



## PAPEL DE FABP4 Y FABP5 CIRCULANTES EN LAS ENFERMEDADES METABÓLICAS

**Daiana Ibarretxe Gerediaga**

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FABP4 Y FABP5 CIRCULANTES EN LAS ENFERMEDADES METABÓLICAS

Daiana Ibarretxe Gerediaga

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FABP4 Y FABP5 CIRCULANTES EN LAS ENFERMEDADES METABÓLICAS

Daiana Ibarretxe Gerediaga

**UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI**

**Departament de Medicina i Cirurgia  
Facultat de Medicina i Ciències de la Salut  
Programa de Doctorat: BIOMEDICINA**



# **Papel de FABP4 y FABP5 circulantes en las Enfermedades Metabólicas**

**Daiana Ibarretxe Gerediaga**

**TESIS DOCTORAL**

**Dirigida por el Prof. Lluís Masana Marín y**

**la Dra. Josefa Girona Tell**

**Reus, 2016**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FABP4 Y FABP5 CIRCULANTES EN LAS ENFERMEDADES METABÓLICAS

Daiana Ibarretxe Gerediaga

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FABP4 Y FABP5 CIRCULANTES EN LAS ENFERMEDADES METABÓLICAS

Daiana Ibarretxe Gerediaga

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FABP4 Y FABP5 CIRCULANTES EN LAS ENFERMEDADES METABÓLICAS

Daiana Ibarretxe Gerediaga



UNIVERSITAT  
ROVIRA I VIRGILI



FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA SALUT  
UNITAT DE RECERCA EN LÍPIDS I ARTERIOSCLEROSI

C/Sant Llorenç, 21  
43201 Reus (Spain)  
Tel. +34 977 759 366  
Fax +34 977 759 322  
luis.masana@urv.cat

FAIG CONSTAR que aquest treball, titulat "**Papel de FABP4 y FABP5 circulantes en las Enfermedades Metabólicas**", que presenta Daiana Ibarretxe Gerediaga per a l'obtenció del títol de Doctor, ha estat realitzat sota la meva direcció al Departament de Medicina i Cirurgia d'aquesta universitat.

---

HAGO CONSTAR que el presente trabajo, titulado "**Papel de FABP4 y FABP5 circulantes en las Enfermedades Metabólicas**", que presenta Daiana Ibarretxe Gerediaga para la obtención del título de Doctor, ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Medicina y Cirugía de esta universidad.

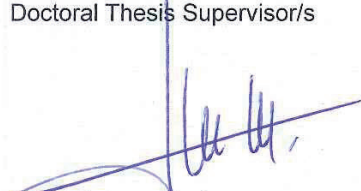
---

I STATE that the present study, entitled "**Papel de FABP4 y FABP5 circulantes en las Enfermedades Metabólicas**", presented by Daiana Ibarretxe Gerediaga for the award of the degree of Doctor, has been carried out under my supervision at the Medicine & Surgery Department of this university.

---

Reus, 23 de novembre de 2015

El/s director/s de la tesi doctoral  
El/los director/es de la tesis doctoral  
Doctoral Thesis Supervisor/s



Lluís Masana Marin



Josefa Girona Tell



Management  
System  
ISO 9001:2008  
www.tuv.com  
ID: 9105930474





UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FABP4 Y FABP5 CIRCULANTES EN LAS ENFERMEDADES METABÓLICAS

Daiana Ibarretxe Gerediaga

*A mis padres*

*A mi hermano*

*A Maximiliano*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FABP4 Y FABP5 CIRCULANTES EN LAS ENFERMEDADES METABÓLICAS

Daiana Ibarretxe Gerediaga

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera empezar comentando que esta tesis recoge una importante trayectoria de investigación y que por tanto muchas personas han participado en ella, por lo que considero justo e importante mencionarlo.

A mi director de tesis, el Profesor Lluís Masana, porque hace 5 años me brindó la gran oportunidad de unirme a la Unidad de Medicina Vascul y Metabolismo (UVASMET), y junto con todo el equipo clínico, he recibido una gran formación en el campo de la Lipidología clínica y el riesgo cardiovascular. Agradezco profundamente todas las enseñanzas, dedicación, trabajo en equipo y miles de experiencias en común que hemos podido compartir.

A mi co-directora de tesis, la Dra. Josefa Girona, por su dedicación, enseñanza, paciencia infinita y apoyo personal siempre que lo he necesitado.

A todo el personal de la URLA, porque han sabido inculcarme la importancia de la investigación en el área básica.

A mis amigos, que ya sabéis quienes sois, por estar a mi lado sin juzgarme, porque simplemente me aceptáis como soy y habéis sabido apoyarme en todo los momentos, a pesar de que algunos han sido muy difíciles.

A mi familia, en especial a aita y a ama, porque sin su apoyo incondicional desde el principio, yo no estaría aquí. Han sabido transmitirme e inculcarme la importancia de esta profesión, la humildad, el humanismo, el cariño, la constancia y perseverancia necesarios en el día a día. Pero sobre todo el amor, que es el principal motor de mi vida.

A mi marido, porque su positivismo, entusiasmo, cariño, amor y apoyo incondicional, han sido vitales en los momentos clave de mi vida. Ya sabes que *“En la calle, codo a codo, somos mucho más que dos...”*

Gracias a todos de todo corazón.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FABP4 Y FABP5 CIRCULANTES EN LAS ENFERMEDADES METABÓLICAS

Daiana Ibarretxe Gerediaga

# ÍNDICE

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FABP4 Y FABP5 CIRCULANTES EN LAS ENFERMEDADES METABÓLICAS

Daiana Ibarretxe Gerediaga

<b>1. Presentación y Justificación</b> . . . . .	21
<b>2. Introducción</b>	
2.1. Transporte celular de los ácidos grasos . . . . .	25
2.1.1. <i>Fatty acid translocase (FAT) /CD36</i> . . . . .	30
2.1.2. <i>Fatty acid transport protein (FATP)</i> . . . . .	32
2.1.3. <i>Plasma membrane fatty acid binding protein (FABPpm)</i> . . . . .	35
2.1.4. <i>Fatty acid binding protein (FABP)</i> , transporte citoplasmático a diversos compartimentos celulares. . . . .	36
2.2. Familia FABP . . . . .	37
2.3. <i>Fatty acid binding protein 4</i>	
2.3.1. Estructura, localización y función . . . . .	44
2.3.2. Variantes genéticas (polimorfismos) del gen FABP4 . . . . .	49
2.3.3. Secreción plasmática y papel de FABP4 circulante . . . . .	49
2.3.4. Conocimientos aportados por los animales <i>Knockout</i> y transgénicos de <i>Fabp4</i> . . . . .	51
2.3.5. Relación de FABP4 circulante con alteraciones metabólicas . . . . .	54
2.3.6. Relación de FABP4 circulante con alteraciones vasculares . . . . .	62
2.3.7. Evidencias de los efectos periféricos de FABP4 . . . . .	64
2.4. <i>Fatty acid binding protein 5</i>	
2.4.1. Estructura, localización y función . . . . .	66
2.4.2. Variantes genéticas (polimorfismos) del gen FABP5 . . . . .	68
2.4.3. Conocimientos aportados por los animales <i>knockout</i> y transgénicos de <i>Fabp5</i> . . . . .	68
2.4.4. Relación de FABP5 circulante con las alteraciones metabólicas y cardiovasculares . . . . .	71
2.5. Complementariedad entre FABP4 y FABP5 . . . . .	73
2.6. <i>Proprotein Convertase Subtilisin Kexin (PCSK9)</i> . . . . .	74
<b>3. Hipótesis</b> . . . . .	77
<b>4. Objetivos</b> . . . . .	81
<b>5. Estudio1: FABP4 plasma concentrations are determined by acquired metabolic derangements rather than genetic determinants</b> . . . . .	85
<b>6. Estudio 2: Impact of epidermal fatty acid binding protein on 2d-NMR-assessed atherogenic dyslipidemia and related disorders.</b> . . . . .	93
<b>7. Estudio 3: Circulating PCSK9 in patients with type 2 diabetes and related metabolic disorders.</b> . . . . .	119



<b>8. Discusión</b>	
8.1. Resumen de resultados .....	143
8.2. Discusión general .....	145
<b>9. Conclusiones .....</b>	<b>155</b>
<b>10. Bibliografía .....</b>	<b>159</b>

# ABREVIATURAS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FABP4 Y FABP5 CIRCULANTES EN LAS ENFERMEDADES METABÓLICAS

Daiana Ibarretxe Gerediaga

---

## ABREVIATURAS

4-HNE	4-hidroxinonenal
ACS1	acyl-CoA sintetasa
AG	Ácido graso
AGCL	Ácido graso de cadena larga
AGCML	Ácidos grasos de cadena muy larga
CAD	Enfermedad arterial coronaria
C-HDL	Colesterol HDL
C-LDL	Colesterol LDL
CETP	Proteína transferidora de ésteres de colesterol
CPAP	Presión continua positiva
CT90	Tiempo de sueño por debajo del 90% de saturación de oxígeno
DRG	Dieta rica en grasas
eNOS	Oxido nítrico sintasa endotelial
ECV	Enfermedad cerebrovascular
FABP	<i>Fatty acid binding protein</i>
FABPc	Fatty acid binding protein citoplasmático
FAT	<i>Fatty acid translocase (FAT)</i>
FATP	<i>Fatty acid transport protein</i>
FG-MDRD	Filtrado glomerular
GIMc	Grosor íntima-media carotideo
HNF1A	Factor nuclear de hepatocitos 1A
HOMA-IR	HOMA de insulino resistencia
HSL	Lipasa sensible a hormonas
IMC	Índice de masa corporal
IL-3	Interleuquina 3

*Abreviaturas*

---

IL-4	Interleuquina 4
IL-6	Interleuquina 6
IVUS	Ultrasonografía intravascular
KO	<i>Knockout</i>
LPL	Lipoprotein lipasa
mAspAt	Aspartato aminotransferasa mitocondrial
NFkB	Factor nuclear kappa B
NEFA	Ácidos grasos no esterificados
NLS	<i>Nuclear localization signal</i>
PAT	Tonometría arterial periférica
PCOS	Síndrome de ovario poliquístico
PCR	Proteína C reactiva
PET-TAC	Tomografía por emisión de positrones – Tomografía axial computerizada
PCRus	Proteína C reactiva ultrasensible
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
RBP4	<i>Retinol binding protein 4</i>
RCV	Riesgo cardiovascular
RLDL	Receptor LDL
SAHS	Síndrome de apnea-hipopnea del sueño
<i>Scd1</i> hepática	Estearoil-coenzima A desaturasa 1
SMet	Síndrome metabólico
TG	Triglicéridos
Th2	Linfocito T helper 2
TNF-alfa	Factor de necrosis tumoral alfa
TZD	Tiazolidinadionas

VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
WT	<i>Wild-type</i>

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FABP4 Y FABP5 CIRCULANTES EN LAS ENFERMEDADES METABÓLICAS

Daiana Ibarretxe Gerediaga

# 1. PRESENTACIÓN Y JUSTIFICACIÓN



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FABP4 Y FABP5 CIRCULANTES EN LAS ENFERMEDADES METABÓLICAS

Daiana Ibarretxe Gerediaga

La diabetes tipo 2 y sus complicaciones micro y macrovasculares son una de las principales epidemias del siglo XXI. La OMS estima que el número de diabéticos se duplicará en todo el mundo en la próxima década. Esta preocupante situación viene precedida por el incremento en la prevalencia de la obesidad, sin ir más lejos en España, la prevalencia se ha duplicado y cada vez afecta más a la población joven. La relación existente entre la obesidad y la diabetes es causal, aunque los mecanismos que vinculan a ambas patologías sólo se conocen parcialmente. La base patogénica más conocida y demostrada es la resistencia a la insulina, que se encuentra presente en la mayoría de obesos, sin embargo, los mecanismos básicos por los que la obesidad induce resistencia a la insulina se conocen parcialmente. Existe suficiente evidencia científica que avala la importancia del papel que ejercen los adipocitos y el tejido adiposo en la regulación de la homeostasis energética y la respuesta inflamatoria. Las alteraciones que suceden en dicho contexto son las responsables del desarrollo de la resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2. Los adipocitos secretan una gran cantidad de sustancias proteicas y lipídicas que ejercen importantes efectos en la regulación del metabolismo lipídico y glucídico.

Existen moléculas derivadas del tejido adiposo que inducen resistencia a la insulina como son las adipoquinas, *Retinol binding protein 4* (RBP4), Resistina y mediadores de inflamación tales como, factor de necrosis tumoral alfa (TNFalfa), interleuquina-6 (IL-6) y proteína C reactiva (PCR). Otras moléculas presentan un efecto contrario, tales como la adiponectina, leptina, visfatina, omentina, etc. Pero cabe destacar, que las moléculas principales secretadas por el tejido adiposo son los ácidos grasos (AG). Si bien la secreción de los AG al torrente circulatorio está regulada por las necesidades energéticas del organismo, estos AG son moléculas metabólicamente muy activas y que ejercen importantes funciones en los órganos imprescindibles para el control energético como el hígado, músculo, páncreas, grasa y otros. El almacenamiento y secreción de los AG en el tejido adiposo está estrechamente regulado. Los AG se almacenan en las vesículas lipídicas en forma de triglicéridos y en caso de requerimiento energético se induce la lipólisis y la liberación de AG al torrente circulatorio. El exceso de AG induce resistencia a la insulina. El transporte intracelular de los AG es un proceso

### Presentación y justificación

---

altamente regulado y participan múltiples moléculas que se han ido estudiando a lo largo de estos años.

Las *Fatty acid binding protein* (FABPs) son moléculas clave en el papel metabólico de los AG. De todas ellas, la *Fatty acid binding protein 4* (FABP4) se expresa en tejido adiposo, en concreto en adipocitos y macrófagos. Su papel principal es el de funcionar como chaperonas lipídicas escoltando a los AG preferentemente de cadena larga (AGCL) y a moléculas derivadas de la oxidación de los mismos a distintos compartimentos celulares para que ejerzan sus funciones metabólicas. La *Fatty acid binding protein 5* (FABP5) se relaciona estrechamente con FABP4, porque se complementan a nivel de macrófagos y adipocitos. En los macrófagos que no expresan FABP4, FABP5 se sobreexpresa, lo que sugiere un mecanismo compensatorio y complementario. Los ratones *Knockout* (KO) para FABP4 son resistentes al desarrollo de la obesidad, diabetes e hipertrigliceridemia inducida por dieta y en los dobles KO para *Fabp4* y *ApoE* están protegidos del desarrollo de lesiones ateromatosas. Tanto la secreción, sus funciones plasmáticas, como la genética, son tema de estudio en los últimos años.

## 2. INTRODUCCIÓN

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FABP4 Y FABP5 CIRCULANTES EN LAS ENFERMEDADES METABÓLICAS

Daiana Ibarretxe Gerediaga

## 2.1. TRANSPORTE CELULAR DE LOS ÁCIDOS GRASOS

Un AG es una biomolécula de naturaleza lipídica formada por una larga cadena hidrocarbonada lineal, de diferente longitud o número de átomos de carbono, en cuyo extremo hay un grupo carboxilo (son ácidos orgánicos de cadena larga). Cada átomo de carbono se une al siguiente y al precedente por medio de un enlace covalente sencillo o doble. Al átomo de su extremo le quedan libres tres enlaces que son ocupados por átomos de hidrógeno (H3C-). Los demás átomos tienen libres los dos enlaces, que son ocupados igualmente por átomos de hidrógeno ( ... -CH2-CH2-CH2- ...). En el otro extremo de la molécula se encuentra el grupo carboxilo (-COOH) que es el que se combina con uno de los grupos hidroxilos (-OH) de la glicerina o propanotriol, reaccionando con él. El grupo carboxilo tiene carácter ácido y el grupo hidroxilo tiene carácter básico (o alcalino). En general, se puede formular un AG genérico como R-COOH, en donde R es la cadena hidrocarbonada que identifica al ácido en particular. Los AG forman parte de los fosfolípidos y glucolípidos, moléculas que constituyen la bicapa lipídica de todas las membranas celulares. En los mamíferos, incluido el ser humano, la mayoría de los AG se encuentran en forma de triglicéridos (TG), moléculas donde los extremos carboxílicos (-COOH) de 3 AG se esterifican con cada uno de los grupos hidroxilos (-OH) del glicerol (glicerina, propanotriol); los TG (grasas) se almacenan en el tejido adiposo.

Los AGCL son importantes depósitos de energía metabólica y son esenciales para sintetizar a nivel celular TG, ésteres de colesterol, fosfolípidos, prostaglandinas, etc <sup>1, 2</sup>. La acilación de AG de las proteínas de membrana influye en su localización y función <sup>3-5</sup>. Los AG también funcionan como transductores de señal modulando la actividad de los canales iónicos, la transmisión sináptica <sup>6, 7</sup> y la expresión génica, involucrados en el metabolismo y la diferenciación celular <sup>8-10</sup>.

Para la mayoría de los tejidos, la función principal de los AG consiste en proporcionar energía metabólica a través de la beta-oxidación. Los AG poseen mayor densidad energética que la glucosa y son almacenados (como componentes de TG) en

## Introducción

---

grandes cantidades en el tejido adiposo<sup>11</sup>. Los AG suministran una cantidad importante de la energía requerida para el metabolismo y la actividad contráctil cardíaca, para la energía utilizada por el músculo esquelético en reposo y moderar la actividad muscular<sup>12</sup>. Una cantidad pequeña de los AG se deriva de la hidrólisis de los TG intramusculares, pero la mayoría se toman de la sangre donde el AG circula unida a la albúmina plasmática<sup>12</sup>. La dependencia sanguínea de los AG es típica de la mayoría de las células, que a excepción de los hepatocitos y adipocitos, no pueden sintetizar o almacenar AG en cantidades suficientes para los requerimientos de la energía oxidativa.

Los requerimientos energéticos se encuentran en constante cambio, por lo que las células deben hacer coincidir el suministro con la demanda<sup>13-15</sup>. En general, el lugar más efectivo para lograr tal regulación es el paso del transporte a nivel de la membrana plasmática<sup>1, 16</sup>. En el caso de los AG, como resultado de su naturaleza hidrofóbica y su habilidad para transferirse de forma pasiva a través de la bicapa fosfolipídica, se propuso que la regulación a nivel de la membrana plasmática no era posible porque no había transportadores de AG. De acuerdo con el modelo de captación pasiva<sup>17-21</sup>, el AG se transferiría fácilmente desde la albúmina a la capa exterior de la membrana plasmática, donde aumenta la protonación del AG como resultado de un cambio aparente en la pKa de 5 a 7-8. El AG protonado y lípido soluble, pasa rápidamente a la capa interna mediante *flip-flop*<sup>22</sup>. Sin embargo, ésta hipótesis ha sido revisada y debatida detalladamente a lo largo de 2 décadas, debido a que el modelo de difusión pasiva no alcanza suficientes evidencias que argumenten la existencia de una proteína facilitadora en la captación de AG.

Primero, la captación del AG exhibe saturabilidad, especificidad y sensibilidad a proteínas modificadoras, propiedades que no cumplen las características de una simple difusión. Segundo, bajo condiciones fisiológicas (AG: ratio albúmina de 0.25-1.0), la transferencia del AG a la membrana se encuentra limitada por una fuerte unión del AG con sitios de alta afinidad con la albúmina. Tercero, la contribución relativa a la forma del AG protonado e ionizado permanece incierta. Tal y como se ha señalado con anterioridad<sup>22</sup>, la captación del AG en una variedad de células o vesículas de membrana,

es sensible con ciertos inhibidores aniónicos conocidos, que frecuentemente bloquean la mayor parte del proceso. Cuarto, la interpretación de que los AG repartidos en la capa externa de la membrana puede mediante *flip-flop* pasar a la capa interna de la membrana a velocidad suficiente para proporcionar metabolismo celular, ha sido debatido por Kleinfeld y colaboradores<sup>23-26</sup>. Por tanto, el concepto de que la captación de los AG consiste en 2 componentes, tales como el pasivo y el mediado por transportadores, cada vez es más aceptado. Estos componentes co-existirían y contribuyen diferencialmente a la captación neta dependiente del AG:ratio albúmina y tipos celulares.

En plasma, la solubilización y el transporte eficiente de los AG, presente en concentraciones milimolares (0.1-1) es posible gracias a la unión con la albúmina plasmática. Los AG libres (no unidos a albúmina y en equilibrio con la misma), son de especial importancia para la captación celular<sup>27</sup>. Sus concentraciones se determinan mediante ratio molar de AG a albúmina y se computan basados en la constante unión AG:albúmina.

Mientras que los diversos estudios experimentales proporcionan apoyo a estas dos posibilidades, la evidencia que apoya un sistema de absorción de AG mediada por proteínas, es considerada actualmente el principal medio por el cual son absorbidos por los tejidos metabólicamente más importantes.

La naturaleza anfipática de la molécula del AG, con una cadena no polar y un grupo de cabeza polar, proporciona las propiedades biofísicas para penetrar en la bicapa lipídica de la membrana celular. Posteriormente, la transferencia del AG de la capa exterior de la bicapa a la capa interior (*flip-flop*) se ve obstaculizada por la carga polar de la cabeza<sup>28</sup>. Sin embargo, en las proximidades de la membrana el aparente pKa del AG cambia de aproximadamente 4.5 en soluciones acuosas a aproximadamente 7.6, como resultado de ello, aproximadamente la mitad de los AG están presentes en la forma no ionizada, por ejemplo, en la forma protonada<sup>29</sup>. Estas formas no cargadas pueden translocarse fácilmente mediante mecanismos de *flip-flop* a la cara interna de



Introducción

la membrana quedando el AG disponible para ser metabolizado. Este mecanismo sugiere que las membranas biológicas no forman barreras para los AG<sup>30</sup>.

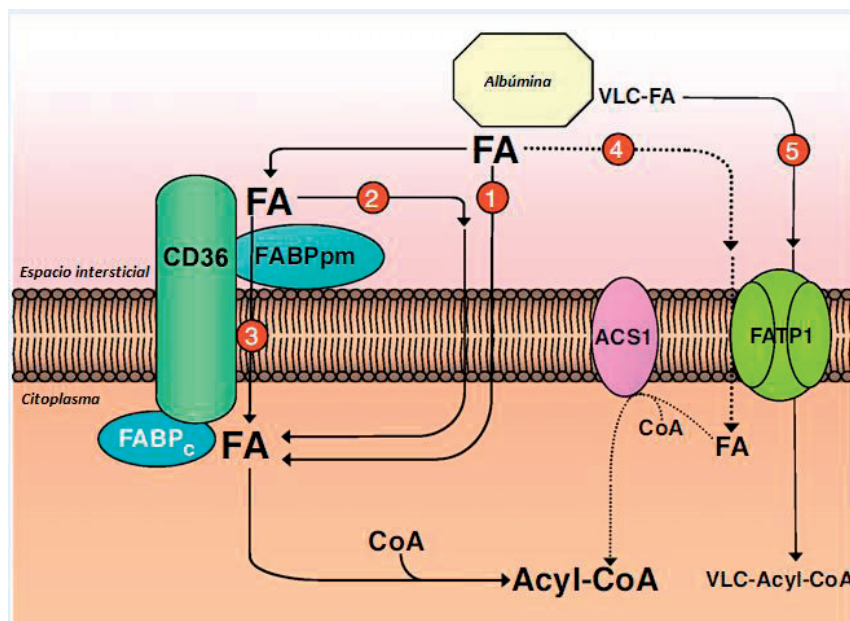
**Las proteínas de membrana implicadas en el transporte intracelular de los AG son CD 36, FABP<sub>pm</sub> y FATPs.** Estas proteínas presentan diferente masa molecular y grado de modificación post-translacional. Algunas muestran un patrón característico en cuanto a la distribución tisular, mientras que otras presentan expresión ubicua. Las *Fatty acid transport protein* (FATPs) forman una familia de 6 proteínas. Para la mayoría de estas proteínas existe suficiente evidencia basada en estudios de líneas celulares y/o animales modificados genéticamente que facilitan la captación celular de los AGCL<sup>31</sup>.

**Tabla 1.** Proteínas de membrana asociados a transporte de AG

Proteína (designación actual)	Masa molecular, kDa	Expresión en tejidos
<i>Plasma membrane fatty acid binding protein</i> (FABP <sub>pm</sub> )	40-43	Hígado, corazón, músculo, tejido adiposo, intestino, placenta
<i>Fatty acid transport protein</i> (FATP)	63	
FATP1		Tejido adiposo, corazón, músculo, cerebro, riñón, piel, pulmón
FATP2		Riñón, hígado, intestino
FATP3		Pulmón, hígado, testículo, piel
FATP4		Intestino, cerebro, riñón, hígado, piel, pulmón, corazón, músculo esquelético
FATP5		Hígado
FATP6		Corazón, músculo esquelético, placenta, testículo, glándula adrenal, riñón, vejiga, útero, piel
<i>Fatty acid translocase/CD36</i>	88	Corazón, intestino, músculo esquelético, tejido adiposo, bazo, plaquetas, monocito/macrófago, endotelio, epidermis, riñón, cerebro, hígado
Caveolina-1	21-24	Expresión ubicua, excepto en músculo/corazón, donde se expresa predominantemente caveolina-3

Adaptada de: Glatz JF et al. *Physiol. Rev* 2010; 90:367-417.

**Figura 1.** Representación esquemática de la visión actual del transporte de AG a través de la membrana celular.



Debido a que el mecanismo exacto de la translocación transmembrana de los AG sigue siendo poco conocido, se sugieren diferentes modelos. 1) En vista de su naturaleza hidrofóbica, los AG pueden cruzar la membrana mediante difusión simple. 2) De forma alternativa, CD36 solamente o junto con FABP<sub>pm</sub>, aceptan al AG en la superficie celular para aumentar su concentración local y ello aumenta el número de eventos de difusión de AG. 3) Existe la posibilidad de que CD36 transporte de forma activa los AG a través de la membrana. Una vez en la parte interior de la membrana los AG se unen mediante FABP citoplasmático (FABP<sub>c</sub>), antes de iniciar vías metabólicas o de señalización. 4) adicionalmente, una minoría de AG son transportados por FATP y rápidamente son activados por acyl-CoA sintetasa (ACS1) para formar ésteres de acyl-CoA. 5) Los AG de cadena muy larga (AGCML) (>C22) son preferentemente transportados por FATPs y por acción de la actividad de sus sintetasas son convertidos directamente en ésteres de acyl-coA AGCML (captados mediante acilación vectorial). Adaptado de Schwenk RW. Y colaboradores. Fatty acid transport across the cell membrane: regulation by fatty acid transporters. *Prostaglandins, leucotrienes and essential fatty acids* 2010; 82:149-154.

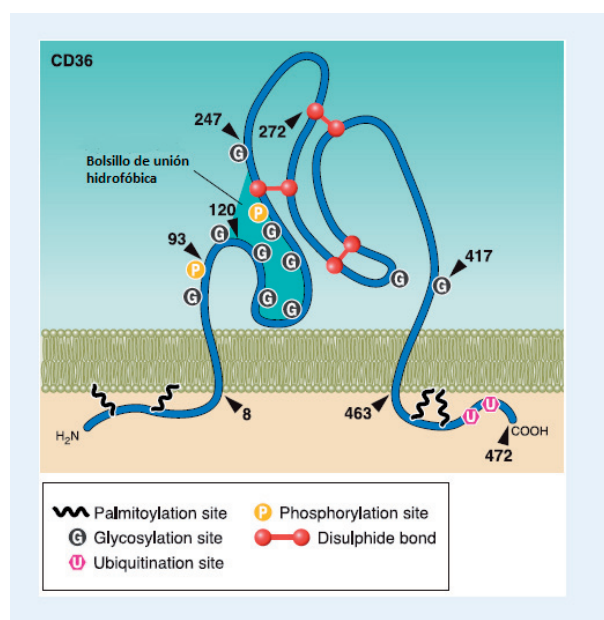
### 2.1.1. *Fatty acid translocase (FAT) /CD36*

Los estudios realizados por Abumrad y colaboradores sobre la acción inhibitoria de los ésteres reactivos de sulfo-N-succinimidilo de AGCL en la captación de AG por los adipocitos de rata<sup>32, 33</sup>, condujeron a la identificación de una proteína integral de membrana designada *membrane fatty acid translocase (FAT)*<sup>34</sup> que parecía idéntica al clúster de diferenciación del antígeno CD36 de los leucocitos (glicoproteína IV), actualmente se reconoce como un receptor *scavenger* clase B con múltiples funciones, en particular la unión de la trombospondina, las lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas, y los fosfolípidos aniónicos, y su acción como un sensor gustativo de lípidos<sup>35-40</sup>.

CD36 es una proteína de 472 aminoácidos (53 kDa), que tiene una topología de la membrana tipo horquilla con la que abarca dos regiones transmembrana, con los segmentos cortos de la porción terminal, tanto de NH<sub>2</sub> como de COOH en el citoplasma<sup>41</sup>. El dominio hidrófobo de la terminal NH<sub>2</sub> parece servir como un anclaje de transmembrana<sup>41</sup>. La proteína está fuertemente glicosilada, cuenta con dos lugares de fosforilación (Thr-92 y Ser-237) y tres puentes disulfuro, y contiene cuatro sitios de palmitolización<sup>41,42</sup>, dos en cada extremo de NH<sub>2</sub> y COOH terminal (cisteínas)<sup>22, 43, 44</sup>. El dominio terminal COOH también contiene dos lugares de ubiquitinación (Lys-469 y Lys-472) (Fig.2).

CD36 se expresa de forma ubicua en muchos tejidos con alta capacidad metabólica para los AGCL<sup>34</sup>, tales como el tejido adiposo, el corazón, el intestino y el músculo, además se ha visto que se expresa en las células endoteliales, las plaquetas y los macrófagos y forma parte de la angiogénesis, la arteriosclerosis, la inflamación y el metabolismo de los lípidos<sup>35</sup>. Los estudios *in vitro* mostraron que CD36 purificada a partir de tejido adiposo se une a AGCL, pero no a AG de cadena corta<sup>42,45</sup>. Un papel clave de CD36 en el transporte de los AG fue demostrada cuando los fibroblastos Ob17PY<sup>46</sup>, fibroblastos C2C12<sup>47</sup>, y el músculo esquelético<sup>48</sup> fueron transfectados con CD36, que se tradujo en un aumento de la tasa de captación de AG. Sin embargo, otros han

encontrado que la transfección de CD36 en células CHO no aumenta la captación de AG en condiciones basales<sup>49,50</sup> o inducido por insulina<sup>50</sup>, sugiriendo que en estas células, un aumento de este tipo requiere proteínas adicionales, o una etapa de activación proteica. Otras funciones de CD36 consiste en que son necesarias tanto para la captación de ácidos grasos de cadena muy larga (AGCML) en células cultivadas y como para la absorción intestinal de AGCML dietéticos en ratones<sup>51</sup>. CD36 también puede funcionar como una molécula de adhesión celular o como un receptor *scavenger* clase B<sup>35, 36</sup>. Además, CD36 parece ser que actúa como un sensor selectivo y no redundante de diacilglicéridos microbianos<sup>52</sup>. Esta versatilidad de CD36 para una amplia variedad de ligandos, posiblemente, puede ser debido a diferencias en la glicosilación de la proteína y/o interacción específica con otras proteínas o constituyentes de la membrana.



**Figura 2.** Esquema de la proteína CD 36. Presentación esquemática de la topología propuesta de CD36 (dos dominios transmembrana), con las pequeñas colas citoplasmáticas palmitilizadas. El gran bucle extracelular tiene 10 lugares de glicosilación y dos sitios de fosforilación. También se muestran los enlaces disulfuro entre las cisteínas extracelulares (entre los residuos de aminoácidos 243-311, 272-333 y 313-323). El NH<sub>2</sub> y COOH terminales contienen cada uno dos sitios de palmitilación, y la terminal COOH contiene dos sitios de ubiquitinación. El área sombreada indica un bolsillo hidrofóbico compuesto por residuos de aminoácidos 93-183 que probablemente está implicadas en la unión del. Las puntas de flecha y los números indican las posiciones aproximadas de los residuos de aminoácidos.

## Introducción

---

Adaptada de Glatz JFC et al. Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: implications for metabolic disease. *Physiol Rev* 2010; 90:367-417.

Existen estudios de células provenientes de hepatoma de rata que sugieren que la porción terminal-COOH del motivo YCAR es necesaria para la localización de CD36 en la superficie celular y para mejorar la captación de AGCL<sup>53</sup>. La extensa glicosilación aumenta la masa del CD36 de 53 a 88 kDa (Tabla 1). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que la glicosilación madura no es necesaria para la expresión superficial de CD36 en células de mamíferos<sup>54</sup>. CD36 se asocia con los microdominios del colesterol y de la membrana rica en esfingolípidos, conocidos como balsas (o como caveolas cuando contienen caveolina). A pesar de que parece que las caveolinas están involucradas en la orientación de CD36 a la membrana plasmática, existen evidencias contradictorias al respecto. Alternativamente, la palmitolización de cada una de las colas citoplasmáticas podría ayudar a reclutar a CD36 a estos microdominios de membrana.

### **2.1.2. Fatty acid transport protein (FATP)**

Forman una familia de 6 proteínas y existe suficiente evidencia para saber que en líneas celulares y/o en animales genéticamente alterados facilitan la captación celular del AGCL.

Los estudio previos *in vitro*, han confirmado que un número de diferentes proteínas facilitan el transporte de AG a través de la membrana plasmática. Las consecuencias metabólicas de la sobreexpresión o eliminación de transportadores de AG en roedores, han sido recientemente documentados, a pesar de que las contribuciones cuantitativas del transporte de AG *per se* al metabolismo de AG en estos modelos, no siempre han sido aclarados.

*In vivo* las FATPs son expresadas con especificidad tisular<sup>55, 56</sup>. A continuación resumimos los datos más importantes de cada tipo de FATP<sup>30</sup> desde el subtipo 1 hasta el 6.

- a) **FATP1**: los ratones transgénicos para FATP1 presentan una captación de AG 4 veces mayor<sup>57</sup>. Esto se asocia a un incremento del 100% de AG en el cardiomiocito y aumenta sus vías metabólicas. Ello se asocia a disfunción cardíaca con hallazgos fisiopatológicos similares a la cardiomiopatía diabética<sup>57</sup>. La ablación de FATP1 reduce el contenido muscular de triacilglicerol, previene el desarrollo de resistencia a la insulina inducida por dieta rica en grasas (DRG)<sup>58</sup> y finaliza la síntesis de triacilglicerol inducida por insulina<sup>59</sup>. De forma sorprendente, la captación basal de AG no se altera<sup>59</sup>. Bonen et al. descubrieron que la sobreexpresión de FATP1 en el músculo esquelético de las ratas aumenta el ratio de transporte intracelular de AGCL.

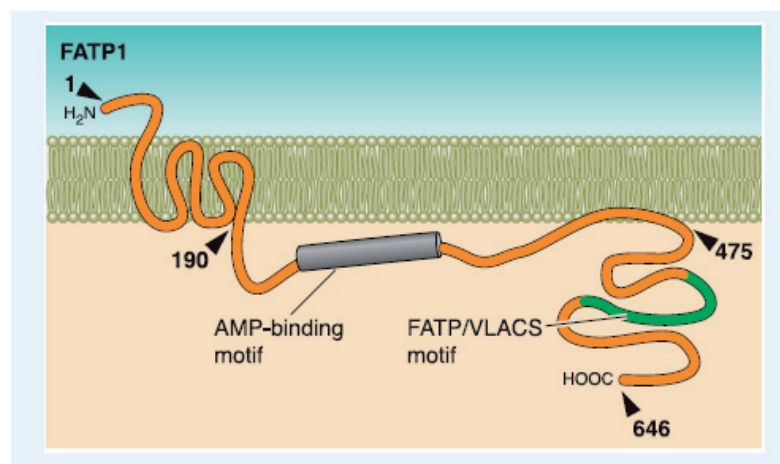


Figura 3. Topología propuesta de FATP1. Sólo un corto segmento de la terminal NH<sub>2</sub> enfrenta el lado extracelular de la membrana. Los residuos de aminoácidos 1-190 están asociados integralmente con la membrana, mientras que los residuos 190 - 257 son citosólicas y contienen la AMP-uni6n que media la actividad acil-CoA sintetasa. Los residuos de aminoácidos 258-475 est6n perif6ricamente asociados con la capa interior de la membrana celular. El extremo COOH se encuentra en el citoplasma. Las puntas de flecha y los n6meros indican las posiciones aproximadas de los residuos de amino6cidos. Adaptada de Glatz JFC et al. Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: implications for metabolic disease. *Physiol Rev* 2010; 90:367-417.

- b) **FATP2:** se expresa mayoritariamente en hígado y riñón. En tejidos de ratones nulos para FATP2, existe una disminución de la actividad peroxisomal de AGCML acyl coA sintetasa y disminuye también la beta oxidación de AGCML, sin embargo, los AGCML no se acumulan en el hígado ni en el riñón<sup>60</sup>.
- c) **FATP3:** parece que esta proteína tiene poca o no tiene función sobre el transporte de AG<sup>61, 62</sup>. Sus efectos *in vivo*, aparentemente no han sido explorados.
- d) **FATP4:** debido a que aparentemente es la única proteína localizada en el intestino delgado, esta proteína se ha visto implicada en la absorción de los lípidos provenientes de la dieta<sup>63</sup>. Dependiendo del método utilizado para generar KO de FATP4, los ratones nulos-FATP4 muestran una letalidad ya sea embrionaria<sup>64</sup> o neonatal precoz<sup>65, 66</sup>. FATP4 parece ser esencial para mantener la estructura normal de la piel y su función<sup>67</sup>. La supresión de un alelo de FATP4 reduce la proteína FATP4 en un 40-50%, y esto se acompaña de una reducción de la captación de AG-BODIPY en células epiteliales intestinales<sup>64</sup>. La sobreexpresión de FATP4 en el músculo esquelético de la rata aumenta la tasa de transporte de AGCL en vesículas gigantes del sarcolema.
- e) **FATP5:** esta proteína se expresa en el hígado<sup>55, 56</sup>. Los estudios en ratones KO de FATP5 revelaron que FATP5 está involucrada en el metabolismo lipídico hepático<sup>68</sup> y que tiene actividad de ácido biliar CoA sintetasa<sup>69</sup>. En ratones KO para FATP5, la captación de AG en los hepatocitos se reduce en un 50% lo que disminuye el contenido de triacilglicerol hepático. Esta disminución de captación de AG, reduce la esterificación de AG, a pesar del aumento en la expresión AG sintetasa<sup>68</sup>.
- f) **FATP6:** Gimeno et al. publicaron en el 2003 que FATP6 se expresaba sólo en el corazón<sup>70</sup>. Se observó que la transfección estable de FATP6 en 293 tipos celulares mejora la captación de AGCL, lo que indica que la isoforma FATP6 es más importante que FATP1 para la captación de los AGCL<sup>70</sup>.

De forma colectiva, todos estos estudios demuestran una importante función metabólica para la mayoría de las FATPs.

### **2.1.3. Plasma membrane fatty acid binding protein (FABP<sub>pm</sub>)**

Descrito por primera vez por Stremel et al.<sup>71</sup> en hígado de rata<sup>72</sup> y microvellosidades jejunaes<sup>73</sup> y posteriormente en tejido adiposo<sup>74, 75</sup> y miocitos cardíacos<sup>76, 77</sup>, los cuales, todos son células con altos flujos transmembrana para los AG. En cuanto a estudios *in vitro*, esta proteína consta de 40-kDa, está periféricamente unida a la capa externa de la membrana plasmática y en hígado de rata la FABP<sub>pm</sub> pudo ser aislada en un medio de alta fuerza iónica<sup>78</sup>. Los anticuerpos directos contra la FABP<sub>pm</sub> de hígado de rata, fueron encontrados para inhibir la captación en un 50-75% de AG por los hepatocitos, microvellosidades jejunaes, adipocitos, cardiomiocitos y vesículas gigantes derivadas de músculo esquelético y cardíaco (mismas referencias bibliográficas citadas al inicio del párrafo). Esto sugiere que al menos una porción sustancial de la captación de todos los AG están involucrados en la unión de AG mediante FABP<sub>pm</sub>, siendo muy similar la expresión de dicha proteína en los mencionados tejidos. Estos estudios, no descartan la contribución de otras FABP, debido a que la inhibición del transporte de AG mediante anticuerpos FABP<sub>pm</sub> fue incompleta.

Los análisis de la secuencia de sus aminoácidos mostraron que FABP<sub>pm</sub> era idéntica al aspartato aminotransferasa mitocondrial (mAspAt)<sup>79, 80</sup>. FABP<sub>pm</sub> y mAspAt son derivados del mismo gen<sup>81</sup>. Aparentemente, FABP<sub>pm</sub>/mAspAt es una proteína con distintas funciones en diferentes espacios subcelulares. En fibroblastos 3T3 transfectados con cDNA mAspAt, FABP<sub>pm</sub>, se localizó en la membrana plasmática, aumentando las tasas de absorción saturable de AGCL<sup>82</sup>.

Estudios *in vivo* sobre los efectos de FABP<sub>pm</sub> en el metabolismo de los AG, muestran que la sobreexpresión en músculo esquelético no alteró la formación de triacilglicerol, sino que se incrementó la oxidación de AG. Sin embargo, la



## Introducción

---

sobreexpresión de FABP<sub>pm</sub>/mAspAt en la mitocondria no alteró la oxidación de AG en mitocondrias aisladas<sup>83</sup>.

Así mismo existen evidencias sobre cooperación entre FABP<sub>pm</sub> con otros transportadores de AG, en concreto CD36<sup>84</sup>.

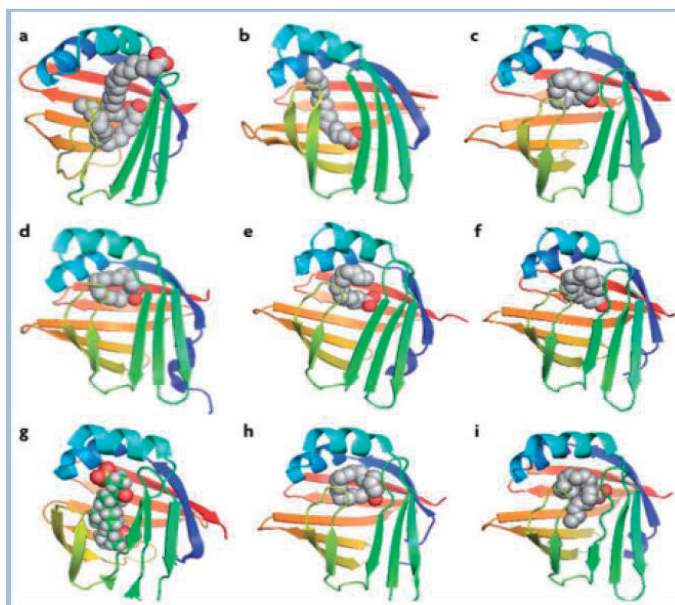
### **2.1.4. Fatty acid binding protein (FABP), transporte citoplasmático a diversos compartimentos celulares.**

Una vez en la zona citoplasmática de la membrana, los AG se unen a las FABP que a modo de chaperonas lipídicas los conducen a distintos compartimentos celulares para que ejecuten sus funciones metabólicas. En concreto los orientan hacia mitocondrias para participar en los mecanismos oxidativos de obtención de energía, facilitan su acilación, son conducidos a las “*lipid droplets*” para su almacenamiento o incluso son translocadas al núcleo celular para que ejerzan sus funciones regulatorias de la expresión génica vía PPAR<sup>85</sup>.

Por todo ello las FABP tienen un papel fundamental en el metabolismo intracelular de los AG.

## 2.2. FAMILIA DE FABP

En 1970, Ockner y colaboradores<sup>86</sup> descubrieron las FABP en el citosol de la mucosa intestinal mientras estudiaban el metabolismo de los AG en el intestino de las ratas. Posteriormente se detectaron otros miembros de esta familia. La familia FABP, que se une a AGCL y a otros lípidos, fue descubierta en diversos tejidos, incluyendo mucosa intestinal, hígado, miocardio, tejido adiposo, riñones, músculo y otros tejidos de los mamíferos. Estas proteínas de unión de los AG, constituyen una familia de proteínas intracelulares de bajo peso molecular (14-15 KDa) con gran afinidad para ligandos hidrofóbicos como AG saturados e insaturados, eicosanoides y otros lípidos<sup>87</sup>. La familia FABP se compone de 9 proteínas diferentes (Fig. 4)<sup>88,89</sup>, cada una específica de un tejido diferente (Tabla 2), cuya función consiste en el transporte intracelular de AG hacia enzimas y diferentes compartimentos celulares, modulando así el metabolismo lipídico intracelular y regulando la expresión génica. Por lo tanto, estas proteínas llevan a cabo funciones especializadas del tejido específico donde son expresadas<sup>88</sup>.



**Figura 4.** Estructuras cristalinas de las proteínas FABP: a) FABP1 o hepática; b) FABP2 o intestinal; c) FABP3 o cardíaca; d) FABP4 o adipocitaria; e) FABP5 o epidérmica; f) FABP6 o ileal; g) FABP7 o del cerebro; h) FABP8 o de mielina; i) FABP9 o de testículo. Furuhashi M. et al. *Nat Rev drug Discov* 2008; 7:489-502.

Introducción

**Tabla 2.** Miembros de la familia FABP, expresión y localización cromosómica.

Gen	Tejido de referencia	Nombres alternativos	Expresión	Localización cromosómica
FABP1	Hígado	L-FABP	Hígado, intestino, páncreas, riñones, pulmón y estómago	2p11
FABP2	Intestino	I-FABP	Intestino, hígado	4q28-q31
FABP3	Corazón	H-FABP	Corazón, músculo esquelético, cerebro, riñones, pulmón, estómago, testículos, aorta, glándulas adrenales y mamarías, placenta, ovarios, tejido adiposo marrón y plasma	1p32-p33
FABP4	Adipocito	A-FABP, aP2, ALBP	Tejido adiposo, adipocitos, macrófagos, cél. espumosas, dendríticas, endoteliales, glándulas mamarías, epitelio bronquial, músculo estriado, plasma y placa de ateroma	8q21
FABP5	Epidermis	E-FABP, mal1, KLBP	Piel, lengua, tejido adiposo, adipocitos, macrófagos, cél. dendríticas, glándula mamaria, cerebro, intestino, riñones, hígado, pulmón, corazón, músculo esquelético, testículos, cristalino, retina, timo y plasma	8q21.13
FABP6	Íleon	II-FABP	Íleon, ovario, glándula adrenal, y estómago	5q33.3-q34
FABP7	Cerebro	B-FABP	Cerebro, cél. glia, retina, glándula mamaria y plasma	6q22-q23
FABP8	Mielina	M-FABP, MP2	Sistema nervioso periféricos, cél. Schwann	8q21.2-22.1
FABP9	testículo	T-FABP	Testículo, glándula salivar y mamaria	8q21.13

Adaptada de Zimmerman AW. et al. New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins. *Cell Mol Life Sci* 2002;59:1096-116.

Todas las FABP se unen a AGCL con diferencias en la selectividad, afinidad y en el mecanismo de la unión como resultado de las pequeñas diferencias estructurales existentes entre las isoformas<sup>90</sup>. La afinidad de la unión varía en función de la longitud de la cadena y el grado de saturación del AG<sup>90</sup>. Esta familia, además, se caracteriza por que todas las proteínas se codifican por genes con similar estructura<sup>89</sup> y se encuentra en todas las especies, desde *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster* hasta roedores y humanos, demostrando así una fuerte conservación a lo largo de la evolución<sup>88</sup>.

La estructura del gen de las FABP consta de 4 exones y 3 intrones y una caja TATAbox en la región de transcripción. La estructura tridimensional de la proteína, presenta características muy similares en todos los tipos de FABP pero con una variabilidad del 20-70% en la secuencia de aminoácidos. Todas ellas se componen por 10 láminas  $\beta$  antiparalelas<sup>91</sup> y 2  $\alpha$  hélices cortas en la región N-terminal. El bolsillo de unión de los AG se encuentra dentro de las láminas beta, y usualmente un AGCL puede unirse a la cavidad interior de las FABP, excepto FABP1, que es la única FABP capaz de unir 2 moléculas simultáneamente<sup>92</sup>. En el extremo N-terminal de las FABP, se encuentra un hélice-*loop*-hélice que forma una estructura similar a una tapa del extremo superior de un barril. Se ha sugerido que dicha estructura, mediante cambios conformacionales transitorios en torno al lugar donde se encuentra, permite la entrada y la salida a la cavidad del AG o la molécula hidrofóbica<sup>92</sup>. Existen diferencias entre las diversas isoformas, debidas a sus estructuras diferentes en cuanto a afinidad y selectividad.

La función de las FABP *in vivo* no está totalmente caracterizada. Se ha propuesto que como chaperonas lipídicas, facilitan activamente el transporte de AG a compartimentos específicos de la célula: la regulación de la actividad enzimática y el almacenamiento energético en las *lipid droplets*; hacia el retículo endoplásmico para la señalización y vehiculización hacia la síntesis de membranas; a la mitocondria o las peroxisomas para la oxidación lipídica; a determinadas enzimas citosólicas, donde se modula actividad del metabolismo de los AG; protegen enzimas y membranas de los efectos nocivos de un exceso de AG; hacia el núcleo para la regulación transcripcional mediada por lípidos o hacia el exterior de la célula para señalización autocrina y paracrina<sup>88, 91-95</sup>.

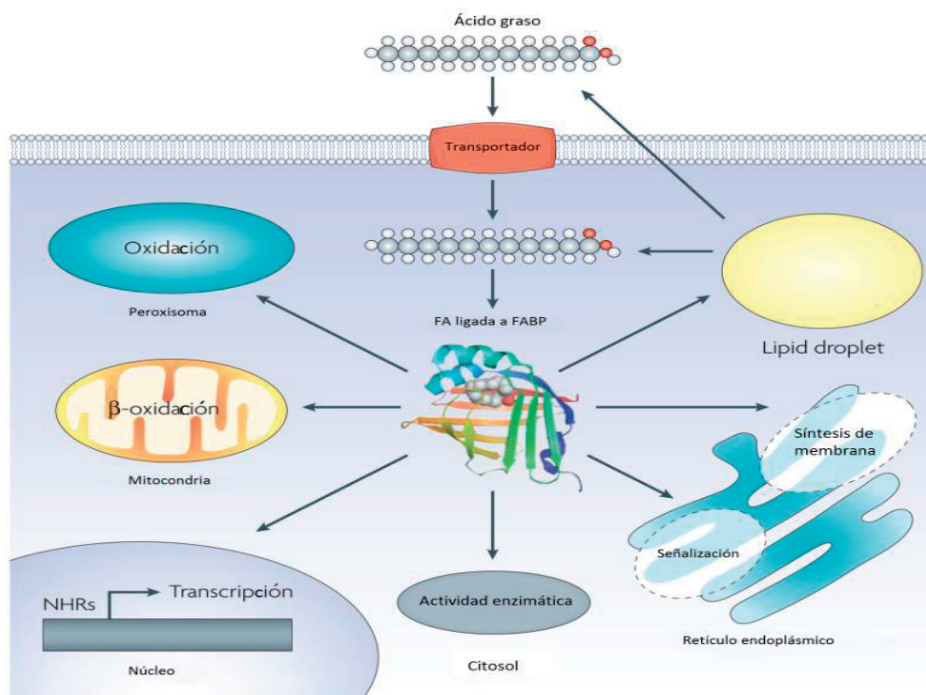


Figura 5. Funciones propuestas de las FABP en la célula. Las FABP transportan las moléculas lipídicas a diferentes compartimentos celulares: a las *lipid droplets* para almacenamiento; al retículo endoplásmico, para la señalización, tránsito y síntesis de membranas; a la mitocondria o peroxisomas para la oxidación; a determinados enzimas citosólicos, para la regulación de la actividad; al núcleo, para la regulación transcripcional proveniente de los lípidos y factores de transcripción; o para acciones autocrinas o paracrinas. Adaptado de Furuhashi M. et al. *Nat Rev drug Discov* 2008; 7:489-503.

Las FABP también están involucradas en la conversión de AG a eicosanoides y la estabilización de los leucotrienos.

De las diversas FABP, específicas de cada tejido<sup>88, 91</sup>, podemos destacar las siguientes:

### 2.2.1. FABP1 o FABP hepática (L-FABP):

Se expresa no sólo en el hígado sino también en el intestino, páncreas, estómago, pulmón y riñón. El gen *FABP1* se localiza en el cromosoma 2 y codifica 127 amino ácidos.

Es la única FABP que puede unir 2 ligandos. Además de unir AGCL también se une a fatty acyl-CoaAs, proliferadores peroxisomales, prostaglandinas,

ácidos biliares, bilirrubina, metabolitos de hidroxil y hidroperoxil de AG, ácido lisofosfatídico, selenio, heme y otros ligandos hidrofóbicos. La transfección de FABP1 a fibroblastos estimula la captación de AG y aumenta su esterificación permitiendo su almacenaje en *pools* lipídicos específicos.

### **2.2.2. FABP2 o FABP intestinal (I-FABP):**

Se expresa mayoritariamente en el epitelio intestinal, sobre todo en la sección distal, donde podría interferir en la captación de AG provenientes de la dieta hacia la circulación sanguínea. Ha sido muy estudiada desde que se comunicó que el polimorfismo A54T en alelos de *FABP2* se relacionaba a la predisposición de diabetes tipo 2, no confirmada en todos los estudios, a una alta tasa de oxidación lipídica y aumento de C-HDL, C-LDL y TG en Indios Pima. Se ha confirmado una correlación de este polimorfismo con el IMC, los TG basales y niveles altos de insulina basal, pero no de diabetes tipo 2 en población japonesa, canadienses aborígenes o población india de la isla de Guadalupe.

### **2.2.3. FABP3 o FABP cardíaca (H-FABP):**

Se expresa en diversos tejidos incluyendo el miocardio, el músculo esquelético, el cerebro, los riñones, los pulmones, el estómago, los testículos, la arteria aorta, la glándula suprarrenal y mamaria, la placenta, los ovarios y el tejido adiposo marrón. Es imprescindible para la  $\beta$ -oxidación en los cardiomiocitos y a su vez modula la captación de AG a nivel musculoesquelético. Hay que tener en cuenta que el corazón deriva un 70% de sus requerimientos energéticos de la oxidación de la grasa, incluso más en estado de ayuno o en diabetes. Debido a la alta demanda de los lípidos en el corazón, se ha propuesto que FABP3 juega un papel importante en el transporte de los AG del sarcolema a sus espacios intracelulares para el metabolismo. Cabe destacar, que los niveles de FABP3 están influenciados por la testosterona, entrenamiento físico y el ritmo circadiano.

#### **2.2.4. FABP4 o FABP adipocitaria (A-FABP, aP2, ALBP):**

Se expresa predominantemente en adipocitos, macrófagos y células dendríticas. Representa aproximadamente un 1% de todas las proteínas citosólicas de los adipocitos maduros. Su función principal es el transporte de AGCL a otros compartimentos intracelulares para el metabolismo o secreción. En el siguiente apartado detallaremos con profundidad otras características.

#### **2.2.5. FABP5 o FABP epidérmica (E-FABP):**

Se expresa principalmente en las células epidérmicas de la piel, pero también se expresa en la lengua, los adipocitos, los macrófagos, las células dendríticas, la glándula mamaria, el cerebro, el intestino, los riñones, el hígado, los testículos, la retina y el bazo. Comparte una homología de aminoácidos del 52% con la FABP4, presentando similar afinidad y selectividad por los AG. También se detallará en el siguiente apartado.

#### **2.2.6. FABP6 o FABP ileal (II-FABP):**

Se expresa principalmente en el íleon, pero también en ovarios, la glándula suprarrenal y el estómago. Presenta una baja o ninguna afinidad de unión con AGCL, sin embargo, presenta una alta afinidad con los ácidos biliares.

#### **2.2.7. FABP7 o FABP cerebral (B-FABP):**

Presente en las células gliales cerebrales, en la retina y en la glándula mamaria. Se ha sugerido que FABP7, participa en la correcta migración y desarrollo de las neuronas del cortex. La FABP7 se sobreexpresa en pacientes con síndrome de Down y esquizofrenia.

#### **2.2.8. FABP8 o Mielínica (M-FABP):**

Se considera una de las proteínas principales de la mielina en el sistema nervioso periférico y también se encuentra presente en las células Schwann. Su función principal consiste en transportar fosfolípidos para la producción y el mantenimiento de la mielina (compuesta de lípidos en un 70%).

### **2.2.9. FABP9 o FABP testicular (T-FABP):**

Se encuentra presente en el tejido de los testículos, de las glándulas salivares y mamarías.

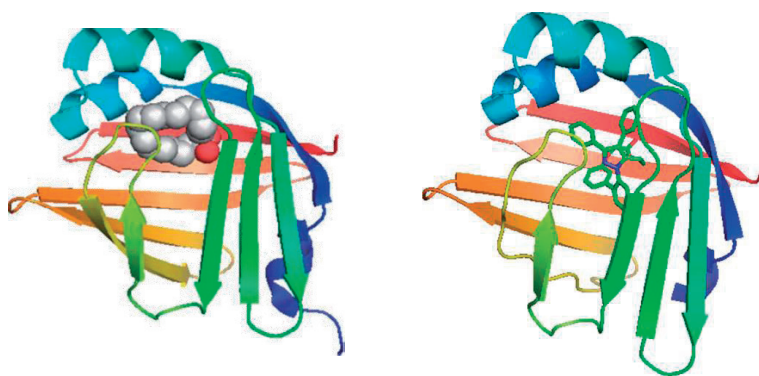


## 2.3. Fatty acid binding protein 4 (FABP4, A-FABP, ALBP o aP2)

### 2.3.1. Estructura, localización y función

Como hemos mencionado anteriormente, la FABP4 pertenece a la familia FABP. Se denomina adipocitaria, porque se describió por primera vez en el tejido adiposo<sup>96-99</sup>. La FABP4 se expresa en los adipocitos maduros, tejido adiposo, macrófago, célula dendrítica, célula endotelial, glándula mamaria, epitelio bronquial, músculo estriado y placa de ateroma, constituyendo aproximadamente el 1% de todas las proteínas solubles en el tejido adiposo<sup>100</sup>.

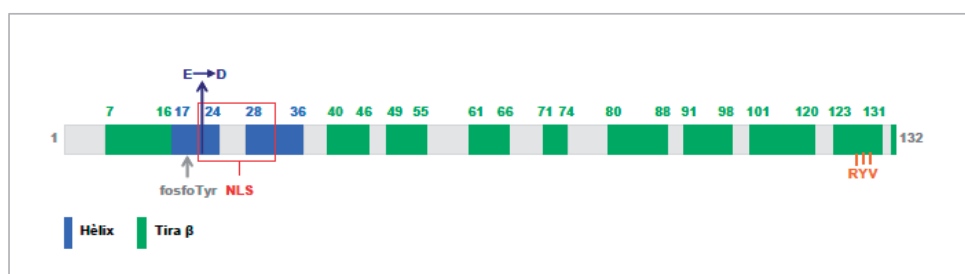
El gen que codifica la FABP4 se identificó a partir de una biblioteca de cDNA de adipocitos 3T3-L1 diferenciados<sup>98</sup>. La FABP4 es una proteína citoplasmática de bajo peso molecular (14.6 kDa) y de carácter ácido (pI 4.8), formada por 132 aminoácidos que une de manera no covalente las moléculas hidrofóbicas, principalmente AGCL, participando en su transporte y metabolismo intracelular. Se localiza en el cromosoma 8, concretamente en la posición 8q21.3-q22.1<sup>101</sup> y consta de una región promotora a 5.4kb del inicio de la transcripción (GenBank *accession number* \_024406)<sup>102</sup>. Los 132 aminoácidos se organizan en 10 láminas beta y 2 hélices en la estructura secundaria. En la región comprendida entre las posiciones 127-129 se sitúa el lugar de interacción con el AG<sup>90</sup>.



**Figura 6.** FABP4 unida con un AG o un inhibidor de molécula pequeña. a) FABP4 humana se une a un AG endógeno como el ácido palmítico. b) FABP4 humana cristalizada en un complejo con BMS309403, un inhibidor sintético de FABP4. Furuhashi M. et al. *Nature* 2007; 447:959-965.

Como regulador transcripcional, coopera con familias de factores de transcripción como la PPAR. La interacción de FABP4 con AG, es esencial para el transporte de la molécula lipídica al núcleo<sup>90</sup>. En la molécula FABP4 se localiza una secuencia *nuclear localization signal* (NLS) comprendida entre los residuos 22 y 32, necesaria para este proceso (Fig. 7).

Después de translocarse, el complejo AG-FABP4 interacciona con el factor de transcripción, concretamente con PPAR $\gamma$ , para activarlo. Dicha activación es dependiente de ligando. La interacción entre las FABP y los PPAR sucede de manera selectiva en función del ligando: FABP4 activa PPAR $\gamma$  y FABP5 activa PPAR $\beta$ <sup>103</sup>.



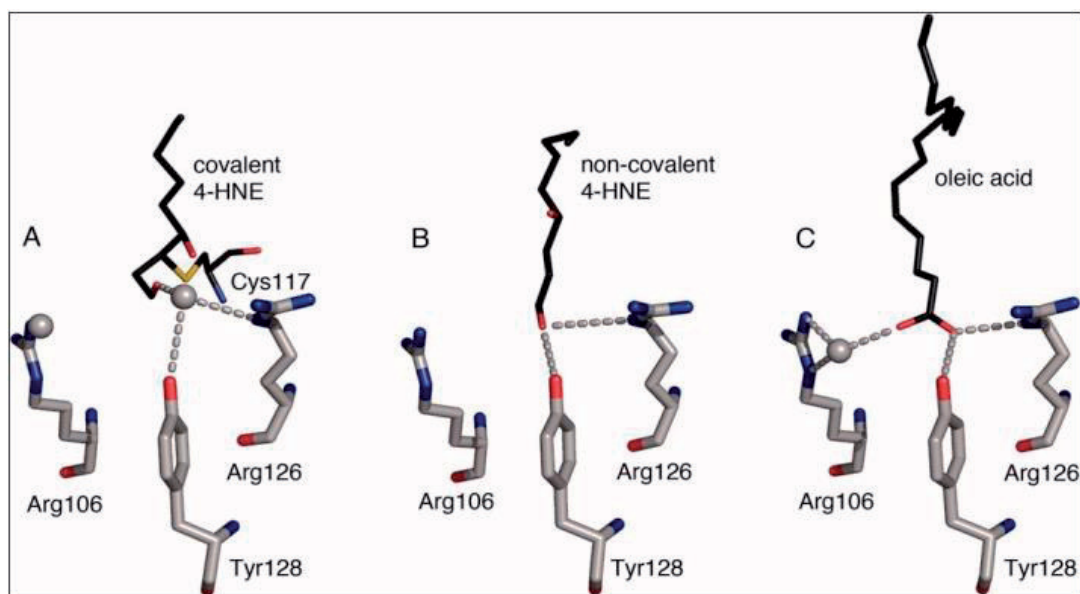
**Figura 7.** Estructura primaria y secundaria de la proteína FABP4. La secuencia primaria de la proteína FABP4 humana está formada por 132 aminoácidos, que se organizan en 10 láminas  $\beta$  y 2 hélices en la estructura secundaria. La región comprendida entre las posiciones 127-129 es el lugar de interacción con el AG. Esta zona tiene 3 residuos aminoácidos: R, Y i V. En la región comprendida entre los residuos 22 i 32, se localiza la NLS, indicada para posibilitar la translocación al núcleo. En la posición 20, se encuentra un residuo de tirosina susceptible de ser fosforilada por tirosina quinasa. En la posición 23 se ha descrito una variante genética natural en el que se produce un cambio de aminoácido, de glutamato a aspartato, que se ha relacionado con la presencia de cáncer de mama y colo-rectal. Sjoebloom et al. *Science* 2006; 314:268-74.

La FABP4 participa en el control de la lipólisis del adipocito<sup>104, 105</sup>, que en parte viene dada por la interacción de la FABP4 con la lipasa sensible a hormonas (HSL) y forma un complejo 1:1. La FABP4 recoge los AG procedentes de la lipólisis de los TG y los conduce al exterior de la célula. Los animales KO para *Fabp4* presentan una disminución en la lipólisis, mientras que en los animales que sobreexpresan *Fabp4* está potenciada<sup>104, 105</sup>. La activación de HSL por la FABP4 depende de la unión de los AG ya que en ausencia del AG no se produce la interacción HSL-FABP4<sup>106-108</sup>. Otros estudios han demostrado

## Introducción

que la intervención de FABP4 sobre la lipólisis está también mediada por interacciones con perilipina y lipoprotein lipasa (LPL)<sup>105, 109</sup>.

Grimsrud y colaboradores describieron que la FABP4 también es capaz de ser modificada por la unión de moléculas lipídicas como los aldehídos. Observaron que la FABP4 se encuentra carbonilada *in vivo* por 4-hidroxinonanal (4-HNE), un hidroxialquenal producto final de la oxidación del ácido araquidónico y linoleico. Dicha modificación sucede en la posición Cys117 y como efecto resultante se obtienen una reducción de 10 veces en la afinidad de unión a los AG<sup>110</sup>. La unión covalente del 4-HNE conforma una holo-estructura que imita el estado en el que la proteína se encuentra unida al AG<sup>111</sup> (Fig.8 ). Tal y como ya se ha comentado, la interacción FABP4-HSL es dependiente de la unión al AG<sup>106-108</sup> y la presencia de aldehídos impide la formación del complejo lo que se refleja en el grado de lipólisis del adipocito. Estos autores sugieren que la modificación de la FABP4 podría contribuir a la resistencia insulínica en la obesidad debido a la alteración de la actividad de HSL<sup>110</sup>.



**Figura 8.** Esquemas de la disposición en la unión covalente y no covalente de 4-HNE a la FABP4 en comparación con la unión a un AG. Hellberg K et al. *Protein Sci* 2010; 19:1480–1489.

Otra modificación que afecta la unión de la FABP4 y el AG es la fosforilación. Hresco y colaboradores demostraron que la FABP4 se fosforilaba en el residuo Tyr19 por mediación de la activación del receptor de la insulina<sup>112-114</sup>. Actualmente, las bases de datos sugieren que la modificación sucede en el residuo 20 en vez del 19 (Fig 7). La fosforilación sucede cuando FABP4 se encuentra unida al AG, ya que es facilitada por el cambio conformacional resultante de la unión<sup>112</sup>. De esta manera, la fosforilación bloquea la FABP4 unida al AG y no le permite liberarse. La fosforilación de FABP4 por parte del receptor de la insulina podría estar en relación a la acción antilipolítica de la insulina.

En cuanto a expresión y regulación cabe destacar que la FABP4 se potencia durante la diferenciación adipocitaria y se regula a nivel transcripcional<sup>115</sup>. Estudios recientes demuestran la regulación positiva de la expresión de FABP4 por los AG, PPAR $\gamma$  e insulina, como también por los agonistas de PPAR $\gamma$  como son las tiazolidinadonas (TZD)<sup>116</sup>. Estudios realizados en nuestro grupo demostraron que el tratamiento con TZD inducen la diferenciación adipocitaria *in vitro* asociada a incremento de la expresión de mRNA de la FABP4 y de los niveles de proteína celular en medio de cultivo<sup>117</sup>. Por otra parte y de forma recíproca, FABP4 es capaz de estimular PPAR $\gamma$ . La interacción de los AG con la FABP4 es esencial para la translocación hacia el núcleo, donde el complejo interacciona con PPAR $\gamma$  y lo activa<sup>118</sup>.

FABP4 también se expresa en macrófagos y es capaz de regular las mismas funciones biológicas que en los adipocitos: acumulación de lípidos, secreción de citoquinas y la expresión de un gran número de genes involucrados en el metabolismo lipídico y la inflamación<sup>119</sup>.

La deficiencia de FABP4 en macrófagos se acompaña de un incremento del eflujo del colesterol<sup>118</sup>, debido a un aumento de las proteínas que controlan este proceso. En paralelo, existe una reducción de la actividad de NF $\kappa$ B, que suprime las funciones proinflamatorias. En cambio, la sobreexpresión de FABP4 provoca acumulación de ésteres de colesterol. Por lo tanto, la expresión de FABP4 en los macrófagos tiene un

## Introducción

---

papel importante en la formación de la célula espumosa y en la inflamación, procesos clave en el desarrollo de la placa de ateroma <sup>96</sup>.

A pesar de que la FABP4 se descubrió en el adipocito, también se ha detectado en macrófagos, en plasma y otras localizaciones como:

- a) **Placa de ateroma:** se ha descrito que las placas expresan niveles elevados de FABP4 tanto en humanos como en murinos<sup>120</sup>.
- b) **Células dendríticas:** FABP4 participa en la activación de la vía del inhibidor de la quinasa NFκB<sup>121</sup>, alterando la expresión de citoquinas en las células dendríticas.
- c) **Células endoteliales:** la FABP4 está implicada en la disfunción endotelial mediante diversos mecanismos como la regulación del VEGF que aumenta en situación de hipoxia intermitente en células endoteliales aórticas humanas<sup>122</sup>.
- d) **Células epiteliales bronquiales:** se ha descrito que la expresión de FABP4 en células del epitelio bronquial, regula la respuesta inflamatoria alérgica de las vías respiratorias mediada por citoquinas derivadas de linfocitos Th2, inducidos por IL-4 y IL-3 en el asma y habiéndose puesto de manifiesto que la ausencia de la FABP4 en ratones protege del asma<sup>123</sup>.
- e) **Pulmón:** se ha detectado FABP4 en las células procedentes de lavados broncoalveolares de pacientes con displasia broncopulmonar<sup>124</sup> y sarcoidosis<sup>125</sup>, que sugieren su implicación en la patogénesis de estas enfermedades.
- f) **Ovarios:** se asocia al síndrome de ovario poliquístico (PCOS) que frecuentemente coexiste con la resistencia a la insulina y se expresa en las células granulosas de los folículos atrésicos antrales<sup>126</sup>.
- g) **Bazo y células T:** se ha observado el aumento de la expresión de FABP4 en linfocitos murinos en respuesta al tratamiento con dexametasona<sup>127</sup>.
- h) **Tumores:** la FABP4 se detecta también en tumores como el lipoblastoma, el liposarcoma<sup>128</sup> y en carcinomas uroteliales<sup>129</sup>.

### 2.3.2. Variantes genéticas (polimorfismos) del gen *FABP4*

Se han descrito diversas mutaciones en el gen de la *FABP4*, pero los *Single nucleotide polymorphism* (SNPs) más estudiados son los siguientes: rs3834363, se ha vinculado a una susceptibilidad aumentada de presentar PCOS<sup>126</sup>. Se han descrito 2 tag SNPs, rs10808846 y rs16909187, que cubren las variantes genéticas más comunes conocidas y se ha observado, que no tienen relación con niveles circulantes de FABP4 en pacientes no diabéticos<sup>130</sup>. Existe otro polimorfismo, el rs16909233, que se ha asociado a resistencia insulínica y aumento de HOMA-IR en pacientes obesos<sup>131</sup>. En otro estudio, el SNP rs1054135, se ha asociado con elevaciones de FABP4 circulante y a mayor predisposición de obesidad en población adolescente y síndrome de apnea-hipopnea del sueño (SAHS)<sup>131, 132</sup>. Existe otro polimorfismo, el PSMA6 rs1048990, con impacto clínico sobre la cardiopatía isquémica, que contribuye a la susceptibilidad del infarto de miocardio en pacientes con diabetes tipo 2<sup>133</sup>.

Por otra parte, el polimorfismo rs77878271 ó T-87C, se considera una mutación importante en el promotor del gen *FABP4* y que determina una menor expresión de FABP4 en tejido adiposo, dicha mutación se asocia a una reducción de riesgo de hipertrigliceridemia, diabetes tipo 2 y enfermedad cardiovascular y condiciona niveles inferiores de FABP4 circulante<sup>134-136</sup>.

### 2.3.3. Secreción plasmática y papel de FABP4 circulante

La primera descripción publicada de FABP4 como proteína circulante fue en el 2006<sup>119</sup>. Desde esta publicación, diversos estudios transversales, de intervención y prospectivos han investigado la regulación y el valor predictivo de la FABP4 circulante en humanos. Recientemente se han postulado diversos mecanismos potenciales a través de los cuales se secreta FABP4 así como su función potencial. FABP4 es secretada en parte al torrente circulatorio por mecanismos no establecidos y su papel fisiológico en plasma no se conoce en la actualidad. Sin embargo, sus concentraciones plasmáticas

## Introducción

---

se han asociado a adiposidad, síndrome metabólico (SMet), dislipemia aterogénica y diabetes tipo 2.

Los mecanismos a través de los cuales se cree que FABP4 es secretada y su potencial efecto se comentan a continuación:

No está claro que la liberación de FABP4 al plasma desde los adipocitos o macrófagos sea un proceso biológico regulado, dado que la FABP4 no tiene secuencias secretoras en su estructura primaria<sup>93, 137</sup>. Sin embargo, las proteínas con ausencia de secuencias de señal de exocitosis pueden cruzar la membrana plasmática mediante mecanismos secretores diferentes y no convencionales<sup>138</sup>. De hecho, los adipocitos murinos liberan varias proteínas que carecen de secuencia de señal secretora mediante micro vesículas y para mayor interés, FABP4 se detecta en micro vesículas<sup>139</sup>. Estos hallazgos se sustentan mediante un estudio convincente que demuestra que los preparados de fracciones de micro vesículas de adipocitos humanos aislados mediante ultra-centrifugación, contienen FABP4<sup>140</sup>. Tomando estos hallazgos en consideración, FABP4 debe acceder a la circulación al menos en parte, por medio de micro-vesículas derivadas de adipocitos<sup>102</sup>. También es posible que la FABP4 alcance la circulación después de la lisis de adipocitos grandes<sup>102</sup>. A favor de esta hipótesis, estaría el hecho de que FABP4 circulante muestra una correlación positiva con las medidas de adiposidad, incluyendo índice de masa corporal (IMC) o porcentaje de grasa corporal. Sin embargo, estudios realizados con adipocitos 3T3-L1, mostraron que a pesar de que las células expresan  $\beta$ -tubulina, FABP4 solamente está presente en el medio de cultivo después de la lisis celular, lo que sugiere la existencia de un mecanismo de secreción<sup>119</sup>.

Recientemente, Schlottmann, I. y colaboradores, han demostrado en un estudio *in vitro*, que FABP4 se secreta activamente de los adipocitos diferenciados humanos y macrófagos THP-1, vía un mecanismo no clásico dependiente de calcio<sup>141</sup>. Ya hemos mencionado que FABP4 carece de secuencia de señal secretora N-terminal, necesaria para la vía secretora clásica. En este estudio demuestran, que a pesar de bloquear la vía clásica, no se anula la secreción de FABP4, demostrando así la secreción mediante vía no clásica. Demostraron que la secreción de FABP4 aumentaba de forma significativa

tras realizar un tratamiento con ionomicina, que eleva los niveles de calcio intracelular en adipocitos humanos. En otro estudio reciente, Ertunc y colaboradores, han identificado otra vía no clásica para la secreción de FABP4 y demuestran que la FABP4 es secretada en respuesta a la actividad lipasa adipocitaria<sup>142</sup>. Teniendo en cuenta el efecto de FABP4 circulante sobre el metabolismo de la glucosa, estos últimos estudios avalan la importancia de FABP4 como diana terapéutica en enfermedades metabólicas.

### 2.3.4. Conocimientos aportados por los animales *Knockout* y transgénicos de *Fabp4*

El conocimiento de la función de las FABP, se ha mejorado gracias a los modelos genéticos de ratones. Los estudios animales sobre la función de FABP4 se resumen en la tabla 6. Hotamisligil y colaboradores estudiaron los primeros ratones KO para *Fabp4* (*Fabp4*<sup>-/-</sup>) y observaron que desarrollaban en mayor medida obesidad inducida por DRG comparando con controles wild-type (WT)<sup>143</sup>, pero a diferencia de los ratones WT, no desarrollaban resistencia a la insulina ni diabetes. Se ha observado que la FABP5 se sobreexpresa en ratones *Fabp4*<sup>-/-</sup>, compensando potencialmente la pérdida de FABP4<sup>105, 143</sup>. El mismo grupo estudió que la falta de resistencia a la insulina en ratones DRG *Fabp4*<sup>-/-</sup>, se correlacionaba con una disminución de la obesidad inducida por TNF-alfa en el tejido adiposo.

A pesar de una homeostasis aparentemente normal de la glucosa, los ratones delgados *Fabp4*<sup>-/-</sup>, presentaban una reducción de la lipólisis y un aumento de la lipogénesis, así como una respuesta de secreción de insulina inhibida ante la estimulación de beta-adrenérgicos<sup>104, 109</sup>, lo que sugiere que FABP4 o una señal lipídica regulada mediante FABP4, podrían estar implicadas en la modulación de la secreción insulínica. Curiosamente, la sobreexpresión transgénica de *Fabp5* aumenta la lipólisis y disminuye los niveles celulares de AG libres. Para entender el papel de FABP4 en ausencia de la expresión compensatoria de FABP5, se cruzaron ratones *Fabp4*<sup>-/-</sup> con ratones *Fabp5*<sup>-/-</sup><sup>144</sup>. Ratones doblemente KO para *Fabp4*<sup>-/-</sup> y *Fabp5*<sup>-/-</sup>, mostraron un



## Introducción

---

fenotipo notable con una fuerte protección contra la obesidad inducida por la dieta, resistencia a la insulina, diabetes tipo 2 y esteatosis hepática<sup>144</sup>.

El modelo triple KO *ob/ob-Fabp4<sup>-/-</sup>-Fabp5<sup>-/-</sup>* (deficientes en leptina), no redujo la obesidad, pero mejoró la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina, lo que conlleva una reducción de la expresión de *Scd1* hepática, y la protección contra el desarrollo de hígado graso<sup>145</sup>. En otros estudios, utilizando ratones *Fabp4-5<sup>-/-</sup>*, se observó un fuerte incremento en la lipogénesis de novo del tejido adiposo, que a su vez provocaba un aumento de los niveles de palmitoleato circulante (C16: 1n7), lo que suprimía la expresión hepática de *Scd1* y aumentaba la sensibilidad a la insulina<sup>146</sup>.

Aunque FABP4 se sobreexpresa durante la diferenciación preadipocitaria, la adipogénesis y la formación del tejido adiposo se desarrollan de forma normal o mejorada en los modelos celulares y de ratones *Fabp4<sup>-/-</sup>* y *Fabp4-5<sup>-/-</sup>*<sup>143, 144</sup>. Se ha observado que en el contexto de la deficiencia de *Fabp4*, la conversión de glucosa en AG se duplica, lo que sugiere que FABP4 podría suprimir la lipogénesis en el adipocito, contribuyendo directamente a las mejoras observadas en la glucosa e insulina basales en ratones obesos deficientes en *Fabp4<sup>-/-</sup>*<sup>147</sup>. Además, los niveles basales y estimulados de lipólisis se reducen significativamente en los adipocitos de ratones *Fabp4<sup>-/-</sup>*, a pesar del aumento compensatorio en la expresión de FABP5<sup>104, 105</sup>. Tal y como hemos mencionado anteriormente, FABP4 se expresa en las lesiones arterioscleróticas y en las células espumosas. Makowski y colaboradores, demostraron que los modelos animales doble KO para *Fabp4<sup>-/-</sup>* y *ApoE<sup>-/-</sup>* (*Fabp4<sup>-/-</sup>-ApoE<sup>-/-</sup>*), comparando con los controles *ApoE<sup>-/-</sup>*, mostraban una clara protección contra la arteriosclerosis, en ausencia de diferencias significativas en cuanto a niveles lipídicos y sensibilidad a la insulina<sup>148</sup>. Además, el mismo grupo observó que el área de la lesión arteriosclerótica se reducía en un 66% en modelo *Fabp4<sup>-/-</sup>-ApoE<sup>-/-</sup>* comparando con el grupo control. Posteriormente Boord y colaboradores estudiaron un modelo de ratón triple KO de *Fabp4<sup>-/-</sup>-Fabp5<sup>-/-</sup>-ApoE<sup>-/-</sup>* y obtuvieron resultados muy similares<sup>149</sup>.

La utilización de inhibidores de la unión de AG con FABP4 (BMS309403) en animales de experimentación también se ha asociado a un menor desarrollo de dislipemia, menos TG y mejoría de la función endotelial. Además según Lee y colaboradores<sup>150</sup> se ha asociado a disminución de un 50% del área de la lesión arteriosclerótica en aorta de ratones *ApoE*<sup>-/-</sup>.

**Tabla 3.** Estudios animales sobre la función de FABP4.

Ref.	Grupo experimental	Grupo control	Dieta	Peso corporal	Resistencia insulínica	Lípidos	Función célula β	Arteriosclerosis
143	<i>Fabp4</i> <sup>-/-</sup>	WT	DRG	↑	↓Glucosa ↓Insulina	↔CT ↓TG ↔NEFA	nd	nd
105	<i>Fabp4</i> <sup>-/-</sup>	WT	DE	↔	nd	↑NEFA	nd	nd
147	<i>Fabp4</i> <sup>-/-</sup>	WT	DRG	↔	↓Glucosa ↓Insulina	nd	nd	nd
144	<i>Fabp4</i> <sup>-/-</sup> - <i>Fabp5</i> <sup>-/-</sup>	WT	DRG	↓	↓Glucosa ↓Insulina	nd	nd	nd
151	<i>ob/ob</i> - <i>Fabp4</i> <sup>-/-</sup>	<i>ob/ob</i>	DE	↑	↓Glucosa ↓Insulina	↓CT ↓TG ↑NEFA	↓SI inducida por lipólisis ↔tamaño célula β	nd
152	<i>Fabp</i> <sup>-/-</sup>	WT	DRG	↔	↓Glucosa	↑TG	nd	nd
145	<i>ob/ob</i> - <i>Fabp4</i> <sup>-/-</sup> - <i>Fabp5</i> <sup>-/-</sup>	<i>ob/ob</i>	DE	↑	↓Glucosa ↓Insulina	↓CT ↓TG ↓NEFA	nd	nd
104	<i>Fabp4</i> <sup>-/-</sup>	WT	DE	nd	↔ Glucosa ↓Insulina	↔NEFA	↓SI inducida por lipólisis	nd
153	<i>ob/ob</i> tratados-BMS309403	<i>ob/ob</i>	DE	↔	↓Glucosa ↓Insulina	↔CT ↓TG ↔NEFA	↔tamaño célula β	nd
153	<i>ApoE</i> <sup>-/-</sup> tratados-BMS309403	<i>ApoE</i> <sup>-/-</sup>	DO	↔	↔ Glucosa ↔ Insulina	↔CT ↔TG ↔NEFA	nd	↓desarrollo de célula. espumosas ↓área de lesión
154	WT tratados-BMS309403	WT	DRG	nd	↔ Glucosa ↔ Insulina	↓TG ↓NEFA	nd	nd
155	<i>Fabp4</i> knockdown	WT	DRG	↑	↔ Glucosa ↔ Insulina	↔TG ↔NEFA	nd	nd
148	<i>Fabp4</i> <sup>-/-</sup> - <i>ApoE</i> <sup>-/-</sup>	<i>ApoE</i> <sup>-/-</sup>	DE	nd	↔ Glucosa ↔ Insulina	↔CT ↔TG	nd	↓desarrollo de célula. Espumosas ↓área de lesión
156	<i>Fabp4</i> <sup>-/-</sup> - <i>ApoE</i> <sup>-/-</sup>	<i>ApoE</i> <sup>-/-</sup>	DO	↑	↔ Glucosa	↔CT ↔TG ↔NEFA	nd	↓área de lesión
149	<i>Fabp4</i> <sup>-/-</sup> - <i>Fabp5</i> <sup>-/-</sup> - <i>ApoE</i> <sup>-/-</sup>	<i>ApoE</i> <sup>-/-</sup>	DE	↓(m) ↔(h)	↓ Glucosa (m)	↓CT ↓TG	nd	↓área de lesión

Introducción

				↔ Glucosa (h)	↔ NEFA			
150	<i>ApoE</i> <sup>-/-</sup> tratados-BMS309403	<i>ApoE</i> <sup>-/-</sup>	DE	↔	↔ Glucosa ↔ Insulina	↔ CT ↓ TG	nd	↑ función endotelial ↑ Relajación

Aumento (↑), descenso (↓) y no regulación (↔) en el grupo experimental, comparado con el grupo control.  
 nd, No determinado; m, mujer; h, hombre; CT, colesterol total; TG, Triglicéridos; NEFA, ácidos grasos no esterificados; DRG, dieta rica en grasas; SI, secreción insulínica; DE, dieta estándar; DO, dieta occidental; WT, wild type; Adaptada de: Kralisch, S. *Diabetologia* (2013) 56:10-21

### 2.3.5. Relación de FABP4 circulante con alteraciones metabólicas

FABP4 se considera un buen biomarcador de alteraciones metabólicas<sup>157</sup>, tales como la obesidad, el SMet, la dislipemia aterogénica, la resistencia a la insulina, la diabetes tipo 2 y la enfermedad cardiovascular. A continuación exponemos los estudios transversales, de intervención y prospectivos en los que se basa esta relación:

#### a) Estudios transversales:

Se han realizado múltiples estudios transversales que han demostrado como FABP4 circulante se asocia de forma positiva e independiente con marcadores de SMet y con variables relacionadas con la obesidad (Tabla 4). De los trabajos más importantes en este aspecto está el realizado por Xu y colaboradores que observaron una regulación positiva significativa de los niveles de FABP4 en la obesidad. Demostraron que los valores FABP4 en suero se correlacionaron positivamente y de forma independiente con los marcadores del SMet, incluyendo la circunferencia de cintura, la presión arterial, la dislipemia, insulina en ayunas y HOMA-IR<sup>119, 158</sup>. y negativamente con el índice de sensibilidad a la insulina (*Quantitative insulin sensitivity check index*)<sup>159</sup>. Existen otros estudios independientes, que también han descrito que existe un aumento en los niveles séricos de FABP4 en pacientes con SMet en comparación con los controles<sup>117, 159, 160</sup>. La asociación existente entre los niveles circulantes de FABP4 con diferentes aspectos del SMet queda demostrada por otros estudio<sup>117, 130, 159-163</sup>. En pacientes

diabéticos, también se ha demostrado, que las TZD aumentan las concentraciones plasmáticas de FABP4 porque activan PPAR $\gamma$ <sup>117</sup>. Cabré y colaboradores, también han descrito que FABP4 circulante se encuentra elevada en los pacientes con diabetes, hiperlipidemia familiar combinada<sup>164</sup> y en aquellos con esteatosis hepática no alcohólica<sup>165</sup>.

Yeung y colaboradores demostraron que los pacientes con alteraciones en el metabolismo de la glucosa o con diabetes tipo 2 presentan niveles circulantes de FABP4 más elevados que individuos controles sanos<sup>166</sup>. En un estudio realizado en población no diabética por Xu y colaboradores, se observó que los niveles circulantes de FABP4 se asociaron positivamente con las concentraciones de glucosa postprandial, insulina basal y con el número de componentes de SMet<sup>119</sup>. Por otro lado, se conoce bien que los pacientes con diabetes tipo 2 pueden desarrollar como complicación microvascular nefropatía diabética, retinopatía diabética y neuropatía diabética. En el estudio realizado por Cabré y colaboradores<sup>167</sup>, los niveles elevados de FABP4 se correlacionaron positivamente con niveles elevados de creatinina plasmática y disminución de filtrado glomerular (FG-MDRD). Otro estudio puso de manifiesto que los niveles circulantes de FABP4 se asociaban con el grado de severidad de la nefropatía<sup>168</sup>. Por tanto, se podría sugerir que los niveles circulantes de FABP4 suponen un marcador de nefropatía diabética en pacientes con diabetes tipo 2.

En PCOS, la presencia de obesidad y la resistencia a la insulina es muy prevalente, por lo que dichas mujeres tienen mayor riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 y enfermedad cardiovascular. En un estudio prospectivo de cambios de estilo de vida en población PCOS obesa, los cambios en los niveles de FABP4 se asociaron con cambios en los marcadores de obesidad, pero no de resistencia a la insulina<sup>169</sup>.

La FABP4 y el SAHS se asocian a un mayor riesgo de SMet en niños y adultos. En el 2010, Khalyfa y colaboradores, compararon niños SAHS y no SAHS entre 5-8 años, subdivididos entre obesos y no obesos, demostraron que niveles circulantes de FABP4 eran más elevados en los niños obesos afectados de SAHS que no en niños obesos no SAHS.

## Introducción

---

Por lo que, en esta población la asociación de SAHS y obesidad son un claro promotor de riesgo cardiometabólico<sup>132</sup>. Lam y colaboradores<sup>170</sup> observaron un aumento de los niveles plasmáticos de la FABP4 en el SAHS, considerándolo como marcadores de severidad en el SAHS. Dicho estudio demostró que se correlacionaban con el índice apnea-hipopnea (IAH), la saturación de O<sub>2</sub> mínima, el tiempo de sueño con saturación de oxígeno < 90% (CT90), los niveles de insulina, el HOMA-IR y los niveles plasmáticos de triglicéridos, independientemente de la obesidad. En otro estudio, Acioglu y colaboradores<sup>171</sup>, no observaron diferencias significativas entre pacientes con SAHS y no SAHS respecto a los niveles de leptina y FABP4 y se correlacionaron con el IMC y no con el IAH. Existen más estudios, como el de Balci y colaboradores<sup>172</sup>, que han observado que el aumento de los niveles circulantes de FABP4 se correlaciona con la gravedad del SAHS, con el índice de masa ventricular izquierda y con el índice de función miocárdica. Esta evidencia podría sugerir que la FABP4 en los pacientes SAHS es un marcador de la disfunción del ventrículo izquierdo en estos pacientes.

Cabré y colaboradores han observado que la FABP4 se asocia a dislipemia aterogénica y observaron que en diabéticos tipo 2, los niveles circulantes elevados de FABP4 se asociaron positivamente con los niveles de TG e inversamente con el C-HDL y ApoA1, independientemente de la obesidad y la resistencia insulínica<sup>162</sup>. El grupo de población con hiperlipemia familiar combinada (HFC) también presenta rasgos clínicos de dislipemia aterogénica, porque presenta una producción aumentada de partículas ricas en triglicéridos, junto con niveles plasmáticos elevados de triglicéridos y colesterol. En este grupo la FABP4 circulante se encuentra elevada comparando con población sana<sup>164</sup>. Se debe tener en cuenta, que en este caso, la presencia de la obesidad en HFC manifiesta asociaciones con los niveles plasmáticos de FABP4 y la hipertrigliceridemia adicionales a los mecanismos patológicos propios de la enfermedad.

**Tabla 4.** Hallazgos principales de FABP4 circulante en estudios transversales en humanos.

Referencia	Cohorte	Hallazgos principales sobre FABP4 circulante	Correlación multivariada
117	169 DMT2 105 controles	Aumento de SMet	nd
173	59 ECV 18 controles	Aumento de ECV	nd
119	129 obesos 100 controles	Aumento en obesidad y SMet	+ PA, insulina basal, HOMA-IR, C-LDL, TG, perímetro abdominal, - adiponectina y C-HDL
159	71 SMet 67 controles	Aumento del SMet	nd
160	12 SMet+/LD-, 32 SMet-/LD+, 17 SMet+/LD+, 122 controles	Aumento del SMet y LD	+ IMC, PA, insulina basal, TG -C-HDL
164	273 HFC 118 controles	Aumento en HFC	+ IMC, insulina basal, HOMA-IR, perímetro cintura (HFC)
165	100 NAFLD 129 controles	Predice inflamación y fibrosis en NAFLD	nd
161	161 niños	Asociado con obesidad	+ IMC, perímetro cintura
130	868 no DMT2	Determinado mediante distribución grasa, función renal y género	+ PCR, TG, WHtR -FG, índice de Stumvoll
162	168 DMT2 105 controles	Asociado con DA en DMT2	+ C-LDL, TG (DM2) -C-HDL (DM2)
163	98 CAD	Asociado con SMet	+ TG

Introducción

166	479 con GIMc	Asociado con GIMc en mujeres	+ edad, PA, GIMc (en mujeres)
174	234 con angiografía coronaria	Asociado con CAD	nd
175	211 CAD 211 controles	Asociado con CAD	+ CAD
176	125 CAD 120 controle	Aumento en CAD	+ volumen de placa (CAD)
177	247 CAD 94 controles	Aumento en CAD	+ índice de arteriosclerosis coronaria
178	18 CAD/CVD 18 controles	Aumento en CVD	nd
179	87 controles	Asociado con inflamación vascular	+ inflamación vascular
180	306 AVC isquémico 306 controles	Aumento en ictus isquémico	nd

CVD, enfermedad cerebrovascular; HFC, hiperlipemia familiar combinada; HOMA-IR, HOMA de insulino resistencia; GIMc, grosor intima-media carotideo; LD, lipodistrofia; SMet, síndrome metabólico; NAFLD, esteatosis hepática no alcohólica; nd, no determinado; T2DM, diabetes mellitus tipo 2; DA, dislipemia aterogénica; AVC, accidente vascular cerebral; PA, presión arterial; TG, triglicéridos; C-HDL, colesterol HDL; C-LDL, colesterol LDL; PCR, proteína C reactiva; IMC, índice de masa corporal; FG, filtrado glomerular; WHtR, ratio cintura-altura; TZD, tiazolinedionas; CAD, enfermedad arterial coronaria. Adaptada de Kralisch et al. *Diabetologia* 2013; 56:10-21.

**b) Estudios de intervención:**

Los estudio de intervención en población infantil<sup>181</sup> y adulta<sup>182</sup> que presentan obesidad, han observado el efecto del cambio de peso corporal sobre la FABP4 circulante. Se ha demostrado que actuando sobre la dieta, la actividad física o, en el caso de la obesidad mórbida, la cirugía bariátrica, se produce una disminución significativa de FABP4 circulante. La obesidad abdominal es una de las alteraciones metabólicas que

caracteriza el SMet. Lázaro y colaboradores, demostraron que FABP4 circulante disminuía significativamente en pacientes con aumento de la actividad física aeróbica, mientras que aumentaba con la reducción de la actividad física<sup>183</sup>. Desde el punto de vista de la obesidad, todos los estudios publicados<sup>184, 185</sup> han demostrado que FABP4 circulante se reduce de forma significativa después de una reducción de peso importante a través de cambios de estilo de vida o de medidas quirúrgicas. Sin embargo, en el estudio de Stejskal y colaboradores, en aquellos pacientes que recuperaban su peso basal se observaba un incremento de FABP4 hasta alcanzar los niveles basales.

Recientemente se ha publicado por Furuhashi y colaboradores, que en pacientes con diabetes tipo 2, el tratamiento con sitagliptina (un inhibidor del dipeptidil peptidasa 4) disminuye de forma significativa las concentraciones séricas de FABP4, así como la hemoglobina glicosilada (HbA1c), sin embargo no se observan cambios significativos en la adiposidad ni en las variables lipídicas<sup>186</sup>.

En cuanto a estudios de intervención en pacientes con SAHS, Catalá y colaboradores han publicado recientemente<sup>187</sup> que los niveles circulantes de FABP4 están directamente relacionados con la severidad del SAHS y que no se modifican tras aplicar tratamiento con CPAP, por lo que se podría considerar como un marcador de alteraciones metabólicas en pacientes afectados de SAHS. Respecto al tratamiento con presión continua positiva (CPAP), Sovova y colaboradores<sup>188</sup> han observado que en pacientes con SAHS grave y un alto porcentaje de tiempo de sueño por debajo del 90% de saturación de oxígeno (CT90), junto con factores de RCV, el tratamiento con CPAP, al menos en 1 año, disminuye los niveles de FABP4 circulante.



Introducción

**Tabla 5.** Hallazgos principales de FABP4 circulante en estudios de intervención en humanos.

Referencia	Cohorte	Tipo de intervención	Periodo de seguimiento	Hallazgos principales sobre FABP4 circulante
184	30 mujeres obesas	Programa de ejercicio	3 meses	Disminuye tras pérdida de peso
185	77 mujeres obesas mórbidas	Cirugía bariátrica	1 año	Disminuye tras pérdida de peso
189	73 niñas obesas en prepubertad	Dieta e intervención de estilo de vida	2 años	Disminuye tras pérdida de peso
190	189 participantes obesos	Dieta baja en grasas	3 meses	Disminuye tras pérdida de peso
191	43 participantes con arteriosclerosis	Tratamiento con atorvastatina	3 meses	Disminuye tras tratamiento con atorvastatina
187	125 con criterios de SAHS	Tratamiento con CPAP	8 semanas	Se asocia a severidad de SAHS

SAHS, Síndrome de apnea-hipopnea del sueño; CPAP, presión continua positiva. Modificada de Kralisch et al. *Diabetologia* 2013; 56:10-21.

**c) Estudios prospectivos:**

Xu y colaboradores publicaron en un estudio longitudinal a 5 años en población no diabética y sin tratamiento farmacológico hipolipemiante, que los niveles elevados de FABP4 circulante predecían de forma independiente el riesgo de desarrollar SMet, independientemente de la adiposidad y la resistencia a la insulina<sup>158</sup>. El hecho de presentar niveles elevados de FABP4 contribuye al desarrollo del sMet en la esteatosis hepática no alcohólica. Las concentraciones plasmáticas basales de FABP4 fueron significativamente más altas en los niños que desarrollaban SMet respecto a los controles<sup>192</sup>. En la misma línea, Tso y colaboradores, en un estudio prospectivo a 10 años, consideraron que FABP4 circulante era un biomarcador para predecir el desarrollo de diabetes tipo 2 independientemente de la obesidad, la resistencia a la insulina y el índice glucémico<sup>193</sup>. Nuestro grupo ha demostrado que las concentraciones basales de FABP4 son marcadores de riesgo para desarrollar dislipemia aterogénica y aunque no se

alcanzó la significación estadística los sujetos que desarrollan diabetes suelen tener cifras basales más elevadas de FABP4<sup>194</sup>.

**Tabla 6.** Hallazgos principales de FABP4 circulante en estudios prospectivos en humanos.

Ref.	Cohorte	Periodo de seguimiento (años)	Hallazgos principales sobre elevado nivel de FABP4 circulante	OR/HR/RR	Otras variables asociadas
173	202 con ictus isquémico (60 muertes)	4.4	Predice mortalidad después del ictus isquémico	HR 2.0	Edad, troponina T, localización ictus
195	284 (70 alcanzaron endpoint primario)	3	Predice eventos CV	HR 1.7 (p=0.07)	nd
158	376 sin SMet (50 desarrollaron SMet)	5	Predice desarrollo de SMet	OR 4.7	HOMA-IR
192	159 sin SMet (10 desarrollaron SMet)	3	Predice desarrollo de SMet	OR 17.3	nd
193	544 sin DMT2 (96 desarrollaron DMT2)	10	Predice desarrollo de DMT2	RR 2.3	Sexo, 2h tras TSOG
196	61 con estadio terminal de ERC (13 fallecieron)	7	Predice mortalidad CV en ERC avanzado	HR 7.8	edad
180	366 con ictus agudo (60 fallecieron)	3 meses	Predice mortalidad prematura tras ictus isquémico	OR 2.7	Edad, Escala de ictus NIH
197	1069 con CAD (204 alcanzaron endpoint)	10	Predice morbilidad y mortalidad CV	HR 1.5	nd
194	578 con diferentes factores de RCV	6	Predice desarrollo de DA	OR 1.03 (p=0.020)	SMet

ERC, enfermedad renal crónica; CAD, enfermedad arterial coronaria; CV, cardiovascular; HOMA-IR, HOMA de insulino resistencia; nd, no determinado; TSOG, test de sobrecarga oral de glucosa; NIH, National Institutes of Health; T2DM, diabetes mellitus tipo 2; SMet, síndrome metabólico; RCV, riesgo cardiovascular; DA, dislipemia aterogénica. Modificada de Kralisch et al. *Diabetologia* 2013; 56:10-21.

### 2.3.6. Relación de FABP4 circulante con alteraciones vasculares

#### a) **Estudios transversales (ver Tabla 4):**

La primera descripción de la asociación entre la FABP4 circulante y la arteriosclerosis se publicó en 2007<sup>166</sup>. Este estudio informaba de que los niveles circulantes de FABP4 eran significativamente mayores en mujeres con placas ateroscleróticas en comparación con aquellas sin placas. Además, las concentraciones de FABP4 aumentaban significativamente con el número de arterias coronarias estenóticas<sup>174</sup>. De acuerdo con estos hallazgos, varios estudios independientes informaron de que FABP4 circulante era significativamente más elevado en los pacientes con enfermedad arterial coronaria (CAD)<sup>175, 176</sup>. Otro pequeño estudio de casos y controles detectó niveles de FABP4 circulante significativamente elevados en pacientes con enfermedad cerebrovascular (ECV), mientras que no se encontraron diferencias en los pacientes con CAD<sup>178</sup>. Las concentraciones plasmáticas de FABP4 son más elevadas también en pacientes con arteriosclerosis carotídea en comparación con controles sanos<sup>173</sup> y se correlacionaba positivamente con la inflamación vascular medida por tomografía por emisión de positrones 8F-FDG<sup>179</sup>.

Yeung y colaboradores, en un estudio en población asiática con RCV, evaluaron la relación entre los niveles de FABP4 circulante y el grosor íntima-media carotídeo (GIMc) y se observó que los niveles circulantes de FABP4 se asociaron positivamente con el GIMc en ambos géneros, pero únicamente en las mujeres los niveles eran significativamente más altos en aquellas que presentaban placas de ateroma<sup>166</sup>.

También se ha descrito la asociación entre niveles altos de FABP4 y la cardiopatía isquémica, con el número de lesiones coronarias<sup>174</sup> y el volumen de las lesiones determinadas por ultrasonografía intravascular (IVUS)<sup>176</sup>. Su presencia en lesiones ateromatosas se consideran un índice de mal pronóstico valvular. Lee y colaboradores, demostraron que existen diferencias en la expresión génica entre los macrófagos aislados de placas ateromatosas estables y vulnerables en humanos y sugieren que la FABP4 y la leptina están implicadas en la progresión de la arteriosclerosis y la ruptura de la placa<sup>198</sup>. En otro estudio se obtuvieron muestras de endarterectomía de pacientes con

estenosis carotídea sintomática y asintomática. En estas placas se estudió la expresión de mRNA y PCR, observando que los niveles de FABP4 eran mayores en las placas inestables respecto a las estables<sup>199</sup>. Lo que sugiere que FABP4 es un factor clave que conecta la acumulación vascular y celular de los lípidos hacia la inflamación.

Nuestro grupo ha descrito que FABP4 circulante se asocia a la insuficiencia cardíaca<sup>200</sup> y también se ha demostrado que en pacientes diabéticos se asocia a disfunción endotelial<sup>201</sup>.

**b) Estudios de intervención (ver Tabla 5):**

Wu y colaboradores demostraron que en pacientes naive de tratamiento hipolipemiente y con arteriosclerosis, el tratamiento con atorvastatina durante 3 meses reducían los niveles circulantes de FABP4<sup>191</sup>. Los pacientes que incluyeron en este estudio habían presentado enfermedad cardiovascular a modo de infarto agudo de miocardio, accidente isquémico transitorio o accidente vascular cerebral, o eran asintomáticos pero con una estenosis > 50% documentada en un territorio coronario, extracraneal o enfermedad arterial periférica. A nivel intraplaca, 18F-fluorodeoxiglucosa se acumula en las zonas ricas en macrófagos y observaron mediante PET-TAC, que la captación disminuía después del tratamiento con atorvastatina.

**c) Estudios prospectivos (ver Tabla 6):**

Furuhashi y colaboradores han sugerido que la FABP4 circulante predice el pronóstico en pacientes con enfermedad renal terminal, siendo considerados una población de alto riesgo de morbi-mortalidad asociada a la arteriosclerosis<sup>196</sup>. FABP4 circulante se asoció de forma independiente y positiva con el accidente cerebrovascular y mortalidad a los 3 meses en pacientes con ictus isquémico<sup>173, 180, 195</sup>.

Existe otro trabajo de Von Eynatten y colaboradores que demostraron que las concentraciones circulantes de FABP4 se asociaban de forma independiente con la morbilidad y mortalidad cardiovascular en pacientes con CAD<sup>197</sup>. Peeters y colaboradores, en un estudio prospectivo con un periodo de seguimiento a 3 años,

demonstraron en un grupo de pacientes endartectomizados que los niveles de FABP4 se correlacionaban con placas inestables y lesiones sintomáticas<sup>195</sup>.

### 2.3.7. Evidencias de los efectos periféricos de FABP4

Existen publicaciones sobre la potencial función que ejerce FABP4 circulante en la célula endotelial y en la función cardíaca. Nuestro grupo publicó que la FABP4 exógena puede inducir proliferación y migración de las células del músculo liso en arterias coronarias humanas y también puede inhibir la expresión de eNOS en células endoteliales humanas<sup>202, 203</sup>. Lamounier-Zepter y colaboradores también observaron que la FABP4 exógena suprime la contracción de cardiomiocitos cultivados *in vitro*<sup>140</sup>, aunque si este efecto es una función específica de FABP4, no es del todo claro. La actividad de FABP4 sobre la función de los cardiomiocitos se potencia en presencia de ácidos epoxieicosatrienoicos, que apoya el hecho de que los ligandos de AG pueden modular la función de FABP4. Además, las FABP en general, regulan la producción de lípidos, que a su vez tienen efectos sobre los cardiomiocitos, por lo que es muy probable que las FABP ejerzan efectos directos e indirectos sobre la función cardíaca<sup>85</sup>.

En estudios *in vitro*, se ha observado que las células endoteliales presentan un aumento en la expresión génica y proteica de la FABP4, por efecto de la hipoxia intermitente<sup>122</sup>. La FABP4 se correlaciona positivamente con los marcadores de inflamación, principalmente con la PCR, lo que sugiere que la FABP4 circulante contribuye en el proceso de la inflamación sistémica.

La disfunción endotelial es un factor clave en el desarrollo de la arteriosclerosis, sin embargo, su estudio no se considera de práctica clínica habitual. Tal y como hemos mencionado en el apartado anterior, a nivel clínico se ha estudiado la relación de los niveles circulantes de FABP4 con la disfunción endotelial determinada mediante tonometría arterial periférica (PAT) en una población con diabetes tipo 2 y se observó

que los niveles elevados de FABP4 circulante se asociaban independientemente con un empeoramiento de la disfunción endotelial en estos pacientes<sup>201</sup>.

## 2.4. *Fatty acid binding protein 5 (FABP5 o E-FABP)*

### 2.4.1. Estructura, localización y función

También conocida como mal1, KLBP o FABP asociada a psoriasis (PA-FABP) es una proteína citoplasmática formada por 135 aminoácidos que unen AG y participa como FABP4 en su transporte y metabolismo intracelular. Ya hemos mencionado anteriormente que se expresa en la lengua, tejido adiposo (adipocitos y macrófagos), célula dendrítica, glándula mamaria, cerebro, riñón, hígado, pulmón y testículo<sup>91</sup>. Pero sobre todo, la FABP5 es específica de las células epidérmicas de la piel y altamente expresada en la piel de pacientes afectados de psoriasis<sup>204</sup>. La función exacta de FABP5 es especialmente difícil de dilucidar, debido a que todos estos tejidos expresan otros miembros de la familia FABP. El gen que la codifica se localiza en el cromosoma 8, en la posición 8q21.13<sup>101</sup>. Funciona como una chaperona lipídica intracelular que une AGCL<sup>85, 205</sup>.



**Figura 9.** Estructura de la FABP5.  
Furuhashi M, Tuncman G, Gorgun CZ, et al. Nature 2007; 447:959-965.

Ya hemos mencionado que la FABP5 también se expresa en los adipocitos y macrófagos, característica que comparte con FABP4. Sin embargo, la expresión en el adipocito por parte de la FABP5, constituye una fracción menor que la FABP4, aproximadamente una cantidad 100 veces más pequeña. En cuanto a expresión, Fisher y colaboradores demostraron que el ratio FABP4/FABP5 es mayor en el tejido adiposo

subcutáneo que en el visceral<sup>96</sup>. Ambas chaperonas también se expresan en los macrófagos y en las células dendríticas<sup>148</sup>. En un estado de déficit de FABP4, la expresión de FABP5 exhibe un fuerte incremento compensatorio en el tejido adiposo, pero no en los macrófagos o en las células dendríticas<sup>148</sup>. Diversos estudios han demostrado que tanto la FABP4 como la FABP5 juegan un papel importante en la regulación de la resistencia a la insulina y en el desarrollo de la arteriosclerosis, a consecuencia de su expresión en adipocitos y macrófagos<sup>121, 148</sup>.

Gracias al trabajo de Armstrong y colaboradores, también se conoce que los ligandos de FABP5, tanto el linolénico como el araquidónico, participan en la activación de PPAR $\beta/\gamma$ <sup>206</sup>. Sin embargo, en otro estudio se observó que FABP5 juega un papel proaterogénico suprimiendo la actividad de PPAR $\gamma$ , lo que aumenta la expresión del receptor de quimiocinas CC-2 de los monocitos, promoviendo su reclutamiento a la lesión arteriosclerótica<sup>207</sup>.

Mediante estudios cristalográficos de FABP5, Sanson y colaboradores han demostrado que los endocannabinoides son transportados intracelularmente por FABP5<sup>208</sup>.

#### La FABP5 se expresa mayoritariamente en las siguientes localizaciones:

- a) **Tejido adiposo:** en los estudios realizados en ratones transgénicos con sobreexpresión de FABP5 se ha observado mediante la estimulación de HSL, un aumento de la lipólisis basal y de la resistencia a la insulina<sup>209</sup>. Tal y como hemos mencionado en el apartado de FABP4, Maeda y colaboradores, estudiaron KO de *Fabp4* y *Fabp5*, en el que demostraron que dichos ratones presentaban una protección para desarrollar enfermedades metabólicas<sup>144</sup>.
- b) **Macrófagos:** Babaev y colaboradores, en un estudio en ratones demostraron que el déficit de *Fabp5* en macrófagos protege contra la arteriosclerosis mediante la reducción de la expresión de genes inflamatorios como la ciclooxigenasa-2 y la IL-6<sup>207</sup>.



- c) **Otras localizaciones:** FABP5 se ha encontrado expresada en piel, lengua, células dendríticas, glándula mamaria, cerebro, intestino, riñones, hígado, pulmón, corazón, músculo esquelético, plasma, testículos, cristalino, retina y timo<sup>91</sup>. Hoekstra y colaboradores han observado que una alimentación rica en colesterol aumenta la expresión de FABP5 en las células del parénquima hepático de ratones deficientes del receptor LDL y provoca un incremento de los niveles plasmáticos de las lipoproteínas aterogénicas (VLDL y LDL), pudiendo indicar que la FABP5 juega un papel en la aterogénesis<sup>210</sup>.

#### 2.4.2. Variantes genéticas (polimorfismos) del gen *FABP5*

A diferencia del gen de la *FABP4*, se han descrito menos polimorfismos del gen *FABP5* que tengan relevancia clínica. Los polimorfismos más importantes estudiados del gen *FABP5* son: rs454550 y rs79370435, ambos están descritos por Bu y colaboradores<sup>211</sup>. Este es un único estudio publicado sobre polimorfismos de *FABP5* y trastornos metabólicos, demostrándose que la presencia de dichas variantes, implican una mayor probabilidad de presentar diabetes tipo 2.

Se han estudiado otros polimorfismos de *FABP3*, *FABP5* y *FABP7* que se relacionan con la esquizofrenia<sup>212</sup>, y en población autista se ha descrito una mutación, 340G>C (Gly114Arg) en el gen de *FABP5*.

#### 2.4.3. Conocimientos aportados por los animales *knockout* y transgénicos de *Fabp5*

Como hemos mencionado en el apartado de modelos animales KO y transgénicos de *Fabp4*, merece la pena recordar que en ratones *Fabp4*<sup>-/-</sup>, la expresión de FABP5 aumenta de forma significativa en macrófagos. Maeda y colaboradores han

demostrado que la deficiencia combinada de la *Fabp4* y *Fabp5* protegen contra el SMet y la arteriosclerosis en ratones<sup>144</sup>.

Los ratones transgénicos que sobreexpresaban el gen de la *FABP5* en el tejido adiposo, exhibían un mejor fenotipo con una mejorada lipólisis basal y estimulada por la HSL<sup>213</sup>. Estos ratones transgénicos, tras ser alimentados con una DRG y sobreexpresar *FABP5* en el tejido adiposo específico, presentaron una reducción en la sensibilidad a la insulina sistémica<sup>209</sup>. Por el contrario, los ratones *Fabp5*<sup>-/-</sup> se encuentran moderadamente protegidos contra la obesidad inducida por la dieta y la resistencia a la insulina, por lo que presentan un aumento en la sensibilidad a la insulina<sup>209</sup>. Los adipocitos de ratones *Fabp5*<sup>-/-</sup> mostraron una mayor capacidad para el transporte de glucosa dependiente de insulina. Aparte de una mayor expresión de *FABP3* en el hígado, no se observó aumento compensatorio en la expresión de *FABP3*, *FABP4* o *FABP7* en el tejido adiposo, testículo, lengua o cerebro en ratones deficientes en *Fabp5*<sup>209</sup>.

En otros estudios se ha observado que la falta total o parcial de *Fabp5* en el hígado durante el desarrollo perinatal, fue compensado por una sobreexpresión de *FABP3*<sup>214</sup>. Por el contrario, no hubo cambios aparentes en la morfología ni en la histología en el hígado de ratones *Fabp5*<sup>-/-</sup>, lo que aparenta ser un modelo saludable. La pérdida de *FABP5* en la epidermis no alteró la composición de AG de la membrana epidérmica, donde los AG son componentes esenciales de la barrera de la permeabilidad de la piel al agua<sup>214</sup>. Únicamente se observó una pequeña reducción en la pérdida de agua transepitérmica en ratones *Fabp5*<sup>-/-</sup>, mientras que la barrera de permeabilidad al agua se recuperó más lentamente tras el daño inducido por la acetona<sup>214</sup>.

Jing y colaboradores, estudiaron un modelo celular no metastásico en ratas, y observaron que cuando estas células sobreexpresaban *FABP5*, inducía metástasis a través de la regulación de la expresión del gen *VEGF*<sup>215</sup>.

Introducción

Por lo tanto, FABP5 parece tener efectos opuestos a los publicados para FABP3 y FABP7, que inhiben el crecimiento del tumor. También se ha informado que FABP5 puede influir en las vías de activación del ácido retinoico a través de PPAR- $\delta$ <sup>216</sup>.

Cabe destacar, que la vinculación de las FABP con la tumorigénesis sigue siendo en gran parte un campo bastante inexplorado. Está descrito, que FABP5 se expresa en los astrocitos y en las células gliales del cerebro prenatal y perinatal, y a diferencia de FABP7, también en las neuronas<sup>217</sup>. La expresión de FABP5 se indujo después de la lesión del nervio periférico, lo que sugiere un papel en la regeneración de las neuronas.

Hyder y colaboradores realizaron un estudio en islotes pancreáticos de ratas observando que tanto FABP3 como FABP5 se expresan en una cantidad considerable en tejido secretor insulínico. Por lo que se presupone que utilizando dichos genes como dianas, se puede lograr una disminución de la captación de AG mediante células beta y prevenir la disfunción de éstas, lo que supondría un gran impacto sobre la diabetes<sup>218</sup>.

**Tabla 7.** Modelos KO y transgénicos de FABP5

Ref.	Modelo	Dieta	Peso corporal	Glu	Ins	AGL	TG	CT	Ins sens.	Hígado graso	FABPs	Notas
209	<i>Fabp5</i> <sup>-/-</sup>	Regular	→	→	→	↑	↓	↓	→		H, A, B→	Ta, testículo, lengua, cerebro
209	<i>Fabp5</i> <sup>-/-</sup>	Alta en grasa	↓	↓	→	↑	→	→	↑	→		Expresión marginal
214	<i>Fabp5</i> <sup>-/-</sup>	Regular									H↑ (hígado)	Comp AG→(piel), TEWL: basal↓; recovery↓
209	<i>Fabp5</i> <sup>-/-</sup> ob/ob	Regular	→	↓	↓	↑	↓	↓	↑	→		Expresión marginal
213	<i>Fabp5</i> <sup>ap2-</sup> promoter	Regular	→			→					E↑(Ta); A↓(Ta)	Lipólisis basal y estimulada↑; Comp AG→Ta
209	<i>Fabp5</i> <sup>ap2-</sup> promoter	Alta en grasa	→	↑	→	→	→	→	↓		E↑(Ta); A↓(Ta)	

Ta, tejido adiposo; AG, ácidos grasos; AGL, ácidos grasos libres; Glu, glucosa; Ins, insulina; TEWL, pérdida de agua transepidermica. Adaptada de Maeda K. Role of the fatty acid binding protein mal1 in obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2003; 52:300-7.

#### **2.4.4. Relación de FABP5 circulante con las alteraciones metabólicas y cardiovasculares**

En la actualidad, no se conocen los mecanismos secretores de FABP5 y en general, el papel de FABP5 es mucho más desconocido que el de FABP4, existiendo menos investigación al respecto. Sin embargo, la mayoría de estudios sugieren un rol similar a la FABP4 como biomarcador de RCV<sup>219</sup>, por relacionarse con la enfermedad cardiovascular, el SMet, la resistencia a la insulina, la diabetes tipo 2 y los tumores.

##### **a) Enfermedad cardiovascular y trastornos metabólicos:**

Un trabajo publicado por Ishimura y colaboradores demostraba la relación existente entre FABP5 circulante y el SMet<sup>220</sup>. Ludvik y colaboradores mostraron que en pacientes con obesidad mórbida cuyos niveles circulantes de FABP4 y FABP5 estaban elevados, los niveles de estas FABP se reducían de forma significativa<sup>182</sup> tras la realización de cirugía bariátrica.

Bagheri y colaboradores proporcionaron evidencias a cerca de la relación aditiva entre FABP4 y FABP5 circulantes con el SMet, factores de riesgo cardiovasculares inflamatorios y la arteriosclerosis coronaria mediante calcio coronario en pacientes con diabetes tipo2. Estos hallazgos sugerían que FABP4 y FABP5 se presentaban como mediadores y biomarcadores en enfermedades metabólicas y cardiovasculares en pacientes con diabetes tipo 2<sup>221</sup>, sin embargo, los niveles de FABP4 pero no los de FABP5 se asociaron con la presencia de calcio en las arterias coronarias. Yeung y colaboradores demostraron que FABP5 es un nuevo biomarcador que se asocia a factores

de riesgo cardiometabólicos y arteriosclerosis carotídea. Para ello, estudiaron una población China de 479 pacientes, algunos provenían de otro estudio de prevalencia con factores de RCV, otros pacientes eran diabéticos tipo 2<sup>219</sup>. En dicho estudio, demostraron la relación entre los niveles de FABP5 circulante y el GIMc<sup>219</sup>, en el cual se observó que los niveles circulantes de FABP5 se asociaron positivamente con el GIMc y con parámetros de adiposidad, así como con los niveles de FABP4 y PCR. También concluyeron que la correlación entre FABP5 y SMet era independiente de FABP4. Posteriormente, de forma contradictoria, Hong y colaboradores estudiaron que tanto FABP4 y FABP5 circulantes se asociaban a SMet pero con diferentes perfiles de asociación con cada componente de SMet y que únicamente FABP4 circulante se asociaba a un riesgo incrementado de CAD y de severidad de arteriosclerosis coronaria<sup>222</sup>.

En otro estudio, Yeung y colaboradores observaron que los niveles de FABP4 y de FABP5 se correlacionaron significativamente con la creatinina sérica y con la tasa de filtrado glomerular (FG), además ambas FABP se asociaban con el grado de severidad de la nefropatía<sup>168</sup>. Existe otro estudio que indica que los inhibidores de FABP4 y FABP5 mejoran la dislipemia, pero no la resistencia insulínica en ratones con obesidad inducida por dieta<sup>154</sup>.

En el trabajo de Català y colaboradores mencionado anteriormente, se ha demostrado que aunque FABP4 circulante se asocia directamente con SAHS grave y no se modifica tras tratamiento con CPAP, por el contrario, FABP5 circulante no se asocia con la severidad de SAHS y aumenta tras tratamiento con CPAP<sup>187</sup>.

b) **Tumores:**

Existen diversos estudios que relacionan la FABP5 circulante con el cáncer de mama<sup>223, 224</sup>. En otro estudio se observó que diferentes AG polinsaturados en la dieta, pueden afectar el metabolismo de los lípidos en los tejidos de cáncer de mama mediante la alteración de la expresión de FABP5, CD-36,

sintasa de AG y receptor de estrógenos y que puede cambiar la respuesta al tratamiento e incluso el pronóstico del cáncer de mama<sup>225</sup>. También se correlaciona con la progresión tumoral del colangiocarcinoma intrahepático<sup>226</sup>.

## 2.5. Complementariedad de FABP4 y FABP5

La relación entre FABP4 y FABP5 es muy estrecha y estudios cromosómicos han determinado que ambas, FABP4 y FABP5 junto con FABP8 forman parte de un clúster genético<sup>90</sup>. Estas 2 proteínas tienen un 52% de sus aminoácidos en común, lo que permite que se unan a los AG con similar selectividad y afinidad<sup>227</sup>.

Se complementan a nivel de macrófagos y adipocitos porque se secretan por ambos. Ya hemos ido insistiendo durante el texto que en macrófagos que no expresan FABP4, FABP5 se sobreexpresa, lo que sugiere un mecanismo compensatorio y complementario, particularmente en aquellas situaciones con un componente activo inflamatorio<sup>153</sup>.

## 2.6. *Proprotein Convertase Subtilisin Kexin 9 (PCSK9)*

PCSK9 es una proteína circulante que se sintetiza y se secreta predominantemente por los hepatocitos. Esta proteína juega un papel clave en la regulación de la expresión del receptor LDL (LDLR), actuando así como uno de los principales reguladores de las concentraciones plasmáticas del C-LDL, una pieza clave en el desarrollo de la arteriosclerosis<sup>228, 229</sup>. PCSK9 se une al dominio extracelular del LDLR, promoviendo así su degradación en la vía lisosomal y permitiendo el aumento de niveles plasmáticos de C-LDL<sup>230, 231</sup>. Existen mutaciones del gen *PCSK9* que muestran una ganancia de función, lo que supone un aumento de actividad de PCSK9 y conlleva a una disminución del LDLR en la membrana plasmática, que a su vez permitirá un aumento de C-LDL en plasma, característica en la Hipercolesterolemia Familiar o aceleración de la enfermedad cardiovascular<sup>232-234</sup>. Sin embargo, las mutaciones de pérdida de función de *PCSK9*, producen los efectos opuestos, siendo asociado a reducción de GIMc, score cálcico coronario y riesgo de enfermedad coronaria global<sup>235, 236</sup>. La variante genética de baja frecuencia más importante que se asocia a niveles circulantes bajos de PCSK9 es R46L (rs11591147). El alelo menor de este polimorfismo, presenta una frecuencia pequeña del 1-2% en población Europea<sup>237</sup>, pero condiciona una baja prevalencia de enfermedad cardiovascular. En la actualidad el desarrollo de anticuerpos monoclonales anti PCSK9, que inducen descensos de LDL superiores al 60%, son una de las vías terapéuticas de mayor futuro para el manejo del riesgo cardiovascular. Recientemente, se están estudiando los efectos de PCSK9 sobre el metabolismo más allá del C-LDL. En particular, resulta muy controvertida la asociación de PCSK9 con la insulina y la homeostasis de la glucosa. Algunos estudios han mostrado una correlación positiva entre PCSK9 y los niveles de insulina y glucosa<sup>238, 239</sup>, mientras otros estudios sugieren que no existe dicha asociación<sup>240</sup>. Sin embargo, en pacientes con diabetes tipo 2 sí que describe una relación entre niveles plasmáticos de PCSK9 con C-no-HDL y apoB100<sup>240</sup>, lo que sugiere que PCSK9 juega un papel en la patogénesis de la dislipemia aterogénica. Verges y colaboradores, han publicado datos adicionales, observando que la diabetes perjudica el efecto de PCSK9 sobre la actividad del LDLR<sup>241</sup>.

Los mecanismos que regulan la expresión de PCSK9 se siguen investigando en la actualidad. Se ha demostrado que la insulina induce la expresión de PCSK9 en hepatocitos de ratones y ratas (*in vivo*) y hepatocitos humanos (*in vitro*)<sup>242-244</sup>. Se ha demostrado que SREBP2 regula la expresión de PCSK9, pero bajo ciertas condiciones, SREBP1c puede unirse a elementos de respuesta a esteroides en el promotor de *PCSK9*<sup>242, 245</sup>. La activación de SREBP1c se regula mediante AG e insulina, permitiendo el enlace del metabolismo de la glucosa y la insulina, con la regulación del PCSK9 y el colesterol. También se ha descrito, que el factor de transcripción HNF1A activa la transcripción de PCSK9, lo que proporciona nuevas evidencias acerca de su asociación con el metabolismo de la glucosa<sup>246, 247</sup>.

Guardiola y colaboradores han descrito que existe una asociación entre niveles plasmáticos de PCSK9 y la dislipemia aterogénica en una población de alto RCV<sup>248</sup>.



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FABP4 Y FABP5 CIRCULANTES EN LAS ENFERMEDADES METABÓLICAS

Daiana Ibarretxe Gerediaga

## 3. HIPÓTESIS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FABP4 Y FABP5 CIRCULANTES EN LAS ENFERMEDADES METABÓLICAS

Daiana Ibarretxe Gerediaga

### 3. HIPÓTESIS

La proteína transportadora de ácidos grasos FABP4 es vertida al torrente circulatorio desde el tejido adiposo. Sus concentraciones se han correlacionado con parámetros clínicos de alteraciones metabólicas como la obesidad, el síndrome metabólico, la dislipemia aterogénica o la diabetes tipo2, así como marcadores de imagen de arteriosclerosis subclínica y lesiones vasculares ateromatosas.

La FABP5 también sintetizada en el tejido adiposo y macrófagos parece jugar un papel complementario al de FABP4, aunque es menos conocido.

Por otra parte la FABP4 circulante parece jugar un papel patogénico en los tejidos periféricos, colaborando en el desarrollo de trastornos metabólicos y en concreto resistencia a la insulina en los mismos. Los mecanismos que regulan las concentraciones plasmáticas de estas proteínas están poco definidas y son probablemente el resultado de la interacción entre determinantes genéticos y factores ambientales.

Por todo ello la hipótesis de nuestro trabajo es que las variantes genéticas que modulan las concentraciones de FABP4 y FABP5 determinan en parte sus concentraciones plasmáticas. Las concentraciones de FABP5 de forma similar a la FABP4 se asocian a parámetros propios de las alteraciones metabólicas como la dislipemia aterogénica. Ambas proteínas podrían estar correlacionadas con PCSK9 dado su importante papel no solo en la regulación del metabolismo del colesterol sino también en la dislipemia aterogénica.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FABP4 Y FABP5 CIRCULANTES EN LAS ENFERMEDADES METABÓLICAS

Daiana Ibarretxe Gerediaga

## 4. OBJETIVOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FABP4 Y FABP5 CIRCULANTES EN LAS ENFERMEDADES METABÓLICAS

Daiana Ibarretxe Gerediaga

## **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar el papel de las concentraciones sanguíneas y las variantes genéticas de las chaperonas lipídicas FABP4 y FABP5 como biomarcadores circulantes de riesgo cardiometabólico en una población afectada de diabetes tipo 2, síndrome metabólico, dislipemia aterogénica y obesidad.

## **OBJETIVOS CONCRETOS**

1. Analizar el impacto de 6 SNPs de FABP4 (rs3834363, rs10808846, rs16909187, rs16909233, rs1054135, rs77878271) sobre las concentraciones plasmáticas de FABP4 en pacientes con alteraciones metabólicas.  
(Estudio 1)
2. Analizar el impacto de 6 SNPs de FABP4 (rs3834363, rs10808846, rs16909187, rs16909233, rs1054135, rs77878271) sobre los parámetros antropométricos y bioquímicos de las alteraciones metabólicas y la presencia de arteriosclerosis subclínica.  
(Estudio 1)
3. Analizar la asociación de los niveles circulantes de FABP5 y los SNPs (rs454550 y rs79370435) sobre la presencia de la dislipemia aterogénica evaluada mediante RMN y marcadores relacionados con alteraciones metabólicas e inflamación.  
(Estudio 2)
4. Analizar el efecto de las principales variantes genéticas de FABP5 sobre sus concentraciones y su relación con las alteraciones metabólicas asociadas.  
(Estudio 2)
5. Estudiar la asociación de PCSK9 con la dislipemia aterogénica y como consecuencia, con las concentraciones plasmáticas de FABP4 y FABP5.  
(Estudio 3)



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FABP4 Y FABP5 CIRCULANTES EN LAS ENFERMEDADES METABÓLICAS

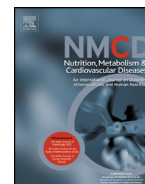
Daiana Ibarretxe Gerediaga

## 5. ESTUDIO 1

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FABP4 Y FABP5 CIRCULANTES EN LAS ENFERMEDADES METABÓLICAS

Daiana Ibarretxe Gerediaga



## FABP4 plasma concentrations are determined by acquired metabolic derangements rather than genetic determinants



D. Ibarretxe, J. Girona, N. Plana, A. Cabré, M. Heras, R. Ferré, J. Merino, J.C. Vallvé,  
L. Masana\*

Vascular Medicine and Metabolism Unit, Research Unit on Lipids and Atherosclerosis, "Sant Joan" University Hospital, Universitat Rovira i Virgili, IISPV, Spanish Biomedical Research Centre in Diabetes and Associated Metabolic Disorders (CIBERDEM), Reus, Spain

Received 27 January 2015; received in revised form 30 April 2015; accepted 18 May 2015  
Available online 11 June 2015

### KEYWORDS

FABP4;  
FABP4  
polymorphisms;  
Type 2 diabetes;  
Metabolic syndrome;  
Obesity

**Abstract** *Background and aims:* Circulating FABP4 is strongly associated with metabolic and cardiovascular risk (CVR) and has been proposed as a new risk biomarker. Several *FABP4* gene polymorphisms have been associated with protein expression *in vitro* and metabolic and vascular alterations *in vivo*. The aim of this study is to evaluate the impact of *FABP4* polymorphisms on FABP4 plasma levels and subclinical arteriosclerosis in patients with obesity, metabolic syndrome (MS) or type 2 diabetes (T2DM).

*Methods and results:* We studied 440 individuals with obesity, MS, T2DM or other cardiovascular risk conditions who attended the vascular medicine and metabolism unit of our hospital. Anamnesis, physical examination and anthropometry data were recorded. Standard biochemical parameters were determined. Plasma FABP4 concentrations were measured. Carotid intima-media thickness (cIMT) was assessed using ultrasonography. The following *FABP4* gene single-nucleotide polymorphisms (SNPs) were analyzed: rs3834363, rs16909233, rs1054135, rs77878271, rs10808846 and rs8192688. None of the studied gene allele variants were hyper-represented in patients grouped according the presence of metabolic alterations nor were they associated with the FABP4 concentration. The *FABP4* gene variants did not determine cIMT differences between the groups. In a multivariate analysis, gender and BMI, but not gene variants, significantly determined plasma FABP4 concentrations.

*Conclusions:* In clinical settings, the circulating FABP4 levels are determined by the acquired metabolic derangements and not genetic variation.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

### Introduction

Fatty acid binding proteins (FABP) are small proteins whose main function is intracellular fatty acid transport.

There are nine FABP isoforms that are expressed in different cells and tissues. FABP4, also known as adipose FABP, is primarily expressed by adipocytes and macrophages, although it is also expressed in small quantities in other cell types [1–3]. The main function of FABP4 is to escort long chain fatty acids across the adipocyte cytoplasm to subcellular compartments, including the nucleus, for metabolic processes [4]. Interestingly, FABP4 knock-out animal models are resistant to obesity and insulin resistance induced by high fat diets and are protected against arteriosclerosis; this is true even in apo E<sup>-/-</sup> background

\* Corresponding author. Vascular Medicine and Metabolism Unit, Research Unit on Lipids and Atherosclerosis, Sant Joan University Hospital Universitat Rovira i Virgili, Av. Josep Laporte, 1 43204-Reus, Spain. Tel.: +34977310300; fax: +34977753377.

E-mail address: [luis.masana@urv.cat](mailto:luis.masana@urv.cat) (L. Masana).

animals [5,6]. In the last decade, plasma concentrations of FABP4 have been linked to adiposity, type 2 diabetes mellitus (T2DM), metabolic syndrome (MS) and atherogenic dyslipidemia [7,8]. Accordingly, FABP4 is now considered one of the most promising emerging biomarkers of metabolic and cardiovascular risk [1]. Moreover, there are data suggesting that circulating FABP4 is more than just a biomarker and may play a pathogenic role [9]. Data from our group and others show that plasma FABP4 can influence peripheral tissue function in tissues such as myocardiocytes or endothelial cells by acting as a new adipokine [10,11].

However, the mechanisms that regulate FABP4 plasma concentration are unknown. A robust body of evidence shows a strong association between FABP4 and adiposity parameters, suggesting that increased body fat results in higher FABP4 plasma levels [12]. However, the impact of genetic variants on plasma FABP4 levels has only been partially addressed. Several *FABP4* gene variants have been linked to plasma FABP4 concentrations [13], while others have been associated with metabolic alterations, such as polycystic ovarian syndrome [14], obstructive sleep apnea [15] or insulin resistance in young populations [13]. There are also data that have demonstrated an association between *FABP4* polymorphisms and vascular risk [1,16,17]. However, there are no data concerning the impact of *FABP4* gene variants in patients with metabolic alterations that are linked to elevated FABP4 concentrations. Therefore, a study examining the effect of *FABP4* genetic polymorphisms in individuals with metabolic derangement is warranted.

In this study, we analyzed the impact of 6 different *FABP4* SNPs in a group of patients with metabolic alterations, including obesity, MS and T2DM.

## Methods

### Studied population

We studied 440 individuals who attended the vascular medicine and metabolism unit of our hospital due to metabolic alterations and/or other cardiovascular risk factors. A total of 369 patients had at least one of the following metabolic alterations: obesity ( $n = 217$ ); MS ( $n = 300$ ); and T2DM ( $n = 321$ ). Subjects with chronic lung, renal or liver disease, cancer or any other serious disease were excluded. Patients on lipid lowering drugs underwent a wash out period for at least 6 weeks (8 weeks if they were on fibrates). Anamnesis and physical examination data were recorded. cIMT was determined in all subjects using ultrasonography following standardized methods. The Hospital Ethical Committee approved the study and all patients provided their written consent to participate in the study.

### Blood sample collection and storage

A blood sample was obtained after overnight fasting. Plasma and serum aliquots were prepared and stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  in the BioBanc of our center until further use. The

cellular buffy coat was obtained and the cells were stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  until DNA analyses were performed.

### Standard biochemical analysis

Plasma and serum were obtained and frozen at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Glucose, HbA<sub>1c</sub>, total cholesterol, HDL-c, LDL-c, triglycerides, apo B100, Apo A1, hepatic and renal profiles were analyzed using standard enzymatic and colorimetric techniques adapted to a Cobas Mira autoanalyzer (Roche Diagnostics, Spain). FABP4 was also evaluated using a commercial ELISA kit (Biovendor, Czech Republic).

### SNP selection and genotyping

We genotyped 4 single nucleotide polymorphisms (SNP) (rs3834363, rs16909233, rs1054135, rs77878271) and 2 tag SNPs (rs10808846 and rs8192688) in the *FABP4* gene that were selected from the International HapMap database (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>). Four SNPs were selected due to their relatively high minor allele frequency (MAF), the existence of previous reports supporting their association with metabolic diseases, or functional evidence. The two tag SNPs were selected because, according to their linkage disequilibrium pattern, they cover all known variants of the *FABP4* gene.

Genomic DNA was extracted from peripheral leukocytes isolated from anticoagulated venous blood using the QIAamp DNA Blood Kit (Qiagen Iberia SL, Madrid, Spain) according to the manufacturer's instructions. All four SNPs were genotyped on the Sequenom MassARRAY platform using the iPLEX Gold protocol as specified by the manufacturer (Sequenom Inc., San Diego, CA) [18]. The genotypes for 5 of the samples were confirmed using duplicate SEQUENOMH runs and demonstrated 100% consistency. Genotyping was performed at the Spanish National Genotyping Center.

### Statistical analysis

The results are expressed as the mean  $\pm$  SD for normally distributed data, the median (interquartile range) for data that was not normally distributed and frequencies for categorical data. The differences between groups were assessed using the *t*-test, Mann–Whitney *U*-test or  $\chi^2$  tests. Correlations were performed using the Spearman's test. Multiple linear regression analysis was used to test the association of FABP4 concentrations with the *FABP4* SNPs, T2DM, MS, obesity, age and gender. All association analyses were adjusted for age, sex and BMI (when appropriate).

We used the GPower 3.1.9.2 software to calculate the sample size that allowed us to detect a 20% difference in FABP4 levels, with a 0.95 power and an alpha error of 0.05.

The Hardy–Weinberg equilibrium test was performed in the studied population using a  $\chi^2$  test. Statistical analyses were performed using SPSS software (IBM SPSS Statistics, version 20.0). A *P* value of  $<0.05$  was considered statistically significant in all analyses.

## Results

### Characteristics of participants

Table 1 shows the clinical characteristics of the study population by gender. FABP4 plasma concentrations were higher in women [18.60 (13.01–28.51) ng/ml vs 32.53(23.59–45.87) ng/ml,  $p < 0.001$ ]. A significant positive correlation was observed between FABP4 levels and BMI ( $r = 0.474$ ,  $p < 0.001$ , Supplementary Fig. 1). In addition, FABP4 concentrations increased with metabolic dysfunction; this parameter was higher in patients with T2DM, MS and obesity [26.30 (17.41–41.18) ng/ml; 27.13 (18.68–41.45) ng/ml; 32.03 (20.13–47.41) ng/ml, respectively] (Supplementary Fig. 2).

### Genotype and allele frequencies of FABP4 SNPs

In Table 2, we show the genotype and allele frequencies of the 6 different *fabp4* SNPs studied. All SNPs were in Hardy–Weinberg equilibrium ( $p > 0.05$ ).

The genotype distribution of all studied FABP4 SNPs was similar regardless of the presence of obesity, T2DM and MS (Table 3). In addition, no associations were found with haplotypes based on the two tag SNPs.

### Association of FABP4 SNPs with FABP4 concentrations and cIMT

The FABP4 concentrations were similar for all of the studied FABP4 SNP alleles (Table 4). The genetic variations in the FABP4 gene did not demonstrate a significant association with FABP4 serum levels in the analysis adjusted by age, gender and BMI (rs3834363:  $p = 0.267$ ,

rs16909233:  $p = 0.689$ , rs1054135:  $p = 0.844$ , rs77878271:  $p = 0.987$ , rs10808846:  $p = 0.267$  and rs8192688:  $p = 0.869$ ). Haplotypes based on the two tag SNPs were also not associated with FABP4 levels. FABP4 concentrations were not associated with cIMT values ( $r = 0.022$ ,  $p = 0.705$ ). The rs16909233 and rs8192688 rare variant carriers had lower cIMT values than the wild type carriers [0.699 (0.628–0.785) mm vs 0.659 (0.610–0.749) mm,  $p = 0.045$ ] (Table 4). However, after adjusting for age, gender and BMI, this association did not remain statistically significant. The other SNPs studied were not associated with cIMT values.

### Association of clinical and genetic data with FABP4 plasma concentration

Multiple linear regression analyses were performed to test the association between each FABP4 SNP and the FABP4 concentration (Fig. 1). As shown by the 95% CI of the b coefficient of the model, only gender (female) and BMI had a significant positive impact on FABP4 plasma concentrations. No statistically significant effects on FABP4 concentrations were observed for all of the studied FABP4 SNPs. When we used the MS components one by one in the multivariate linear regression analysis, waist circumference, instead of BMI and gender, explained the FABP4 plasma concentrations.

## Discussion

We examined the impact of FABP4 gene variants on both FABP4 protein plasma concentration and the association with obesity, MS, T2DM and cIMT. The main result of this study is that none of the examined gene variants were

**Table 1** Clinical and biochemical characteristics of the study population ( $n = 440$ ).

	All	Female	Male	P-value
N	440	228	212	
Age (years)	59 (50–66)	60 (52–66)	60 (50–66)	0.585
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	31.4 (26.9–34.8)	30.0 (26.7–36.8)	29.9 (26.9–33.7)	0.335
DM (%)	73.4	72.2	74.6	0.591
Obesity (%)	49.6	49.8	49.6	0.521
MS (%)	77.3	72.2	77.4	0.526
MS components (%)				
3	22.0	24.6	19.6	0.326
4	37.8	40.6	35.4	0.401
5	29.4	26.8	31.6	0.374
Smoker (%)	17.0	8.6	25.3	<0.001
Glucose (mg/dl)	129.5 (101.0–165.5)	121.6 (95.6–156.9)	136.0 (108.5–172)	0.006
TC (mM)	5.20 (4.51–6.19)	5.34 (4.63–6.32)	5.11 (4.45–6.02)	0.041
LDLc (mM)	3.23 (2.53–4.06)	3.41 (2.56–4.19)	3.07 (2.50–3.89)	0.015
HDLc (mM)	1.41 (1.21–1.61)	1.51 (1.33–1.71)	1.28 (1.13–1.49)	<0.001
TG (mM)	1.53 (0.98–2.43)	1.48 (0.98–2.10)	1.67 (0.99–3.15)	0.020
apoA1 (mg/dl)	138 ± 15	141 ± 14	135 ± 15	<0.001
apoB100 (mg/dl)	102 ± 28	104 ± 28	101 ± 29	0.200
FABP4 (ng/ml)	24.4 (16.3–37.8)	32.6 (23.6–45.9)	18.6 (13.0–28.5)	<0.001
cIMT (mm)	0.685 (0.620–0.776)	0.669 (0.614–0.752)	0.707 (0.628–0.811)	0.14

CVR, cardiovascular risk; BMI, Body Mass Index; DM, Type 2 Diabetes Mellitus; MS, Metabolic syndrome; TC, total cholesterol; LDLc, low density lipoprotein cholesterol; HDLc, high density lipoprotein cholesterol; TG, triglycerides; FABP4, Fatty acid binding protein 4; cIMT, carotid intima-media thickness. Values for mean ± SD, median (interquartile range) and frequencies are shown.

**Table 2** Genotype and allele frequencies of *FABP4* SNP variants in the study population.

SNPs	Genotype	Genotype frequency (%)	Minor allele frequency (%)
rs3834363	CA CA (225)	51.1	27.6
	DEL CA (187)	42.5	
	DEL DEL (28)	6.4	
rs16909233	GG (302)	68.6	16.8
	GA (128)	29.1	
	AA (10)	2.3	
rs1054135	GG (356)	80.9	9.8
	GA (82)	18.6	
	AA (2)	0.5	
rs77878271	AA (423)	96.1	1.9
	AG (17)	3.9	
	GG (0)	0	
rs10808846	GG (225)	51.1	27.6
	GT (187)	42.5	
	TT (28)	6.4	
rs8192688	CC (302)	68.6	16.8
	CT (128)	29.1	
	TT (10)	2.3	

The number of participants that were included is shown in parenthesis.

associated with the *FABP4* concentration, metabolic, or vascular alterations. Therefore, circulating *FABP4* concentrations are most likely determined by acquired conditions, such as fat mass and adipose tissue dysfunction, regardless of genetic background.

We selected four *FABP4* SNPs because they had been previously associated with increased *FABP4* levels or metabolic alterations. The rare rs3834363 allele has been linked to increased susceptibility to polycystic ovarian syndrome [14]. The rs16909233 allele was studied in obese children, and this rare allele was associated with increased insulin resistance and is considered a putative marker of prediabetes in young people [13]. We observed that this SNP was associated with decreased cIMT values in variant carriers, but the association was not statistically significant after adjusting for age and gender. The rs1054135 variant has been associated with higher levels of *FABP4* and metabolic conditions, such as obstructive sleep apnea and obesity in children [13,15,19]. Finally, the rare allele of rs77878271 has been considered to be protective against hypertriglyceridemia, diabetes and cardiovascular diseases

in different populations [20,21]. We also examined two tag SNPs, rs10808846 and rs8192688, which cover the 164 known genetic variants in the *FABP4* gene [22]. In this study of a metabolically altered population, the impact of these gene variants was not statistically significant. The lack of significance observed in this study may be due to the low prevalence of the rare variants. The genetic frequencies for homozygous genotypes ranged from 0 to 6%, increasing to between 4 and 42% for heterozygotes, where the metabolic effect may be diluted. Clinically, the final impact, whether due to low genetic impact or low prevalence, is that the examined genetic variants are not determinants of *FABP4* concentrations in an adult group of patients with obesity, MS, T2DM and other cardiovascular conditions [23]. We cannot establish the observed effect in a young, non-metabolically ill population [15]. Our data confirm the impact of adiposity and gender, likely linked to differential fat distribution, on *FABP4* concentrations. These associations have been previously described by our group and others [24,25]. Although diabetic patients had higher *FABP4* than non-diabetic patients, diabetes per se was not a net contributor to *FABP4* concentrations. This fact could be explained by the role of obesity in the association between *FABP4* and diabetes [26]. Although a direct relationship between diabetes and *FABP4* levels cannot be ruled out, the association is likely due to increased lipolysis [27]. Our data have clinical relevance because circulating *FABP4* is not only a bystander biomarker, but most likely is an effector molecule that conveys messages from dysfunctional adipose tissue to peripheral tissue. It has been observed that *in vitro*, *FABP4* alters myocardiocyte contractibility [11]. Our group has also shown an effect in endothelial and muscular cells [10,28] and that *FABP4* is associated with atherogenic dyslipidemias [7,24] and heart failure [29]. Therefore, *FABP4* has been considered to be a link between adiposity and vascular complications [1].

Our study has several limitations. First, although our sample contains a large group of metabolically ill adult patients, the sample size is limited. Our patients are suffering from various metabolic conditions, and these results cannot be extrapolated to other groups, such as non-obese or younger populations. This study was conducted in the Catalonia region of Spain; thus, replication studies in other populations are warranted to extrapolate these data to other groups.

**Table 3** Genotype frequencies of minor *FABP4* SNPs in the presence or absence (Y/N) of metabolic disturbances.

SNPs	Genotype variants	Obesity n = 217		Type 2 diabetes n = 321		Metabolic syndrome n = 300		Not obesity, DM, MS n = 71	
		Y/N	p	Y/N	p	Y/N	p	Y/N	p
rs3834363	DELCA + DEL DEL	49.8 vs 48.2	0.774	48.3 vs 50.4	0.746	47.7 vs 53.4	0.396	56.7 vs 47.6	0.213
rs16909233	GA + AA	34.1 vs 29.1	0.303	30.0 vs 35.0	0.352	31.3 vs 33.0	0.795	35.0 vs 30.8	0.550
rs1054135	GA + AA	18.4 vs 19.5	0.808	20.1 vs 16.2	0.411	18.7 vs 21.6	0.542	23.3 vs 18.4	0.378
rs77878271	AG + GG	2.8 vs 5.0	0.323	3.1 vs 6.0	0.170	3.0 vs 5.7	0.325	6.7 vs 3.4	0.269
rs10808846	GT + TT	49.8 vs 48.2	0.774	48.3 vs 50.4	0.746	47.7 vs 53.4	0.396	56.7 vs 47.6	0.213
rs8192688	CT + TT	34.1 vs 29.1	0.303	30.0 vs 35.0	0.352	31.3 vs 33.0	0.795	35.0 vs 30.8	0.550

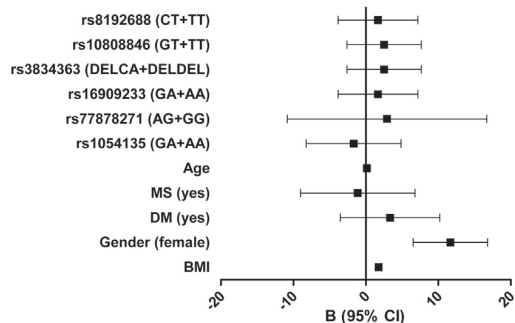
SNP, Single nucleotide polymorphism; p values were estimated using a  $\chi^2$  test.



**Table 4** FABP4 plasma levels, cIMT and FABP4 SNP variants.

SNPs	FABP4 (ng/ml)			cIMT (mm)		
	Wild carriers	Variant carriers	<i>p</i>	Wild carriers	Variant carriers	<i>p</i>
rs3834363	25.1 (16.8–36.9)	23.9 (15.6–38.7)	0.661	0.700 (0.620–0.779)	0.670 (0.621–0.768)	0.290
rs16909233	25.1 (17.3–38.5)	23.4 (14.6–35.5)	0.112	0.699 (0.628–0.785)	0.659 (0.610–0.749)	0.045
rs1054135	24.5 (16.0–36.9)	24.2 (18.3–39.2)	0.580	0.688 (0.620–0.771)	0.669 (0.621–0.809)	0.861
rs77878271	24.5 (16.6–37.2)	22.4 (9.2–45.6)	0.266	0.688 (0.614–0.779)	0.648 (0.637–0.740)	0.605
rs10808846	25.1 (16.8–36.9)	23.9 (15.6–38.7)	0.661	0.700 (0.620–0.779)	0.670 (0.621–0.768)	0.290
rs8192688	25.1 (17.3–38.5)	23.4 (14.6–35.5)	0.112	0.699 (0.628–0.785)	0.659 (0.610–0.749)	0.045

*p* Values were estimated using a Mann–Whitney *U*-test. FABP4 are expressed as the median (interquartile range).



**Figure 1** Multivariate linear regression analysis between FABP4 plasma concentrations (dependent variable) and FABP4 SNP variant carriers, age, MS, T2DM, gender and BMI. When we used the MS components one by one in the Multivariate linear regression analysis, waist circumference, instead of BMI and gender, explained the FABP4 plasma concentrations. FABP4, Fatty acid binding protein 4; BMI, Body Mass Index; MS, Metabolic syndrome; type 2 diabetes, T2DM. B (95% CI): coefficient B (95% confidence interval).

In conclusion, in an adult group of patients with obesity, MS or T2DM, the circulating levels of FABP4 are most likely determined by acquired conditions, such as adiposity, rather than genetic determinants. The gene variants did not have an impact on FABP4 plasma concentrations, metabolic alterations or preclinical atherosclerotic markers.

### Authors' contribution

DI, NP, RF, JM and LM designed the study. DI, NP, RF, JM and LM contributed to the data collection and conducted the study. DI, JG, AC and MH contributed to the data analysis. DI, JG, NP, AC, MH, RF, JM, JCV and LM contributed to the writing of the manuscript.

### Conflict of interest

None of the authors have a competing interest.

### Funding

This study was funded in part by CIBERDEM and FIS-PI11/02216.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.numecd.2015.05.008>.

### References

- [1] Kralisch S, Fasshauer M. Adipocyte fatty acid binding protein: a novel adipokine involved in the pathogenesis of metabolic and vascular disease? *Diabetologia* 2013;56:10–21.
- [2] Glatz JF, Borchers T, Spener F, van der Vusse GJ. Fatty acids in cell signalling: modulation by lipid binding proteins. *Prostagl Leukot Essent Fat Acids* 1995;52:121–7.
- [3] Lazaro I, Diaz M, Cabre A, Masana L, Ibanez 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. *Gynecol Endocrinol* 2011;27:935–9.
- [4] Bernlohr DA, Simpson MA, Hertzell AV, Banaszak LJ. Intracellular lipid-binding proteins and their genes. *Annu Rev Nutr* 1997;17:277–303.
- [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, 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.
- [7] 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.
- [8] Aragonés G, Ferrer R, Lazaro I, Cabre A, Plana N, Merino J, et al. Fatty acid-binding protein 4 is associated with endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2010;213:329–31.
- [9] Bagheri R, Qasim AN, Mehta NN, Terembula K, Kapoor S, Braunstein S, et al. Relation of plasma fatty acid binding proteins 4 and 5 with the metabolic syndrome, inflammation and coronary calcium in patients with type-2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 2010;106:1118–23.
- [10] Aragonés G, Saavedra P, Heras M, Cabre A, Girona J, Masana L. Fatty acid-binding protein 4 impairs the insulin-dependent nitric oxide pathway in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Diabetol* 2012;11:72.
- [11] 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.
- [12] Mankowska-Cyl A, Krintus M, Rajewski P, Sypniewska G. A-FABP and its association with atherogenic risk profile and insulin resistance in young overweight and obese women. *Biomark Med* 2013;7:723–30.
- [13] Khalyfa A, Bhushan B, Hegazi M, Kim J, Kheirandish-Gozal L, Bhattacharjee R, 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.



- [14] Wang J, Tang J, Wang B, Song J, Liu J, Wei Z, et al. FABP4: a novel candidate gene for polycystic ovary syndrome. *Endocrine* 2009; 36:392–6.
- [15] Bhushan B, Khalyfa A, Spruyt K, Kheirandish-Gozal L, Capdevila OS, Bhattacharjee R, et al. Fatty-acid binding protein 4 gene polymorphisms and plasma levels in children with obstructive sleep apnea. *Sleep Med* 2011;12:666–71.
- [16] Damcott CM, Moffett SP, Feingold E, Barmada MM, Marshall JA, Hamman RF, et al. 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;53:303–9.
- [17] Chan KH, Song Y, Hsu YH, You NC, Ft 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;18:1812–20.
- [18] Oeth P, del Mistro G, Marnellos G, Shi T, van den Boom D. Qualitative and quantitative genotyping using single base primer extension coupled with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MassARRAY). *Methods Mol Biol* 2009;578:307–43.
- [19] Mukamal KJ, Wilk JB, Biggs ML, Jensen MK, Ix JH, Kizer JR, et al. Common FABP4 genetic variants and plasma levels of fatty acid binding protein 4 in older adults. *Lipids* 2013;48:1169–75.
- [20] Tuncman G, Erbay E, Hom X, De Vivo I, Campos H, Rimm EB, 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.
- [21] Ordovas JM. Identification of a functional polymorphism at the adipose fatty acid binding protein gene (FABP4) and demonstration of its association with cardiovascular disease: a path to follow. *Nutr Rev* 2007;65:130–4.
- [22] Tonjes A, Kralisch S, Lossner U, Kovacs P, Bluher M, Stumvoll M, et al. Metabolic and genetic predictors of circulating adipocyte fatty acid-binding protein. *Int J Obes (Lond)* 2012;36:766–73.
- [23] Mansego ML, Martinez F, Martinez-Larrad MT, Zabena C, Rojo G, Morcillo S, et al. Common variants of the liver fatty acid binding protein gene influence the risk of type 2 diabetes and insulin resistance in Spanish population. *PLoS One* 2012;7:e31853.
- [24] Cabre A, Babio N, Lazaro I, Bullo M, Garcia-Arellano A, Masana L, et al. FABP4 predicts atherogenic dyslipidemia development. The PREDIMED study. *Atherosclerosis* 2012;222:229–34.
- [25] 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.
- [26] Djousse L, Gaziano JM. Plasma levels of FABP4, but not FABP3, are associated with increased risk of diabetes. *Lipids* 2012;47:757–62.
- [27] Mita T, Furuhashi M, Hiramitsu S, Ishii J, Hoshina K, Ishimura S, et al. FABP4 is secreted from adipocytes by adenylyl cyclase-PKA- and guanylyl cyclase-PKG-dependent lipolytic mechanisms. *Obesity (Silver Spring)* 2015;23:359–67.
- [28] Girona J, Rosales R, Plana N, Saavedra P, Masana L, Vallve JC. FABP4 induces vascular smooth muscle cell proliferation and migration through a MAPK-dependent pathway. *PLoS One* 2013;8:e81914.
- [29] Cabre A, Valdovinos P, Lazaro I, Bonet G, Bardaji A, Masana L. Parallel evolution of circulating FABP4 and NT-proBNP in heart failure patients. *Cardiovasc Diabetol* 2013;12:72.

## 6. ESTUDIO 2

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FABP4 Y FABP5 CIRCULANTES EN LAS ENFERMEDADES METABÓLICAS

Daiana Ibarretxe Gerediaga

**ACEPTADO EN:**

**Journal of Clinical Lipidology.**



**IMPACT OF EPIDERMAL FATTY ACID BINDING  
PROTEIN ON 2D-NMR-ASSESSED ATHEROGENIC  
DYSLIPIDEMIA AND RELATED DISORDERS**

Daiana Ibarretxe<sup>1,3</sup>, MD, Josefa Girona<sup>1,3</sup>, PhD, Núria Amigó<sup>2,3</sup>, MS, Núria Plana<sup>1,3</sup>, PhD,  
Raimón Ferré<sup>1,3</sup>, PhD, Sandra Guaita<sup>1,3</sup>, PhD, Roger Mallo<sup>2,3</sup>, PhD, Mercedes Heras<sup>1,3</sup>, BS, Luis  
Masana<sup>1,3</sup>, PhD\*

<sup>1</sup>Vascular Medicine and Metabolism Unit, Research Unit on Lipids and Atherosclerosis, “Sant Joan” University Hospital, Universitat Rovira i Virgili, IISPV, Reus, Spain.

<sup>2</sup> Biosfer Teslab, Reus and Department of Electronic Engineering, Universitat Rovira i Virgili, IISPV, Tarragona, Spain.

<sup>3</sup>Spanish Biomedical Research Centre in Diabetes and Associated Metabolic Disorders (CIBERDEM), Madrid, Spain.

**Corresponding author:**

Luis Masana, MD, PhD

Vascular Medicine and Metabolism Unit, Research Unit on Lipids and Atherosclerosis

Sant Joan University Hospital

Universitat Rovira i Virgili

C Sant Llorens, 21, 43201-Reus, Spain

Tel.: +34977759366; Fax: +34977759732

E-mail address: luis.masana@urv.cat

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** The role of circulating FABP5 on metabolic alterations is under active evaluation. On the other hand *FABP5* SNPs (rs454550 and rs79370435) seem to modulate its effect.

**OBJECTIVES:** Our aim was to examine the role of circulating FABP5 levels and its main SNPs in atherogenic dyslipidemia (AD) assessed by 2D-NMR and related metabolic and inflammation markers. We hypothesized that circulating FABP5 may be a biomarker for metabolic risk.

**METHODS:** We studied 459 subjects admitted to the metabolism unit because of lipid metabolism disturbances, and/or associated disorders. After a six-week lipid-lowering drug wash-out period, anamnesis and physical examination were performed. Carotid intima-media thickness (cIMT) was measured by ultrasound. FABP5, FABP4, lipids, metabolic proteins and enzymes were determined by biochemical methods. The lipid profile was assessed by NMR. The rs454550 and rs79370435 *FABP5* gene variants were also determined.

**RESULTS:** The FABP5 plasma levels were positively correlated with adiposity, glucose metabolism and lipolysis parameters and were associated with AD, as assessed by NMR. There was a significant positive correlation between hsCRP and FABP5. The presence of type 2 diabetes, obesity, metabolic syndrome or AD was associated with higher FABP5 plasma levels ( $p < 0.005$ ). The FABP5 concentrations, but not those of FABP4, were higher in patients with carotid plaques. FABP5 was a main determinant of plaque presence according to logistic regression analysis. The rare rs454550 allele was hyper-represented in non-obese subjects ( $p = 0.011$ ).

**CONCLUSIONS:** FABP5 is a biomarker of adiposity-associated metabolic derangements that include AD, thus underscoring the concomitant presence of inflammation. FABP5 is associated with increased subclinical atherosclerosis.

**Keywords** FABP5 · FABP4 · NMR · Atherogenic dyslipidaemia · Carotid plaque · hsCRP · type 2 diabetes

## Introduction

The Fatty Acid Binding Protein (FABP) family is a group of small proteins that act as intracellular fatty acid transporters. They act as lipid chaperones that deliver fatty acids to different subcellular departments, modulate intracellular lipid metabolism and regulate gene expression [1]. There are 9 different members, and they are named after the tissue in which they are mainly expressed, although there is no strict tissue specific expression pattern [2]. In this regard, the epidermal FABP (FABP5) is expressed not just in the skin [3] but also in liver, brain and mammary glands [4]. Importantly, it is also expressed in adipocytes and macrophages [5, 6], which suggests a coordinated effect with adipose FABP (FABP4). Moreover, they have a 52% amino acid similarity and bind with similar selectivity and affinity to fatty acids. FABPs are partially secreted into the circulation and plasma levels can be monitored. The FABP4 plasma concentrations are considered an emerging cardiometabolic risk factor. Its circulating levels are associated with obesity and an increased prevalence of metabolic syndrome (MetS) [7], type 2 diabetes, or atherogenic dyslipidaemia (AD) [8-10]. It has also been associated with other atherosclerotic diseases. FABP4 knock-out mice are resistant to high fat diet-induced obesity and diabetes development [11, 12]. Accordingly, FABP4 inhibitors are under study as protectors against metabolic derangement [13]. As mentioned above, FABP5 has a similar secretion pattern, as it is secreted by adipocytes and macrophages. In macrophages in which FABP4 has been blunted, FABP5 is overexpressed, which suggests compensatory and complementary mechanisms, particularly in those situations with an active inflammatory component [14]. Though the clinical information about FABP4 is overwhelming, data on the clinical implications of circulating FABP5 concentrations are scarce. In animal models, the FABP5 concentration is associated with obesity and metabolic disorders [15]. Certain studies suggest an association of FABP5 with metabolic risk both in type 2 diabetic patients and in the presence of subclinical atherosclerosis [16-19]. Its concentrations seem to be decreased by weight reduction [20]. It has also been associated with nephropathy [21]. The FABP4 and FABP5 circulating levels showed a different association profile with metabolic alterations in patients with obstructive sleep apnoea (OSA), which suggests a different clinical role [22]. Additionally, the impact of certain *FABP5* gene variations has been analyzed. The associations of rs454550 and rs79370435 variants with diabetes and other metabolic disorders have been evaluated [23], although no conclusive results have yet been made.

We studied the association of FABP5 circulating levels and its gene variants on the presence of atherogenic dyslipidemia assessed by 2D-NMR and related metabolic and inflammation markers. We hypothesized that circulating FABP5 may be a metabolic risk biomarker.

## Methods

### Study design and participants

For this cross-sectional study, we recruited 459 consecutive individuals who were studied between 2010 and 2012, to the vascular medicine and metabolism unit of our University Hospital due to lipid metabolism disturbances and associated disorders (type 2 diabetes, metabolic syndrome (MetS) and obesity) and who were willing to participate. The population was composed by 223 women and 236 men. As shown in table 1 (column 1), the population was characterized by a high prevalence of metabolic alterations (50% were obese, 72% had type 2 diabetes and 57% were hypertensive). Atherogenic dyslipidemia was defined as the presence of high triglycerides and low HDL-C in plasma. Subjects with chronic lung, renal or liver disease, cancer or any other serious disease were excluded. Patients on lipid-lowering drugs underwent a 6-week wash-out period (8 weeks if they were on fibrates). Anamnesis, anthropometry and physical examination data were recorded. The Hospital Ethical Committee approved the study, and all patients provided their written consent to participate in the study.

### Carotid intima-media thickness (cIMT) and arterial stiffness

Three hundred and twenty seven subjects underwent a vascular study with Mylab 50 X-Vision ultrasound (Esaote, Italy). A 7.5 MHz linear array and semiautomated software were used to measure cIMT in the far wall of both common carotid arteries. The cIMT mean was the average of 2 territories. Bifurcations and internal carotids were also measured using a manual method. Plaque was defined as a focal structure that either encroached into the arterial lumen by at least 0.5 mm or 50% of the surrounding cIMT value or demonstrated a thickness >1.5 mm, as measured from the media-adventitia interface to the intima-lumen interface, according to the Mannheim Carotid Intima-Media Thickness Consensus [24].

Arterial wall functional properties with respect to elasticity state were measured by ultrasonography using the MyLab X-60 (Esaote, Genova, Italy) with the QAS software System and a LA533 linear transducer (Quality Arterial Stiffness software) (n=121). Examination was performed according to standardized measurements [25]. Augmentation index (Aix) and pulse wave velocity (PWV) were measured directly in the right and left common carotid arteries and were adjusted for arterial pressure, age, and gender to determine the pulse wave velocity and for heart rate and gender to determine the augmentation index. An average for both sides was calculated for Aix and PWV.

### **Body fat distribution**

The body fat distribution was assessed via MyLab 50 X-Vision ultrasonography (Esaote, Italy). The subcutaneous (SAT) and preperitoneal fat (VAT) thicknesses were measured by placing a 7.5-MHz linear array perpendicular to the skin on the epigastrium, according to the ultrasound image review consensus [26]. The thickness of SAT is defined as the distance between the anterior surface of the linea alba and the fat-skin barrier. The VAT extends from the anterior surface of the liver (left lobe) to the posterior surface of the linea alba. Preaortic intraabdominal fat (PIF), as measured with 3.5-MHz convex array, was the distance between the anterior aortic wall and the posterior surface of the rectus abdominis muscle, as measured 1-5 cm above the umbilicus in the xipho-umbilical line.

### **Blood sample collection and storage**

A blood sample was obtained after overnight fasting. Plasma and serum aliquots were prepared and stored at -80°C in the BioBanc of our centre until further use. The cellular buffy coat was obtained, and the cells were stored at -80°C until DNA analyses were performed.

### **Standard biochemical analyses**

Biochemical parameters, lipids, apolipoproteins, NEFA and high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP) were measured using colorimetric, enzymatic and immunoturbidimetric assays (Spinreact, SA, Spain; Wako Chemicals GmbH, Germany; Polymedco, NY, US; CV<4%) that were adapted to a Cobas Mira Plus autoanalyzer (Roche Diagnostics, Spain). The lipid profile was analyzed according to Spintrol "H" CAL (Spinreact, SA, Spain) GC-MS reference methods. Spintrol "H" Normal (Spinreact, SA, Spain) was used as a quality control. Plasma glycerol was measured using a commercial kit (Zen-Bio, Inc., NC, US). FABP5, FABP4, insulin, HMW-adiponectin and retinol binding protein 4 (RBP4) levels were assessed using commercial ELISA kits (BioVendor Laboratory Medicine Inc., Brno, Czech Republic; R&D Systems, MN, US; RayBiotech, Inc, GA, US; and Mercodia AB, Uppsala, Sweden; CV<5%). Cholesteryl ester transfer protein (CETP) activity was measured using a fluorometric assay (BioVision, CA, US). Lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) activity was assessed using a fluorometric assay (Calbiochem, CA, US). Insulin resistance was estimated using homeostasis model assessment index (HOMA-IR) [27]. The glomerular filtration rate (GFR) was estimated using the formula from the Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) study [28].



## 2D NMR lipid profile evaluation

The Liposcale test was used in all samples [29]. A 500- $\mu$ l aliquot of plasma was shipped on dry ice to Biosfer Teslab (Reus, Spain) for lipoprotein analysis by nuclear magnetic resonance (NMR). The particle size, number of the main types of lipoprotein (VLDL, LDL and HDL) and the particle concentration of the nine subtypes were determined as previously reported. Briefly, the particle concentration and the diffusion coefficients were obtained from the measured amplitudes and attenuation of their spectroscopically distinct lipid methyl group NMR signals using the 2D diffusion-ordered  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy (DSTE) pulse. The methyl signal was surface-fitted with 9 Lorentzian functions associated with each lipoprotein subtype: large, medium and small for each of the main types of lipoprotein (VLDL, LDL and HDL). The area of each Lorentzian function was related to the lipid concentration of each lipoprotein subtype, and the size of each subtype was calculated from the diffusion coefficient. The particle numbers of each lipoprotein subtype were calculated by dividing the lipid volume by the particle volume of a given class. The lipid volumes were determined by using common conversion factors to convert concentration units into volume units. The variation coefficients for particle number were between 2% and 4%. The variation coefficients for particle size were lower than 0.3%.

## SNP Selection and Genotyping

We genotyped 2 single nucleotide polymorphisms (SNP) (rs454550 and rs79370435) of the *FABP5* gene that were selected from the International HapMap database (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>). Two SNPs were selected due to the existence of previous reports supporting their association with type 2 diabetic patients (Bu L 2011). Genomic DNA was extracted from peripheral leukocytes that had been isolated from anticoagulated venous blood using the QIAamp DNA Blood Kit (Qiagen Iberia SL, Madrid, Spain) according to the manufacturer's instructions. Two SNPs were genotyped on the Sequenom MassARRAY platform using the iPLEX Gold protocol as specified by the manufacturer (Sequenom Inc., San Diego, CA) [30]. The genotypes for 5 of the samples were confirmed using duplicate SEQUENOMH runs and showed 100% consistency. Genotyping was performed at the Spanish National Genotyping Center.

## Statistical analyses

The main outcome was the association between FABP5 and standard and 2D-NMR lipid parameters before and after adjustment by confounding metabolic factors. The results are expressed as the mean  $\pm$  SD for normally distributed data, the median (interquartile range, IQR) for data that was not normally distributed and frequencies for categorical data. The differences between groups were assessed using the t-test or ANOVA (for data that was normally distributed), Mann-Whitney U-test or Kruskal-Wallis test (for data that were not normally distributed) or  $\chi^2$  tests (for data that were collected as categorical variables). All association analyses were adjusted for age, gender and BMI (when appropriate). Correlations were performed using the Spearman's test. Kruskal-Wallis test was used to compare the serum hsCRP levels in groups according to the FABP4 and FABP5 levels. Binary logistic regression analysis was used to calculate the odds ratio (OR) of serum FABP5 and FABP4 for their association with the presence of carotid plaque. The Hardy-Weinberg equilibrium test was performed in the studied population using a  $\chi^2$  test. We used the GPower 3.1.9.2 software to calculate the sample size, which allowed us to detect a 20% difference in FABP5 levels, with a 0.95 power and an alpha error of 0.05. Statistical analyses were performed using the SPSS software (IBM SPSS Statistics, version 20.0). A *p* value of  $< 0.05$  was considered statistically significant in all analyses.

## Results

Table 1 summarizes the clinical, demographic and biochemical characteristics of the patients by increasing FABP5 tertiles. We found a statistically significant increase according to FABP5 tertiles in the prevalence of type 2 diabetes, obesity, MetS, AD, hypertension and smokers ( $p < 0.05$ ). As expected, the frequency of patients with none of the above risk factors was lower ( $p < 0.001$ ). Regarding lipid parameters, an atherogenic lipid profile (high LDL-C, triglycerides, Non-HDL-C and apo B100) was significantly increased by FABP5 tertiles ( $p < 0.05$ ). Those subjects in the medium and higher FABP5 tertiles had less more VLDL and fewer HDL particles ( $p = 0.002$  and  $p = 0.003$ , respectively) as well as LDLs of smaller size ( $p = 0.007$ ) as assessed by 2D-NMR (Table 1). Glycerol and NEFA concentrations were significantly increased across FABP5 tertiles ( $p < 0.05$ ). Also CETP activity was higher in the higher FABP5 tertile ( $p < 0.05$ ). The PCSK9 levels, despite showing a positive trend, did not statistically change among FABP5 tertiles. BMI and insulin resistance parameters were also increased (basal insulin, glucose, HOMA) ( $p < 0.05$ ). Interestingly, the levels of the inflammatory biomarker

## Estudio 2

hsCRP were increased according to FABP5 tertiles ( $p<0.001$ ). FABP4 levels were significant increased ( $p<0.05$ ), and the HMW-adiponectin levels were decreased ( $p<0.05$ ). No significant changes were observed for vascular and adiposity imaging values based on FABP5 tertiles. GFR-MDRD levels were significantly decreased by FABP5 tertiles ( $p<0.001$ ). The stratification by gender is shown in Supplementary Table 1S. Lipoprotein NMR showed a more atherogenic profile in men. Men also had higher cIMT and prevalence of carotid plaque ( $p=0.015$ ,  $p=0.035$ , respectively) compared with women.

Table 2 shows the correlations between FABP5 plasma concentrations and anthropometric, clinical, biochemical data and 2D-NMR lipoprotein profile. FABP5 was significant positively associated with VLDL particle number and negatively associated with HDL particle number and VLDL and LDL size ( $p<0.05$ ). FABP5 was significant positively associated with FABP4 and obesity, insulin resistance, AD, lipolysis and inflammation markers. The FABP5 levels correlated negatively with HMW-adiponectin and MDRD-GFR. After adjusting for BMI and gender, all correlations were insignificant, except for FABP4, which became stronger ( $r=0.309$ ,  $p<0.001$ ); other correlations included hsCRP ( $r=0.138$ ,  $p=0.004$ ), NEFA ( $r=0.180$ ,  $p<0.001$ ), HDL-C ( $r=-0.111$ ,  $p=0.019$ ), total HDL particles ( $r=-0.156$ ,  $p=0.001$ ) and VLDL size ( $r=-0.107$ ,  $p=0.024$ ). MDRD-GFR association remained significant after adjusting for BMI ( $r=-0.279$ ,  $p<0.001$ ).

The presence of at least one major metabolic alteration (obesity, MetS, type 2 diabetes or AD) was correlated with a significantly higher FABP5 plasma level (7.56 (5.7-10.3) vs 8.6 (6.7-10.7) in obesity,  $p=0.003$ ; 7.04 (5.6-9.3) vs 8.6 (6.7-11.0) in type 2 diabetes,  $p<0.001$ ; 6.4 (4.8-8.9) vs 8.4 (6.7-11.0) in MetS,  $p<0.001$ ; 7.8 (6.1-10.6) vs 8.6 (6.9-11.0) in AD,  $p=0.005$ ) (Fig. 1). The differences remained significant for type 2 diabetes, MetS, and AD groups, after adjusting for age, gender and BMI ( $p=0.002$  in type 2 diabetes;  $p=0.003$  in MetS;  $p=0.005$  in AD).

The FABP5 plasma levels were higher in smokers (9.0 (6.9-11.8) vs 7.9 (6.2-10.6),  $p=0.009$ ) whereas the FABP4 levels did not change (25.1 (15.1-41.6) vs 25.0 (16.6-38.1),  $p=0.959$ ). These differences remained after adjusting for gender, age and BMI ( $p=0.004$ ).

The FABP5 plasma levels were significantly higher in those patients with carotid plaques (7.6 (6.1-9.5) vs 8.24 (6.5-10.2),  $p=0.021$ ), whereas the FABP4 concentrations were not different (25.8 (16.6-36.1) vs 22.9 (15.9-35.5),  $p=0.324$ ) (Fig. 2). These differences remained after adjusting for age, gender, smoking and hsCRP ( $p=0.035$ ).

Table 3 shows the logistic regression analyses among serum FABP5, FABP4 levels and carotid plaque. In the crude model analysis, FABP5 was associated with carotid plaque, and FABP4 was not. The association between FABP5 and plaque remain in models that include age, gender, BMI and hsCRP (model 2 and 3). When Non-HDL-C and smoking were added to the model (model 4), the significant association between FABP5 and carotid plaque was lost.

Although high FABP4 concentrations are associated with higher hsCRP, the concomitant elevation of FABP5 was associated with higher hsCRP levels ( $p < 0.001$ ) (Fig. 3). Statistical significance was maintained after adjusting for age, gender and BMI ( $p = 0.017$ ).

Table 4 shows the association of rs454550 and rs79370435 *FABP5* gene variants with type 2 diabetes, obesity, MetS and AD. Interestingly the rare allele of rs454550 was significantly overrepresented in the non-obese group (8.3 vs 16.4,  $p = 0.011$ ). No differences were found between the FABP5 plasma levels and *FABP5* SNPs. None of the gene variants correlated to the FABP5 levels in any of the metabolic situations.

## Discussion

This study provides a comprehensive evaluation of FABP5 plasma concentrations and its main gene variants, with a special focus on its association with lipid metabolism. Our main conclusions are that FABP5 is increased in all clinical situations that are characterized by adiposity-associated metabolic derangements. In our work, FABP5 has been associated with BMI and with insulin resistance parameters such as insulin levels and negatively associated with adiponectin. We studied the lipoprotein profile by 2D-NMR (a method developed by our unit [29]), which shows that FABP5 is linked to AD, as characterized by increased number of VLDL particles, fewer HDL particles and smaller LDL particles. Accordingly, FABP5 is associated with lipolysis parameters, such as the glycerol and NEFA concentrations, and conversely, CETP activity was higher in the higher FABP5 tertile, which could be a mechanism to explain the HDL disturbances. Although LDL cholesterol was increased in the middle and high FABP5 tertiles, no correlations with total circulating PCSK9 values were observed. Despite these concordances, a direct role of FABP5 on lipolysis control in adipocytes has not been established. The association between FABP5 and AD vanished when the calculations were adjusted for BMI, thus reinforcing its pivotal role in this metabolic alteration. Although the data surrounding FABP5 circulating levels are scarce, our results are in agreement with previous results suggesting an association between FABP5 levels and metabolic alterations [16-19]. We had previously found a weak correlation between FABP5 and adiposity in OSA patients [22]. However, that observation was focused on OSA patients, and the sample size was too small to obtain conclusions. Interestingly, after BMI and gender adjustments, the only significant correlations of FABP5 concentrations were with FABP4, which can be explained by their close metabolic functions, lipolysis parameters and hsCRP. Obesity is characterized by fat accumulation in adipocytes, and once this fat depot exceeds a physiological amount, the adipose tissue is infiltrated by macrophages, which leads to a subclinical chronic inflammatory state.

## Estudio 2

---

This inflammatory state has been implicated in metabolic side effects of obesity such as diabetes, MetS or dyslipidaemia, as well as vascular lesions. In other words, the clinical impact of inflamed adipose tissue is even greater. Our data indicate that although both FABP4 and FABP5 are adiposity-associated metabolic derangement markers, the increase in FABP5 plasma levels could indicate a worse inflammatory status. Moreover, our results suggest an interesting role for FABP5 and highlight the presence of subclinical arteriosclerosis. Patients with carotid plaques had higher FABP5. Furthermore, FABP5 was correlated with the presence of non-obstructive carotid plaques after multiple adjustments, whereas FABP4 was not. The correlation was lost after adjusting for smoking and lipids, which suggests a cooperative mechanism between these risk factors and FABP5. These data confirm the observations of Yeung et al [16], who showed a correlation between FABP5 and cIMT in MetS patients. The reason why FABP5 but not FABP4 was associated with carotid plaque presence could be explained by a greater correlation of FABP5 with inflammatory activity compared with FABP4. Although a high FABP4 should suggest to the clinician an increased risk of metabolic alterations associated to adiposity, the concomitant increase in FABP5 indicates an acceleration of the process and possible complications beyond metabolism, due to a higher overall inflammatory state and harmful lipid profile.

In this study we have also explored the impact of *FABP5* genetic variants on its plasma concentrations in different metabolic alterations. We examined two polymorphisms (rs454550 and rs79370435) and observed that rs454550 was overrepresented in non-obese subjects. This suggests that if this observation could be replicated in other and larger populations, there could be a protective effect against obesity of this rare allele. The only available data in the literature on this issue are found the work by Bu et al [23], who showed that this *FABP5* SNP was associated with an increased risk of diabetes, which is in contrast to our finding. The mechanisms behind these observations are not clear because the impact of this gene variant on FABP5 expression is not known. Moreover, in our study, the examined variants were not associated with differences in the FABP5 plasma concentrations.

Our study has several limitations. The cross-sectional design precludes extrapolating any causality association. The sample size is relatively small particularly for genetic studies but the significant results are reinforced. We studied a metabolically altered population, so the extrapolation of these data to other groups must be done with caution; however, we did study a clinically informative population. Regarding the genetic component of the study, our results can be applied to our population, and replication studies are warranted to extrapolate the data. Our results suggest a correlation between FABP5 and metabolic risk, but the cross-sectional design of our study currently limits its clinical use as a biomarker.

### **Conclusion**

The circulating FABP5 levels are strongly associated with AD components and related metabolism alterations that in turn are associated with adiposity. Its high levels also suggest an inflammatory component and the presence of incipient vascular complications. The FABP5 plasma concentrations are not grossly influenced by its gene variants, although one of them could confer resistance to obesity.

**Funding** This study was funded in part by CIBERDEM and FIS-PII1/02216 and FEDER funds.

**Duality of interest** The authors declare that there is no duality of interest associated with this manuscript.

**Contribution statement** DI, NP, RF and LM designed the study. DI, NP, RF and LM contributed to the data collection and conducting the study. DI, JG, SG and MH contributed to the data analysis. NA and RM contributed to NMR analysis. DI, JG, NP, RF and LM contributed to the writing of the manuscript.

## References

1. Boord JB, Fazio S, Linton MF (2002) Cytoplasmic fatty acid-binding proteins: emerging roles in metabolism and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 13:141-147
2. Furuhashi M, Ishimura S, Ota H, Miura T (2011) Lipid chaperones and metabolic inflammation. *Int J Inflam* 2011:642612
3. Siegenthaler G, Hotz R, Chatellard-Gruaz D, Didierjean L, Hellman U, Saurat JH (1994) Purification and characterization of the human epidermal fatty acid-binding protein: localization during epidermal cell differentiation in vivo and in vitro. *Biochem J* 302 ( Pt 2):363-371
4. Krieg P, Feil S, Furstenberger G, Bowden GT (1993) Tumor-specific overexpression of a novel keratinocyte lipid-binding protein. Identification and characterization of a cloned sequence activated during multistage carcinogenesis in mouse skin. *J Biol Chem* 268:17362-17369
5. Makowski L, Hotamisligil GS (2005) The role of fatty acid binding proteins in metabolic syndrome and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 16:543-548
6. Furuhashi M, Hotamisligil GS (2008) Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 7:489-503
7. Xu A, Wang Y, Xu JY et al (2006) Adipocyte fatty acid-binding protein is a plasma biomarker closely associated with obesity and metabolic syndrome. *Clin Chem* 52:405-413
8. Cabre A, Lazaro I, Girona J et al (2008) Plasma fatty acid binding protein 4 is associated with atherogenic dyslipidemia in diabetes. *J Lipid Res* 49:1746-1751
9. Cabre A, Babio N, Lazaro I et al (2012) FABP4 predicts atherogenic dyslipidemia development. The PREDIMED study. *Atherosclerosis* 222:229-234
10. Cabre A, Lazaro I, Girona J et al (2007) Fatty acid binding protein 4 is increased in metabolic syndrome and with thiazolidinedione treatment in diabetic patients. *Atherosclerosis* 195:e150-158
11. Hotamisligil GS, Johnson RS, Distel RJ, Ellis R, Papaioannou VE, Spiegelman BM (1996) Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein. *Science* 274:1377-1379
12. Uysal KT, Scheja L, Wiesbrock SM, Bonner-Weir S, Hotamisligil GS (2000) Improved glucose and lipid metabolism in genetically obese mice lacking aP2. *Endocrinology* 141:3388-3396
13. Lan H, Cheng CC, Kowalski TJ et al (2011) Small-molecule inhibitors of FABP4/5 ameliorate dyslipidemia but not insulin resistance in mice with diet-induced obesity. *J Lipid Res* 52:646-656
14. Furuhashi M, Tuncman G, Gorgun CZ et al (2007) Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2. *Nature* 447:959-965

15. Maeda K, Uysal KT, Makowski L et al (2003) Role of the fatty acid binding protein mall1 in obesity and insulin resistance. *Diabetes* 52:300-307
16. Yeung DC, Wang Y, Xu A et al (2008) Epidermal fatty-acid-binding protein: a new circulating biomarker associated with cardio-metabolic risk factors and carotid atherosclerosis. *Eur Heart J* 29:2156-2163
17. Hong J, Gu W, Zhang Y et al (2011) Different association of circulating levels of adipocyte and epidermal fatty acid-binding proteins with metabolic syndrome and coronary atherosclerosis in Chinese adults. *Atherosclerosis* 217:194-200
18. Bagheri R, Qasim AN, Mehta NN et al (2010) Relation of plasma fatty acid binding proteins 4 and 5 with the metabolic syndrome, inflammation and coronary calcium in patients with type-2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 106:1118-1123
19. Ishimura S, Furuhashi M, Watanabe Y et al (2013) Circulating levels of fatty acid-binding protein family and metabolic phenotype in the general population. *PLoS One* 8:e81318
20. Haider DG, Schindler K, Bohdjalian A et al (2007) Plasma adipocyte and epidermal fatty acid binding protein is reduced after weight loss in obesity. *Diabetes Obes Metab* 9:761-763
21. Yeung DC, Xu A, Tso AW et al (2009) 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* 32:132-134
22. Catala R, Cabre A, Hernandez-Flix S et al (2013) Circulating FABP4 and FABP5 levels are differently linked to OSA severity and treatment. *Sleep* 36:1831-1837
23. Bu L, Salto LM, De Leon KJ, De Leon M (2011) Polymorphisms in fatty acid binding protein 5 show association with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 92:82-91
24. Touboul PJ, Hennerici MG, Meairs S et al (2012) Mannheim carotid intima-media thickness and plaque consensus (2004-2006-2011). An update on behalf of the advisory board of the 3rd, 4th and 5th watching the risk symposia, at the 13th, 15th and 20th European Stroke Conferences, Mannheim, Germany, 2004, Brussels, Belgium, 2006, and Hamburg, Germany, 2011. *Cerebrovasc Dis* 34:290-296
25. Adji A, O'Rourke MF, Namasivayam M (2011) Arterial stiffness, its assessment, prognostic value, and implications for treatment. *Am J Hypertens* 24:5-17
26. Vlachos IS, Hatzioannou A, Perelas A, Perrea DN (2007) Sonographic assessment of regional adiposity. *AJR Am J Roentgenol* 189:1545-1553
27. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC (1985) Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28:412-419



*Estudio 2*

---

28. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D (1999) 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* 130:461-470
29. Mallol R, Amigo N, Rodriguez MA et al (2015) Liposcale: a novel advanced lipoprotein test based on 2D diffusion-ordered <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *J Lipid Res* 56:737-746
30. Oeth P, del Mistro G, Marnellos G, Shi T, van den Boom D (2009) Qualitative and quantitative genotyping using single base primer extension coupled with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MassARRAY). *Methods Mol Biol* 578:307-343

**TABLES**

**Table 1.** Characteristics of the study group sorted by FABP5 (ng/ml) concentration tertiles.

Clinical data	Overall	Lowest Tertile	Middle Tertile	Highest Tertile	p value
	(n=459)	T1 (n=153)	T2 (n=153)	T3 (n=153)	
	8.1 (6.3-10.7)	5.7 (4.8-6.3)	8.1 (7.5-8.9)	11.8 (10.7-14.2)	
Age (years)	60 (50-66)	59 (50-65)	60 (52-66)	61 (50-67)	0.416
Type 2 diabetes (%)	71.9	60.1	75.2	80.4	<0.001
Obesity (%)	50.5	41.4	52.6	57.6	0.016
MetS (%)	78.5	64.3	82.6	89.4	<0.001
AD (%)	31.8	24.2	35.9	35.3	0.046
Hypertension (%)	57.6	45.6	56.4	71.5	<0.001
None of the above (%)	13.3	26.8	8.5	4.6	<0.001
Smoke (yes, %)	17.7	13.1	15.3	24.7	0.020
SBP (mmHg)	135 (125-149)	132 (120-148)	138 (125-150)	134 (125-148)	0.199
DBP (mmHg)	80 (72-86)	80 (72-85)	80 (75-85)	80 (70-88)	0.786
Waist perimeter (cm)	102 (94-112)	99 (88-105)	104 (97-114)	106 (98-116)	<0.001
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	30.0 (26.9-35.0)	28.8 (26.0-32.6)	30.0 (27.1-35.3)	30.9 (27.5-36.8)	0.001
<b>Biochemical data</b>					
Total Cholesterol (mmol/l)	5.2 (4.5-6.2)	5.0 (4.4-5.9)	5.4 (4.6-6.6)	5.2 (4.6-6.3)	0.021
LDL-C (mmol/l)	3.3 (2.5-4.1)	3.0 (2.4-3.8)	3.5 (2.6-4.3)	3.3 (2.7-4.2)	0.004
HDL-C (mmol/l)	1.4 (1.2-1.6)	1.4 (1.2-1.7)	1.4 (1.2-1.6)	1.4 (1.2-1.6)	0.269
Triglycerides (mmol/l)	1.5 (1.0-2.4)	1.3 (0.8-2.2)	1.6 (1.1-2.7)	1.7 (1.2-2.6)	0.001
Non-HDL-C (mmol/l)	3.8 (3.2-4.7)	3.5 (2.9-4.4)	4.0 (3.3-4.9)	3.8 (3.2-4.9)	0.002

*Estudio 2*

Apo A1 (mg/dl)	137 (129-148)	136 (128-147)	138 (130-148)	138 (129-149)	0.652
Apo B100 (mg/dl)	101 (84.0-120)	96 (78-111)	105 (87-127)	101 (85-122)	0.007
Glucose (mg/dl)	129 (101-165)	121 (92-162)	136 (113-176)	125 (103-158)	0.008
Basal insulin (mU/l)	10.2 (6.5-16.8)	7.6 (5.2-12.5)	10.8 (6.7-20.1)	12.2 (8.6-24.0)	<0.001
HbA <sub>1c</sub> (%)	6.4 (5.7-7.6)	6.3 (5.8-7.5)	6.5 (5.7-7.7)	6.3 (5.7-7.5)	0.798
HOMA-IR	2.8 (1.5-6.2)	1.8 (1.0-3.3)	3.0 (1.5-6.4)	4.1 (2.3-6.8)	<0.001
hsCRP (mg/l)	2.1 (1.1-3.6)	1.6 (0.9-3.1)	2.1 (1.2-3.4)	2.9 (1.3-5.0)	<0.001
MDRD-GFR (ml/min/1.73)	87.7 (75.6-103)	92.5 (80.7-104.5)	91.0 (78.5-109.8)	81.3 (68.5-96.2)	<0.001
FABP4 (ng/ml)	25.0 (16.6-38.4)	21.4 (15.0-29.8)	25.3 (16.4-36.0)	32.5 (19.2-51.4)	<0.001
NEFA (μmol/l)	571 (402-726)	502 (335-680)	569 (408-697)	629 (468-806)	<0.001
RBP4 (μg/ml)	53.7 (42.4-66.9)	57.1 (44.3-67.5)	50.4 (40.3-65.1)	54.3 (43.6-65.7)	0.075
CETPactivity (pmol/h/μl)	11.6 (10.2-13.4)	11.1 (10.1-12.9)	12.0 (10.4-14.2)	11.6 (10.3-13.3)	0.021
LCATactivity (470nm/390nm)	2.1 (2.1-2.2)	2.1 (2.1-2.2)	2.1 (2.0-2.2)	2.2 (2.1-2.2)	0.093
Glicerol (μM)	56.9 (30.6-96.4)	47.5 (26.9-87.0)	56.9 (32.5-90.7)	64.4 (38.1-117)	0.021
HMW-Adiponectin (μg/ml)	5.4 (2.9-8.9)	6.0 (3.1-10.7)	5.5 (3.2-8.1)	4.7 (2.6-7.8)	0.038
PCSK9 (ng/ml)	321 (254-404)	304 (247-378)	338 (265-423)	316 (258-420)	0.086
<b>Vascular and adiposity Imaging values</b>					
cIMT (mm)*	0.68 (0.62-0.77)	0.69 (0.63-0.76)	0.68 (0.61-0.78)	0.68 (0.61-0.79)	0.989
Carotid Plaque (yes, %)*	33.6	27.3	33.6	39.1	0.209
PWV (m/s)**	8.8 (7.3-10.4)	8.9 (7.3-10.4)	9.2 (7.7-10.5)	8.2 (7.1-10.3)	0.621
AIx**	5.2±5.0	5.4±5.5	5.5±5.1	4.9±7.7	0.895
VAT (mm)*	13.1 (10.3-16.6)	13.3 (10.5-17.1)	13.1 (10.5-17.6)	13.1 (9.5-16.0)	0.726
SAT (mm)*	11.7 (7.9-15.5)	11.4 (7.7-15.2)	10.6 (8.5-16.2)	12.2 (7.5-15.3)	0.870
PIF (mm)*	66.1±23.0	64.7±23.2	66.7±22.0	66.6±24.2	0.870

**Lp subclasses particles**

Total VLDL (nmol/l)	49.8 (29.0-97.8)	38.1 (22.3-85.6)	57.9 (29.6-114.7)	56.3 (35.4-105.5)	0.002
Large VLDL (nmol/l)	1.8 (1.0-2.9)	1.4 (0.8-2.6)	2.1 (1.1-3.1)	2.0 (1.2-2.9)	0.006
Medium VLDL (nmol/l)	7.9 (4.6-13.6)	6.7 (3.5-12.5)	9.0 (4.6-14.8)	8.3 (5.6-14.8)	0.006
Small VLDL (nmol/l)	40.3 (22.9-82.2)	30.3 (18.0-69.4)	47.5 (23.9-96.1)	46.4 (28.2-88.2)	0.001
Total LDL (nmol/l)	897 (682-1184)	846 (657-1093)	935 (693-1240)	924 (687-1210)	0.156
Large LDL (nmol/l)	113 (87-149)	111 (86-140)	118 (89-159)	113 (87-145)	0.709
Medium LDL (nmol/l)	322 (236-418)	305 (222-388)	341 (235-447)	333 (245-417)	0.202
Small LDL (nmol/l)	465 (339-620)	424 (319-570)	475 (441-652)	476 (351-628)	0.069
Total HDL (μmol/l)	25.1 (21.5-29.4)	26.6 (21.9-30.6)	25.3 (22.0-29.3)	23.9 (20.7-27.6)	0.003
Large HDL (μmol/l)	0.15 (0.11-0.19)	0.15 (0.11-0.20)	0.16 (0.11-0.19)	0.15 (0.11-0.19)	0.793
Medium HDL (μmol/l)	6.94 (5.08-9.21)	7.20 (5.60-9.75)	6.77 (5.03-8.79)	6.45 (4.56-8.91)	0.017
Small HDL (μmol/l)	18.0 (15.5-20.9)	18.4 (15.7-21.5)	18.0 (16.0-20.9)	17.3 (14.8-20.0)	0.017

**Lp diameter size (nm)**

VLDL	42.6±0.6	42.7 ±0.6	42.6 ±0.5	42.5 ±0.6	0.006
LDL	21.0 (20.9-21.1)	21.1 (20.9-21.2)	21.0 (20.9-21.1)	21.0 (20.9-21.2)	0.007
HDL	8.20 (8.12-8.24)	8.21 (8.15-8.24)	8.17 (8.11-8.24)	8.20 (8.12-8.24)	0.189

Data are expressed as median (IQR) for non-normally distributed data, the mean ± SD for normally distributed data, or percentages for categorical variables. The statistical tests used were ANOVA (for data that was normally distributed), Kruskal-Wallis test (for data that were not normally distributed) or  $\chi^2$  tests (for data gathered as categorical variables). MetS, Metabolic syndrome; AD, Atherogenic dyslipidaemia; SBP, Systolic blood pressure; DBP, Diastolic blood pressure; BMI, Body mass index; HbA<sub>1c</sub>, Glycosylated haemoglobin; LDL-C, Low density lipoprotein; HDL-C, High density lipoprotein; hsCRP, High-sensitivity C-reactive protein; cIMT, Carotid intima-media thickness; PWV, Pulse wave velocity; Aix, Augmentation index; VAT, Visceral fat; SAT, Subcutaneous fat; PIF, Preaortic intraabdominal fat; Lp, lipoprotein particle.

Estudio 2

\* cIMT, carotid plaque, VAT, SAT and PIF. Total ( $n=327$ ), T1 ( $n=108$ ), T2 ( $n=109$ ) and T3 ( $n=110$ ).

\*\* PWV and Aix. Total ( $n=121$ ), T1 ( $n=41$ ), T2 ( $n=40$ ) and T3 ( $n=40$ ).

**Table 2.** Spearman's correlation of metabolic, lipid, inflammatory and metabolomic variables with plasma levels of FABP5 in all populations.

FABP5	<i>r</i>	<i>p</i>
Age	0.074	0.116
SBP	0.082	0.120
DBP	0.028	0.595
Waist perimeter	0.252	<0.001
BMI	0.171	<0.001
Total cholesterol	0.071	0.128
LDL-C	0.120	0.010
HDL-C	-0.100	0.032
Non-HDL-C	0.107	0.022
Triglycerides	0.161	0.001
APOA1	0.032	0.500
APOB100	0.112	0.016
Glucose	0.073	0.116
Basal insulin	0.370	<0.001
HbA <sub>1c</sub>	0.011	0.831
HOMA-IR	0.366	<0.001
hsCRP	0.210	<0.001
MDRD-GFR	-0.262	<0.001
FABP4	0.242	<0.001
NEFA	0.217	<0.001
RBP4	-0.020	0.673

---

CETP activity	0.075	0.112
LCAT activity	0.014	0.768
Glicerol	0.136	0.004
HMW-Adiponectin	-0.119	0.011
PCSK9	0.059	0.210
cIMT*	0.013	0.812
Total VLDL particles	0.143	0.002
Total LDL particles	0.068	0.148
Total HDL particles	-0.159	0.001
VLDL size	-0.141	0.003
LDL size	-0.132	0.005
HDL size	-0.068	0.144

---

After adjustment for BMI and gender, only hsCRP ( $r=0.138$ ,  $p=0.004$ ), FABP4 ( $r=0.309$ ,  $p<0.001$ ), NEFA ( $r=0.184$ ,  $p<0.001$ ), HDL-C ( $r=-0.111$ ,  $p=0.019$ ), total HDL particles ( $r=-0.156$ ,  $p=0.001$ ) and VLDL size ( $r=-0.107$ ,  $p=0.024$ ) maintained statistical association.

MDRD-GFR remain significant after adjusting for BMI ( $r=-0.279$ ,  $p<0.001$ ).

\* cIMT. Total ( $n=327$ ).

**Table 3.** Binary logistic regression analysis of the association between serum FABP5 and FABP4 concentrations and presence of carotid plaque.

Adjusted for	FABP5 (ng/ml)		FABP4 (ng/ml)	
	OR (95%CI)	p value	OR (95%CI)	p value
Model 1: crude: no adjustment	1.073 (1.006-1.144)	0.011	0.994 (0.983-1.005)	0.309
Model 2: adjusting for age and gender	1.094 (1.021-1.173)	0.011	0.995 (0.982-1.008)	0.468
Model 3: adjusting for age, gender, BMI and hsCRP	1.079 (1.002-1.162)	0.044	0.984 (0.966-1.002)	0.081
Model 4: adjusting for age, gender, BMI, hsCRP, smoking, Non-HDL-C	1.064(0.987-1.147)	0.105	0.983 (0.965-1.001)	0.065

Data are displayed as odds ratios (ORs) with 95% confidential interval (CI). BMI, Body mass index; hsCRP, C reactive protein.

**Table 4.** *FABP5* SNP frequencies according to the presence of type 2 diabetes, Obesity, MetS and AD.

SNPs <i>FABP5</i>	Genotype variants	Type 2 diabetes		Obesity		MetS		AD	
		y/n	p	y/n	p	y/n	p	y/n	p
rs454550	GG	89.1 vs 83.8	0.130	91.7 vs 83.6	0.011	88.1 vs 86.2	0.632	88.6 vs 87.3	0.703
	CG+CC	10.9 vs 16.2		8.3 vs 16.4		11.9 vs 13.8		11.4 vs 12.7	
rs79370435	AA	87.9 vs 87.2	0.842	90.3 vs 85.9	0.159	89.8 vs 83.9	0.131	87.9 vs 87.6	0.945
	AG+GG	12.1 vs 12.8		9.7 vs 14.1		10.2 vs 16.1		12.1 vs 12.4	

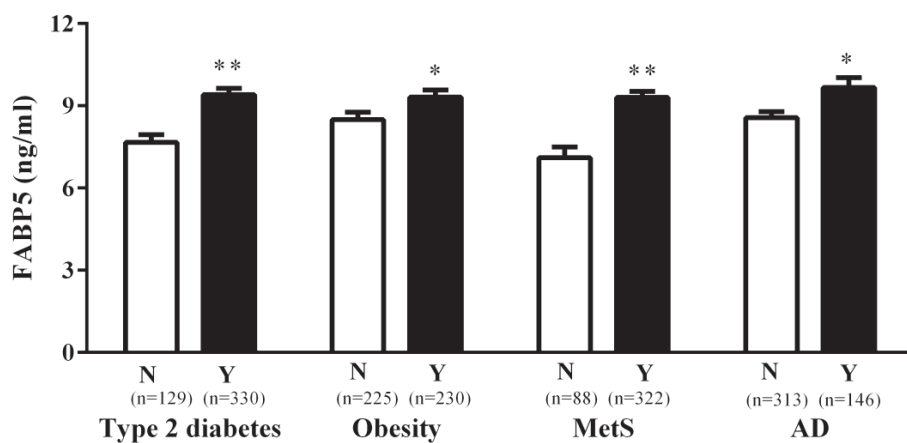
$\chi^2$  test. MetS, Metabolic syndrome; AD, Atherogenic dyslipidaemia.



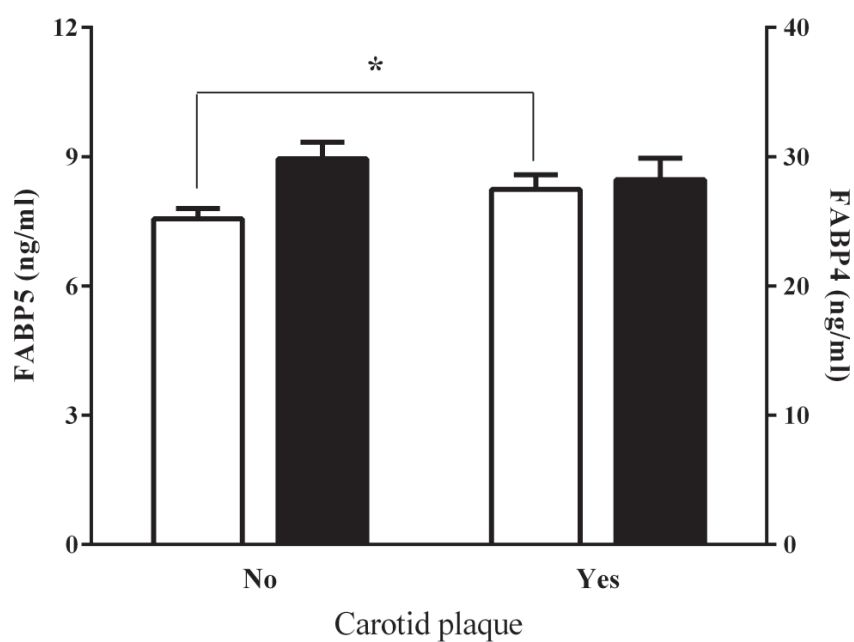
Estudio 2

**LEGENDS FOR FIGURES**

**Figure 1.** FABP5 concentrations according the presence of type 2 diabetes, obesity, MetS and AD. Bars represents mean and SEM. \*  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ , Mann-Whitney U-test. MetS, Metabolic syndrome; AD, Atherogenic dyslipidaemia. N, No; Y, Yes.



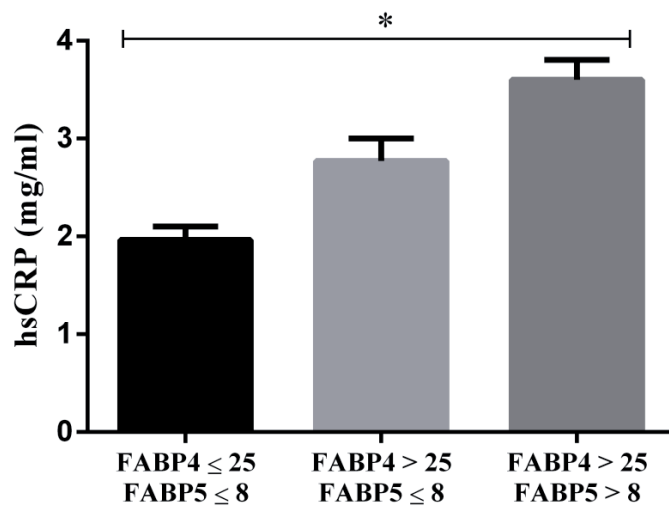
**Figure 2.** FABP5 and FABP4 concentrations with respect to presence of carotid plaque (n=327). White bars represent FABP5 levels and black bars represent FABP4 levels. Bars represent mean and SEM. \* $p < 0.05$ , Mann-Whitney U-test.



Estudio 2

---

**Figure 3.** hsCRP levels according to FABP5 and FABP4 concentrations. Bars represent mean and SEM.  $*p < 0.001$ , Kruskal-Wallis test. Numbers represent FABP concentrations in ng/ml.



## 7. ESTUDIO 3

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FABP4 Y FABP5 CIRCULANTES EN LAS ENFERMEDADES METABÓLICAS

Daiana Ibarretxe Gerediaga

**ACEPTADO EN:**

**Clínica en Investigación en arteriosclerosis.**



**Circulating PCSK9 in patients with type 2 diabetes  
and related metabolic disorders**

**Concentraciones circulantes de PCSK9 en población con diabetes tipo  
2 y alteraciones metabólicas asociadas**

Daiana Ibarretxe<sup>a,c</sup>, Josefa Girona<sup>a,c</sup>, Núria Plana<sup>a,c</sup>, Anna Cabré<sup>a,c</sup>, Raimón Ferré<sup>a,c</sup>, Núria Amigó<sup>b,c</sup>, Sandra Guaita<sup>a,c</sup>, Roger Mallo<sup>b,c</sup>, Mercedes Heras<sup>a,c</sup>, Luis Masana<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup>Vascular Medicine and Metabolism Unit, Research Unit on Lipids and Atherosclerosis, “Sant Joan” University Hospital, Universitat Rovira i Virgili, IISPV, Reus, Spain.

<sup>b</sup>Biosfer Teslab, Reus and Department of Electronic Engineering, Universitat Rovira i Virgili, IISPV, Tarragona, Spain.

<sup>c</sup>Biomedical Research Centre in Diabetes and Associated Metabolic Disorders (CIBERDEM), Madrid, Spain.

**Corresponding author:**

Luis Masana, MD, PhD

Vascular Medicine and Metabolism Unit, Research Unit on Lipids and Atherosclerosis

Sant Joan University Hospital

Universitat Rovira i Virgili

C Sant Llorens, 21, 43201-Reus, Spain

Tel.: +34977759366; Fax: +34977759732

E-mail address: [luis.masana@urv.cat](mailto:luis.masana@urv.cat)

### Abstract

**Background:** PCSK9 is a pivotal molecule in the regulation of lipid metabolism. Previous studies have suggested that PCSK9 expression and its function in LDL receptor regulation could be altered in the context of diabetes. The aim was to assess PCSK9 plasma levels in patients with type 2 diabetes (T2DM) and other related metabolic disorders as well as its relation to the metabolomic profile generated by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and glucose homeostasis.

**Methods:** There were recruited a total of 457 patients suffering from T2DM and other metabolic disorders (metabolic syndrome (MetS), obesity and atherogenic dyslipidaemia (AD) and other disorders). Anamnesis, anthropometry and physical examinations were conducted, and vascular and abdominal adiposity imaging were carried out. Biochemical studies were performed to determine PCSK9 plasma levels 6 weeks after lipid lowering drug wash-out in treated patients. A complete metabolomic lipid profile was also generated by NMR. The rs505151 and rs11591147 genetic variants of *PCSK9* gene were identified in patients.

**Results:** The results showed that PCSK9 levels are increased in patients with T2DM and MetS (14% and 13%;  $p < 0.005$ , respectively). Circulating PCSK9 levels were correlated with an atherogenic lipid profile and with insulin resistance parameters. PCSK9 levels were also positively associated with AD, as defined by lipoprotein particle number and size. The rs11591147 genetic variant resulted in lower levels of circulating PCSK9 and LDL cholesterol (LDL-C).

**Conclusions:** PCSK9 plasma levels are increased in T2DM and MetS patients and are associated with LDL-C and other parameters of AD and glucose metabolism.

**Keywords:** PCSK9; type 2 diabetes; metabolic syndrome; nuclear magnetic resonance; SNP.

## Resumen

**Introducción:** PCSK9 es una molécula clave en la regulación del metabolismo lipídico. Estudios previos sugieren que la expresión y función de PCSK9 entorno a la regulación del receptor LDL puede alterarse en diabetes. El objetivo del estudio fue determinar los niveles circulantes de PCSK9 en pacientes con diabetes tipo 2 (DM) y otras enfermedades metabólicas y su relación con las lipoproteínas estudiadas mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y la homeostasis de la glucosa.

**Métodos:** Se estudiaron un total de 457 pacientes, afectados de DM y otras alteraciones metabólicas (síndrome metabólico (SMet), obesidad y dislipemia aterogénica (DA) y otros). Se realizó anamnesis, antropometría, exploración física y estudio vascular de carótidas y adiposidad abdominal. Se realizó bioquímica incluyendo PCSK9 circulante (tras 6 semanas de lavado en pacientes con hipolipemiantes). Se estudió mediante RMN el perfil de lipoproteínas. Se determinaron las variantes genéticas rs505151 y rs11591147 del gen *PCSK9*.

**Resultados:** Los niveles circulantes de PCSK9 están aumentados en pacientes con DM y SMet (14% and 13%;  $p < 0.005$ , respectivamente). Los niveles circulantes de PCSK9 se correlacionaron de forma positiva con el perfil lipídico aterogénico y parámetros de resistencia insulínica. Los niveles circulantes de PCSK9 también se asociaron positivamente a DA, definida mediante número y tamaño de lipoproteínas analizado mediante RMN. Los portadores de la variante genética rs11591147 mostraron niveles inferiores de PCSK9 plasmática y C-LDL.

**Conclusiones:** Los niveles circulantes de PCSK9 están aumentados en pacientes con DM y SMet junto con parámetros de DA y metabolismo de la glucosa, más allá del C-LDL.

**Palabras clave:** PCSK9; diabetes tipo 2; síndrome metabólico; resonancia magnética nuclear; SNP.



## Introduction

Proprotein Convertase Subtilisin Kexin 9 (PCSK9) is a circulating protein that is synthesized and secreted predominantly by hepatocytes and plays a pivotal role in regulating LDL receptor (LDLR) expression, thereby acting as the main regulator of LDL cholesterol (LDL-C) concentration in plasma,<sup>1,2</sup> a key risk factor in the development of cardiovascular disease. PCSK9 binds to the extracellular domain of the LDLR, thereby promoting the degradation of the LDLR in the lysosomal pathway and leading to an increase in LDL-C level in plasma.<sup>3,4</sup> Gain-of-function mutations in the *PCSK9* gene confer an increase in PCSK9 activity, reducing the number of LDLRs in the cell membrane and leading to high LDL cholesterol levels in plasma that result in familial hypercholesterolemia and vascular disease acceleration.<sup>5-7</sup> Loss-of-function mutations in *PCSK9* produce the opposite results and have been associated with a reduction in carotid intima-media thickness (cIMT), calcium coronary score and overall coronary disease risk.<sup>8,9</sup> The most important low frequency genetic variant associated with low circulating levels of PCSK9 is R46L (rs11591147). The minor allele of this polymorphism has a frequency of 1-2% among the European population,<sup>10</sup> explaining only a minor fraction of the variation in circulating PCSK9 level in healthy subjects.

Recently, the effects of PCSK9 on metabolism beyond LDL have been actively studied. In particular, the association of PCSK9 level with insulin and glucose homeostasis remains controversial. Although some studies have shown a positive correlation between circulating PCSK9 and insulin and glucose levels,<sup>11,12</sup> more recent work suggests that there is no association.<sup>13</sup> In contrast, patients with type 2 diabetes exhibit a relationship between PCSK9, non-HDL cholesterol, and apolipoprotein B levels,<sup>13</sup> suggesting a role for PCSK9 in the pathogenesis of atherogenic dyslipidaemia (AD). Additional results have suggested that diabetes impairs the effect of PCSK9 on LDLR activity.<sup>14</sup>

The regulatory mechanisms affecting PCSK9 expression are under investigation. It has been demonstrated that insulin induces hepatic PCSK9 expression *in vivo* in mice and rats and *in vitro* in human hepatocytes.<sup>15-17</sup> It has been shown that SREBP2 regulates PCSK9 expression, but under certain conditions, SREBP1c can also bind to the SRE in the *PCSK9* promoter.<sup>15,18</sup> SREBP1c activation is regulated by fatty acids

and insulin, thereby linking glucose and insulin metabolism to PCSK9 and cholesterol regulation. Moreover, the transcription factor HNF1A has been reported to activate *PCSK9* transcription, providing new evidence for its association with glucose metabolism. No cases of PCSK9 nullizygoty have been reported in humans, and PCSK9-deficient mice have yielded contradictory results.<sup>19,20</sup>

Guardiola M. et al. has reported an association between circulating PCSK9 levels and AD in a subgroup of patients with high cardiovascular risk.<sup>21</sup> In this study, we have examined the effect of two main Single Nucleotide Polymorphism (SNP) (rs505151, rs11591147) on circulating PCSK9 levels and clinical, vascular, biochemical parameters, as well as Nuclear Magnetic resonance (NMR)-assessed lipid profile, in patients with type 2 diabetes and related metabolic alterations.

## **Material and Methods**

### **Study design and participants**

For this cross-sectional study, we recruited 457 consecutive individuals who were treated between 2010 and 2012 in the vascular medicine and metabolism unit of our University Hospital due to type 2 diabetes or related disorders, such as metabolic syndrome (MetS), obesity, and AD. Subjects with chronic lung, renal or liver disease, cancer, or any other serious disease were excluded. Patients on lipid-lowering drugs underwent a 6-week wash-out period (8 weeks if they were on fibrates). Anamnesis, anthropometry and physical examination data were recorded. The Hospital Ethical Committee approved the study, and all patients provided written consent to participate in the study.

### **Carotid intima-media thickness (cIMT) and arterial stiffness**

Three hundred and twenty-seven subjects underwent a vascular study with Mylab 50 X-Vision ultrasound (Esaote, Italy). A 7.5 MHz linear array and semiautomated software were used to measure cIMT in the far wall of both common carotid arteries. The cIMT mean was the average of 2 territories. Bifurcations and internal carotids were measured

manually. Plaques were defined as focal structures that either encroached into the arterial lumen by at least 0.5 mm or 50% of the surrounding cIMT value or that demonstrated a thickness >1.5 mm, as measured from the media-adventitia interface to the intima-lumen interface, according to the Mannheim Carotid Intima-Media Thickness Consensus.<sup>22</sup>

Arterial wall functional properties with respect to the elasticity state were measured by ultrasonography using the MyLab X-60 (Esaote, Genova, Italy) with the QAS software System and an LA533 linear transducer (Quality Arterial Stiffness software) (n=121). The examination was performed according to standardized measurements.<sup>23</sup> The augmentation index (Aix) and pulse wave velocity (PWV) were measured directly in the right and left common carotid arteries and were adjusted for arterial pressure, age, and gender to determine the pulse wave velocity as well as for heart rate and gender to determine the augmentation index. An average for Aix and PWV was calculated for both sides.

### **Body fat distribution**

Body fat distribution was assessed via MyLab 50 X-Vision ultrasonography (Esaote, Italy). The subcutaneous (SAT) and preperitoneal fat (VAT) thicknesses were measured by placing a 7.5-MHz linear array perpendicular to the skin on the epigastrium according to the ultrasound image review consensus.<sup>24</sup> The thickness of the SAT is defined as the distance between the anterior surface of the linea Alba and the fat-skin barrier. The VAT extends from the anterior surface of the liver (left lobe) to the posterior surface of the linea Alba. Preaortic intraabdominal fat (PIF), as measured with a 3.5-MHz convex array, was measured as the distance between the anterior aortic wall and the posterior surface of the rectus abdominis muscle at 1-5 cm above the umbilicus along the xipho-umbilical line.

### **Blood sample collection and storage**

A blood sample was obtained after overnight fasting. Plasma and serum aliquots were prepared and stored at -80°C in the BioBanc of our centre until further use. The cellular

buffy coat was obtained, and the cells were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until DNA analyses were performed.

### **Standard biochemical analyses**

Biochemical parameters, lipids and apolipoproteins were measured using colorimetric, enzymatic and immunoturbidimetric assays (Spinreact, SA, Spain; Wako Chemicals GmbH, Germany; Polymedco, NY, US) adapted to a Cobas Mira Plus autoanalyzer (Roche Diagnostics, Spain). Circulating PCSK9 and insulin was measured using commercial ELISA kits (R&D Systems, MN, US and Mercodia AB, Uppsala, Sweden). Insulin resistance was estimated using the homeostasis model assessment index (HOMA-IR).<sup>25</sup>

### **2D NMR lipid profile evaluation**

The Liposcale test was used in all samples. This advanced lipoprotein test is based on 2D diffusion-ordered  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy. This method adds diffusion coefficients to classical NMR determinations to provide a direct measure of mean particle size and number.<sup>26</sup>

### **SNP selection and genotyping**

In the present study were genotyped 2 SNPs; rs505151, an E670G polymorphism, and rs11591147, an R46L polymorphism, of the *PCSK9* gene, that were selected from the International HapMap database (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>). These SNPs were selected due to previous reports supporting their association with PCSK9 level and subclinical atherosclerosis. rs11591147 is associated with lower levels of plasmatic PCSK9 and reduced subclinical atherosclerosis.<sup>8</sup> rs505151 is associated with higher cIMT and its progression.<sup>6</sup> Genomic DNA was extracted from peripheral leukocytes that had been isolated from anticoagulated venous blood using the QIAamp DNA Blood Kit (Qiagen Iberia SL, Madrid, Spain) according to the manufacturer's instructions. The two SNPs were genotyped on the Sequenom MassARRAY platform using the iPLEX

Gold protocol as specified by the manufacturer (Sequenom Inc., San Diego, CA).<sup>27</sup> The genotypes of 5 of the samples were confirmed using duplicate SEQUENOMH runs and showed 100% consistency. Genotyping was performed at the Spanish National Genotyping Centre.

### Statistical analyses

The results are expressed as the mean  $\pm$  SD for normally distributed data, the median (interquartile range, IQR) for data that was not normally distributed, and the frequency for categorical data. The differences between groups were assessed using the t-test or ANOVA (for data that were normally distributed), the Mann-Whitney U-test or Kruskal-Wallis test (for data that were not normally distributed) or  $\chi^2$  tests (for data that were collected as categorical variables). Correlations were performed using Spearman's test. Statistical analyses were performed using SPSS software (IBM SPSS Statistics, version 20.0). A *p* value of  $< 0.05$  was considered statistically significant in all analyses.

### Results

Table 1 summarizes the clinical, demographic, biochemical, vascular and adiposity imaging and lipoprotein NMR characteristics of patients by gender. We found a statistically significant increase in the incidence of smokers, waist circumference and diastolic blood pressure (DBP) in males ( $p < 0.05$ ). Regarding lipid and glucose parameters, females presented higher levels of total cholesterol, HDL cholesterol (HDL-C), LDL-C, triglycerides, Apo A1 and glucose with respect to males ( $p < 0.05$ ). Imaging revealed that, as expected, males presented higher cIMT, carotid plaque levels and arterial stiffness ( $p < 0.05$ ). The observed body fat distributions were in accord with the literature; males had a higher average PIF, while females had a higher average SAT ( $p < 0.05$ ). LDL and HDL size, as assessed by 2D-NMR, was lower in males, females had less total VLDL Lp particle number ( $p = 0.017$ ) and more total LDL and HDL Lp particle number ( $p < 0.0001$ ;  $p < 0.0001$ , respectively).

Table 2 shows the binary correlations between circulating PCSK9 and anthropometric, clinical, biochemical data, vascular and adiposity imaging, and 2D-NMR lipoprotein profile. The results show a positive and significant correlation between circulating PCSK9 and lipid and glucose homeostasis parameters, including total cholesterol, LDL-C, HDL-C, triglycerides, non-HDL-C, ApoA1, ApoB100, glucose, basal insulin, HbA1c and HOMA-IR ( $p < 0.05$ ). The PCSK9 levels were positively correlated with FABP4 ( $r = 0.113$ ,  $p = 0.015$ ) but not with FABP5. Significant positive correlations were observed between circulating PCSK9 and total VLDL and LDL Lp particle number ( $r = 0.180$ ,  $p < 0.0001$ ;  $r = 0.133$ ,  $p = 0.004$ , respectively). In contrast, circulating PCSK9 levels were negatively correlated with VLDL, LDL and HDL Lp size ( $r = -0.118$ ,  $p = 0.011$ ;  $r = -0.109$ ,  $p = 0.019$ ;  $r = -0.105$ ,  $p = 0.025$ , respectively). In the studied population, there is no significant correlation between circulating PCSK9 concentration and vascular or adiposity imaging values.

Figure 1 shows circulating PCSK9 concentrations in the presence or absence of type 2 diabetes, MetS, obesity and AD. Circulating PCSK9 was higher in the presence of metabolic alterations, but only type 2 diabetes and MetS patients reached statistical significance (14% and 13%, respectively;  $p < 0.005$ ). Moreover, the PCSK9 level rose with an increase in MetS components, reaching statistical significance beyond 4 components. ( $p < 0.05$ ) (Fig. 2).

Figure 3 shows that carriers of the rare variant rs11591147 have significantly lower levels of both circulating PCSK9 (Fig.3a) and LDL-C (Fig.3b) ( $p < 0.05$ ).

## Discussion

In this study, we have described the association between total PCSK9 plasma level and clinical parameters in patients with type 2 diabetes or associated metabolic alterations. The main observation is that PCSK9 concentration is associated not only with LDL-C values, but with MetS and type 2 diabetes. Despite a lack of correlation with BMI, PCSK9 concentrations are higher in patients with type 2 diabetes mellitus, AD and MetS. Moreover, a higher number of MetS components were correlated with higher

PCSK9 concentrations. The association of PCSK9 with triglycerides, non-HDL-cholesterol and apoB was reinforced by its correlation with the AD profile, as assessed by 2D-NMR. PCSK9 was positively associated with VLDL and LDL particle number and VLDL size, while it was negatively associated with VLDL, LDL and HDL size. These data suggest a pivotal role of PCSK9 on the lipid profile beyond LDL metabolism. This association is concordant with the effects observed on triglyceride levels in patients treated with PCSK9 inhibitors when a reduction on the above mentioned lipid has been communicated.<sup>28</sup> The positive correlation between HDL-C is paradoxical, and we cannot explain this result. The results strongly support an effect of PCSK9 on triglyceride rich lipoprotein (TRL). The mechanisms associated with this effect are not yet fully understood. It has been demonstrated that PCSK9 can interfere directly with apoB synthesis to modulate all apoB-containing particles.<sup>29</sup> Moreover, the interaction of PCSK9 with VLDL receptors has also been suggested.<sup>30</sup> However, in this work there are a correlation between PCSK9 level and insulin metabolism: higher PCSK9 levels are linked to higher insulin, glucose, HbA1c and HOMA levels. Taking into account the impact of insulin on TRL metabolism, it cannot exclude an insulin-mediated effect of PCSK9 on these particles. The correlation between glucose and insulin metabolism and PCSK9 is the subject of intense debate.<sup>11, 12</sup> Here, the results show that diabetic patients exhibit higher PCSK9 levels. The mechanism underlying this association is not clear, but it is known that the *PCSK9* gene is regulated by the SREBP1c and HNF1a transcription factors, both of which are involved in insulin metabolism.<sup>15, 18</sup> Interestingly, PCSK9 levels were correlated to FABP4 concentrations which is considered an emerging biomarker of adiposity related alterations including type 2 diabetes, MetS and hypertriglyceridemia as AD component. In our hands, PCSK9 concentration did not serve as a subclinical arteriosclerosis marker in this population. Its concentration was not associated with cIMT values, nor did patients with increased cIMT exhibit different PCSK9 levels. This observation could be in conflict with genetic data showing that individuals wearing PCSK9 loss-of-function mutation have less subclinical atherosclerosis. Previous statin treatment could explain in part our data. Also interesting was the lack of association between PCSK9 and the adiposity indexes. PCSK9 did not differ significantly according to BMI or sonography-assessed

fat distribution. These data are not surprising, given that PCSK9 is not expressed in adipose tissue.

Finally, the results of the present study corroborate the impact of loss-of-function mutations on PCSK9 and LDL concentrations, suggesting that these gene variants contribute to common lipid profiles.

The study has several limitations. The cross-sectional design precludes extrapolating any causality association. The sample size is relatively small particularly for genetic studies but the significant results are strengthened. We studied a metabolically altered population, so the extrapolation of these data to other groups must be done with caution. In the present study, PCSK9 levels are total and not free fraction. Moreover, although the patients were washout for lipid lowering treatment we cannot exclude a residual impact on PCSK9 after the washout period.

## Conclusion

PCSK9 concentrations are elevated in patients with MetS and type 2 diabetes. Its concentration is associated with insulin and glucose levels and AD profile as assessed by NMR, suggesting that PCSK9 is highly correlated with insulin metabolism, thereby modulating its impact on lipid profile.

## Ethical disclosures

**Protection of human and animal subjects.** The authors declare that no experiments were performed on humans or animals for this investigation.

**Confidentiality of Data.** The authors declare that no patient data appears in this article.

**Right to privacy and informed consent.** The authors have obtained the informed consent of the patients and /or subjects mentioned in the article. The author for correspondence is in possession of this document.



### **Conflict of interest**

The authors declared no conflict of interest.

### **Acknowledgments**

This work was supported by grants from the Spanish Atherosclerosis Society. PCSK9 como marcador del patrón metabólico asociado a la dislipemia aterogénica. Relación con la arteriosclerosis subclínica. Beca FEA/SEA 2012 Investigación clínico-epidemiológica presented at the XXV SEA Congress, 2012. Spanish Atherosclerosis Society to Anna Cabré.

### **Fundings**

This study was funded in part by CIBERDEM and FIS-PI11/02216 and FEDER funds.

### **Contribution statement**

The authors' responsibilities were as follows: DI, NP, RF and LM designed the study; DI, JG, NP, RF and LM conducted research; JG, AC, SG performed the biochemical analyses; NA and RM performed NMR analyses; DI, JG and LM performed the statistical tests and wrote the final manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

## References

1. Goldstein JL, Brown MS. The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annu Rev Biochem.* 1977;46:897-930.
2. Seidah NG, Benjannet S, Wickham L, Marcinkiewicz J, Jasmin SB, Stifani S, et al. The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:928-33.
3. Lambert G, Sjouke B, Choque B, Kastelein JJ, Hovingh GK. The PCSK9 decade. *J Lipid Res.* 2012;53:2515-24.
4. Costet P, Krempf M, Cariou B. PCSK9 and LDL cholesterol: unravelling the target to design the bullet. *Trends Biochem Sci.* 2008;33:426-34.
5. Chernogubova E, Strawbridge R, Mahdessian H, Malarstig A, Krapivner S, Gigante B, et al. Common and low-frequency genetic variants in the PCSK9 locus influence circulating PCSK9 levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32:1526-34.
6. Norata GD, Garlaschelli K, Grigore L, Raselli S, Tramontana S, Meneghetti F, et al. Effects of PCSK9 variants on common carotid artery intima media thickness and relation to ApoE alleles. *Atherosclerosis.* 2010;208:177-82.
7. Abifadel M, Varret M, Rabes JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet.* 2003;34:154-6.
8. Cohen JC, Boerwinkle E, Mosley TH, Jr., Hobbs HH. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N Engl J Med.* 2006;354:1264-72.
9. Huang CC, Fornage M, Lloyd-Jones DM, Wei GS, Boerwinkle E, Liu K. Longitudinal association of PCSK9 sequence variations with low-density lipoprotein cholesterol levels: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults Study. *Circ Cardiovasc Genet.* 2009;2:354-61.
10. Benn M, Nordestgaard BG, Grande P, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A. PCSK9 R46L, low-density lipoprotein cholesterol levels, and risk of ischemic heart disease: 3 independent studies and meta-analyses. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55:2833-42.
11. Lakoski SG, Lagace TA, Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Genetic and metabolic determinants of plasma PCSK9 levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94:2537-43.
12. Baass A, Dubuc G, Tremblay M, Delvin EE, O'Loughlin J, Levy E, et al. Plasma PCSK9 is associated with age, sex, and multiple metabolic markers in a population-based sample of children and adolescents. *Clin Chem.* 2009;55:1637-45.
13. Brouwers MC, Troutt JS, van Greevenbroek MM, Ferreira I, Feskens EJ, van der Kallen CJ, et al. Plasma proprotein convertase subtilisin kexin type 9 is not altered in subjects with impaired glucose metabolism and type 2 diabetes mellitus, but its relationship with non-HDL cholesterol and apolipoprotein B may be modified by type 2 diabetes mellitus: The CODAM study. *Atherosclerosis.* 2011;217:263-7.
14. Verges B, Duvillard L, Brindisi MC, Gautier E, Krempf M, Costet P, et al. Lack of association between plasma PCSK9 and LDL-apoB100 catabolism in patients with uncontrolled type 2 diabetes. *Atherosclerosis.* 2011;219:342-8.
15. Costet P, Cariou B, Lambert G, Lalanne F, Lardeux B, Jarnoux AL, et al. Hepatic PCSK9 expression is regulated by nutritional status via insulin and sterol regulatory element-binding protein 1c. *J Biol Chem.* 2006;281:6211-8.
16. Persson L, Galman C, Angelin B, Rudling M. Importance of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 in the hormonal and dietary regulation of rat liver low-density lipoprotein receptors. *Endocrinology.* 2009;150:1140-6.
17. Miao J, Manthena PV, Haas ME, Ling AV, Shin DJ, Graham MJ, et al. Role of Insulin in the Regulation of Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35:1589-96.

18. Horton JD, Shah NA, Warrington JA, Anderson NN, Park SW, Brown MS, et al. Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:12027-32.
19. Mbikay M, Sirois F, Mayne J, Wang GS, Chen A, Dewpura T, et al. PCSK9-deficient mice exhibit impaired glucose tolerance and pancreatic islet abnormalities. *FEBS Lett*. 2010;584:701-6.
20. Langhi C, Le May C, Gmyr V, Vandewalle B, Kerr-Conte J, Krempf M, et al. PCSK9 is expressed in pancreatic delta-cells and does not alter insulin secretion. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;390:1288-93.
21. Guardiola M, Plana N, Ibarretxe D, Cabre A, Gonzalez M, Ribalta J, et al. Circulating PCSK9 levels are positively correlated with NMR-assessed atherogenic dyslipidaemia in patients with high cardiovascular risk. *Clin Sci (Lond)*. 2015;128:877-82.
22. Touboul PJ, Hennerici MG, Meairs S, Adams H, Amarenco P, Bornstein N, et al. Mannheim carotid intima-media thickness and plaque consensus (2004-2006-2011). An update on behalf of the advisory board of the 3rd, 4th and 5th watching the risk symposia, at the 13th, 15th and 20th European Stroke Conferences, Mannheim, Germany, 2004, Brussels, Belgium, 2006, and Hamburg, Germany, 2011. *Cerebrovasc Dis*. 2012;34:290-6.
23. Adji A, O'Rourke MF, Namasivayam M. Arterial stiffness, its assessment, prognostic value, and implications for treatment. *Am J Hypertens*. 2011;24:5-17.
24. Vlachos IS, Hatzioannou A, Perelas A, Perrea DN. Sonographic assessment of regional adiposity. *AJR Am J Roentgenol*. 2007;189:1545-53.
25. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28:412-9.
26. Mallol R, Amigo N, Rodriguez MA, Heras M, Vinaixa M, Plana N, et al. Liposcale: a novel advanced lipoprotein test based on 2D diffusion-ordered 1H NMR spectroscopy. *J Lipid Res*. 2015;56:737-46.
27. Oeth P, del Mistro G, Marnellos G, Shi T, van den Boom D. Qualitative and quantitative genotyping using single base primer extension coupled with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MassARRAY). *Methods Mol Biol*. 2009;578:307-43.
28. Li C, Lin L, Zhang W, Zhou L, Wang H, Luo X, et al. Efficiency and safety of proprotein convertase subtilisin/kexin 9 monoclonal antibody on hypercholesterolemia: a meta-analysis of 20 randomized controlled trials. *J Am Heart Assoc*. 2015;4:e001937.
29. Sun H, Samarghandi A, Zhang N, Yao Z, Xiong M, Teng BB. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 interacts with apolipoprotein B and prevents its intracellular degradation, irrespective of the low-density lipoprotein receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32:1585-95.
30. Roubtsova A, Munkonda MN, Awan Z, Marcinkiewicz J, Chamberland A, Lazure C, et al. Circulating proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) regulates VLDLR protein and triglyceride accumulation in visceral adipose tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31:785-91.

## Tables

**Table 1.** Characteristics of the study group sorted by gender.

<b>Clinical data</b>	<b>Male (n=234)</b>	<b>Female (n=223)</b>	<b>p value</b>
Age (years)	60 (50-65)	60 (52-66)	0.594
Type 2 diabetes (%)	72.6	70.9	0.670
Obesity (%)	50.0	51.4	0.773
MetS (%)	78.2	78.7	0.897
AD (%)	35.9	28.1	0.073
Hypertension (%)	58.3	26.8	0.761
Low CVR	10.3	14.2	0.210
Smoke (yes, %)	26.0	9.0	<b>&lt;0.0001</b>
SBP (mmHg)	135 (125-150)	135 (124-147)	0.472
DBP (mmHg)	80 (75-88)	79 (70-83)	<b>0.003</b>
Waist perimeter (cm)	104.0 (99.0-112.0)	100.0 (90.0-113.0)	<b>0.002</b>
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	30.0 (27.0-33.6)	30.0 (26.8-37.2)	0.175
<b>Biochemical data</b>			
Total cholesterol (mmol/l)	5.1 (4.5-6.0)	5.4 (4.7-6.3)	<b>0.038</b>
LDL-C (mmol/l)	3.1 (2.5-3.9)	3.4 (2.6-4.2)	<b>0.017</b>
HDL-C (mmol/l)	1.3 (1.13-1.49)	1.51 (1.33-1.71)	<b>&lt;0.001</b>
Triglycerides (mmol/l)	1.69 (1.0-3.0)	1.5 (1.0-2.1)	<b>0.018</b>
Non-HDL-C (mmol/l)	3.7 (3.1-4.7)	3.8 (3.2-4.8)	0.721
APOA1 (mg/dl)	134 (125-144)	142 (132-150)	<b>&lt;0.001</b>
APOB100 (mg/dl)	97 (82-118)	105 (84-126)	0.148
Glucose (mg/dl)	133 (108-170)	122 (96-157)	<b>0.010</b>
Basal insulin (mU/l)	10.5 (6.9-16.3)	9.2 (5.9-19.3)	0.610
HbA <sub>1c</sub> (%)	6.4 (5.7-7.6)	6.4 (5.7-7.6)	0.815
HOMA-IR	2.98 (1.62-5.67)	2.46 (1.23-6.64)	0.754
PCSK9 (ng/ml)	313.7 (246.7-383.7)	331.6 (261.2-424.4)	0.064
FABP4 (ng/ml)	18.60 (13.07-28.51)	33.35 (23.89-46.02)	<b>&lt;0.001</b>
FABP5 (ng/ml)	7.98 (6.27-10.32)	8.12 (6.51-11.02)	0.234
<b>Vascular and adiposity imaging values</b>			
cIMT (mm)*	0.70 (0.63-0.79)	0.67 (0.61-0.75)	<b>0.015</b>
Carotid plaque (%)*	39.4	27.8	<b>0.026</b>
PWV (m/s)**	8.77 (7.02-10.77)	8.82 (7.82-10.01)	0.842
Aix**	4.01±4.34	6.91±5.42	<b>0.012</b>
VAT (mm)*	13.2 (10.1-17.7)	13.0 (10.7-16.2)	0.473
SAT (mm)*	8.8 (5.9-11.6)	15.2 (12.9-18.0)	<b>&lt;0.001</b>
PIF (mm)*	72.12±22.32	58.45±21.45	<b>&lt;0.001</b>
<b>Lp subclass particles</b>			
Total VLDL (nM)	55.0 (30.1-119.5)	46.3 (26.5-85.6)	<b>0.017</b>
Large VLDL (nM)	2.0 (1.1-3.6)	1.6 (0.9-2.6)	<b>0.007</b>
Medium VLDL (nM)	8.3 (4.7-15.6)	7.6 (4.2-12.6)	<b>0.017</b>
Small VLDL (nM)	44.7 (24.4-101.3)	37.6 (21.2-69.8)	<b>0.016</b>
Total LDL (nM)	838 (607-1093)	1005 (723-1266)	<b>&lt;0.0001</b>
Large LDL (nM)	106 (80-134)	124 (96-161)	<b>&lt;0.0001</b>

Estudio 3

Medium LDL (nM)	297 (208-381)	363 (259-452)	<b>&lt;0.0001</b>
Small LDL (nM)	435 (317-574)	501 (355-649)	<b>0.002</b>
Total HDL (μM)	23.1 (20.7-27.3)	27.0 (22.9-31.4)	<b>&lt;0.0001</b>
Large HDL (μM)	0.15 (0.11-0.19)	0.16 (0.12-0.20)	0.252
Medium HDL (μM)	6.1 (4.4-8.0)	7.8 (6.1-9.9)	<b>&lt;0.0001</b>
Small HDL (μM)	17.0 (14.8-19.8)	19.0 (16.7-21.7)	<b>&lt;0.0001</b>
<b>Lp diameter size (nm)</b>			
VLDL	42.61 ± 0.57	42.55 ± 0.58	0.272
LDL	21.0 (20.9-21.1)	21.1 (20.9-21.2)	<b>0.018</b>
HDL	8.17 (8.09-8.24)	8.21 (8.16-8.24)	<b>&lt;0.0001</b>

Data are expressed as the mean ± SD for normally distributed data, as the median (IQR) for non-normally distributed data, or as a percentage for categorical variables. The statistical tests used were ANOVA (for data that was normally distributed), Kruskal-Wallis (for data that were not normally distributed) or  $\chi^2$  (for data gathered as categorical variables). MetS, metabolic syndrome; AD, atherogenic dyslipidaemia; Low CVR, low cardiovascular risk; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; BMI, body mass index; HbA<sub>1c</sub>, glycosylated haemoglobin; LDL-C, low density lipoprotein; HDL-C, high density lipoprotein; cIMT, carotid intima-media thickness; PWV, pulse wave velocity; AIx, augmentation index; VAT, visceral fat; SAT, subcutaneous fat; PIF, preaortic intraabdominal fat; Lp, lipoprotein particle.

\* cIMT, carotid plaque, VAT, SAT and PIF. Total ( $n=327$ ).

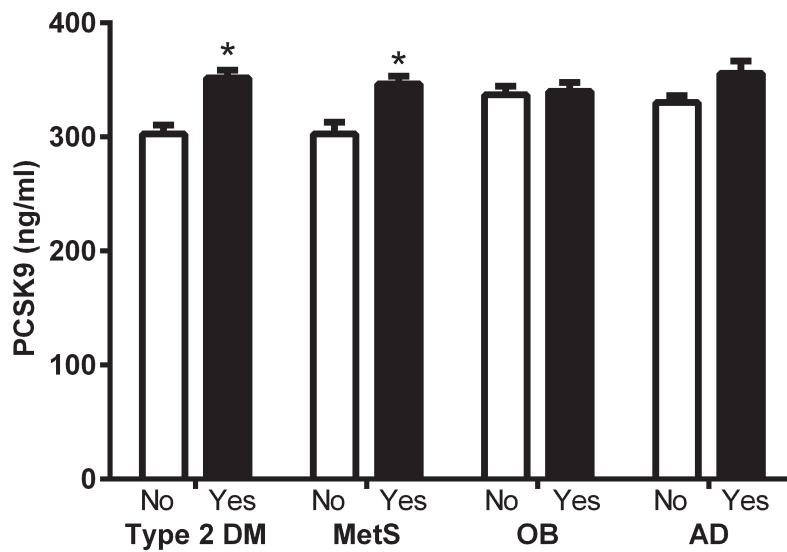
\*\* PWV and AIx. Total ( $n=121$ ).

**Table 2.** Spearman's correlation of metabolic, lipid and metabolomic variables with PCSK9 plasma levels in all populations.

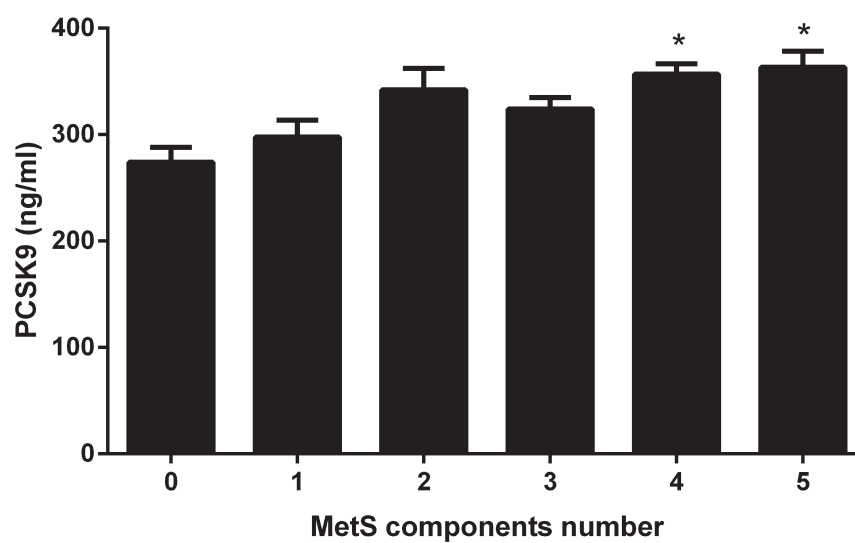
<b>PCSK9</b>	<b><i>r</i></b>	<b><i>p</i></b>
Age	0.039	0.404
SBP	0.121	<b>0.022</b>
DBP	0.082	0.124
Waist circumference	0.068	0.174
BMI	0.051	0.274
Total cholesterol	0.197	<b>&lt;0.0001</b>
LDL-C	0.177	<b>&lt;0.0001</b>
HDL-C	0.119	<b>0.011</b>
Triglycerides	0.214	<b>&lt;0.0001</b>
Non-HDL-C	0.181	<b>&lt;0.0001</b>
APOA1	0.146	<b>0.002</b>
APOB100	0.192	<b>&lt;0.0001</b>
Glucose	0.220	<b>&lt;0.0001</b>
Basal insulin	0.203	<b>0.027</b>
HbA <sub>1c</sub>	0.138	<b>0.010</b>
HOMA-IR	0.202	<b>0.028</b>
FABP4	0.113	<b>0.015</b>
FABP5	0.059	0.210
Total VLDL particles	0.180	<b>&lt;0.0001</b>
Total LDL particles	0.133	<b>0.004</b>
Total HDL particles	0.029	0.532
VLDL size	-0.118	<b>0.011</b>
LDL size	-0.109	<b>0.019</b>
HDL size	-0.105	<b>0.025</b>

### FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** Association between circulating PCSK9 and type 2 diabetes, MetS, obesity and AD in patients.



**Figure 2.** Association between circulating PCSK9 and the number of MetS components.

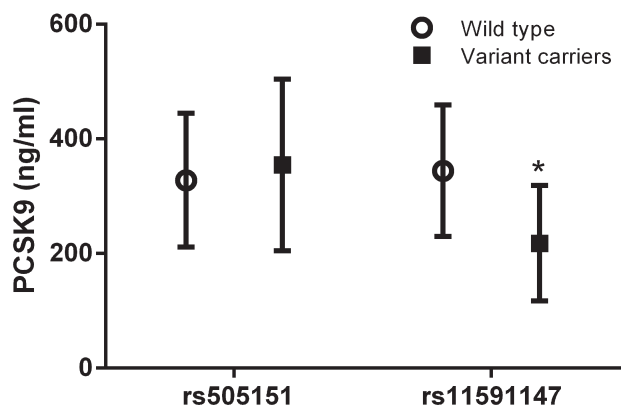




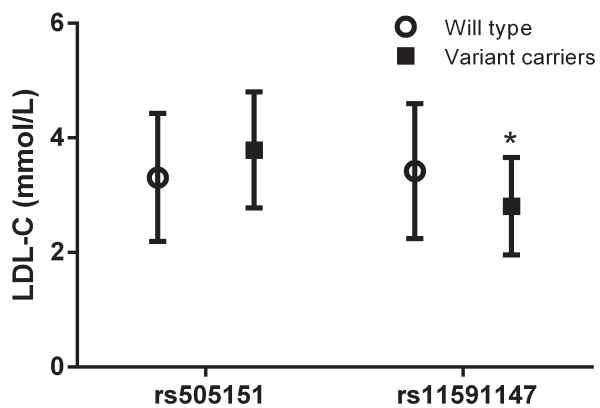
Estudio 3

**Figure 3.** Association between the two studied SNPs and the levels of circulating PCSK9 (a) and LDL-C (b).

a)



b)



## 8. DISCUSIÓN

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FABP4 Y FABP5 CIRCULANTES EN LAS ENFERMEDADES METABÓLICAS

Daiana Ibarretxe Gerediaga

## 8.1. Resumen de resultados

### Estudio 1- objetivo 1

En pacientes afectos de trastornos metabólicos, las concentraciones de FABP4 no están moduladas por variantes del gen *FABP4*. Ninguna de las variantes estudiadas se asoció a niveles de FABP4 altas o bajas.

Las concentraciones de FABP4 en este grupo de pacientes están determinadas por condicionantes ambientales como son la obesidad y el género.

### Estudio1- objetivo 2

Ninguna de las variantes del gen *FABP4* estudiadas estaban hiper o hiporrepresentadas en ninguna de las alteración metabólicas estudiadas a pesar de que en todas ellas la FABP4 circulante presentaba concentraciones elevadas.

Ninguna de las variantes del gen *FABP4* estudiadas se correlacionó con los parámetros de arteriosclerosis subclínica.

### Estudio2- objetivo 3

Las concentraciones de FABP5 se asocian con adiposidad, alteraciones del metabolismo de la glucosa, marcadores de lipólisis y PCRus. Las concentraciones de FABP5 se asociaron a una distribución y tamaño de lipoproteínas, evaluado por RMN, propio de la dislipemia aterogénica.

Las concentraciones de FABP5 se relacionaron con la presencia de placas a nivel carotídeo.

### Estudio2- objetivo 4

Las concentraciones de FABP5 fueron independientes de las variantes del gen *FABP5* estudiadas. Dichas variantes genéticas no se relacionaron con mayor o menor prevalencia de trastornos metabólicos en la población estudiada, a excepción de una menor prevalencia de obesidad asociada a la variante rs454550 de *FABP5*.

## *Discusión*

---

### **Estudio 3- objetivo 5**

Las concentraciones plasmáticas de PCSK9, más allá de su relación con el metabolismo de las LDL, se correlacionan con elementos de dislipemia aterogénica. Además se correlacionó de forma positiva con las concentraciones de FABP4, aunque no con las de FABP5.

## 8.2. Discusión general

En este trabajo hemos examinado el papel de FABP4 y FABP5 circulantes como biomarcadores de riesgo metabólico y vascular. Al mismo tiempo hemos analizado los factores determinantes de sus concentraciones plasmáticas evaluando el papel de diversos polimorfismos de los genes *FABP4* Y *FABP5* en sus concentraciones o directamente sobre el riesgo metabólico o vascular. Respecto a FABP4, el resultado principal de nuestro estudio residió en que ninguna de las variantes genéticas examinadas se asociaron con las concentraciones plasmáticas de FABP4 y tampoco con alteraciones metabólicas ni vasculares es un grupo de población afecto de alteraciones metabólicas como obesidad, SMet o diabetes tipo 2.

Tras examinar el impacto de las variantes genéticas estudiadas (6 SNPs del gen *FABP4*), sobre niveles circulantes de FABP4 y trastornos metabólicos, no se observaron efectos ni en las concentraciones plasmáticas de FABP4 ni en las enfermedades cardiovasculares, por lo que es más probable que las concentraciones circulantes de FABP4 se encuentren determinadas por condiciones adquiridas, tales como la masa grasa y la disfunción del tejido adiposo e independientemente del *background* genético. Seleccionamos los 4 SNPs debido a que existían estudios que mostraban asociación con aumento en las concentraciones de FABP4 o alteraciones metabólicas. El SNP rs3834363 se ha vinculado a una susceptibilidad aumentada de presentar PCOS<sup>126</sup>. La variante genética del SNP rs16909233 fue estudiado por Khalyfa y colaboradores, en niños obesos y se asociaba a resistencia a la insulina (aumento de HOMA-IR), por lo que se considera un marcador putativo de la prediabetes en la infancia<sup>131</sup>. Hemos observado, que los portadores de dicha variante presentan menor GIMc, pero la asociación pierde significancia estadística tras ajustar por edad y género. La variante genética del rs1054135 se ha asociado con niveles mayores de FABP4 circulante en obesidad infantil<sup>131</sup> y también con trastornos metabólicas como el SAHS en niños<sup>132</sup>. El alelo menor del rs77878271 ha sido considerado como protector contra la hipertrigliceridemia, la diabetes tipo 2 y las enfermedades cardiovasculares en

## Discusión

---

poblaciones diferentes<sup>134, 135</sup>. También estudiamos 2 tag SNPs, el rs10808846 y el rs8192688, que entre ambas cubren las 164 variantes genéticas conocidas del gen de la *FABP4*. En un estudio cuya población se encuentra metabólicamente alterada, el impacto de estas variantes genéticas no fue estadísticamente significativa<sup>130</sup>.

La falta de significancia encontrada en este estudio, puede deberse a la baja prevalencia de las variantes raras. Las frecuencias genéticas para genotipos homocigotos oscilaba entre 0 a 6%, aumentado a 4-42% para los heterocigotos, por lo que el efecto metabólico ha podido ser diluido. Además cabe tener en cuenta las características de la población estudiada con elevada prevalencia de sobrepeso u obesidad lo que condiciona de forma importante las concentraciones de FABP4 en plasma. Probablemente en población joven, delgada y sin alteraciones metabólicas el impacto genético pudiera ser superior.

Desde el punto de vista clínico, el impacto final, ya sea por el escaso efecto genético o la baja prevalencia, supone que las variantes genéticas examinadas no son determinantes de las concentraciones circulantes de FABP4 en un grupo de pacientes adultos con obesidad, SMet, diabetes tipo 2 y otras condiciones cardiovasculares. No hemos podido establecer el efecto observado en población de niños metabólicamente enfermos<sup>132</sup>. Nuestros datos confirman el impacto de la adiposidad y el género sobre las concentraciones FABP4, probablemente se explica por la diferencia existente en la distribución de la grasa. Estas asociaciones se han descrito previamente por otros grupos y también por el nuestro<sup>117, 162, 194</sup>. Aunque los pacientes diabéticos tenían niveles mayores de FABP4 circulante que los no diabéticos, la diabetes *per se* no era un contribuyente neto para las concentraciones FABP4. Este hecho podría explicarse debido al efecto de la obesidad en la asociación entre FABP4 y la diabetes<sup>249</sup>. Aunque una relación directa entre la diabetes y los niveles de FABP4 no se puede descartar, la asociación es probablemente debida al aumento de la lipólisis<sup>250</sup>.

Nuestros datos tienen relevancia clínica porque la FABP4 circulante no es sólo un biomarcador, sino que lo más probable es que sea una molécula efectora que transmite los mensajes de tejido adiposo disfuncional al tejido periférico. Se ha observado que *in vitro*, FABP4 altera la contractibilidad de los miocardiocitos<sup>140</sup>. Nuestro grupo ha demostrado que los niveles circulantes de FABP4 tienen un efecto en las células endoteliales y musculares<sup>202, 203</sup>. También que FABP4 circulante está asociada con la dislipidemia aterogénica<sup>162, 194</sup> y con la insuficiencia cardíaca<sup>200</sup>. Por lo tanto, la FABP4 circulante ha sido considerada como un enlace entre la adiposidad y las complicaciones vasculares.

Por otra parte, los estudios de intervención sugieren que la FABP4 circulante disminuye después de la pérdida de peso<sup>183</sup> y de la terapia con estatinas<sup>191</sup>, y podrían contribuir a los efectos beneficiosos de estas intervenciones. En cuanto a los estudios prospectivos, éstos sugieren que concentraciones circulantes altas de FABP4 predicen el riesgo de desarrollar enfermedades metabólicas<sup>194</sup> y vasculares<sup>195, 197</sup>, independientes de los marcadores de riesgo establecidos.

Al analizar el impacto de las concentraciones plasmáticas de FABP5 y 2 de sus variantes genéticas sobre trastornos metabólicos asociados a adiposidad, especialmente la dislipemia aterogénica analizada mediante RMN, también observamos que las concentraciones plasmáticas de FABP5 se encontraban elevadas en dichos trastornos metabólicos, sin embargo, no se encontraron diferencias entre los niveles circulantes de FABP5 en relación a los SNPs de *FABP5*.

Las concentraciones plasmáticas de FABP5 se asociaron a IMC y a parámetros de resistencia a la insulina y negativamente con la adiponectina. Se estudió el perfil lipoproteico mediante 2d-RMN, (método Liposcale validado y publicado por Mallol y colaboradores<sup>251</sup>). Esta técnica, nos mostró que FABP5 se asociaba a la dislipemia aterogénica, caracterizada por el aumento de partículas VLDL, menor número de partículas HDL y partículas LDL más pequeñas. Además, los niveles circulantes de FABP5



## Discusión

---

se asociaron a parámetros de lipólisis, tales como el glicerol y ácidos grasos no esterificados (NEFA) e inversamente con la actividad de la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP), sobre todo en el tercil superior de FABP5, lo que podría estar relacionado con un mecanismo que podría justificar el trastorno de las partículas HDL.

A pesar de estos resultados, no se ha establecido un papel directo de FABP5 en el control de la lipólisis en los adipocitos. La asociación existente entre FABP5 y la dislipemia aterogénica se perdía cuando los cálculos se ajustaron con el IMC, reforzando así su papel fundamental en esta alteración metabólica. Aunque las publicaciones entorno a los niveles circulantes de FABP5 son relativamente escasos, debemos comunicar que nuestros resultados son acordes con los resultados publicados anteriormente y que sugiere una asociación entre los niveles circulantes de FABP5 y las alteraciones metabólicas<sup>219-222</sup>. Sin embargo, en el trabajo de Català y colaboradores, se observó una correlación débil entre los niveles plasmáticos de FABP5 y la adiposidad en los pacientes afectos de SAHS<sup>187</sup>. Cabe destacar que esta observación se centró en pacientes con SAHS y que el tamaño de la muestra era demasiado pequeña como para obtener conclusiones y extrapolarla a otros grupos de pacientes.

Curiosamente, en nuestro estudio, después de ajustar las correlaciones por IMC y género, las únicas correlaciones significativas de las concentraciones plasmáticas de FABP5, se mantenían con FABP4 circulante, parámetros de la lipólisis y proteína C reactiva ultra sensible (PCRus). La correlación positiva y significativa existente entre niveles circulantes de FABP4 y FABP5 puede explicarse debido a sus cercanas funciones metabólicas.

Respecto a la PCRus, es un hecho bien conocido, que la obesidad se caracteriza por la acumulación de grasa en los adipocitos, y una vez que este depósito de grasa excede una cantidad fisiológica, el tejido adiposo se infiltra por macrófagos lo que conduce a un estado inflamatorio subclínico crónico. Este estado inflamatorio o

proinflamatorio, se ha visto implicado en diversos trastornos metabólicos tales como, la obesidad, la diabetes tipo 2, el SMet o la dislipidemia, así como también las lesiones vasculares. Por tanto, es una realidad que el impacto clínico del tejido adiposo inflamado es aún mayor.

Aunque las concentraciones plasmáticas de FABP4 se asociaron con una mayor PCRus, la elevación concomitante de FABP5, condicionaba niveles todavía mayores de PCRus. Esta relación se mantenía de forma estadísticamente significativa tras ajustar por edad, género e IMC.

Nuestros datos indican que aunque los niveles circulantes tanto de FABP4 como de FABP5 son marcadores de trastornos metabólicos asociado a adiposidad, el aumento añadido de los niveles plasmáticos de FABP5 podría indicar un estado inflamatorio más avanzado.

Por otra parte, nuestros datos señalan que los niveles circulantes de FABP5 son un mejor marcador de arteriosclerosis subclínica que FABP4. Los pacientes con placas carotídeas presentaron de forma significativa niveles mayores de FABP5 circulante, sin embargo, no presentaban niveles mayores de FABP4. Esta correlación con la presencia de placas carotídeas no obstructivas se mantuvo tras múltiples ajustes. En concreto la asociación entre FABP5 y la presencia de placas carotídeas se mantuvo después de ajustar por género, edad, tabaquismo y PCRus, lo que sugiere un mecanismo de cooperación entre estos factores de riesgo y FABP5. Estos datos confirman las observaciones de Yeung y colaboradores<sup>219</sup>, que mostraron una correlación entre los niveles circulantes de FABP5 y el GIMc en los pacientes con SMet. La razón por la cual FABP5 circulante, pero no la FABP4 circulante, se asoció con la presencia de la placa carotídea podría explicarse por una mayor correlación de la FABP5 con la actividad inflamatoria en comparación con FABP4.

## Discusión

---

Otro dato a destacar, es que los pacientes fumadores presentaban niveles circulantes mayores de FABP5, sin embargo, los niveles circulantes de FABP4 eran similares entre fumadores y no fumadores. Las bases de esta observación no las conocemos, pero en caso de confirmarse, podrían ser un elemento que contribuyera a la relación existente entre FABP5 y la presencia de arteriosclerosis subclínica.

Si bien los niveles elevados de FABP4 circulante, nos deben sugerir un mayor riesgo de alteraciones metabólicas asociadas a la adiposidad, el aumento concomitante de FABP5 nos indicaría una aceleración del proceso metabólico y vascular y posibles complicaciones más allá del metabolismo, todo ello debido a un perfil lipídico perjudicial y a un estado general inflamatorio aumentado.

En cuanto al impacto de las variantes genéticas rs454550 y rs79370435 del gen de la *FABP5* en las concentraciones plasmáticas de FABP5 y diversas alteraciones metabólicas, observamos que la variante rara rs454550 estaba hiper-representada en los sujetos no obesos. Si esta observación pudiera ser replicada en otras poblaciones y con mayor número de participantes, podría sugerir que puede existir un efecto protector de este alelo raro contra la obesidad. Los únicos datos disponibles en la literatura sobre los polimorfismos de *FABP5* relacionados con los trastornos metabólicos, son de Bu L. y colaboradores<sup>211</sup>, que demostraron que los portadores de la variante genética rs454550 y rs79370435 se asociaron con un mayor riesgo de presentar diabetes tipo 2. Este dato resulta contradictorio con nuestros resultados. Los mecanismos que explicarían dichas observaciones no son del todo claros ya que el impacto de esta variante genética en la expresión de la FABP5 no es conocida en la actualidad.

Por otra parte, en nuestro estudio, las variantes genéticas examinadas no se asociaron con diferencias en las concentraciones plasmáticas de FABP5, por lo que al igual que sucede con la FABP4, podemos decir que los niveles plasmáticos de estas

adipoquinas están más influenciados por factores adquiridos que por condiciones genéticas.

En este trabajo también hemos estudiado la relación de los niveles circulantes de PCSK9 con FABP4 y FABP5 en el contexto de otros parámetros clínicos en pacientes con diabetes tipo 2, SMet, obesidad y dislipemia aterogénica. Nuestros datos confirmaron que las concentraciones plasmáticas de PCSK9, además de la conocida asociación con el C-LDL, se asociaban a alteraciones relacionadas con la obesidad y a parámetros del metabolismo de la glucosa.

Las concentraciones plasmáticas de PCSK9 fueron superiores en los pacientes con diabetes tipo 2, dislipemia aterogénica y SMet. Por otra parte, un mayor número de componentes de SMet se correlacionaron con concentraciones más altas de PCSK9 circulante. La asociación de PCSK9 con TG, colesterol-no-HDL y apoB se vio reforzada por su correlación con el perfil de la dislipemia aterogénica, según la evaluación de 2D-RMN.

Los niveles circulantes de PCSK9 se asociaron positivamente con el número de partículas VLDL y LDL y negativamente con el tamaño de partículas VLDL, LDL y HDL. Estos datos sugieren un papel fundamental de PCSK9 sobre el perfil lipídico más allá del metabolismo del C-LDL. Tal y como ya ha sido comunicado anteriormente<sup>248</sup>, esta asociación concuerda con los efectos observados en los niveles de TG en pacientes tratados con inhibidores de PCSK9, que se encuentran disminuídos. La correlación positiva entre el C-HDL y PCSK9 circulante es paradójica, y no podemos explicar este resultado.

Una observación original que refuerza estas correlaciones fue la existencia de una asociación positiva entre los niveles circulantes de PCSK9 y los niveles circulantes de FABP4, aunque no con los de FABP5. Esta relación, no comunicada previamente, refuerza el vínculo generalmente poco reconocido de las concentraciones plasmáticas

## Discusión

---

de PCSK9 con el metabolismo graso más allá del colesterol, como es la dislipemia aterogénica y la diabetes.

Las implicaciones clínicas de este hecho están por determinar, pero entre otras podrían estar en relación con las elevaciones de colesterol en la obesidad y trastornos relacionados.

Nuestros datos apoyan fuertemente un efecto de PCSK9 circulante sobre las lipoproteínas ricas triglicéridos (TRL). Los mecanismos asociados con este efecto aún no se entienden completamente. Se ha demostrado que PCSK9 puede interferir directamente sobre la síntesis de apoB, modulando así todas las partículas que contienen apoB<sup>252</sup>. Además, también ha sido sugerida la interacción existente entre PCSK9 circulante con los receptores VLDL<sup>253</sup>.

Como dato adicional, es interesante la asociación de PCSK9 y el metabolismo de la glucosa. Hemos observado una asociación entre los niveles altos de PCSK9 circulante y los niveles de insulina, glucosa, HbA1c y HOMA-IR. Teniendo en cuenta el impacto de la insulina sobre el metabolismo de TRL, no podemos excluir un efecto de la insulina mediada por PCSK9 en estas partículas. La correlación entre la glucosa y el metabolismo de la insulina con las concentraciones plasmáticas de PCSK9 son objeto de un intenso debate<sup>238, 239</sup>. En nuestro estudio, podemos decir que los pacientes diabéticos presentan niveles más altos PCSK9 circulante. El mecanismo que subyace a esta asociación no está del todo clara, pero se conoce que el gen del *PCSK9* está regulado además de por SREBP2, por los factores de transcripción SREBP1c y HNF1a. Dichos factores de transcripción se encuentran involucrados en el metabolismo de la insulina<sup>242, 245</sup>.

Nuestra observación sobre la relación de PCSK9 y FABP4 ofrece una nueva visión mecanicista sobre los efectos de PCSK9 más allá de papel en la regulación del colesterol LDL, influyendo probablemente sobre el metabolismo de los TG y la glucosa.

En este estudio, las concentraciones plasmáticas de PCSK9 no sirvieron como marcador de la arteriosclerosis subclínica en esta población. Sus concentraciones no se asociaron con valores del GIMc, ni siquiera se observaron diferentes niveles de PCSK9 en los pacientes expuestos a un mayor GIMc. También nos parece interesante la falta de asociación entre el PCSK9 circulante y los índices de adiposidad. PCSK9 no difirió significativamente con el IMC o con la distribución de la grasa evaluada mediante ecografía. Estos datos nos parecen coherentes debido a que PCSK9 no se expresa en el tejido adiposo.

Finalmente, se ha corroborado el impacto de las mutaciones de pérdida de función en las concentraciones de PCSK9 y C-LDL, lo que sugiere que estas variantes genéticas contribuyen a los perfiles lipídicos comunes.

### **Limitaciones**

Nuestros datos tienen varias limitaciones. Se tratan de estudios transversales, por lo que si bien podemos señalar asociaciones relevantes, clínicamente no podemos establecer vínculos causales.

Si bien el tamaño muestral es suficiente para detectar diferencias entre los diferentes grupos con trastornos metabólicos, el tamaño de la muestra es pequeño para los estudios genéticos. Nuestros datos deben ser considerados como observaciones que requieren un refrendo en otras poblaciones y con un número superior de individuos.

Los pacientes presentan diversos trastornos metabólicos y por tanto estos resultados no se pueden extrapolar a otros grupos, tales como población no obesa y joven.

En cuanto a los datos de las concentraciones plasmáticas de PCSK9 están realizadas en forma de PCSK9 total y no la fracción libre.

## *Discusión*

---

Además, aunque a los pacientes se les realizó un periodo de lavado suficiente de hipolipemiantes, no se puede excluir un impacto residual de éstos, especialmente sobre las concentraciones de PCSK9 después de este periodo de lavado.

## 9. CONCLUSIONES



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FABP4 Y FABP5 CIRCULANTES EN LAS ENFERMEDADES METABÓLICAS

Daiana Ibarretxe Gerediaga

## Conclusión 1

En un grupo de adultos afectados de diabetes tipo 2, obesidad y síndrome metabólico, los niveles circulantes de FABP4 están determinadas principalmente por condiciones adquiridas como la adiposidad, más que por determinantes genéticos. Las variantes genéticas estudiadas no tuvieron impacto sobre los niveles circulantes de FABP4, alteraciones metabólicas o arteriosclerosis subclínica. Esto sugiere que el acúmulo de grasa en el tejido adiposo es responsable de la hipersecreción de FABP4 a la circulación, lo que probablemente se traduce en efectos metabólicos a distancia.

## Conclusión 2

Las concentraciones plasmáticas de FABP5 se asocian con parámetros de adiposidad, metabolismo de la glucosa, lipólisis y con dislipemia aterogénica evaluada mediante RMN. Las concentraciones de FABP5, pero no las de FABP4, están incrementadas en individuos con placas de ateroma carotídeas. La elevación concomitante de FABP4 y FABP5 se asocia con niveles aún mayores de PCRus que por separado. FABP5 es el principal determinante de la presencia de placas y el alelo raro del polimorfismo rs454550 está hiper-representado en los sujetos no obesos.

Por todo ello consideramos a FABP5 como un biomarcador de enfermedades metabólicas asociadas a adiposidad que incluyen dislipemia aterogénica, que además señala un grado superior de inflamación y se asocia con un aumento de la arteriosclerosis subclínica. La determinación conjunta de FABP4 y FABP5 podría determinar de forma más precisa la situación de riesgo metabólico de este grupo de pacientes.

## *Conclusiones*

---

### **Conclusión 3**

Las concentraciones plasmáticas de PCSK9 están elevadas en pacientes con síndrome metabólico y diabetes tipo 2. Sus concentraciones se asocian con niveles de insulina y glucosa y el perfil de la dislipemia aterogénica según la evaluación de RMN, lo que sugiere que PCSK9 está altamente correlacionada con el metabolismo de la insulina, modulando así su impacto en el perfil de los lípidos. La relación de PCSK9 con aspectos del metabolismo glucídico y lipídico, más allá de las LDL, se ve reforzada por la observación de nuestro estudio que muestra como PCSK9 circulante se correlaciona positivamente con los niveles plasmáticos de FABP4.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FABP4 Y FABP5 CIRCULANTES EN LAS ENFERMEDADES METABÓLICAS

Daiana Ibarretxe Gerediaga

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Galli C, Marangoni F. Recent advances in the biology of n-6 fatty acids. *Nutrition*. 1997;13:978-85.
2. Yamashita A, Sugiura T, Waku K. Acyltransferases and transacylases involved in fatty acid remodeling of phospholipids and metabolism of bioactive lipids in mammalian cells. *J Biochem*. 1997;122:1-16.
3. Bouvier M, Loisel TP, Hebert T. Dynamic regulation of G-protein coupled receptor palmitoylation: potential role in receptor function. *Biochem Soc Trans*. 1995;23:577-81.
4. Jackson CS, Zlatkine P, Bano C, Kabouridis P, Mehul B, Parenti M, et al. Dynamic protein acylation and the regulation of localization and function of signal-transducing proteins. *Biochem Soc Trans*. 1995;23:568-71.
5. Mundy DI. Protein palmitoylation in membrane trafficking. *Biochem Soc Trans*. 1995;23:572-6.
6. Anderson MP, Welsh MJ. Fatty acids inhibit apical membrane chloride channels in airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:7334-8.
7. Ordway RW, Singer JJ, Walsh JV, Jr. Direct regulation of ion channels by fatty acids. *Trends Neurosci*. 1991;14:96-100.
8. 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;32:1449-56.
9. Grimaldi PA, Knobel SM, Whitesell RR, Abumrad NA. Induction of aP2 gene expression by nonmetabolized long-chain fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:10930-4.
10. Distel RJ, Robinson GS, Spiegelman BM. Fatty acid regulation of gene expression. Transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J Biol Chem*. 1992;267:5937-41.
11. Glatz JF, Van Breda E, Van der Vusse GJ. Intracellular transport of fatty acids in muscle. Role of cytoplasmic fatty acid-binding protein. *Adv Exp Med Biol*. 1998;441:207-18.
12. Brouns F, van der Vusse GJ. Utilization of lipids during exercise in human subjects: metabolic and dietary constraints. *Br J Nutr*. 1998;79:117-28.
13. Turcotte LP, Richter EA, Kiens B. Increased plasma FFA uptake and oxidation during prolonged exercise in trained vs. untrained humans. *Am J Physiol*. 1992;262:E791-9.
14. Mackie BG, Dudley GA, Kaciuba-Uscilko H, Terjung RL. Uptake of chylomicron triglycerides by contracting skeletal muscle in rats. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*. 1980;49:851-5.

## Bibliografía

---

15. Martin WH, 3rd, Dalsky GP, Hurley BF, Matthews DE, Bier DM, Hagberg JM, et al. Effect of endurance training on plasma free fatty acid turnover and oxidation during exercise. *Am J Physiol.* 1993;265:E708-14.
16. Suzuki K, Kono T. Evidence that insulin causes translocation of glucose transport activity to the plasma membrane from an intracellular storage site. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980;77:2542-5.
17. Hamilton JA. Fatty acid transport: difficult or easy? *J Lipid Res.* 1998;39:467-81.
18. Noy N, Donnelly TM, Zakim D. Physical-chemical model for the entry of water-insoluble compounds into cells. Studies of fatty acid uptake by the liver. *Biochemistry.* 1986;25:2013-21.
19. Zhang F, Kamp F, Hamilton JA. Dissociation of long and very long chain fatty acids from phospholipid bilayers. *Biochemistry.* 1996;35:16055-60.
20. Kamp F, Zakim D, Zhang F, Noy N, Hamilton JA. Fatty acid flip-flop in phospholipid bilayers is extremely fast. *Biochemistry.* 1995;34:11928-37.
21. Zakim D. Fatty acids enter cells by simple diffusion. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1996;212:5-14.
22. Abumrad N, Harmon C, Ibrahimi A. Membrane transport of long-chain fatty acids: evidence for a facilitated process. *J Lipid Res.* 1998;39:2309-18.
23. Kleinfeld AM, Storch J. Transfer of long-chain fluorescent fatty acids between small and large unilamellar vesicles. *Biochemistry.* 1993;32:2053-61.
24. Kleinfeld AM, Chu P, Storch J. Flip-flop is slow and rate limiting for the movement of long chain anthroyloxy fatty acids across lipid vesicles. *Biochemistry.* 1997;36:5702-11.
25. Kleinfeld AM, Storms S, Watts M. Transport of long-chain native fatty acids across human erythrocyte ghost membranes. *Biochemistry.* 1998;37:8011-9.
26. Richieri GV, Low PJ, Ogata RT, Kleinfeld AM. Thermodynamics of fatty acid binding to engineered mutants of the adipocyte and intestinal fatty acid-binding proteins. *J Biol Chem.* 1998;273:7397-405.
27. Sorrentino D, Robinson RB, Kiang CL, Berk PD. At physiologic albumin/oleate concentrations oleate uptake by isolated hepatocytes, cardiac myocytes, and adipocytes is a saturable function of the unbound oleate concentration. Uptake kinetics are consistent with the conventional theory. *J Clin Invest.* 1989;84:1325-33.
28. Schwenk RW, Holloway GP, Luiken JJ, Bonen A, Glatz JF. Fatty acid transport across the cell membrane: regulation by fatty acid transporters. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2010;82:149-54.

29. Kamp F, Hamilton JA. pH gradients across phospholipid membranes caused by fast flip-flop of un-ionized fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:11367-70.
30. Bonen A, Chabowski A, Luiken JJ, Glatz JF. Is membrane transport of FFA mediated by lipid, protein, or both? Mechanisms and regulation of protein-mediated cellular fatty acid uptake: molecular, biochemical, and physiological evidence. *Physiology (Bethesda)*. 2007;22:15-29.
31. Clarke DC, Miskovic D, Han XX, Calles-Escandon J, Glatz JF, Luiken JJ, et al. Overexpression of membrane-associated fatty acid binding protein (FABPpm) in vivo increases fatty acid sarcolemmal transport and metabolism. *Physiol Genomics*. 2004;17:31-7.
32. Harmon CM, Abumrad NA. Binding of sulfosuccinimidyl fatty acids to adipocyte membrane proteins: isolation and amino-terminal sequence of an 88-kD protein implicated in transport of long-chain fatty acids. *J Membr Biol*. 1993;133:43-9.
33. Harmon CM, Luce P, Beth AH, Abumrad NA. Labeling of adipocyte membranes by sulfo-N-succinimidyl derivatives of long-chain fatty acids: inhibition of fatty acid transport. *J Membr Biol*. 1991;121:261-8.
34. Abumrad NA, el-Maghrabi MR, Amri EZ, Lopez E, Grimaldi PA. Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J Biol Chem*. 1993;268:17665-8.
35. Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest*. 2001;108:785-91.
36. Febbraio M, Silverstein RL. CD36: implications in cardiovascular disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39:2012-30.
37. Ibrahimi A, Abumrad NA. Role of CD36 in membrane transport of long-chain fatty acids. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2002;5:139-45.
38. Khan NA, Besnard P. Oro-sensory perception of dietary lipids: new insights into the fat taste transduction. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1791:149-55.
39. Stuart LM, Bell SA, Stewart CR, Silver JM, Richard J, Goss JL, et al. CD36 signals to the actin cytoskeleton and regulates microglial migration via a p130Cas complex. *J Biol Chem*. 2007;282:27392-401.
40. Su X, Abumrad NA. Cellular fatty acid uptake: a pathway under construction. *Trends Endocrinol Metab*. 2009;20:72-7.



## Bibliografía

---

41. Tao N, Wagner SJ, Lublin DM. CD36 is palmitoylated on both N- and C-terminal cytoplasmic tails. *J Biol Chem.* 1996;271:22315-20.
42. Jochen AL, Hays J, Mick G. Inhibitory effects of cerulenin on protein palmitoylation and insulin internalization in rat adipocytes. *Biochim Biophys Acta.* 1995;1259:65-72.
43. Aitman TJ, Glazier AM, Wallace CA, Cooper LD, Norsworthy PJ, Wahid FN, et al. Identification of Cd36 (Fat) as an insulin-resistance gene causing defective fatty acid and glucose metabolism in hypertensive rats. *Nat Genet.* 1999;21:76-83.
44. Vistisen B, Roepstorff K, Roepstorff C, Bonen A, van Deurs B, Kiens B. Sarcolemmal FAT/CD36 in human skeletal muscle colocalizes with caveolin-3 and is more abundant in type 1 than in type 2 fibers. *J Lipid Res.* 2004;45:603-9.
45. Baillie AG, Coburn CT, Abumrad NA. Reversible binding of long-chain fatty acids to purified FAT, the adipose CD36 homolog. *J Membr Biol.* 1996;153:75-81.
46. Ibrahimi A, Sfeir Z, Magharaie H, Amri EZ, Grimaldi P, Abumrad NA. Expression of the CD36 homolog (FAT) in fibroblast cells: effects on fatty acid transport. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:2646-51.
47. Bastie CC, Hajri T, Drover VA, Grimaldi PA, Abumrad NA. CD36 in myocytes channels fatty acids to a lipase-accessible triglyceride pool that is related to cell lipid and insulin responsiveness. *Diabetes.* 2004;53:2209-16.
48. Nickerson JG, Alkhateeb H, Benton CR, Lally J, Nickerson J, Han XX, et al. Greater transport efficiencies of the membrane fatty acid transporters FAT/CD36 and FATP4 compared with FABPpm and FATP1 and differential effects on fatty acid esterification and oxidation in rat skeletal muscle. *J Biol Chem.* 2009;284:16522-30.
49. Eyre NS, Cleland LG, Mayrhofer G. FAT/CD36 expression alone is insufficient to enhance cellular uptake of oleate. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;370:404-9.
50. van Oort MM, van Doorn JM, Bonen A, Glatz JF, van der Horst DJ, Rodenburg KW, et al. Insulin-induced translocation of CD36 to the plasma membrane is reversible and shows similarity to that of GLUT4. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1781:61-71.
51. Drover VA, Nguyen DV, Bastie CC, Darlington YF, Abumrad NA, Pessin JE, et al. CD36 mediates both cellular uptake of very long chain fatty acids and their intestinal absorption in mice. *J Biol Chem.* 2008;283:13108-15.
52. Hoebe K, Georgel P, Rutschmann S, Du X, Mudd S, Crozat K, et al. CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature.* 2005;433:523-7.

53. Eyre NS, Cleland LG, Tandon NN, Mayrhofer G. Importance of the carboxyl terminus of FAT/CD36 for plasma membrane localization and function in long-chain fatty acid uptake. *J Lipid Res.* 2007;48:528-42.
54. Hoosdally SJ, Andress EJ, Wooding C, Martin CA, Linton KJ. The Human Scavenger Receptor CD36: glycosylation status and its role in trafficking and function. *J Biol Chem.* 2009;284:16277-88.
55. Doege H, Stahl A. Protein-mediated fatty acid uptake: novel insights from in vivo models. *Physiology (Bethesda).* 2006;21:259-68.
56. Hirsch D, Stahl A, Lodish HF. A family of fatty acid transporters conserved from mycobacterium to man. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:8625-9.
57. Chiu HC, Kovacs A, Blanton RM, Han X, Courtois M, Weinheimer CJ, et al. Transgenic expression of fatty acid transport protein 1 in the heart causes lipotoxic cardiomyopathy. *Circ Res.* 2005;96:225-33.
58. Kim JK, Gimeno RE, Higashimori T, Kim HJ, Choi H, Punreddy S, et al. Inactivation of fatty acid transport protein 1 prevents fat-induced insulin resistance in skeletal muscle. *J Clin Invest.* 2004;113:756-63.
59. Wu Q, Ortegon AM, Tsang B, Doege H, Feingold KR, Stahl A. FATP1 is an insulin-sensitive fatty acid transporter involved in diet-induced obesity. *Mol Cell Biol.* 2006;26:3455-67.
60. Heinzer AK, Watkins PA, Lu JF, Kemp S, Moser AB, Li YY, et al. A very long-chain acyl-CoA synthetase-deficient mouse and its relevance to X-linked adrenoleukodystrophy. *Hum Mol Genet.* 2003;12:1145-54.
61. DiRusso CC, Li H, Darwis D, Watkins PA, Berger J, Black PN. Comparative biochemical studies of the murine fatty acid transport proteins (FATP) expressed in yeast. *J Biol Chem.* 2005;280:16829-37.
62. Pei Z, Fraisl P, Berger J, Jia Z, Forss-Petter S, Watkins PA. Mouse very long-chain Acyl-CoA synthetase 3/fatty acid transport protein 3 catalyzes fatty acid activation but not fatty acid transport in MA-10 cells. *J Biol Chem.* 2004;279:54454-62.
63. Stahl A, Hirsch DJ, Gimeno RE, Punreddy S, Ge P, Watson N, et al. Identification of the major intestinal fatty acid transport protein. *Mol Cell.* 1999;4:299-308.
64. Gimeno RE, Hirsch DJ, Punreddy S, Sun Y, Ortegon AM, Wu H, et al. Targeted deletion of fatty acid transport protein-4 results in early embryonic lethality. *J Biol Chem.* 2003;278:49512-6.

## Bibliografía

---

65. Herrmann T, van der Hoeven F, Grone HJ, Stewart AF, Langbein L, Kaiser I, et al. Mice with targeted disruption of the fatty acid transport protein 4 (Fatp 4, Slc27a4) gene show features of lethal restrictive dermopathy. *J Cell Biol.* 2003;161:1105-15.
66. Moulson CL, Martin DR, Lugus JJ, Schaffer JE, Lind AC, Miner JH. Cloning of wrinkle-free, a previously uncharacterized mouse mutation, reveals crucial roles for fatty acid transport protein 4 in skin and hair development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:5274-9.
67. Herrmann T, Grone HJ, Langbein L, Kaiser I, Gosch I, Bennemann U, et al. Disturbed epidermal structure in mice with temporally controlled fatp4 deficiency. *J Invest Dermatol.* 2005;125:1228-35.
68. Doege H, Baillie RA, Ortegon AM, Tsang B, Wu Q, Punreddy S, et al. Targeted deletion of FATP5 reveals multiple functions in liver metabolism: alterations in hepatic lipid homeostasis. *Gastroenterology.* 2006;130:1245-58.
69. Hubbard B, Doege H, Punreddy S, Wu H, Huang X, Kaushik VK, et al. Mice deleted for fatty acid transport protein 5 have defective bile acid conjugation and are protected from obesity. *Gastroenterology.* 2006;130:1259-69.
70. Gimeno RE, Ortegon AM, Patel S, Punreddy S, Ge P, Sun Y, et al. Characterization of a heart-specific fatty acid transport protein. *J Biol Chem.* 2003;278:16039-44.
71. Diede HE, Rodilla-Sala E, Gunawan J, Manns M, Stremmel W. Identification and characterization of a monoclonal antibody to the membrane fatty acid binding protein. *Biochim Biophys Acta.* 1992;1125:13-20.
72. Stremmel W, Strohmeyer G, Borchard F, Kochwa S, Berk PD. Isolation and partial characterization of a fatty acid binding protein in rat liver plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82:4-8.
73. Stremmel W, Lotz G, Strohmeyer G, Berk PD. Identification, isolation, and partial characterization of a fatty acid binding protein from rat jejunal microvillous membranes. *J Clin Invest.* 1985;75:1068-76.
74. Potter BJ, Stump D, Schwieterman W, Sorrentino D, Jacobs LN, Kiang CL, et al. Isolation and partial characterization of plasma membrane fatty acid binding proteins from myocardium and adipose tissue and their relationship to analogous proteins in liver and gut. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987;148:1370-6.
75. Schwieterman W, Sorrentino D, Potter BJ, Rand J, Kiang CL, Stump D, et al. Uptake of oleate by isolated rat adipocytes is mediated by a 40-kDa plasma membrane fatty acid binding protein closely related to that in liver and gut. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85:359-63.

76. Sorrentino D, Stump D, Potter BJ, Robinson RB, White R, Kiang CL, et al. Oleate uptake by cardiac myocytes is carrier mediated and involves a 40-kD plasma membrane fatty acid binding protein similar to that in liver, adipose tissue, and gut. *J Clin Invest.* 1988;82:928-35.
77. Stremmel W. Fatty acid uptake by isolated rat heart myocytes represents a carrier-mediated transport process. *J Clin Invest.* 1988;81:844-52.
78. Sorrentino D, Van Ness K, Moukabary K, Berk PD. Hepatocellular  $22\text{Na}^+$  uptake: effect of oleate. *Am J Physiol.* 1991;261:G1024-9.
79. Berk PD, Wada H, Horio Y, Potter BJ, Sorrentino D, Zhou SL, et al. Plasma membrane fatty acid-binding protein and mitochondrial glutamic-oxaloacetic transaminase of rat liver are related. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:3484-8.
80. Stump DD, Zhou SL, Berk PD. Comparison of plasma membrane FABP and mitochondrial isoform of aspartate aminotransferase from rat liver. *Am J Physiol.* 1993;265:G894-902.
81. Bradbury MW, Berk PD. Mitochondrial aspartate aminotransferase: direction of a single protein with two distinct functions to two subcellular sites does not require alternative splicing of the mRNA. *Biochem J.* 2000;345 Pt 3:423-7.
82. Isola LM, Zhou SL, Kiang CL, Stump DD, Bradbury MW, Berk PD. 3T3 fibroblasts transfected with a cDNA for mitochondrial aspartate aminotransferase express plasma membrane fatty acid-binding protein and saturable fatty acid uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:9866-70.
83. Holloway GP, Lally J, Nickerson JG, Alkhateeb H, Snook LA, Heigenhauser GJ, et al. Fatty acid binding protein facilitates sarcolemmal fatty acid transport but not mitochondrial oxidation in rat and human skeletal muscle. *J Physiol.* 2007;582:393-405.
84. Chabowski A, Gorski J, Luiken JJ, Glatz JF, Bonen A. Evidence for concerted action of FAT/CD36 and FABPpm to increase fatty acid transport across the plasma membrane. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2007;77:345-53.
85. Hotamisligil GS, Bernlohr DA. Metabolic functions of FABPs-mechanisms and therapeutic implications. *Nat Rev Endocrinol.* 2015;11:592-605.
86. Ockner RK, Manning JA, Poppenhausen RB, Ho WK. A binding protein for fatty acids in cytosol of intestinal mucosa, liver, myocardium, and other tissues. *Science.* 1972;177:56-8.
87. Krusinova E, Pelikanova T. Fatty acid binding proteins in adipose tissue: a promising link between metabolic syndrome and atherosclerosis? *Diabetes Res Clin Pract.* 2008;82 Suppl 2:S127-34.

## Bibliografía

---

88. Hertzel AV, Bernlohr DA. The mammalian fatty acid-binding protein multigene family: molecular and genetic insights into function. *Trends Endocrinol Metab.* 2000;11:175-80.
89. Zimmerman AW, Veerkamp JH. New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59:1096-116.
90. Chmurzynska A. The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism. *J Appl Genet.* 2006;47:39-48.
91. 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.
92. Glatz JF, van der Vusse GJ. Cellular fatty acid-binding proteins: their function and physiological significance. *Prog Lipid Res.* 1996;35:243-82.
93. Reese-Wagoner A, Thompson J, Banaszak L. Structural properties of the adipocyte lipid binding protein. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1441:106-16.
94. Bernlohr DA, Simpson MA, Hertzel AV, Banaszak LJ. Intracellular lipid-binding proteins and their genes. *Annu Rev Nutr.* 1997;17:277-303.
95. Coe NR, Bernlohr DA. Physiological properties and functions of intracellular fatty acid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1391:287-306.
96. 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.
97. 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;258:10083-9.
98. 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;81:5468-72.
99. 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;132:850-5.
100. 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.

101. 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;40:207-9.
102. Kralisch S, Fasshauer M. Adipocyte fatty acid binding protein: a novel adipokine involved in the pathogenesis of metabolic and vascular disease? *Diabetologia*. 2013;56:10-21.
103. Tan NS, Shaw NS, Vinckenbosch N, Liu P, Yasmin R, Desvergne B, et al. Selective cooperation between fatty acid binding proteins and peroxisome proliferator-activated receptors in regulating transcription. *Mol Cell Biol*. 2002;22:5114-27.
104. Scheja L, Makowski L, Uysal KT, Wiesbrock SM, Shimshek DR, Meyers DS, et al. Altered insulin secretion associated with reduced lipolytic efficiency in aP2<sup>-/-</sup> mice. *Diabetes*. 1999;48:1987-94.
105. 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.
106. 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;96:5528-32.
107. 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;278:47636-43.
108. 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;279:52399-405.
109. Hertzel AV, Smith LA, Berg AH, Cline GW, Shulman GI, Scherer PE, et al. Lipid metabolism and adipokine levels in fatty acid-binding protein null and transgenic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;290:E814-23.
110. 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;6:624-37.
111. 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;19:1480-9.

## Bibliografía

---

112. 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;265:21075-85.
113. 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;84:1844-8.
114. 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;263:13626-34.
115. Boord JB, Fazio S, Linton MF. Cytoplasmic fatty acid-binding proteins: emerging roles in metabolism and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2002;13:141-7.
116. Perera RJ, Marcusson EG, Koo S, Kang X, Kim Y, White N, et al. Identification of novel PPARgamma target genes in primary human adipocytes. *Gene.* 2006;369:90-9.
117. 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.
118. 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 IkappaB kinase activities. *J Biol Chem.* 2005;280:12888-95.
119. 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.
120. 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.
121. Rolph MS, Young TR, Shum BO, Gorgun CZ, Schmitz-Peiffer C, Ramshaw IA, et al. Regulation of dendritic cell function and T cell priming by the fatty acid-binding protein AP2. *J Immunol.* 2006;177:7794-801.
122. 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;145:396-8.
123. Shum BO, Mackay CR, Gorgun CZ, Frost MJ, Kumar RK, Hotamisligil GS, et al. The adipocyte fatty acid-binding protein aP2 is required in allergic airway inflammation. *J Clin Invest.* 2006;116:2183-92.

124. Ghelfi E, Karaaslan C, Berkelhamer S, Akar S, Kozakewich H, Cataltepe S. Fatty acid-binding proteins and peribronchial angiogenesis in bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011;45:550-6.
125. Maver A, Medica I, Peterlin B. Search for sarcoidosis candidate genes by integration of data from genomic, transcriptomic and proteomic studies. *Med Sci Monit.* 2009;15:SR22-8.
126. Wang J, Tang J, Wang B, Song J, Liu J, Wei Z, et al. FABP4: a novel candidate gene for polycystic ovary syndrome. *Endocrine.* 2009;36:392-6.
127. Abdelwahab SA, Owada Y, Kitanaka N, Adida A, Sakagami H, Ono M, et al. Enhanced expression of adipocyte-type fatty acid binding protein in murine lymphocytes in response to dexamethasone treatment. *Mol Cell Biochem.* 2007;299:99-107.
128. Bennett JH, Shousha S, Puddle B, Athanasou NA. Immunohistochemical identification of tumours of adipocytic differentiation using an antibody to aP2 protein. *J Clin Pathol.* 1995;48:950-4.
129. Ohlsson G, Moreira JM, Gromov P, Sauter G, Celis JE. Loss of expression of the adipocyte-type fatty acid-binding protein (A-FABP) is associated with progression of human urothelial carcinomas. *Mol Cell Proteomics.* 2005;4:570-81.
130. Tonjes A, Kralisch S, Lossner U, Kovacs P, Bluher M, Stumvoll M, et al. Metabolic and genetic predictors of circulating adipocyte fatty acid-binding protein. *Int J Obes (Lond).* 2012;36:766-73.
131. Khalyfa A, Bhushan B, Hegazi M, Kim J, Kheirandish-Gozal L, Bhattacharjee R, 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.
132. Bhushan B, Khalyfa A, Spruyt K, Kheirandish-Gozal L, Capdevila OS, Bhattacharjee R, et al. Fatty-acid binding protein 4 gene polymorphisms and plasma levels in children with obstructive sleep apnea. *Sleep Med.* 2011;12:666-71.
133. Barbieri M, Marfella R, Rizzo MR, Boccardi V, Siniscalchi M, Schiattarella C, et al. The -8 UTR C/G polymorphism of PSMA6 gene is associated with susceptibility to myocardial infarction in type 2 diabetic patients. *Atherosclerosis.* 2008;201:117-23.
134. Tuncman G, Erbay E, Hom X, De Vivo I, Campos H, Rimm EB, 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.



*Bibliografía*

---

135. Ordovas JM. Identification of a functional polymorphism at the adipose fatty acid binding protein gene (FABP4) and demonstration of its association with cardiovascular disease: a path to follow. *Nutr Rev.* 2007;65:130-4.
136. Saksi J, Ijas P, Mayranpaa MI, Nuotio K, Isoviita PM, Tuimala J, et al. Low-expression variant of fatty acid-binding protein 4 favors reduced manifestations of atherosclerotic disease and increased plaque stability. *Circ Cardiovasc Genet.* 2014;7:588-98.
137. Veerkamp JH, Maatman RG. Cytoplasmic fatty acid-binding proteins: their structure and genes. *Prog Lipid Res.* 1995;34:17-52.
138. Radisky DC, Stallings-Mann M, Hirai Y, Bissell MJ. Single proteins might have dual but related functions in intracellular and extracellular microenvironments. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10:228-34.
139. Aoki N, Jin-no S, Nakagawa Y, Asai N, Arakawa E, Tamura N, et al. Identification and characterization of microvesicles secreted by 3T3-L1 adipocytes: redox- and hormone-dependent induction of milk fat globule-epidermal growth factor 8-associated microvesicles. *Endocrinology.* 2007;148:3850-62.
140. 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.
141. Schlottmann I, Ehrhart-Bornstein M, Wabitsch M, Bornstein SR, Lamounier-Zepter V. Calcium-dependent release of adipocyte fatty acid binding protein from human adipocytes. *Int J Obes (Lond).* 2014;38:1221-7.
142. Ertunc ME, Sikkeland J, Fenaroli F, Griffiths G, Daniels MP, Cao H, et al. Secretion of fatty acid binding protein aP2 from adipocytes through a nonclassical pathway in response to adipocyte lipase activity. *J Lipid Res.* 2015;56:423-34.
143. 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.
144. Maeda K, Cao H, Kono K, Gorgun CZ, Furuhashi M, Uysal KT, et al. Adipocyte/macrophage fatty acid binding proteins control integrated metabolic responses in obesity and diabetes. *Cell Metab.* 2005;1:107-19.
145. Cao H, Maeda K, Gorgun CZ, Kim HJ, Park SY, Shulman GI, et al. Regulation of metabolic responses by adipocyte/macrophage Fatty Acid-binding proteins in leptin-deficient mice. *Diabetes.* 2006;55:1915-22.

146. Cao H, Gerhold K, Mayers JR, Wiest MM, Watkins SM, Hotamisligil GS. Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. *Cell*. 2008;134:933-44.
147. Shaughnessy S, Smith ER, Kodukula S, Storch J, Fried SK. Adipocyte metabolism in adipocyte fatty acid binding protein knockout mice (aP2<sup>-/-</sup>) after short-term high-fat feeding: functional compensation by the keratinocyte [correction of keratinocyte] fatty acid binding protein. *Diabetes*. 2000;49:904-11.
148. 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.
149. 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.
150. Lee MY, Li H, Xiao Y, Zhou Z, Xu A, Vanhoutte PM. Chronic administration of BMS309403 improves endothelial function in apolipoprotein E-deficient mice and in cultured human endothelial cells. *Br J Pharmacol*. 2011;162:1564-76.
151. Uysal KT, Scheja L, Wiesbrock SM, Bonner-Weir S, Hotamisligil GS. Improved glucose and lipid metabolism in genetically obese mice lacking aP2. *Endocrinology*. 2000;141:3388-96.
152. Baar RA, Dingfelder CS, Smith LA, Bernlohr DA, Wu C, Lange AJ, et al. Investigation of in vivo fatty acid metabolism in AFABP/aP2<sup>(-/-)</sup> mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005;288:E187-93.
153. Furuhashi M, Tuncman G, Gorgun CZ, Makowski L, Atsumi G, Vaillancourt E, et al. Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2. *Nature*. 2007;447:959-65.
154. Lan H, Cheng CC, Kowalski TJ, Pang L, Shan L, Chuang CC, et al. Small-molecule inhibitors of FABP4/5 ameliorate dyslipidemia but not insulin resistance in mice with diet-induced obesity. *J Lipid Res*. 2011;52:646-56.
155. Yang R, Castriota G, Chen Y, Cleary MA, Ellsworth K, Shin MK, et al. RNAi-mediated germline knockdown of FABP4 increases body weight but does not improve the deranged nutrient metabolism of diet-induced obese mice. *Int J Obes (Lond)*. 2011;35:217-25.

## Bibliografía

---

156. 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.
157. Furuhashi M, Saitoh S, Shimamoto K, Miura T. Fatty Acid-Binding Protein 4 (FABP4): Pathophysiological Insights and Potent Clinical Biomarker of Metabolic and Cardiovascular Diseases. *Clin Med Insights Cardiol.* 2014;8:23-33.
158. 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.
159. 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.
160. Coll B, Cabre A, Alonso-Villaverde C, Lazaro I, Aragonés G, Parra S, 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.
161. 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.
162. 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.
163. 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;74:327-31.
164. Cabre A, Lazaro I, Cofan M, Jarauta E, Plana N, Garcia-Otin AL, et al. FABP4 plasma levels are increased in familial combined hyperlipidemia. *J Lipid Res.* 2010;51:1173-8.
165. Milner KL, van der Poorten D, Xu A, Bugianesi E, Kench JG, Lam KS, et al. Adipocyte fatty acid binding protein levels relate to inflammation and fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2009;49:1926-34.
166. 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.
167. 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.

168. Yeung DC, Xu A, Tso AW, Chow WS, Wat NM, Fong CH, et al. 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;32:132-4.
169. 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.
170. Lam DC, Xu A, Lam KS, Lam B, Lam JC, Lui MM, et al. Serum adipocyte-fatty acid binding protein level is elevated in severe OSA and correlates with insulin resistance. *Eur Respir J*. 2009;33:346-51.
171. Acioglu E, Yigit O, Volkan Sunter A, Taskin U, Bercik Inal B, Sahin M. Obesity and obstructive sleep apnea syndrome. *J Otolaryngol Head Neck Surg*. 2010;39:744-51.
172. Balci MM, Arslan U, Firat H, Kocaoglu I, Vural MG, Balci KG, et al. Serum levels of adipocyte fatty acid-binding protein are independently associated with left ventricular mass and myocardial performance index in obstructive sleep apnea syndrome. *J Investig Med*. 2012;60:1020-6.
173. Holm S, Ueland T, Dahl TB, Michelsen AE, Skjelland M, Russell D, et al. Fatty Acid binding protein 4 is associated with carotid atherosclerosis and outcome in patients with acute ischemic stroke. *PLoS One*. 2011;6:e28785.
174. 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.
175. Doi M, Miyoshi T, Hirohata S, Nakamura K, Usui S, Takeda K, et al. Association of increased plasma adipocyte fatty acid-binding protein with coronary artery disease in non-elderly men. *Cardiovasc Diabetol*. 2011;10:44.
176. 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*. 2010;211:164-9.
177. Bao Y, Lu Z, Zhou M, Li H, Wang Y, Gao M, et al. Serum levels of adipocyte fatty acid-binding protein are associated with the severity of coronary artery disease in Chinese women. *PLoS One*. 2011;6:e19115.

*Bibliografía*

---

178. Pala L, Monami M, Ciani S, Dicembrini I, Pasqua A, Pezzatini A, et al. Adipokines as possible new predictors of cardiovascular diseases: a case control study. *J Nutr Metab.* 2012;2012:253428.
179. Yoo HJ, Kim S, Park MS, Choi HY, Yang SJ, Seo JA, et al. Serum adipocyte fatty acid-binding protein is associated independently with vascular inflammation: analysis with (18)F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96:E488-92.
180. Tso AW, Lam TK, Xu A, Yiu KH, Tse HF, Li LS, et al. Serum adipocyte fatty acid-binding protein associated with ischemic stroke and early death. *Neurology.* 2011;76:1968-75.
181. 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.
182. Haider DG, Schindler K, Bohdjalian A, Prager G, Luger A, Wolzt M, et al. Plasma adipocyte and epidermal fatty acid binding protein is reduced after weight loss in obesity. *Diabetes Obes Metab.* 2007;9:761-3.
183. Lazaro I, Ferre R, Plana N, Aragones G, Girona J, Merino J, et al. Lifestyle changes lower FABP4 plasma concentration in patients with cardiovascular risk. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed).* 2012;65:152-7.
184. 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.
185. Simon I, Escote X, Vilarrasa N, Gomez J, Fernandez-Real JM, Megia A, et al. Adipocyte fatty acid-binding protein as a determinant of insulin sensitivity in morbid-obese women. *Obesity (Silver Spring).* 2009;17:1124-8.
186. Furuhashi M, Hiramitsu S, Mita T, Fuseya T, Ishimura S, Omori A, et al. Reduction of serum concentration of FABP4 by sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Lipid Res.* 2015.
187. Catala R, Cabre A, Hernandez-Flix S, Ferre R, Sangenis S, Plana N, et al. Circulating FABP4 and FABP5 levels are differently linked to OSA severity and treatment. *Sleep.* 2013;36:1831-7.
188. Sovova E, Hobzova M, Stejskal D, Sova M, Kolek V, Zapletalova J. Treatment of obstructive sleep apnea with continuous positive airway pressure decreases adipocyte fatty acid-binding protein levels. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2012;156:58-62.

189. Corripio R, Gonzalez-Clemente JM, Perez-Sanchez J, Naf S, Gallart L, Nosas R, et al. Weight loss in prepubertal obese children is associated with a decrease in adipocyte fatty-acid-binding protein without changes in lipocalin-2: a 2-year longitudinal study. *Eur J Endocrinol.* 2010;163:887-93.
190. 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;22:380-2.
191. Wu YW, Kao HL, Huang CL, Chen MF, Lin LY, Wang YC, et al. The effects of 3-month atorvastatin therapy on arterial inflammation, calcification, abdominal adipose tissue and circulating biomarkers. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2012;39:399-407.
192. Choi KM, Yannakoulia M, Park MS, Cho GJ, Kim JH, Lee SH, et al. Serum adipocyte fatty acid-binding protein, retinol-binding protein 4, and adiponectin concentrations in relation to the development of the metabolic syndrome in Korean boys: a 3-y prospective cohort study. *Am J Clin Nutr.* 2011;93:19-26.
193. 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.
194. Cabre A, Babio N, Lazaro I, Bullo M, Garcia-Arellano A, Masana L, et al. FABP4 predicts atherogenic dyslipidemia development. The PREDIMED study. *Atherosclerosis.* 2012;222:229-34.
195. Peeters W, de Kleijn DP, Vink A, van de Weg S, Schoneveld AH, Sze SK, et al. Adipocyte fatty acid binding protein in atherosclerotic plaques is associated with local vulnerability and is predictive for the occurrence of adverse cardiovascular events. *Eur Heart J.* 2011;32:1758-68.
196. Furuhashi M, Ishimura S, Ota H, Hayashi M, Nishitani T, Tanaka M, et al. Serum fatty acid-binding protein 4 is a predictor of cardiovascular events in end-stage renal disease. *PLoS One.* 2011;6:e27356.
197. von Eynatten M, Breitling LP, Roos M, Baumann M, Rothenbacher D, Brenner H. Circulating adipocyte fatty acid-binding protein levels and cardiovascular morbidity and mortality in patients with coronary heart disease: a 10-year prospective study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32:2327-35.

*Bibliografía*

---

198. Lee K, Santibanez-Koref M, Polvikoski T, Birchall D, Mendelow AD, Keavney B. Increased expression of fatty acid binding protein 4 and leptin in resident macrophages characterises atherosclerotic plaque rupture. *Atherosclerosis*. 2013;226:74-81.
199. Agardh HE, Folkersen L, Ekstrand J, Marcus D, Swedenborg J, Hedin U, et al. Expression of fatty acid-binding protein 4/aP2 is correlated with plaque instability in carotid atherosclerosis. *J Intern Med*. 2011;269:200-10.
200. Cabre A, Valdovinos P, Lazaro I, Bonet G, Bardaji A, Masana L. Parallel evolution of circulating FABP4 and NT-proBNP in heart failure patients. *Cardiovasc Diabetol*. 2013;12:72.
201. Aragonés G, Ferre R, Lazaro I, Cabre A, Plana N, Merino J, et al. Fatty acid-binding protein 4 is associated with endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis*. 2010;213:329-31.
202. Girona J, Rosales R, Plana N, Saavedra P, Masana L, Vallve JC. FABP4 induces vascular smooth muscle cell proliferation and migration through a MAPK-dependent pathway. *PLoS One*. 2013;8:e81914.
203. Aragonés G, Saavedra P, Heras M, Cabre A, Girona J, Masana L. Fatty acid-binding protein 4 impairs the insulin-dependent nitric oxide pathway in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Diabetol*. 2012;11:72.
204. Madsen P, Rasmussen HH, Leffers H, Honore B, Celis JE. Molecular cloning and expression of a novel keratinocyte protein (psoriasis-associated fatty acid-binding protein [PA-FABP]) that is highly up-regulated in psoriatic skin and that shares similarity to fatty acid-binding proteins. *J Invest Dermatol*. 1992;99:299-305.
205. Lin MH, Khnykin D. Fatty acid transporters in skin development, function and disease. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1841:362-8.
206. Armstrong EH, Goswami D, Griffin PR, Noy N, Ortlund EA. Structural basis for ligand regulation of the fatty acid-binding protein 5, peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (FABP5-PPARbeta/delta) signaling pathway. *J Biol Chem*. 2014;289:14941-54.
207. Babaev VR, Runner RP, Fan D, Ding L, Zhang Y, Tao H, et al. Macrophage Mal1 deficiency suppresses atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-null mice by activating peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-regulated genes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31:1283-90.

208. Sanson B, Wang T, Sun J, Wang L, Kaczocha M, Ojima I, et al. Crystallographic study of FABP5 as an intracellular endocannabinoid transporter. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2014;70:290-8.
209. Maeda K, Uysal KT, Makowski L, Gorgun CZ, Atsumi G, Parker RA, et al. Role of the fatty acid binding protein mal1 in obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2003;52:300-7.
210. Hoekstra M, Stitzinger M, van Wanrooij EJ, Michon IN, Kruijt JK, Kamphorst J, et al. Microarray analysis indicates an important role for FABP5 and putative novel FABPs on a Western-type diet. *J Lipid Res*. 2006;47:2198-207.
211. Bu L, Salto LM, De Leon KJ, De Leon M. Polymorphisms in fatty acid binding protein 5 show association with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011;92:82-91.
212. Maekawa M, Iwayama Y, Arai R, Nakamura K, Ohnishi T, Toyota T, et al. Polymorphism screening of brain-expressed FABP7, 5 and 3 genes and association studies in autism and schizophrenia in Japanese subjects. *J Hum Genet*. 2010;55:127-30.
213. 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*. 2002;43:2105-11.
214. Owada Y, Suzuki I, Noda T, Kondo H. Analysis on the phenotype of E-FABP-gene knockout mice. *Mol Cell Biochem*. 2002;239:83-6.
215. Jing C, Beesley C, Foster CS, Chen H, Rudland PS, West DC, et al. Human cutaneous fatty acid-binding protein induces metastasis by up-regulating the expression of vascular endothelial growth factor gene in rat Rama 37 model cells. *Cancer Res*. 2001;61:4357-64.
216. Schug TT, Berry DC, Shaw NS, Travis SN, Noy N. Opposing effects of retinoic acid on cell growth result from alternate activation of two different nuclear receptors. *Cell*. 2007;129:723-33.
217. Veerkamp JH, Zimmerman AW. Fatty acid-binding proteins of nervous tissue. *J Mol Neurosci*. 2001;16:133-42; discussion 51-7.
218. Hyder A, Zenhom M, Klapper M, Herrmann J, Schrezenmeir J. Expression of fatty acid binding proteins 3 and 5 genes in rat pancreatic islets and INS-1E cells: regulation by fatty acids and glucose. *Islets*. 2010;2:174-84.
219. Yeung DC, Wang Y, Xu A, Cheung SC, Wat NM, Fong DY, et al. Epidermal fatty-acid-binding protein: a new circulating biomarker associated with cardio-metabolic risk factors and carotid atherosclerosis. *Eur Heart J*. 2008;29:2156-63.



*Bibliografía*

---

220. Ishimura S, Furuhashi M, Watanabe Y, Hoshina K, Fuseya T, Mita T, et al. Circulating levels of fatty acid-binding protein family and metabolic phenotype in the general population. *PLoS One*. 2013;8:e81318.
221. Bagheri R, Qasim AN, Mehta NN, Terembula K, Kapoor S, Braunstein S, et al. Relation of plasma fatty acid binding proteins 4 and 5 with the metabolic syndrome, inflammation and coronary calcium in patients with type-2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol*. 2010;106:1118-23.
222. Hong J, Gu W, Zhang Y, Yan Q, Dai M, Shi J, et al. Different association of circulating levels of adipocyte and epidermal fatty acid-binding proteins with metabolic syndrome and coronary atherosclerosis in Chinese adults. *Atherosclerosis*. 2011;217:194-200.
223. Liu RZ, Graham K, Glubrecht DD, Germain DR, Mackey JR, Godbout R. Association of FABP5 expression with poor survival in triple-negative breast cancer: implication for retinoic acid therapy. *Am J Pathol*. 2011;178:997-1008.
224. Kannan-Thulasiraman P, Seachrist DD, Mahabeleshwar GH, Jain MK, Noy N. Fatty acid-binding protein 5 and PPARbeta/delta are critical mediators of epidermal growth factor receptor-induced carcinoma cell growth. *J Biol Chem*. 2010;285:19106-15.
225. Zhang F, Chen Y, Long J, Dong L, Wang Y, Chen Y. Dietary fatty acids affect lipid metabolism and estrogen receptor expression in N-methyl-N-nitrosourea-induced rat mammary cancer model. *Clin Lab*. 2015;61:389-95.
226. Jeong CY, Hah YS, Cho BI, Lee SM, Joo YT, Jung EJ, et al. Fatty acid-binding protein 5 promotes cell proliferation and invasion in human intrahepatic cholangiocarcinoma. *Oncol Rep*. 2012;28:1283-92.
227. Haunerland NH, Spener F. Fatty acid-binding proteins--insights from genetic manipulations. *Prog Lipid Res*. 2004;43:328-49.
228. Goldstein JL, Brown MS. The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annu Rev Biochem*. 1977;46:897-930.
229. Seidah NG, Benjannet S, Wickham L, Marcinkiewicz J, Jasmin SB, Stifani S, et al. The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:928-33.
230. Lambert G, Sjouke B, Choque B, Kastelein JJ, Hovingh GK. The PCSK9 decade. *J Lipid Res*. 2012;53:2515-24.
231. Costet P, Krempf M, Cariou B. PCSK9 and LDL cholesterol: unravelling the target to design the bullet. *Trends Biochem Sci*. 2008;33:426-34.

232. Chernogubova E, Strawbridge R, Mahdessian H, Malarstig A, Krapivner S, Gigante B, et al. Common and low-frequency genetic variants in the PCSK9 locus influence circulating PCSK9 levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32:1526-34.
233. Norata GD, Garlaschelli K, Grigore L, Raselli S, Tramontana S, Meneghetti F, et al. Effects of PCSK9 variants on common carotid artery intima media thickness and relation to ApoE alleles. *Atherosclerosis.* 2010;208:177-82.
234. Abifadel M, Varret M, Rabes JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet.* 2003;34:154-6.
235. Cohen JC, Boerwinkle E, Mosley TH, Jr., Hobbs HH. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N Engl J Med.* 2006;354:1264-72.
236. Huang CC, Fornage M, Lloyd-Jones DM, Wei GS, Boerwinkle E, Liu K. Longitudinal association of PCSK9 sequence variations with low-density lipoprotein cholesterol levels: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults Study. *Circ Cardiovasc Genet.* 2009;2:354-61.
237. Benn M, Nordestgaard BG, Grande P, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A. PCSK9 R46L, low-density lipoprotein cholesterol levels, and risk of ischemic heart disease: 3 independent studies and meta-analyses. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55:2833-42.
238. Lakoski SG, Lagace TA, Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Genetic and metabolic determinants of plasma PCSK9 levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94:2537-43.
239. Baass A, Dubuc G, Tremblay M, Delvin EE, O'Loughlin J, Levy E, et al. Plasma PCSK9 is associated with age, sex, and multiple metabolic markers in a population-based sample of children and adolescents. *Clin Chem.* 2009;55:1637-45.
240. Brouwers MC, Troutt JS, van Greevenbroek MM, Ferreira I, Feskens EJ, van der Kallen CJ, et al. Plasma proprotein convertase subtilisin kexin type 9 is not altered in subjects with impaired glucose metabolism and type 2 diabetes mellitus, but its relationship with non-HDL cholesterol and apolipoprotein B may be modified by type 2 diabetes mellitus: The CODAM study. *Atherosclerosis.* 2011;217:263-7.
241. Verges B, Duvillard L, Brindisi MC, Gautier E, Krempf M, Costet P, et al. Lack of association between plasma PCSK9 and LDL-apoB100 catabolism in patients with uncontrolled type 2 diabetes. *Atherosclerosis.* 2011;219:342-8.
242. Costet P, Cariou B, Lambert G, Lalanne F, Lardeux B, Jarnoux AL, et al. Hepatic PCSK9 expression is regulated by nutritional status via insulin and sterol regulatory element-binding protein 1c. *J Biol Chem.* 2006;281:6211-8.

## Bibliografía

---

243. Persson L, Galman C, Angelin B, Rudling M. Importance of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 in the hormonal and dietary regulation of rat liver low-density lipoprotein receptors. *Endocrinology*. 2009;150:1140-6.
244. Miao J, Manthena PV, Haas ME, Ling AV, Shin DJ, Graham MJ, et al. Role of Insulin in the Regulation of Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35:1589-96.
245. Horton JD, Shah NA, Warrington JA, Anderson NN, Park SW, Brown MS, et al. Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:12027-32.
246. Mbikay M, Sirois F, Mayne J, Wang GS, Chen A, Dewpura T, et al. PCSK9-deficient mice exhibit impaired glucose tolerance and pancreatic islet abnormalities. *FEBS Lett*. 2010;584:701-6.
247. Langhi C, Le May C, Gmyr V, Vandewalle B, Kerr-Conte J, Krempf M, et al. PCSK9 is expressed in pancreatic delta-cells and does not alter insulin secretion. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;390:1288-93.
248. Guardiola M, Plana N, Ibarretxe D, Cabre A, Gonzalez M, Ribalta J, et al. Circulating PCSK9 levels are positively correlated with NMR-assessed atherogenic dyslipidaemia in patients with high cardiovascular risk. *Clin Sci (Lond)*. 2015;128:877-82.
249. Djousse L, Gaziano JM. Plasma levels of FABP4, but not FABP3, are associated with increased risk of diabetes. *Lipids*. 2012;47:757-62.
250. Mita T, Furuhashi M, Hiramitsu S, Ishii J, Hoshina K, Ishimura S, et al. FABP4 is secreted from adipocytes by adenylyl cyclase-PKA- and guanylyl cyclase-PKG-dependent lipolytic mechanisms. *Obesity (Silver Spring)*. 2015;23:359-67.
251. Mallol R, Amigo N, Rodriguez MA, Heras M, Vinaixa M, Plana N, et al. Liposcale: a novel advanced lipoprotein test based on 2D diffusion-ordered 1H NMR spectroscopy. *J Lipid Res*. 2015;56:737-46.
252. Sun H, Samarghandi A, Zhang N, Yao Z, Xiong M, Teng BB. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 interacts with apolipoprotein B and prevents its intracellular degradation, irrespective of the low-density lipoprotein receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32:1585-95.
253. Roubtsova A, Munkonda MN, Awan Z, Marcinkiewicz J, Chamberland A, Lazure C, et al. Circulating proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) regulates VLDLR protein and

triglyceride accumulation in visceral adipose tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*  
2011;31:785-91.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FABP4 Y FABP5 CIRCULANTES EN LAS ENFERMEDADES METABÓLICAS

Daiana Ibarretxe Gerediaga