionnaires and 24h recall records over three days administrated at the beginning and end of the study. Patients were advised to follow a Mediterranean type diet adapted to individual energy requirements. Leisure PA was assessed by the Minnesota Questionnaire, adapted to the Spanish population,²⁹ at baseline and at a one-year follow-up. All participants were advised to increase their PA reaching at least an additional energy expenditure of 400-500 kcal day⁻¹ by aerobic low-to-moderate intensity activities for 30-45 minutes, five times per week. The recommended activities included walking at a moderate pace, stationary cycling, or gently swimming. PA was expressed as metabolic equivalent hour per week (MET·h wk⁻¹). Levels of total PA were categorized as low (< 20 MET·h wk⁻¹) and high (> 40 MET·h wk⁻¹) before and after follow-up. Patients were classified according changes from one level to another after the follow-up period as increasing, maintaining or decreasing PA groups.

Smoking status was determined by the standard questionnaires when indicated.³⁰

Smokers were advised to stop tobacco consumption and pharmacological and psychological support was given when necessary. Follow-up medical and dietitian visits were performed at four-month intervals.

Biochemical determinations

FABP4 plasma levels were determined by commercial ELISA kits (Bio Vendor Laboratory Medicine Inc., Brno, Czech Republic). Results were calculated using computerized data reduction of absorbance for the standards versus concentrations using a four-parameter polynomial regression model and expressed as $\mu\text{g/l}$. The precision of this assay was 5.3% intra-assay and 3.9% inter-assay coefficients of variation. The antibodies used in the human FABP4 ELISA are highly specific for human FABP4, with no detectable cross-reactivity to human FABP1, FABP2, FABP3 or FABP5.

Standard biochemical parameters were determined via the usual methods. Cholesterol, triglycerides, APO A1, APO B100, direct LDL-cholesterol and HDL-cholesterol were measured using enzymatic and immunoturbidimetric assays (Spinreact, SA, Spain) adapted to the Cobas Mira Plus autoanalyzer (Roche Diagnostics, Spain).

Statistical analyses

Statistical tests and corresponding *P*-values were two-sided. In all cases, a *P*-value of less than 0.05 was considered statistically significant. SPSS version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) was used for all statistical analyses. Normality distribution was assessed with the Kolmogorov-Smirnov test. Log-transformation was performed before analyses when variables had a skewed distribution. Spearman correlation tests were used to analyze bivariate associations between changes in FABP4 and changes in other variables. Spearman correlation results according to PA changes were plotted using the network drawing software Cytoscape version 2.6.3.³¹ In the display, a node represents changes in variable and a link between nodes represents positive Spearman correlation values. Different rho values are represented as long and dotted lines for those significant correlations between $0.218 < \rho < 0.263$ or as short and solid lines for those between $0.491 < \rho < 0.539$. Square and

circle nodes were used for significant correlations in the increasing and non-increasing PA group, respectively. Partial bivariate correlation tests were used to adjust bivariate associations by changes in weight or body mass index. Data from baseline and at a one-year follow-up are presented as mean (95% confidence interval for the mean) for continuous variables and as frequencies for categorical variables. The observed differences of variables before and after the intervention period within-group were analyzed using the paired *t*-test, the Wilcoxon test or chi-squared test, as appropriate. Changes in variables were calculated as one-year follow-up values minus baseline values. The effects of intervention on different continuous variables between-groups were assessed by comparing changes in variables using Kruskal-Wallis tests. One-way ANOVA was used for comparisons of FABP4 between smokers and non-smokers at baseline.

Forward stepwise multiple linear regression analyses were performed to find the changes in variables with an independent significant association with changes in FABP4. Variables with a high association ($r > 0.700$, $p < 0.05$) were not included in the same model. The accepted model was the one with a higher adjusted R^2 and lower number of variables included. The final parameters were obtained introducing the chosen variables in a linear regression analysis. We report the B coefficient values and their 95% confidence intervals (CI).

Results

Table 1 shows basal and post-intervention period values of anthropometry, PA, energy intake, lipids and pharmacological treatment of patients distributed according to their PA change category. We observed that changes in circulating FABP4 levels were inversely correlated with changes in PA in the whole group ($r = -0.171$, $P = 0.044$) (Figure 1). Moreover, this association between PA and FABP4 was enhanced when excluding participants that did not change their PA ($r = -0.348$, $P = 0.024$) (Figure 1). Increments of FABP4 correlated positively with increments of weight ($r = 0.211$, $P = 0.012$), waist circumference ($r = 0.190$, $P = 0.024$) and body mass index ($r = 0.213$, $P = 0.011$) in all participants. The association between PA and

FABP4 increments were conserved after adjusting for weight and body mass index changes ($r = -0.167$, $P = 0.050$ and $r = -0.184$, $P = 0.030$; respectively). Changes in FABP4 levels were also inversely correlated with changes in APO A1 levels ($r = -0.201$, $P = 0.017$) and positively correlated with changes in insulin levels ($r = 0.207$, $P = 0.014$) in all participants. All of these associations were lost in the group of patients with increasing PA (Figure 2). However, the non-increasing PA group conserved the positive associations between changes in FABP4 and changes in insulin and anthropometric parameters (Figure 2).

Figure 3 shows the changes in circulating FABP4 levels regarding the three categories of PA modification. Increasing PA compared to maintaining or even decreasing PA, significantly reduced FABP4 levels. Moreover, independently of the initial levels of PA, increasing versus decreasing PA account for an average decrease of FABP4 levels of 10.3 units ($P < 0.015$). The reduction in FABP4 levels observed in the increasing PA group was directly associated with a reduction in APO B100 and LDL cholesterol levels ($r = 0.491$, $P = 0.017$ and $r = 0.539$, $P = 0.008$; respectively) (Figure 2).

As expected, in the decreasing PA group, weight and body mass index increased significantly ($P = 0.002$ and $P = 0.020$, respectively), and the same tendency was observed for waist circumference ($P = 0.123$) (Table 1). These parameters were not modified in the maintaining PA group whereas in the increasing PA group, waist circumference, weight and body mass index were significantly reduced ($P = 0.009$, $P = 0.003$ and $P = 0.004$, respectively) (Table 1). Moreover, the increment of MET·h wk⁻¹ inversely correlated with variations in weight ($r = -0.407$, $P < 0.001$), waist circumference ($r = -0.359$, $P < 0.001$) and body mass index ($r = -0.405$, $P < 0.001$). However, those patients who reduced weight without changes in PA (maintaining PA group), showed no changes in their circulating FABP4 levels after the intervention period (30.6 (95%CI, 25.9 – 35.2) µg l⁻¹ at the one-year follow-up vs. 31.3 (95%CI, 27.0 – 35.6) µg l⁻¹ at baseline, $P = 0.556$). Those patients who increased PA without changes in weight showed reduced circulating FABP4 levels after the intervention period (28.0 (95%CI, 8.5 – 47.5) µg l⁻¹ at the one-year follow-up vs. 34.7 (95%CI, 9.7 – 59.8) µg l⁻¹ at baseline, $P = 0.046$).

Total caloric intake was not altered during the study regardless of the PA group (Table 1). Dietary parameters weren't significantly associated with FABP4 modifications (data not shown).

There were no differences in FABP4 levels between smokers and non-smokers (29.2 (95%CI, 24.9 – 33.4) µg l⁻¹ vs. 29.6 (95%CI, 26.7 – 32.5) µg l⁻¹, respectively, $P = 0.605$) at baseline and quitting smoking was not associated with changes in FABP4 levels ($P = 0.541$).

Finally, stepwise multiple regression analyses were performed to evaluate the independent predictors of changes in FABP4 levels. In all participants, changes in PA were selected as independent factors contributing to FABP4 changes ($P = 0.015$). Excluding from the analyses those participants with no changes in PA, changes in APO A1 and in PA were the independent factors associated with FABP4 changes ($B = -0.409$ (95%CI, -0.812 – -0.006, $P = 0.016$ and $B = -0.206$ (95%CI, -0.371 – -0.040, $P = 0.047$), respectively). Changes in PA were the main contributor (15%) to FABP4 changes. In all cases, changes in anthropometric parameters were excluded from the generated models.

Discussion

This study is the first to communicate that an increase in PA, regardless of weight loss, during a therapeutic lifestyle change program, leads to a decrease in circulating FABP4 in patients at elevated CV risk. Weight loss was also associated with FABP4 reduction. Variations in other components of the therapeutic lifestyle changes, such as smoking and diet, did not contribute to FABP4 modifications. Our group and others have already communicated that FABP4 is associated with body fat mass.^{9,15} It has been suggested that FABP4 changes reflect fat mass dynamics and nutritional status.^{11,23,24,32} Fisher *et al.* demonstrated a decreased expression of FABP4 in the subcutaneous adipose tissue of subjects with weight loss.³³ Because PA was also associated with body weight reduction in our study, it would be logical to consider that the impact of PA on FABP4 levels could be mediated by fat mass reduction. However, in our study, the inverse correlation between PA and FABP4 remained after adjustment for body weight

reduction. Moreover, those subjects who reduced their weight without increasing PA did not modify their FABP4 levels, and conversely, those patients who increased their PA without succeeding in lowering weight significantly decreased their FABP4 levels. Only the change in PA independent of changes in weight, waist circumference or body mass index, was the determinant of FABP4 changes in a regression analysis. Thus, we consider that increasing PA reduces FABP4 independently and additionally to the effect of weight loss. In line with our results, Choi *et al.* and Reinher *et al.* showed a decrease in FABP4 levels after physical training and weight loss in a group of obese women and children, respectively,^{25,26} whereas Möhlig *et al.* observed no FABP4 changes after a four-month lifestyle intervention period in PCOS patients.²⁷

The mechanisms responsible for changes in circulating FABP4 remain unknown. Adipose tissue is considered to be the major contributor of FABP4 in the circulation; therefore, any body-weight loss will result in a decrease in FABP4. However, as commented above, the impact of PA on FABP4 seems to be only partially mediated by changes in fat depots, thus, the direct impact of PA mediated by increasing energy expenditure, fat oxidation, etc., must be taken into account. Interestingly, it has been observed that endurance exercise training is associated with increased accumulation of FABP4 in skeletal muscle fibers,^{34,35} probably due to an increased lipolysis in the tissue or perhaps a higher FABP4 tissue retention could result in its plasma reduction. FABP4 variations, as expected, were directly correlated with increments in body fat and insulin function parameters. Interestingly, in those patients increasing PA, these correlations were lost whereas strong associations were observed between FABP4 changes and LDL cholesterol and APO B100 variations. The association between FABP4 and lipid metabolism has been previously reported. We have communicated an association between FABP4 and atherogenic dyslipidemia in type 2 diabetic patients.¹⁴ FABP4 deficient mice have lower total and non-HDL cholesterol levels.³⁶ Xu *et al.* demonstrated a positive association between FABP4 and LDL-cholesterol in non-obese subjects,⁹ and recently, Engl *et al.* demonstrated that reductions in FABP4 levels were the predictors of changes in total cholesterol levels during the refeeding of patients with anorexia nervosa.²³ Likewise, Sihanidou *et al.* reported that total cholesterol

and weight gain were the only independent predictors of FABP4 levels in preterm infants.³⁷ Our results suggest that while FABP4 is naturally associated with body fat and insulin dependent metabolism, PA leads to metabolic changes modifying both FABP4 and LDL metabolism components.

High FABP4 plasma levels are considered to be metabolic and vascular damage markers, but its strong association with metabolic alteration and vascular lesion suggests a possible causal effect. Moreover, it has been shown, *in vitro*, that FABP4 interferes with the insulin receptor signalling cascade,³⁸ and, recently, it was communicated that FABP4 induces functional alterations to cardiomyocytes.³⁹ Therefore, knowledge of mechanisms regulating circulating FABP4 reductions, such as increasing PA and weight loss, will allow for new therapeutic strategies to prevent metabolic and vascular risk in obese patients.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS PI051954 and PI081409) Madrid, Spain. CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas is an ISCIII project.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Makowski L, Hotamisligil GS. Fatty acid binding proteins--the evolutionary crossroads of inflammatory and metabolic responses. *J Nutr* 2004; **134**: 2464S-2468S.
2. Coe NR, Simpson MA, Bernlohr DA. Targeted disruption of the adipocyte lipid-binding protein (aP2 protein) gene impairs fat cell lipolysis and increases cellular fatty acid levels. *J Lipid Res* 1999; **40**: 967-972.
3. Scheja L, Makowski L, Uysal KT *et al.* Altered insulin secretion associated with reduced lipolytic efficiency in aP2^{-/-} mice. *Diabetes* 1999; **48**: 1987-1994.

4. Hotamisligil GS, Johnson RS, Distel RJ *et al.* Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein. *Science* 1996; **274**: 1377-1379.
5. Makowski L, Boord JB, Maeda K *et al.* Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis. *Nat Med* 2001; **7**: 699-705.
6. Boord JB, Maeda K, Makowski L *et al.* Adipocyte fatty acid-binding protein, aP2, alters late atherosclerotic lesion formation in severe hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; **22**: 1686-1691.
7. Boord JB, Maeda K, Makowski L *et al.* Combined adipocyte-macrophage fatty acid-binding protein deficiency improves metabolism, atherosclerosis, and survival in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2004; **110**: 1492-1498.
8. Furuhashi M, Tuncman G, Gorgun CZ *et al.* Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2. *Nature* 2007; **447**: 959-965.
9. Xu A, Wang Y, Xu JY *et al.* Adipocyte fatty acid-binding protein is a plasma biomarker closely associated with obesity and metabolic syndrome. *Clin Chem* 2006; **52**: 405-413.
10. Yun KE, Kim SM, Choi KM *et al.* Association between adipocyte fatty acid-binding protein levels and childhood obesity in Korean children. *Metabolism* 2009; **58**: 798-802.
11. Engl J, Ciardi C, Tatarczyk T *et al.* A-FABP--a biomarker associated with the metabolic syndrome and/or an indicator of weight change? *Obesity* (Silver Spring) 2008; **16**: 1838-1842.
12. Tso AW, Xu A, Sham PC *et al.* Serum adipocyte fatty acid binding protein as a new biomarker predicting the development of type 2 diabetes: a 10-year prospective study in a Chinese cohort. *Diabetes Care* 2007; **30**: 2667-2672.
13. Xu A, Tso AW, Cheung BM *et al.* Circulating adipocyte-fatty acid binding protein levels predict the development of the metabolic syndrome: a 5-year prospective study. *Circulation* 2007; **115**: 1537-1543.
14. Cabré A, Lázaro I, Girona J *et al.* Plasma fatty acid binding protein 4 is associated with atherogenic dyslipidemia in diabetes. *J Lipid Res* 2008; **49**: 1746-1751.
15. Cabré A, Lázaro I, Girona J *et al.* Fatty acid binding protein 4 is increased in metabolic syndrome and with thiazolidinedione treatment in diabetic patients. *Atherosclerosis* 2007; **195**: e150-158.
16. Yeung DC, Xu A, Cheung CW *et al.* Serum adipocyte fatty acid-binding protein levels were independently associated with carotid atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; **27**: 1796-1802.
17. Yeung DC, Wang Y, Xu A *et al.* Epidermal fatty-acid-binding protein: a new circulating biomarker associated with cardio-metabolic risk factors and carotid atherosclerosis. *Eur Heart J* 2008; **29**: 2156-2163.
18. Rhee EJ, Lee WY, Park CY *et al.* The association of serum adipocyte fatty acid-binding protein with coronary artery disease in Korean adults. *Eur J Endocrinol* 2009; **160**: 165-172.
19. Miyoshi T, Onoue G, Hirohata A *et al.* Serum adipocyte fatty acid-binding protein is independently associated with coronary atherosclerotic burden measured by intravascular ultrasound. *Atherosclerosis* 2010; e-pub ahead of print 4 February 2010; doi:10.1016/j.atherosclerosis.2010.01.032
20. Tuncman G, Erbay E, Hom X *et al.* A genetic variant at the fatty acid-binding protein aP2 locus reduces the risk for hypertriglyceridemia, type 2 diabetes, and cardiovascular disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**: 6970-6975.
21. Haluzik MM, Anderlova K, Dolezalova R *et al.* Serum adipocyte fatty acid binding protein levels in patients with type 2 diabetes mellitus and obesity: the influence of fenofibrate treatment. *Physiol Res* 2009; **58**: 93-99.
22. Karpisek M, Stejskal D, Kotolova H *et al.* Treatment with atorvastatin reduces serum adipocyte-fatty acid binding protein value in patients with hyperlipidaemia. *Eur J Clin Invest* 2007; **37**: 637-642.
23. Engl J, Tschoner A, Willis M *et al.* Adipocyte fatty acid binding protein during refeeding of female patients with anorexia nervosa. *Eur J Nutr* 2009; **48**: 403-408.
24. Stejskal D, Karpisek M, Bronsky J. Serum adipocyte-fatty acid binding protein discriminates patients with permanent and temporary body weight loss. *J Clin Lab Anal* 2008; **22**: 380-382.
25. Choi KM, Kim TN, Yoo HJ *et al.* Effect of exercise training on A-FABP, lipocalin-2 and RBP4 levels in obese women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2009; **70**: 569-574.
26. Reinehr T, Stoffel-Wagner B, Roth CL. Adipocyte fatty acid-binding protein in obese children before and after weight loss. *Metabolism* 2007; **56**: 1735-1741.

27. Mohlig M, Weickert MO, Ghadamgadi E *et al.* Adipocyte fatty acid-binding protein is associated with markers of obesity, but is an unlikely link between obesity, insulin resistance, and hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome women. *Eur J Endocrinol* 2007; **157**: 195-200.
28. Ferré R, Plana N, Merino J *et al.* Effects of therapeutic lifestyle changes on peripheral artery tonometry in patients with abdominal obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* (in press).
29. Elosua R, Garcia M, Aguilar A *et al.* Validation of the Minnesota Leisure Time Physical Activity Questionnaire In Spanish Women. Investigators of the MARATDON Group. *Med Sci Sports Exerc* 2000; **32**: 1431-1437.
30. DiClemente CC, Prochaska JO, Fairhurst SK *et al.* The process of smoking cessation: an analysis of precontemplation, contemplation, and preparation stages of change. *J Consult Clin Psychol* 1991; **59**: 295-304.
31. Shannon P, Markiel A, Ozier O *et al.* Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 2003; **13**: 2498-2504.
32. Haider DG, Schindler K, Bohdjalian A *et al.* Plasma adipocyte and epidermal fatty acid binding protein is reduced after weight loss in obesity. *Diabetes Obes Metab* 2007; **9**: 761-763.
33. Fisher RM, Eriksson P, Hoffstedt J *et al.* Fatty acid binding protein expression in different adipose tissue depots from lean and obese individuals. *Diabetologia* 2001; **44**: 1268-1273.
34. Timmons JA, Larsson O, Jansson E *et al.* Human muscle gene expression responses to endurance training provide a novel perspective on Duchenne muscular dystrophy. *Faseb J* 2005; **19**: 750-760.
35. Fischer H, Gustafsson T, Sundberg CJ *et al.* Fatty acid binding protein 4 in human skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; **346**: 125-130.
36. Perrella MA, Pellacani A, Layne MD *et al.* Absence of adipocyte fatty acid binding protein prevents the development of accelerated atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Faseb J* 2001; **15**: 1774-1776.
37. Siahianidou T, Margeli A, Davradou M *et al.* Circulating adipocyte fatty acid binding protein

levels in healthy preterm infants: Positive correlation with weight gain and total-cholesterol levels. *Early Hum Dev* 2010; e-pub ahead of print 13 March 2010; doi:10.1016/j.earlhumdev.2010.02.008.

38. Hresko RC, Hoffman RD, Flores-Riveros JR *et al.* Insulin receptor tyrosine kinase-catalyzed phosphorylation of 422(aP2) protein. Substrate activation by long-chain fatty acid. *J Biol Chem* 1990; **265**: 21075-21085.

39. Lamounier-Zepter V, Look C, Alvarez J *et al.* Adipocyte fatty acid-binding protein suppresses cardiomyocyte contraction: a new link between obesity and heart disease. *Circ Res* 2009; **105**: 326-334.

Legends to Figures

Figure 1. Association of changes in circulating FABP4 levels (one-year follow-up FABP4 value minus baseline FABP4 value) with changes in PA (one-year follow-up MET·h wk⁻¹ value minus baseline MET·h wk⁻¹ value). Solid line = all participants ($n = 140$); dotted line = participants with changes in PA ($n = 42$).

Figure 2. Illustration of Spearman correlation coefficients (ρ) between changes in variables (one-year follow-up values minus baseline values) and changes in FABP4 (one-year follow-up FABP4 value minus baseline FABP4 values) created with the software Cytoscape.³¹ The nodes represent changes in variables and a link between nodes indicates significant correlation between values. Different ρ are represented as long and dotted lines for those correlations between $0.218 < \rho < 0.263$ or short and solid lines for those correlations between $0.491 < \rho < 0.539$. Square and circle nodes were used for the correlations in the increasing and non-increasing PA group, respectively.

Figure 3. Column plot showing changes in circulating FABP4 levels (one-year follow-up FABP4 value minus baseline FABP4 value) in decreasing ($n = 19$), maintaining ($n = 98$) or increasing ($n = 23$) PA groups of patients. * $P < 0.05$ for the comparisons between categories of PA evolution.

Table 1. Participant characteristics at baseline and after one-year intervention divided by categories of changes in physical activity.

Variables	Decreasing PA (n = 19)		Maintaining PA (n = 98)		Increasing PA (n = 23)	
	Baseline	Follow-up	Baseline	Follow-up	Baseline	Follow-up
Clinical data						
Gender (men, %)	79		71		87	
Age (years)	55 (51–59)		54 (52–56)		53 (49–58)	
Weight (kg)	91.4 (86.2–96.6)	94.1 (88.5–99.7)*	87.9 (85.0–90.8)	87.7 (84.6–90.7)	88.9 (84.0–93.9)	86.3 (81.1–91.5)*
BMI (kg m ⁻²)	32.8 (30.8–34.7)	33.7 (31.8–35.6)*	31.4 (30.7–32.1)	31.3 (30.5–32.2)	31.5 (30.1–32.9)	30.5 (29.0–32.1)*
Waist circumference (cm)	107.1 (103.2–111.0)	108.2 (104.5–111.8)	105.6 (103.8–107.5)	104.8 (102.7–106.9)	103.4 (100.1–106.6)	99.9 (96.4–103.5)*
Lifestyle parameters						
PA (MET·h wk ⁻¹)	42.4 (36.7–48.0)	23.2 (17.8–28.7)*	24.8 (20.4–29.2)	28.7 (22.9–34.5)*	17.5 (13.4–21.7)	39.0 (34.0–44.0)*
E intake / E requirements	0.96 (0.84–1.09)	0.90 (0.78–1.02)	1.04 (0.97–1.10)	0.98 (0.92–1.04)	1.00 (0.87–1.13)	1.02 (0.94–1.10)
Biochemical parameters						
Total-cholesterol (mmol l ⁻¹)	5.4 (4.8–6.1)	5.1 (4.3–5.8)	5.3 (5.1–5.6)	5.2 (4.9–5.5)	5.4 (4.8–6.1)	5.2 (4.8–5.6)
LDL-cholesterol (mmol l ⁻¹)	3.6 (3.0–4.1)	3.2 (2.6–3.8)	3.3 (3.1–3.5)	3.1 (2.9–3.3)*	3.2 (2.8–3.6)	3.3 (2.9–3.7)
HDL-cholesterol (mmol l ⁻¹)	1.3 (1.2–1.4)	1.3 (1.1–1.4)	1.3 (1.3–1.4)	1.3 (1.3–1.4)	1.4 (1.3–1.5)	1.4 (1.3–1.5)
Triglycerides (mmol l ⁻¹)	2.8 (2.2–3.3)	2.8 (1.9–3.8)	3.2 (2.6–3.8)	3.0 (2.4–3.6)	3.5 (1.3–5.7)	2.2 (1.6–2.8)
APO A1 (mg dl ⁻¹)	130 (123–136)	131 (125–137)	133 (130–136)	135 (132–137)	133 (127–139)	138 (130–145)*
APO B100 (mg dl ⁻¹)	124 (110–139)	114 (99–130)	118 (114–123)	117 (110–125)	114 (105–124)	114 (104–123)
Medications						
Statins (%)	32	63*	50	55	56	78
Fibrates (%)	32	21	39	46	43	30
Antihypertensive drugs (%)	53	58	37	42	43	48
Oral antidiabetic drugs (%)	37	47	20	21	9	13

Values are means (95% confidence interval for the mean) or frequencies.

PA, physical activity; BMI, body mass index; MET·h wk⁻¹, metabolic equivalent hour per week; E, energy; LDL, low-density lipoprotein; HDL, high-density lipoprotein; APO, apolipoprotein

* $P < 0.05$ for the comparison of measures at baseline and follow-up by the non-parametric paired-samples Wilcoxon test for continuous variables or by the chi-squared test for categorical variables in each category of PA evolution

Figure 1

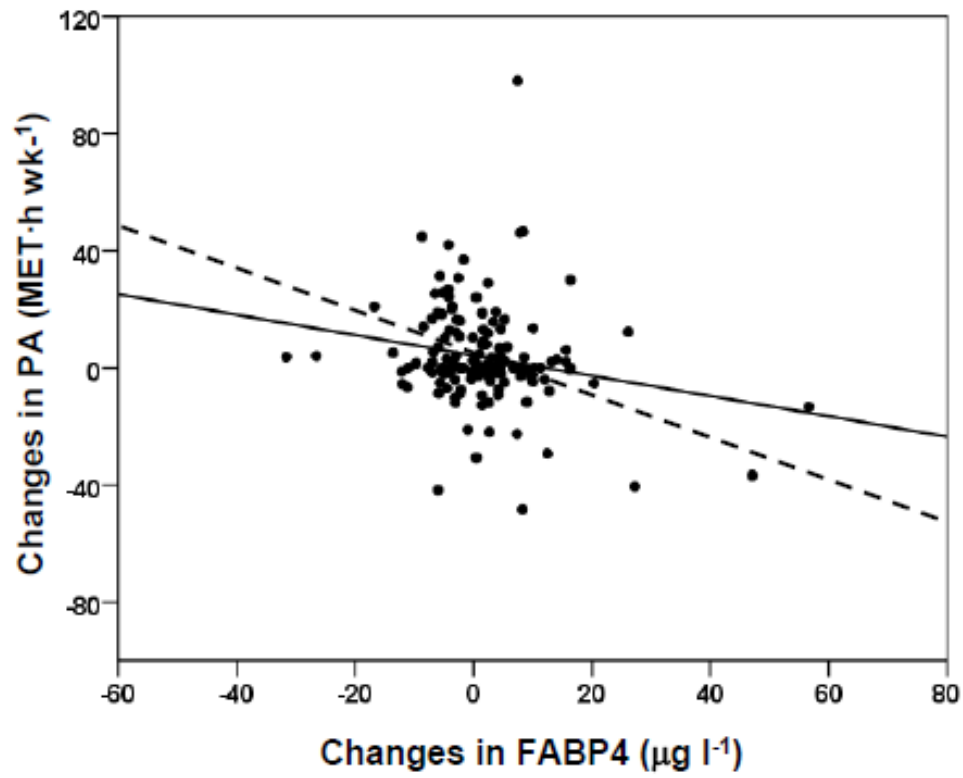


Figure 2

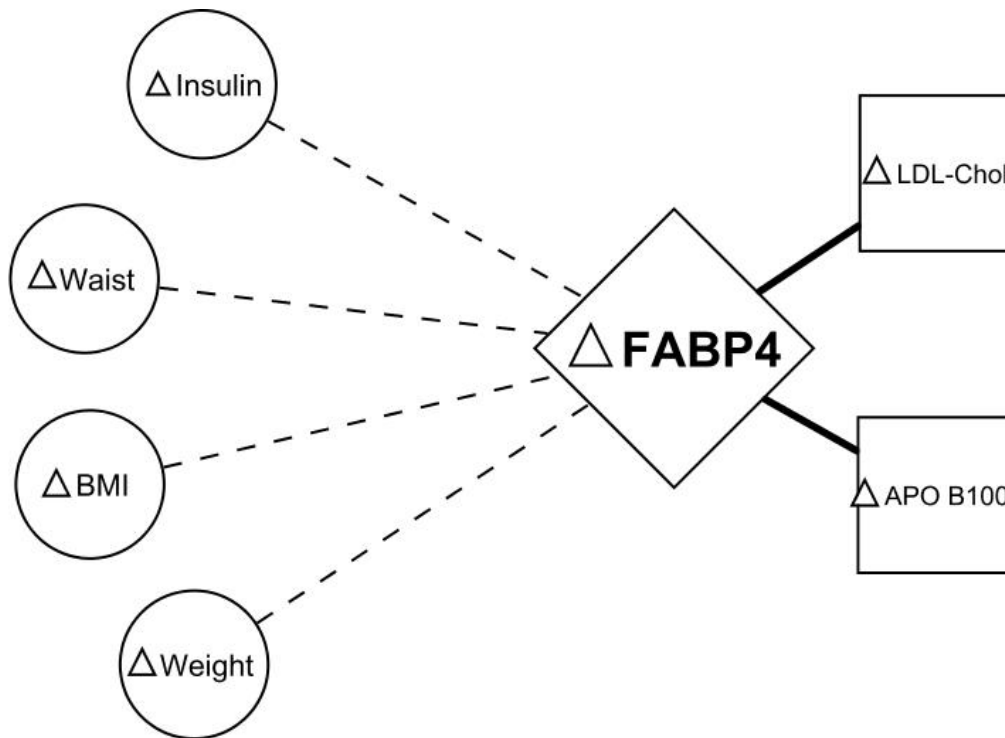
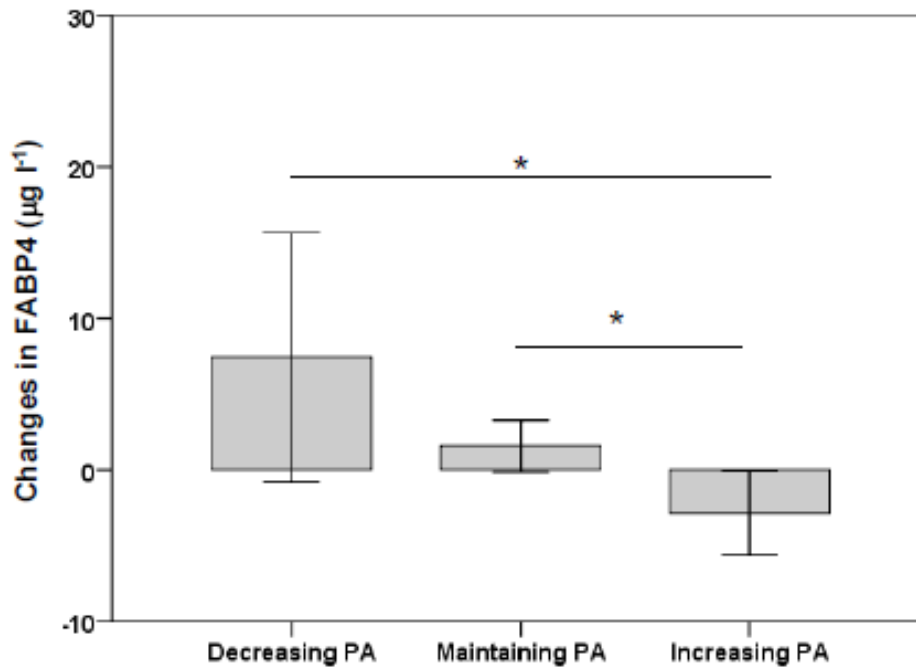


Figure 3



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
REGULACIÓ DE FABP4 DEPENDENT DE NRF2 EN MACRÒFAGS
Iolanda Lázaro López
ISBN:978-84-693-8852-5/DL:T.1952-2010

Concentraciones plasmáticas de FABP4 y evolución del síndrome metabólico

Circulating FABP4 concentrations and metabolic syndrome evolution

Anna Cabré, Iolanda Lázaro, Núria Plana, Raimón Ferre, Jordi Merino y Lluís Masana*

Unitat de Medicina Vasculard i Metabolisme, Unitat de Recerca de Lípids i Arteriosclerosi, Hospital Universitari Sant Joan, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Reus, España

*** Autor para correspondencia.**

Correo electrónico: luis.masana@urv.cat (L. Masana).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Resumen

Antecedentes: Los niveles circulantes de FABP4 se han asociado a alteraciones metabólicas y se han considerado un biomarcador predictivo de desarrollo de síndrome metabólico (SM) independiente de la adiposidad y la resistencia a la insulina en sujetos asiáticos no diabéticos.

Objetivo: Evaluar la relación entre los cambios en los niveles circulantes de FABP4 y la regresión o progresión de SM en sujetos incluidos en un programa global de cambios terapéuticos de estilo de vida.

Pacientes y Métodos: En este estudio prospectivo de 1 año de duración se incluyeron 140 sujetos con obesidad abdominal y riesgo cardiovascular global aumentado. Se evaluó la asociación entre los cambios en los niveles de FABP4 y la evolución del diagnóstico de SM y sus componentes. También se analizaron cambios en otros parámetros bioquímicos, marcadores antropométricos y parámetros vasculares.

Resultados: Se observó un aumento en los niveles de FABP4 asociado a la progresión de SM y una reducción de los niveles de FABP4 asociada a regresión de SM. El aumento en los niveles de FABP4 se asoció con la aparición tanto de hipertrigliceridemia como de colesterol-HDL bajo, mientras que las reducciones de FABP4 se asociaron con la desaparición de los criterios de SM de obesidad abdominal, colesterol-HDL bajo y glicemia basal. Los predictores de progresión de SM fueron aumentos en el perímetro abdominal y las concentraciones de insulina. Las disminuciones de FABP4 fueron el único predictor independiente de regresión de SM.

Conclusiones: Las variaciones en la concentración plasmática de FABP4 se asocian a la progresión o regresión de SM. Dado el impacto de FABP4 sobre diversos componentes de SM no podemos descartar una relación causal entre el descenso de FABP4 y la regresión de SM.

Abstract

Background: Circulating FABP4 levels had been associated to metabolic alterations and they have been considered a predictive biomarker of metabolic syndrome development independently of adiposity and insulin resistance in non-diabetic Asians.

Objective: To evaluate the relationship of changes in FABP4 levels and MS regression or progression in a group of subjects enrolled in a lifestyle therapeutic changes program.

Methods: In the present study, we included 140 subjects with abdominal obesity and increased global cardiovascular risk which were prospectively followed up for 1 year. The association of changes in FABP4 levels with changes in MS and its components was evaluated. Changes in other biochemical parameters, anthropometric markers and vascular data were also investigated.

Results: We observed an increase in FABP4 levels associated to MS progression and a reduction in FABP4 levels associated to MS regression. The increase in FABP4 levels were associated to the appearance of either the triglyceridemia or the HDL-cholesterol MS components, while FABP4 reductions were associated to the regression of either the abdominal obesity, HDL-cholesterol or the basal glycemia criteria of MS. The predictors of MS progression were positive changes in insulin and waist circumference. FABP4 reductions were the only independent predictor of MS regression.

Conclusions: Variations in circulating FABP4 levels are associated with MS progression and regression. Considering the impact of FABP4 on several MS components we cannot exclude a causal relationship between FABP4 reduction and MS regression.

Introducció

El síndrome metabólico (SM) es la conjunción de varios factores de riesgo como son la obesidad abdominal, la dislipemia, la hipertensión y la hiperglicemia. La resistencia a la insulina se considera un factor patogénico fundamental. Los sujetos con SM tienen un riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular y diabetes tipo 2 aumentado^{1, 2}. Trabajos recientes han sugerido un papel central del tejido adiposo como órgano dinámico que, a parte de almacenar energía, actúa como órgano endocrino secretando moléculas bioactivas como mediadores de inflamación, varias citoquinas y adipocinas involucradas en el desarrollo de la resistencia a la insulina y la arteriosclerosis³. La *adipocyte fatty acid-binding protein* o FABP4 es una proteína presente en el citoplasma de adipocitos y macrófagos donde se ha relacionado con la respuesta inflamatoria, el metabolismo lipídico y glucídico⁴⁻⁶. Estudios en modelos animales han permitido avanzar en el conocimiento de la implicación de la FABP4 en estos procesos. Se ha demostrado que la deficiencia de FABP4 protege frente al desarrollo de hiperinsulinemia, hiperglicemia y resistencia a la insulina cuando se induce obesidad⁷ y reduce lesiones arterioscleróticas en modelos hipercolesterolémicos^{5, 8, 9}. Estudios en humanos han demostrado la presencia de FABP4 en circulación¹⁰ y aunque se desconoce su función se ha propuesto como marcador en diferentes patologías asociadas a alteraciones metabólicas. Se han descrito niveles circulantes de FABP4 elevados en sujetos con sobrepeso, obesidad¹⁰, dislipemia aterógena¹¹ y enfermedad cardiovascular¹²⁻¹⁴. Estudios prospectivos han propuesto que los niveles circulantes de FABP4 podrían ser predictores de desarrollo de diabetes tipo 2 y SM^{15, 16}.

Las alteraciones metabólicas del SM se ven fuertemente influenciadas por la modificación del estilo de vida y de los hábitos de alimentación¹⁷. Sin embargo existen escasos estudios del efecto de cambios de estilo de vida sobre los niveles de FABP4. Estudios recientes muestran que los niveles circulantes de FABP4 pueden ser reducidos por programas de ejercicio físico y consejos nutricionales en sujetos obesos^{18, 19} aunque no han demostrado su efectividad en pacientes con riesgo cardiovascular como el síndrome del ovario poliquístico²⁰. Por otra parte no existen

estudios prospectivos de regresión de SM y su asociación con los niveles circulantes de FABP4.

En este estudio evaluamos el efecto de un programa global de cambios de estilo de vida sobre el SM y su repercusión sobre los niveles circulantes de FABP4 en una población con elevado riesgo cardiovascular.

Pacientes y métodos

Sujetos de estudio

En estado basal se analizó una cohorte de 405 pacientes, 254 hombres y 151 mujeres, de 22-79 años, con obesidad abdominal y riesgo cardiovascular global aumentado que eran derivados a la unidad de medicina vascular y metabolismo de nuestro hospital. En el estudio prospectivo se incluyeron 140 pacientes, 105 hombres y 35 mujeres, de 22-79 años, de esta misma cohorte que participaban en un estudio prospectivo del impacto de cambios terapéuticos de estilos de vida sobre el riesgo cardiovascular de 1 año de duración²¹. Los consejos sobre los cambios de estilo de vida que recibieron los pacientes se basaron en el aumento de la actividad física (AF) en su tiempo libre, en seguir una dieta sana y dejar de fumar. Los criterios de inclusión fueron presentar obesidad abdominal según criterios del ATP III (≥ 102 cm hombres; ≥ 88 cm mujeres) y riesgo cardiovascular global aumentado considerándose la presencia de diabetes tipo 2 o un riesgo cardiovascular global según el *Framingham Risk Score* entre 5-20% a 10 años. Se excluyeron del estudio aquellos sujetos con antecedentes de enfermedad cardiovascular, neoplasia y otras enfermedades crónicas severas. El tratamiento farmacológico habitual fue mantenido durante todo el tiempo de intervención o bien fue modificado según requerimientos individuales siguiendo las indicaciones clínicas habituales. El SM se definió siguiendo los criterios de ATP III en aquellos sujetos que presentaban al menos 3 de los siguientes factores: obesidad abdominal (≥ 102 cm hombres; ≥ 88 cm mujeres); tensión arterial $> 130/85$ mmHg o tratamiento hipotensor; triglicéridos > 1.69 mmol/l; HDL < 1.03 mmol/l (hombres) o < 1.29 mmol/l (mujeres); y glicemia basal > 6.1 mmol/l.

Se recogieron los datos físicos, antropométricos, vasculares y se les practicó un análisis bioquímico general antes y después del

periodo de intervenció. Además los niveles circulantes de FABP4 fueron cuantificados antes y después del seguimiento de 1 año. El comito tico de nuestro hospital aprobó el estudio y todos los participantes firmaron un consentimiento informado antes de entrar en el estudio.

Cambios terapéuticos de estilo de vida

La dieta fue evaluada mediante cuestionarios de frecuencia y registros de 3 días de recogida de datos 24h que fueron suministrados al principio y al final del estudio. Las recomendaciones dietéticas que se hicieron se basaron en seguir una dieta tipo Mediterránea. La AF en el tiempo libre fue valorada al inicio y al final del estudio mediante el cuestionario de Minnesota adaptado a la población espaola²². Se recomendó a todos los participantes incrementar su AF realizando actividades de baja y moderada intensidad durante 30-45 minutos, 5 veces por semana, para conseguir al menos un gasto energético adicional de 400-500 kcal/día. Las actividades recomendadas incluyeron andar caminar a un ritmo moderado, bicicleta estacionaria o nadar suavemente. El hábito tabáquico se determinó mediante cuestionarios estndar²³. Se aconsej que los fumadores abandonaran el consumo de tabaco y se les facilitó soporte farmacológico y psicológico cuando fue necesario. Se realizó un seguimiento médico y dietético cada 4 meses.

Determinaciones bioquímicas

Las concentraciones circulantes de FABP4 se determinaron en plasma de los pacientes mediante kits comerciales de ELISA (Bio Vendor Laboratory Medicine Inc., Brno, República Checa). Los resultados se calcularon utilizando un modelo de regresión polinomial de 4 parámetros y se expresaron como $\mu\text{g/l}$. La precisión intraensayo fue de 5.3% CV y interensayo de 3.9% CV. Los anticuerpos utilizados en este kit de ELISA de FABP4 humano son altamente específicos para la FABP4 humana y no presentan reactividad cruzada detectable para las FABP1, FABP2, FABP3 o FABP5 humanas.

Los parámetros bioquímicos generales se determinaron mediante métodos estándar. El colesterol, los triglicéridos, la APO A1, la APO B100, la medición directa del colesterol LDL y

del colesterol HDL se evaluaron mediante métodos enzimáticos e inmunoturbidimtricos (Spinreact, SA, España) adaptados para el autoanalizador Cobas Mira Plus (Roche Diagnostics, España).

Determinación del grosor de la tima media

Para la obtención de las imágenes carotídeas para las mediciones del grosor de la tima media (GIM) se utilizó un An Acusson Sequoia sonograph (Siemens Medical Solutions, Erlangen, Germany) equipado con una sonda *linear array* de ultrasonidos (8L5 5-12 MHz transductor de pequeñas piezas de banda ancha). Se obtuvieron 3 determinaciones de cada uno de los siguientes segmentos: arteria carótida común, interna y bulbo de ambos lados derecho e izquierdo. El valor medio de todos ellos fue definido como el GIM medio.

Análisis estadísticos

Para todos los anlisis se utilizó el paquete informático SPSS versión 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Los datos presentados en las tablas expresan medias \pm desviación estándar para las variables continuas o la frecuencia para las variables categóricas. Todos los valores de p obtenidos fueron bilaterales y se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$. Los cambios en las variables se calcularon como el valor de la variable a 1 año de seguimiento menos el valor basal de la variable. Las comparaciones de cambios en las variables se analizaron mediante el test no paramétrico de la U de Mann-Whitney en cada categoría de cambio de SM. El anlisis estadístico se complet con anlisis de regresión lineal múltiple por pasos hacia delante para estudiar los cambios en las variables con una asociación independiente y significativa con cambios en FABP4. Las variables con una asociación elevada ($r > 0.700$, $p < 0.05$) no se incluyeron en el mismo modelo. Los modelos aceptados fueron aquellos con la mayor R^2 y el mínimo número de variables incluidas. Los parámetros finales se obtuvieron introduciendo en un modelo forzado las variables escogidas en un anlisis de regresión lineal. En las tablas se presentan los coeficientes B no estandarizados \pm error tpico para los resultados de los modelos de regresión lineal múltiple.

Resultados

Características de los sujetos de estudio

De la cohorte de 405 sujetos analizados en estado basal, el 66% (n=267) presentaron criterios de SM según ATPIII. La Figura 1 muestra las concentraciones basales de FABP4 distribuidas según género y presencia de SM. Observamos que las concentraciones de FABP4 fueron significativamente más elevadas en presencia de SM tanto en hombres (28.1 (25.9 – 30.3) $\mu\text{g/l}$ vs 21.8 (19.7 – 23.9) $\mu\text{g/l}$, $p < 0.001$) como en mujeres (42.0 (39.0 – 45.0) $\mu\text{g/l}$ vs 36.0 (31.2 – 40.9) $\mu\text{g/l}$, $p = 0.031$).

La Tabla 1 muestra las características clínicas de los pacientes del estudio prospectivo. Esta tabla resume la incidencia de SM y de sus componentes en estado basal y a 1 año de seguimiento. Un 20% de los sujetos inicialmente diagnosticados de SM (n=96) mostraron regresión de esta alteración metabólica tras el periodo de intervención. Por otra parte, al inicio del estudio 43 sujetos no cumplían criterios de SM (n=43) y 28% de estos sujetos desarrollaron SM al año de seguimiento.

Datos antropométricos, bioquímicos y vasculares y cambios de SM

El grupo de sujetos que revirtieron criterios de SM, presentaron una disminución significativa del perímetro abdominal, de las concentraciones de triglicéridos y insulina y del riesgo cardiovascular calculado según la fórmula de Framingham cuando los comparamos con el grupo de sujetos que mantuvieron criterios de SM a lo largo del estudio (Tabla 2). No se observaron cambios en las concentraciones séricas de glucosa ni en los parámetros vasculares.

El seguimiento reveló que los sujetos que desarrollaron SM comparados con los sujetos que no presentaron SM a lo largo del estudio, aumentaron todos los parámetros antropométricos registrados, aunque únicamente el aumento del perímetro abdominal alcanzó significación estadística (Tabla 2). De los parámetros bioquímicos analizados, las concentraciones de insulina aumentaron con la aparición de SM, acompañadas por una progresión en el GIM (Tabla 2). En este grupo, las concentraciones de

glucosa presentaron una tendencia a aumentar aunque no alcanzaron niveles estadísticamente significativos. Sin embargo no se observaron cambios ni en los niveles de triglicéridos ni en el riesgo cardiovascular calculado según Framingham. No se observó ningún otro cambio en los parámetros lipídicos (APOA1, APOB100, colesterol total, colesterol LDL y HDL) ni cambios en la tensión arterial asociados a cambios en la presencia de SM.

La Figura 2 muestra los cambios en los niveles circulantes de FABP4 en el seguimiento distribuidos según la evolución de SM. Observamos un aumento de los niveles circulantes de FABP4 asociados a progresión de SM y una reducción de estos niveles asociados a regresión de SM. Los cambios en FABP4 fueron estadísticamente significativos entre el grupo de progresión y el grupo sin SM ($p = 0.019$) y entre el grupo de regresión y el grupo con mantenimiento de SM ($p = 0.001$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en FABP4 entre el grupo de sujetos que mantuvieron criterios de SM y el grupo de progresión a SM (Figura 2).

La progresión a SM representó un aumento medio de 4.9 unidades de FABP4, mientras que la regresión de SM resultó en una disminución media de 8.8 unidades de FABP4 (Tabla 3).

Concentraciones circulantes de FABP4 y cambios en los componentes del SM

La Figura 3 muestra los cambios en FABP4 considerando los componentes de SM individualmente. Los niveles circulantes de FABP4 disminuyeron significativamente en los sujetos que presentaron regresión de los siguientes criterios de SM: obesidad abdominal ($p = 0.023$) (Figura 3A), colesterol-HDL ($p = 0.032$) (Figura 3C) o glicemia basal ($p = 0.022$) (Figura 3E), respecto a los sujetos que mantuvieron estos criterios de SM a lo largo del estudio. Sin embargo, los niveles circulantes de FABP4 aumentaron significativamente en aquellos sujetos en los que debutaron en la presencia de trigliceridemia ($p = 0.058$) (Figura 3B) y colesterol-HDL bajo ($p = 0.043$) (Figura 3C), comparado con aquellos sujetos que se mantuvieron sin la aparición de estos criterios de SM a lo largo del estudio.

Predictores de cambio en SM

La Tabla 3 muestra los predictores de evolución de SM en la población de estudio. Los predictores de regresión de SM incluyeron reducciones en todas las variables antropométricas analizadas (peso, IMC y perímetro abdominal), en el riesgo cardiovascular calculado según Framingham y en los niveles circulantes de FABP4. Sin embargo, no se observaron cambios en el GIM asociados a regresión de SM en este estudio.

Por otro lado, los predictores asociados a la aparición de SM fueron un aumento en el perímetro abdominal y en las concentraciones de insulina y FABP4. Elevaciones en el GIM presentaron una tendencia muy próxima a la significación estadística de estar asociadas con la aparición de SM.

Finalmente realizamos análisis de regresión múltiple hacia adelante para evaluar los predictores independientes asociados a cambios en SM (Tabla 4). Únicamente la reducción en los niveles circulantes de FABP4 fue un predictor independiente de la regresión de SM, mientras que los factores asociados independientemente con la progresión de SM fueron el aumento en el perímetro abdominal y en las concentraciones de insulina.

Discusión

Este estudio es el primero en comunicar que la reducción de las concentraciones circulantes de FABP4 durante un programa terapéutico de cambios de estilo de vida podría ser un predictor de regresión de SM en pacientes con obesidad abdominal y riesgo cardiovascular elevado independiente de cambios en la adiposidad y la resistencia a la insulina. Es conocida la asociación de los niveles circulantes de FABP4 y la obesidad o la resistencia a la insulina^{10, 24}. Las concentraciones de FABP4 están aumentadas en pacientes con SM tengan o no diabetes tipo 2^{10, 24}. Además las concentraciones de FABP4 correlacionan positivamente con todos los parámetros que definen el SM y aumentan con la presencia de mayor número de componentes de SM. Sin embargo la asociación positiva entre FABP4 y marcadores de resistencia a la insulina no se ha observado en pacientes con diabetes tipo 2²⁴. Los resultados de un estudio prospectivo a 5

años en sujetos de origen asiático demostraron que las concentraciones basales de FABP4 predicen el desarrollo de SM independientemente de la adiposidad y la resistencia a la insulina¹⁶. Nuestro estudio realizado en sujetos caucásicos no confirma estos resultados. Aunque el aumento en las concentraciones de FABP4 se asoció con la aparición de SM a 1 año, juntamente con el aumento de las concentraciones de insulina, del índice HOMA, del perímetro abdominal y del GIM, las variaciones de FABP4 no se mantuvieron como predictor independiente de desarrollo del SM, quedando como tales el aumento en el perímetro abdominal y en las concentraciones de insulina. Cabe destacar que una de las variables que pueden estar influenciando el resultado obtenido es que nuestro estudio incluía la diabetes como uno de los criterios de inclusión a diferencia del estudio de Xu y colaboradores¹⁶. Nuestro grupo ha demostrado previamente que los sujetos con diabetes tipo 2 presentan niveles más elevados de FABP4 así mismo Tso y colaboradores¹⁵ han demostrado que los niveles de FABP4 pueden ser un predictor de desarrollo de diabetes tipo 2. En la misma línea, nuestro grupo de pacientes presentaba un riesgo cardiovascular moderado-alto lo cual puede estar también sesgando el resultado, dando ya unos valores basales de FABP4 superiores. Está bien establecida la asociación de la FABP4 con la enfermedad cardiovascular en modelos animales. La deficiencia en FABP4 proporciona una protección frente a la enfermedad cardiovascular en modelos animales de hipercolesterolemia^{8, 9}. Estudios publicados por otros grupos en humanos muestran que las concentraciones circulantes de FABP4 se asocian positivamente con elevaciones del GIM¹², con mayor número de vasos estenóticos¹³ y con mayor volumen de placa¹⁴. Sin embargo, nuestro grupo tampoco ha podido confirmar una asociación entre los niveles circulantes de FABP4 y arteriosclerosis en pacientes con diabetes tipo 2²⁴.

Dado el elevado riesgo cardiovascular de estos pacientes es interesante todo aquel tratamiento dirigido a reducir cualquier factor de riesgo en estos pacientes. Por ello es de interés clínico el desarrollo de tratamientos dirigidos a disminuir los componentes del SM así como el estudio de nuevos marcadores que permitan el seguimiento o sirvan de predictores de evolución de esta enfermedad. Nuestro estudio muestra que existe una asociación

entre la reducció de los niveles circulantes de FABP4 y la desaparició del diagnòstico de SM, es decir con la reducció de componentes del SM. Aunque la reducció de FABP4 se observó con la desaparició de los criterios de SM de colesterol HDL bajo, glicemia basal y obesidad abdominal, la asociació entre la reducció de FABP4 y regresió de SM fue independiente de cambios en la adiposidad, el perfil lipídico y la resistencia a la insulina. Por ello no podemos descartar que descensos en FABP4 pudieran colaborar en la regresió de algunos componentes de SM. En este sentido FABP4 se ha implicado directamente en el control de la lipólisis adipocitaria²⁴, en la acción del receptor de la insulina^{26, 27} y la contractilidad de células musculares cardíacas²⁸. Los niveles de FABP4 pueden ser modificados farmacológicamente por la acción de las estatinas. Existe un estudio que muestra que las estatinas pueden reducir la FABP4 en sujetos hipercolesterolémicos²⁹. Además recientemente se ha observado que la reducció del peso corporal y la actividad física pueden reducir los niveles de FABP4 en pacientes obesos^{18, 19}. Estos resultados junto con el presente estudio sugieren que un programa de cambios de estilo de vida adecuado a los factores de riesgo cardiovascular podría ser de utilidad en el manejo clínico de pacientes con SM y elevado riesgo cardiovascular. Se requiere de estudios con un número mayor de pacientes y mayor tiempo de seguimiento para confirmar el papel de la FABP4 en la regresió del SM.

Agradecimientos

Proyecto financiado por la Fundación/Sociedad Española de Arteriosclerosis. Beca FEA/SEA 2006 para Investigación Clínico-Epidemiológica: Aspectos clínico-epidemiológicos de la arteriosclerosis y sus factores de riesgo. Una comunicació referente a esta línea de trabajo, titulada: "La *fatty acid-binding protein* de adipocito está aumentada en el síndrome metabólico y el tratamiento con tiazolidinadionas en pacientes con diabetes tipo 2", fue presentada en el XX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Arteriosclerosis celebrado en Valencia el año 2007 y galardonada con una mención especial. El CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas es una iniciativa de ISCIII.

Bibliografía

1. Malik S, Wong ND, Franklin SS, Kamath TV, L'Italien GJ, Pio JR, et al. Impact of the metabolic syndrome on mortality from coronary heart disease, cardiovascular disease, and all causes in United States adults. *Circulation*. 2004;110:1245-50.
2. Ford ES. Risks for all-cause mortality, cardiovascular disease, and diabetes associated with the metabolic syndrome: a summary of the evidence. *Diabetes Care*. 2005;28:1769-78.
3. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:2548-56.
4. Makowski L, Hotamisligil GS. Fatty acid binding proteins--the evolutionary crossroads of inflammatory and metabolic responses. *J Nutr*. 2004;134:2464S-8S.
5. Boord JB, Maeda K, Makowski L, Babaev VR, Fazio S, Linton MF, et al. Combined adipocyte-macrophage fatty acid-binding protein deficiency improves metabolism, atherosclerosis, and survival in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2004;110:1492-8.
6. Makowski L, Brittingham KC, Reynolds JM, Suttles J, Hotamisligil GS. The fatty acid-binding protein, aP2, coordinates macrophage cholesterol trafficking and inflammatory activity. Macrophage expression of aP2 impacts peroxisome proliferator-activated receptor gamma and I κ B kinase activities. *J Biol Chem*. 2005;280:12888-95.
7. Hotamisligil GS, Johnson RS, Distel RJ, Ellis R, Papaioannou VE, Spiegelman BM. Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein. *Science*. 1996;274:1377-9.
8. Makowski L, Boord JB, Maeda K, Babaev VR, Uysal KT, Morgan MA, et al. Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis. *Nat Med*;2001;7:699-705.
9. Boord JB, Maeda K, Makowski L, Babaev VR, Fazio S, Linton MF, et al. Adipocyte fatty acid-binding protein, aP2, alters late atherosclerotic lesion formation in severe hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1686-91.
10. Xu A, Wang Y, Xu JY, Stejskal D, Tam S, Zhang J, et al. Adipocyte fatty acid-binding protein is a plasma biomarker closely associated with obesity and metabolic syndrome. *Clin Chem*. 2006;52:405-13.
11. Cabre A, Lazaro I, Girona J, Manzanares JM, Marimon F, Plana N, et al. Plasma fatty acid

binding protein 4 is associated with atherogenic dyslipidemia in diabetes. *J Lipid Res.* 2008;49:1746-51.

12. Yeung DC, Xu A, Cheung CW, Wat NM, Yau MH, Fong CH, et al. Serum adipocyte fatty acid-binding protein levels were independently associated with carotid atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:1796-802.

13. Rhee EJ, Lee WY, Park CY, Oh KW, Kim BJ, Sung KC, et al. The association of serum adipocyte fatty acid-binding protein with coronary artery disease in Korean adults. *Eur J Endocrinol.* 2009;160:165-72.

14. Miyoshi T, Onoue G, Hirohata A, Hirohata S, Usui S, Hina K, et al. Serum adipocyte fatty acid-binding protein is independently associated with coronary atherosclerotic burden measured by intravascular ultrasound. *Atherosclerosis.* En prensa 2010.

15. Tso AW, Xu A, Sham, PC, Wat NM, Wang Y, Fong CH, et al. Serum adipocyte fatty acid binding protein as a new biomarker predicting the development of type 2 diabetes: a 10-year prospective study in a Chinese cohort. *Diabetes Care.* 2007;30:2667-72.

16. Xu A, Tso AW, Cheung BM, Wang Y, Wat NM, Fong CH, et al. Circulating adipocyte-fatty acid binding protein levels predict the development of the metabolic syndrome: a 5-year prospective study. *Circulation.* 2007;115:1537-43.

17. Miyatake N, Fujii M, Miyachi M, Tabata I, Takeshi S, Hirao T, et al. Changes in metabolic syndrome and its components with lifestyle modification in Japanese men. *Intern Med.* 2010;49:261-5.

18. Reinehr T, Stoffel-Wagner B, Roth CL. Adipocyte fatty acid-binding protein in obese children before and after weight loss. *Metabolism.* 2007;56:1735-41.

19. Choi KM, Kim TN, Yoo HJ, Lee KW, Cho GJ, Hwang TG, et al. Effect of exercise training on A-FABP, lipocalin-2 and RBP4 levels in obese women. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2009;70:569-74.

20. Mohlig M, Weickert MO, Ghadamgadai E, Machlitt A, Pfuller B, Arafat AM, et al. Adipocyte fatty acid-binding protein is associated with markers of obesity, but is an unlikely link between obesity, insulin resistance, and hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome women. *Eur J Endocrinol.* 2007;157:195-200.

21. Ferre R, Plana N, Merino J, Aragones G, Girona, J, Heras M, et al. Effects of therapeutic lifestyle changes on peripheral artery

tonometry in patients with abdominal obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* En prensa 2010.

22. Elosua R, Garcia M, Aguilar A, Molina L, Covas MI, Marrugat J. Validation of the Minnesota Leisure Time Physical Activity Questionnaire In Spanish Women. Investigators of the MARATDON Group, *Med Sci Sports Exerc.* 2000;32:1431-7.

23. DiClemente CC, Prochaska JO, Fairhurst SK, Velicer WF, Velasquez MM, Rossi JS. The process of smoking cessation: an analysis of precontemplation, contemplation, and preparation stages of change. *J Consult Clin Psychol.* 1991;59:295-304.

24. Cabre A, Lazaro I, Girona J, Manzanares JM, Marimon F, Plana N, et al. Fatty acid binding protein 4 is increased in metabolic syndrome and with thiazolidinedione treatment in diabetic patients. *Atherosclerosis.* 2007;195:e150-8.

25. Coe NR, Simpson MA, Bernlohr DA. Targeted disruption of the adipocyte lipid-binding protein (aP2 protein) gene impairs fat cell lipolysis and increases cellular fatty acid levels. *J Lipid Res.* 1999; 40:967-72.

26. Buelt MK, Shekels LL, Jarvis BW, Bernlohr DA. In vitro phosphorylation of the adipocyte lipid-binding protein (p15) by the insulin receptor. Effects of fatty acid on receptor kinase and substrate phosphorylation. *J Biol Chem.* 1991;266:12266-71.

27. Buelt MK, Xu Z, Banaszak LJ, Bernlohr DA. Structural and functional characterization of the phosphorylated adipocyte lipid-binding protein (pp15). *Biochemistry.* 1992;31:3493-9.

28. Lamounier-Zepter V, Look C, Alvarez J, Christ T, Ravens U, Schunck WH, et al. Adipocyte fatty acid-binding protein suppresses cardiomyocyte contraction: a new link between obesity and heart disease. *Circ Res.* 2009;105:326-34.

29. Karpisek M, Stejskal D, Kotolova H, Kollar P, Janoutova G, Ochmanova R, et al. Treatment with atorvastatin reduces serum adipocyte-fatty acid binding protein value in patients with hyperlipidaemia. *Eur J Clin Invest.* 2007;37:637-42.

Pies de Figura

Figura 1.

Diagrama de caja que muestra la distribución de las concentraciones circulantes de FABP4 en los hombres y las mujeres del estudio según la

presencia (cajas grises) o no (cajas blancas) de síndrome metabólico.

Figura 2.

SM, síndrome metabólico.

Gráfico de barras que muestra los cambios en las concentraciones circulantes de FABP4 (valor FABP4 al año de seguimiento menos el valor basal de FABP4) en el grupo de pacientes que permaneció sin SM ($n = 31$), el grupo con progresión a SM ($n = 12$), el grupo que se mantuvo con SM ($n = 77$) y el grupo con regresión de SM ($n = 19$).

Figura 3.

Gráficos de barras que muestran los cambios en las concentraciones circulantes de FABP4 (valor FABP4 al año de seguimiento menos el valor basal de FABP4) distribuidos por la evolución a lo largo del estudio de los diferentes criterios que definen el síndrome metabólico: obesidad abdominal (A), hipertrigliceridemia (B), colesterol-HDL (C), tensión arterial (D) y glicemia basal (E).

Tabla 1. Características clínicas de los pacientes del estudio.

Variables	basal	1-año seguimiento
n		140
Género (hombres, %)		75
Edad (años)	54 ± 10	55 ± 10
Riesgo CV Framingham (%)	11.7 ± 7.0	10.7 ± 6.1
Diabetes tipo 2 (%)	34	
Criterios SM		
Obesidad abdominal (%)	74	71
Trigliceridemia (%)	86	75
Colesterol-HDL (%)	12	19
Tensión arterial (%)	82	76
Glicemia basal (%)	48	51
SM (%)	69	64
Regresión SM vs. basal (%)	-	20
Progresión SM vs. basal (%)	-	28
Tratamiento farmacológico		
Estatinas (%)	49	60
Fibratos (%)	39	40
Hipotensores (%)	40	45
Antidiabéticos orales (%)	21	24

CV: cardiovascular; SM: síndrome metabólico; HDL: lipoproteínas de alta densidad
Regresión SM: SM basal y no SM a 1-año de seguimiento vs. SM basal y SM a 1-año de seguimiento.
Progresión SM: no SM basal y SM a 1-año de seguimiento vs. no SM basal y no SM a 1-año de seguimiento.

Tabla 2. Evolución de las variables clínicas y bioquímicas según la evolución de SM.

Cambios en variables	Cambios en SM					
	SM	Regresión SM	<i>p</i>	No SM	Progresión SM	<i>p</i>
SM (basal / 1-año seguimiento)	sí / sí	sí / no		no / no	no / sí	
Peso (kg)	-0.06 ± 3.55	-2.52 ± 5.18	0.103	-0.27 ± 5.55	2.01 ± 4.43	0.054
IMC (kg/m ²)	0.01 ± 1.47	-0.88 ± 1.84	0.108	-0.13 ± 1.96	0.69 ± 1.52	0.051
Cintura (cm)	-0.30 ± 4.40	-3.24 ± 5.28	0.040	-2.73 ± 5.28	1.75 ± 3.98	0.015
TAS (mmHg)	-6.6 ± 15.7	-8.2 ± 13.0	0.518	-4.2 ± 16.5	4.8 ± 10.7	0.091
TAD (mmHg)	-4.2 ± 12.1	0.2 ± 6.8	0.313	-3.1 ± 10.5	-4.9 ± 12.9	0.862
Triglicéridos (mmol/l)	0.08 ± 3.07	-0.94 ± 1.57	0.020	-0.58 ± 2.81	-0.50 ± 2.17	0.414
Colesterol-LDL (mmol/l)	-0.27 ± 0.85	-0.16 ± 0.72	0.616	0.02 ± 0.75	-0.16 ± 1.10	0.947
Colesterol-HDL (mmol/l)	-0.02 ± 0.23	0.02 ± 0.22	0.600	0.04 ± 0.18	-0.11 ± 0.46	0.698
Insulina (mU/l)	0.76 ± 12.49	-3.06 ± 7.80	0.043	-1.45 ± 4.37	18.69 ± 50.47	0.003
Glucosa (mmol/l)	-0.04 ± 1.64	-0.16 ± 1.17	0.617	-0.46 ± 1.56	0.16 ± 1.20	0.076
HOMA-IR	0.14 ± 6.74	-0.58 ± 3.15	0.109	-0.72 ± 2.07	7.96 ± 23.90	0.007
FABP4 (µg/l)	4.27 ± 11.72	-4.73 ± 8.91	0.001	-1.53 ± 5.35	3.36 ± 5.70	0.019
GIM medio (mm)	0.01 ± 0.12	0.03 ± 0.16	0.731	-0.02 ± 0.09	0.06 ± 0.17	0.019
Riesgo CV Framingham (%)	-0.57 ± 4.54	-2.79 ± 4.20	0.005	-1.06 ± 3.70	0.92 ± 4.89	0.201

SM: síndrome metabólico; IMC: índice de masa corporal; TAS: tensión arterial sistólica; TAD: tensión arterial diastólica; LDL: lipoproteínas de baja densidad; HDL: lipoproteínas de alta densidad; HOMA-IR: *homeostasis model assessment-insulin resistance*; FABP4: *adipocyte fatty acid-binding protein*; GIM: grosor de la íntima media; CV: cardiovascular. *p* para las comparaciones de cambio de variables, definidas como la diferencia entre la variable 1-año de seguimiento y variable basal, mediante el test no paramétrico de la U de Mann-Whitney en cada categoría de cambio de SM según criterios de ATPIII.

Regresión SM: SM basal y no SM a 1- año de seguimiento vs. SM basal y SM at 1-año de seguimiento. Progresión SM: no SM basal y SM a 1- vs. no SM basal y no SM a 1-año de seguimiento.

Tabla 3. Predictores de cambios en SM.

Cambios en variables	Regresión SM		Progresión SM	
	Coefficiente B ± SE	<i>p</i> *	Coefficiente B ± SE	<i>p</i> **
Peso (kg)	-2.47 ± 1.01	0.016	2.29 ± 1.79	0.210
IMC (kg/m ²)	-0.90 ± 0.40	0.026	0.83 ± 0.63	0.197
Cintura (cm)	-3.18 ± 1.22	0.010	4.48 ± 1.69	0.011
Triglicéridos (mmol/l)	-0.97 ± 0.73	0.187	0.08 ± 0.90	0.929
Insulina (mU/l)	-3.66 ± 3.01	0.226	20.14 ± 8.98	0.030
Glucosa (mmol/l)	-0.04 ± 0.41	0.926	0.62 ± 0.50	0.222
HOMA-IR	-0.62 ± 1.60	0.696	8.69 ± 4.25	0.048
FABP4 (µg/l)	-8.80 ± 2.89	0.003	4.89 ± 1.85	0.012
GIM medio (mm)	0.03 ± 0.03	0.413	0.08 ± 0.04	0.052
Riesgo CV Framingham (%)	-2.28 ± 1.14	0.048	1.98 ± 1.38	0.158

SM: síndrome metabólico; IMC: índice de masa corporal; HOMA-IR: *homeostasis model assessment-insulin resistance*; FABP4: *adipocyte fatty acid-binding protein*; GIM: grosor de la íntima media; CV: cardiovascular.

* *p* obtenida a partir del análisis de regresión lineal para la comparación de cambios en el grupo de regresión de SM

** *p* a partir de análisis de regresión lineal para la comparación de cambios en el grupo de progresión a SM

Tabla 4. Análisis de regresión múltiple hacia adelante mostrando las variables cuyos cambios se asocian de forma independiente y significativa con cambios en el SM.

	coeficiente B ± SE	<i>p</i>
Regresión SM		
Cambios in FABP4 (µg/l)	0.030 ± 0.011	0.012
Progresión SM		
Cambios en cintura (cm)	0.025 ± 0.011	0.031
Cambios in insulina (mU/l)	0.006 ± 0.002	0.009

Figura 1

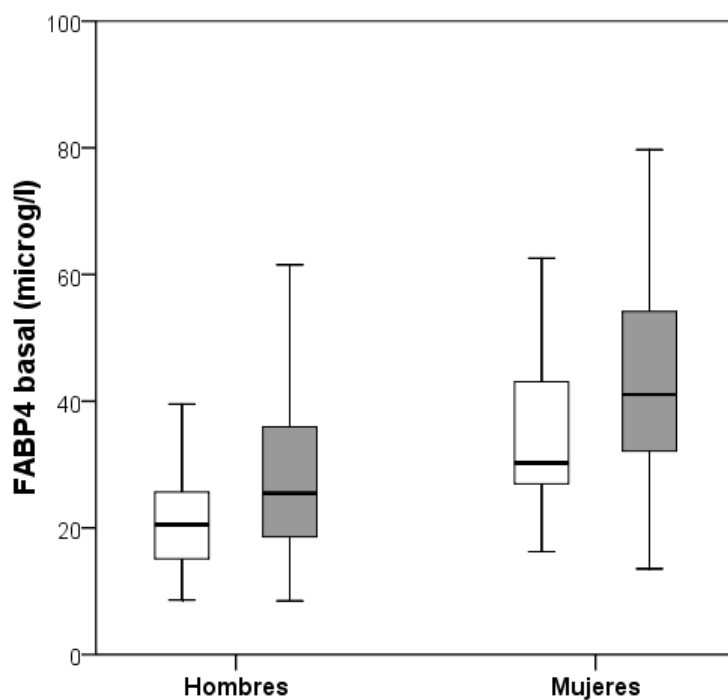


Figura 2

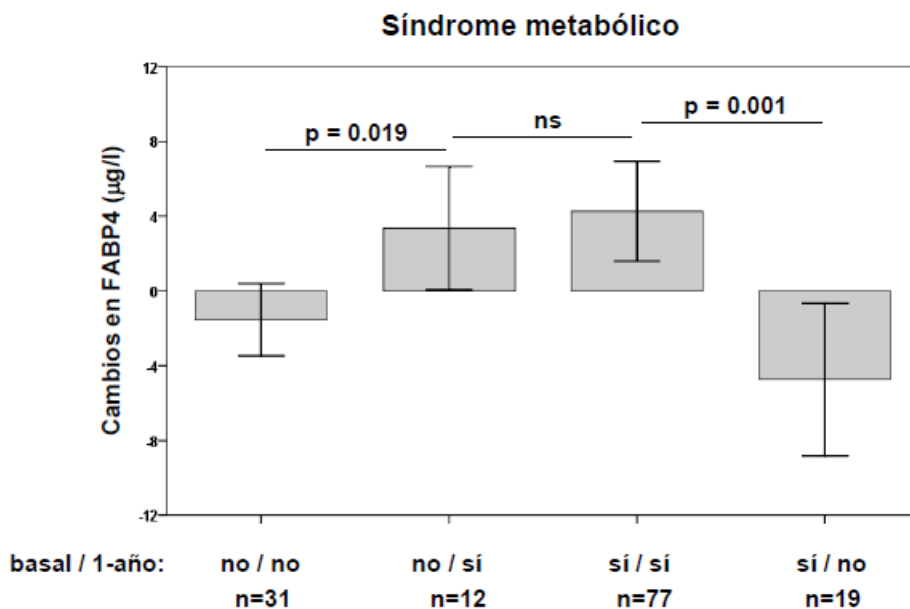
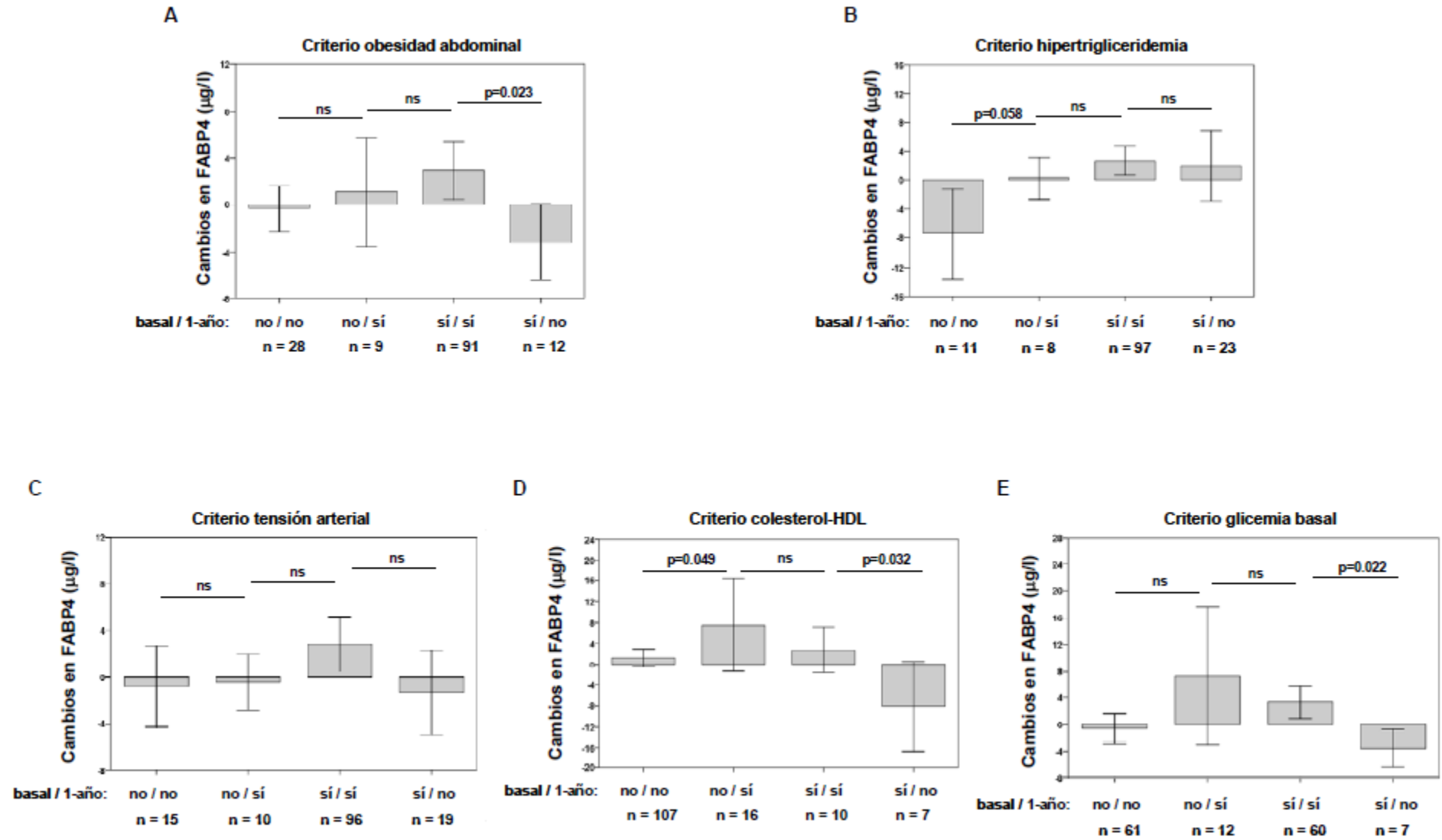


Figura 3



Fatty Acid-Binding Protein-4 Plasma Levels Are Associated to Metabolic Abnormalities and Response to Therapy in Girls and Young Women with Androgen Excess

Iolanda Lázaro^{a,b}, Marta Díaz^{b,c}, Anna Cabré^{a,b,*}, Lluís Masana^{a,b}, Lourdes Ibáñez^{b,c}

^a Vascular Medicine and Metabolism Unit, Research Unit on Lipids and Atherosclerosis, Internal Medicine Department, Sant Joan University Hospital, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain

^b CIBER of Diabetes and Associated Metabolic Diseases (CIBERDEM), Barcelona, Spain

^c Hospital Sant Joan de Déu, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Running headline: FABP4 and androgen excess in girls

*Corresponding author at: Tel.: +34 977759367; fax: +34 977759322

E-mail address: anna.cabre@urv.cat (A. Cabré).

Abstract count: 250 words, References: 30, Word count: 3979 (including tables and legends to figures)

ABSTRACT

Objective: To study circulating fatty acid-binding protein 4 (FABP4) as a predictive marker of long-term therapeutic outcome in young women with polycystic ovary syndrome (PCOS) and in girls with ovarian androgen excess and a history of precocious pubarche (PP).

Subjects and Methods: We included 114 patients with hyperinsulinemic androgen excess. Fifty-six patients had a history of PP and 39 from those had a low birth weight who were randomized to remain untreated (n=13) or to receive metformin (n=26) for > 2 yr. Fifty-eight patients had PCOS and received a low-dose combination of flutamide and metformin plus an oral contraceptive for > 2 yr. Auxology, androgens, glucose, insulin, HOMA insulin-resistance (IR), lipid profile, FABP4 and body composition (by DXA) were assessed at baseline and follow-up.

Results: At baseline, FABP4 was associated with anthropometric measurements, systolic blood pressure (SBP), and with total and abdominal fat mass (all $p < 0.001$). FABP4 levels increased after follow-up in all subgroups, the increase being less pronounced in the PP-treated girls ($p < 0.05$); in the PCOS patients, basal FABP4 levels were inversely associated to changes in SBP, HOMA-IR, and total fat mass (all $p < 0.05$), so that higher FABP4 levels were detected in those women with a more marked improvement. BMI standard deviation score was the main independent predictor of FABP4 variations (33%, $p < 0.001$).

Conclusion: FABP4 is a strong clinical biomarker of adiposity, IR and the presence of the components of the metabolic syndrome in non-obese hyperandrogenic girls and young women; pre-treatment FABP4 levels appear to predict therapeutic long-term response.

Keywords: FABP4; polycystic ovary syndrome; precocious pubarche

1. Introduction

Polycystic Ovary Syndrome (PCOS), is the most frequent endocrine disorder in adolescents and young women, and is characterized by a variable constellation including anovulatory hyperandrogenism, hyperinsulinemia, dyslipidemia, increased central fat—even in the absence of obesity—and low-grade inflammation [1-3]. Low dose therapy with metformin—an insulin sensitizer-, and flutamide—a pure androgen receptor-blocker-combined with an estro-progestagen containing drospirenone when there is pregnancy risk, ameliorates the endocrine-metabolic state of these women and

normalizes body composition and markers of cardiovascular health [2,4,5].

Precocious pubarche in girls (PP, appearance of pubic hair before the age of 8 years) due to an exaggerated adrenarche has long been recognized as a risk factor for PCOS development, mainly if PP was preceded by a low birth weight (LBW) and subsequent catch-up in weight [6-8]; hyperinsulinemia is a key factor in the development of this sequence [6,7]. Early postmenarcheal intervention with either metformin in LBW-PP girls appears to attenuate the endocrine-metabolic abnormalities and subsequent clinical hyperandrogenism [9,10].

Fatty acid-binding proteins (FABPs) belong to the superfamily of lipid-binding proteins; they are expressed in a tissue-specific manner and primarily regulate fatty acid uptake and intracellular transport [11,12]. Recently, fatty acid-binding protein 4 (FABP4), also known as aP2 –which is expressed in the cytosol of adipocytes and macrophages-, was introduced as a novel adipokine, and its serum levels were shown to independently correlate with the development of the metabolic syndrome and cardiovascular disease in humans [11-15]. For example, increased FABP4 concentrations appear to be a clinical biomarker for insulin resistance in type 2 diabetes and also precede atherogenic dyslipidemia, independent of obesity [16]. FABP4 levels increase in situations associated to adipose tissue abnormalities such as human immunodeficiency virus-associated lipodystrophy or ectopic fat deposition in non-alcoholic steatohepatitis (NASH); FABP4-deleted mice show reduced expression of inflammatory cytokines and enhanced insulin signaling and glucose uptake in adipocytes [17-19].

Reports of the potential role of FABP4 on the endocrine-metabolic abnormalities associated to PCOS are scarce, and so far, no associations other than those derived from adiposity have been described in these patients [20]; FABP4 concentrations in non-obese children and adolescents have not yet been evaluated.

We hypothesized that circulating FABP4 levels may be a predictive marker of long-term therapeutic outcome in non-obese young women with clinical PCOS and in girls with LBW-PP and subclinical androgen excess -and thus at risk for subsequent development of clinical hyperandrogenism and associated metabolic syndrome.

2. Study Design and Methods

2.1. Study Population

The study population was composed of a total of 114 Caucasian Northern Spanish girls and young women with hyperinsulinemic androgen excess. The flow chart for recruitment and selection of the patients is shown in Fig. 1.

Fifty-six of the n=114 patients [age (mean \pm SEM), 11.8 \pm 0.3 yr; BMI, 20.9 \pm 0.3 Kg/m²] had a history of PP; thirty-nine of these girls had in

addition a LBW, had been followed since prepuberty in the outpatient clinic of the Endocrinology Unit at Hospital Sant Joan de Déu, and had been enrolled in three separate clinical studies investigating the safety and efficacy of metformin treatment on their hyperinsulinemic androgen excess. Two of the trials were initiated before 2003, and thus before compulsory trial registration; the third trial was registered as ISRCTN 84749320 [9,10 and 21, respectively]. As described, the inclusion criteria were: 1) PP due to exaggerated adrenarche, as judged by high serum dehydroepiandrosterone-sulfate (DHEAS) and/or androstenedione levels; 2) hyperinsulinemia during a 2 h oral glucose tolerance test (oGTT), defined as peak serum insulin >150 mU/ml and/or mean insulin >84 mU/ml [2]; 3) weight <2.9 kg at term birth (38-41 wk) or below -1 SD for gestational age at preterm birth (33-37 wk); 4) body mass index (BMI) less than +2 SD for chronological age [22]; 5) absence of clinical signs of androgen excess.

Of the thirty-nine LBW-PP girls, n=13 were randomized to remain untreated, and were prospectively followed for a mean of 2.7 \pm 0.2 yr. Twenty-six were allocated to receive metformin in monotherapy (850 mg, daily at dinner time) for a mean of 2.5 \pm 0.2 yr. The remaining PP girls (n=17) were selected among girls consecutively seen in the outpatient clinic, based on the availability of complete phenotypical data at baseline. No follow-up data of these girls were available.

Fifty-eight of the n=114 patients were young women who had developed clinical signs of androgen excess postmenarche and had been diagnosed with PCOS (age, 18.4 \pm 0.3 yr; BMI, 22.9 \pm 0.4 Kg/m²); they were at least 2 yr beyond menarche, and were followed in the outpatient clinic according to standard procedures, including yearly blood sampling in fasting state, and yearly assessment of body composition. The inclusion criteria were: 1) hirsutism (Ferriman-Gallwey score >8) plus either amenorrhea (menses absent for >3 mo) or oligomenorrhea (menstrual cycle >45 days); 2) increased testosterone and/or androstenedione levels and 17-OH-progesterone hyperresponse to GnRH-agonist [2]; 3) hyperinsulinemia (oGTT). All patients received a combination of low-dose metformin (850 mg/d), flutamide (62.5 mg/d) plus a monophasic fourth-generation oral

contraceptive (Yasmin[®], Schering; ethinylestradiol 30 mcg + drospirenone 3 mg, 21 days/mo), for at least two years (mean: 2.6 ± 0.1 yr).

In all postmenarcheal girls, the assessments were performed in the follicular phase (day 3-7) or after 2 mo of amenorrhea.

None of the patients had thyroid dysfunction, hyperprolactinemia, late-onset congenital adrenal hyperplasia, Cushing's syndrome, glucose intolerance, or type 2 diabetes. None had received oral contraceptives or other medications known to affect gonadal function or carbohydrate metabolism during the previous 6 months.

FABP4 was assessed in the whole cohort (n=114) at baseline; follow-up measurements were performed after 2 yr (mean, 2.2 ± 0.1 yr) in n= 97 patients (n=39 LBW-PP girls and n=58 PCOS young women) from whom endocrine-metabolic and body composition data for comparisons were available. The baseline data including body composition and endocrine-metabolic phenotype other than FABP4 of the LBWPP girls have been published in part previously [9,10,21]; none of the 2 yr data have been reported before. FABP4 was also measured in 31 age- and BMI-matched healthy controls (n=18 girls; age, 12.8 ± 0.4 yr, and n=13; age, 18.1 ± 0.5 yr) for comparisons. These were either short-normal Spanish girls of the same region (heights 10th-25th percentiles) attending the general pediatric clinic or students of the second year of the nurse school. None of them had clinical signs of androgen excess.

2.2. Clinical, Endocrine and Metabolic Assessments

Height and weight were measured, and body mass index (BMI) was calculated (weight divided by height squared; Kg/m²). BMI standard deviation scores (SDS) were derived from regional normative data [22].

Fasting blood glucose, serum insulin, sex-hormone binding globuline (SHBG), androstenedione, DHEAS and testosterone were measured as previously described [2,10]. Fasting insulin sensitivity was estimated from fasting insulin and glucose levels using the homeostasis model assessment (HOMA-CIGMA

Calculator program v2.00). Free androgen index (FAI) was calculated as testosterone x 100/SHBG. Serum lipids were measured by routine laboratory methods; serum LDL was calculated using the Friedwald formula. Plasma levels of FABP4 were assessed by commercial kits (BioVendor Laboratory Medicine Inc., Brno, Czech Republic). Results were calculated using the computerized data reduction of absorbance for the standards versus the concentration using a four-parameter polynomial regression model and expressed as µg/L. The coefficients of variation (CV) intra- and inter-assay were 5.3% and 3.9%, respectively. The antibodies used in the human FABP4 ELISA are highly specific for human FABP4, with no detectable cross-reactivity to human FABP1, FABP2, FABP3 or FABP5.

2.3. Body Composition

Body composition was assessed by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) with a Lunar Prodigy coupled to Lunar software (Lunar Corp, WI, USA), as described [3]. Coefficients of variation (CVs) for scanning precision were 2.0% and 2.6% for fat and lean mass (Hologic, Waltham, MA) with an intra-individual CV for abdominal fat mass of 0.7% [2].

2.4. Statistics & Ethics

Analysis was performed using SPSS (version 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). All data are presented as the mean ± SEM. Normal distribution of data was checked with the Kolmogorov-Smirnov test. Log-transformation was performed when variables were not normally distributed. Variables between follow-up and baseline were compared with the paired-samples t test for the PCOS group and with the Wilcoxon test for untreated and treated PP groups. Variable increments between groups were compared with the nonparametric Mann-Whitney U-test. Partial bivariate correlation tests were used to adjust bivariate associations by age at baseline. Spearman correlation tests were used to analyze bivariate associations between FABP4 and variable increments. A forward stepwise multiple linear regression analysis was performed to find the variables with an independent significant association with FABP4. Variables with a high association (r>0.700, p>0.05) were not included in the same model.

The accepted model was the one with a higher adjusted R^2 and lower number of variables included. The final parameters were obtained introducing the variables chosen in a linear regression analysis. A p value of less than 0.05 was considered statistically significant.

The study protocol was approved by the Institutional Review Board of Barcelona University, Hospital of Sant Joan de Déu. Informed consent was obtained from parents and/or patients, and assent from minors.

3. Results

Table 1a shows the clinical, body composition and endocrine-metabolic variables at baseline; Table 1b shows the binary correlations between FABP4 levels and those variables. Data are presented for the whole cohort ($n=114$), and for each the PP ($n=56$) and PCOS ($n=58$) subgroups separately.

FABP4 levels were not significantly different from those encountered in the age- and BMI-matched controls. In the whole cohort, FABP4 was positively associated with BMI-SDS, waist circumference, waist-to-hip ratio, systolic blood pressure (SBP), and to total and abdominal fat mass (all $p<0.001$). Weaker but nevertheless significant correlations were present for diastolic BP (DBP), insulin, HOMA-IR, LDL-C, and triglycerides. In the PCOS subgroup, FABP4 was strongly correlated with auxological and body composition parameters, and also with fasting insulin and HOMA-IR (all $p<0.001$).

Table 2 shows the studied variables at baseline and after 2 yrs of follow-up in the $n=97$ patients in whom complete data were available.

In the PP-untreated subgroup, all variables worsened with time, as expected, including for an increase in BMI versus baseline. In contrast, in the PP-treated subgroup and in the PCOS subgroup there was an improvement in most of the variables assessed; all these benefits occurred without appreciable changes in BMI. FABP4 increased after follow-up in all subgroups; however, the increase was significantly less pronounced in the PP-treated girls ($p<0.05$).

In order to assess the predictive value of FABP4 levels in the therapeutic response, we studied

the relationships between FABP4 basal values and the changes (Δ) after follow-up in the selected variables. In the PP-untreated subgroup, higher baseline FABP4 levels predicted a higher increase in weight and BMI (all $p<0.05$) after follow-up; these associations were not detected in the PP-treated subgroup. In the PCOS subgroup, basal FABP4 levels were inversely associated to changes in SBP, HOMA-IR, and total fat mass ($p=0.02$; $p=0.04$ and $p=0.03$, respectively), so that higher basal FABP4 levels were detected in those subjects who experienced a more marked improvement after 2 yr. No correlations were found between FABP4 levels and androgens, either at baseline or after follow-up.

A forward stepwise regression analysis showed that 33% of the FABP4 variation was explained by variations in BMI-SDS ($p<0.001$), with a B coefficient = 2.61 (95% CI, 1.92- 3.30). Considering only the PCOS group, waist circumference and SBP were the main contributors to FABP4 variations (48%) with B coefficients of 0.41 (95% CI, 0.25-0.57; $p<0.001$) and 0.15 (95% CI, 0.02-0.28; $p=0.022$), respectively.

4. Discussion

In our population of non-obese girls and young women with androgen excess, circulating FABP4 was associated to measures of insulin resistance and body adiposity; in addition, FABP4 correlated with metabolic syndrome parameters including both SBP and DBP and the lipid profile. Multivariate linear regression analysis disclosed that BMI-SDS was the main determinant of FABP4 plasma concentrations.

Although circulating FABP4 has been suggested to be an independent marker of the metabolic syndrome, its role in the pathogenesis of insulin resistance is still controversial [23]. For example, FABP4 has been found to be a determinant of insulin sensitivity in morbidly obese women undergoing bariatric surgery; in contrast, the changes of this adipokine did not parallel the amelioration in insulin resistance parameters after lifestyle intervention in PCOS obese women, suggesting that at least in the obese PCOS population, FABP4 is not a key factor linking adiposity to insulin resistance [20]. In agreement with published data in obese PCOS women, we could not demonstrate an

independent impact of FABP4 on androgen levels, suggesting that FABP4 actions in adipocytes do not interact with the metabolic pathway of adipose tissue steroidogenesis [20,24].

In our hyperandrogenic patients, insulin sensitivity, the lipid profile, serum androgens, and body composition parameters improved after two years of treatment with metformin or low-dose flutamide-metformin plus an oral contraceptive, as expected; in the untreated PP girls, the endocrine-metabolic and body composition profile diverged further from the norm. In treated girls, the decrease in the body fat fraction was accompanied by an increase in lean mass, without appreciable changes in body weight. Plasma FABP4 levels did not parallel these changes, as they increased over two years in both the untreated and treated subgroups, although significantly less in the latter. However, hyperandrogenic patients with the highest baseline FABP4 levels were those in whom body composition and insulin resistance improved most, suggesting that FABP4 may be a marker for predicting treatment efficacy in non-obese hyperandrogenic patients.

The paradoxical increase in circulating FABP4 levels after intervention may be ascribed in part to metformin's actions in the liver, where it is capable of inducing hepatic gene expression that closely mimics the profile of calorie restriction [25]. This mechanism may also explain the marked decrease in FABP4 levels observed in young women with anorexia nervosa upon refeeding and weight gain [26]. In addition, genetic variations in the FABP4 gene that reduce or enhance FABP4 expression could influence circulating levels of the protein and also cardiometabolic and diabetes risks [14,27,28]. In this regard, obese children with the allelic variant rs1054135 show higher plasma FABP4 levels than age- and BMI-matched children without this polymorphism and with the same degree of insulin resistance [14].

The mechanisms by which FABPs controls the development of major components of the metabolic syndrome have not been fully elucidated; however, recent reports indicate that the impact of FABPs on systemic metabolism is the result of interactions between these proteins' independent effects in macrophages and adipocytes, particularly in

adipose tissue, where FABP4 is more abundant [24]. It is so far unknown whether adipocyte-related signals regulated by FABP4 may also play a role in the metabolic alterations and enhanced insulin action in liver or muscle. Recently, metformin has been shown to reduce lipid accumulation in macrophages by repressing the transcription factor FOXO1, which in turn, results in a reduction of FABP4 expression [29]. Elevated FOXO1 expression and nuclear localization have been observed in mouse models of diabetes and obesity; inhibition of FOXO1 reduces fat accumulation in the liver and improves insulin sensitivity [30]. Taken together, these findings suggest that metformin-induced repression of FABP4 transcription mediated by FOXO1 may have a key role in the prevention of atherosclerosis [29].

One of the strengths of the study was the relatively homogeneous phenotype of the cohorts, the prospective and long-term follow-up of the patients and the availability of the same methodology for clinical, endocrine-metabolic and body composition assessments over two years.

In conclusion, FABP4 is a strong clinical biomarker of adiposity, insulin resistance and the presence of the components of the metabolic syndrome in nonobese hyperandrogenic girls and young women; pre-treatment FABP4 levels appear to predict therapeutic long-term response. Additional long-term, prospective studies will help to further clarify the etiological role of FABP4 in hyperandrogenic states, including the potential influences of genetic variations of this protein on the clinical phenotype [30].

Funding

CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas is an ISCIII project.

Conflict of interest

None.

Acknowledgements

We thank Dr. Luis del Río and Dr. Silvana di Gregorio for performing the body composition studies.

References

- [1] Franks S. Polycystic ovary syndrome in adolescents. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32:1035-41.
- [2] Ibáñez L, de Zegher F. Ethinylestradiol-drospirenone, flutamide-metformin, or both for adolescents and women with hyperinsulinemic hyperandrogenism: opposite effects on adipocytokines and body adiposity. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:1592-7.
- [3] Tarkun I, Arslan BC, Cantürk Z, Türemen E, Sahin T, Duman C. Endothelial dysfunction in young women with polycystic ovary syndrome: relationship with insulin resistance and low-grade chronic inflammation. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:5592-6.
- [4] Ibáñez L, de Zegher F. Low-dose flutamide-metformin therapy for hyperinsulinemic hyperandrogenism in non-obese adolescents and women. *Hum Reprod Update* 2006;12:243-52.
- [5] Gambineri A, Patton L, Vaccina A, et al. Treatment with flutamide, metformin, and their combination added to a hypocaloric diet in overweight-obese women with polycystic ovary syndrome: a randomized, 12-month, placebo-controlled study. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:3970-80.
- [6] Ibáñez L, Díaz R, López-Bermejo A, Marcos MV. Clinical spectrum of premature pubarche: Links to metabolic syndrome and ovarian hyperandrogenism. *Rev Endocr Metab Disord* 2009;10:63-76.
- [7] Ibáñez L, Valls C, Potau N, Marcos MV, de Zegher F. Polycystic ovary syndrome after precocious pubarche: ontogeny of the low birthweight effect. *Clin Endocrinol* 2001;55:667-72.
- [8] Rosenfield RL. Clinical review: Identifying children at risk for polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:787-96.
- [9] Ibáñez L, Ferrer A, Ong K, Amin R, Dunger D, de Zegher F. Insulin sensitization early post-menarche prevents progression from precocious pubarche to polycystic ovary syndrome. *J Pediatr* 2004;144:23-9.
- [10] Ong K, de Zegher F, López-Bermejo A, Dunger DB, Ibáñez L. Flutamide-Metformin for young post-menarcheal girls with preclinical androgen excess: Evidence for differential response by androgen receptor genotype. *Eur J Endocrinol* 2007;157:661-8.
- [11] Erbay E, Cao H, Hotamisligil GS. Adipocyte/macrophage fatty acid binding proteins in metabolic syndrome. *Curr Atheroscler Rep* 2007;9:222-9.
- [12] Furuhashi M, Hotamisligil GS. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7:489-503.
- [13] Fasshauer M, Seeger J, Waldeyer T, et al. Serum levels of the adipokine adipocyte fatty acid-binding protein are increased in preeclampsia. *Am J Hypertens* 2008;21:582-6.
- [14] Khalyfa A, Bhushan B, Hegazi M, et al. Fatty-acid binding protein 4 gene variants and childhood obesity: potential implications for insulin sensitivity and CRP levels. *Lipids Health Dis* 2010;9:18.
- [15] Yeste D, Vendrell J, Tomasini R, et al. Retinol-binding protein 4 levels in obese children and adolescents with glucose intolerance. *Horm Res Paediatr* 2010;73:335-40.
- [16] Cabré A, Lázaro I, Girona J, et al. Plasma fatty acid binding protein 4 is associated with atherogenic dyslipidemia in diabetes. *J Lipid Res* 2008;49:1746-51.
- [17] Westerbacka J, Kolak M, Kiviluoto T, et al. Genes involved in fatty acid partitioning and binding, lipolysis, monocyte/macrophage recruitment, and inflammation are overexpressed in the human fatty liver of insulin-resistant subjects. *Diabetes* 2007;56:2759-65.
- [18] Coll B, Cabré A, Alonso-Villaverde C, et al. The fatty acid binding protein-4 (FABP4) is a strong biomarker of metabolic syndrome and lipodystrophy in HIV infected patients. *Atherosclerosis* 2008;199:147-53.
- [19] Furuhashi M, Fucho R, Görgün CZ, Tuncman G, Cao H, Hotamisligil GS. Adipocyte/macrophage fatty acid-binding proteins contribute to metabolic deterioration through actions in both macrophages and adipocytes in mice. *J Clin Invest* 2008;118:2640-50.
- [20] Möhlig M, Weickert MO, Ghadamgadai E, et al. Adipocyte fatty acid-binding protein is associated with markers of obesity, but is an unlikely link between obesity, insulin resistance, and hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome women. *Eur J Endocrinol* 2007;157:195-200.
- [21] Ibáñez L, López-Bermejo A, Diaz M, Marcos MV, de Zegher F. Metformin treatment for 4 yr to reduce total and visceral fat in low-birthweight girls with precocious pubarche. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:1841-5.
- [22] Ferrández-Longás A, Mayayo E, Labarta JI, et al. Estudio longitudinal de crecimiento y desarrollo. Centro Andrea Prader. Zaragoza 1980-2002. Patrones de crecimiento y

desarrollo en España. Atlas de gráficas y tablas, Madrid, In ERGON, ed.2004, pp 61-115.

[23] Cabré A, Lázaro I, Girona J, et al. Fatty acid binding protein 4 is increased in metabolic syndrome and with thiazolidinedione treatment in diabetic patients. *Atherosclerosis* 2007;195:e150-8.

[24] Furuhashi M, Fucho R, Görgün CZ, Tuncman G, Cao H, Hotamisligil GS. Adipocyte/macrophage fatty acid-binding proteins contribute to metabolic deterioration through actions in both macrophages and adipocytes in mice. *J Clin Invest* 2008;118:2640-50.

[25] Ingram DK, Zhu M, Mamczarz J, et al. Calorie restriction mimetics: an emerging research field. *Aging Cell* 2006;2:97-108.

[26] Engl J, Tschoner A, Willis M, et al. Adipocyte fatty acid binding protein during refeeding of female patients with anorexia nervosa. *Eur J Nutr* 2009;48:403-8.

[27] Tuncman G, Erbay E, Hom X, et al. A genetic variant at the fatty acid-binding protein aP2 locus reduces the risk for hypertriglyceridemia, type 2 diabetes, and cardiovascular disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:6970-5.

[28] Chan KH, Song Y, Hsu YH, You NC, F Tinker L, Liu S. Common genetic variants in fatty acid-binding protein-4 (FABP4) and clinical diabetes risk in the Women's Health Initiative Observational Study. *Obesity (Silver Spring)* 2010;Jan 28, [Epub ahead of print]

[29] Song J, Ren P, Zhang L, Wang XL, Chen L, Shen YH. Metformin reduces lipid accumulation in macrophages by inhibiting FOXO1-mediated transcription of fatty acid-binding protein 4. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;201;393:89-94.

[30] Wang J, Tang J, Wang B, et al. FABP4: a novel candidate gene for polycystic ovary syndrome. *Endocrine* 2009;Oct 21. [Epub ahead of print]

Figure Legends

Fig. 1. Flow Chart for Recruitment and Selection of the Study Population. PP indicates precocious pubarche; LBW, low birth weight; NBW, normal birth weight; PCOS, polycystic ovary syndrome.

Figure 1

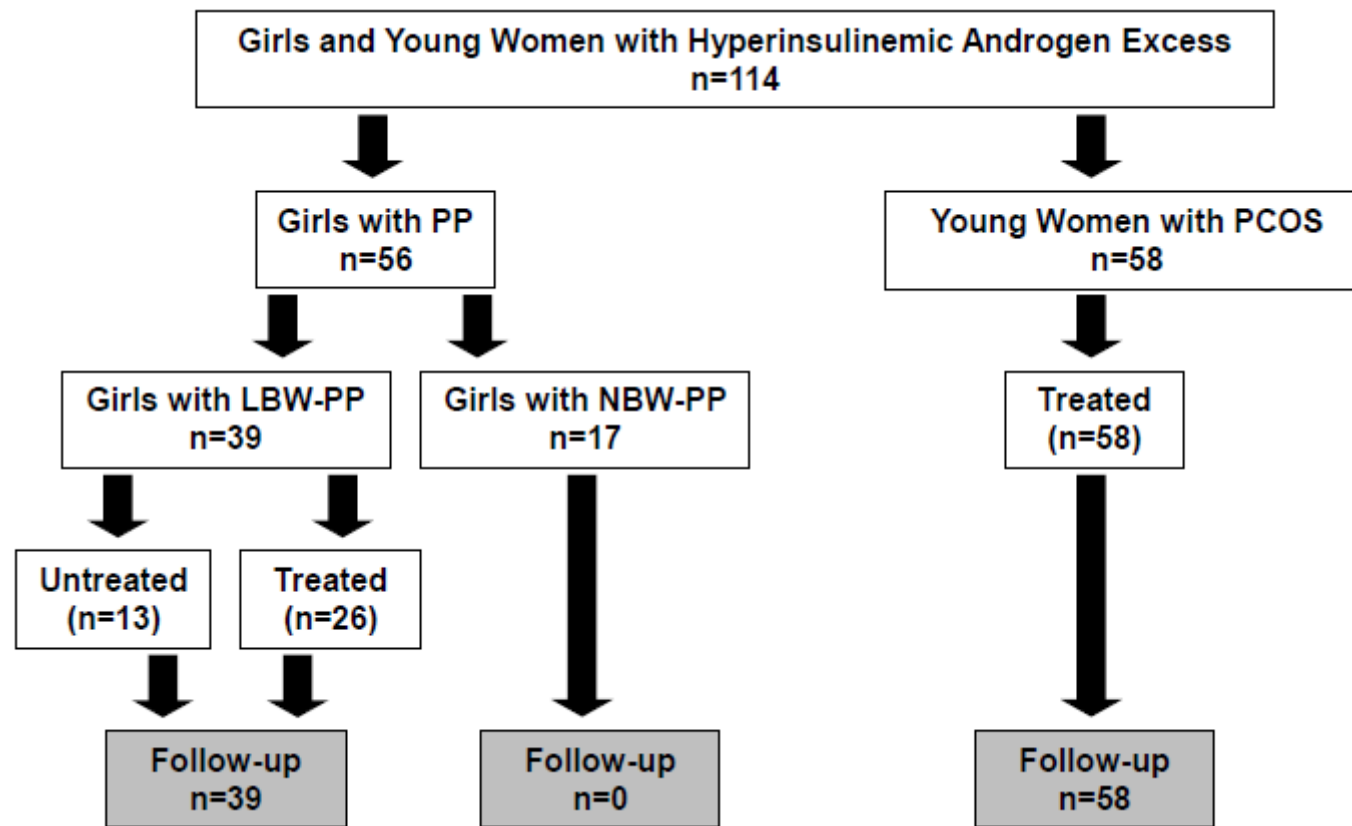


Table 1a. Baseline characteristics of the study patients.

Variables	All (n=114)	PP (n=56)	PCOS (n=58)
Clinical data			
Age (yr)	15.2 ± 0.4	11.8 ± 0.3	18.4 ± 0.3
BMI-SDS	0.9 ± 0.1	0.6 ± 0.1	1.2 ± 0.2
Waist (cm)	73.5 ± 0.8	70.3 ± 0.8	76.6 ± 1.1
WHR	0.78 ± 0.01	0.79 ± 0.01	0.77 ± 0.01
SBP (mmHg)	112 ± 1	107 ± 1	117 ± 1
DBP (mmHg)	61 ± 1	61 ± 1	61 ± 1
Body Composition (DXA)			
FBM (Kg)	19.1 ± 0.7	16.3 ± 0.8	21.8 ± 1.0
AFM (Kg)	5.4 ± 0.2	4.4 ± 0.3	6.3 ± 0.3
LBM (Kg)	33.0 ± 0.5	30.9 ± 0.8	35.1 ± 0.5
Endocrine-Metabolic Variables			
Glucose (mg/dL)	90 ± 1	90 ± 1	90 ± 1
Insulin (mU/L)	12.1 ± 0.5	12.5 ± 0.7	11.6 ± 0.7
HOMA-IR	2.7 ± 0.1	2.8 ± 0.2	2.6 ± 0.2
FABP4 (µg/L)	12.9 ± 0.6	13.1 ± 0.8	12.8 ± 0.8
LDL-cholesterol (mg/dL)	91 ± 3	85 ± 4	96 ± 4
HDL-cholesterol (mg/dL)	59 ± 1	60 ± 2	58 ± 2
Triglycerides (mg/dL)	73 ± 3	74 ± 5	72 ± 4
Androstenedione (ng/dL)	263 ± 13	189 ± 11	334 ± 18
Testosterone (ng/dL)	72 ± 3	57 ± 4	86 ± 5
SHBG (nmol/L)	42 ± 2	44 ± 3	40 ± 3
DHEAS (µg/dL)	218 ± 10	167 ± 10	267 ± 14

Values are mean ± SEM

PP, Precocious Pubarche; PCOS, Polycystic Ovary Ssyndrome; BMI-SDS, body mass index standard deviation score; WHR, waist-to-hip ratio; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; FBM, fat body mass; AFM, abdominal fat mass; LBM, lean body mass; HOMA-IR, homeostatic model assessment - insulin resistance index, FABP4, adipocyte fatty-acid binding protein; LDL, low-density lipoprotein; HDL, high density lipoprotein; SHBG, sex-hormone-binding globulin; DHEAS, dehydroepiandrosterone sulfate.

FABP4 values in population controls; girls (age, 12.8 ± 0.4 yr; n=18): 12.8 ± 1.8 µg/L; young women (age, 18.3 ± 0.5 yr; n=13): 13.6 ± 2.1 µg/L.

Table 1b. Correlations between baseline FABP4 levels and baseline variables in the study population.

Variable	All (n=114)		PP (n=56)		PCOS (n=58)	
	Rho	<i>p</i>	Rho	<i>p</i>	Rho	<i>p</i>
BMI-SDS	0.582	<0.001	0.493	<0.001	0.628	<0.001
Waist	0.463	<0.001	0.256	0.060	0.654	<0.001
WHR	0.324	<0.001	0.011	0.939	0.509	<0.001
SBP	0.293	0.002	0.183	0.180	0.474	<0.001
DBP	0.229	0.015	0.112	0.415	0.335	0.011
FBM	0.468	<0.001	0.298	0.027	0.644	<0.001
AFM	0.340	<0.001	0.066	0.635	0.622	<0.001
LBM	-0.093	0.327	-0.165	0.228	0.171	0.203
Glucose	0.146	0.124	0.022	0.871	0.231	0.083
Insulin	0.211	0.025	-0.047	0.732	0.524	<0.001
HOMA-IR	0.219	0.020	-0.033	0.809	0.532	<0.001
LDL-cholesterol	0.275	0.003	0.253	0.062	0.204	0.127
HDL-cholesterol	-0.009	0.926	-0.223	0.102	0.054	0.688
Triglycerides	0.236	0.012	0.266	0.050	0.167	0.215
Androstenedione	0.048	0.615	0.043	0.755	0.108	0.422
Testosterone	-0.018	0.848	-0.117	0.395	0.059	0.661
SHBG	-0.156	0.098	-0.244	0.072	-0.187	0.164
DHEAS	0.087	0.359	0.075	0.587	0.255	0.066

PP, Precocious Pubarche; PCOS, Polycystic Ovary Syndrome; BMI-SDS, body mass index standard deviation score; WHR, waist-to-hip ratio; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; FBM, fat body mass; AFM, abdominal fat mass; LBM, lean body mass; HOMA-IR, homeostatic model assessment - insulin resistance index, LDL, low-density lipoprotein; HDL, high density lipoprotein; SHBG, sex-hormone-binding globulin; DHEAS, dehydroepiandrosterone sulfate.

Table 2. Clinical data, body composition measurements and endocrine-metabolic variables before and after ~ 2 yr of follow-up with or without intervention.

	PP (n=39)				PCOS (n=58)	
	Untreated (n=13)		Treated (n=26)		Basal	Follow-up
	Basal	Follow-up	Basal	Follow-up		
<u>Clinical data</u>						
Age (years)	10.0 ± 0.7	13.1 ± 0.6 [†]	12.1 ± 0.3	14.3 ± 0.3 [§]	18.4 ± 0.4	21.4 ± 0.3 [§]
BMI (Kg/m ²)	20.3 ± 0.6	21.8 ± 0.7 [*]	20.6 ± 0.5	20.9 ± 0.4	22.9 ± 0.4	22.9 ± 0.4
BMI-SDS	1.1 ± 0.3	1.0 ± 0.3	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.2	1.2 ± 0.2	1.3 ± 0.2
Waist (cm)	68.9 ± 1.4	73.6 ± 1.6 [†]	70.4 ± 1.2	68.8 ± 0.8 ^{* #}	76.6 ± 1.1	73.1 ± 1.1 [§]
WHR	0.83 ± 0.01	0.81 ± 0.02	0.78 ± 0.01	0.74 ± 0.01 [§]	0.77 ± 0.01	0.73 ± 0.01 [§]
SBP (mmHg)	106 ± 3	107 ± 3	108 ± 2	108 ± 2	117 ± 1	116 ± 1
DBP (mmHg)	60 ± 3	61 ± 3	61 ± 2	61 ± 1	61 ± 1	61 ± 1
<u>Body Composition</u>						
BMD (g/cm ²)	0.9 ± 0.1	1.0 ± 0.1 [†]	1.0 ± 0.0	1.1 ± 0.0 [§]	1.2 ± 0.0	1.2 ± 0.0
FBM (Kg)	14.1 ± 1.7	19.0 ± 1.4 [†]	17.0 ± 1.2	17.0 ± 1.0 [¶]	21.8 ± 1.0	20.6 ± 0.9 [*]
AFM (Kg)	4.0 ± 0.6	7.4 ± 2.2 [*]	4.6 ± 0.4	6.3 ± 1.2	6.3 ± 0.3	5.8 ± 0.3 [†]
LBM (Kg)	26.1 ± 2.1	29.8 ± 1.5 [*]	32.0 ± 0.9	34.2 ± 0.8 [§]	35.1 ± 0.5	35.8 ± 0.6 [*]
<u>Endocrine-metabolic variables</u>						
Glucose (mg/dL)	85 ± 2	91 ± 1 [*]	91 ± 2	91 ± 1	90 ± 1	88 ± 1
Insulin (mU/L)	11.3 ± 1.6	15.8 ± 2.5	14.2 ± 1.1	11.2 ± 0.8 [*]	11.6 ± 0.7	9.0 ± 0.5 [§]
HOMA-IR	2.4 ± 0.4	3.6 ± 0.6	3.3 ± 0.3	2.5 ± 0.2 [*]	2.6 ± 0.2	2.0 ± 0.1 [§]
FABP4 (µg/L)	12.9 ± 0.8	18.4 ± 1.4 [†]	10.8 ± 0.9	14.5 ± 1.1 [§]	12.8 ± 0.8	16.8 ± 0.9 [§]
LDL-cholesterol (mg/dL)	85 ± 8	80 ± 8	80 ± 6	84 ± 4	97 ± 4	98 ± 3
HDL-cholesterol (mg/dL)	70 ± 4	61 ± 6 [*]	57 ± 2	54 ± 2	58 ± 2	67 ± 2 [§]
Triglycerides (mg/dL)	65 ± 4	77 ± 11	83 ± 9	59 ± 3 [*]	72 ± 4	81 ± 4
Androstenedione (ng/dL)	164 ± 26	271 ± 32 [*]	202 ± 16	236 ± 18	334 ± 18	274 ± 9 [†]
Testosterone (ng/dL)	51 ± 11	55 ± 7	63 ± 5	60 ± 5	86 ± 5	59 ± 4 [§]
SHBG (nmol/L)	54 ± 7	42 ± 6 [*]	41 ± 4	47 ± 3 [¶]	40 ± 3	145 ± 7 [§]
DHEAS (µg/dL)	145 ± 19	176 ± 14	181 ± 16	198 ± 17	267 ± 14	209 ± 14 [§]

BMI, body mass index; BMI-SDS, body mass index standard deviation score; WHR, waist-to-hip ratio; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; BMD, bone mineral density; FBM, fat body mass; AFM, abdominal fat mass; LBM, lean body mass; HOMA-IR, homeostatic model assessment - insulin resistance index, FABP4, adipocyte fatty acid-binding protein; SHBG, sex-hormone-binding globulin; DHEAS, dehydroepiandrosterone sulfate.

* $P < 0.05$, [†] $P < 0.005$ and [§] $P < 0.001$ for the comparisons between assessments at baseline and at follow-up in the PCOS women (paired-samples t-test) and in the non-treated and treated PP girls (Wilcoxon test).

|| $P < 0.05$, [¶] $P < 0.005$ and [#] $P < 0.001$ for the comparisons of increments in the assessed values between the untreated and treated PP girls (Mann Whitney U-test).