



**FABP4 I BIOMARCADORS DE LA DISFUNCIÓ ENDOTELIAL. ESTUDI
CLÍNIC I IN VITRO**
Gemma Aragonès Bargalló

ISBN: 978-84-693-8853-2
Dipòsit Legal: T.1951-2010

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

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

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

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FABP4 I BIOMARCADORS DE LA DISFUNCIÓ ENDOTELIAL. ESTUDI CLÍNIC I IN VITRO

Gemma Aragonès Bargalló

ISBN:978-84-693-8853-2/DL:T.1951-2010

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FABP4 I BIOMARCADORS DE LA DISFUNCIÓ ENDOTELIAL. ESTUDI CLÍNIC I IN VITRO

Gemma Aragonès Bargalló

ISBN:978-84-693-8853-2/DL:T.1951-2010

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
Unitat de Recerca en Lípids i Arteriosclerosi
Departament de Medicina i Cirurgia
Facultat de Medicina i Ciències de la Salut
Programa de Doctorat: NUTRICIÓ I METABOLISME



FABP4 i biomarcadors de disfunció endotelial.
Estudi clínic i *in vitro*

Gemma Aragonès Bargalló

TESI DOCTORAL 2010

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FABP4 I BIOMARCADORS DE LA DISFUNCIÓ ENDOTELIAL. ESTUDI CLÍNIC I IN VITRO

Gemma Aragonès Bargalló

ISBN:978-84-693-8853-2/DL:T.1951-2010

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

| DADES IDENTIFICATIVES DE LA TESI DOCTORAL | |
|--|--|
| Títol de la tesi doctoral FABP4 I BIOMARCADORS DE LA DISFUNCIÓ ENDOTELIAL. ESTUDI CLÍNIC I <i>IN VITRO</i> | |
| Doctorand/a GEMMA ARAGONÈS BARGALLÓ | |
| Programa de Doctorat / Programa Oficial de Postgrau NUTRICIÓ I METABOLISME | |
| Departament MEDICINA I CIRURGIA | Grup de recerca UNITAT DE RECERCA EN LÍPIDS I ARTERIOSCLEROSI |
| Director/a LLUÍS MASANA MARÍN | Correu electrònic del Director/a luis.masana@urv.cat |
| Codirector/a JOSEFA GIRONA TELL | Correu electrònic del Codirector/a josefa.girona@urv.cat |
| Tutor/a (si s'escau) | Correu electrònic del Tutor/a |

| INFORME DEL DIRECTOR DE TESI | | |
|--|----|----|
| El/s (co)director/s sotasignats emeten l'informe de la tesi doctoral presentada a tràmit de dipòsit, en base a la revisió dels següents elements de qualitat: | | |
| | SI | NO |
| La tesi consisteix en un treball original de recerca | x | |
| El títol reflecteix acuradament el contingut de la tesi | x | |
| Les hipòtesis i/o els objectius de la tesi estan clarament formulats | x | |
| La metodologia està descrita | x | |
| Hi consta el procediment | x | |
| Hi consten els resultats i la discussió dels mateixos | x | |
| Les conclusions de la tesi corresponen a les hipòtesis i/o objectius formulats | x | |
| La bibliografia està ben reflectida | x | |
| D'aquesta tesi es deriven les següents aportacions científiques: | | |
| Peripheral Artery Tonometry and Endothelial Function, Inflammation and Lipid Oxidation biomarkers in patients with cardiovascular risk factors | | |
| Gemma Aragonès, Raimon Ferré, Josefa Girona, Núria Plana, Jordi Merino, Mercedes Heras, Lluís Masana (en revisió). | | |
| Fatty acid binding protein 4 is associated with endothelial dysfunction in type 2 diabetic patients | | |
| Gemma Aragonès, Raimon Ferré, Iolanda Lázaro, Anna Cabré, Núria Plana, Jordi Merino, Mercedes Heras, Josefa Girona, Lluís Masana (<i>Atherosclerosis</i> 2010, en premsa). DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2010.07.026 | | |
| Fatty Acid Binding Protein 4 Induces Endothelial Dysfunction Throught Insulin-Signaling Pathway in Human Umbilical Vascular Endothelial Cells. | | |
| Gemma Aragonès, Josefa Girona, Anna Cabré, Iolanda Lázaro, Mercedes Heras, Lluís Masana (en revisió). | | |
| Altres comentaris sobre la qualitat de la tesi: | | |

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

Reus, 5 de Juliol de 2010

LLUÍS MASANA MARÍN
Director/a de la tesi

JOSEFA GIRONA TELL
Codirector/a (si s'escau)

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FABP4 I BIOMARCADORS DE LA DISFUNCIÓ ENDOTELIAL. ESTUDI CLÍNIC I IN VITRO

Gemma Aragonès Bargalló

ISBN:978-84-693-8853-2/DL:T.1951-2010

Als meus avis

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FABP4 I BIOMARCADORS DE LA DISFUNCIÓ ENDOTELIAL. ESTUDI CLÍNIC I IN VITRO

Gemma Aragonès Bargalló

ISBN:978-84-693-8853-2/DL:T.1951-2010

AGRAÏMENTS

Poques vegades tenim l'oportunitat d'expressar i agrair tot allò que sentim.

En breus paraules m'agradaria dirigir-me a tots vosaltres, que heu fet possible d'una manera o altra, la realització d'aquesta tesi doctoral.

Fent memòria, han estat quasi 4 anys, ens els quals he pogut gaudir de pertànyer a un grup "punter" en l'àmbit de la recerca bàsica i clínica, i estic molt satisfeta del resultat obtingut tant professional com personalment.

En primer lloc, donar les gràcies al Prof. Lluís Masana per donar-me l'oportunitat de compartir amb el seu grup les meves inquietuts científiques i formar-me com a futura "investigadora".

A la Dra Josefa Girona, per transmetre'm en tot moment la il·lusió del saber cada dia més, en no desistir mai i seguir sempre endavant. El seu suport incondicional i les seves paraules m'han acompanyat des del primer a l'últim dia. Moltes gràcies.

A tota l'URLA, ha estat un plaer compartir tots aquests moments inoblidables amb vosaltres. Hem estat una gran família.

Al Gabinet Vascular, per acollir-me i ensenyar-me el dia a dia del treball clínic tan valuós que realitzeu. Gràcies per confiar en mi.

Al CRB, per ser sempre tan benvinguda al vostre laboratori. Sou encantadors.

Al Biobanc, vosaltres va ser les responsables d'introduir-me en aquest món tan fantàstic. Gràcies.

A la professora biòloga de batxillerat, Isabel Felip, qui em va transmetre la seva vocació amb una pedagogia activa.

A la meva colla d'amics, les nenes del bàsquet i els amics de la universitat. Simplement gràcies per ser-hi sempre. Pel vostre suport incondicional. En resum, sou genials!

A la meva família, especialment als meus pares, que m'ho han donat tot. M'han ensenyat els valors més importants a seguir, m'han acompanyat sempre en els moments més bonics i més difícils d'aquest camí, els seus consells dia a dia, el seu optimisme, la seva perseverància, el seu recolzament i la seva confiança en mi.

I finalment, al meu germà Gerard, ha estat sempre el meu referent a seguir i m'ha ensenyat a no defallir mai.

Moltes gràcies a tots.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FABP4 I BIOMARCADORS DE LA DISFUNCIÓ ENDOTELIAL. ESTUDI CLÍNIC I IN VITRO

Gemma Aragonès Bargalló

ISBN:978-84-693-8853-2/DL:T.1951-2010

Índex

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FABP4 I BIOMARCADORS DE LA DISFUNCIÓ ENDOTELIAL. ESTUDI CLÍNIC I IN VITRO

Gemma Aragonès Bargalló

ISBN:978-84-693-8853-2/DL:T.1951-2010

| | |
|---|----|
| 1. PRESENTACIÓ I JUSTIFICACIÓ | 17 |
| 2. INTRODUCCIÓ | 21 |
| 2.1. ATEROSCLEROSI I MALALTIA CARDIOVASCULAR..... | 21 |
| 2.1.1. Risc cardiovascular..... | 21 |
| 2.1.2. Patogènia de l'aterosclerosi..... | 22 |
| 2.1.3. Obesitat, síndrome metabòlica, diabetis tipus 2 i malaltia cardiovascular | |
| 2.1.3.1. Diabetis mellitus tipus 2 i resistència a la insulina..... | 25 |
| 2.1.3.2. Obesitat..... | 25 |
| 2.1.3.3. La síndrome metabòlica..... | 27 |
| 2.2. DISFUNCIÓ ENDOTELIAL..... | 29 |
| 2.2.1. L'endoteli i la disfunció endotelial..... | 29 |
| 2.2.2. Paper de l'Òxid Nítric (NO) en l'endoteli..... | 30 |
| 2.2.3. Biomarcadors circulants..... | 32 |
| 2.2.3.1. Molècules d'adhesió endotelials..... | 33 |
| 2.2.3.1.1. E-selectina..... | 35 |
| 2.2.3.1.2. VCAM1 i ICAM1..... | 36 |
| 2.2.3.2. Oxidació lipídica..... | 37 |
| 2.2.3.3. Molècules mediadores d'inflamació (IL6, TNF α , PCR)..... | 38 |
| 2.2.4. Vies de senyalització implicades en la funció endotelial..... | 39 |
| 2.2.4.1. PI3K/Akt/eNOS..... | 39 |
| 2.2.4.2. Via de les MAPK (<i>Mitogen activated protein kinase</i>)..... | 40 |
| 2.2.4.3. Balanç de les vies de senyalització dependents d'insulina..... | 41 |
| 2.2.4.4. Vies de senyalització paral·leles involucrades en l'homeòstasi de la glucosa i l'homeòstasi vascular..... | 42 |
| 2.2.4.5. El paper de NF-kB (<i>Nuclear factor kB</i>) en l'endoteli..... | 43 |
| 2.3. ESTUDIS FUNCIONALS I D'IMATGE PER LA VALORACIÓ DE LA FUNCIÓ ENDOTELIAL I L'ARTERIOSCLEROSI SUBCLÍNICA..... | 45 |
| 2.3.1. Test intracoronari de l'AcetilColina..... | 46 |
| 2.3.2. La Dilatació mediada per Flux (FMD)..... | 46 |
| 2.3.3. Tonometria Arterial Perifèrica (PAT)..... | 47 |
| 2.3.4. Gruix de l'Íntima-mitja de les caròtides..... | 49 |
| 2.3.5. Índex Turmell-Braç (ITB)..... | 50 |

| | |
|---|-----------|
| 2.4. ADIPOCYTE FATTY ACID BINDING PROTEIN (FABP4)..... | 51 |
| 2.4.1. Família de FABP..... | 51 |
| 2.4.2. FABP4..... | 55 |
| 2.4.2.1. FABP4 en macròfags..... | 57 |
| 2.4.2.2. FABP4 circulant i alteracions metabòliques..... | 58 |
| 2.4.2.3. FABP4 com a diana terapèutica..... | 59 |
| 3. HIPÒTESI I OBJECTIUS..... | 65 |
| 4. MATERIALS I MÈTODES..... | 69 |
| 4.1. ESTUDI CLÍNIC..... | 69 |
| 4.1.1. Població estudiada..... | 69 |
| 4.1.2. Obtenció de mostres i anàlisi bioquímica..... | 70 |
| 4.1.3. Estudi vascular..... | 70 |
| 4.1.3.1. Tonometria arterial perifèrica..... | 70 |
| 4.1.4. Estudi de FABP4 circulant per la tècnica d'ELISA..... | 72 |
| 4.1.5. <i>Human cytokine antibody array</i> : sVCAM1, ICAM1, E-selectina, TNF α i IL6..... | 73 |
| 4.1.6. Anàlisi de les LDL oxidades..... | 74 |
| 4.1.7. Anàlisi dels anticossos de les LDL oxidades..... | 75 |
| 4.2. ESTUDI <i>IN VITRO</i> | 76 |
| 4.2.1. Cultius cel·lulars i reactius..... | 76 |
| 4.2.2. Disseny dels experiments in vitro amb cèl·lules HUVEC..... | 78 |
| 4.2.2.1. Efecte de FABP4 en l'activació d'eNOS en estat basal..... | 78 |
| 4.2.2.2. Dosi-resposta d'eNOS i d'Akt per l'acció de la insulina en HUVECs..... | 78 |
| 4.2.2.3. Temps-resposta d'eNOS i d'Akt per l'acció de la insulina en HUVECs..... | 79 |
| 4.2.2.4. Efecte de FABP4 en l'activació d'eNOS previ a l'estimulació amb insulina..... | 79 |
| 4.2.2.5. Efecte de FABP4 en l'activació d'Akt previ a l'estimulació amb insulina..... | 80 |
| 4.2.2.6. Efecte de FABP4 en la via de senyalització MAPK/ERK previ a l'activació amb insulina..... | 80 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2.2.7. Efecte de FABP4 en l'expressió del mRNA de l'eNOS previ a l'estimulació amb insulina..... | 81 |
| 4.2.2.8. Efecte de FABP4 en l'expressió del mRNA de l'E-selectina previ a l'estimulació amb insulina..... | 82 |
| 4.2.2.9. Efecte de FABP4 en l'expressió del mRNA de VCAM1 previ a l'estimulació amb insulina | 83 |
| 4.2.2.10. Assaig d'adhesió dels leucòcits a l'endoteli vascular..... | 84 |
| 4.2.2.10.1. Marcatge fluorescent de les cèl·lules Jurkat..... | 84 |
| 4.2.2.10.2. Procediment de l'assaig d'adhesió..... | 84 |
| 4.2.3. Procediment de la preparació de lisats totals d'HUVEC amb tampó RIPA..... | 85 |
| 4.2.4. Citotoxicitat de les condicions experimentals..... | 86 |
| 4.2.5. Quantificació de proteïna pel mètode Bradford..... | 87 |
| 4.2.6. Western Blot d'eNOS, Akt, MAPK, FABP4 i actina..... | 87 |
| 4.2.7. Expressió de mRNA d'eNOS, E-selectina i VCAM1..... | 88 |
| 4.2.7.1. Aïllament de RNA..... | 88 |
| 4.2.7.2. PCR quantitativa a temps real (RT-PCR)..... | 88 |
| 4.3. ANÀLISI ESTADÍSTICA..... | 89 |
| 4.3.1. Estudi clínic..... | 89 |
| 4.3.2. Estudi <i>in vitro</i> | 89 |
| 5. RESULTATS..... | 93 |
| 5.1. ESTUDI CLÍNIC..... | 93 |
| 5.1.1. Relació de RHI-PAT i biomarcadors de funció endotelial, inflamació i oxidació lipídica..... | 93 |
| 5.1.2. FABP4 està associada a la disfunció endotelial en pacients amb diabetis tipus 2..... | 98 |
| 5.2. ESTUDI <i>IN VITRO</i> . FABP4 indueix disfunció endotelial a través de la via de senyalització depenent d'insulina en HUVECs..... | 103 |
| 5.2.1. Efecte de FABP4 en la via de senyalització depenent d'insulina (IRS-1/PI3-kinase/Akt/eNOS) en HUVECs..... | 103 |
| 5.2.2. Efecte de FABP4 en la via de senyalització MAPK/ERK..... | 104 |
| 5.2.3. Efecte de FABP4 en l'expressió del mRNA de l'eNOS previ a l'estimulació amb insulina..... | 105 |

| | |
|---|------------|
| 5.2.4. Efecte de FABP4 en l'expressió del mRNA de l'E-selectina previ a l'estimulació amb insulina..... | 105 |
| 5.2.5. Efecte de FABP4 en l'expressió del mRNA de VCAM1 previ a l'estimulació amb insulina..... | 106 |
| 5.2.6. Efecte de FABP4 en l'adhesió dels leucòcits a les cèl·lules endotelials..... | 106 |
| 5.2.7. Figures..... | 107 |
| 6. DISCUSSIÓ..... | 123 |
| 7. CONCLUSIONS FINALS..... | 137 |
| 8. REFERÈNCIES..... | 141 |
| 9. ANNEX I..... | 159 |
| 9.1. Full d'informació al participant i consentiment informat..... | 159 |
| 10. ANNEX II Procediments Normalitzats de Treball (PNT) | 163 |
| 10.1. PNT de la detecció de les LDL oxidades per ELISA..... | 163 |
| 10.2. PNT de la detecció dels anticossos de les LDL oxidades per ELISA..... | 166 |
| 10.3. PNT de la detecció de FABP4 per ELISA..... | 169 |
| 10.4. PNT del mètode Bradford..... | 175 |
| 10.5. PNT de l'Electroforesi SDS-PAGE..... | 178 |
| 10.6. PNT del Western Blot..... | 183 |
| 10.7. PNT de l'Extracció de RNA dels extractes cel·lulars..... | 189 |
| 10.8. PNT de la quantificació del RNA per Qubit..... | 193 |
| 10.9. PNT de la RT-PCR | 195 |
| 11. ANNEX III | 201 |

Fatty acid-binding protein 4 is associated with endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes. Gemma Aragonès, Raimon Ferré, Iolanda Lázaro, Anna Cabré, Núria Plana, Jordi Merino, Mercedes Heras, Josefa Girona, Lluís Masana.

Atherosclerosis 2010, en premsa.

DOI: [10.1016/j.atherosclerosis.2010.07.026](https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2010.07.026)

1. Presentació i Justificació

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FABP4 I BIOMARCADORS DE LA DISFUNCIÓ ENDOTELIAL. ESTUDI CLÍNIC I IN VITRO

Gemma Aragonès Bargalló

ISBN:978-84-693-8853-2/DL:T.1951-2010

El projecte de la tesi doctoral, que us presento, s'ha realitzat a la Unitat de Recerca en Lípids i Arteriosclerosi del departament de Medicina i Cirurgia de la Facultat de Ciències de la Salut i Medicina de la Universitat Rovira i Virgili i ha estat dirigida pel Prof. Lluís Masana i la Dra. Josefa Girona.

El principal objectiu de la Unitat a gran escala, és contribuir a la reducció de la morbiditat i mortalitat cardiovascular. Actualment, les malalties cardiovasculars són la primera causa de mortalitat a Catalunya, i a la resta del món industrialitzat. Les prediccions actuals indiquen que, l'any 2020, les malalties cardiovasculars i l'aterosclerosi, en particular, es convertiran en la principal causa mundial de mortalitat. Els estudis epidemiològics han revelat que l'aterosclerosi és una malaltia progressiva i multifactorial, resultat de diversos factors ambientals i genètics. En el nostre projecte hem intentat contribuir en la lluita pel que s'ha considerat l'epidèmia més important del segle XXI.

Des d'un punt de vista científic, aquesta tesi pretén aportar noves dades sobre el mecanisme bàsic de l'aterosclerosi i la disfunció endotelial. Proporcionar una nova evidència clínica sobre la funció endotelial valorada a nivell perifèric i la seva associació amb altres factors cardiovasculars com poden ser els biomarcadors circulants endotelials i la proteïna FABP4. Els resultats de l'estudi ens podrien ajudar a entendre millor la relació de la funció endotelial amb els biomarcadors plasmàtics i els paràmetres vasculars. A nivell *in vitro*, hem estudiat els mecanismes moleculars específics, implicats en la disfunció endotelial, i el paper de la proteïna FABP4 circulant en aquest procés. Tot i que s'ha demostrat l'increment en circulació de FABP4 en presència de la síndrome metabòlica, diabetis i obesitat, actualment, a nivell molecular no existeix cap relació causal entre la presència de la FABP4 plasmàtica i l'aparició d'alteracions metabòliques. Per altra banda, un estudi recent, mostra l'impacte de la FABP4 circulant en la disminució de la contractibilitat en cardiomiòcits, la qual cosa fa pensar, que la FABP4 en plasma podria tenir un efecte directe en teixits perifèrics. Per tant, els nostres resultats suggereixen una evidència més que els nivells elevats de FABP4 plasmàtica podrien estar implicats en el dany arterial en condicions d'obesitat, SM i diabetis tipus 2.

La tesi està dividida en diferents apartats. La Introducció que proporciona els coneixements genèrics necessaris per poder entendre el curs del treball. A continuació, la Hipòtesi i els Objectius que justifiquen el desenvolupament dels estudis experimentals. Tot seguit, els Materials i els Mètodes utilitzats per dur a terme tots els

experiments i valoracions. Els resultats es presenten per separat segons l'estudi clínic i l'estudi *in vitro*, juntament amb les taules i figures respectives. Després, la Discussió i les Conclusions finals de la tesi. Finalment, les Referències de tota la bibliografia consultada i l'Annex amb els procediments normalitzats de treball del laboratori.

Els resultats de la tesi s'han descrit en tres manuscrits dels quals, dos es troben sotmesos a editor en revistes científiques d'àmbit internacional i un ha estat publicat a la revista *Atherosclerosis* (Annex III).

En els laboratoris de l'URLA es treballa segons el sistema de la norma de qualitat ISO 9001 garantint els resultats obtinguts en aquesta tesi.

2. Introducció

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FABP4 I BIOMARCADORS DE LA DISFUNCIÓ ENDOTELIAL. ESTUDI CLÍNIC I IN VITRO

Gemma Aragonès Bargalló

ISBN:978-84-693-8853-2/DL:T.1951-2010

2.1. ATEROSCLEROSI I MALALTIA CARDIOVASCULAR

L'aterosclerosi és un procés patològic de caràcter inflamatori, que afecta a les grans artèries (coronàries, aorta, caròtides, cerebrals i fins i tot a les artèries perifèriques) i és la principal causa de les malalties cardiovasculars [1]. Els estudis epidemiològics han revelat que l'aterosclerosi és una malaltia progressiva i multifactorial [2], resultat de diversos factors ambientals i genètics. Es caracteritza, a grans trets, per un engruiximent i pèrdua d'elasticitat de la paret dels vasos sanguinis com a conseqüència de l'acumulació a l'espai subendotelial de material lipídic, teixit fibrós, i restes de tipus cel·lulars i altres productes sanguinis. L'evolució d'aquestes lesions pot donar lloc a l'oclusió de la llum vascular, provocat pel creixement de la pròpia lesió subendotelial o mitjançant complicacions trombòtiques, que es desencadenen en l'aparició de manifestacions clíniques com la malaltia isquèmica cardíaca o els accidents vasculars cerebrals [3]. Aquestes complicacions representen la major causa de mort als països industrialitzats. Concretament, a Espanya, 125.000 morts anuals es deuen a l'aterosclerosi, 5 milions de persones ingressen a l'hospital a causa de la malaltia i més de 560.000 pacients són donats d'alta de l'hospital amb el diagnòstic de patir malaltia cardiovascular [4]. Les prediccions actuals indiquen que l'any 2020 les malalties cardiovasculars i l'aterosclerosi, en particular, es convertiran en la principal causa mundial de mortalitat. Tots dos, l'envelliment progressiu de la població del món i un estil de vida poc saludables, hauran contribuït a aquest procés. La malaltia ateroscleròtica es considera un procés multifactorial del qual es coneixen un elevat nombre de factors de risc que predisposen el seu desenvolupament. Durant l'última dècada, la disponibilitat de noves eines de recerca, incloent-hi models de ratolins modificats genèticament, ha donat lloc a una millor comprensió dels mecanismes moleculars que connecten l'alteració del metabolisme del colesterol i els factors de risc per al desenvolupament de la placa ateroscleròtica [5]. Ara està clar, l'aterosclerosi no és simplement una conseqüència inevitable de l'envelliment degeneratiu, sinó una condició inflamatòria crònica que pot ser convertit en un esdeveniment clínic agut per trencament de la placa i la trombosi.

2.1.1. Risc cardiovascular

Estudis epidemiològics han identificat nombrosos factors de risc cardiovascular relacionats amb l'aterosclerosi. Entre ells destaquen els factors de risc tradicionals o clàssics no modificables, com l'edat, sexe, raça, història familiar i característiques

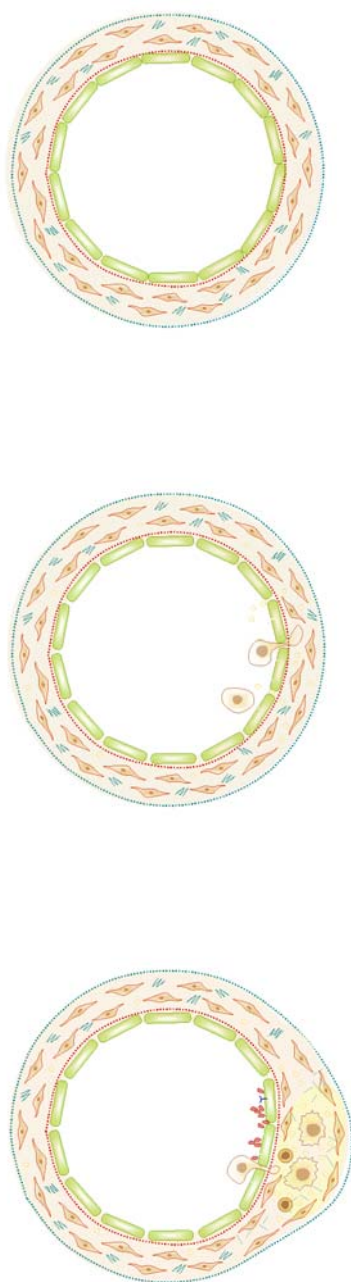
genètiques i els factors de risc modificables com les dislipèmies (nivells elevats de colesterol associat a les LDL i disminuïts de colesterol HDL), la hipertensió arterial, la diabetis i la resistència a la insulina, l'obesitat (índex de massa corporal $> 30 \text{ kg/m}^2$), el tabac, el sedentarisme, l'estrés, entre d'altres [1].

Les dislipèmies representen un factor de risc de gran importància. S'ha establert l'existència d'una relació causal entre nivells elevats de colesterol plasmàtic, associat a les lipoproteïnes de baixa densitat (LDL i VLDL), i la incidència de cardiopatia isquèmica. Una de les característiques de l'aterosclerosi és l'acumulació de colesterol a la paret arterial com a conseqüència d'un desequilibri en l'homeòstasi. Les LDL són les responsables del transport del colesterol del plasma als teixits perifèrics. Molts estudis clínics demostren que la reducció de nivells plasmàtics de colesterol LDL disminueix la mortalitat i morbiditat associada a la malaltia coronària. En canvi, les lipoproteïnes d'alta densitat (HDL), es consideren antiaterogèniques degut a la seva capacitat d'extreure el colesterol dels teixits. Per tant, se les considera un factor protector enfront a les malalties cardiovasculars.

Tot i la importància dels lípids plasmàtics, la formació de la lesió ateroscleròtica és un procés molt més complex, en el qual intervenen l'endoteli vascular, lipoproteïnes modificades, cèl·lules sanguínies com els leucòcits, cèl·lules musculars llises, proteïnes de la matriu extracel·lular i tot tipus de molècules inflamatòries. La percepció de tots aquests fenòmens reforça la idea que la prevenció de les malalties cardiovasculars ha d'implicar no només a la correcció dels factors de risc sinó a desenvolupar noves estratègies per combatre les malalties associades a aquest procés patològic.

2.1.2. Patogènia de l'aterosclerosi

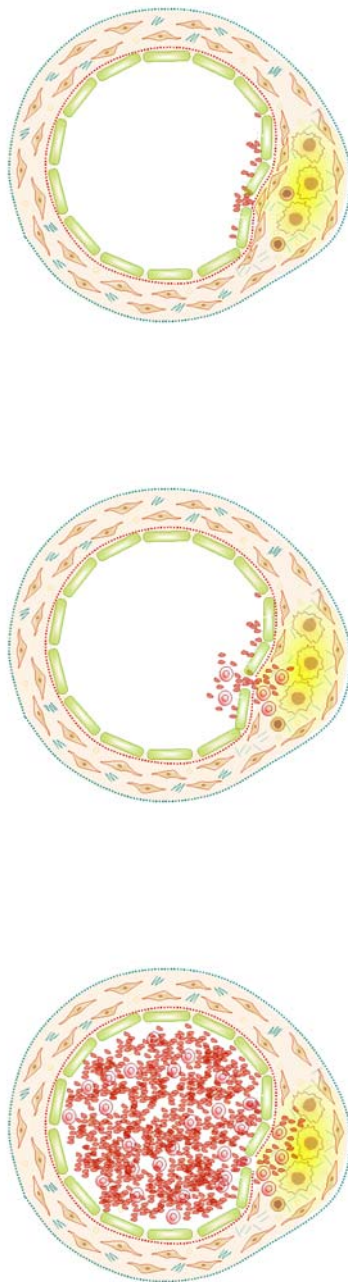
Estudis patològics revelen l'aparició d'una sèrie de canvis en els vasos durant l'aterogènesi i mostren el paper fonamental de les cèl·lules inflamatòries, particularment de monòcits/macròfags en la progressió del procés [3]. Estudis amb teixits cel·lulars suggereixen diverses i possibles vies d'iniciació i progressió de la malaltia. Tot i així, la principal evidència és el paper clau que desenvolupa l'endoteli induint la inflamació, l'acumulació de LDL oxidades en l'espai subendotelial, el reclutament de monòcits i la formació de cèl·lules escumoses. La progressió de l'aterosclerosi (Figura 1) s'inicia com a resposta a la disfunció endotelial i la inflamació vascular, seguit per la progressiva acumulació de colesterol, calci i restes de cèl·lules en l'íntima de la paret vascular de les artèries.



Les primeres lesions consisteixen en l'acumulació subendotelial de colesterol en macròfags i la formació de cèl·lules escumoses. Les cèl·lules endotelials actuen exercint un gran nombre de funcions en l'homeòstasi vascular: regulació de la permeabilitat vascular i transport de molècules, que contribueixen al manteniment del to vascular regulant el balanç de molècules vasodiladores i vasoconstrictores i proporcionen una superfície no adherent pels leucòcits circulants. L'activació i la disfunció endotelial, que apareix en el primer estadi de l'aterogènesi, es caracteritza per l'increment de la permeabilitat vascular en lipoproteïnes, augment del reclutament de leucòcits, reducció de la producció d'òxid nítric i l'augment de la producció de vasoconstrictors, desequilibri de factors prothrombòtics i antitrombòtics, provocant un desequilibri en l'homeòstasi de l'endoteli vascular. Entre els agents que medien l'efecte de reclutament de monòcits, trobem les molècules d'adhesió (selectines i integrines) i les substàncies quimioattractants (proteïna quimiotàctica de monòcits, MCP-1) expressades a la superfície endotelial.

Les selectines (E- i P-selectina) promouen una unió transitòria dels monòcits a l'endoteli anomenada *rolling*, de manera que augmenta el temps de contacte que permet la unió amb les integrines (VCAM1 i ICAM1). L'augment de permeabilitat

vascular dóna lloc a la captació del subendoteli de LDL circulants, les quals interaccionen amb els proteoglicans de la matriu subendotelial i n'afavoreix la retenció i els processos de modificació proteolítica i oxidativa, passant a ser altament aterogèniques. L'entrada de colesterol, provinent de les LDL al macròfag de forma massiva, té lloc principalment pels *receptors scavengers* [6]. Aquest procés dóna lloc a la formació de *cèl·lules escumoses*, que en disposar-se en forma de capes estratificades a l'íntima arterial, es converteix en l'anomenada *estria grassa*. Representa la primera lesió detectable en el procés arterioscleròtic.



En els éssers humans, la lesió d'estria grassa es pot trobar en l'aorta en la primera dècada de la vida, en les artèries coronàries en la segona dècada i en les artèries cerebrals en les dècades tercera i quarta. A causa de les diferències en la dinàmica del flux de la sang, existeixen regions que predisposen la formació d'aquestes lesions a les artèries. Les estries grasses no són clínicament significatives, però són les precursoras de les lesions més avançades que es caracteritzen per l'acumulació de lípids i restes necròtiques.

Si el procés de proliferació continua, l'estria grassa pot evolucionar cap a una lesió més aguda o *placa d'ateroma*, que conté major riquesa lipídica i restes cel·lulars. A més, les plaques poden arribar a ser cada vegada més complexes amb calcificació, ulceració a la superfície luminal, i presència de lesions hemorràgiques que hi creixen. Encara que les lesions avançades poden produir símptomes d'isquèmia com a resultat d'una progressiva oclusió de la llum vascular, la complicació clínicament més important és una ruptura de

la placa ateromatosa i la formació d'un trombe o coàgul de sang, donant lloc a un infart de miocardi o accident cerebrovascular [3, 7].

Figura 1. Esquema del desenvolupament de la lesió ateroscleròtica.

2.1.3. Obesitat, síndrome metabòlica, diabetis tipus 2 i malaltia cardiovascular:

2.1.3.1. Diabetis mellitus tipus 2 (DT2) i resistència a la insulina

És el tipus de diabetis més comú en els països desenvolupats. Es troba estretament lligat amb l'obesitat, el 80% dels individus que presenten DT2 són obesos [8]. La seva incidència augmenta progressivament, i és tractada per l'Organització Mundial de la Salut (OMS) com a futura epidèmia del segle XXI [9]. Es desenvolupa en adults de mitjana edat tot i que actualment està incrementant-se la seva incidència en la població jove. Els adults diabètics presenten 2 o 3 vegades més risc de desenvolupar complicacions cardiovasculars enfront als adults que no presenten DT2 [10].

Aquesta malaltia es caracteritza per un desordre en la secreció d'insulina per part de les cèl·lules β del pàncrees i per l'aparició de la resistència a la insulina en teixits com el múscul esquelètic, el fetge i el teixit adipós. La resistència a la insulina es pot definir com la incapacitat de l'organisme per respondre eficientment a aquesta molècula. Aquesta situació produeix una alteració del balanç dels nivells circulants de glucosa, el pàncrees secreta gran quantitat d'insulina i gradualment les cèl·lules pancreàtiques esdevenen deficientes i disminueix el seu nombre. L'estat de resistència a la insulina produeix una profunda alteració del metabolisme energètic, repercutint en el perfil lipoproteic. Els pacients DT2 presenten hipertrigliceridèmia, disminució d'HDL i acúmulo de LDL petites i denses, a més d'increment d'Apolipoproteïna B, augment dels àcids grassos lliures circulants i hiperlipèmia postprandial. Aquesta alteració sembla originada per la incapacitat del teixit adipós de mantenir un correcte emmagatzematge gras produint-se un increment de la lipòlisi de triglicèrids que augmentarà l'oferta d'àcids grassos a nivell hepàtic i producció de VLDL.

Juntament amb la profunda alteració metabòlica, els pacients DT2 tenen un estat proinflamatori subclínic amb concentracions augmentades de mediadors de la inflamació com el TNF α , la IL6 i la proteïna C reactiva (PCR), entre d'altres.

2.1.3.2. Obesitat

L'obesitat és la malaltia metabòlica amb més prevalència en els països desenvolupats i continua augmentant espectacularment a nivell d'epidèmia en aquests països. L'obesitat comporta una elevada mortalitat associada a la malaltia cardiovascular, involucrats directa o indirectament múltiples factors de risc.

El sobrepès es defineix com el valor de l'Índex de massa corporal (IMC: pes en kg/ (talla en m)²) que es troba entre 25 i 30 kg/m². En canvi, es considera obesitat quan el valor de la IMC és superior a 30 kg/m². El concepte d'obesitat visceral, definit clínicament segons el criteri de NCEP/ATPIII com el perímetre abdominal superior a 88 cm en dones i 102 cm en homes, és considerat molt útil en la pràctica clínica ja que està relacionat directament amb alteracions metabòliques i cardiovasculars associades a la síndrome metabòlica i la resistència a la insulina.

El teixit adipós és l'òrgan d'emmagatzematge i mobilització del greix de l'organisme i el seu interès ha augmentat per la seva funció com a òrgan endocrí, el qual allibera una gran quantitat de molècules d'adipoquines com la IL6 i el TNF α (molècules proinflamatòries) i mediadors bioactius com la adiponectina i la leptina, que influeixen no només a l'homeòstasi del greix corporal, sinó també a la resistència a la insulina, la diabetis, la inflamació i el procés ateroscleròtic [11]. El patró de producció de les adipoquines canvia en l'obesitat, disminuint les molècules que exerceixen efectes protectors com l'adiponectina i augmenten aquelles que tenen accions proinflamatòries. Entre aquestes es poden mencionar la leptina, el TNF α , la IL6 que promouen l'expressió de biomarcadors endotelials (E-selectina, VCAM1, ICAM1), els quals afavoreixen el dany vascular i la disfunció endotelial (Figura 2). Per tant, la disfunció endotelial podria ser el vincle d'unió entre l'obesitat i l'aparició de la malaltia cardiovascular [12, 13].

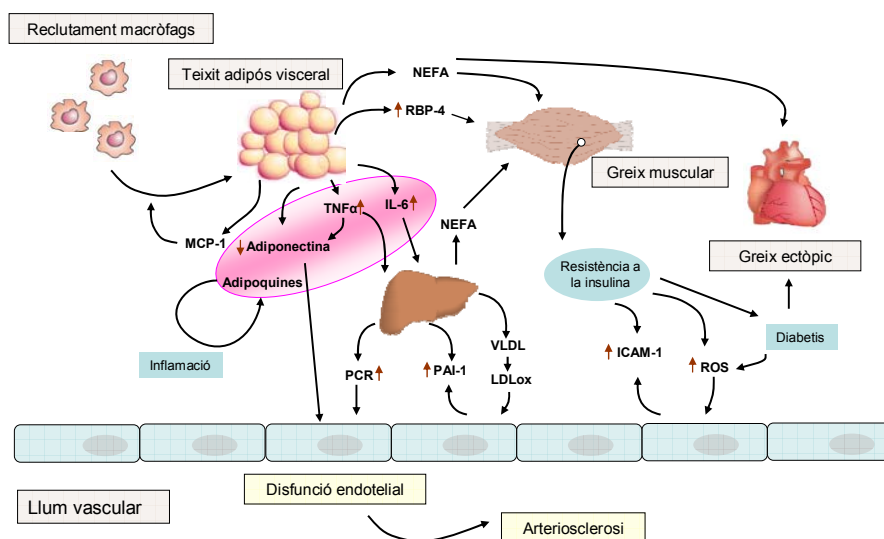


Figura 2. Esquema del desenvolupament de la lesió ateroscleròtica en l'obesitat.

2.1.3.3. La síndrome metabòlica

La síndrome metabòlica (SM) és una malaltia multifactorial que engloba múltiples factors de risc cardiovascular, com la resistència a la insulina, l'obesitat visceral, la dislipèmia aterogènica, la inflamació i la hipertensió (Figura 3). Totes les característiques de la SM s'associen amb la lesió i la disfunció endotelial, el principal esdeveniment en l'aterosclerosi, i, per tant, en un augment del risc cardiovascular [14, 15].

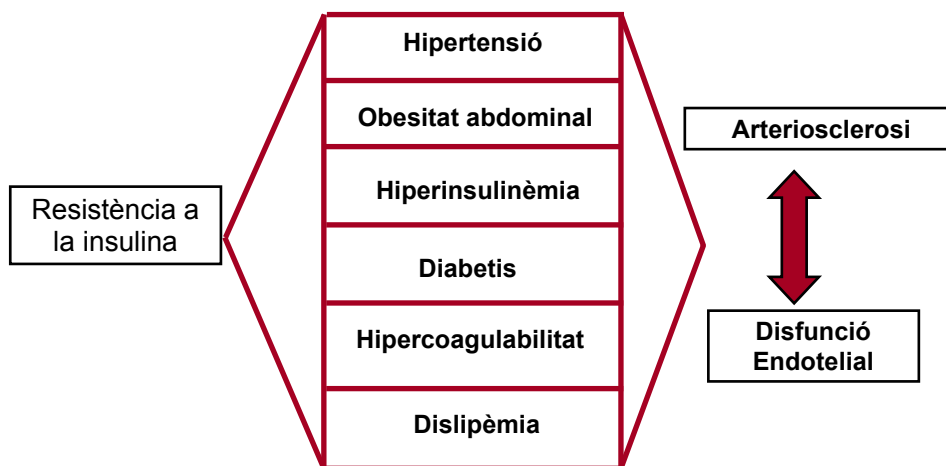


Figura 3. Esquema de la síndrome metabòlica com a malaltia multifactorial.

Existeixen diverses definicions internacionals que han estat proposades per l'OMS, *EUA National Cholesterol Education Program (NCEP/ATPIII)* el 2001 i la Federació Internacional de Diabetis (IDF) 2005, entre d'altres, classificades en la Taula 1A. Totes aquestes definicions comparteixen els components essencials: alteracions del metabolisme de la glucosa, obesitat, hipertensió i dislipèmia. Tot i així, difereixen en els criteris d'inclusió. La definició de consens proposada per NCEP/ATPIII el 2001 és la que s'ha fet servir en l'estudi clínic d'aquesta tesi. Aquest criteri es basa en diagnosticar SM en aquells individus que presentin tres o més dels següents factors: concentració elevada de triglicèrids, reducció de la concentració de lipoproteïnes d'alta densitat (HDL), elevada pressió arterial o increment del nivell de glucosa en plasma. Recentment, existeix una nova actualització dels criteris de SM segons NCEP/ATPIII proposada per *American Heart Association (AHA)* en la qual es tenen en compte els tractaments hipolipemiant, hipotensors i hipoglicèmics que segueixen molts individus (Taula 1B) [16]. L'ús de diferents definicions, fins ara, ha fet difícil estimar la prevalença de la síndrome metabòlica i fer comparacions de prevalença entre els

Introducció

diferents països. La taxa d'incidència augmenta amb l'edat i la prevalença de la cardiopatia coronària és més gran en els pacients amb aquesta condició.

Taula 1A. Definicions de la síndrome metabòlica segons els diferents organismes.

| Organització mundial de la salut | NCEP/ATPIII | Federació Internacional de Diabetis |
|--|--|---|
| <p><i>Diabetis o alteració de la glucosa en dejú o defecte en la tolerància a la glucosa o resistència a la insulina, més dos o més dels següents criteris:</i></p> <p>Relació cintura-cadera: $\text{♂} > 0.90$; $\text{♀} > 0.85$ i/o $\text{IMC} > 30 \text{ kg/m}^2$</p> <p>Pressió Arterial (mmHg): $\geq 140/90$</p> <p>TG (mg/dL) ≥ 150 i/o HDL (mg/dL) $\text{♂} < 35$ $\text{♀} < 40$</p> <p>Microalbuminúria: relació de l'excreció en l'orina d'albumina (mg/ml) ≥ 20 mg/ml o relació albumina/creatinina (mg/g) ≥ 30</p> | <p><i>Tres o més dels següents criteris:</i></p> <p>Perímetre abdominal (cm): $\text{♂} > 102$; $\text{♀} > 88$ cm</p> <p>TG (mg/dL): ≥ 150</p> <p>HDL (mg/dL): $\text{♂} < 40$; $\text{♀} < 50$</p> <p>Pressió Arterial (mmHg): $\geq 130/85$</p> <p>Glucosa plasmàtica en dejú (mg/dL) ≥ 110</p> | <p><i>Obesitat central definida $\text{♂} \geq 94$cm; $\text{♀} \geq 80$ cm en europeus, més dos o més dels següents criteris:</i></p> <p>TG (mg/dL): ≥ 150</p> <p>HDL (mg/dL): $\text{♂} < 40$; $\text{♀} < 50$</p> <p>Pressió Arterial (mmHg): $\geq 130/85$</p> <p>Glucosa plasmàtica en dejú (mg/dL) ≥ 100</p> |
| <p>Abreviacions: ATP, Adult Treatment Panel; IMC, índex de massa corporal; HDL, lipoproteïna d'alta densitat; NCEP, National Cholesterol Education Program; TG, triglicèrids.</p> | | |

Taula 1B. Definició de SM per l'Actualització de NCEP/ATPIII per l'AHA 2005

| <i>Tres o més dels següents criteris</i> | <i>Punts de tall categoritzats</i> |
|--|--|
| Perímetre abdominal (cm) | $\text{♂} > 102$; $\text{♀} > 88$ cm |
| TG (mg/dL) | ≥ 150 o tractament per concentracions elevades de TG |
| HDL (mg/dL) | $\text{♂} < 40$; $\text{♀} < 50$ o tractament per la reducció d'HDL |
| Pressió Arterial (mmHg) | $\geq 130/85$ o tractament per la hipertensió |
| Glucosa plasmàtica en dejú (mg/dL) | ≥ 110 o tractament per la concentració elevada de glucosa |
| <p>Abreviacions: ATP, Adult Treatment Panel; HDL, lipoproteïna d'alta densitat; NCEP, National Cholesterol Education Program; TG, triglicèrids.</p> | |

2.2. DISFUNCIÓ ENDOTELIAL

2.2.1. L'endoteli i la disfunció endotelial

L'endoteli és la monocapa de cèl·lules endotelials que cobreix la superfície interna de tot el sistema vascular i per tant es troba a la regió més interna de la paret arterial, l'*íntima*. L'endoteli és el major regulador de l'homeòstasi vascular i representa una barrera dinàmica entre la sang circulant i els teixits subjacents. Està permanentment exposat tant a estímuls mecànics, com són el flux sanguini, la pressió arterial i la distensió de la paret, com a nombrosos estímuls químics, procedents de les cèl·lules sanguínies. Com a resposta, donarà lloc a l'alliberament de diversos factors reguladors del to vascular, com ara les prostaglandines i l'òxid nítric (NO) [17]. Per tant, és un autèntic òrgan de regulació vascular i és l'encarregat de mantenir el balanç entre la vasodilatació i la vasoconstricció, la inhibició i estimulació de la proliferació i la migració de les cèl·lules musculars llises, i la trombogènesi i la fibrinòlisi. No obstant, quan aquest balanç és alterat per presència de factors de risc cardiovascular, tant els tradicionals (com són la hipercolesterolèmia, la hipertensió i la diabetis) com factors de risc emergents (l'obesitat i la inflamació sistèmica), l'endoteli pot adoptar un fenotip que facilita la inflamació, la trombosi, la vasoconstricció i la formació de la lesió ateroscleròtica, causant el dany en la paret arterial. Aquest procés és el que s'anomena *disfunció endotelial*, el qual és un esdeveniment important en la primera etapa de la patogènia de l'aterosclerosi, que contribueix a la iniciació i progressió de la placa [18, 19]. És un terme col·lectiu que inclou una sèrie de canvis que experimenta l'endoteli durant l'aterogènesi, principalment l'augment del to vascular a causa de la disminució de la biodisponibilitat del vasodilatador per excel·lència, l'òxid nítric (NO). El dany a l'endoteli altera el balanç de la secreció de molècules vasodilatadores i vasoconstrictores i indueix diversos processos que promouen l'aterosclerosi com l'augment de la permeabilitat vascular i la infiltració de lipoproteïnes a l'espai subendotelial, l'agregació plaquetària, l'adhesió de leucòcits i la generació de citocines inflamatòries (Figura 4). En aquest estat d'activació de l'endoteli, hi ha una reducció de la producció i activitat del NO, que provoca disminució de la vasodilatació, primer signe de l'aterosclerosi i predictor de risc cardiovascular futur. El paper de l'endoteli en estat "sa" i en la disfunció endotelial durant l'arteriosclerosi ha estat de considerable interès en l'estudi del tractament amb hipolipemians per tal de reestablir una correcta funció endotelial.

NADPH, involucrats amb la síntesi de NO [21]. El gas s'allibera de les cèl·lules endotelials a les cèl·lules musculars llises on activa la *guanilat ciclasa* (GC), que provoca la vasodilatació arterial (Figura 5). En aquest sentit, l'endoteli és capaç d'adaptar la perfusió dels òrgans als canvis en la despesa cardíaca. A més, l'activació de l'enzim també es pot donar per la interacció proteïna-proteïna, com és el cas de l'associació amb *heat shock protein 90* (Hsp90). Alternativament, eNOS pot ser activat per la bradiquinina, la pressió hemodinàmica (*shear stress*), els estrògens i la insulina, a través de l'estimulació de la via PI3K/Akt (veure apartat 2.2.4). Akt fosforila l'enzim eNOS a nivell de Serina¹¹⁷⁷. El resultat és la producció directa de NO el qual s'expandeix localment per la paret arterial i activa la GC en les cèl·lules musculars, donant lloc a la vasodilatació arterial. Aquesta via d'activació d'eNOS és independent a l'acció del calci intracel·lular [22-24].

A més de la vasodilatació, el NO impedeix l'adhesió dels leucòcits i la seva transmigració a la paret arterial, la proliferació de les cèl·lules vasculars del múscul llis, i l'adhesió i agregació plaquetària. NO també impedeix l'oxidació de les LDL. L'oxidació de les LDL es considera com un mecanisme important en el procés ateroscleròtic, a més, les LDL oxidades del plasma es correlacionen directament amb el síndrome coronari agut. El dany en la producció i/o l'activitat de NO promou l'aterosclerosi, augmentant l'estrés oxidatiu. Les LDL oxidades augmenten la síntesi de caveolina-1, la qual redueix la producció del NO per inhibició de l'enzim eNOS. L'estrés oxidatiu pot interferir en la no-síntesi de NO independentment a les LDL a través de la producció de ROS (*espècies reactives d'oxigen*). Aquests efectes descrits del NO són importants en la protecció de l'aterosclerosi [18].

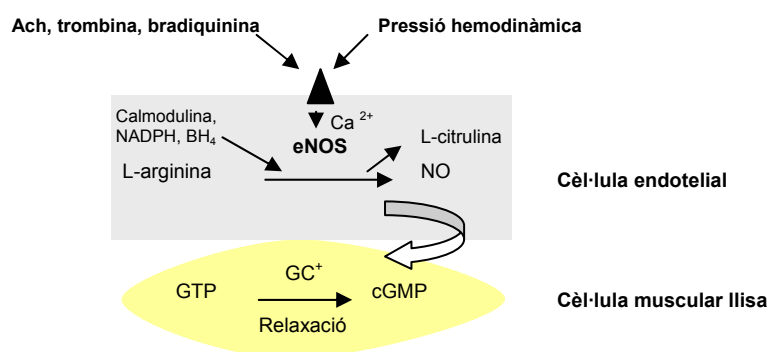


Figura 5. Síntesi de l'òxid nítric en la cèl·lula endotelial.

Per altra banda, altres vasodilatadors poden ser la prostaciclina i la bradiquinina. La prostaciclina actua juntament amb el NO per inhibir l'agregació plaquetària, en canvi la bradiquinina estimula la secreció de NO i prostaciclina contribuint a la mateixa funció. L'endoteli també produeix substàncies vasoconstrictores, com poden ser l'endotelina, que és la molècula vasoconstrictora endògena més coneguda. L'angiotensina II, molècula també vasoconstrictora, actua com a pro-oxidant, estimulant la producció d'endotelina. Aquestes dues molècules promouen la proliferació i la migració de les cèl·lules musculars llises i contribueixen a la formació de la placa d'ateroma. Els macròfags activats i les cèl·lules musculars llises vasculares, constituents de la placa, produeixen gran quantitat d'endotelina. El dany a l'endoteli altera el balanç entre la secreció de molècules vasodilatadores i vasoconstrictores i indueix diversos processos que promouen l'aterosclerosi [25, 26].

2.2.3. Biomarcadors circulants

Durant el procés d'activació endotelial i inflamació existeix un augment en l'expressió de biomarcadors que caracteritzen aquest procés. Hi ha un gran nombre de marcadors circulants lligats a la disfunció endotelial com les molècules d'adhesió solubles (selectines i integrines) i les citocines proinflamatòries, les quals, totes elles, promouen l'adherència dels monòcits a l'endoteli i acceleren el procés ateroscleròtic [27-29]. Actualment, existeix també un altre mètode indirecte de valorar la funció endotelial, consisteix en analitzar els nivells i la funció de cèl·lules endotelials progenitores circulants ja que s'ha confirmat que estan inversament relacionades amb la disfunció endotelial [30]. En la Taula 2, es mostren principals evidències clíniques de la relació dels biomarcadors i els factors de risc CV.

Taula 2. Principals evidències en estudis clínics de la relació dels biomarcadors circulants i la disfunció endotelial i el risc CV.

| Referències | Població estudiada | Biomarcador | Resultats importants |
|-----------------------------|---|-----------------------------------|--|
| Ridker et al. 1998 [31] | 948 individus control | sICAM1, PCR | Nivells elevats de sICAM1 i PCR prediu el risc de patir infart de miocardi. |
| Stenvinkel et al. 2000 [32] | 88 pacients CVD | sICAM1 | sICAM1 prediu events CV |
| Tataru et al. 2000 [33] | 1413 pacients amb síndrome agut de miocardi | PCR | PCR es correlaciona amb el número d'artèries amb estenosi. |
| Malik et al. 2001 [34] | Meta-anàlisi de molècules d'adhesió i predicció d'events CV | Molècules d'adhesió | Les molècules d'adhesió afegixen informació als factors de risc CV establerts per a la predicció de futurs events CV. |
| Katritsis et al. 2001 [35] | 103 pacients CAD | PCR | Els nivells de PCR s'associen al risc de lesió ateroscleròtica. |
| Pradham et al. 2002 [36] | 14916 controls | sVCAM1 i ICAM1 | sICAM1 s'associa a l'infart agut de miocardi. |
| Menown et al. 2003 [37] | 391 individus amb infart agut de miocardi | sVCAM1, ICAM1 i sE-sel, PCR i IL6 | sVCAM1 i PCR s'associen a recurrència d'events CV. Nivells elevats de sICAM1, IL6 i PCR en els pacients vs controls. |
| Meigs et al. 2004 [38] | 1522 control | sVCAM1, ICAM1 i sE-sel | La concentració de sE-sel i sICAM1 prediu l'aparició de DT2 i es troba augmentada en aquests pacients. |
| Thakore et al. 2007 [39] | 2885 individus (<i>Framingham heart study</i>) | PCR, IL6, ICAM1 | PCR i IL6 s'associen a l'aterosclerosi subclínica (IMT) i la IL6 a l'estenosi arterial. |
| Sakurai et al. 2009 [40] | 505 individus | PCR i sE-sel | Tots dos biomarcadors es relacionen amb l'aterosclerosi subclínica (IMT) i poden ser biomarcadors d'aterosclerosi en població general. |

Abreviacions: IMC, índex de massa corporal; DT2, diabetis tipus 2; CVD, malaltia cardiovascular; PCR, proteïna C reactiva; IL6, interleucina 6; sICAM1, molècula d'adhesió soluble intercel·lular 1; VCAM1, mol·lècula d'adhesió soluble vascular 1; sE-sel, E-selectina soluble; CV, cardiovascular; IMT, gruix íntima-mitja de l'artèria

2.2.3.1. Molècules d'adhesió endotelials

En les darreres dècades, ha guanyat interès l'estudi dels mecanismes moleculars pels quals les cèl·lules són capaces d'interaccionar amb el seu entorn, incloent-hi les interaccions amb les altres cèl·lules i els components de la matriu extracel·lular. En els últims anys, ha guanyat pes l'estudi estructural i funcional de les molècules d'adhesió i altres proteïnes que promouen gran varietat d'unions específiques entre cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula-matriu extracel·lular.

Introducció

Les molècules d'adhesió són proteïnes heterogènies responsables de l'adhesió recíproca entre diferents tipus cel·lulars com cèl·lules endotelials, monòcits, limfòcits, plaquetes, cèl·lules musculars llises o bé entre cèl·lules i la matriu extracel·lular. En estudis previs s'han classificat aquestes molècules en sis tipus de molècules d'adhesió: integrines (VLA-4), selectines (P-, E- selectines), immunoglobulines (ICAM1, VCAM1, PECAM-1), cadherines, proteoglicans i mucines. Les molècules d'adhesió poden expressar-se constitutivament a la superfície de la membrana cel·lular o bé per la inducció d'un estímul. La interacció entre l'endoteli i els leucòcits circulants a través d'integrines, selectines i immunoglobulines és clau en el reclutament d'aquests durant la disfunció endotelial i el desenvolupament de la lesió ateroscleròtica [7] (Figura 6).

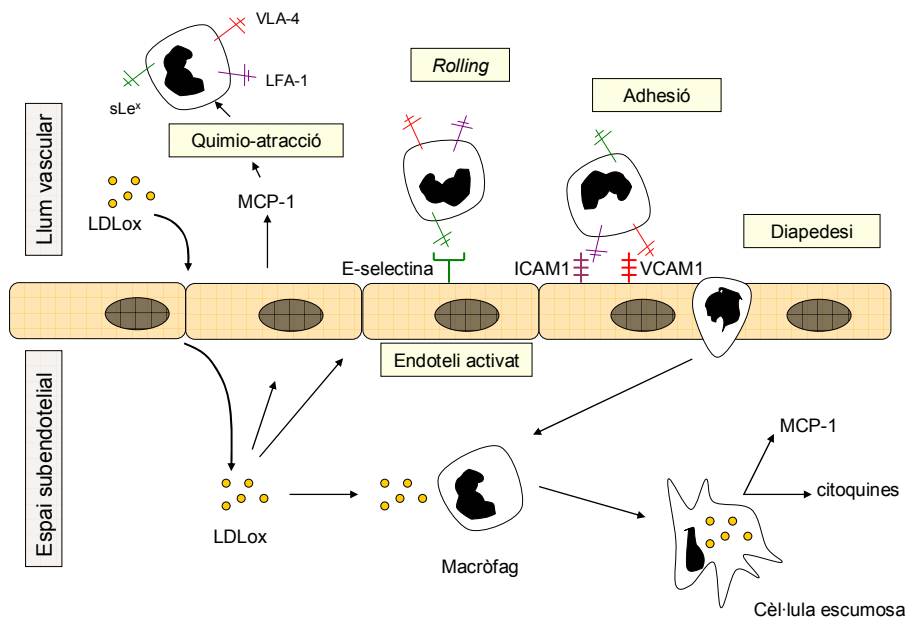


Figura 6. Esquema de les diferents etapes en l'adhesió dels leucòcits en l'endoteli vascular amb els lligands moleculars implicats en el procés. Després de l'activació de l'endoteli i la secreció de citocines proinflamatòries que atreuen els limfòcits, com la MCP-1, apareix la primera fase del procés anomenat *rolling*. Consisteix en una unió transitòria dels monòcits a l'endoteli a través de les selectines (E-selectina), de manera que augmenta el temps de contacte que permet la unió amb les integrines (VCAM1 i ICAM1) que donaran lloc a l'adhesió dels monòcits a la superfície endotelial (segona fase del procés). La tercera fase s'anomena *diapedesi* i està caracteritzada per la transmissió dels monòcits a l'espai subendotelial.

2.2.3.1.1. E-selectina

E-selectina és una proteïna de la família de les selectines i s'expressa específicament en la superfície de les cèl·lules endotelials estimulades. En canvi, la P-selectina s'expressa tant en l'endoteli com en les plaquetes activades. Durant la inflamació, les selectines (E- i P-selectina) promouen una unió transitòria dels monòcits a l'endoteli anomenada *rolling*, de manera que augmenta el temps de contacte per permetre la unió a les integrines [41, 42].

L'expressió d'E-selectina en la superfície de les HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) és màxim a les 6 hores després de l'estimulació amb TNF α o IL-1 i és detectable almenys fins a les 24 hores [43]. L'E-selectina circulant (soluble E-selectin:sE-selectin) pot ser secretada per l'acció d'una proteasa o bé alliberada pel dany o activació cel·lular. sE-selectina és detectable per ELISA a partir del plasma o bé del medi procedent de cultius cel·lulars. La concentració de sE-selectina correlaciona amb l'expressió de proteïna a la superfície cel·lular. Per això, la concentració de sE-selectina plasmàtica és un marcador d'activació o dany endotelial [27].

En estudis previs, s'ha observat que els nivells de sE-selectina estan augmentats amb pacients amb infart de miocardi en comparació amb població control [44]. Per altra banda, existeixen estudis que correlacionen positivament la proteïna amb arteriosclerosi subclínica, com el gruix íntima-mitja de les carotídes (IMT) [40]. En canvi, en altres estudis, no es confirmen aquests resultats. En pacients amb diabetis tipus 2, es troben nivells augmentats en plasma i el tractament amb fàrmacs hipoglucemians podria disminuir la seva concentració en circulació. Previs estudis han confirmat que la resistència a la insulina està implicada amb l'increment de sE-selectina [38].

En resum, sE-selectina és específica de l'endoteli i és un marcador clau en la disfunció endotelial. Està augmentada en pacients amb malaltia coronària, diabetis tipus 2, hipertensió i dislipèmia. La presència de sE-selectina pot predir l'aparició de diabetis tipus 2. A més, estudis d'intervenció mostren que un canvi terapèutic en l'estil de vida (dieta cardiosaludable, activitat física i tabaquisme) pot interferir i disminuir els nivells de sE-selectina plasmàtics.

2.2.3.1.2. VCAM1 i ICAM1

ICAM1 (molècula d'adhesió intercel·lular 1) i VCAM1 (molècula d'adhesió vascular 1) són molècules d'adhesió, les quals tenen una estructura similar a les immunoglobulines. Aquestes molècules són els lligands endotelials de les integrines expressades en els leucòcits i les plaquetes i faciliten l'adhesió endotelial i transmigració dels leucòcits circulants a l'espai subendotelial. Els lligands de ICAM1 són dues integrines dels leucòcits: LFA-1 i Mac-1. VCAM1 s'uneix a VLA-4 (integrina també de leucòcit) [7]. L'expressió de ICAM1 i VCAM1 està augmentada en resposta a l'estímul de citocines inflamatòries i LDL oxidades. Aquestes molècules s'expressen principalment en les cèl·lules endotelials, tot i així, també poden expressar-se en cèl·lules musculars llises i monòcits i, per tant, no es poden considerar específiques de l'endoteli. Són detectades per ELISA en medi de cultiu, procedent de cultius cel·lulars activats amb citocines proinflamatòries [45]. Existeixen diferències inter-individuals en la concentració en plasma degut a variacions existents entre poblacions, races, ètnies etc [46].

En previs estudis patològics, s'ha demostrat que ICAM1 i VCAM1 es troben presents en plaques d'ateroma i es troben sobreexpressades en cèl·lules endotelials, procedents de models animals hipercolesterolèmics [47]. En estudis d'associació previs, s'han observat nivells elevats de sICAM1 i sVCAM1 circulants en individus amb angina de pit [31, 32]. A més, sICAM1 s'associa directament amb un risc elevat de patir malaltia cardiovascular. En estudis, en els quals es valora la presència de plaques d'ateroma a les artèries caròtides s'ha trobat correlació positiva amb l'increment de sICAM1 i sVCAM1 en plasma [34]. S'han detectat nivells alts en individus amb malaltia arterial perifèrica (PAD) diagnosticada per ITB (Índex turmell-braç) [48-50]. Mitjançant estudis d'aterosclerosi subclínica, sVCAM1 ha estat l'únic marcador relacionat independentment amb la mesura del gruix íntima-mitja de les carotídes (IMT) [51].

Un meta-anàlisi va mostrar que la presència de sICAM1 podria ser útil per a la predicció de la diabetis mellitus i malaltia cardiovascular en individus sans [52]. En canvi, sVCAM1 seria de més interès en la predicció de malaltia cardiovascular recurrent [36].

En resum, s'ha de tenir en compte que tant sICAM1 com sVCAM1 no són específiques d'endoteli. sICAM-1 prediu el risc de patir infart de miocardi i l'aparició de diabetis mellitus. En pacients amb la malaltia cardiovascular establerta, sVCAM1 correlaciona amb un elevat risc de patir la síndrome coronària aguda.

2.2.3.2. Oxidació lipídica

Les lipoproteïnes oxidades tenen un paper clau en el desenvolupament del procés ateroscleròtic. Les lipoproteïnes circulants, principalment LDL, poden travessar l'endoteli danyat, a causa de l'augment de la permeabilitat vascular, i acumular-se en l'espai subendotelial. Les LDL interaccionen amb proteoglicans i glicosaminoglicans de l'íntima afavorint la seva retenció i posteriors modificacions oxidatives i proteolítiques. Les LDL oxidades atrauen els monòcits cap a l'íntima on es diferencien en macròfags. La internalització de partícules oxidades per part dels macròfags a través dels seus *receptors scavenger* dona lloc a la producció de cèl·lules escumoses que promou la formació de la placa d'ateroma. Per tant, la presència de les LDL oxidades afavoreix la formació de cèl·lules escumoses, l'augment de l'adhesió leucocitària, l'atracció de monòcits, el creixement i diferenciació de monòcits, l'activació dels macròfags i la síntesi de citocines proinflamatòries, l'afectació del to vascular, l'augment de la permeabilitat vascular i coagulació, la citotoxicitat i la proliferació de les cèl·lules musculars llises [3].

Els biomarcadors de l'estrés oxidatiu més utilitzats per a quantificar l'estat de peroxidació lipídica són: les LDL oxidades i els anticossos de les LDL oxidades circulants, la susceptibilitat de les LDL a l'oxidació. Recentment, s'ha deduït que el quocient entre LDL oxidades i LDL colesterol o HDL colesterol ha estat considerat un bon indicador de la mesura de les lipoproteïnes oxidades en circulació [53]. Previs estudis han demostrat que el quocient entre LDL oxidades i HDL colesterol és el millor biomarcador per distingir individus sense o amb malaltia cardiovascular [54].

Estudis patològics previs suggereixen l'existència de formes oxidades de lipoproteïnes en plasma i altres teixits. En concret, s'han associat nivells plasmàtics elevats en pacients diabètics [55]. Altres estudis han demostrat que la LDL oxidada circulant s'associa amb aterosclerosi subclínica [56], amb aterosclerosi coronària i perifèrica, amb síndrome coronari agut i amb la presència de plaques d'ateroma vulnerables [57]. Diversos estudis suggereixen que els nivells elevats de LDL oxidada en plasma són un marcador d'events cardiovasculars futurs [58]. A més, s'ha vist que el tractament amb antioxidants retarda la progressió de la lesió ateroscleròtica.

Per altra banda, múltiples estudis clínics confirmen l'associació dels anticossos de les LDL oxidades amb la presència de plaques d'ateroma i amb la severitat de l'aterosclerosi [59]. A més, els seus nivells en plasma es troben augmentats en hipertensió, diabetis, tabaquisme i alteracions renals [60]. Actualment, són utilitzats com a marcadors de la patologia ateroscleròtica. Tot i així, existeix molta controvèrsia en conèixer el paper dels anticossos de les LDL oxidades en plasma. Per una banda,

s'afirma que podrien tenir un efecte protector i fins i tot afavorir una disminució *in situ* en la lesió ateroscleròtica, i, per l'altra banda, sembla ser que juguen una funció destacada en la resposta proinflamatòria amb propietats proaterogèniques [61].

2.2.3.3. Molècules mediadores d'inflamació (IL6, TNF α , PCR)

Moltes evidències suggereixen que la inflamació té un paper important en el procés ateroscleròtic des de la iniciació de l'estria grassa fins la culminació de les complicacions cardiovasculars. Per tant, la presència d'elevats nivells plasmàtics de marcadors d'inflamació són considerats factors de risc en el desenvolupament de la malaltia cardiovascular. Durant el procés ateroscleròtic, els leucòcits s'adhereixen a la paret arterial i la seva entrada a l'interior està controlada per citocines proinflamatòries. Les dos més importants són les citocines α i β . Les primeres són quimiotàctiques per neutròfils o limfòcits i entre elles detaquen les interleucines (IL) com la IL6. Les citocines β atreuen monòcits, limfòcits, basòfils i eosinòfils. En aquesta família, hi pertany el MCP-1 (proteïna quimiotàctica de monòcits).

La IL6 forma part de la família de les citocines i és produïda tant per macròfags com per adipòcits [62]. Es troba en nivells augmentats en individus obesos o amb dislipèmia aterògena i amb resistència a la insulina [63]. Estudis previs suggereixen que la IL6 pot participar en el desenvolupament de l'aterosclerosi, ja que s'expressa en les cèl·lules escumoses i en cèl·lules musculars llises de les lesions ateromatoses. A més, pot afavorir el dany vascular indirectament en estimular la síntesi de la proteïna C reactiva a nivell hepàtic [64].

El TNF α es sintetitza fonamentalment en el macròfag més que en l'adipòcit. El TNF α també pot exercir efectes perjudicials sobre la funció vascular a través de diversos mecanismes [63]. En les cèl·lules endotelials és capaç d'induir l'activació del factor de transcripció NF κ B, que estimula la formació de molècules d'adhesió, i, en conseqüència, afavoreix el desenvolupament d'un procés inflamatori local [65]. El TNF α , també, és capaç de reduir la biodisponibilitat de l'òxid nítric i la inhibició de la síntesi d'eNOS a nivell de mRNA i, per tant, de participar en alteracions de la funció endotelial. A més, el TNF α (igual que la IL6) estimula la producció de proteïna C reactiva, pel que contribueix a un procés inflamatori sistèmic que pot danyar la paret vascular, afavorint el procés ateroscleròtic [66]. En individus obesos i amb resistència a la insulina els seus nivells circulants estan elevats [67]. De fet, previs estudis

suggereixen la seva participació en la resistència a la insulina en induir la fosforilació de residus serina del receptor de la insulina, inhibint la seva activitat [68].

Per altra banda, el marcador inflamatori més conegut és la *proteïna C reactiva* (PCR) [69, 70]. Es considera com un dels màxims responsables de tot el procés ateroscleròtic. La PCR és una proteïna inflamatòria reactant de fase aguda secretada pel fetge. Estudis recents han demostrat que la seva síntesi també es dona en la lesió ateroscleròtica, en macròfags, adipòcits i cèl·lules musculars llises. Per altra banda, s'ha demostrat que té un efecte directe en la paret arterial com a proteïna proaterogènica: reducció de la producció de NO i prostaciclina i estimulació de la producció d'endotelina -1, molècules d'adhesió, MCP-1 i ILs [71]. També, s'indueix l'expressió del factor tissular i de les espècies reactives d'oxigen (ROS) i la secreció d'altres citocines proinflamatòries en macròfags.

En els darrers anys, estudis cel·lulars, en animals d'experimentació i en humans, han establert la relació entre la PCR i l'arteriosclerosi. Des del punt de vista clínic, existeix una important evidència científica del valor predictiu dels nivells mínimament elevats de PCR sobre el desenvolupament de la malaltia CV. Valors superiors a 2-3 mg/l s'associen a major risc CV i s'ha suggerit que independentment dels valors lipídics, xifres altes de PCR podrien ser una indicació terapèutica, punt sota important debat en l'actualitat [35] [39, 40].

2.2.4. Vies de senyalització implicades en la funció endotelial

2.2.4.1. PI3K/Akt/eNOS

La via de senyalització de la insulina en l'endoteli que lidera l'activació d'eNOS i l'increment de producció de NO és completament diferent als mecanismes depenents de calci utilitzats pels receptors *G-protein-coupled*. En els darrers anys, s'ha establert tota la via de senyalització de producció de NO a nivell molecular [72] (Figura 7). Aquesta via s'activa amb la fosforilació del receptor de la insulina (IR) per mitjà de la insulina que immediatament activa (fosforila) el substrat del receptor de la mateixa (IRS-1). Aquest s'uneix i activa la PI3K (fosfatidilinositol 3 quinasa), enzim que presenta tanta activitat lípid-quinasa com proteïna-quinasa, i que està implicat en moltes funcions cel·lulars, particularment en el creixement, la supervivència i la proliferació de les cèl·lules. Un dels productes generats per la PI3K, l'IP3, és capaç de segrestar la proteïna Akt a la membrana plasmàtica on serà fosforilada i com a

conseqüència activada per una altra quinasa, la PDK-1 [73]. PDK-1 fosforila i activa Akt en Serina⁴⁷³. Akt és una proteïna serina/treonina quinasa que controla diferents tipus de respostes cel·lulars com la inhibició de l'apoptosi o la regulació de la proliferació cel·lular i el metabolisme [74]. És capaç de regular una gran quantitat de substractes en els quals s'hi inclouen la glicogen sintasa quinasa-3 β (GSK-3 β), c-Ras, diferents efectors antiapoptòtics dels compartiments cel·lulars i l'eNOS [75]. Akt fosforila doncs, directament a l'enzim eNOS a nivell de Serina¹¹⁷⁷, resultant l'augment de l'activació de l'enzim i la producció de NO. L'activació de la PI3k i l'Akt és imprescindible per l'estimulació dependent d'insulina de producció de NO en l'endoteli [76]. En condicions patològiques, múltiples estudis experimentals demostren que l'estrés oxidatiu, l'augment d'àcids grassos lliures, l'expressió de citocines inflamatòries i la dislipèmia són capaces de dur a terme un efecte inhibitori sobre aquesta via de senyalització en l'endoteli vascular, contribuint a la hiperinsulinèmia i la disfunció endotelial [77-79].

2.2.4.2. Via de les MAPK (*Mitogen activated protein kinase*)

La insulina és capaç d'activar la via de senyalització proaterogènica de les MAPKs en l'endoteli. Aquesta via de senyalització és l'encarregada de regular la síntesi i secreció de l'endotelina-1 i a més, l'expressió de molècules d'adhesió endotelials com la E-selectina, VCAM1 i ICAM1 (Figura 7). La cascada de les MAPK s'organitza en tres nivells: les MAPKs són activades i fosforilades per les MAPKKs (*Mitogen activated protein kinase kinase*) que a la vegada són activades i fosforilades per les MAPKKKs (*Mitogen activated protein kinase kinase kinase*). Aquestes s'activen per interacció amb les proteïnes, unides a GTP (*Small GTPases*) com Ras i altres proteïnes que connecten el receptor d'insulina de la superfície amb aquesta via de senyalització [80]. Existeixen tres subfamílies de MAPKs: ERKs (*Extracellular responsive kinases*), JNKs (*c-Jun N-terminal kinases*) i p38MAPK. La subfamília ERK està més especialitzada en transduir senyals quan es produeix una estimulació per factors de creixement o agents mitògens i és la que està involucrada en la via de senyalització dependent d'insulina.

Existeix controvèrsia en els resultats experimentals. Previs estudis, amb models animals amb hipercolesterolèmia induïda, demostren que la via de senyalització de les MAPkinases es podria veure disminuïda, concretament en la inhibició de la fosforilació de Erk1/2 juntament amb la disminució de la via de la PI3k [81]. En canvi, altres estudis demostren que la via de senyalització de les MAPkinases podria ser

potenciada en resposta de la inhibició de la via de les PI3K en condicions d'hiperinsulinèmia [76].

2.2.4.3. Balanç de les vies de senyalització dependents d'insulina

Una característica important en la resistència a la insulina és el dany en la via de la PI3K/Akt, i el no-efecte en aquesta via de senyalització de les MAPKinases (dependent d'insulina) la qual es manté en correcte funcionament. En aquesta situació, es dona la pèrdua de balanç entre les dues vies, PI3K/Akt i MAPKinases, dependents d'insulina, que provoca una disminució de la producció de NO i un increment de la síntesi d'endotelina-1 i de l'expressió de molècules d'adhesió (VCAM1 i E-selectina), característic de la disfunció endotelial. A més, l'endotelina-1 és capaç d'inhibir el IRS-1, suprimint la cascada de senyalització en les cèl·lules musculars vasculars i danyant la translocació de GLUT4 (transportador de glucosa encarregat de captar la glucosa del medi extracel·lular) a la membrana. És possible que la disminució de NO en l'endoteli causada per la resistència a la insulina, pugui contribuir a l'acceleració del procés ateroscleròtic mitjançant la vasoconstricció, la inflamació i la trombosi [25, 82].

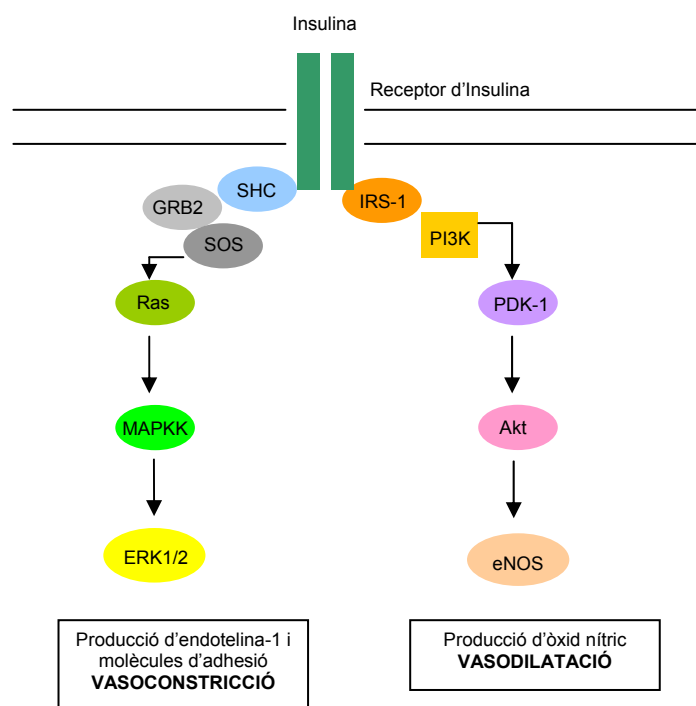


Figura 7. Vies de senyalització dependents d'insulina en l'endoteli vascular.

2.2.4.4. Vies de senyalització paral·leles involucrades en l'homeòstasi de la glucosa i l'homeòstasi vascular

L'acció vasodilatadora de la insulina juga un paper fisiològic central en l'hemodinàmica vascular i l'homeòstasi del metabolisme en condicions normals. Evidències prèvies suggereixen que les vies de senyalització dependents d'insulina en el múscul esquelètic, el teixit adipós i l'endoteli vascular estan relacionades amb el flux vascular i el metabolisme de la glucosa.

La captació de la glucosa mediada per insulina en el múscul esquelètic i el teixit adipós té lloc per la translocació de GLUT4 a la membrana cel·lular. Per tal de poder dur a terme aquesta translocació, és necessari l'activació de la via PI3K en la qual estan involucrades el IR, IRS-1, PI3K, PDK-1 i Akt, les quals s'han descrit anteriorment. La via de les MAPkinases no contribueixen en aquesta funció. En l'endoteli, l'acció vascular de la insulina és l'estimulació de l'activitat de l'enzim eNOS i la producció de NO a través de la mateixa via de senyalització (PI3K/Akt). En canvi, la cascada de les MAPK no produeix NO sinó que estimula la síntesi de l'endotelina-1 (vasoconstrictor) en resposta de l'acció de la insulina [72].

Per tant, l'activació d'aquesta via específica de senyalització dependent d'insulina, en el múscul esquelètic, dona com a resultat l'increment de la captació de glucosa, i afavoreix la vasodilatació a l'endoteli. Així doncs, els mecanismes d'acció de la insulina en teixit vascular i teixit metabòlic amb funcions complementàries, poden proporcionar la regulació de la glucosa i l'homeòstasi vascular. En condicions d'estrés oxidatiu, hiperglicèmia, inflamació i augment dels àcids grassos lliures circulants, aquesta via de senyalització es veu alterada provocant simultàniament resistència a la insulina en els teixits metabòlics (múscul esquelètic i teixit adipós) i disfunció endotelial en el teixit vascular (Figura 8).

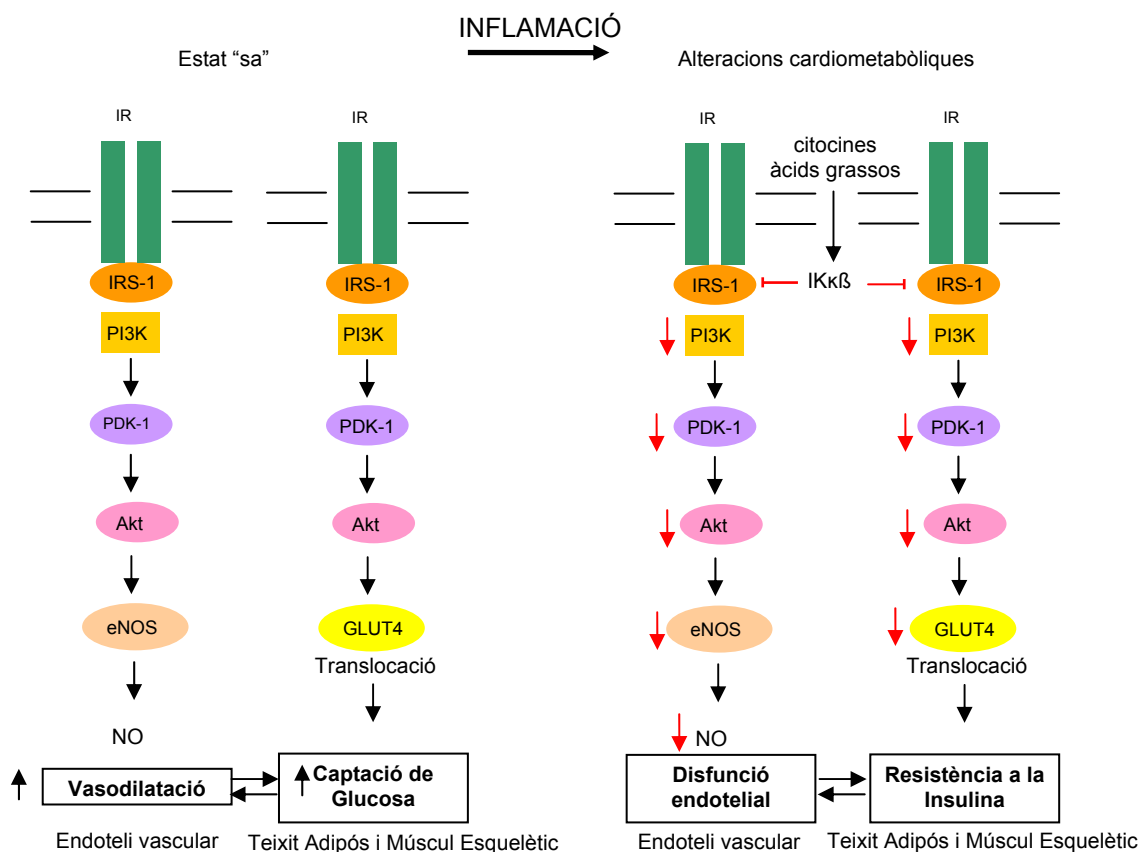


Figura 8. Via de senyalització PI3K/Akt en l'endoteli i en teixit metabòlic.

Adaptada de Jeong-a Kim et al. *Circulation* 2006;113;1888-1904

2.2.4.5. El paper de NF- κ B (Nuclear factor κ B) en l'endoteli

El factor nuclear κ B (NF- κ B) és un factor de transcripció sensible a l'estrés oxidatiu que regula la transcripció de gens implicats en la resposta inflamatòria, l'apoptosi i el creixement cel·lular. Es tracta d'un heterodímer format principalment per dues subunitats, p65 i p50. En situació normal, NF- κ B es troba al citoplasma de la cèl·lula, on es manté inactiu degut a la unió de la subunitat p65 amb proteïnes repressores com les I κ B. Existeixen moltes vies que activen NF- κ B, la majoria de les quals convergeixen en l'activació de la IKK (*I κ B kinase complex*), responsable de la fosforilació de les I κ Bs. La fosforilació i posterior degradació d'I κ B pel proteosoma permet que NF- κ B quedi lliure i pugui translocar-se al nucli on activarà la transcripció de múltiples gens [83]. En condicions patològiques com són la dislipèmia, l'estrés oxidatiu i l'obesitat, es troben nivells augmentats de marcadors inflamatoris en circulació. Citocines inflamatòries com el TNF α i la IL1 β són capaces d'induir a través del seu receptor l'activació de JNK i IKK β , que donarà lloc a l'activació de NF- κ B.

inhibeix la via d'activació d'eNOS i la seva expressió. A més, NF-kB estimula la síntesi de les molècules d'adhesió, incloent-hi la ICAM1, la VCAM1 i l'E-selectina, que potencien el dany vascular. De manera interessant, NO té efectes antiinflamatoris en l'endoteli inhibint l'activitat de NF-kB i reduint l'expressió de les molècules d'adhesió. Conseqüentment, en condicions de resistència a la insulina en el que existeix una disminució de la biodisponibilitat de NO, cal tenir en compte aquest factor patològic que incrementa l'estat inflamatori [65, 68, 84].

2.3. ESTUDIS FUNCIONALS I D'IMATGE PER LA VALORACIÓ DE LA FUNCIO ENDOTELIAL I L'ARTERIOSCLEROSI SUBCLÍNICA

L'avaluació del risc cardiovascular es basa en càlculs sobre la presència de factors de risc clàssics, principalment l'edat, sexe, tabaquisme, pressió arterial, els nivells de colesterol i diabetis. Encara que molts índexs i taules s'han desenvolupat, la seva sensibilitat i especificitat per detectar persones en risc són baixos, en general, per sota del 50% [85]. Per millorar la nostra capacitat per predir el risc global de desenvolupar una complicació cardiovascular, es necessiten nous enfocaments que es troben sota avaluació. Un d'ells és l'estudi de l'arteriosclerosi subclínica. La presència de lesions arterials, fins i tot sense manifestacions clíniques, sembla ser un bon marcador de risc a nivell individual. Les imatges de les artèries i els mètodes d'estudi funcional contribuiran a millorar la capacitat de predicció. Entre els diversos sistemes d'avaluació de la funció endotelial, els que tenen una aplicació clínica es troben: en l'índex turmell-braç (ITB), el gruix íntima-mitja (IMT) de les caròtides i la valoració de la funció endotelial.

Encara que hi ha una important evidència en la recerca bàsica, que demostra que la funció endotelial és la primera alteració de la paret de l'artèria, que condueix al desenvolupament de l'arteriosclerosi, els mètodes d'avaluació de la funció endotelial encara no han arribat a l'aplicació clínica [19, 86, 87]. Això és, probablement, a causa de la manca de mètodes eficients per determinar la funció endotelial a nivell clínic. Existeixen diversos enfocaments per estudiar la funció endotelial. Uns d'ells són els marcadors bioquímics (com s'ha descrit en apartats anteriors). Molts estudis mostren el paper de les molècules d'adhesió secretades per les cèl·lules endotelials com a marcadors de funció endotelial: VCAM, ICAM, E-selectina, P-selectina, citoquines, endotelina-1, l'òxid nítric (NO) i molècules associades, entre d'altres, han estat àmpliament estudiades. Encara que hi ha estudis que mostren tant la correlació amb la disfunció endotelial i el risc cardiovascular, les seves concentracions plasmàtiques afegeixen poca informació als mètodes clàssics per al càlcul de risc cardiovascular [88]. Per altra banda, els polimorfismes de gens associats a la funció endotelial, com les correlacions de l'ECA, l'endotelina-1, i l'eNOS han estat explorats i positivament mostrats en la bibliografia. No obstant això, l'impacte d'aquests estudis a nivell clínic no és del tot significatiu.

Existeixen diversos mètodes clínics per estudiar la reactivitat vascular. Són sistemes de valorar la capacitat de dilatació de l'artèria sota un estímul diferent (Taula 3).

Taula 3. Característiques dels principals mètodes per la valoració clínica de la funció endotelial

| Tècnica | No-invasiu | Repetible | Reproducible | Reflex biològic | Independent d'operador | Predictiu |
|-----------------------------|-------------------|------------------|---------------------|------------------------|-------------------------------|------------------|
| Test intracoronari de l'Ach | - | - | +/- | + | - | + |
| FMD | + | + | +/- | + | - | + |
| PAT | + | + | +/- | + | + | + |

Abreviacions: PAT, tonometria arterial perifèrica; FMD, *flow mediated-dilation*; Ach, acetilcolina.

+ indica que existeixen evidències en la bibliografia

- evidències insuficients en la bibliografia

2.3.1. Test intracoronari de l'AcetilColina

La vasodilatació coronària induïda per l'acetil-colina (Ach) és el mètode *gold estàndard*. Mostra la capacitat de les artèries coronàries per dilatar en virtut de la perfusió Ach. És un sistema invasiu que no es pot aplicar universalment. Tot i així, correlaciona directament amb els factors de risc CV [18].

2.3.2. La Dilatació mediada per Flux (FMD)

El mètode més utilitzat és la mesura de la dilatació de l'artèria braquial mediada per flux (FMD). Aquest sistema es basa en la mesura ecogràfica del diàmetre de l'artèria braquial abans i després de la isquèmia. La dilatació de 5-10 min, després de la isquèmia, és mediada per l'endoteli i depenent de NO, per tant, la FMD reflecteix la funció vasodilatadora depenent de l'endoteli. Les anomalies derivades es consideren un marcador de dany en la funció endotelial [89]. La FMD es veu disminuïda en pacients amb aterosclerosi i amb factors de risc coronari i millora amb la teràpia per minvar el risc CV. La FMD s'associa amb la presència de factors de risc CV i amb biomarcadors plasmàtics de funció endotelial incloent-hi els nivells de cèl·lules progenitores endotelials circulants [19]. Algunes dades mostren que és independent de la mesura de la IMT [90]. Així doncs, la mesura de la FMD pot ser una bona eina pel pronòstic en la cardiologia preventiva, útil per a la predicció d'aparició d'events CV en pacients d'elevat risc i per valorar el risc en població amb risc CV baix. A més, és una

excel·lent eina per detectar canvis en la funció endotelial, basats en la hiperèmia reactiva, després d'intervencions terapèutiques. Aquest mètode ha estat àmpliament utilitzat en assajos clínics per avaluar l'acció de drogues [91].

No obstant això, no és àmpliament utilitzat a nivell clínic. Les raons són diverses, però el problema més important és la seva alta dependència als intercanvis d'operador i la seva variabilitat inter-assaig [92].

2.3.3. Tonometria Arterial Perifèrica (PAT)

En els darrers anys, diversos mètodes per avaluar la funció endotelial, independents d'operador, s'han desenvolupat. Entre ells, la tonometria arterial perifèrica (PAT) sembla ser un mètode fiable [87, 93, 94], el qual és capaç de detectar alteracions vasculars en pacients d'alt risc cardiovascular [95]. PAT és una tecnologia no invasiva que estudia l'amplitud de l'ona de pols (PWA) arterial del dit de la mà amb bio-sensors digitals. La sonda digital consisteix en un sensor en forma de didal, que imparteix un camp de pressió uniforme i presenta un defecte semblant en tota la superfície de la falange distal valorant l'evolució del volum del pols. Aquests sensors valoren els canvis en el volum digital a través d'ones de pols les quals són percebudes per un transductor de pressió i analitzades directament pel software específic. Per tant, els senyals de canvi de la pressió es filtren, s'amplifiquen, i s'emmagatzemen per a la seva posterior anàlisi. Per realitzar les mesures, es col·loquen dues sondes, cadascuna en un dit d'ambdues mans. Després d'un període d'estabilització, una isquèmia de 5 min és induïda en el braç de prova inflant mitjançant un braçalet de pressió arterial. El software específic calcula les diferències en l'amplitud de l'ona del pols (PWA) abans i després de la isquèmia controlada en comparació amb el braç control.

Encara que els mecanismes de control de la vasodilatació en les artèries grans i petites són probablement diferents, s'ha demostrat que la PWA s'associa a la producció de NO [96]. D'altra banda, aquest mètode ha estat comparat amb el *gold standard* (AchCV) que mostra una bona sensibilitat i especificitat [87]. També està directament relacionat amb el mètode de l'artèria braquial FMD [94]. Aquest mètode és capaç de detectar disfunció vascular en pacients d'elevat risc cardiovascular (Taula 4). Recents estudis mostren correlació de PAT amb el *Framingham Risk Score* en una població general [97, 98]. La capacitat predictiva de la mesura de PAT ha estat recentment demostrada i s'han associat valors de PAT disminuïts, que indiquen disfunció endotelial amb el risc d'aparició de malaltia CV [99].

El nostre grup ha estat el primer d'Espanya amb la incorporació d'aquesta tècnica. A les nostres mans les dades preliminars suggereixen que és capaç de distingir entre la SM i els subjectes sense SM, obesos vs no obesos, i pacients amb VIH i les persones no infectades pel virus [100]. A més, segons un estudi recent del nostre grup, el PAT s'associa amb les dades antropomètriques de pacients amb elevat risc CV i la millora del PAT amb els canvis terapèutics de l'estil de vida (tabaquisme, dieta i exercici físic) [101].

Per altra banda, aquesta tècnica és altament reproduïble i principalment independent d'operador. Per tant, podria ser una bona eina per avaluar la funció a nivell clínic. S'ha establert que un valor de l'índex de la hiperèmia reactiva (RHI-PAT) inferior a 1,66 indicaria una funció endotelial anormal, per tant, un major risc cardiovascular. No obstant això, els valors del rang normal, probablement varien en funció de la població, zona geogràfica, estil de vida. Per a la nostra població mediterrània, els valors normals no s'han establert encara, però les dades preliminars suggereixen que aquest punt de tall pot variar. El mètode PAT podria ser l'eina eficient per incloure a l'avaluació a nivell clínic de la funció endotelial en pacients amb un risc cardiovascular intermedi.

Taula 4. Revisió dels estudis clínics més significatius de la funció endotelial realitzats amb el PAT

| Referències | Població estudiada | Detalls de l'estudi | Resultats importants |
|------------------------------|--------------------------------------|---|---|
| Bonetti et al. 2003 [86] | 23 adults amb angina de pit | Tractament amb fàrmac adequat | El valor de PAT augmenta després del tractament. |
| Kuvin et al. 2003 [94] | 89 pacients amb angina de pit | PAT i valoració braquial simultània | PAT i FMD correlacionen i amb els factors de risc CV, i amb l'estrés. |
| Bonetti et al. 2004 [87] | 94 pacients amb CVD (cateterització) | PAT i valoració de la resposta amb Ach | El valor de PAT és inferior en pacients amb disfunció endotelial coronària. |
| Nohria et al. 2006 [96] | 19 adults sans | PAT amb tractament de L-NAME (inhibidor d'eNOS) | El valor de PAT és depenent del NO. |
| Scroeter et al. 2006 | 12 adults sans | Ingestió d'aliments risc amb flavonoides | La ingesta de flavonoides augmenta el valor de PAT. |
| Haller et al. 2007 [95] | 44 infants | PAT (DT2 vs no DT2) | El valor de PAT és inferior en nens diabètics. |
| Aversa et al. 2008 [102] | 20 DT2 | Tractament amb sildenafil. PAT i FMD | El sildenafil augmenta la resposta hiperèmica de PAT i FMD. |
| Dhindsa et al. 2008 [103] | 40 adults sans | PAT i FMD mesurat simultàniament | PAT i FMD correlacionen amb la resposta hiperèmica, però no amb el PWA. |
| Hamburg et al. 2008 [98] | 1957 adults | PAT i factors de risc CV | El valor de PAT és inferior en homes en l'obesitat, perfil lipídic alterat, DT2, tabac, tractament amb hipolipemians i augmenta amb l'edat. |
| Matsuzawa et al. 2010 [104] | 140 dones amb angina de pit | PAT i predicció de risc d'isquèmia coronària | El valor de PAT és inferior en pacients amb isquèmia. Predictor en població d'alt risc. |
| Rubinshtein et al. 2010 [99] | 329 pacients de risc CV | PAT i events CV. Seguiment de 7anys | PAT s'associa a la malaltia CV i identifica els pacients amb risc CV |

Abreviacions: PAT, tonometria arterial perifèrica; FMD, *flow mediated-dilation*; NO, òxid nítric; PWA, ona d'amplitud de pols; DT2, diabetis mellitus tipus 2; L-NAME, L-nitro-arginina-metil-èster; eNOS, sintasa de l'òxid nítric endotelial; CVD, malaltia cardiovascular; CV, cardiovascular; IMT, gruix íntima-mitja de l'artèria.

2.3.4. Gruix de l'íntima-mitja de l'artèria caròtida

L'IMT és probablement el millor mètode per avaluar la presència d'arteriosclerosi subclínica a nivell de lesió arterial. Es tracta d'un mètode reproduïble i relativament fàcil d'utilitzar el qual consisteix en realitzar una ecografia de les artèries caròtides per mesurar els canvis estructurals que es produeixen a la paret dels vasos sanguinis a causa de l'aterosclerosi. L'IMT augmenta amb el nombre de factors de risc CV associats amb l'edat, el gènere, el tabaquisme, la hipertensió, la hipercolesterolèmia i

la DT2, entre altres. És un mètode no invasiu i reproduïble per a la detecció d'aterosclerosi subclínica. A més, és una tècnica relativament barata i segura que pot visualitzar la llum i les parets de les artèries seleccionades. Hi ha molts estudis que mostren que l'IMT està directament relacionada amb el risc CV [105]. D'altra banda, s'ha acceptat com a mesura subclínica per valorar l'arteriosclerosi [106]. L'IMT es considera un indicador de l'edat arterial, i alguns estudis afirmen el benefici de la substitució per l'edat a les taules de Framingham o equivalent. Existeixen moltes evidències que mostren que la progressió de l'IMT pot ser aturada i fins i tot invertida pels tractaments antiaterogènics com les estatines o els hipotensors [107]. L'IMT no és només un indicador de les malalties de l'artèria cerebral, sinó també coronària. Molts autors afirmen que la mesura de l'IMT hauria de ser realitzada en tots els individus amb risc cardiovascular intermedi per tal de poder triar una millor intervenció clínica [108].

2.3.5. Índex Turmell-Braç

L'Índex turmell-braç (ITB) és clínicament aplicable i sembla ser un bon mètode per classificar els pacients amb risc cardiovascular elevat. L'ITB és una tècnica no invasiva, fàcil de realitzar, que pot ser aplicada a nivell clínic. Es tracta de mesurar, mitjançant un eco-Doppler, la pressió sistòlica en l'artèria humeral del braç, la tibial-posterior i la pèdia de la cama i peu respectivament d'ambdós costats de l'individu (esquerre i dret). Es calcula el quocient per tots dos costats, en el qual en el numerador es posa el valor més alt de l'extremitat inferior i en el denominador el valor més alt de pressió de l'artèria humeral. Un ITB baix ($<0,9$) es considera un marcador de malaltia arterial perifèrica i un indicador d'arteriosclerosi. Per tant, els individus amb aquesta alteració han de ser tractats intensivament amb independència de la seva qualificació de risc cardiovascular. A la població ARIC l'ITB es va correlacionar negativament amb el risc cardiovascular [109]. En l'estudi MERITO, en el qual el nostre grup va participar, hi ha dades que mostren que aproximadament el 25% dels pacients diabètics assintomàtics i els individus amb un risc cardiovascular intermedi presenten un ITB anormal [110]. Aquests pacients han de ser considerats com d'alt risc, però en general no són tractats adequadament [111].

2.4. ADIPOCYTE FATTY ACID BINDING PROTEIN (FABP4)

2.4.1. Família de FABP

Les proteïnes d'unió a àcids grassos, o FABPs, constitueixen una família de proteïnes intracel·lulars de baix pes molecular (14-15kDa) amb gran afinitat per lligands hidrofòbics com àcids grassos saturats i insaturats, eicosanoids i altres lípids [112]. Estan involucrades amb el transport intracel·lular d'àcids grassos cap a enzims i diferents compartiments cel·lulars, modulant el metabolisme lipídic intracel·lular i regulant l'expressió gènica [113]. Podem trobar FABPs al llarg de totes les espècies, demostrant una forta conservació en l'evolució. Existeixen, com a mínim, 9 FABPs citoplasmàtiques, específiques de teixit (Taula 5), identificades fins a l'actualitat (Figura 9). L'estructura gènica conservada en tots els membres de la família consisteix en 4 exons separats per 3 introns i una caixa *TATA*box en la regió de transcripció. L'estructura tridimensional de la proteïna presenta característiques molt similars en tots els tipus de FABP tot i que existeixen diferències identificades en la seqüència d'aminoàcids (del 22 al 73% de semblança en l'estructura proteica). Estan compostes per 10 làmines β antiparal·leles [114, 115].

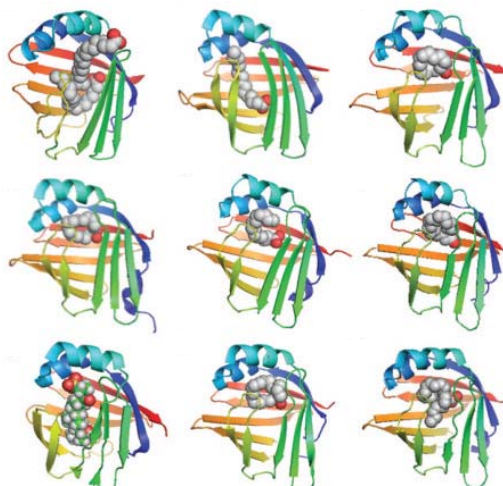


Figura 9. Estructura cristal·logràfica de l'enllaç entre les FABPs citoplasmàtiques i els àcids grassos.

Furuhashi M et al. *Nature Reviews* 2008;7:489-502

La funció principal d'aquestes proteïnes citoplasmàtiques és potenciar la solubilitat dels àcids grassos i el seu transport cap a enzims i compartiments cel·lulars (a la mitocondria, als peroxisomes per l'oxidació, al reticle endoplasmàtic per la

reesterificació i emmagatzematge, o al nucli per la regulació de l'expressió gènica) (Figura 10). Estudis de sobreexpressió i d'inhibició de la proteïna suggereixen que FABP està involucrada en el metabolisme lipídic [116].

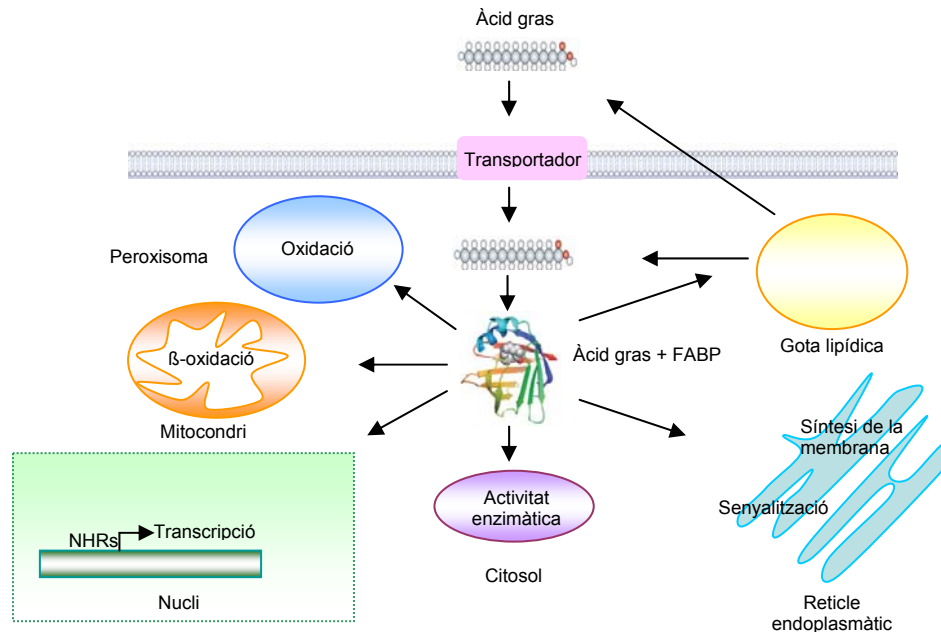


Figura 10. Esquema de la funció principal de les FABPs

Per la seva modulació de la biodisponibilitat dels àcids grassos, les FABPs tenen un efecte indirecte sobre diversos processos cel·lulars en els quals els àcids grassos estan involucrats, com és la regulació de vies de senyalització. Els àcids grassos modulen l'activació de la proteïna quinasa C, de l'inhibidor de la quinasa kappa (IKK), que són mecanismes relacionats amb la resistència a la insulina i la SM [117, 118]. A més, el paper de les FABPs en la regulació de la transcripció gènica està ben caracteritzat, especialment en gens relacionats amb el metabolisme lipídic [114]. Les FABPs cooperen amb els factors de transcripció de la família dels PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptor*) induint la transactivació dependent de lligand dels PPAR [119].

Taula 5. Quadre resum de les nou FABPs descrites i específiques de teixit.

| Gen | Nom comú (en anglès) | Nom alternatiu | Expressió |
|------------|-----------------------------|---------------------------------------|---|
| Fabp1 | <i>Liver FABP</i> | L-FABP, h-FABP, Z proteïna | Fetge, intestí, pàncrees, ronyons, pulmons i estómac |
| Fabp2 | <i>Intestinal FABP</i> | I-FABP, gFABP | Intestí i fetge |
| Fabp3 | <i>Heart FABP</i> | H-FABP, MDGI | Cor, múscul esquelètic, cervell, ronyons, pulmons, estómac, testicles, aorta, glàndula suprarenal i mamària, placenta, ovaris i teixit adipós marró |
| Fabp4 | <i>Adipocyte FABP</i> | A-FABP, aP2, ALBP | Adipòcit, macròfag i cèl·lules dendrítiques |
| Fabp5 | <i>Epidermal FABP</i> | E-FABP, PA-FABP, <i>Mal-1</i> | Epidermis, llengua, adipòcit, macròfag, cèl·lula dendrítica, glàndula mamària, cervell, intestí, ronyons, fetge, testicles, retina i melsa. |
| Fabp6 | <i>Ileal FABP</i> | II-FABP, I-BABP, <i>gastrotropina</i> | Íleum, ovari, glàndula suprarenal i estómac |
| Fabp7 | <i>Brain FABP</i> | B-FABP, MRG, BLBP | Cervell, cèl·lula glial, retina i glàndula mamària |
| Fabp8 | <i>Myelin FABP</i> | M-FABP, PMP2 | Sistema nerviós perifèric i cèl·lula de <i>Scwann</i> |
| Fabp9 | <i>Testis FABP</i> | T-FABP | Testicles, glàndules salivals i mamàries |

De les diverses FABPs, específiques de teixit [120], podem destacar:

FABP1 (L-FABP) és abundant en el citoplasma de l'hepatòcit del fetge, però també s'expressa en altres teixits com en l'intestí, el pàncrees, els ronyons, els pulmons i l'estómac. Representa el 5% del total de proteïnes citosòliques de l'hepatòcit. El promotor del gen de *fabp1* conté una regió de reconeixement per PPRE i es relaciona amb el transport dels seus lligands caps als enzims específics i cap al nucli, on interacciona amb receptors nuclears activats per PPARs [121, 122]. A diferència de la resta de FABPs, presenta la capacitat d'unió de dos lligands simultàniament suggerint la qual cosa afavoreix les interaccions entre lligand i receptor.

FABP2 (I-FABP), s'expressa majoritàriament en l'epiteli intestinal, abundant en la secció distal, on podria interferir en la captació d'àcids grassos provinents de la dieta cap a la circulació sanguínia.

FABP3 (H-FABP) s'expressa en diversos teixits com el cor, el múscul esquelètic, el cervell, els ronyons, els pulmons, l'estómac, els testicles, l'artèria aorta, la glàndula suprarenal i mamària, la placenta, els ovaris i el teixit adipós marró. És essencial per a la β -oxidació en els cardiomiòcits i modula la captació d'àcids grassos a nivell de múscul esquelètic. La seva expressió és regulada per l'exercici físic, els agonistes de PPAR α i la testosterona i oscil·la segons el cicle circadià.

FABP4 (A-FABP o aP2) s'expressa en adipòcits, macròfags i cèl·lules dendrítiques. Representa al voltant del 6% del total de proteïnes citosòliques dels adipòcits madurs. La seva funció principal, com es presenta detalladament en el següent apartat, és el transport d'àcids grassos de cadena llarga a altres compartiments subcel·lulars per al metabolisme, o per a la secreció cel·lular després de la lipòlisi. FABP4 també pot ser translocada al nucli per regular la funció de determinats factors de transcripció com PPAR γ . Actualment, existeix un increment de les evidències del paper predictiu de FABP4 circulant en la síndrome metabòlica i el risc cardiometabòlic.

FABP5 (E-FABP) s'expressa principalment en les cèl·lules epidèrmiques de la pell. Tot i així també és present en altres teixits com la llengua, els adipòcits, els macròfags, la cèl·lula dendrítica, la glàndula mamària, el cervell, l'intestí, els ronyons, el fetge, els testicles, la retina i la melsa. Comparteix un 52% d'homologia d'aminoàcids amb la FABP4 i presenta la mateixa afinitat i selectivitat pels lligands com els àcids grassos. Evidències dels darrers anys en experimentació animal, suggereixen que FABP5 plasmàtica també juga un paper destacat en les alteracions metabòliques i resistència a la insulina.

FABP6 (II-FABP) és present en l'íleum (part distal de l'intestí prim), l'ovari, la glàndula suprarenal i l'estómac. Tot i que la seva contribució no és massa clara, presenta una afinitat molt alta pels àcids biliars. S'ha hipotetitzat que pugui realitzar la funció de receptor citosòlic dels àcids biliars i s'ha demostrat que aquests poden regular l'expressió de FABP6. Es necessitarien més estudis per conèixer la seva implicació en l'absorció lipídica en l'intestí.

FABP7 (B-FABP) és present en el cervell, la cèl·lula glial, la retina i la glàndula mamària. S'expressa en diverses regions del cervell dels ratolins en l'estadi embriogènic i la seva expressió va minvant en el procés de diferenciació. Presenta una gran afinitat pels àcids grassos *n*-3 poliinsaturats com l'àcid docosahexanoic, el qual és un important nutrient pel sistema nerviós i és considerat el seu principal lligand. En

condicions patològiques, B-FABP és sobreexpressada en pacients amb el Síndrome de Down i l'esquizofrènia.

FABP8 (M-FABP) s'expressa en el sistema nerviós perifèric i la cèl·lula de *Scwann*. És una de les proteïnes més abundants en la mielina del sistema nerviós perifèric. La seva funció coneguda és transportar principalment fosfolípids per a la producció i el manteniment de la mielina (70% composta de lípids).

FABP9 (T-FABP) es presenta en el teixit dels testicles, en les glàndules salivals i mamàries.

2.4.2. FABP4

Adipocyte fatty acid binding protein, també coneguda com a FABP4, ALBP (*adipocyte lipid binding protein*) o aP2, va ser per primera vegada descrita en teixit adipós [123]. És la proteïna intracel·lular millor caracteritzada com a transportadora de lípids. S'expressa en els adipòcits madurs, teixit adipós i macròfags [124]. Un estudi recent mostra que FABP4 s'expressa també en cèl·lules endotelials microvasculars [125]. Representa al voltant del 6% del total de proteïnes cel·lulars dels adipòcits madurs [126]. La seva funció principal sembla ser com a xaperona citoplasmàtica de cadena llarga d'àcids grassos, la qual els transporta a altres compartiments subcel·lulars per al metabolisme, o per a la secreció cel·lular després de la lipòlisi [127, 128]. FABP4 també pot ser translocada al nucli per regular la funció de determinats factors de transcripció com PPAR γ .

S'han realitzat diversos treballs amb models ratolins *knock-out* per FABP4 per estudiar les funcions i l'impacte de la proteïna en l'homeòstasi del metabolisme. Tot i que els models de ratolins usats han aportat evidències dels efectes específics i els mecanismes d'acció de FABP4 en el metabolisme i la inflamació, la biologia definitiva i la funció de FABP4 en la fisiologia humana segueixen sent poc clares.

Curiosament, els ratolins *knock-out* FABP4, mostren que aquesta deficiència sembla tenir efecte en la sensibilitat a la insulina, el metabolisme lipídic i la lipòlisi, aspectes relacionats amb la síndrome metabòlica i en presència d'obesitat induïda genèticament o per dieta [129]. Per tant, la deficiència d'aP2 protegeix contra la hiperinsulinèmia, la resistència a la insulina i la diabetis tipus 2 induïda per l'obesitat [117]. Aquest ratolins disminueixen l'expressió de TNF α en teixit adipós. En els ratolins *knock-out* FABP4 s'ha demostrat que redueixen un 40% la lipòlisi basal *in vivo* i augmenten la secreció

d'àcids grassos 2 o 3 vegades més *in vitro*, suggerint un increment d'àcids grassos en plasma [130, 131]. Per tant, FABP4 podria mediar l'eflux d'àcids grassos. FABP4, doncs, té un paper fisiològic en la regulació de la lipòlisi adipocitària. La reducció de la lipòlisi en aquests models va ser inicialment atribuïda a la capacitat de FABP4 d'unir-se i activar HSL (*Hormone-sensitive lipase*) formant complexos 1:1 amb la lipasa (interacció proteïna-proteïna) [132]. No obstant, l'activació de HSL, mitjançant la FABP4, depèn de les propietats de FABP4 en unir-se als àcids grassos. En absència dels àcids grassos, la formació del complex FABP4 i la HSL no està demostrada.

Amb la finalitat d'avaluar si la deficiència de FABP4 podia tenir conseqüències a nivell de macròfag, que pogués interferir en el desenvolupament de l'arteriosclerosi, es varen aïllar macròfags de ratolins doble *knock-out* per FABP4 i apoE (model murí establert d'arteriosclerosi). En aquestes cèl·lules, es va observar una reducció de les citocines proinflamàtòries, com TNF- α , IL1 β , MCP-1 i IL6, i una reducció en l'acumulació de colesterol esterificat en el seu interior quan es van exposar a LDL modificades [117]. Totes aquestes modificacions, en models animals, són acompanyades d'una disminució en el tamany de les lesions ateroscleròtiques i un retard en el desenvolupament de les plaques ateroscleròtiques [121, 133, 134]. Aquests resultats suggereixen que l'expressió de FABP4 pot tenir un paper important en la formació de la cèl·lula escumosa i en el desenvolupament de l'arteriosclerosi a través de mecanismes potencialment independents dels seus efectes metabòlics.

L'expressió de FABP4 és potenciada durant la diferenciació adipocitària i és regulada a nivell transcripcional [113]. Recents estudis *in vitro* demostren la regulació positiva de l'expressió de FABP4 pels àcids grassos, PPAR γ i insulina, com també pels agonistes de PPAR γ com són les tiazolidindiones (TZDs, fàrmacs antidiabètics) [135, 136]. Aquests resultats també es varen comprovar en models animals. Estudis en el nostre grup, van demostrar que el tractament amb TZDs indueixen la diferenciació adipocitària *in vitro* associada a l'increment de l'expressió de mRNA de FABP4 i de nivells de proteïna cel·lular al medi de cultiu [137].

A més, estudis recents mostren que PPAR γ regula l'expressió de FABP4 a través de PPPE (*peroxisome proliferator responsive element*) present en el promotor del gen de FABP4 [138]. Per altra banda, la interacció dels àcids grassos amb FABP4 és essencial per a la translocació cap al nucli, on el complex és capaç d'interaccionar amb PPAR γ i activar-lo [118].

2.4.2.1. FABP4 en macròfags

FABP4 s'expressa en macròfags i és capaç de regular les mateixes funcions biològiques que en els adipòcits: acumulació de lípids, secreció de citoquines i expressió d'un gran nombre de gens involucrats amb el metabolisme lipídic i la inflamació.

L'existència d'un cert paral·lelisme entre la biologia dels adipòcits i els macròfags resulta evident si tenim en compte que diferents gens importants per les cèl·lules adipocitàries, entre els quals s'inclouen factors de transcripció, citocines, molècules proinflamatòries, transportadors d'àcids grassos i *receptors scavengers*, s'expressen també en macròfags, on juguen un paper significatiu.

La primera evidència de l'expressió i regulació de FABP4 en macròfags es va mostrar en estudis realitzats *in vitro* amb cultius primaris de monòcits humans o amb THP-1 (línia cel·lular de monòcits). En aquests estudis, es va demostrar que FABP4 s'expressa en macròfags després del tractament amb un inductor de la diferenciació a monòcits com és el PMA [34]. També s'ha mostrat que els agonistes PPAR γ estimulen l'expressió de FABP4 en monòcits [139], i que les LDL oxidades indueixen tant el seu mRNA com la proteïna en macròfags THP-1 [127]. En canvi, s'ha vist que la inducció de FABP4 a través de LDL oxidades és inhibida pel tractament amb atorvastatina [140].

En absència de FABP4, l'activitat de PPAR γ en el macròfag s'incrementa, activant l'expressió de CD36 i l'estimulació de la captació de lipoproteïnes. L'augment de l'activitat de PPAR γ en deficiència de FABP4 en macròfags està acompanyat també per una estimulació significativa de LXR α i ABCA1 incrementant la via d'eflux del colesterol [118]. Les proteïnes procedents de l'eflux de colesterol en deficiència de FABP4 són estimulades i el colesterol és secretat. En paral·lel, existeix una reducció de IKK β i de l'activitat de NF κ B, suprimint les funcions proinflamatòries. En canvi, la sobreexpressió de FABP4 provoca l'acumulació d'ésters de colesterol. Aquests resultats suggereixen que l'expressió de FABP4 té un paper important en la formació de la cèl·lula escumosa i en la inflamació del procés ateroscleròtic [123, 124].

A través de les seves diferents accions en adipòcits i en macròfags, FABP4 presenta un punt de connexió entre diferents característiques de la síndrome metabòlica, i pot constituir una nova diana terapèutica per a la prevenció i tractament de l'aterosclerosi.

2.4.2.2. FABP4 circulant i alteracions metabòliques

Tot i que la FABP4, tradicionalment, ha estat descrita com a proteïna citosòlica, estudis dels darrers anys han demostrat que aquesta proteïna pot ser secretada pels adipòcits al medi extracel·lular en absència de dany cel·lular [128]. L'estudi de Xu i col·laboradors va mostrar per espectrometria de masses, com FABP4 és alliberada al medi procedent d'adipòcits 3T3-L1. La presència de FABP4 plasmàtica ha estat confirmada en diferents estudis i la seva concentració en circulació és comparable a la majoria d'adipoquines (10-60ng/ml) [128, 141]. El teixit adipós es considera la màxima font de FABP4 circulant, tot i així la contribució de FABP4 secretada dels adipòcits versus els macròfags, no ha estat averiguada. L'únic estudi *in vivo*, que s'ha realitzat, ha revelat una correlació entre FABP4 en el sèrum i la seva expressió a nivell de greix visceral i subcutani en models animals [142]. En humans, no existeix cap estudi que mostri la relació entre FABP4 del teixit adipós i la concentració en el sèrum.

Així doncs, FABP4 es troba circulant en el plasma, i, en els darrers anys, molts esforços s'han centrat en el descobriment de la seva funció. Actualment, no es coneixen ni les vies de secreció de la proteïna al medi extracel·lular, ja que la proteïna no conté cap senyal de secreció. A més, la seva funció fisiològica en circulació és desconeguda. En recents estudis, existeix un increment de les evidències del paper predictiu de FABP4 en la síndrome metabòlica i el risc cardiometabòlic [128, 143] (Taula 6). No obstant això, a nivell molecular no existeix cap relació causal entre la presència de FABP4 circulant i l'aparició d'alteracions metabòliques. El nostre grup i altres han demostrat que les concentracions plasmàtiques de FABP4 estan directament relacionades amb la distribució de greix corporal i es troben augmentades en pacients amb obesitat, SM, diabetis tipus 2, hiperlipèmia familiar combinada o en lipodistròfia en pacients VIH [130, 137, 144-146]. Alguns estudis mostren una correlació de FABP4 i la resistència a la insulina, i s'ha postulat com a predictor d'alteració de la regulació metabòlica [128, 141, 147]. Els nivells de FABP4 plasmàtica també s'han associat amb la presència de malaltia cardiovascular [142, 148]. No obstant això, el paper causal de FABP4 en aquests processos no ha estat establert. Existeixen evidències indirectes que FABP4 circulant podria intervenir en la resistència a la insulina, la dislipèmia aterogènica i contribuir amb la inflamació sistèmica ja que correlaciona positivament amb la PCR [137, 141, 149]. S'ha demostrat també una associació inversa amb l'adiponectina en plasma (protectora) [142], tot i que en algun estudi posterior, aquesta correlació ha estat positiva. Per altra banda, també s'ha associat a marcadors d'arteriosclerosi subclínica com la mesura de l'engruïment de la paret arterial (IMT) [150] i el volum de placa d'ateroma, mesurat per ecografia

intravascular (IVUS) [151]. Molts estudis mostren un dimorfisme sexual en FABP4 plasmàtica, amb nivells més augmentats en dones [137, 147]. Una explicació per aquesta diferència en el gènere podria ser que el percentatge de greix en dones és superior en el teixit adipós subcutani (SAT), i en canvi en els homes es troba augmentat en el teixit adipós visceral (VAT). Diversos estudis mostren que l'expressió de FABP4 és superior en el SAT que en VAT [123, 124, 152]. Per altra banda, també s'està estudiant la regulació de l'expressió de FABP4 mediada per hormones. El paper inhibitori de la testosterona en el cas de la secreció d'adiponectina, podria estar lligat també en la secreció de FABP4.

Altres estudis mostren que la pèrdua de pes i la intervenció en l'estil de vida [153], promouen la reducció plasmàtica de FABP4, mostrant un lligand d'aquesta proteïna amb paràmetres d'adipositat [154].

Intervencions farmacològiques han estat també estudiades i s'ha demostrat la influència que poden tenir en la circulació de FABP4 en humans *in vivo*. En un estudi longitudinal amb pacients dislipèmics (no diabètics), es va valorar el tractament amb atorvastatina durant 3 mesos. Els resultats varen ser la disminució de FABP4 plasmàtica independentment dels canvis en els nivells de colesterol [155]. Estudis posteriors del nostre grup [137] mostren cap efecte del tractament d'estatines en els nivells de FABP4 circulant, en canvi s'observa un augment de la concentració plasmàtica en els pacients tractats amb TZDs. Aquest resultat es confirma amb un estudi longitudinal amb pacients diabètics tractats durant 12 setmanes amb pioglitazone, en el qual es va observar un augment de FABP4 plasmàtica paral·lelament amb un increment de l'activitat PPAR γ en cèl·lules mononuclears perifèriques. Aquests resultats donen suport als estudis *in vitro* i podrien explicar el fet que el tractament amb TZDs a través de la inducció de l'activitat de PPAR γ induïx la diferenciació adipocitària i l'acumulació de greix intracel·lular [136, 139].

Per altra banda, un estudi recent mostra l'impacte directe de FABP4 circulant en la disminució de la contractibilitat de les cèl·lules musculars del miocardi, la qual suggereix que FABP4 en plasma podria tenir un efecte directe en algunes cèl·lules i els teixits perifèrics [156]. Per tant, nivells elevats de FABP4 plasmàtica podrien estar implicats en el dany arterial en condicions d'obesitat, SM i diabetis tipus 2.

2.4.2.3. FABP4 com a diana terapèutica

Recentment, s'ha sintetitzat un potent inhibitori de FABP4, el BMS309403, el qual desenvolupa una inhibició competitiva de la unió de l'àcid gras en la cavitat interna de FABP4 [157]. *In vitro*, s'ha observat una reducció de la formació de cèl·lules

Introducció

escumoses demostrat per la disminució del 40% de l'acumulació intracel·lular d'ésters de colesterol, degut a l'augment de l'eflux de colesterol. En models animals, el tractament amb l'inhibidor redueix l'expressió de citocines inflamatòries en macròfags. En adipòcits, s'observa una reducció de la captació de greix. Models animals amb obesitat induïda genèticament o per dieta, tractats amb l'inhibidor, presenten una disminució en els nivells de glucosa, insulina i triglicèrids, un augment d'adiponectina i pel contrari una elevada concentració d'àcids grassos lliures. En models animals deficients amb apoE, la inhibició de FABP4 redueix les lesions ateroscleròtiques tot i no haver canvis en la glucosa i el metabolisme lipídic.

Taula 6. Revisió dels estudis clínics més significatius amb FABP4 circulant

| Referències | Població estudiada | Detalls de l'estudi | Resultats importants |
|----------------------------|---|---|--|
| Stejskal et al. 2006 [147] | 71 SM; 67 controls | Estudi de l'obesitat i la SM | FABP4 elevada en SM. Relació de FABP4 i els nivells de glucosa, insulina, TG, IMC, perímetre abd i negativament amb HDL. |
| Xu et al. 2006 [128] | 229 individus (129 obesos) | Estudi de l'obesitat i la SM | FABP4 superior en obesos correlaciona perímetre abd, la pressió, dislipèmia, resistència a la insulina, components de SM. |
| Cabré et al. 2007 [137] | 169 DT2; 105 controls | Estudi de la SM i el tractament amb TZD en DT2 | FABP4 superior en DT2, SM i correlaciona amb obesitat, TG, lipoperòxids, PCR, pressió arterial, adiponectina. TZD augmenta l'expressió de FABP4. |
| Tso et al. 2007 [142] | 544 adults | Estudi de la predicció de DT2 | FABP4 es correlaciona amb marcadors de risc CV. Predictor independent de patir DT2. |
| Xu et al. 2007 [141] | 495 individus de Hong Kong CVR study population | Estudi prospectiu de l'aparició de SM | FABP4 prediu la SM independentment de l'adipositat i la resistència a la insulina. |
| Yeung et al. 2007 [150] | Cohort xinesa (479 individus) | Arteriosclerosi subclínica: IMT | FABP4 es correlaciona amb la IMT i en ♀ amb la presència de placa d'ateroma. |
| Cabré et al. 2008 [146] | 169 DT2; 105 controls | Dislipèmia aterògena en diabètics | Correlació TG, ApoCIII, VLDL i negativa amb HDL. Nivells baixos adiponectin, elevats de FABP4 predictors de la dislipèmia. |
| Cabré et al. 2008 [145] | 161 DT2; 102 controls | Estudi de la disfunció renal en DT2 | FABP4 correlaciona amb la creatinina i negativament MDRD-GFR en DT2. |
| Coll et al. 2008 [130] | 183 individus VIH | Estudi de la lipodistrofia i la FABP4 en VIH | FABP4 elevada en SM i lipodistrofia en VIH. Correlació amb IMC, TG, insulina i pressió. |
| Cabré et al. 2009 [144] | 273 individus de població de HFC | Estudi de la presència de FABP4 en aquesta població i la relació amb obesitat | Correlaciona IMC, Perímetre abd, HOMA index i insulina. En el subgrup d'obesos s'associa amb TG i el tamany de les LDL. |

| | | | |
|---------------------------|---------------------|--|--|
| Koh et al. 2009 [158] | 181 pacients DT2 | Associació amb malaltia del fetge (no-alcohòlica) | FABP4 es correlaciona amb aquesta malaltia en DT2. |
| Rhee et al. 2009 [148] | 234 pacients de CVD | Estudi amb individus CVD als quals se'ls hi ha realitzat una angiografia coronària | FABP4 elevada en DT2 i s'associa a l'estenosis de les artèries coronàries. |
| Yeung et al. 2009 [159] | 273 pacients DT2 | Estudi de les complicacions macrovasculars | FABP4 es correlaciona amb la nefropatia en DT2. |
| Hsu, et al. 2010 [143] | 98 individus CVD | Estudi de la SM i la CVD | S'associa als components de SM, IMC, TG, LDL, i negativament a HDL. |
| Khalyfa et al. 2010 [149] | 309 nens | Estudi en l'obesitat infantil | Relació de FABP4 IMC, HOMA index, PCR. Freqüència al·lèlica associada en obesos. |
| Miyoshi et al. 2010 [151] | 125 individus CVD | Metodologia: IVUS | FABP4 correlaciona amb el volum de placa d'ateroma, IMC, IL6, PCR, i negativament amb HDL. |

Abreviacions: IMC, índex de massa corporal; HDL, lipoproteïna d'alta densitat; LDL, lipoproteïna de baixa densitat; VLDL, lipoproteïna de molt baixa densitat; TG, triglicèrids; DT2, diabetis tipus 2; SM, síndrome metabòlica; CVD, malaltia cardiovascular; PCR, proteïna C reactiva; VIH, virus de la immunodeficiència humana; TZD, tiazodielindiones; CV, cardiovascular; IVUS, ecografia intravascular; MDRD-GFR, taxa de filtrat glomerular; IMT, gruix íntima-mitja de l'artèria.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FABP4 I BIOMARCADORS DE LA DISFUNCIÓ ENDOTELIAL. ESTUDI CLÍNIC I IN VITRO

Gemma Aragonès Bargalló

ISBN:978-84-693-8853-2/DL:T.1951-2010

3. Hipòtesi i Objectius

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FABP4 I BIOMARCADORS DE LA DISFUNCIÓ ENDOTELIAL. ESTUDI CLÍNIC I IN VITRO

Gemma Aragonès Bargalló

ISBN:978-84-693-8853-2/DL:T.1951-2010

HIPÒTESI

Els pacients amb obesitat abdominal, síndrome metabòlica o diabetis tipus 2 tenen un increment del risc cardiovascular. La disfunció de l'endoteli vascular es considera un factor determinant de les malalties cardiovasculars, per tant, els pacients amb risc cardiovascular elevat presenten alteracions de la funció endotelial mesurada per tècniques diverses. La hiperèmia reactiva (RH) perifèrica és un paràmetre subrogat de disfunció endotelial que es pot mesurar mitjançant la determinació de la tonometria arterial perifèrica (PAT). Els pacients amb les alteracions metabòliques descrites presentaran alteracions del RHI-PAT i dels nivells circulants de biomarcadors de funció endotelial. La disfunció endotelial dels pacients obesos, amb SM i DT2 pot estar induïda per adipoquines i altres proteïnes derivades del teixit adipós, entre elles la FABP4. Aquesta proteïna sintetitzada al teixit adipós presenta concentracions elevades en plasma en les situacions metabòliques abans esmentades. Creiem que a més d'un marcador de risc cardiovascular, la FABP4 circulant té efectes lesius sobre teixits perifèrics i, en concret, pot afectar la funció endotelial interferint en el correcte metabolisme de les cèl·lules endotelials.

OBJECTIUS

1. Estudiar la relació del RHI-PAT i biomarcadors circulants de funció endotelial, inflamació i oxidació lipídica en pacients amb risc cardiovascular.
2. Estudiar l'associació de FABP4 circulant amb la disfunció endotelial mesurada per RHI-PAT i biomarcadors plasmàtics.
3. A nivell *in vitro*, estudiar els mecanismes moleculars a través dels quals FABP4 indueix disfunció endotelial.
 - 3.1. Avaluar l'efecte de FABP4 sobre l'expressió d'eNOS en cèl·lules endotelials.
 - 3.1.1. Estudiar l'efecte de FABP4 sobre la via de senyalització PI3K/Akt dependent d'insulina en HUVECs.
 - 3.2. Avaluar l'efecte de FABP4 sobre l'adhesió leucocitària en una monocapa de cèl·lules endotelials.
 - 3.2.1. Estudiar l'efecte de FABP4 sobre la via de les MAPK i les molècules d'adhesió en HUVECs.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FABP4 I BIOMARCADORS DE LA DISFUNCIÓ ENDOTELIAL. ESTUDI CLÍNIC I IN VITRO

Gemma Aragonès Bargalló

ISBN:978-84-693-8853-2/DL:T.1951-2010

4. Materials i Mètodes

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FABP4 I BIOMARCADORS DE LA DISFUNCIÓ ENDOTELIAL. ESTUDI CLÍNIC I IN VITRO

Gemma Aragonès Bargalló

ISBN:978-84-693-8853-2/DL:T.1951-2010

4.1. ESTUDI CLÍNIC

4.1.1. Població i disseny de l'estudi

Es va realitzar un estudi transversal en el qual la població total estudiada va ser de 257 individus (76♀ i 181♂) entre 22-80 anys, amb cap evidència clínica de presentar malaltia cardiovascular, amb risc cardiovascular global intermedi (5-20% en 10 anys segons el FRS). Els individus van ser assistits a la Unitat de Medicina Vascular i Metabolisme de l'Hospital Universitari Sant Joan de Reus. El criteri d'ATPIII va ser utilitzat per a diagnosticar la presència de SM. Els pacients amb previs events coronaris, cerebrals o perifèrics; càncer (hepàtic, renal, pulmonar); malalties endocrines inflamatòries o altres malalties cròniques o amb dislipèmies genètiques, no van ser inclosos en l'estudi.

Es va realitzar a tots els participants:

1. Estudi antropomètric: es va dur a terme una exploració física completa, es van recollir els paràmetres antropomètrics i es va fer la valoració del risc CV.
2. Estudi vascular: es va realitzar la valoració de la funció vascular per tonometria arterial perifèrica a tots els individus abans de l'extracció de sang.
3. Estudi bioquímic i de biomarcadors circulants endotelials, d'inflamació i d'oxidació lipídica: a partir del plasma o del sèrum es van determinar les concentracions de la proteïna FABP4 i es van quantificar les concentracions dels biomarcadors circulants: sE-selectina, sVCAM1, sICAM1, TNF α , IL6, LDL oxidades i els anticossos de les LDL oxidades. Els biomarcadors circulants es van determinar en 245 participants.

L'estudi es va dur a terme mentre els pacients continuaven amb tractament pel control dels factors de risc CV segons els protocols dels facultatius de l'hospital. L'estudi va ser aprovat pel Comitè d'Investigació Ètic i Clínic de l'Hospital Universitari Sant Joan de Reus, i tots els participants van signar el consentiment informat (veure Annex I).

4.1.2. Obtenció de mostres i anàlisi bioquímica

Les mostres de sang es van obtenir després d'un període de 12 hores en dejú, centrifugades (2500rpm, 15min) immediatament i guardades a -80°C , al Banc de Mostres Biològiques (Biobanc) de l'Hospital Universitari Sant Joan de Reus (Figura 11). A partir de les alíquotes de plasma i sèrum es va realitzar l'anàlisi bioquímica.

Els paràmetres bioquímics estàndards es van determinar en sèrum mitjançant mètodes normalitzats del laboratori clínic. Les concentracions de colesterol, triglicèrids, glucosa, LDL i HDL directe i de PCR ultrasensible van ser mesurades utilitzant assaigs enzimàtics (ITC Diagnostics, Barcelona) o per immunoassaigs turbidimètrics (Beckman-Coulter, Fullerton, CA). Aquests mètodes van ser adaptats per l'autoanalitzador *Cobas Mira Plus* (Roche Diagnostics). L'hemoglobina glicada (HbA_{1c}) es va mesurar per cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC).

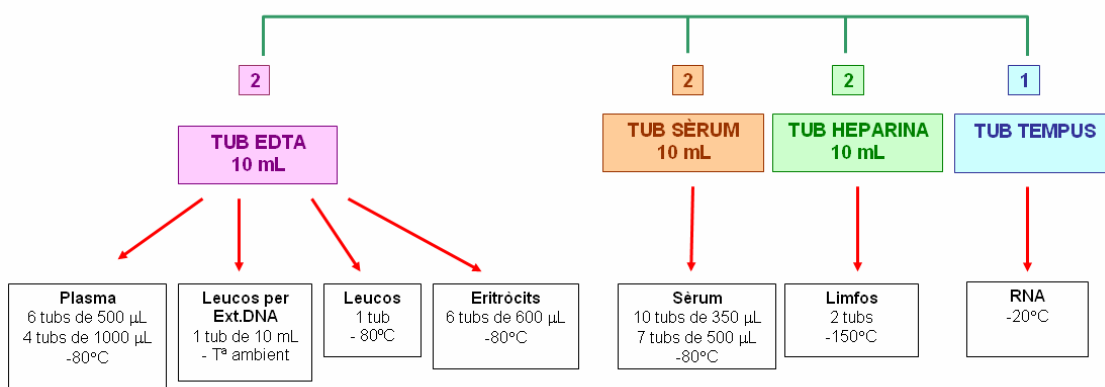


Figura 11. Esquema de l'obtenció de mostres i les alíquotes processades i guardades al Biobanc.

4.1.3. Estudi vascular

4.1.3.1. Tonometria arterial perifèrica

L'estudi de la funció endotelial, mesurant la hiperèmia reactiva mitjançant tonometria arterial perifèrica, es va realitzar amb l'aparell Endo-PAT 2000 (Itamar Medical, Caesarea, Israel) el qual mesura aquests canvis depenents de NO en l'endoteli en el to vascular, utilitzant bio-sensors digitals [96] (Figura 12). Els sensors valoren els canvis en el volum de l'ona de pols de les artèries digitals (PWA) els quals són percebuts per un transductor de pressió i analitzats directament pel software específic.

Els bio-sensors en forma de didal consten d'una coberta externa, rígida i una superfície de làtex inflable en coixins pneumàtics en el seu interior. Els sistemes de pressió digital eviten la distensió venosa. Els canvis en el to arterial són provocats en resposta a una oclusió de l'artèria braquial induïda durant 5 min. Les mesures del braç control (en el procediment està indicat) són utilitzades per desestimar canvis no-depenents de NO en el to vascular.



Figura 12. Imatge de l'aparell Endo-PAT 2000.

El procediment va ser el següent per cada individu (Figura 13):

Totes les valoracions es van realitzar a primera hora del matí (8 a 10h), abans de l'extracció de sang. Els pacients no podien portar ni rellotge, ni braçalets ni anells. La valoració es va dur a terme en un ambient agradable i tranquil, amb una temperatura ambiental controlada (18-22°C). Els pacients eren col·locats en posició supina amb els braços i les mans a la mateixa alçada utilitzant un reposa-braç. El braçalet de pressió es va situar en el braç d'estudi (braç esquerre), i, en canvi, el braç dret ens va servir de control. Les sondes digitals es van col·locar al segon dit de cada mà i els dits del voltant es van separar amb l'ajuda d'una petita esponja per tal de no interferir. La valoració va començar amb el registre durant un període basal de 5 min, tot seguit es va inflar el braçalet de pressió fins a una pressió sistòlica superior a 50 mmHg de la del pacient, durant 5 min. A continuació, es va desinflar el braçalet induint la hiperèmia reactiva, la qual es va mantenir durant 5 min més.

L'índex de la hiperèmia reactiva (RHI-PAT) va ser analitzat per l'ordinador, independent d'operador. La mitjana de l'amplitud de la senyal del PAT durant la post-oclusió es divideix per la mitjana de l'amplitud de la senyal del PAT abans de ser inflat en estat basal (3.5 min). El valor de RHI-PAT va ser normalitzat pel braç control per compensar possibles canvis sistèmics. La disfunció endotelial va ser definida com el valor de RHI-PAT < 1.66 segons les instruccions del fabricant.

Els avantatges principals són que és un mètode reproduïble i independent d'operador, és a dir, no existeixen interpretacions subjectives de l'augment de diàmetre associat amb els ultrasons tant en l'artèria braquial com en la FMD. A més, representa un mètode no invasiu per la mesura indirecta de la funció endotelial coronària, fàcil d'utilitzar i optimitzar.

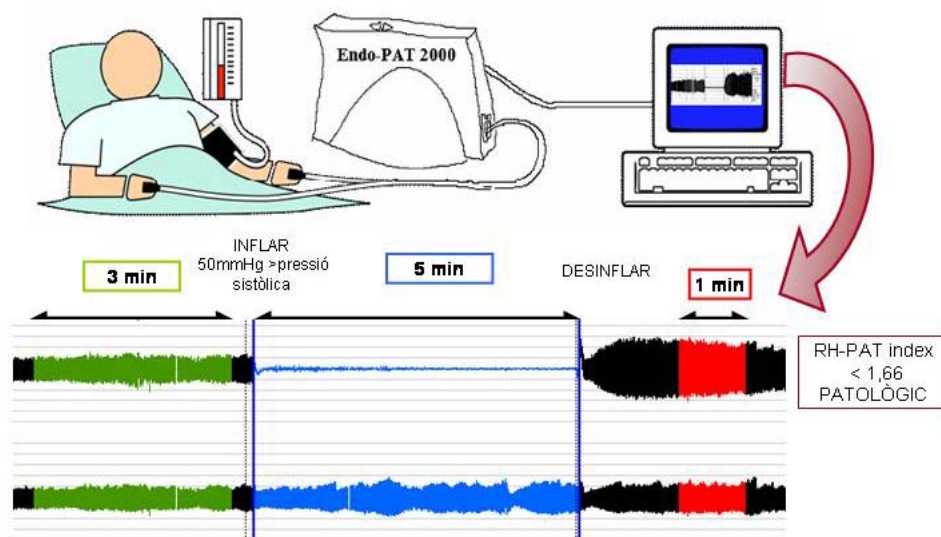


Figura 13. Esquema de la valoració de la funció endotelial mitjançant l'aparell Endo-PAT 2000.

4.1.4. Estudi de FABP4 circulant per la tècnica d'ELISA

Les concentracions plasmàtiques de FABP4 circulant van ser valorades usant kits comercials de la tècnica d'ELISA (BioVendor Laboratory Medicine Inc., Brno, Czech Republic). Concretament, aquesta quantificació es va realitzar mitjançant una tècnica quantitativa immunoenzimàtica d'ELISA de tipus sandvitx i es van determinar les concentracions de FABP4 en plasma seguint el procediment recomanat pel kit comercial.

Breument:

1. El kit proporciona una placa de 96 pouets. En cada pou, estava fixat un anticòs monoclonal pel biomarcador FABP4.

2. Es van dispensar els estàndards (de concentracions conegudes) o les mostres (plasma procedent dels individus de l'estudi) en cada pou per analitzar la presència de l'antigen complementari. Totes les mostres es van determinar per duplicat.
3. Després del rentat de tots els pous per descartar la resta de proteïnes les quals no havien quedat unides, es va afegir l'anticòs primari específic de FABP4 amb l'enzim conjugat (amb la peroxidasa).
4. Tot seguit, es va dur a terme el rentat per eliminar l'excés de reactiu i es va afegir la solució de substrat, la qual va desenvolupar color en proporció de la quantitat de biomarcador unit.
5. Finalment, la reacció colorimètrica va ser aturada per la solució stop (H_2SO_4) i la intensitat del color va ser mesurada pel lector de plaques d'ELISA (Bio Whittaker) a la longitud d'ona de 450nm.

Per comparació de la densitat òptica de la mostra amb la corba estàndard, es va determinar la concentració de FABP4 mitjançant l'anàlisi de les dades computades per l'absorbància dels estàndards versus la concentració utilitzada en una regressió polinòmica de 4rt grau.

Els resultats són expressats en ng/ml. Les característiques representatives de l'assaig són <5% pel coeficient de variació intra-assaig i <8% pel coeficient de variació inter-assaig (veure Annex II 10.3).

4.1.5. Human cytokine antibody array: sVCAM1, ICAM1, E-selectina, TNF α i IL6

L'expressió diferencial de citocines inflamatòries i molècules d'adhesió es va determinar mitjançant un microarray múltiple *Human Cytokine Antibody Array* de RayBiotech (empresa on es va realitzar) (Norcross, GA; EUA). Aquesta tècnica mesura simultàniament 5 citocines per mitjà de la tècnica ELISA. Consisteix en col·locar 5 anticossos de les citocines específiques respectivament a la superfície de vidre on es realitza l'experiment i en la qual s'afegeixen les mostres i per tant s'obtenen els nivells plasmàtics de les 5 citocines simultàniament. Es van utilitzar un parell d'anticossos específics per cada citocina per a la detecció. L'anticòs primari es

va situar en la superfície del vidre. Després de la incubació amb la mostra, la citocina va ser unida a la superfície sòlida. Un segon anticòs secundari, marcat amb biotina, es va afegir. Aquest és capaç de reconèixer un epítot diferent de la citocina. El complex de citocines-anticòs-biotina pot ser visualitzat a través de l'addició de l'estreptavidina, marcada amb fluorescència, i utilitzant un lector de plaques en el qual es van llegir les mostres a 555-565nm.

L'avantatge d'aquest mètode és que a partir de microarrays múltiples es poden afegir diversos anticossos específics per citocines en el suport de vidre, i realitzar una detecció múltiple de les concentracions de citocines en un únic experiment, per tant, en la mateixa mostra es poden mesurar simultàniament les 5 molècules. Per a la quantificació de citocines, la concentració va ser determinada a partir d'una corba estàndard generada per cinc punts estàndards de cada citocina. En un experiment, els estàndards per cada citocina i les mostres van ser analitzades en cada matriu de forma simultània a través de la tècnica ELISA. Els resultats es mostren en ng/ml per sVCAM1, sICAM1, sE selectina i pg/ml per TNF α i IL6. Els coeficients de variació inter-assaig i els coeficients de variació intra-assaig dels biomarcadors van ser <12% i <10%, respectivament.

4.1.6. Anàlisi de les LDL oxidades

L'estudi dels biomarcadors circulants d'oxidació lipídica es va realitzar mitjançant una tècnica quantitativa immunoenzimàtica d'ELISA de tipus sandvitx. Aquest mètode va ser utilitzat per determinar els valors plasmàtics de LDL oxidades i dels anticossos de LDL oxidades en sèrum, seguint el procediment recomanat pels kits comercials.

Per quantificar les LDL oxidades en plasma, es va utilitzar la tècnica d'immunoassaig en fase sòlida (amb 2 llocs d'unió) del kit comercial ELISA Mercodia Oxidized LDL ELISA (Mercodia AB, Uppsala, Sweden). Aquest kit utilitza l'anticòs monoclonal murí específic, mAb-4E6, que Holvoet et al. presenta en les seves publicacions, el qual es va fer servir per quantificar les concentracions de LDL oxidades en plasma en el seu estudi. La intensitat de la reacció colorimètrica va ser mesurada pel lector de plaques d'ELISA (Bio Whittaker) a la longitud d'ona de 450nm. Els resultats es van obtenir amb U/L i han estat expressats com la relació LDLoxidades/LDL colesterol (U/mmol). Les característiques representatives de l'assaig són 6.3% pel coeficient de variació intra-assaig i 4.7% pel coeficient de variació inter-assaig (veure Annex II 10.1)

4.1.7. Anàlisi dels anticossos de les LDL oxidades

Per l'estudi dels anticossos de les LDL oxidades en sèrum es va realitzar una tècnica quantitativa immunoenzimàtica d'ELISA de tipus sandvitx i seguint el procediment recomanat pels kits comercials.

Les concentracions en sèrum dels anticossos de les LDL oxidades van ser quantificades mitjançant els kits comercials d'ELISA *IMTEC-ox-LDL-antibodies* (IMTEC Immunodiagnostika GmbH, Berlin, Germany). Aquest test permet la determinació simultània d'auto-anticossos anti-LDL oxidades IgM i IgG després de substraure els auto-anticossos anti-LDL nativa. La intensitat de la reacció colorimètrica va ser mesurada pel lector de plaques d'ELISA (Bio Whittaker) a la longitud d'ona de 450nm. Els resultats van ser expressats en U/mL. Les característiques representatives de l'assaig són 7.8% pel coeficient de variació intra-assaig i 8.6% pel coeficient de variació inter-assaig (veure Annex II 10.2).

4.2. ESTUDI *IN VITRO*

4.2.1. Cultius cel·lulars i reactius

TIPUS CEL·LULARS I REACTIUS

Les cèl·lules endotelials amb les quals hem treballat són les HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) de Cascade Biologics™. Tot el material necessari pel creixement i manteniment de les cèl·lules també va ser comprat a Cascade Biologics™: el medi de cultiu (Medium 200), el suplement de sèrum i factors de creixement (LSGS) el qual conté sèrum fetal boví (2% v/v), heparina (10µg/ml), hidrocortisona (1µg/ml), factor de creixement epidèrmic (10ng/ml) i de fibroblast (3ng/ml); la solució de Gentamicina (antibiòtic, 10µg/ml) i Amphotericina (0.25µg/ml, antimicòtic), la Tripisina i el seu neutralitzador (per poder desadherir les cèl·lules dels flascons) i el medi de congelació necessari per a la criopreservació (Synth-a-Freeze).

Els limfòcits (Jurkat T Cells, ACC 282) procedeixen de la casa DSMZ (Alemanya). El medi pel seu creixement, RPMI-1640 Glut-MAX, el tampó fosfat-salí (PBS), sèrum fetal boví (FBS), la penicilina i l'estreptomicina van ser obtinguts a GIBCO *Laboratories*, on van ser testats per endotoxines. FBS va ser inactivat per escalfament abans de ser utilitzat (56°C, 30 min).

La insulina és de Sigma-Aldrich Inc (St-Louis, MO). FABP4 va ser comprada a BioVendor (Czech Republic). TNFα procedeix de Calbiochem (San Diego, California). La majoria d'anticossos primaris del western blot (Anti-eNOS, anti-peNOS (Ser¹¹⁷⁷), anti-Akt, anti-pAkt (Ser⁴⁷³), anti- p44/p42 MAPK (Erk1/2), anti- phospho-p44/p42 MAPK (Erk1/2) Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴) van ser obtinguts a Cell Signaling Technology Inc (Beverly MA). L'anticòs primari específic de FABP4 va provenir de R&D Systems (Minneapolis), l'anticòs primari per l'actina el vàrem a comprar a Santa Cruz (California) i l'anticòs secundari (IgG-HRP) de Dako (Dinamarca). El colorant fluorescent de l'assaig d'adhesió, la Calceïna-AM es va comprar a Molecular Probes (Oregon, USA).

CULTIUS CEL·LULARS

Les HUVECs són cèl·lules endotelials de cultiu primari, aïllades de l'endoteli de vena de cordó umbilical humà. Les HUVECs van ser criopreservades en passatge 1 i segons les recomanacions de la casa comercial, poden ser cultivades i propagades

fins a 16 vegades. Cada lot d'HUVEC va ser testat per VIH, el virus de l'hepatitis B i C, micoplasmes, bacteries, llevats i fongs, i el seu resultat va ser negatiu.

Les HUVECs van ser descongelades i es van fer créixer en flascons estèrils de 75 cm² segons les recomanacions de la casa comercial. El medi 200 va ser suplementat amb el 10% de LSGS i l'1% de la solució de gentamicina/amphotericina. Les cèl·lules es van col·locar en un incubador humit a 37°C i 5% CO₂ (Thermo) fins que aquestes estaven preparades per realitzar els experiments. Vam treballar amb passatge 3 cel·lular en tots els estudis.

La línia cel·lular de limfòcits Jurkat es va obtenir de la casa DSMZ (ACC 282) i és procedent de limfòcits de sang perifèrica d'un nen de 14 anys al qual se li havia diagnosticat leucèmia limfoblàstica aguda. Aquestes cèl·lules van ser testades per VIH, el virus de l'hepatitis B i C, micoplasmes, bacteries, llevats i fongs, i el seu resultat va ser negatiu.

La línia cel·lular de leucèmia va ser descongelada i les cèl·lules es van fer créixer amb el seu medi RPMI-1640 Glut-MAX. El medi va ser suplementat amb el 10% de FBS prèviament inactivat per calor, 100 U/L de penicilina i 100 µg/mL d'estreptomicina. Les cèl·lules es van col·locar en un incubador humit a 37°C i 5% CO₂ fins que aquestes estaven preparades per realitzar els experiments (Figura 14).

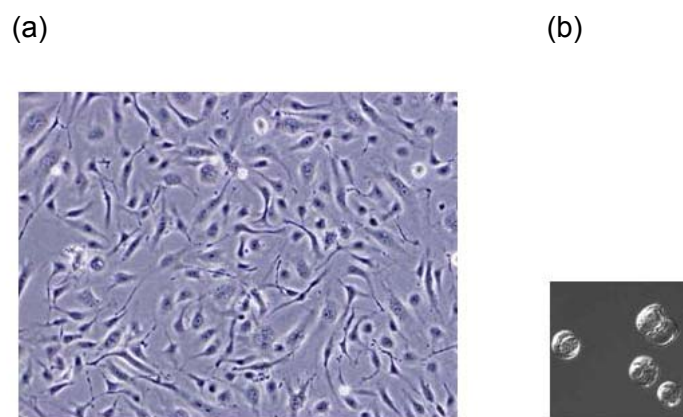


Figura 14. Imatge del creixement de les HUVECs en un 50% de confluència aproximadament (a) i de les cèl·lules Jurkat (b).

4.2.2. Disseny dels experiments *in vitro* amb cèl·lules HUVEC

4.2.2.1. Efecte de FABP4 en l'activació d'eNOS en estat basal

Les cèl·lules endotelials (HUVEC) es van fer créixer en plaques de petri de 10 ø (Nunc) fins a la seva confluència per tal de poder exposar-les a les condicions d'estudi. Les cèl·lules confluents van ser incubades amb medi complet amb tots els factors de creixement.

Un cop les cèl·lules estaven preparades per començar l'experiment, van ser incubades amb concentracions creixents de FABP4 (0, 25, 50 i 100ng/ml) durant 30 min. Després del temps d'incubació, les cèl·lules HUVECs es van processar per l'obtenció dels lisats cel·lulars totals (veure apartat 4.2.3) amb els quals posteriorment es va quantificar la proteïna fosforilada d'eNOS (p-eNOS) a nivell de Serina¹¹⁷⁷ i la proteïna eNOS total per western blot (veure apartat 4.2.6). La proteïna dels lisats cel·lulars va ser quantificada pel mètode de Bradford (veure l'apartat 4.2.5). Cada experiment es va realitzar 3 vegades independentment.

4.2.2.2. Dosi-resposta d'eNOS i d'Akt per l'acció de la insulina en HUVECs

Les cèl·lules endotelials (HUVEC) es van fer créixer en plaques de petri de 10 ø (Nunc) fins a la seva confluència per tal de poder exposar-les a les condicions d'estudi. Les cèl·lules confluents van ser suplementades amb medi 200 amb el 2% de FBS, sense els factors de creixement.

Aquest estudi va ser realitzat per establir la concentració òptima d'insulina necessària per estimular les HUVECs i dur a terme els posteriors experiments. Un cop les cèl·lules estaven preparades per començar l'experiment, van ser incubades amb concentracions creixents d'insulina (0, 100, 300 i 600nM) durant 30 min. Després del temps d'incubació, les cèl·lules HUVEC es van processar per l'obtenció dels lisats cel·lulars totals (veure apartat 4.2.3) amb els quals posteriorment es van quantificar les proteïnes fosforilades d'eNOS (p-eNOS) a nivell de Serina¹¹⁷⁷ i d'Akt (p-Akt) a nivell de Serina⁴⁷³ i les proteïnes eNOS i Akt total per western blot (veure apartat 4.2.6). La proteïna dels lisats cel·lulars va ser quantificada pel mètode de Bradford (s'explica en l'apartat 4.2.5). Cada experiment es va realitzar 3 vegades independentment.

4.2.2.3. Temps-resposta d'eNOS i d'Akt per l'acció de la insulina en HUVECs

Les cèl·lules endotelials (HUVEC) es van fer créixer en plaques de petri de 10 ø (Nunc) fins a la seva confluència per tal de poder exposar-les a les condicions d'estudi. Les cèl·lules confluents van ser suplementades amb medi 200 amb el 2% de FBS, sense els factors de creixement.

Aquest estudi va ser realitzat per establir el temps òptim d'incubació de les HUVECs amb insulina per tal d'observar l'estimulació de les cèl·lules endotelials i dur a terme els posteriors experiments amb aquesta condició. Un cop les cèl·lules estaven preparades per començar l'experiment, van ser incubades amb la concentració d'insulina establerta (600nM) durant 10, 30 i 60 min. Després dels temps d'incubació, les cèl·lules HUVECs es van processar per l'obtenció dels lisats cel·lulars totals (veure apartat 4.2.3) amb els quals, posteriorment, es van quantificar les proteïnes fosforilades d'eNOS (p-eNOS) a nivell de Serina¹¹⁷⁷ i d'Akt (p-Akt) a nivell de Serina⁴⁷³ i les proteïnes eNOS i Akt total per western blot (veure apartat 4.2.6). La proteïna dels lisats cel·lulars va ser quantificada pel mètode de Bradford (s'explica en l'apartat 4.2.5). Cada experiment es va realitzar 3 vegades independentment.

4.2.2.4. Efecte de FABP4 en l'activació d'eNOS previ a l'estimulació amb insulina

Les cèl·lules endotelials (HUVECs) es van fer créixer en plaques de petri de 10 ø (Nunc) fins a la seva confluència per tal de poder exposar-les a les condicions d'estudi. Les cèl·lules confluents van ser suplementades amb medi 200 amb el 2% de FBS, sense els factors de creixement per tal d'evitar l'activació basal de l'enzim.

En un primer experiment, volíem estudiar si el tractament de les cèl·lules endotelials amb FABP4 modificava la presència de la proteïna a nivell intracel·lular indicant la captació de FABP4 per les cèl·lules endotelials i l'efecte en la fosforilació d'eNOS prèvia estimulació d'insulina. Les cèl·lules van ser incubades amb les condicions de l'experiment : FABP4 a concentracions creixents (0, 25, 50 i 100ng/ml) durant 30 min. Tot seguit, per a l'estimulació amb insulina, les HUVECs van ser incubades amb insulina amb una concentració preestablerta de 600nM durant 30 min. Després del temps d'incubació, les cèl·lules HUVEC es van processar per l'obtenció dels lisats

cel·lulars totals (veure apartat 4.2.3) amb els quals posteriorment es va quantificar la proteïna fosforilada d'eNOS (p-eNOS) a nivell de Serina¹¹⁷⁷ i les proteïnes eNOS total, FABP4 i actina per western blot (veure apartat 4.2.6). La proteïna dels lisats cel·lulars va ser quantificada pel mètode de Bradford (s'explica en l'apartat 4.2.5). Cada experiment es va realitzar 3 vegades independentment.

4.2.2.5. Efecte de FABP4 en l'activació d'Akt previ a l'estimulació amb insulina

Per continuar l'estudi de la via de senyalització depenent d'insulina PI3K/Akt/eNOS, es va decidir estudiar l'efecte de FABP4 sobre la fosforilació de la proteïna Akt.

Les cèl·lules endotelials (HUVECs) es van fer créixer en plaques de petri de 10 ø (Nunc) fins a la seva confluència per tal de poder exposar-les a les condicions d'estudi. Les cèl·lules confluents van ser suplementades amb medi 200 amb el 2% de FBS, sense els factors de creixement per tal d'evitar l'activació basal de l'enzim.

A continuació, les cèl·lules van ser incubades amb les condicions de l'experiment: FABP4 a concentracions creixents (0, 25, 50 i 100ng/ml) durant 30 min. Tot seguit, per a l'estimulació amb insulina, les HUVECs van ser incubades amb insulina amb una concentració preestablerta de 600nM durant 30 min. Després del temps d'incubació, les cèl·lules HUVEC es van processar per l'obtenció dels lisats cel·lulars totals (veure apartat 4.2.3) amb els quals posteriorment es va quantificar la proteïna fosforilada d'Akt (p-Akt) a nivell de Serina⁴⁷³ i la proteïna Akt total per western blot (veure apartat 4.2.6). La proteïna dels lisats cel·lulars va ser quantificada pel mètode de Bradford (s'explica en l'apartat 4.2.5). Cada experiment es va realitzar 3 vegades independentment.

4.2.2.6. Efecte de FABP4 en la via de senyalització MAPK/ERK previ a l'activació amb insulina

Per estudiar l'efecte de FABP4 en la via de senyalització de MAPK/ERK, es va valorar la fosforilació de la proteïna p44/p42 MAPK (Erk1/2) després del tractament amb FABP4.

Les cèl·lules endotelials (HUVEC) es van fer créixer en plaques de petri de 10 ø (Nunc) fins a la seva confluència per tal de poder exposar-les a les condicions d'estudi. Les cèl·lules confluents van ser suplementades amb medi 200 amb el 2% de FBS, sense els factors de creixement per tal d'evitar l'activació basal de l'enzim.

A continuació, les cèl·lules van ser incubades amb les condicions de l'experiment : FABP4 a concentracions creixents (0, 25, 50 i 100ng/ml) durant 30 min. Tot seguit, per a l'estimulació amb insulina, les HUVECs van ser incubades amb insulina amb una concentració preestablerta de 600nM durant 30 min. Després del temps d'incubació, les cèl·lules HUVEC es van processar per l'obtenció dels lisats cel·lulars totals (veure apartat 4.2.3) amb els quals, posteriorment, es va quantificar la proteïna fosforilada p44/p42 MAPK (Erk1/2) a nivell de Treonina²⁰² i a nivell de Tirosina²⁰⁴ i la proteïna p44/p42 MAPK (Erk1/2) total per western blot (veure apartat 4.2.6). La proteïna dels lisats cel·lulars va ser quantificada pel mètode de Bradford (s'explica en l'apartat 4.2.5). Cada experiment es va realitzar 3 vegades independentment.

4.2.2.7. Efecte de FABP4 en l'expressió del mRNA de l'eNOS previ a l'estimulació amb insulina

Les cèl·lules endotelials (HUVEC) es van fer créixer en plaques de petri de 12 pous (Nunc) fins a la seva confluència per tal de poder exposar-les a les condicions d'estudi. Les cèl·lules confluents van ser incubades amb medi complet amb tots els factors de creixement.

Un cop les cèl·lules estaven preparades per començar l'experiment, les HUVECs van ser incubades en plaques de 12 pous (Nunc) amb concentracions creixents de FABP4 (0, 50 i 100ng/ml) durant 30 min. Tot seguit, per a realitzar l'estimulació de la via per insulina, les HUVECs van ser incubades amb la concentració de 600nM, prèviament estudiada, d'insulina durant 24 hores amb medi suplementat amb els factors de creixement [77] , [79], [160]. Després del temps d'incubació, es va dur a terme la l'extracció del mRNA de les cèl·lules per valorar l'expressió d'eNOS.

Procediment de l'extracció de mRNA

1. Treure les plaques de l'incubador. Tot el material ha de ser lliure de RNAses.
2. Aspirar el medi de cultiu de tots els pous vigilant no tocar les cèl·lules
3. Traspassar el medi en eppendorfs, els quals tot seguit s'han de centrifugar a 1500rpm durant 5min. Guardar el sobrenedant a -80°C. Per a la determinació de la toxicitat cel·lular de les condicions experimentals, el medi de cultiu va ser guardat per al posterior anàlisi.
4. Afegir 400 µL 1 X Solució de lisi (1:1 *Nucleic Acid purification Lysis Solution 2x* i PBS lliure de RNAses).

5. Barrejar les cèl·lules pipetejant amunt i avall
6. Traspasar les mostres en eppendorfs i mantenir-los durant 1 hora a 4°C per facilitar una correcta lisi cel·lular.
7. Després d'aquest temps, guardar les mostres a -20°C fins a la realització de l'extracció de mRNA d'eNOS (explica't apartat 4.2.7).

Cada experiment es va realitzar 3 vegades independentment.

4.2.2.8. Efecte de FABP4 en l'expressió del mRNA de l'E-selectina previ a l'estimulació amb insulina

Les cèl·lules endotelials (HUVECs) es van fer créixer en plaques de petri de 12 pous (Nunc) fins a la seva confluència per tal de poder exposar-les a les condicions d'estudi. Les cèl·lules confluents van ser incubades amb medi complet amb tots els factors de creixement.

Un cop les cèl·lules estaven preparades per començar l'experiment, les HUVECs van ser incubades en plaques de 12 pous (Nunc) amb concentracions creixents de FABP4 (0, 50 i 100ng/ml) durant 30 min. Tot seguit, per a realitzar l'estimulació de la via per insulina, les HUVECs van ser incubades amb la concentració de 600nM, prèviament estudiada, d'insulina durant 24 hores amb medi suplementat amb els factors de creixement. Després del temps d'incubació, es va dur a terme la l'extracció del mRNA de les cèl·lules per valorar l'expressió d'E-selectina.

Procediment de l'extracció de mRNA

1. Treure les plaques de l'incubador. Tot el material ha de ser lliure de RNAses.
2. Aspirar el medi de cultiu de tots els pous vigilant no tocar les cèl·lules
3. Traspasar el medi en eppendorfs, els quals tot seguit s'han de centrifugar a 1500rpm durant 5min. Guardar el sobrenedant a -80°C. Per a la determinació de la toxicitat cel·lular de les condicions experimentals, el medi de cultiu va ser guardat per al posterior anàlisi.
4. Afegir 400 µL 1 X Solució de lisi (1:1 *Nucleic Acid purification Lysis Solution 2x* i PBS lliure de RNAses).
5. Barrejar les cèl·lules pipetejant amunt i avall
6. Traspasar les mostres en eppendorfs i mantenir-los durant 1 hora a 4°C per facilitar una correcta lisi cel·lular.

7. Després d'aquest temps, guardar les mostres a -20°C fins a la realització de l'extracció de mRNA d'E-selectina (explica't apartat 4.2.7).

Cada experiment es va realitzar 3 vegades independentment.

4.2.2.9. Efecte de FABP4 en l'expressió del mRNA de VCAM1 previ a l'estimulació amb insulina

Les cèl·lules endotelials (HUVECs) es van fer créixer en plaques de petri de 12 pous (Nunc) fins a la seva confluència per tal de poder exposar-les a les condicions d'estudi. Les cèl·lules confluents van ser incubades amb medi complet amb tots els factors de creixement.

Tot seguit, les HUVECs van ser incubades en plaques de 12 pous (Nunc) amb concentracions de FABP4 (100ng/ml) durant 30 min. Tot seguit, per a realitzar l'estimulació de la via per insulina, les HUVECs van ser incubades amb la concentració de 600nM, prèviament estudiada d'insulina durant 24 hores amb medi suplementat amb els factors de creixement [77] , [79], [160]. Després del temps d'incubació, es va dur a terme la l'extracció del mRNA de les cèl·lules per quantificar l'expressió de la VCAM1.

Procediment de l'extracció de mRNA

1. Treure les plaques de l'incubador. Tot el material ha de ser lliure de RNAses.
2. Aspirar el medi de cultiu de tots els pous vigilant no tocar les cèl·lules
3. Traspasar el medi en eppendorfs, els quals tot seguit s'han de centrifugar a 1500rpm durant 5min. Guardar el sobrenedant a -80°C. Per a la determinació de la toxicitat cel·lular de les condicions experimentals, el medi de cultiu va ser guardat per al posterior anàlisi.
4. Afegir 400 µL 1 X Solució de lisi (1:1 *Nucleic Acid purification Lysis Solution 2x* i PBS lliure de RNAses).
5. Barrejar les cèl·lules pipetejant amunt i avall
6. Traspasar les mostres en eppendorfs i mantenir-los durant 1hora a 4°C per facilitar una correcta lisi cel·lular.
7. Després d'aquest temps, guardar les mostres a -20°C fins a la realització de l'extracció de mRNA de VCAM1 (explica't apartat 4.2.7).

Cada experiment es va realitzar 3 vegades independentment.

4.2.2.10. Assaig d'adhesió dels leucòcits a l'endoteli vascular

Aquest mètode va ser desenvolupat per a valorar la interacció entre les cèl·lules Jurkat (leucòcits) marcades fluorescentment (calceïna) amb la monocapa confluent de cèl·lules endotelials (HUVEC). En la preparació de l'assaig d'adhesió vàrem tenir en compte d'incloure els controls més adequats per a valorar la fluorescència total de cèl·lules marcades després de l'adhesió i controls per analitzar la pròpia autofluorescència de les cèl·lules no marcades. El número absolut de cèl·lules va ser determinat mitjançant una corba de correlació estàndard amb la fluorescència i el número de cèl·lules [161, 162].

4.2.2.10.1. Marcatge fluorescent de les cèl·lules Jurkat

La calceïna acetaximetil éster (calceïna-AM) va ser usada per marcar fluorescentment les cèl·lules Jurkat. La calceïna-AM és una molècula no fluorescent i lipofílica, la qual és trencada per una esterasa endògena, provocant l'emissió d'alta fluorescència (calceïna) i retinguda en l'interior de les cèl·lules viables. La calceïna proporciona una fluorescència independent de pH i, per tant, és un marcador citoplasmàtic el qual interfereix mínimament en el procés d'adhesió cel·lular. L'excitació i l'emissió de les longituds d'ona produïdes per la calceïna són de 480 i 530nm.

El marcatge fluorescent de les cèl·lules Jurkat va ser realitzat mitjançant la incubació de 5×10^6 cèl·lules/ml amb $5 \mu\text{M}$ calceïna-AM en medi RPMI1640 durant 30 min a 37°C i 5% de CO_2 . Després de la incubació, les cèl·lules van ser rentades 2 vegades amb medi RPMI1640 per descartar l'excés de colorant.

4.2.2.10.2. Procediment de l'assaig d'adhesió

La monocapa de cèl·lules endotelials HUVECs es va fer créixer en densitat de 7500 cèl·lules/pou en plaques de cultius de 96 pouets. Es va mantenir en un incubador de cultiu humit al 5% CO_2 i a 37°C fins a la confluència cel·lular. Les cèl·lules van ser incubades amb FABP4 (100ng/ml) durant 30 min i tot seguit van ser estimulades amb insulina (600nM) durant 24 hores. Les cèl·lules es van incubar amb $\text{TNF-}\alpha$ (10ng/ml) durant 24 hores per obtenir un control positiu de l'adhesió. Després de les incubacions, el medi va ser recol·lectat i centrifugat durant 5 min a 900 rpm per tal de descartar les restes cel·lulars, per a la determinació de la toxicitat cel·lular de les condicions experimentals. Tot seguit, les cèl·lules van ser rentades 3 vegades amb medi RPMI

1640. A continuació, es va realitzar el co-cultiu amb les cèl·lules Jurkat marcades (2.5×10^5 cèl·lules/pouet) amb medi 200 durant 1 hora en l'incubador de cultiu humit al 5% CO_2 i a 37°C . Les cèl·lules Jurkat no adherides varen ser rentades 3 vegades amb medi 200. La intensitat de la fluorescència de cada pouet va ser quantificada mitjançant el lector de plaques (Synergy HT, BioTek).

Els resultats van ser expressats com a percentatge d'adhesió (tenint en compte l'autofluorescència de les cèl·lules) dividit pel total de fluorescència de les cèl·lules afegides a cada pouet i multiplicat per 100.

4.2.3. Procediment de la preparació de lisats totals d'HUVEC amb tampó RIPA

Sempre es va partir d'una placa de 10cm per condició amb > 80% confluència.

1. Treure les plaques de l'incubador i posar-les sobre gel. Tot el material ha de ser fred i en gel.
2. Eliminar el medi de les cèl·lules amb pipetes *pasteur* estèrils i guardar-lo amb eppendorf, el qual tot seguit s'ha de centrifugar a 1500rpm durant 5 min. Guardar el sobrenedant a -80°C . Per a la determinació de la toxicitat cel·lular de les condicions experimentals, el medi de cultiu va ser guardat pel posterior anàlisi.
3. Rentar 3 vegades amb PBS fred.
4. Afegir 100 μl de tampó RIPA (veure Taula 7)
5. Rascar les cèl·lules amb un *cell-lifter*.
6. Traspasar la suspensió cel·lular a un tub eppendorf.
7. Deixar la suspensió cel·lular en gel durant 30 min. Durant aquest temps, fer processos d'agitació en el vórtex cada 5 min.
8. Centrifugar a 16000g durant 10 min a 4°C .
9. Recollir el sobrenedant i determinar la concentració de proteïna. La proteïna total va ser quantificada pel mètode de Bradford (veure l'apartat 4.2.5).
10. Fer alíquotes i guardar-ho -80°C fins realitzar el western blot per les proteïnes fosforilades d'eNOS (p-eNOS), d'Akt (p-Akt), p44/p42 MAPK (Erk1/2), i la proteïnes totals: eNOS, Akt, p44/p42 MAPK (Erk1/2), FABP4 i actina (s'explica apartat 4.2.6).

Protocol de preparació del Tampó RIPA

Utilitzem solucions prèviament preparades al laboratori.

Taula 7. Preparació del Tampó RIPA

| Solució del Laboratori | Volum | Concentració final |
|-------------------------------|--------------|-----------------------------|
| 1M Tris-HCl, pH 7.52 | 1ml | 50mM Tris-HCl |
| 5M NaCl | 33µl | 150mM NaCl |
| SDS 10% | 200µl | 0.1% SDS |
| Nonidet | 200µl | 1% Nonidet |
| Àcid Deoxycholic Sòdic | 0.1g | 0.5% Àcid Deoxycholic Sòdic |

Fins a un volum final de 20ml amb H₂O MilliQ.

Afegim 1 pastilla d'inhibidors de proteases *Complete Mini* de Roche per cada 10ml de tampó per conservar les proteïnes de la mostra en bones condicions. Dissolem i fem alíquotes que guardem al congelador de -20°C.

4.2.4. Citotoxicitat de les condicions experimentals

La quantitat de LDH (lactat deshidrogenasa) secretada al medi extracel·lular determina l'efecte de citotoxicitat que es pot trobar en les condicions d'estudi. La citotoxicitat va ser analitzada mitjançant el *Cytotoxicity Detection Kit* (Roche Applied Science). El kit consisteix en un assaig colorimètric (plaques de 96 pous) en el qual es quantifica la mort cel·lular per lisi basat en la valoració de l'activitat de la LDH alliberada des del citosol de les cèl·lules danyades al medi extracel·lular. El dany en la membrana cel·lular determina l'alliberació de LDH en el medi de cultiu. Aquest mètode es basa en l'assaig directe de l'acoplament de NADH₂ el qual utilitza piruvat com a substrat. L'absorbància va ser llegida a 492nm i 620nm. Els resultats van ser expressats com el percentatge de LDH alliberada, que representa la quantitat de LDH en el medi extracel·lular més la quantitat en les cèl·lules, determinat després de la inducció de la lisi cel·lular (tampó Tritó al 1%). Les cèl·lules, també, van ser visualitzades amb un microscopi de contrast de fase per tal de comprovar els canvis morfològics que podien haver succeït. No es van trobar efectes citotòxics en cap de les condicions experimentals utilitzades.

4.2.5. Quantificació de proteïna pel mètode Bradford

Les concentracions de les proteïnes van ser analitzades amb el mètode Bradford [163] amb el reactiu corresponent (Bio Rad) seguint les instruccions del PNT de la unitat (Veure Annex II 10.4).

4.2.6. Western Blot d'eNOS, Akt, MAPK, FABP4 i actina

Aquesta tècnica és una aplicació de l'electroforesi SDS-PAGE. Les proteïnes separades mitjançant electroforesi SDS-PAGE són transferides a una membrana de nitocel·lulosa de 0.2µm (en el nostre cas), mitjançant l'aplicació d'un corrent elèctric, on poden ser destacades i identificades per hibridació amb anticossos específics, ja que la membrana és una rèplica del patró de les proteïnes separades pel gel.

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

L'electroforesi i la transferència de la membrana es van realitzar mitjançant *NUPAGE Protein Analysis System* (Invitrogen). Tot seguit, la membrana va ser bloquejada amb el 2% de reactiu *ECL Advance Blocking Reagent* (Amersham Biosciences) durant 1 hora a temperatura ambient. Les membranes van ser incubades amb els anticossos primaris adequats segons la proteïna estudiada: anticòs per eNOS, anticòs d'eNOS fosforilada a nivell de serina (Ser¹¹⁷⁷), anticòs per Akt, anticòs d'Akt fosforilada a nivell de serina (Ser⁴⁷³), anticòs per p44/p42 MAPK (Erk1/2) i anticòs de la proteïna fosforilada a nivell de treonina (Thr²⁰²) i a nivell de tirosina (Tyr²⁰⁴). Pel western blot de FABP4, les membranes van ser incubades amb l'anticòs primari per FABP4 (R&D Systems). La incubació amb el respectiu anticòs primari es va realitzar durant tota la nit, en agitació i a una temperatura de 4°C. En canvi, per a la detecció d'actina la membrana va ser bloquejada amb el 2% de reactiu *ECL Advance Blocking Reagent* durant tota la nit a 4°C en agitació i va ser incubada amb l'anticòs primari per actina durant 1 hora a temperatura ambient. Els complexos antígen-anticòs van ser detectats amb la incubació de la membrana amb l'anticòs secundari IgG-HRP (Dako). Les bandes van ser visualitzades utilitzant el reactiu *ECL* (Amersham Pharmacia) amb el sistema de valoració de la imatge *Versadoc* (Bio Rad). Les bandes van ser quantificades amb el software *Quantity one* versió 4.6.2. Els nivells relatius de proteïna

fosforilada van ser quantificats i tot seguit normalitzats pel valor de la proteïna total respectiva. En canvi, els nivells relatius de proteïna FABP4 van ser quantificats i normalitzats per l'expressió d'actina. Els resultats són expressats com a unitats arbitràries (AU) (veure Annex II 10.5 i 10.6).

4.2.7. Expressió de mRNA d'eNOS, E-selectina i VCAM1

4.2.7.1. Aïllament de RNA

El RNA total va ser aïllat de les cèl·lules endotelials amb el tampó de lisi *Nucleic Acid Purification* (Applied Biosystems) mitjançant l'aparell *ABI PRISM 6100 Nucleic Acid PrepStation* (Applied Biosystems) seguint les instruccions específiques de la casa comercial. Tot seguit, la quantificació de la concentració de RNA es va obtenir amb la lectura de l'absorbància de les mostres a 260nm. La relació d'absorbància 260/280nm va ser usada per valorar la qualitat del RNA aïllat (veure Annex II 10.7 i 10.8).

4.2.7.2. PCR quantitativa a temps real (RT-PCR)

L'amplificació de les molècules individuals de RNA es va realitzar mitjançant el mètode de RT-PCR, que combina la transcripció reversa (RT) del RNA a cDNA i la reacció en cadena de la polimerasa (PCR).

Per dur a terme la RT es va utilitzar l'aparell *2720 Thermal Cycler* (Applied Biosystems). 0.5 µg del RNA total va ser usat per realitzar la transcripció reversa de RNA a cDNA utilitzant hexàmers (oligonucleòtids) aleatoris i l'enzim *SuperScript II reverse transcriptase* (Invitrogen) segons el protocol establert de la casa comercial. Tot seguit, l'expressió dels nostres biomarcadors va ser avaluada per la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) a temps real amb l'aparell *ABI PRISM 7900 Detection System* (Applied Biosystems). Els primers de la Taqman i pels nostres gens d'estudi: eNOS, E-selectina, VCAM1 i GAPDH van ser obtinguts, validats i pre-dissenyats per *Assays-on-Demand products* (Applied Biosystems) els quals van ser usats per realitzar-se les amplificacions de la RT-PCR.

L'expressió de mRNA per cada gen el vàrem calcular utilitzant el mètode matemàtic $2^{-\Delta\Delta Ct}$ recomanat. El grup control (les cèl·lules no tractades) va ser definit com el calibrador de l'experiment. El GAPDH va ser usat com el gen endogen d'expressió constitutiva per a normalitzar els resultats dels gens estudiats (Veure Annex II 10.9)

4.3. ANÀLISI ESTADÍSTICA

4.3.1. Estudi clínic

Totes les dades van ser estudiades amb el test de Kolmogorov-Smirnov per a comprovar la normalitat de les variables. Les variables contínues són presentades com la mitjana \pm la desviació estàndard per les dades en distribució normal i com la mediana (percentil 25 - percentil 75) per les dades que no segueixen una distribució normal i com a freqüències (n) o percentatges (%) per les variables categòriques. Les variables amb distribució no-normal com és el RHI-PAT, van ser transformades a logaritmes. En el cas de la variable FABP4, que en transformar-la en logaritme va continuar sense seguir una distribució normal, es va utilitzar els tests no-paramètrics corresponents per l'anàlisi. Les comparacions entre grups van ser determinades utilitzant una anàlisi de la variància (ANOVA) o el test no-paramètric U de Mann-Whitney. L'associació univariada va ser analitzada amb les correlacions Spearman o Pearson. Les diferències entre els grup de tercils de sE-selectina van ser determinades mitjançant *two-way* anàlisi de la variància (ANOVA). Les diferències entre els grups de tercils de FABP4 van ser determinades amb el test de la X^2 . Els predictors de l'anàlisi per regressió *stepwise* van ser seleccionats per l'anàlisi de correlació i entre les variables conegudes que sabem que es troben associades a la variable depenent. Les diferències van ser considerades significatives quan $P < 0.05$. Per a realitzar tota l'anàlisi estadística es va utilitzar SPSS versió 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

4.3.2. Estudi *in vitro*

Els resultats són presentats com la mitjana \pm la desviació estàndard de com a mínim tres experiments separats. Les diferències de les mitjanes van ser determinades utilitzant una anàlisi de la variància (ANOVA), seguit d'un test post-hoc de comparacions múltiples (Dunnett's test). Les diferències van ser considerades significatives quan $P < 0.05$. Per a realitzar tota l'anàlisi estadística es va utilitzar *GraphPad Prism 5.0 Software Inc.*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FABP4 I BIOMARCADORS DE LA DISFUNCIÓ ENDOTELIAL. ESTUDI CLÍNIC I IN VITRO

Gemma Aragonès Bargalló

ISBN:978-84-693-8853-2/DL:T.1951-2010

5. Resultats

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FABP4 I BIOMARCADORS DE LA DISFUNCIÓ ENDOTELIAL. ESTUDI CLÍNIC I IN VITRO

Gemma Aragonès Bargalló

ISBN:978-84-693-8853-2/DL:T.1951-2010

5.1. ESTUDI CLÍNIC

5.1.1. Relació de RHI-PAT i biomarcadors de funció endotelial, inflamació i oxidació lipídica

Les característiques clíniques i bioquímiques del grup de 257 pacients es presenten en la Taula 1 de l'estudi. Tal com podem observar en la taula, la mitjana d'edat dels pacients va ser de 57 ± 10.66 anys, dels quals el 30% eren dones.

Taula 1. Paràmetres clínics, metabòlics i lipídics dels pacients.

| Característiques | Total (n=257) |
|--|---------------------|
| Dones, % | 29.6 |
| Edat, anys | 57.29 ± 10.66 |
| Pressió sistòlica, mmHg | 137.99 ± 16.88 |
| Pressió diastòlica | 83.51 ± 10.72 |
| Índex de massa corporal, kg/m^2 | 31.11 ± 4.41 |
| Perímetre abdominal, cm | 103.83 ± 10.62 |
| Colesterol total, mmol/l | 5.10 ± 1.13 |
| Triglicèrids, mmol/l | 1.89 (1.20-2.97) |
| LDL, mmol/l | 3.19 ± 0.94 |
| HDL, mmol/l | 1.40 ± 0.30 |
| Glucosa, mmol/l | 6.80 ± 2.10 |
| HbA1c, % | 6.37 ± 1.16 |
| FABP4, ng/ml | 26.02 (19.39-37.99) |
| Diabetis mellitus, % | 41 |
| Tabaquisme, % | 36.3 |
| Hipertensió, % | 60.8 |
| Síndrome Metabòlica, % | 55.5 |
| Fàrmacs hipolipemians, % | 68.2 |
| Fàrmacs antiagregants, % | 18.0 |
| Fàrmacs hipoglicèmics orals, % | 28.6 |
| Fàrmacs hipertensors, % | 46.1 |

Les variables amb distribució normal es presenten com la mitjana \pm la desviació estàndard o el percentatge de pacients. Les variables que no segueixen una distribució normal són

Resultats

presentades com la mediana (percentil 25 - percentil 75). Abreviacions: LDL, lipoproteïna de baixa densitat; HDL, lipoproteïna d'alta densitat.

La mesura de la valoració de la funció endotelial i la determinació dels biomarcadors endotelials, d'inflamació i oxidació lipídica es resumeixen en la Taula 2. La mediana del RHI-PAT dels participants va ser de 1.58 (1.45 - 1.89) i segons el gènere, per les dones va ser de 1.68 (1.45 - 1.96) i pels homes de 1.55 (1.45 - 1.86), i aquesta diferència va ser significativa ($P=0.013$).

Taula 2. Avaluació clínica de la funció vascular i els biomarcadors endotelials d'inflamació i d'oxidació lipídica dels pacients.

| Variable | Mediana (P ₂₅ - P ₇₅) |
|------------------------|--|
| RHI-PAT | 1.58 (1.45-1.89) |
| sICAM1, ng/ml | 73.02 (28.50-185.93) |
| sVCAM1, ng/ml | 840.17 (374.47-1323.70) |
| sE-selectina, ng/ml | 23.89 (10.82-43.23) |
| IL6, pg/ml | 47.66 (24.00-149.67) |
| TNF α , pg/ml | 147.86 (24.00-507.70) |
| PCR, mg/l | 1.44 (0.75-3.43) |
| Anticossos oxLDL, U/ml | 16.23 (14.25-19.44) |
| oxLDL/LDL, U/mmol | 56.05 (45.62-68.60) |

Les variables són presentades com la mediana (percentil 25 - percentil 75). Abreviacions: P₂₅, percentil 25; P₇₅, percentil 75; RHI-PAT, índex de la hiperèmia reactiva; sICAM1, molècula d'adhesió soluble intercel·lular1; sVCAM1, molècula d'adhesió soluble vascular1; sE-selectina, E-selectina soluble; IL6, interleucina 6; TNF α , factor de necrosis tumoral α ; PCR, proteïna C reactiva; oxLDL/LDL, lipoproteïna de baixa densitat oxidada/LDL. (n=245)

Per tal d'estudiar els biomarcadors de funció endotelial, inflamació i oxidació lipídica, primer de tot es van realitzar correlacions no ajustades en les quals, es va demostrar, que les concentracions de sE-selectina mantien una correlació positiva significativa amb sVCAM1, sICAM1 i LDL oxidades ($r=0.675$, $P<0.001$; $r=0.222$, $P=0.001$; $r=0.200$, $P=0.002$, respectivament), i per altra banda, el TNF- α va correlacionar significativament amb la IL6 (0.755 ; $P<0.001$). En valorar les concentracions plasmàtiques dels biomarcadors en els pacients diabètics vam observar que els valors de sE-selectina van ser significativament superiors en els pacients diabètics respecte els no-diabètics (33.30 ± 25.22 vs. 28.46 ± 25.17 ng/ml, $P=0.05$).

Tot seguit, es va analitzar la relació de RHI-PAT i els paràmetres clínics i bioquímics. En la Taula 3 es mostren les correlacions entre RHI-PAT i aquests paràmetres. Els valors de RHI-PAT es van correlacionar positiva i significativament amb la pressió sistòlica, l'edat i les HDL, i inversament amb el perímetre abdominal i els triglicèrids ($P < 0.05$).

Taula 3. Correlació entre el Log(RHI-PAT) i els paràmetres clínics i bioquímics dels pacients.

| | Log(RHI-PAT) | |
|-------------------------|--------------|---------|
| | r | P-valor |
| Edat | 0.183 | 0.004 |
| Log(pressió sistòlica) | 0.191 | 0.003 |
| Log(pressió diastòlica) | 0.054 | 0.402 |
| Índex de massa corporal | -0.094 | 0.144 |
| Perímetre abdominal | -0.136 | 0.036 |
| Colesterol total | -0.005 | 0.937 |
| Log(triglicèrids) | -0.0199 | 0.020 |
| LDL | 0.092 | 0.154 |
| HDL | 0.142 | 0.026 |
| Glucosa | -0.014 | 0.831 |

Abreviacions: RHI-PAT, índex de la hiperèmia reactiva; LDL, lipoproteïna de baixa densitat; HDL, lipoproteïna d'alta densitat. L'associació univariada va ser analitzada amb la correlació de Pearson.

A continuació, es va estudiar la relació de RHI-PAT i els biomarcadors de funció endotelial, inflamació i oxidació lipídica. En la població total, vàrem observar una correlació significativa inversa entre el RHI-PAT i la sE-selectina ($r = -0.179$, $P = 0.005$) i una correlació al límit de la significació amb la sVCAM1 ($r = -0.119$, $P = 0.065$) (Taula 4). A més, després d'ajustar el RHI-PAT per variables que es coneixen i que poden estar-hi associades com l'edat, el gènere, l'IMC, la pressió sistòlica, la relació entre les HDL i el colesterol total, la diabetis, el tabac, i el tractament amb hipolipemians i hipoglicèmics orals, la correlació es va mantenir estadísticament significativa ($r = -0.139$, $P = 0.035$).

Resultats

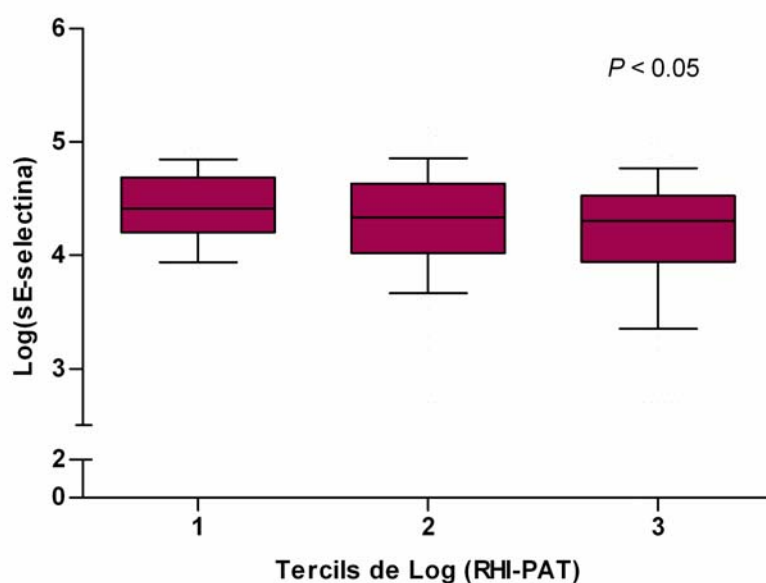
Taula 4. Correlació entre el Log(RHI-PAT) i els biomarcadors endotelials, d'inflamació i oxidació lipídica dels pacients.

| | Log(RHI-PAT) | |
|-----------------------|--------------|---------|
| | r | P-valor |
| Log(sE-selectina) | -0.179 | 0.005 |
| Log(sVCAM1) | -0.119 | 0.065 |
| Log(sICAM1) | 0.014 | 0.825 |
| Log(IL6) | 0.020 | 0.755 |
| Log(TNF α) | -0.037 | 0.572 |
| Log(PCR) | -0.015 | 0.820 |
| oxLDL/LDL | -0.182 | 0.005 |
| Log(anticossos oxLDL) | 0.051 | 0.430 |

Abreviacions: RHI-PAT, índex de la hiperèmia reactiva; sE-selectina, E-selectina soluble; sICAM1, molècula d'adhesió soluble intercel·lular1; sVCAM1, molècula d'adhesió soluble vascular1; IL6, interleucina 6; TNF α , factor de necrosis tumoral α ; PCR, proteïna C reactiva; oxLDL/LDL, lipoproteïna de baixa densitat oxidada/LDL. L'associació univariada va ser analitzada amb la correlació de Pearson. (n=245)

Per confirmar els resultats i ampliar l'estudi, es va dividir la població en tercils de RHI-PAT, és a dir, els individus del primer tercil són els que presentaven pitjor funció endotelial. Es va observar una associació inversa i significativa entre les concentracions de sE-selectina plasmàtiques i els tercils de RHI-PAT ($P=0.019$) (Figura 1). Aquests resultats indiquen que els individus amb pitjor funció endotelial presentaven valors més elevats de sE-selectina en plasma. A més, aquesta correlació es va mantenir després de ser ajustada per l'edat, el gènere i l'IMC ($P=0.05$). Per altra banda, també vàrem observar una correlació significativa inversa entre el RHI-PAT i la relació de LDL oxidades i LDL (oxLDL/LDL) ($r=-0.180$, $P=0.004$) presentada en la Taula 4.

Figura 1. Concentracions de sE-selectina en funció dels terçils de RHI-PAT.



Mitjana \pm la desviació estàndard del logaritme de sE-selectina [(Log(sE-selectina))] i el logaritme de RHI-PAT [Log(RHI-PAT)] en terçils. $P=0.019$, ANOVA.

En aquest estudi, el RHI-PAT va correlacionar de manera significativa amb l'edat, la relació de HDL i colesterol total, els triglicèrids, la pressió sistòlica, la diabetis i el tabac. Totes aquestes variables es van incloure en el model de regressió lineal per *stepwise*. El resultat obtingut va ser que la sE-selectina és un dels determinants del valor de RHI-PAT, juntament amb el tabac i els triglicèrids amb una associació inversa i la pressió sistòlica (relació directa) (Taula 5).

Taula 5. Model de regressió lineal per *stepwise* per a l'anàlisi de RHI-PAT

| | B | P-valor | canvi en R^2 (%) |
|------------------------|--------|---------|--------------------|
| Tabaquisme | -0.035 | 0.006 | 5.3 |
| Log(pressió sistòlica) | 0.321 | 0.008 | 3.0 |
| Log(sE-selectina) | -0.028 | 0.022 | 2.5 |
| Log(triglicèrids) | -0.049 | 0.027 | 1.8 |

Anàlisi de regressió per *stepwise* de 240 pacients. $R^2=0.112$, $P<0.001$.
Les variables entrades al model van ser: Log(sE-selectina), edat, gènere, Log(pressió sistòlica), índex de massa corporal, la relació de HDL i colesterol total, Log(triglicèrids), diabetis, tabaquisme i el tractament amb hipoglicèmics i hipotensors.

Resultats

5.1.2. FABP4 està associada a la disfunció endotelial en pacients amb diabetis tipus 2

A la Taula 6, es resumeixen les característiques clíniques i bioquímiques dels pacients segons presentin o no diabetis tipus 2. Els pacients diabètics (41%) eren d'edat més avançada que els pacients no diabètics i aquesta diferència va ser significativa ($P<0.05$). A més, els pacients diabètics presentaven una pressió sistòlica més elevada, un índex de massa corporal i de perímetre abdominal superiors ($P<0.05$) i en canvi, concentracions de LDL colesterol inferiors ($P<0.05$). Tal com esperàvem, els pacients diabètics van mostrar concentracions augmentades de glucosa i hemoglobina glicada (HbA1c) respecte els no-diabètics ($P<0.05$).

Taula 6. Paràmetres clínics, metabòlics, bioquímics i de la funció vascular en pacients segons tinguin DT2 o no.

| Característiques | No-DT2 (n=152) | DT2 (n=105) | P |
|--|-------------------------|------------------------|---------|
| Dones, % | 28.9 | 30.5 | 0.792 |
| Edat, anys | 55.38 ± 11.06 | 60.07 ± 9.44 | <0.0001 |
| Pressió sistòlica, mmHg | 136.22 ± 14.66 | 140.55 ± 19.44 | 0.043 |
| Pressió diastòlica | 83.42 ± 11.06 | 83.63 ± 10.27 | 0.879 |
| Índex de massa corporal, kg/m ² | 30.22 ± 4.06 | 32.43 ± 4.60 | <0.0001 |
| Perímetre abdominal, cm | 101.91 ± 9.72 | 106.70 ± 11.29 | <0.0001 |
| Colesterol total, mmol/l | 5.33 ± 1.08 | 4.77 ± 1.12 | <0.0001 |
| Triglicèrids, mmol/l | 1.88 (1.22-2.77) | 1.94 (1.11-3.23) | 0.596 |
| LDL, mmol/l | 3.44 ± 0.93 | 2.84 ± 0.85 | <0.0001 |
| HDL, mmol/l | 1.43 ± 0.30 | 1.36 ± 0.28 | 0.061 |
| Glucosa, mmol/l | 5.80 ± 1.18 | 8.24 ± 2.29 | <0.0001 |
| HbA1c, % | 5.35 ± 0.59 | 6.74 ± 1.09 | <0.0001 |
| FABP4, ng/ml | 25.30 (17.77-35.81) | 29.22 (21.52-39.64) | 0.069 |
| sICAM1, ng/ml | 70.20 (28.95-182.85) | 78.33 (27.94-175.32) | 0.908 |
| sVCAM1, ng/ml | 791.24 (339.30-1265.50) | 984.86 (459.73-1430.0) | 0.082 |
| sE-selectina, ng/ml | 21.01 (9.79-37.96) | 27.53 (13.73-48.63) | 0.036 |
| IL6, pg/ml | 44.91 (24.00-143.89) | 53.33 (24.00-155.54) | 0.754 |
| TNFα, pg/ml | 129.31 (24.00-476.25) | 158.13 (36.17-549.91) | 0.395 |
| PCR, mg/l | 1.33 (0.66-3.42) | 1.69 (0.84-4.50) | 0.259 |

| | | | |
|------------------------|---------------------|---------------------|-------|
| Anticossos oxLDL, U/ml | 16.22 (14.51-19.56) | 16.31 (14.13-19.14) | 0.497 |
| oxLDL /LDL, U/mmol | 54.87 (44.29-67.94) | 58.02 (47.47-69.75) | 0.175 |
| RHI-PAT | 1.58 (1.46-1.89) | 1.58 (1.45-1.86) | 0.884 |

Les variables amb distribució normal es presenten com la mitjana \pm la desviació estàndard o percentatge de pacients. Les variables que no segueixen una distribució normal són presentades com la mediana (percentil 25 - percentil 75). Abreviacions: CVR, risc cardiovascular; DT2, diabetis mellitus tipus 2; LDL, liproteïna de baixa densitat; HDL, lipoproteïna d'alta densitat; sICAM1, molècula d'adhesió soluble intercel·lular 1; sVCAM1, molècula d'adhesió soluble vascular 1; sE-selectina, E selectina soluble; IL6, interleucina 6; TNF α , factor de necrosis tumoral α ; PCR, proteïna C reactiva; oxLDL /LDL, lipoproteïna de baixa densitat oxidada/LDL; RHI-PAT, índex de la hiperèmia reactiva. Les diferències entre no-DT2 i DT2 es van analitzar mitjançant ANOVA o el test no-paramètric U de Mann-Whitney.

Quan vam estudiar les concentracions de FABP4 plasmàtica en els pacients, vam observar que tendien a ser més elevades en els pacients diabètics ($P=0.069$). Quan la població d'estudi es va dividir en tercils de FABP4 circulant, es va observar un augment del percentatge d'individus amb diabetis en el tercer tercil (valors elevats de FABP4), comparat amb els no-diabètics (24.8%, 36.2%, 39.0% vs. 38.8%, 31.6%, 29.6% respectivament; $P=0.05$). Com ja s'havia demostrat en altres estudis previs, vam confirmar que la concentració de FABP4 plasmàtica és superior en dones que en homes, i aquesta diferència és significativa ($P<0.001$) [137].

A la Taula 7, es presenten les correlacions de FABP4 amb els paràmetres clínics i bioquímics, amb els biomarcadors de funció endotelial, d'inflamació i d'oxidació lipídica, així com la valoració clínica de la funció endotelial. Vàrem observar una correlació positiva i estadísticament significativa entre FABP4 i l'edat, l'índex de massa corporal, la IL6, la PCR i els anticossos de les LDL oxidades (oxLDL) i, en canvi, una correlació negativa amb sICAM1 i la relació oxLDL/LDL ($P<0.05$) en la població total.

Resultats

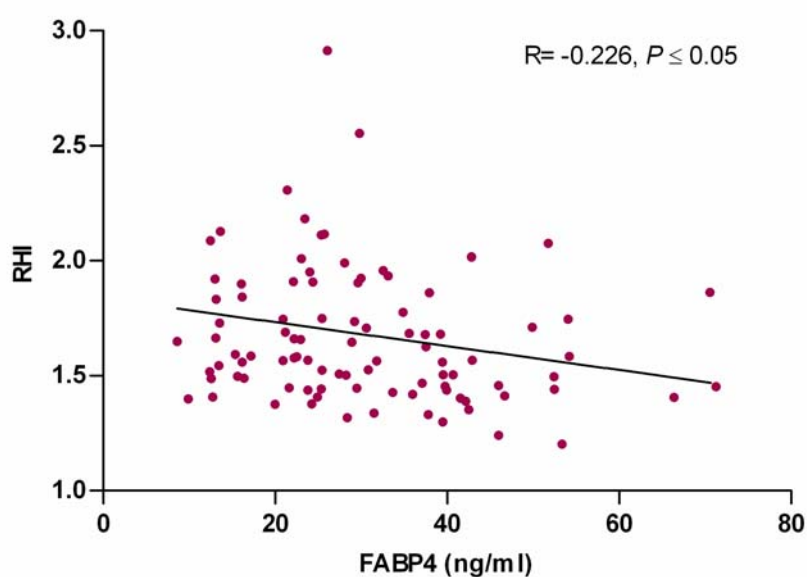
Taula 7. Correlacions de FABP4 amb característiques clíniques, biomarcadors endotelials i la funció vascular.

| Variable | Tots els pacients CVR (n=257) | | No-DT2 (n=152) | | DT2 (n=105) | |
|-------------------------|----------------------------------|---------|-------------------|-------|----------------|-------|
| | r | P | r | P | r | P |
| Edat | 0.183 | 0.003 | 0.174 | 0.032 | 0.181 | 0.065 |
| Índex de massa corporal | 0.199 | 0.001 | 0.185 | 0.023 | 0.211 | 0.033 |
| Perímetre abdominal | 0.094 | 0.139 | 0.058 | 0.480 | 0.138 | 0.170 |
| sICAM1 | -0.168 | 0.007 | -0.165 | 0.045 | -0.185 | 0.059 |
| sVCAM1 | -0.061 | 0.332 | -0.020 | 0.808 | -0.146 | 0.140 |
| sE-selectina | -0.028 | 0.656 | -0.013 | 0.870 | -0.099 | 0.319 |
| IL6 | 0.142 | 0.024 | 0.111 | 0.179 | 0.171 | 0.083 |
| TNF α | 0.033 | 0.610 | 0.006 | 0.946 | 0.065 | 0.521 |
| PCR | 0.226 | <0.0001 | 0.229 | 0.005 | 0.176 | 0.073 |
| Anticossos oxLDL | 0.190 | 0.002 | 0.155 | 0.056 | 0.251 | 0.010 |
| oxLDL /LDL | -0.153 | 0.014 | -0.141 | 0.084 | -0.196 | 0.045 |
| RHI-PAT | -0.025 | 0.701 | 0.098 | 0.237 | -0.226 | 0.027 |

Abreviacions: CVR, risc cardiovascular; DT2, diabetis mellitus tipus 2; LDL, liproteïna de baixa densitat; HDL, lipoproteïna d'alta densitat; sICAM1, molècula d'adhesió soluble intercel·lular 1; sVCAM1, molècula d'adhesió soluble vascular 1; sE-selectina, E-selectina soluble; IL6, interleucina 6; TNF α , factor de necrosis tumoral α ; PCR, proteïna C reactiva; oxLDL /LDL, lipoproteïna de baixa densitat oxidada/LDL; RHI-PAT, índex de la hiperèmia reactiva. Les associacions univariades van ser analitzades amb la correlació de Pearson o Spearman.

En pacients diabètics, els nivells de FABP4 es van correlacionar de manera positiva amb l'índex de massa corporal i els anticossos de les LDL oxidades ($P<0.05$), i van mostrar una tendència al límit de la significació entre FABP4 i IL6 i PCR. En aquest grup de pacients, FABP4 es va associar inversa i significativament amb la valoració de la funció endotelial mesurada pel RHI-PAT ($r=-0.226$, $P=0.027$) (Figura 2). Aquesta correlació es va mantenir significativa després d'ajustar-la per les variables confusores com l'edat, el gènere i l'IMC ($P=0.05$). En canvi, aquesta relació no es va observar en els pacients no-diabètics.

Figura 2. Relació entre FABP4 i RHI-PAT en pacients diabètics.

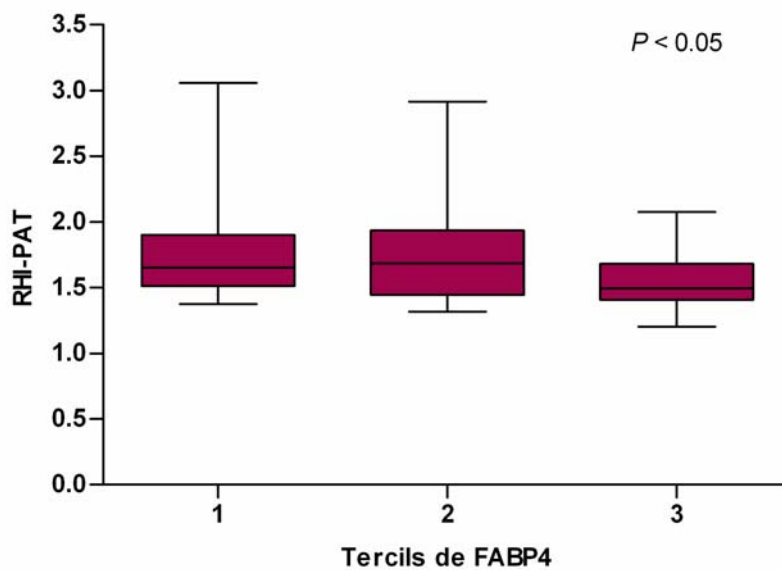


L'associació univariada va ser analitzada amb la correlació de Spearman.

Després de dividir la població en tercils de FABP4, es va observar una associació inversa de RHI-PAT a través dels tercils de FABP4. Per tant, els individus amb pitjor funció endotelial es trobaven amb més percentatge en el tercer tercil, en el qual s'observen uns valors més elevats de FABP4 plasmàtica ($P=0.023$) (Figura 3). Després d'ajustar per l'edat, el gènere i l'IMC l'associació es va mantenir significativa ($P=0.05$).

Resultats

Figura 3. Valors de RHI-PAT en funció dels tercils de FABP4 en pacients diabètics.



Les dades es presenten mitjançant un *box-and-whisker plot* del RHI-PAT i els tercils de FABP4 en pacients diabètics. Les comparacions entre grups van ser determinades utilitzant el test no-paramètric U de Mann-Whitney.

Finalment, es va realitzar un model de regressió lineal per *stepwise* en el qual es van introduir les següents variables independents: edat, gènere, IMC, colesterol total, triglicèrids, glucosa, sE-selectina, anticossos de les LDL oxidades i la PCR. El resultat va revelar que FABP4 va ser l'única variable associada a RHI-PAT (inversa) en pacients diabètics ($R^2=0.034$, $P=0.043$) (Taula 8).

Taula 8. Model de regressió lineal per *stepwise* per a l'anàlisi de RHI-PAT en pacients DT2

| | B | P-valor | canvi en R^2 (%) |
|-------|--------|---------|--------------------|
| FABP4 | -0.005 | 0.043 | 4.5 |

Anàlisi de regressió per *stepwise* de 105 pacients DT2. $R^2 = 0.034$, $P = 0.043$.
Les variables entrades al model van ser: edat, gènere, índex de massa corporal, colesterol total, triglicèrids, glucosa, sE-selectina, anticossos de les LDL oxidades i la PCR.

5.2. ESTUDI *IN VITRO*. FABP4 indueix disfunció endotelial a través de la via de senyalització dependent d'insulina en HUVECs

5.2.1. Efecte de FABP4 en la via de senyalització dependent d'insulina (IRS-1/PI3-kinase/Akt/eNOS) en HUVECs

En un primer experiment, vam estudiar si el tractament de les cèl·lules endotelials amb FABP4 modificava la presència de la proteïna a nivell intracel·lular indicant la captació de FABP4 per les cèl·lules endotelials. La Figura 1 mostra que el tractament de FABP4 a concentracions creixents (0-100 ng/ml) amb HUVECs durant 30 min augmenta de manera significativa la quantitat de proteïna FABP4 intracel·lular (lisats totals cel·lulars) respecte les cèl·lules no tractades ($P<0.05$). L'increment va ser del 43% a les concentracions estudiades (25, 50, 100 ng/ml) sense observar diferències entre elles. Cap de les concentracions estudiades de FABP4 va resultar ser tòxica per a les cèl·lules.

Per determinar si FABP4 podria tenir algun efecte en l'activitat de l'eNOS, vàrem estudiar l'activació de l'enzim mitjançant la seva fosforilació a Ser¹¹⁷⁷. En els resultats vam observar que la incubació de les HUVEC amb medi 200 suplementat (amb 2% FBS i els factors de creixement que mantenen una activació basal d'eNOS) amb FABP4 (0-100ng/ml) durant 30 min va inhibir la fosforilació de l'enzim de manera dosi-dependent en un 52%, 61% i un 65%, a 25, 50 i 100 ng/ml, respecte el control ($P<0.05$) (Figura 2).

A partir d'aquí, tots els experiments d'activació es van dur a terme amb medi 200 al 2% de FBS sense factors de creixement per no obtenir una activació basal de l'enzim destacada. Tot seguit, per establir la concentració adequada d'incubació d'insulina per l'estimulació de les HUVECs pels posteriors experiments, es va realitzar un estudi de dosi-resposta (0-600nM) per estudiar la fosforilació de l'enzim eNOS a nivell de Ser¹¹⁷⁷ i de l'enzim Akt a nivell de Ser⁴⁷³. Es va observar un augment dosi-resposta de l'activació tant de l'eNOS com de l'Akt, que va ser de 25%, 46% i 58% per eNOS (100, 300 i 600nM, respectivament) i 55% i 68% per Akt (300nM i 600nM, respectivament) ($P<0.05$). Es va concloure que la concentració òptima de treball seria 600nM d'insulina (Figura 3 i 4).

Seguidament, es va estudiar el temps òptim d'incubació en un experiment temps-resposta (0-60 min) per l'activació tant de l'eNOS com de l'Akt. Els resultats van

Resultats

mostrar un augment temps-resposta en l'activació de l'eNOS de 19% ($P<0.05$), 34% ($P<0.05$) i 8% a 10, 30 i 60 min, respectivament. Valorant la fosforilació d'Akt, els resultats van mostrar un augment temps-resposta en l'activació de l'Akt de 15%, 35% ($P<0.05$) i 54% ($P<0.05$) a 10, 30 i 60 min, respectivament. Es va determinar que el temps d'incubació establert seria de 30 min per l'eNOS i per l'Akt ja que es va obtenir una estimulació suficient per poder dur a terme els següents experiments (Figura 5 i 6).

Així doncs, tots els experiments d'activació de la via de senyalització dependent d'insulina, es van realitzar en les següents condicions: 600nM i 30 min.

Prèvia estimulació amb insulina, l'enzim eNOS és fosforilat per l'activació de la via PI3k/Akt en l'endoteli vascular. Es va analitzar l'efecte de FABP4 sobre la fosforilació d'eNOS a nivell de Ser¹¹⁷⁷, estimulant la via de senyalització amb insulina. Les HUVECs van ser preincubades amb FABP4 (0-100ng/ml) durant 30 min previ al tractament amb insulina (600nM, 30 min). Com es mostra en la Figura 7, l'augment de la fosforilació d'eNOS induïda per l'acció de la insulina (51%, $P<0.05$) va ser inhibida per FABP4 en un 23% i 45% a 50 i 100ng/ml, respectivament, sent estadísticament significatiu a 100ng/ml ($P<0.05$).

Per tant, FABP4 podria inhibir la fosforilació d'eNOS tant en estat basal com després de l'activació amb insulina i causar la inactivació d'eNOS en les cèl·lules endotelials. Per aquesta raó, sabent que la insulina activa eNOS a través de la molècula Akt, vàrem decidir estudiar si FABP4 podria tenir algun efecte en l'activació d'aquesta quinasa. Prèvia estimulació amb insulina, Akt és fosforilada a través de la via de senyalització PI3k en les cèl·lules endotelials (veure Figura 7 de la Introducció). Vàrem estudiar l'efecte de FABP4 sobre la fosforilació d'Akt a nivell de Ser⁴⁷³. Les HUVECs van ser preincubades durant 30 min amb FABP4 (0-100ng/ml) previ al tractament amb insulina (600nM, 30 min). Després de l'activació d'Akt per insulina (47%, $P<0.05$), vam observar que FABP4 va inhibir la fosforilació d'Akt en un 21%, 24%, 75% a 25, 50 i 100ng/ml respectivament, sent estadísticament significatiu a 100ng/ml ($P<0.05$) (Figura 8).

5.2.2. Efecte de FABP4 en la via de senyalització MAPK/ERK

L'objectiu d'aquest experiment era determinar si FABP4 podria tenir algun efecte en la via de les MAPkinases (veure Figura 7 de la Introducció). Es van estudiar les fosforilacions de p44/p42 MAPK (Erk1/2) a nivell de Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴. Les HUVECs van ser

preincubades amb FABP4 (0-100ng/ml) durant 30 min previ al tractament amb insulina (600nM, 30 min). L'estimulació de les fosforilacions a través de l'acció de la insulina (83%, $P<0.05$), va ser inhibida parcialment per FABP4 en un 12%, 27% i 29% a 25, 50 i 100ng/ml respectivament tot i no ser significativa (Figura 9).

5.2.3. Efecte de FABP4 en l'expressió del mRNA de l'eNOS previ a l'estimulació amb insulina

Previs estudis demostren que l'expressió del mRNA d'eNOS és regulat per l'activació de la insulina en les cèl·lules endotelials [164]. Tal com esperàvem, la insulina (600nM) va incrementar l'expressió d'eNOS a nivell de mRNA a les 24 hores en un 61% respecte el control ($P<0.05$) (Figura 10). A continuació, vam estudiar l'expressió del mRNA de l'eNOS a partir de cèl·lules tractades amb FABP4. Les HUVECs van ser preincubades amb FABP4 (0-100ng/ml) durant 30 min previ al tractament amb insulina (600nM) amb medi complet durant 24 hores. Es va observar que l'activació de l'expressió de mRNA per insulina, va ser inhibida per la presència de FABP4 a 50 ng/ml i 100ng/ml en un 63% i un 59% respectivament ($P<0.05$) (Figura 10). Es va utilitzar TNF α (10ng/ml) com a control negatiu de l'experiment ja que està demostrat que el TNF α disminueix l'expressió del mRNA d'eNOS en les cèl·lules endotelials, augmentant la inestabilitat del seu mRNA [165]. El tractament amb TNF α va resultar en una inhibició del 93% ($P<0.05$) en l'expressió de mRNA de l'eNOS. Cap de les concentracions estudiades de FABP4 va resultar ser tòxica per a les cèl·lules.

5.2.4. Efecte de FABP4 en l'expressió del mRNA de l'E-selectina previ a l'estimulació amb insulina

El tractament amb insulina durant 24 hores va augmentar en un 21% l'expressió d'E-selectina a nivell de mRNA de manera no significativa. A continuació, vam estudiar l'expressió del mRNA de l'E-selectina a partir de cèl·lules tractades amb FABP4. Les HUVECs van ser preincubades amb FABP4 (0-100ng/ml) durant 30 min previ al tractament amb insulina (600nM) amb medi complet durant 24 hores. Es va observar que l'activació de l'expressió de mRNA per insulina, va ser augmentada per la presència de FABP4 a 50 ng/ml i 100ng/ml en un 18% i un 2% respectivament de manera no significativa (Figura 11). Es va utilitzar TNF α (10ng/ml) com a control positiu de l'experiment ja que està demostrat que el TNF α incrementa l'expressió del mRNA d'E-selectina en les cèl·lules endotelials. El tractament amb TNF α va resultar en un

augment del 99% ($P<0.05$) en l'expressió de mRNA de l'E-selectina. Cap de les concentracions estudiades de FABP4 va resultar ser tòxica per a les cèl·lules.

5.2.5. Efecte de FABP4 en l'expressió del mRNA de VCAM1 previ a l'estimulació amb insulina

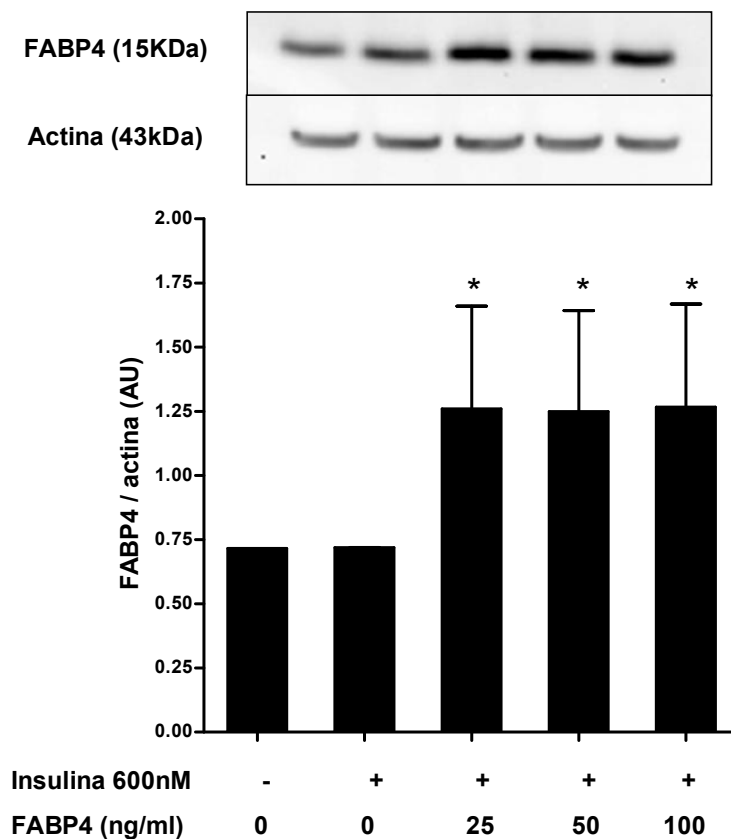
El tractament amb insulina durant 24 hores va augmentar en un 15% l'expressió de VCAM1 a nivell de mRNA de manera no significativa. Tot seguit, vam estudiar l'expressió del mRNA de VCAM1 a partir de cèl·lules tractades amb FABP4. Les HUVECs van ser preincubades amb FABP4 (100ng/ml) durant 30 min abans dels tractament amb insulina (600nM) amb medi complet durant 24 hores. Els resultats mostren que el tractament amb FABP4 augmenta l'activació de l'expressió del mRNA de VCAM1 en un 33% ($P<0.05$) (Figura 12). Es va utilitzar TNF α (10ng/ml) com a control positiu de l'experiment ja que està demostrat que el TNF α activa l'expressió del mRNA de VCAM1 en les cèl·lules endotelials [166]. El tractament amb TNF α va resultar ser en un augment del 99% en l'expressió de mRNA de la VCAM1 ($P<0.05$).

5.2.6. Efecte de FABP4 en l'adhesió dels leucòcits a les cèl·lules endotelials

Per tal d'aprofundir en l'efecte de FABP4 sobre la funció endotelial, vam realitzar l'assaig d'adhesió dels leucòcits a l'endoteli. El tractament amb insulina durant 24 hores va augmentar en un 10% l'adhesió dels leucòcits a l'endoteli de manera no significativa. Els resultats obtinguts mostren que el tractament de FABP4 a 100ng/ml amb les cèl·lules endotelials durant 30 min i l'activació posterior amb insulina (600nM) durant 24 hores augmenta un 24% ($P<0.05$) l'adhesió dels leucòcits a les cèl·lules endotelials (Figura 13). Es va utilitzar TNF α (10ng/ml) com a control positiu de l'experiment ja que està demostrat que augmenta l'expressió de molècules d'adhesió i per tant la interacció entre els dos tipus cel·lulars [166]. El tractament amb TNF α va resultar ser en un augment del 77% ($P<0.05$) en l'adhesió dels leucòcits a les cèl·lules endotelials. Cap de les concentracions estudiades de FABP4 va resultar ser tòxica per a les cèl·lules.

5.2.7. Figures

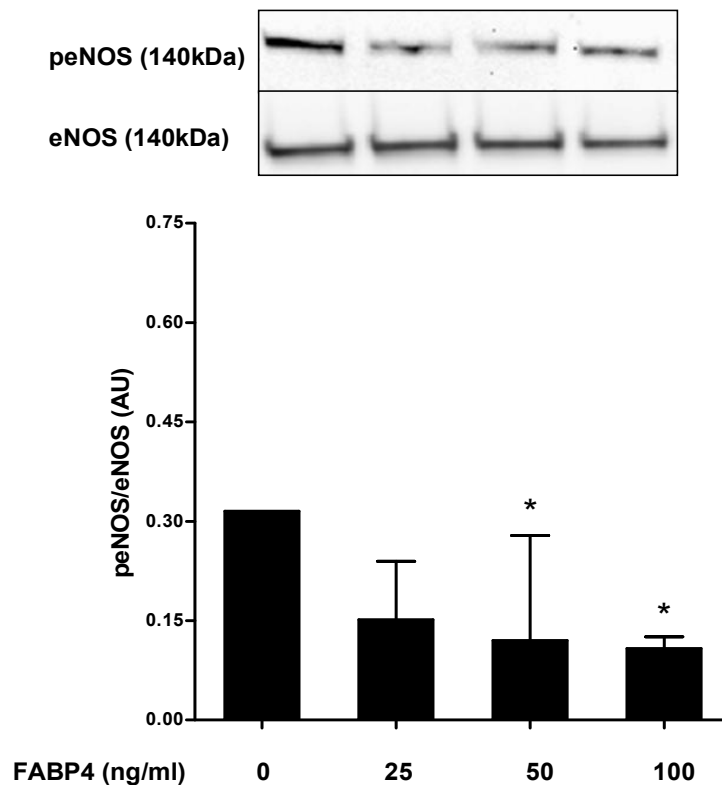
Figura 1.



Presència de FABP4 en els lisats cel·lulars. Les HUVECs van ser incubades amb FABP4 (0-100ng/ml) durant 30 min prèvia estimulació amb insulina (600nM, 30 min). Es presenten les bandes representatives d'un experiment, * $P < 0.05$ vs insulina(-) / FABP4(-). Els resultats representen la mitjana d'almenys tres experiments fets per duplicat.

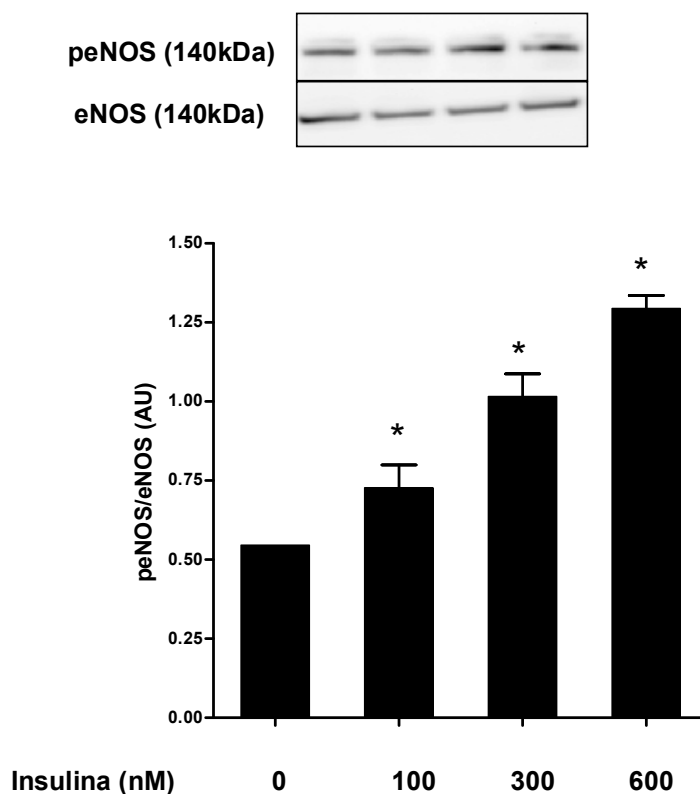
Resultats

Figura 2.



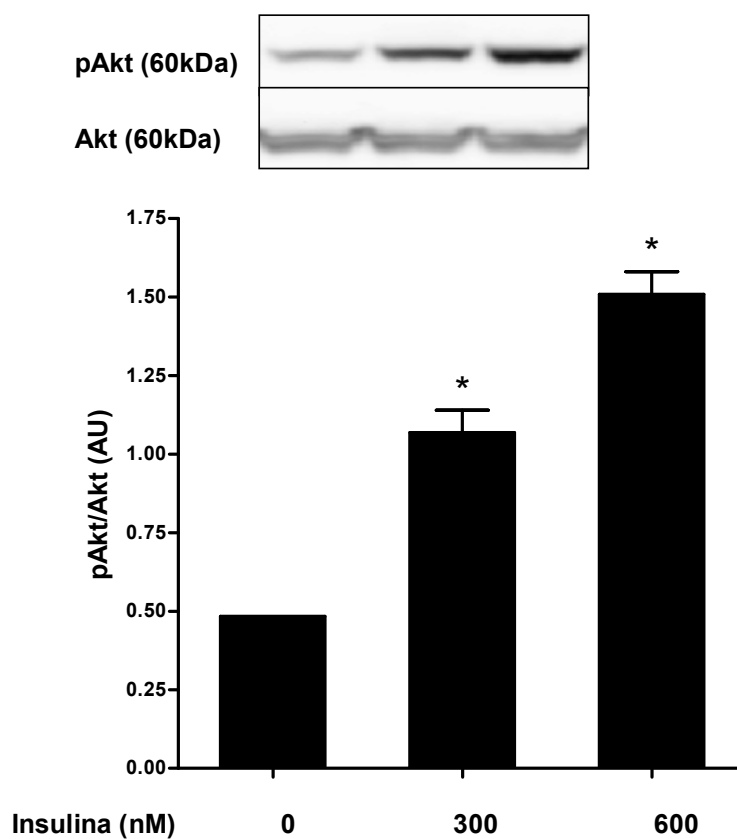
Efecte de FABP4 en la fosforilació d'eNOS a nivell de Ser¹¹⁷⁷ en HUVECs les quals van ser incubades amb concentracions creixents de FABP4 (0-100 ng/ml) durant 30 min. Es presenten les bandes representatives d'un experiment, * $P < 0.05$ vs insulina(-) / FABP4(-). Els resultats representen la mitjana d'almenys tres experiments fets per duplicat.

Figura 3.



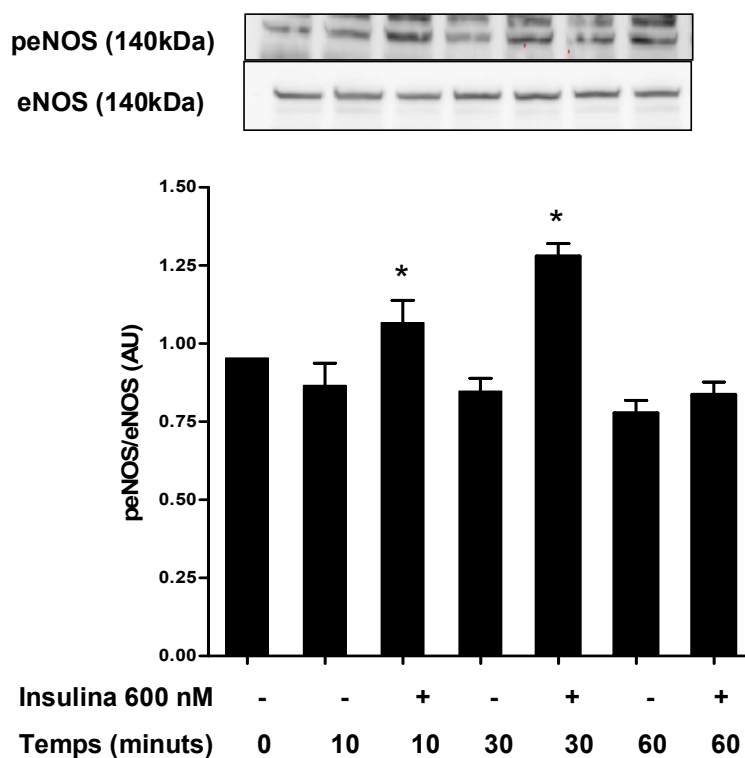
Dosi-resposta en la fosforilació d'eNOS a nivell de Ser¹¹⁷⁷ en HUVECs les quals van ser incubades a concentracions creixents d'insulina (0-600nM) durant 30 min. Es presenten les bandes representatives d'un experiment. * $P < 0.05$ vs insulina(-). Els resultats representen la mitjana d'almenys tres experiments fets per duplicat.

Figura 4.



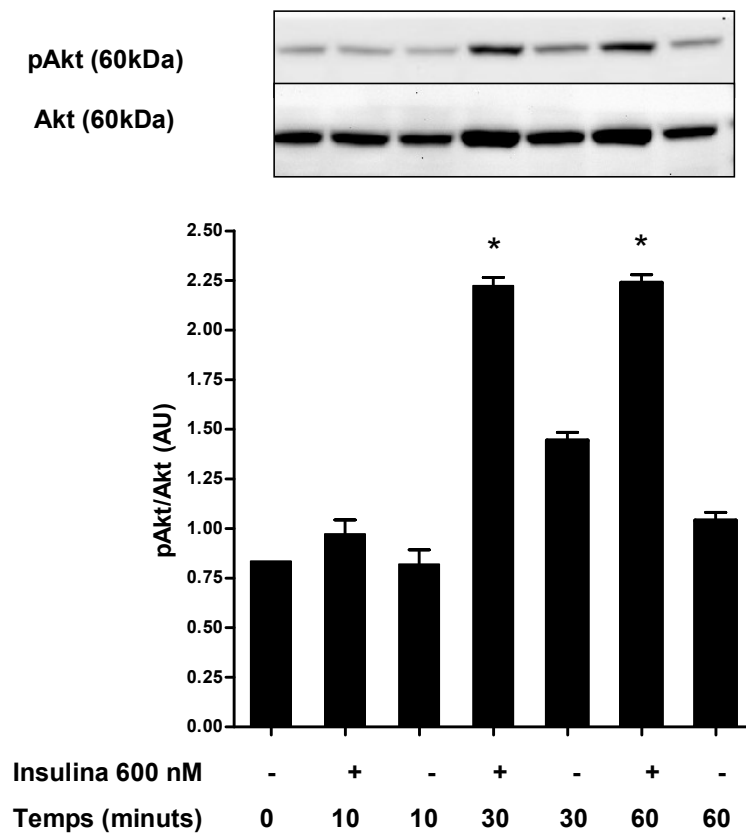
Dosi-resposta en la fosforilació d'Akt a nivell de Ser⁴⁷³ en HUVECs les quals van ser incubades a concentracions creixents d'insulina (0-600nM) durant 30 min. Es presenten les bandes representatives d'un experiment. * $P < 0.05$ vs insulina (-). Els resultats representen la mitjana d'almenys tres experiments fets per duplicat.

Figura 5.



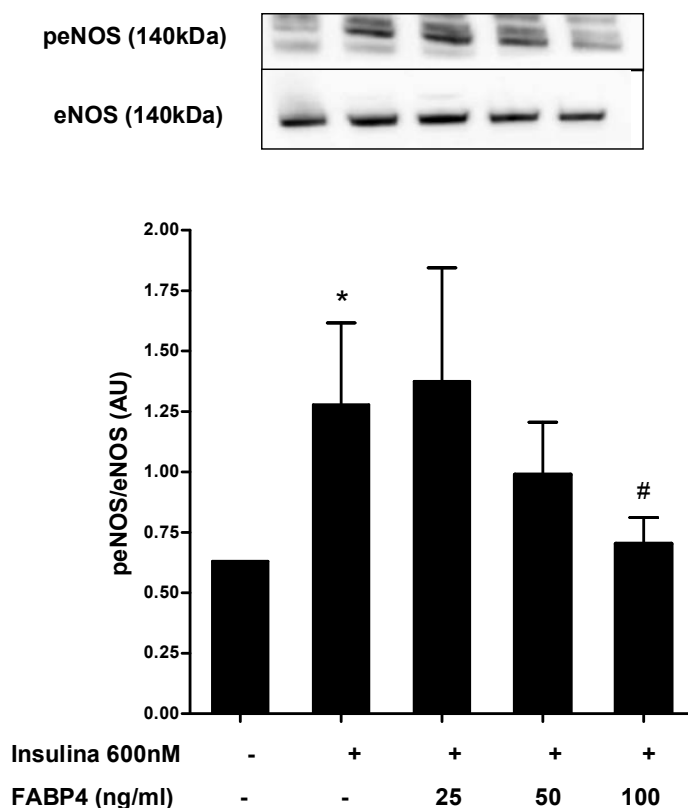
Temps-resposta en la fosforilació d'eNOS a nivell de Ser¹¹⁷⁷ en HUVECs les quals van ser incubades amb insulina a una concentració de 600nM durant 0, 10, 30 i 60 min. Es presenten les bandes representatives d'un experiment. * $P < 0.05$ vs insulina(-). Els resultats representen la mitjana d'almenys tres experiments fets per duplicat.

Figura 6.



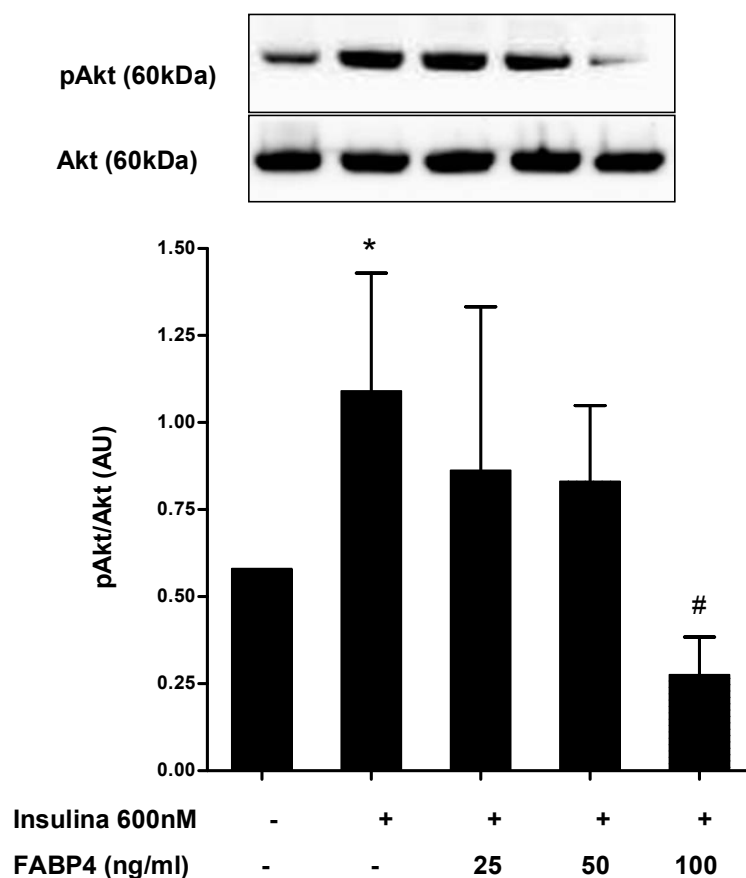
Temps-resposta en la fosforilació d'Akt a nivell de Ser⁴⁷³ en HUVECs les quals van ser incubades amb insulina a una concentració de 600nM durant 0, 10, 30 i 60 min. Es presenten les bandes representatives d'un experiment. * $P < 0.05$ vs insulina(-). Els resultats representen la mitjana d'almenys tres experiments fets per duplicat.

Figura 7.



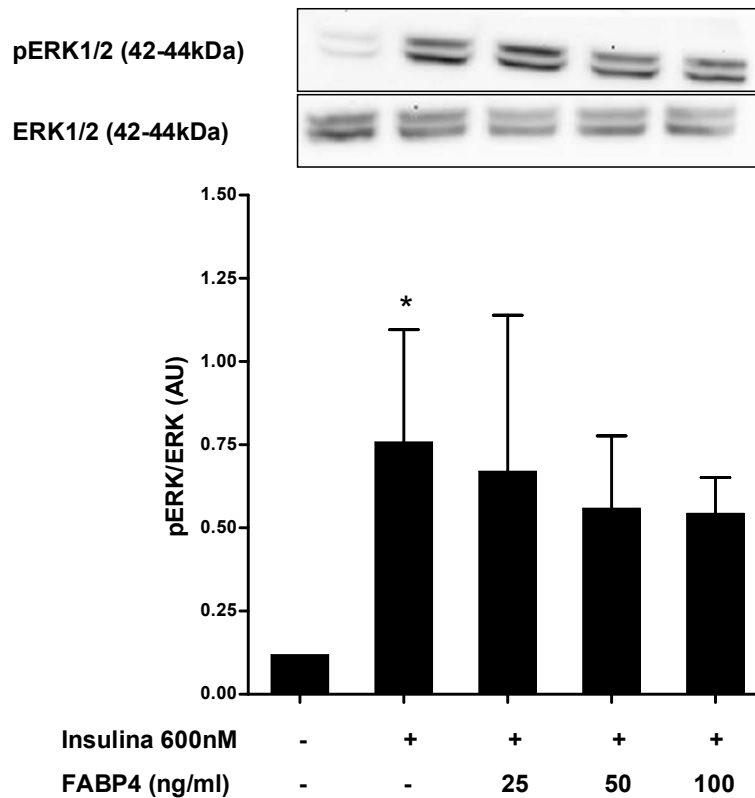
Efecte de FABP4 en la fosforilació d'eNOS a nivell de Ser¹¹⁷⁷ prèvia activació amb insulina. Les HUVECs van ser incubades amb concentracions creixents de FABP4 (0-100 ng/ml) durant 30 min i incubades amb insulina (600nM, 30 min). Es presenten les bandes representatives d'un experiment. * $P < 0.05$ vs insulina(-) / FABP4 (-); # $P < 0.05$ vs insulina(+) / FABP4(-). Els resultats representen la mitjana d'almenys tres experiments fets per duplicat.

Figura 8.



Efecte de FABP4 en la fosforilació d'Akt a nivell de Ser⁴⁷³ prèvia activació amb insulina. Les HUVECS van ser incubades amb concentracions FABP4 (0-100 ng/ml) durant 30 min i incubades amb insulina (600nM, 30 min). Es presenten les bandes representatives d'un experiment, * $P < 0.05$ vs insulina(-) / FABP4 (-); # $P < 0.05$ vs insulina(+)/ FABP4(-). Els resultats representen la mitjana d'almenys tres experiments fets per duplicat.

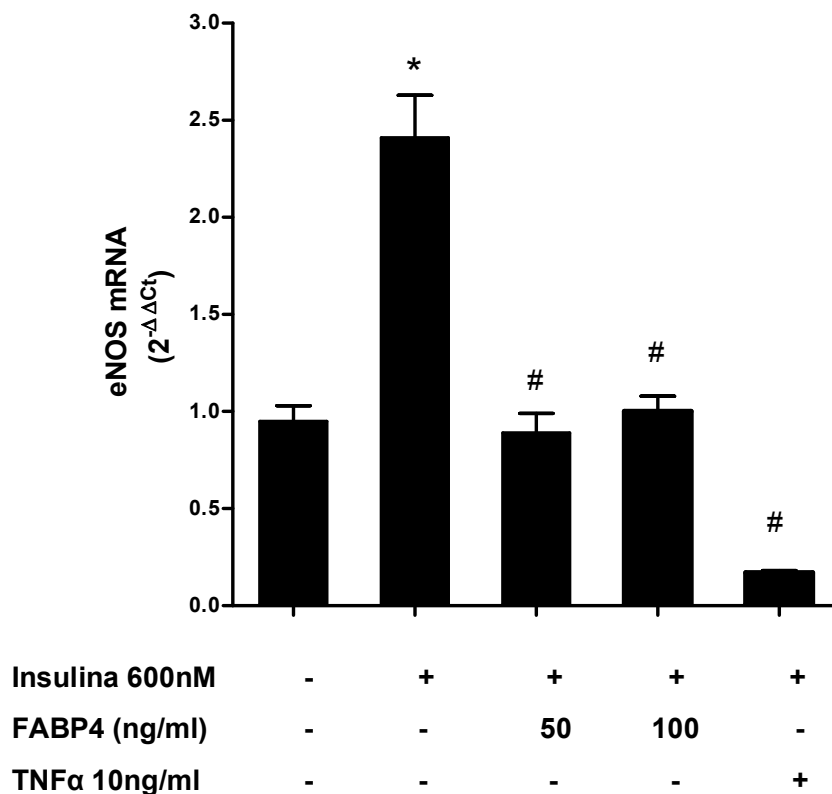
Figura 9.



Efecte de FABP4 en la fosforilació de p44/p42 MAPK (Erk1/2) a nivell de Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ prèvia activació amb insulina. Les HUVECs van ser incubades amb concentracions creixents de FABP4 (0 -100 ng/ml) durant 30 min i incubades amb insulina (600nM, 30 min). Es presenten les bandes representatives d'un experiment. * $P < 0.05$ vs insulina(-) / FABP4 (-); # $P < 0.05$ vs insulina(+) / FABP4(-). Els resultats representen la mitjana d'almenys tres experiments fets per duplicat.

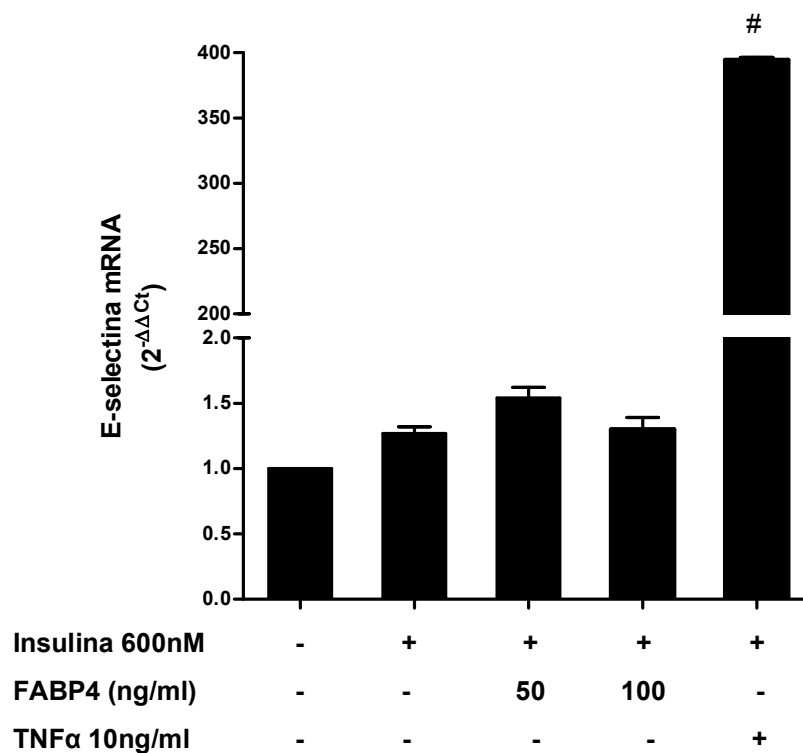
Resultats

Figura 10.



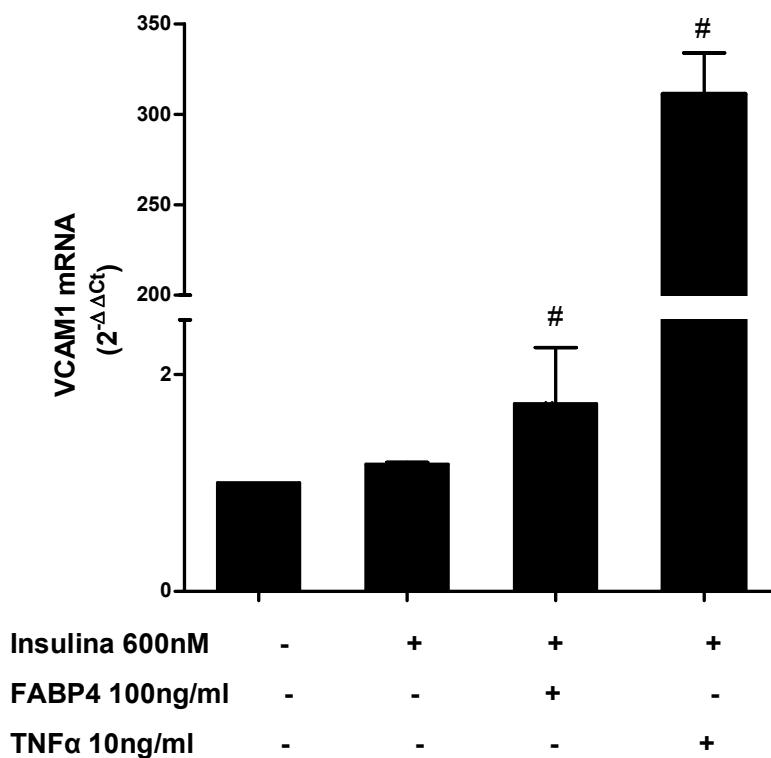
Efecte de FABP4 sobre l'expressió del mRNA d'eNOS. Les HUVEC van ser incubades amb concentracions creixents de FABP4 (0-100ng/ml) durant 30 min i després tractades amb insulina (600nM) durant 24 hores. TNFα (10ng/ml) com a control negatiu. Les dades es presenten utilitzant el mètode $2^{-\Delta\Delta C_t}$. * $P < 0.05$ vs insulina(-) / FABP4 (-); # $P < 0.05$ vs insulina(+) / FABP4(-). Els resultats representen la mitjana d'almenys tres experiments fets per triplicat.

Figura 11.



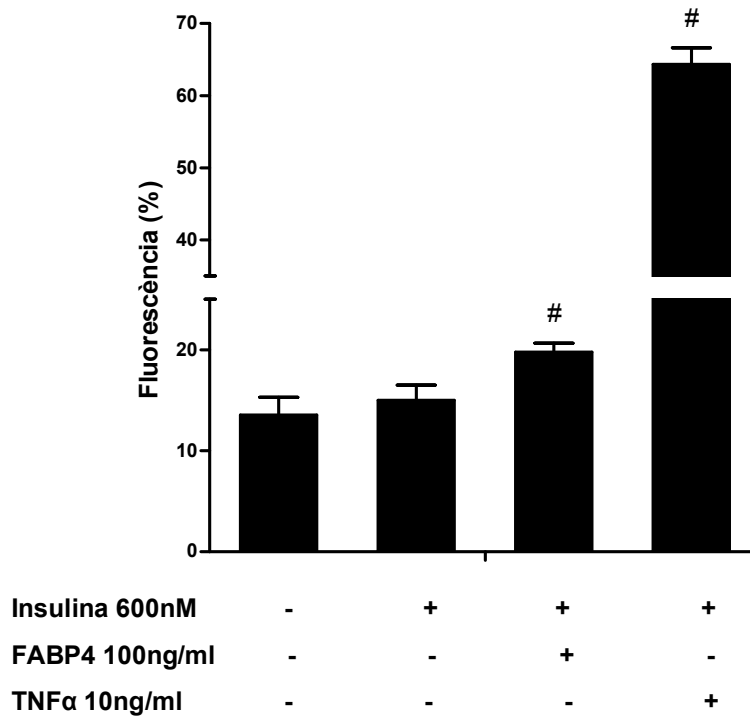
Efecte de FABP4 sobre l'expressió del mRNA d'E-selectina. Les HUVEC van ser incubades amb concentracions creixents de FABP4 (0-100ng/ml) durant 30 min i després tractades amb insulina (600nM) durant 24 hores. TNFα (10ng/ml) com a control positiu. Les dades es presenten utilitzant el mètode $2^{-\Delta\Delta C_t}$. # $P < 0.05$ vs insulina(+)/FABP4(-). Els resultats representen la mitjana d'almenys tres experiments fets per triplicat.

Figura 12.



Efecte de FABP4 sobre l'expressió del mRNA de VCAM1. Les cèl·lules van ser incubades amb FABP4 (100 ng/ml) durant 30 min i tractades amb insulina (600nM) durant 24 hores. TNFα (10ng/ml) com a control positiu. Les dades es presenten utilitzant el mètode $2^{-\Delta\Delta C_t}$. # $P < 0.05$ vs insulina(+) / FABP4(-). Els resultats representen la mitjana d'almenys tres experiments fets per triplicat.

Figura 13.



Efecte de FABP4 sobre l'adhesió de les cèl·lules Jurkat a l'endoteli. Les HUVECs van ser incubades amb FABP4 (100ng/ml) durant 30 min i tractades amb insulina (600nM) durant 24 hores. TNFα (10ng/ml) com a control positiu. Les dades s'expressen com el percentatge de fluorescència (d'adhesió). # $P < 0.05$ vs insulin(+) / FABP4(-). Els resultats representen la mitjana d'almenys tres experiments fets per triplicat.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FABP4 I BIOMARCADORS DE LA DISFUNCIÓ ENDOTELIAL. ESTUDI CLÍNIC I IN VITRO

Gemma Aragonès Bargalló

ISBN:978-84-693-8853-2/DL:T.1951-2010

6. Discussió

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FABP4 I BIOMARCADORS DE LA DISFUNCIÓ ENDOTELIAL. ESTUDI CLÍNIC I IN VITRO

Gemma Aragonès Bargalló

ISBN:978-84-693-8853-2/DL:T.1951-2010

La tesi derivada del nostre treball consisteix que la FABP4 circulant altera la funció endotelial mesurada per la tècnica de RHI-PAT. Aquesta tècnica s'associa a altres marcadors de disfunció endotelial com les concentracions de sE-selectina i a la presència de molècules que alteren la funció endotelial com les LDL oxidades. A més, hem pogut obtenir indicis clars de l'efecte directe de FABP4 sobre la funció de les cèl·lules endotelials. Els nostres resultats permeten afirmar que la FABP4 interfereix a nivell molecular en la senyalització de la insulina per l'activació d'eNOS i de les molècules d'adhesió cel·lulars.

Aquest treball aporta dades sobre els possibles mecanismes que expliquen una observació clínica. Creiem per tant que un dels punts forts del nostre estudi és el contínuum que ha permès donar explicacions experimentals a un fet clínic. El nostre treball s'ha plantejat en tres fases: 1) Estudi de la tècnica RHI-PAT en relació a marcadors bioquímics de funció endotelial. 2) Estudi de la influència de la FABP4 circulant sobre la funció endotelial mesurada com a RHI-PAT. 3) Estudi de l'impacte de la FABP4 sobre la funció de les cèl·lules endotelials *in vitro*.

1. La tècnica RHI-PAT es relaciona amb marcadors bioquímics de funció endotelial.

La disfunció endotelial juga un paper clau en l'aterogènesi i contribueix al desenvolupament clínic de la malaltia CV. Actualment, sabem que els factors de risc vascular coneguts promouen alteracions funcionals de les cèl·lules endotelials resultant en la disminució de la biodisponibilitat de NO, donant lloc a la vasoconstricció, inflamació i trombosi. En estudis amb humans, s'han associat aquests factors de risc CV amb el dany de la funció vasomotora i en els individus amb una funció vascular anormal, s'ha observat que tenen un major risc de patir events CV. A més, les modificacions d'aquests factors de risc CV contribueixen a la millora de l'aterosclerosi coronària, gràcies, en part, a la millora de la funció endotelial. La dificultat per determinar la funció endotelial en pacients ha fet que es desenvolupin tècniques reproduïbles i d'aplicació senzilla a la pràctica clínica.

Així doncs, en els darrers anys, existeix una necessitat creixent per identificar una nova metodologia no invasiva, per tal de facilitar la identificació d'individus amb risc de patir events CV. En aquest treball, hem intentat valorar si l'estudi de la disfunció endotelial detectada per tonometria arterial perifèrica és un bon candidat com a eina clínica de la valoració de la funció endotelial en pacients amb risc CV. Per això hem investigat la seva relació amb els biomarcadors endotelials, inflamació i oxidació

lipídica. El resultat més rellevant mostra que la sE-selectina es va associar de manera significativa amb el RHI-PAT en una població de risc CV intermedi. Tanmateix el valor de RHI-PAT es va associar de forma significativa a un factor lesiu per l'endoteli com és la concentració de LDL oxidades.

Els nostres resultats recolzen la tècnica de RHI-PAT com a mètode per a la valoració de la funció endotelial a nivell clínic [97]. Estudis previs demostren que aquesta tècnica proporciona una bona sensibilitat i especificitat en la predicció de la disfunció endotelial coronària diagnosticada pel test de perfusió intracoronari d'Ach [87]. Si bé recentment, s'ha demostrat que la FMD de l'artèria braquial prediu futurs events CV en pacients amb malaltia coronària, l'estudi de Rubinshtein et al. [99] mostra que el RHI-PAT té una capacitat similar de predicció d'events CV. També s'ha demostrat que el RHI-PAT afegeix valor predictiu al FRS en la detecció d'individus amb elevat risc CV [98]. Per altra banda, el RHI-PAT està esdevenint una eina molt útil per avaluar la funció vascular en diverses malalties. Com per exemple, es va detectar una millora en la funció endotelial mesurada per RHI-PAT en pacients amb tractament per angina de pit [86]. Una funció endotelial anormal també va ser observada per RHI-PAT en adolescents amb diabetis tipus 1 [167]. Aquest concepte d'utilització d'una tècnica no invasiva per valorar la funció endotelial és un concepte que actualment s'està estudiant per incloure en la prevenció primària (o secundària). Per tant, l'avaluació no invasiva de la funció endotelial podria ser útil com una eina clínica, no només per la predicció d'events CV futurs, sinó també per la valoració dels seus tractaments. A més, mentre la principal limitació dels mètodes que detecten la reactivitat hiperèmica és la reproduïbilitat d'aquests tests, la valoració de RHI-PAT és assequible, reproduïble, no invasiva i independent d'operador, el qual no està subjecte a interpretacions subjectives de diàmetre dels vasos associats com en la mesura per ultrasons de l'artèria braquial.

La principal causa de la disfunció endotelial és la disminució de la vasodilatació depenent de NO. Ha estat demostrat que el NO és el factor determinant en la contribució de l'augment de la reactivitat vascular després d'una isquèmia controlada mesurada pel RHI-PAT. Així doncs, la resposta hiperèmica valorada pel RHI-PAT reflecteix en part la biodisponibilitat del NO a nivell molecular i per tant la funció endotelial. No obstant això, s'ha de tenir en compte que aquest mètode, com s'ha explicat anteriorment, consisteix en la mesura del flux vascular en microvasculatura perifèrica, i els mecanismes de regulació del to vascular dels vasos petits i grans podrien ser diferents. La microvasculatura digital és anatòmicament complexa i consisteix en una circulació dual, formada per un costat per l'anastomosi arteriovenosa

i per l'altra pels vasos que originen la xarxa capil·lar [168]. L'anastomosi arteriovenosa és particularment molt abundant en la vasculatura digital i regula la quantitat de flux sanguini en els dits. El to vascular en l'anastomosi arteriovenosa és regulat pel sistema nerviós simpàtic i també pel NO el qual té un important paper en el flux sanguini digital [168, 169]. Tot i així, la funció vasodilatadora mediada pel NO juga un paper més determinant, modulant la funció vascular digital en resposta a un estímul, com la hiperèmia reactiva [96]. Per tant, s'ha demostrat que els mecanismes de regulació del to vascular dels vasos petits també són dependents de NO en les microartèries [96]. Per altra banda, diversos estudis han demostrat l'associació de factors de risc CV com la hipertensió, la diabetis, la dislipèmia i l'edat, amb canvis estructurals importants en la microvasculatura que contribueix a disminuir la hiperèmia reactiva. Per exemple, estudis histològics mostren l'engruiximent de la capa íntima-mitja i evidències d'hipertrofia microvascular en animals d'experimentació [170, 171] i en pacients hipertensos [172]. En diversos estudis, s'ha observat anormalitats en la microvasculatura relacionades amb la resistència a la insulina i l'obesitat [173-176]. També, la hipercolesterolèmia s'ha associat a la reducció de la reactivitat vascular [177], i s'ha vist que la teràpia hipolipemiant amb estatines, millora la resposta hiperèmica [178]. De forma interessant, els canvis estructurals en la microcirculació correlacionen fortament amb la pressió de pols, suggerint un mecanisme d'unió entre els factors de risc CV i la disfunció endotelial microvascular [179, 180].

Els nostres resultats van demostrar que la sE-selectina es correlaciona inversament amb RHI-PAT, mentre que sVCAM1 va mostrar una tendència en el mateix sentit. En canvi, no es va trobar associació amb sICAM1, PCR, IL6 ni TNF- α . La sE-selectina és secretada exclusivament per les cèl·lules endotelials, en canvi, altres molècules d'adhesió, com sVCAM1 i sICAM1, també poden ser sintetitzades pels leucòcits, les cèl·lules musculars llises i les plaquetes [181]. Per tant, la sE-selectina podria considerar-se un biomarcador específic de dany endotelial. La seva funció principal és permetre la unió dels leucòcits a l'endoteli en el procés de *rolling* abans de l'adhesió a través de les molècules d'adhesió cel·lular i la transmigració a l'espai subendotelial. La sE-selectina és sintetitzada per les cèl·lules endotelials activades i alliberada al plasma [182].

Alguns estudis clínics han suggerit que els nivells plasmàtics de diferents biomarcadors inflamatoris i la disfunció endotelial s'associen amb esdeveniments clínics, tot i que altres treballs no han confirmat aquests resultats [183, 184]. Estudis previs han demostrat que la sE-selectina sembla ser la molècula d'adhesió que es

correlaciona millor amb la FMD en individus sans [185]. Aquests resultats estarien en concordança amb els nostres. Si bé, no es van trobar associacions entre la VCAM1 i ICAM1 i els valors de RHI-PAT, altres estudis han mostrat una associació entre sICAM i la FMD en pacients amb hipercolesterolèmia familiar [186]. A més, s'ha confirmat que sICAM i la FMD estan relacionats en l'estimació del risc CV [187]. En aquest estudi previ, la sE-selectina i la sVCAM no es van mesurar. Les raons de la discrepància entre els nostres resultats i altres de publicats no estan clares, però cal tenir present que les poblacions estudiades són diferents. Un altre estudi va mostrar que només sICAM1, i no sE-selectina o sVCAM1, es va correlacionar amb la funció endotelial en individus sans utilitzant mètodes invasius [188]. D'altra banda, en el nostre estudi els pacients diabètics van presentar uns nivells més elevats de sE-selectina circulant, d'acord amb altres estudis anteriors [44]. En el nostre treball les diferències de RHI-PAT entre diabètics i no diabètics no van ser significatives. En la diabetis tipus 1, també s'ha confirmat la correlació entre sE-selectina i la funció endotelial mesurada en aquest cas amb FMD [189].

La relació entre RHI-PAT i la concentració plasmàtica de LDL oxidades en relació als nivells de LDL és un altre resultat que corrobora el comportament biològic d'aquesta variable (RHI-PAT) com a marcador de funció endotelial. És conegut des de fa temps que l'oxidació de les LDL altera la funció endotelial. De fet, el primer pas en la formació de la placa d'ateroma es considera que és l'oxidació de les LDL i aquesta alteració condiona l'activació de l'endoteli que facilita el reclutament de cèl·lules inflamatòries. El nostre treball amplia aquesta evidència clínica a la mesura de la funció endotelial a través de l'estudi de la reactivitat vascular perifèrica. Al mateix temps reforça la validesa de la tècnica com a valor subrogat de funció endotelial.

Un dels factors a nivell clínic més relacionat amb el RHI-PAT ha estat el perímetre abdominal, el qual s'ha associat inversament als valors del RHI-PAT. Aquest resultat va en concordança amb altres estudis previs en els quals s'ha demostrat que el perímetre abdominal és un component important en la síndrome metabòlica i un factor determinant en l'infart de miocardi [190]. A més, l'associació inversa del RHI-PAT amb les HDL i la positiva associació amb els triglicèrids suggereixen que el RHI-PAT és específicament sensible als components de la síndrome metabòlica. Hem observat una correlació paradoxal positiva entre hipertensió arterial, edat i RHI-PAT. Donat que el mètode valora el volum sanguini, és probable que aquest valor sigui depenent de la pressió de pols, la qual cosa explicaria que els pacients amb tensió arterial elevada tinguin nivells de RHI-PAT superiors. Per altra banda, l'estreta correlació entre edat i

tensió arterial explicaria les troballes en tots dos casos. Aquesta mateixa associació positiva entre la tensió arterial i RHI-PAT ha estat observada en els pacients de l'estudi Framingham [98].

Un factor, que cal tenir present en l'estudi, és que l'obtenció de mostres amb les quals es va realitzar l'anàlisi bioquímica i l'exploració vascular, es va dur a terme sense interrompre el tractament farmacològic dels pacients, segons especifica el Comitè d'Ètica. Encara que a l'anàlisi estadística es va considerar aquest fet, això podria ser una limitació de l'estudi perquè els pacients no es trobaven en condicions basals. Tanmateix, això també proporciona informació sobre la situació d'aquest grup de pacients durant el tractament, que representa una informació molt important a nivell clínic.

El RHI-PAT té diversos avantatges potencials sobre les mesures tradicionals de la funció endotelial. En concret, la valoració de RHI-PAT és assequible, reproduïble, no invasiva i independent d'operador. El RHI-PAT podria ser una eina molt útil en el camp de la recerca i a nivell clínic per avaluar la disfunció endotelial en les poblacions d'alt o moderat risc de desenvolupar malaltia CV.

El fet que la sE-selectina, marcador específic soluble de dany endotelial, i la LDL oxidada, factor patogènic de disfunció endotelial, es trobin relacionats amb el RHI-PAT en pacients amb risc CV recolza el paper del RHI-PAT en l'avaluació de la funció endotelial. En resum, PAT és una eina vàlida per a ser utilitzada a nivell clínic per valorar la funció endotelial en pacients amb risc CV elevat.

2. La FABP4 circulant s'associa a la disfunció endotelial mesurada com a RHI-PAT

Els mecanismes que contribueixen a la disfunció endotelial dels pacients obesos, amb SM i DT2 no són del tot coneguts. En els darrers anys, s'ha donat importància a l'efecte de les adipoquines i altres proteïnes derivades del teixit adipós com a molècules que podien actuar efectuant la lesió vascular. Nosaltres ens hem interessat per valorar el paper que hi pot tenir la FABP4. Aquesta proteïna sintetitzada al teixit adipós presenta concentracions elevades en plasma en situacions d'alteracions metabòliques com són els pacients diabètics, obesos i amb SM. La nostra hipòtesi és que, a més d'un marcador de risc CV, la FABP4 circulant en aquests pacients podria

tenir efectes lesius causals sobre teixits perifèrics i en concret afectar la funció endotelial interferint en el correcte metabolisme de les cèl·lules endotelials.

Els nostres resultats mostren que nivells elevats circulants de FABP4 s'associen amb disfunció endotelial en pacients amb diabetis tipus 2 (DT2), el que podria reflectir un impacte directe de FABP4 sobre l'aterosclerosi subclínica en aquest grup de pacients. L'anàlisi multivariant va revelar que FABP4 plasmàtica va ser un factor independent associat amb la disfunció endotelial. A més, es va demostrar l'associació directa de FABP4 i diversos biomarcadors d'inflamació i oxidació lipídica, com la IL6, la PCR i els anticossos de les LDL oxidades en pacients amb risc CV moderat. Aquests resultats suggereixen que FABP4 podria estar implicada en el mecanisme fisiopatològic de les alteracions metabòliques que condueixen a la malaltia cardiovascular i podria considerar-se com un marcador de risc de la disfunció endotelial en l'estat de DT2.

Encara que els estudis per conèixer el paper intracel·lular de FABP4 han guanyat importància en els darrers anys, la funció de FABP4 circulant en plasma segueix sent desconeguda. Estudis dels darrers anys han demostrat que aquesta proteïna pot ser secretada pels adipòcits al medi extracel·lular en absència de dany en la cèl·lula [128]. Altres estudis van observar com FABP4 pot ser alliberada al medi procedent d'adipòcits 3T3-L1. La presència de FABP4 plasmàtica ha estat confirmada en diferents estudis i la seva concentració en circulació és comparable a la majoria d'adipoquines. Tot i així, actualment, no es coneixen les vies de secreció de la proteïna al medi extracel·lular, ja que la proteïna no conté cap senyal de secreció. En estudis previs, s'ha demostrat que FABP4 circulant és major en dones que en homes [137]. Una explicació per aquesta diferència en el gènere podria ser que el percentatge de greix en dones és superior en el teixit adipós subcutani (SAT), i en canvi, en els homes es troba augmentat en el teixit adipós visceral (VAT). Diversos estudis mostren que l'expressió de FABP4 és superior en el SAT que en VAT [123, 124, 152]. A més, d'acord amb altres estudis, les concentracions plasmàtiques de FABP4 estan clarament relacionades amb la massa de greix corporal i l'IMC, probablement perquè FABP4 s'allibera a la circulació en excés a causa de la sobreproducció durant la hipertròfia del teixit adipós [191]. S'ha observat en diversos treballs, un augment de la síntesi de FABP4 durant la maduració dels adipòcits i durant l'activació del macròfag i la seva transformació en cèl·lules escumoses [127, 133, 134]. Durant el desenvolupament de l'obesitat, s'observa hipertròfia del teixit adipós i infiltració de macròfags, tot i així, la contribució dels adipòcits i de les cèl·lules inflamatòries en la secreció de FABP4 circulant és desconeguda. A més, tampoc es coneix en humans si existeix una relació directa entre l'augment de FABP4 a nivell cel·lular i la seva

concentració elevada en circulació. Tot i així, algunes alteracions metabòliques poden estar associades amb els efectes perifèrics de l'augment de FABP4. La sobreexpressió intracel·lular d'aquesta proteïna en els adipòcits augmenta la lipòlisi per l'activació de la HSL (lipasa sensible a hormones), que indueix un alliberament d'àcids grassos lliures no esterificats (NEFA) a la sang [192]. Prèviament, hem afirmat que els nivells alts de FABP4 en DT2 estan vinculats a la dislipèmia aterògena, com a resultat de l'hiperflux de NEFA al fetge, fet que fa augmentar la secreció de les VLDL [146].

FABP4 també sembla interferir en el metabolisme de la insulina per la interacció directa amb el seu receptor en diversos tipus cel·lulars [193]. En estudis previs, es va postular que FABP4 podria ser un bon biomarcador plasmàtic de la predisposició a presentar la SM i la DT2 [142]. Per tant, una concentració plasmàtica incrementada de FABP4 podria ser considerada com un perill pels teixits perifèrics. Recentment, s'ha demostrat que els nivells de FABP4 causen dany directe als cardiomiòcits, la qual cosa podria contribuir a la disfunció miocàrdica en situacions en les que s'incrementa FABP4 [156].

Altres grups han demostrat que FABP4 s'associa amb la presència de malalties cardiovasculars i arteriosclerosi subclínica segons l'avaluació de la IMT carotídia, així com l'associació amb el volum de la placa d'ateroma avaluat per ecografia intravascular [148, 150, 151].

Els nostre estudi demostra, per primera vegada, la relació entre la concentració plasmàtica de FABP4 i una mesura de disfunció endotelial en pacients diabètics.

L'associació de FABP4 i la disfunció endotelial és un pas més en la relació entre FABP4 i les lesions arterials. Encara que els nostres resultats no poden establir una relació causal i que no existeix cap més estudi que confirmi aquests resultats, podem especular que FABP4 pot induir la disfunció endotelial de manera directa. A més, FABP4 està clarament relacionat amb l'IMC, tant en els pacients DT2 com en els no-DT2. Per tant, podria ser interpretat com que FABP4 és un marcador de dany endotelial com a factor associat amb l'obesitat. Tanmateix, els nivells alts de FABP4 es van associar amb els valors del RHI-PAT fins i tot després d'ajustar per aquesta variable de confusió.

A més, estudis recents han demostrat que FABP4 s'associa amb diversos marcadors d'inflamació com la IL6 i la PCR [151]. Els nostres resultats estan d'acord amb aquests estudis previs quan es va considerar tot el grup de pacients amb risc CV, però aquesta associació no es va mantenir en el grup de DT2.

Per altra banda, FABP4 es va associar amb els anticossos contra les LDL oxidades en pacients amb DT2. L'oxidació lipídica ha estat considerada com un inductor de la disfunció endotelial, de manera que no podem excloure una interacció entre les dues variables i l'alteració de RHI-PAT. D'altra banda, a causa de la seva estructura terciària, FABP4 pot enllaçar una àmplia gamma de molècules hidrofòbiques, entre elles els aldehids derivats de l'oxidació d'àcids grassos monoinsaturats i poliinsaturats com l'hidroxinonenal. Aquesta característica ha estat argumentada per donar suport a un possible efecte antioxidant de FABP4 a nivell cel·lular. Si aquesta capacitat està present a nivell plasmàtic és encara desconeguda. No obstant això, els anticossos contra les LDL oxidades no es van associar amb el RHI-PAT en els estudis de correlació. D'altra banda, l'associació entre FABP4 i RHI-PAT es va mantenir després d'ajustar per aquests.

Finalment, FABP4 sembla ser l'únic marcador bioquímic associat amb RHI-PAT en l'anàlisi de la regressió lineal per *stepwise*. Els nostres resultats recolzen la hipòtesi que FABP4 circulant és no només un marcador bioquímic, sinó també un generador d'efecte d'algunes de les complicacions observades en la DT2 com el dany vascular. Per tant, podria ser que FABP4 produís un efecte directe en la lesió arterial en aquests pacients. Tot i així, desconeixem per què la correlació entre FABP4 i RHI-PAT no es va observar en els pacients no diabètics. Una hipòtesi podria ser que altres factors de dany endotelial presents en la DT2 són necessaris per expressar la lesió arterial, o que nivells més alts són necessaris en els pacients no-DT2.

Cal afegir, que aquest treball presenta diverses limitacions. Es tracta d'un estudi transversal, en el qual es poden detectar correlacions, però no es poden formular prediccions. Per avaluar la rellevància clínica dels nivells plasmàtics de FABP4, són necessaris estudis prospectius. Per altra banda, l'impacte del tractament hipolipemiant i hipoglicèmic en l'associació de FABP4 i RHI-PAT no està clar. No obstant això, l'efecte, probablement, aniria en contra de la seva associació pel que reforça els nostres resultats.

En resum, hem demostrat per primera vegada que els nivells circulants de FABP4 estan associats amb la disfunció endotelial valorada amb el RHI-PAT en DT2. Si es pogués establir una relació de causalitat, determinar les concentracions plasmàtiques de FABP4 podria ser un objectiu terapèutic per tal de prevenir el dany vascular en pacients amb DT2.

3. La FABP4 té un paper causal directe sobre l'alteració de la funció de les cèl·lules endotelials *in vitro*.

A partir d'aquest punt, vam voler estudiar si es podia establir una relació de causalitat entre la presència de FABP4 plasmàtica, el dany vascular i la disfunció endotelial que ha estat detectada per RHI-PAT. Considerant aquesta hipòtesi i tenint en compte que estudis previs demostren l'efecte de FABP4 sobre la funció de les cèl·lules musculars del cor, fet que reforça la possibilitat que FABP4 pugui produir dany directe en els teixits perifèrics a nivell cel·lular [156], els nostres resultats *in vitro* proporcionen una nova evidència de l'efecte de FABP4 en la disfunció vascular i suggereixen que FABP4 podria ser un factor causal de la lesió en l'endoteli vascular.

En aquest estudi, FABP4 *in vitro* disminueix l'activació i expressió de l'enzim eNOS i augmenta l'expressió de VCAM1 i E-selectina i l'adhesió dels leucòcits a les cèl·lules vasculars, induint la disfunció en les cèl·lules endotelials. Tots aquests efectes sembla ser que podrien estar relacionats en interaccions moleculars a nivell de les cascades de senyalització depenents d'insulina. A més, FABP4 podria inhibir les MAPkinases i l'Akt.

A nivell molecular, molts estudis *in vitro* mostren que l'estimulació amb insulina de la via de senyalització IRS/Akt/eNOS activa la fosforilació d'eNOS i l'expressió del seu mRNA [25, 194]. L'efecte de la insulina produeix vasodilatació de les artèries a través de l'estimulació del seu receptor que desencadena la cascada d'activació IRS/PI3K/Akt i eNOS, activant la producció de NO el qual s'expandeix a les cèl·lules musculars llises. En el nostre treball, hem observat que les incubacions amb concentracions creixents de FABP4 amb presència i absència d'insulina, provoquen la inhibició de la fosforilació d'eNOS. Aquest resultat pot indicar que al no activar-se l'enzim eNOS, disminueix la biodisponibilitat de NO i, per tant, la vasodilatació dependent d'endoteli es veu afectada induint disfunció en les cèl·lules endotelials. Per tal de valorar la cascada de senyalització de la insulina, es va determinar el grau de fosforilació de l'Akt, proteïna que es troba "upstream" de la via. Els nostres resultats van mostrar que la FABP4 inhibia la fosforilació d'Akt, i per tant la inhibició de la via, induint la disfunció de les cèl·lules endotelials. Estudis previs demostren que la insulina activa l'expressió d'eNOS en cèl·lules endotelials [164]. Els nostres resultats mostren que a llarg temps (24 hores), FABP4 és capaç d'inhibir l'acció de la insulina disminuint l'expressió de mRNA d'eNOS. Per tant, FABP4 *in vitro* disminueix l'activació de l'enzim eNOS i disminueix la seva expressió.

Per altra banda, la insulina és capaç d'induir l'expressió de les molècules d'adhesió a través de la via de les MAPkinases [166]. Amb aquest sentit vam estudiar l'efecte de FABP4 sobre aquesta via d'activació depenent d'insulina. Els nostres resultats deteminen que FABP4 pot inhibir, de manera lleu, la fosforilació de la proteïna p44/p42 MAPK (Erk1/2). Tot i així, FABP4 va tendir a incrementar l'expressió de mRNA de l'E-selectina i va augmentar de manera significativa l'expressió de mRNA de la molècula d'adhesió VCAM1. Aquest resultat indica que FABP4 pot afavorir el procés de disfunció endotelial promovent l'expressió de les molècules d'adhesió. A més, es va estudiar si FABP4 podia efectar directament l'adhesió dels leucòcits a l'endoteli vascular. Els resultats obtinguts van mostrar que FABP4 estimula l'adhesió dels leucòcits a les cèl·lules endotelials, afavorint el procés de disfunció endotelial. Aquest fet concorda en estudis previs on es demostra que l'augment de l'adhesió de leucòcits a l'endoteli vascular estimula l'expressió de molècules d'adhesió com la VCAM1 [7].

Tots aquestes efectes de FABP4, que sembla ser, podrien estar relacionats en interaccions moleculars a nivell de les cascades de senyalització depenents d'insulina, i en la modulació de l'expressió d'eNOS, VCAM1 i E-selectina i l'adhesió dels leucòcits a les cèl·lules vasculares, induint la disfunció en les cèl·lules endotelials, confirmen la nostra hipòtesi de l'efecte directe de FABP4 en la disfunció vascular suggerint que FABP4 podria ser un factor causal de la resistència a la insulina en l'endoteli vascular.

Tenint present tots aquests resultats, hem proposat un hipotètic mecanisme pel qual FABP4 podria induir disfunció endotelial (Figura 15). Els efectes que hem observat en aquest treball en les dues vies de senyalització estudiades (Akt/eNOS i MAPK) es duen a terme a través del receptor de la insulina. Tenint en compte aquest context, estudis previs demostren la capacitat de FABP4 en fosforilar-se a nivell de Tirosina²⁰ [195] ja que FABP4 conté una seqüència de reconeixement per l'activitat tirosinaquinasa. A més, s'ha demostrat anteriorment que FABP4 és una proteïna diana del receptor de la insulina (IR) i pot ser fosforilada [193]. En l'estudi de Hresko et al, van descriure que la capacitat de FABP4 d'unir àcids grassos es veu disminuïda quan es troba fosforilada, i per tant afavoreix l'increment d'àcids grassos lliures en les cèl·lules endotelials, els quals poden danyar la via de senyalització de la insulina. Per tant, en concordança amb els nostres resultats, la FABP4 fosforilada podria danyar la via de senyalització de la insulina per l'acció dels àcids grassos lliures. A més, en un estudi previ es va demostrar que la H-FABP (la qual presenta un 62% d'homologia amb la FABP4) té la capacitat d'unió a un receptor de membrana en les cèl·lules cardíques [196].

L'excés de FABP4 circulant pot reflectir un increment de FABP4 a l'interior de la cèl·lula i interferir amb les vies de senyalització de la insulina. La FABP4 intracel·lular podria ser fosforilada pel IR. Aquesta fosforilació provocaria la disminució de les vies de senyalització de la insulina i la inhibició de l'activació de l'enzim eNOS, i en conseqüència, contribuiria a la disfunció endotelial. Per altra banda, si FABP4 es fosforilés, no podria unir els àcids grassos, els quals podrien activar el NFκB i l'expressió de les molècules d'adhesió, com VCAM1 i E-selectina, en concordança amb els resultats obtinguts. Tot i així, aquests resultats s'haurien de confirmar i sobretot estudiar com FABP4 pot internalitzar-se a través de la membrana i si un cop en el citoplasma, és fosforilada a nivell *in vitro*.

En resum, els resultats presentats mostren que FABP4 podria modular negativament l'activació de l'enzim encarregat de la producció de NO, afectant la vasodilatació arterial. FABP4 induiria disfunció endotelial inhibint l'activació d'eNOS i estimulants l'expressió de VCAM1, Eselectina i l'adhesió dels leucòcits a l'endoteli vascular. El nostre estudi suggereix que l'increment de FABP4 circulant podria tenir un impacte directe en la lesió arterial i ser una bona diana terapèutica en pacients amb SM i resistència a la insulina.

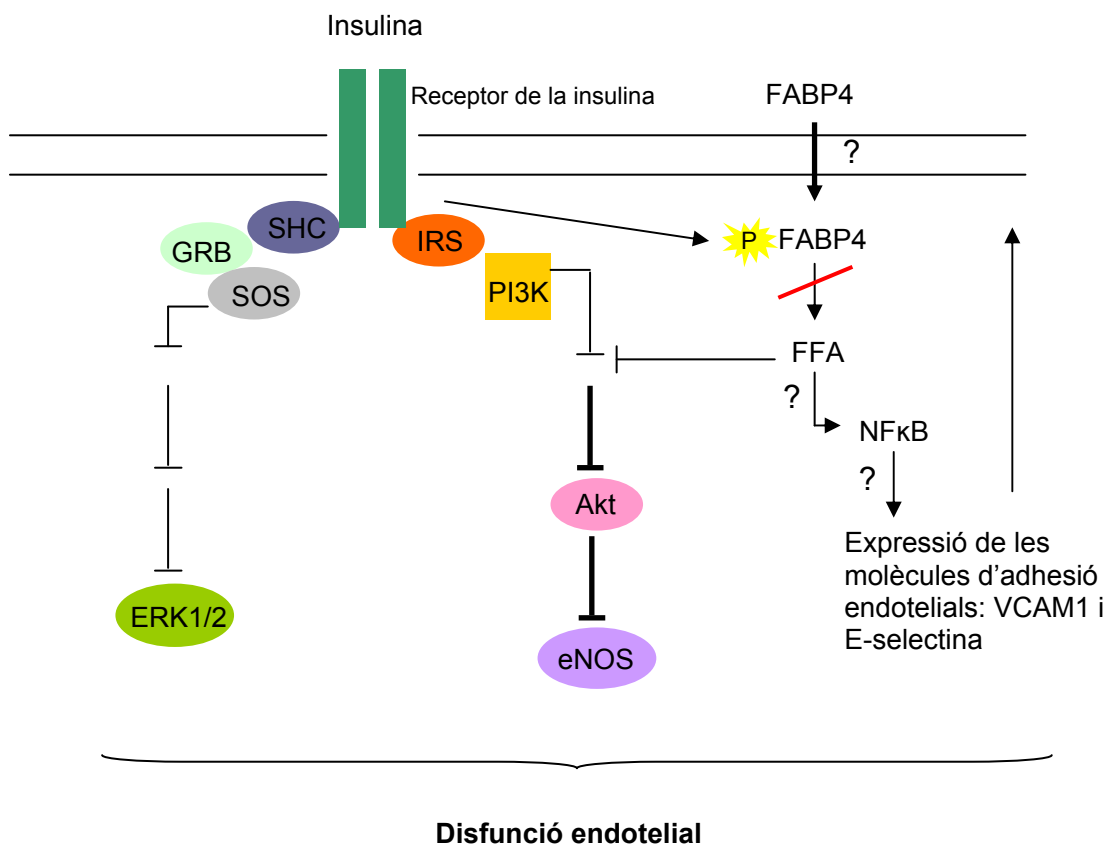


Figura 15. Model proposat de l'efecte de FABP4 en l'endoteli vascular

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FABP4 I BIOMARCADORS DE LA DISFUNCIÓ ENDOTELIAL. ESTUDI CLÍNIC I IN VITRO

Gemma Aragonès Bargalló

ISBN:978-84-693-8853-2/DL:T.1951-2010

7. Conclusions finals

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FABP4 I BIOMARCADORS DE LA DISFUNCIÓ ENDOTELIAL. ESTUDI CLÍNIC I IN VITRO

Gemma Aragonès Bargalló

ISBN:978-84-693-8853-2/DL:T.1951-2010

1. Les concentracions sèriques de sE-selectina estan associades a una pitjor funció endotelial mesurada amb tonometria arterial perifèrica en pacients amb risc CV, recolzant el paper del RHI-PAT en la valoració clínica de la funció endotelial.

- 1.1. La sE-selectina es relaciona directament amb els biomarcadors endotelials: sVCAM1, sICAM1, i les LDL oxidades en pacients amb risc CV.
- 1.2. Els pacients DT2 presenten nivells de sE-selectina augmentats respecte els no-DT2.
- 1.3. La LDL oxidada s'associa inversament amb el RHI-PAT.
- 1.4. La sE-selectina és un dels determinants del RHI-PAT juntament amb el tabac i els triglicèrids en pacients amb risc CV.

2. Els valors elevats de FABP4 estan associats amb disfunció endotelial determinada per RHI-PAT en pacients DT2.

- 2.1. La concentració plasmàtica de FABP4 és superior en els pacients DT2, respecte els no-DT2.
- 2.2. FABP4 es relaciona directament amb l'edat, l'índex de massa corporal, la IL6, la PCR i els anticossos de les LDL oxidades en els pacients amb risc CV moderat.
- 2.3. FABP4 és l'únic predictor associat al RHI-PAT en els individus DT2.

3. FABP4 indueix disfunció endotelial a nivell molecular inhibint l'activació d'eNOS a través de les cascades de senyalització dependents d'insulina en l'endoteli vascular.

- 3.1. FABP4 modula la via de senyalització dependent d'insulina (IRS-1/PI3-kinasa/Akt/eNOS) inhibint l'activació de les proteïnes Akt i eNOS.
- 3.2. FABP4 interfereix en la via de senyalització de les MAPkinases disminuint parcialment la fosforilació de la proteïna ERK1/2.
- 3.3. FABP4 disminueix l'expressió de l'eNOS, augmenta l'expressió de VCAM1 i tendeix a incrementar l'expressió d'E-selectina.
- 3.4. FABP4 estimula l'adhesió dels leucòcits a les cèl·lules endotelials.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FABP4 I BIOMARCADORS DE LA DISFUNCIÓ ENDOTELIAL. ESTUDI CLÍNIC I IN VITRO

Gemma Aragonès Bargalló

ISBN:978-84-693-8853-2/DL:T.1951-2010

8. Referències

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FABP4 I BIOMARCADORS DE LA DISFUNCIÓ ENDOTELIAL. ESTUDI CLÍNIC I IN VITRO

Gemma Aragonès Bargalló

ISBN:978-84-693-8853-2/DL:T.1951-2010

- [1] Nabel EG. Cardiovascular disease. *N Engl J Med* 2003;349:60-72.
- [2] Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000;407:233-41.
- [3] Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-26.
- [4] Banegas JR, Rodriguez-Artalejo F, Graciani A, Villar F, Herruzo R. Mortality attributable to cardiovascular risk factors in Spain. *Eur J Clin Nutr* 2003;57 Suppl 1:S18-21.
- [5] Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;352:1685-95.
- [6] Kodama T, Freeman M, Rohrer L, Zabrecky J, Matsudaira P, Krieger M. Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils. *Nature* 1990;343:531-5.
- [7] De Caterina R, Libby P. *Endothelial dysfunctions and vascular diseases*. 2007.
- [8] Bloomgarden ZT. Obesity and diabetes. *Diabetes Care* 2000;23:1584-90.
- [9] Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 1998;15:539-53.
- [10] Bloomgarden ZT. The European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* 2005;28:1250-7.
- [11] Despres JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 2006;444:881-7.
- [12] Van Gaal LF, Mertens IL, De Block CE. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature* 2006;444:875-80.
- [13] Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 2006;444:840-6.
- [14] Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, et al. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2001;24:683-9.
- [15] Paoletti R, Bolego C, Poli A, Cignarella A. Metabolic syndrome, inflammation and atherosclerosis. *Vasc Health Risk Manag* 2006;2:145-52.
- [16] Grundy SM. Metabolic syndrome scientific statement by the American Heart Association and the National Heart, Lung, and Blood Institute. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:2243-4.
- [17] Drexler H, Kastner S, Strobel A, Studer R, Brodde OE, Hasenfuss G. Expression, activity and functional significance of inducible nitric oxide synthase in the failing human heart. *J Am Coll Cardiol* 1998;32:955-63.
- [18] Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 2004;109:III27-32.

Referències

- [19] Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation* 2007;115:1285-95.
- [20] Luscher TF, Tschudi MR, Wenzel RR, Noll G. [Endothelial dysfunction and nitrogen monoxide (NO; nitric oxide)]. *Internist (Berl)* 1997;38:411-9.
- [21] Behrendt D, Ganz P. Endothelial function. From vascular biology to clinical applications. *Am J Cardiol* 2002;90:40L-8L.
- [22] Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 1999;399:601-5.
- [23] Montagnani M, Chen H, Barr VA, Quon MJ. Insulin-stimulated activation of eNOS is independent of Ca²⁺ but requires phosphorylation by Akt at Ser(1179). *J Biol Chem* 2001;276:30392-8.
- [24] Tabit CE, Chung WB, Hamburg NM, Vita JA. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: molecular mechanisms and clinical implications. *Rev Endocr Metab Disord* 2010;11:61-74.
- [25] Jansson PA. Endothelial dysfunction in insulin resistance and type 2 diabetes. *J Intern Med* 2007;262:173-83.
- [26] Mather KJ, Lteif A, Steinberg HO, Baron AD. Interactions between endothelin and nitric oxide in the regulation of vascular tone in obesity and diabetes. *Diabetes* 2004;53:2060-6.
- [27] Constans J, Conri C. Circulating markers of endothelial function in cardiovascular disease. *Clin Chim Acta* 2006;368:33-47.
- [28] Szmítko PE, Wang CH, Weisel RD, de Almeida JR, Anderson TJ, Verma S. New markers of inflammation and endothelial cell activation: Part I. *Circulation* 2003;108:1917-23.
- [29] Szmítko PE, Wang CH, Weisel RD, Jeffries GA, Anderson TJ, Verma S. Biomarkers of vascular disease linking inflammation to endothelial activation: Part II. *Circulation* 2003;108:2041-8.
- [30] Blann AD, Woywodt A, Bertolini F, et al. Circulating endothelial cells. Biomarker of vascular disease. *Thromb Haemost* 2005;93:228-35.
- [31] Ridker PM, Hennekens CH, Roitman-Johnson B, Stampfer MJ, Allen J. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet* 1998;351:88-92.
- [32] Stenvinkel P, Lindholm B, Heimbürger M, Heimbürger O. Elevated serum levels of soluble adhesion molecules predict death in pre-dialysis patients: association with malnutrition, inflammation, and cardiovascular disease. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:1624-30.

- [33] Tataru MC, Heinrich J, Junker R, et al. C-reactive protein and the severity of atherosclerosis in myocardial infarction patients with stable angina pectoris. *Eur Heart J* 2000;21:1000-8.
- [34] Malik I, Danesh J, Whincup P, et al. Soluble adhesion molecules and prediction of coronary heart disease: a prospective study and meta-analysis. *Lancet* 2001;358:971-6.
- [35] Katritsis D, Korovesis S, Giazitzoglou E, et al. C-Reactive protein concentrations and angiographic characteristics of coronary lesions. *Clin Chem* 2001;47:882-6.
- [36] Pradhan AD, Rifai N, Ridker PM. Soluble intercellular adhesion molecule-1, soluble vascular adhesion molecule-1, and the development of symptomatic peripheral arterial disease in men. *Circulation* 2002;106:820-5.
- [37] Menown IB, Mathew TP, Gracey HM, et al. Prediction of Recurrent Events by D-Dimer and Inflammatory Markers in Patients with Normal Cardiac Troponin I (PREDICT) Study. *Am Heart J* 2003;145:986-92.
- [38] Meigs JB, Hu FB, Rifai N, Manson JE. Biomarkers of endothelial dysfunction and risk of type 2 diabetes mellitus. *Jama* 2004;291:1978-86.
- [39] Thakore AH, Guo CY, Larson MG, et al. Association of multiple inflammatory markers with carotid intimal medial thickness and stenosis (from the Framingham Heart Study). *Am J Cardiol* 2007;99:1598-602.
- [40] Sakurai S, Kitamura A, Cui R, Yamagishi K, Tanigawa T, Iso H. Relationships of soluble E-selectin and high-sensitivity C-reactive protein with carotid atherosclerosis in Japanese men. *J Atheroscler Thromb* 2009;16:339-45.
- [41] Eppihimer MJ, Wolitzky B, Anderson DC, Labow MA, Granger DN. Heterogeneity of expression of E- and P-selectins in vivo. *Circ Res* 1996;79:560-9.
- [42] Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 1996;88:3259-87.
- [43] Vestweber D, Blanks JE. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev* 1999;79:181-213.
- [44] Roldan V, Marin F, Lip GY, Blann AD. Soluble E-selectin in cardiovascular disease and its risk factors. A review of the literature. *Thromb Haemost* 2003;90:1007-20.
- [45] Pigott R, Dillon LP, Hemingway IH, Gearing AJ. Soluble forms of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 are present in the supernatants of cytokine activated cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;187:584-9.

Referències

- [46] Miller MA, Sagnella GA, Kerry SM, Strazzullo P, Cook DG, Cappuccio FP. Ethnic differences in circulating soluble adhesion molecules: the Wandsworth Heart and Stroke Study. *Clin Sci (Lond)* 2003;104:591-8.
- [47] Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA, Jr., Libby P. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arterioscler Thromb* 1993;13:197-204.
- [48] Silvestro A, Brevetti G, Schiano V, Scopacasa F, Chiariello M. Adhesion molecules and cardiovascular risk in peripheral arterial disease. Soluble vascular cell adhesion molecule-1 improves risk stratification. *Thromb Haemost* 2005;93:559-63.
- [49] Silvestro A, Scopacasa F, Ruocco A, et al. Inflammatory status and endothelial function in asymptomatic and symptomatic peripheral arterial disease. *Vasc Med* 2003;8:225-32.
- [50] Tzoulaki I, Murray GD, Lee AJ, Rumley A, Lowe GD, Fowkes FG. C-reactive protein, interleukin-6, and soluble adhesion molecules as predictors of progressive peripheral atherosclerosis in the general population: Edinburgh Artery Study. *Circulation* 2005;112:976-83.
- [51] De Caterina R, Basta G, Lazzarini G, et al. Soluble vascular cell adhesion molecule-1 as a biohumoral correlate of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2646-54.
- [52] Hulthe J, Wikstrand J, Mattsson-Hultén L, Fagerberg B. Circulating ICAM-1 (intercellular cell-adhesion molecule 1) is associated with early stages of atherosclerosis development and with inflammatory cytokines in healthy 58-year-old men: the Atherosclerosis and Insulin Resistance (AIR) study. *Clin Sci (Lond)* 2002;103:123-9.
- [53] Scheffer PG, Bos G, Volwater HG, Dekker JM, Heine RJ, Teerlink T. Associations of LDL size with in vitro oxidizability and plasma levels of in vivo oxidized LDL in Type 2 diabetic patients. *Diabet Med* 2003;20:563-7.
- [54] Johnston N, Jernberg T, Lagerqvist B, Siegbahn A, Wallentin L. Improved identification of patients with coronary artery disease by the use of new lipid and lipoprotein biomarkers. *Am J Cardiol* 2006;97:640-5.
- [55] Ceriello A. Controlling oxidative stress as a novel molecular approach to protecting the vascular wall in diabetes. *Curr Opin Lipidol* 2006;17:510-8.
- [56] Hulthe J, Fagerberg B. Circulating oxidized LDL is associated with subclinical atherosclerosis development and inflammatory cytokines (AIR Study). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1162-7.

- [57] Holvoet P. Oxidized LDL and coronary heart disease. *Acta Cardiol* 2004;59:479-84.
- [58] Shimada K, Mokuno H, Matsunaga E, et al. Circulating oxidized low-density lipoprotein is an independent predictor for cardiac event in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2004;174:343-7.
- [59] Inoue T, Uchida T, Kamishirado H, Takayanagi K, Hayashi T, Morooka S. Clinical significance of antibody against oxidized low density lipoprotein in patients with atherosclerotic coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:775-9.
- [60] Piarulli F, Lapolla A, Sartore G, et al. Autoantibodies against oxidized LDLs and atherosclerosis in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2005;28:653-7.
- [61] Gounopoulos P, Merki E, Hansen LF, Choi SH, Tsimikas S. Antibodies to oxidized low density lipoprotein: epidemiological studies and potential clinical applications in cardiovascular disease. *Minerva Cardioangiol* 2007;55:821-37.
- [62] Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 2004;145:2273-82.
- [63] Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res* 2005;96:939-49.
- [64] Yudkin JS, Kumari M, Humphries SE, Mohamed-Ali V. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis* 2000;148:209-14.
- [65] Min JK, Kim YM, Kim SW, et al. TNF-related activation-induced cytokine enhances leukocyte adhesiveness: induction of ICAM-1 and VCAM-1 via TNF receptor-associated factor and protein kinase C-dependent NF-kappaB activation in endothelial cells. *J Immunol* 2005;175:531-40.
- [66] Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 2004;92:347-55.
- [67] Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:911-9; quiz 20.
- [68] Anderson HD, Rahmutula D, Gardner DG. Tumor necrosis factor-alpha inhibits endothelial nitric-oxide synthase gene promoter activity in bovine aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 2004;279:963-9.
- [69] Ridker PM, Haughie P. Prospective studies of C-reactive protein as a risk factor for cardiovascular disease. *J Investig Med* 1998;46:391-5.

Referències

- [70] Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med* 2002;347:1557-65.
- [71] Verma S, Wang CH, Li SH, et al. A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation* 2002;106:913-9.
- [72] Kim JA, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation* 2006;113:1888-904.
- [73] Vlahos CJ, McDowell SA, Clerk A. Kinases as therapeutic targets for heart failure. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2:99-113.
- [74] Hanada M, Feng J, Hemmings BA. Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target. *Biochim Biophys Acta* 2004;1697:3-16.
- [75] Oudit GY, Sun H, Kerfant BG, Crackower MA, Penninger JM, Backx PH. The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. *J Mol Cell Cardiol* 2004;37:449-71.
- [76] Symons JD, McMillin SL, Riehle C, et al. Contribution of insulin and Akt1 signaling to endothelial nitric oxide synthase in the regulation of endothelial function and blood pressure. *Circ Res* 2009;104:1085-94.
- [77] Kawakami A, Osaka M, Tani M, et al. Apolipoprotein CIII links hyperlipidemia with vascular endothelial cell dysfunction. *Circulation* 2008;118:731-42.
- [78] Mineo C, Shaul PW. Modulation of endothelial NO production by high-density lipoprotein. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2002;67:459-69.
- [79] Wang XL, Zhang L, Youker K, et al. Free fatty acids inhibit insulin signaling-stimulated endothelial nitric oxide synthase activation through upregulating PTEN or inhibiting Akt kinase. *Diabetes* 2006;55:2301-10.
- [80] Garrington TP, Johnson GL. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1999;11:211-8.
- [81] Fulton DJ. Mechanisms of vascular insulin resistance: a substitute Akt? *Circ Res* 2009;104:1035-7.
- [82] Bakker W, Eringa EC, Sipkema P, van Hinsbergh VW. Endothelial dysfunction and diabetes: roles of hyperglycemia, impaired insulin signaling and obesity. *Cell Tissue Res* 2009;335:165-89.
- [83] Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 2002;23:599-622.

- [84] Li X, Commane M, Jiang Z, Stark GR. IL-1-induced NFkappa B and c-Jun N-terminal kinase (JNK) activation diverge at IL-1 receptor-associated kinase (IRAK). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:4461-5.
- [85] Comin E, Solanas P, Cabezas C, et al. [Estimating cardiovascular risk in Spain using different algorithms]. *Rev Esp Cardiol* 2007;60:693-702.
- [86] Bonetti PO, Barsness GW, Keelan PC, et al. Enhanced external counterpulsation improves endothelial function in patients with symptomatic coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:1761-8.
- [87] Bonetti PO, Pumper GM, Higano ST, Holmes DR, Jr., Kuvin JT, Lerman A. Noninvasive identification of patients with early coronary atherosclerosis by assessment of digital reactive hyperemia. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:2137-41.
- [88] Wang TJ, Gona P, Larson MG, et al. Multiple biomarkers for the prediction of first major cardiovascular events and death. *N Engl J Med* 2006;355:2631-9.
- [89] Moens AL, Goovaerts I, Claeys MJ, Vrints CJ. Flow-mediated vasodilation: a diagnostic instrument, or an experimental tool? *Chest* 2005;127:2254-63.
- [90] Yeboah J, Burke GL, Crouse JR, Herrington DM. Relationship between brachial flow-mediated dilation and carotid intima-media thickness in an elderly cohort: the Cardiovascular Health Study. *Atherosclerosis* 2008;197:840-5.
- [91] Yeboah J, Crouse JR, Hsu FC, Burke GL, Herrington DM. Brachial flow-mediated dilation predicts incident cardiovascular events in older adults: the Cardiovascular Health Study. *Circulation* 2007;115:2390-7.
- [92] Yeboah J, Sutton-Tyrrell K, McBurnie MA, Burke GL, Herrington DM, Crouse JR. Association between brachial artery reactivity and cardiovascular disease status in an elderly cohort: the cardiovascular health study. *Atherosclerosis* 2008;197:768-76.
- [93] Kuvin JT, Mammen A, Mooney P, Alsheikh-Ali AA, Karas RH. Assessment of peripheral vascular endothelial function in the ambulatory setting. *Vasc Med* 2007;12:13-6.
- [94] Kuvin JT, Patel AR, Sliney KA, et al. Assessment of peripheral vascular endothelial function with finger arterial pulse wave amplitude. *Am Heart J* 2003;146:168-74.
- [95] Haller MJ, Stein J, Shuster J, et al. Peripheral artery tonometry demonstrates altered endothelial function in children with type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes* 2007;8:193-8.
- [96] Nohria A, Gerhard-Herman M, Creager MA, Hurley S, Mitra D, Ganz P. Role of nitric oxide in the regulation of digital pulse volume amplitude in humans. *J Appl Physiol* 2006;101:545-8.

Referències

- [97] Hamburg NM, Benjamin EJ. Assessment of endothelial function using digital pulse amplitude tonometry. *Trends Cardiovasc Med* 2009;19:6-11.
- [98] Hamburg NM, Keyes MJ, Larson MG, et al. Cross-sectional relations of digital vascular function to cardiovascular risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation* 2008;117:2467-74.
- [99] Rubinshtein R, Kuvin JT, Soffler M, et al. Assessment of endothelial function by non-invasive peripheral arterial tonometry predicts late cardiovascular adverse events. *Eur Heart J* 2010;31:1142-8.
- [100] Coll B, Aragonés G, Parra S, Alonso-Villaverde C, Masana L. Ezetimibe effectively decreases LDL-cholesterol in HIV-infected patients. *Aids* 2006;20:1675-7.
- [101] Ferré R, Plana N, Merino J, et al. Effects of therapeutic lifestyle changes on peripheral artery tonometry in patients with abdominal obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2010 *in press*.
- [102] Aversa A, Vitale C, Volterrani M, et al. Chronic administration of Sildenafil improves markers of endothelial function in men with Type 2 diabetes. *Diabet Med* 2008;25:37-44.
- [103] Dhindsa M, Sommerlad SM, DeVan AE, et al. Interrelationships among noninvasive measures of postischemic macro- and microvascular reactivity. *J Appl Physiol* 2008;105:427-32.
- [104] Matsuzawa Y, Sugiyama S, Sugamura K, et al. Digital assessment of endothelial function and ischemic heart disease in women. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:1688-96.
- [105] O'Leary DH, Polak JF, Kronmal RA, Manolio TA, Burke GL, Wolfson SK, Jr. Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. *N Engl J Med* 1999;340:14-22.
- [106] Stein JH, Korcarz CE, Hurst RT, et al. Use of carotid ultrasound to identify subclinical vascular disease and evaluate cardiovascular disease risk: a consensus statement from the American Society of Echocardiography Carotid Intima-Media Thickness Task Force. Endorsed by the Society for Vascular Medicine. *J Am Soc Echocardiogr* 2008;21:93-111; quiz 89-90.
- [107] Balk EM, Karas RH, Jordan HS, Kupelnick B, Chew P, Lau J. Effects of statins on vascular structure and function: a systematic review. *Am J Med* 2004;117:775-90.
- [108] Naghavi M, Falk E, Hecht HS, Shah PK. The first SHAPE (Screening for Heart Attack Prevention and Education) guideline. *Crit Pathw Cardiol* 2006;5:187-90.

- [109] Wattanakit K, Folsom AR, Duprez DA, Weatherley BD, Hirsch AT. Clinical significance of a high ankle-brachial index: insights from the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Atherosclerosis* 2007;190:459-64.
- [110] Suarez C, Manzano L, Mostaza J, et al. [Prevalence of peripheral artery disease evaluated by ankle brachial index in patients with metabolic syndrome. MERITO I study]. *Rev Clin Esp* 2007;207:228-33.
- [111] Manzano L, Mostaza JM, Suarez C, et al. [Value of the ankle-brachial index in cardiovascular risk stratification of patients without known atherotrombotic disease. MERITO study]. *Med Clin (Barc)* 2007;128:241-6.
- [112] 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.
- [113] Boord JB, Fazio S, Linton MF. Cytoplasmic fatty acid-binding proteins: emerging roles in metabolism and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2002;13:141-7.
- [114] Zimmerman AW, Veerkamp JH. New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins. *Cell Mol Life Sci* 2002;59:1096-116.
- [115] 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.
- [116] Chmurzynska A. The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism. *J Appl Genet* 2006;47:39-48.
- [117] Makowski L, Boord JB, Maeda K, et al. Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis. *Nat Med* 2001;7:699-705.
- [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 I κ B kinase activities. *J Biol Chem* 2005;280:12888-95.
- [119] Tan NS, Shaw NS, Vinckenbosch N, et al. Selective cooperation between fatty acid binding proteins and peroxisome proliferator-activated receptors in regulating transcription. *Mol Cell Biol* 2002;22:5114-27.
- [120] Hertz AV, Bernlohr DA. The mammalian fatty acid-binding protein multigene family: molecular and genetic insights into function. *Trends Endocrinol Metab* 2000;11:175-80.

Referències

- [121] Boord JB, Maeda K, Makowski L, et al. Adipocyte fatty acid-binding protein, aP2, alters late atherosclerotic lesion formation in severe hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1686-91.
- [122] Storch J, McDermott L. Structural and functional analysis of fatty acid-binding proteins. *J Lipid Res* 2009;50 Suppl:S126-31.
- [123] Fisher RM, Eriksson P, Hoffstedt J, et al. Fatty acid binding protein expression in different adipose tissue depots from lean and obese individuals. *Diabetologia* 2001;44:1268-73.
- [124] 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.
- [125] Elmasri H, Karaaslan C, Teper Y, et al. Fatty acid binding protein 4 is a target of VEGF and a regulator of cell proliferation in endothelial cells. *Faseb J* 2009;23:3865-73.
- [126] 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.
- [127] Fu Y, Luo L, Luo N, Garvey WT. Lipid metabolism mediated by adipocyte lipid binding protein (ALBP/aP2) gene expression in human THP-1 macrophages. *Atherosclerosis* 2006;188:102-11.
- [128] Xu A, Wang Y, Xu JY, et al. Adipocyte fatty acid-binding protein is a plasma biomarker closely associated with obesity and metabolic syndrome. *Clin Chem* 2006;52:405-13.
- [129] 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.
- [130] Coll B, Cabre A, Alonso-Villaverde C, et al. The fatty acid binding protein-4 (FABP4) is a strong biomarker of metabolic syndrome and lipodystrophy in HIV-infected patients. *Atherosclerosis* 2008;199:147-53.
- [131] Scheja L, Makowski L, Uysal KT, et al. Altered insulin secretion associated with reduced lipolytic efficiency in aP2^{-/-} mice. *Diabetes* 1999;48:1987-94.
- [132] Baar RA, Dingfelder CS, Smith LA, et al. Investigation of in vivo fatty acid metabolism in AFABP/aP2^(-/-) mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005;288:E187-93.

- [133] Fu Y, Luo N, Lopes-Virella MF. Oxidized LDL induces the expression of ALBP/aP2 mRNA and protein in human THP-1 macrophages. *J Lipid Res* 2000;41:2017-23.
- [134] 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.
- [135] Kletzien RF, Foellmi LA, Harris PK, Wyse BM, Clarke SD. Adipocyte fatty acid-binding protein: regulation of gene expression in vivo and in vitro by an insulin-sensitizing agent. *Mol Pharmacol* 1992;42:558-62.
- [136] Perera RJ, Marcusson EG, Koo S, et al. Identification of novel PPARgamma target genes in primary human adipocytes. *Gene* 2006;369:90-9.
- [137] Cabre A, Lazaro I, Girona J, et al. Fatty acid binding protein 4 is increased in metabolic syndrome and with thiazolidinedione treatment in diabetic patients. *Atherosclerosis* 2007;195:e150-8.
- [138] Schachtrup C, Emmeler T, Bleck B, Sandqvist A, Spener F. Functional analysis of peroxisome-proliferator-responsive element motifs in genes of fatty acid-binding proteins. *Biochem J* 2004;382:239-45.
- [139] Pelton PD, Zhou L, Demarest KT, Burriss TP. PPARgamma activation induces the expression of the adipocyte fatty acid binding protein gene in human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;261:456-8.
- [140] Llaverias G, Noe V, Penuelas S, et al. Atorvastatin reduces CD68, FABP4, and HBP expression in oxLDL-treated human macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;318:265-74.
- [141] Xu A, Tso AW, Cheung BM, et al. Circulating adipocyte-fatty acid binding protein levels predict the development of the metabolic syndrome: a 5-year prospective study. *Circulation* 2007;115:1537-43.
- [142] Tso AW, Xu A, Sham PC, et al. Serum adipocyte fatty acid binding protein as a new biomarker predicting the development of type 2 diabetes: a 10-year prospective study in a Chinese cohort. *Diabetes Care* 2007;30:2667-72.
- [143] 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.
- [144] Cabre A, Lazaro I, Cofan M, et al. FABP4 plasma levels are increased in familial combined hyperlipidemia. *J Lipid Res* 2009.
- [145] Cabre A, Lazaro I, Girona J, et al. Plasma fatty acid-binding protein 4 increases with renal dysfunction in type 2 diabetic patients without microalbuminuria. *Clin Chem* 2008;54:181-7.

Referències

- [146] Cabre A, Lazaro I, Girona J, et al. Plasma fatty acid binding protein 4 is associated with atherogenic dyslipidemia in diabetes. *J Lipid Res* 2008;49:1746-51.
- [147] 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.
- [148] Rhee EJ, Lee WY, Park CY, et al. The association of serum adipocyte fatty acid-binding protein with coronary artery disease in Korean adults. *Eur J Endocrinol* 2009;160:165-72.
- [149] Khalyfa A, Bhushan B, Hegazi M, et al. Fatty-acid binding protein 4 gene variants and childhood obesity: potential implications for insulin sensitivity and CRP levels. *Lipids Health Dis* 2010;9:18.
- [150] Yeung DC, Xu A, Cheung CW, et al. Serum adipocyte fatty acid-binding protein levels were independently associated with carotid atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:1796-802.
- [151] Miyoshi T, Onoue G, Hirohata A, et al. Serum adipocyte fatty acid-binding protein is independently associated with coronary atherosclerotic burden measured by intravascular ultrasound. *Atherosclerosis* 2010.
- [152] Fischer H, Gustafsson T, Sundberg CJ, et al. Fatty acid binding protein 4 in human skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;346:125-30.
- [153] 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.
- [154] Haider DG, Schindler K, Prager G, et al. Serum retinol-binding protein 4 is reduced after weight loss in morbidly obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:1168-71.
- [155] Karpisek M, Stejskal D, Kotolova H, et al. Treatment with atorvastatin reduces serum adipocyte-fatty acid binding protein value in patients with hyperlipidaemia. *Eur J Clin Invest* 2007;37:637-42.
- [156] Lamounier-Zepter V, Look C, Alvarez J, et al. Adipocyte fatty acid-binding protein suppresses cardiomyocyte contraction: a new link between obesity and heart disease. *Circ Res* 2009;105:326-34.
- [157] Furuhashi M, Tuncman G, Gorgun CZ, et al. Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2. *Nature* 2007;447:959-65.
- [158] Koh JH, Shin YG, Nam SM, Lee MY, Chung CH, Shin JY. Serum adipocyte fatty acid-binding protein levels are associated with nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2009;32:147-52.

- [159] Yeung DC, Xu A, Tso AW, 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.
- [160] Zecchin HG, Priviero FB, Souza CT, et al. Defective insulin and acetylcholine induction of endothelial cell-nitric oxide synthase through insulin receptor substrate/Akt signaling pathway in aorta of obese rats. *Diabetes* 2007;56:1014-24.
- [161] Roy S, Sen CK, Kobuchi H, Packer L. Antioxidant regulation of phorbol ester-induced adhesion of human Jurkat T-cells to endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 1998;25:229-41.
- [162] Sen CK, Bagchi D. Regulation of inducible adhesion molecule expression in human endothelial cells by grape seed proanthocyanidin extract. *Mol Cell Biochem* 2001;216:1-7.
- [163] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
- [164] Kuboki K, Jiang ZY, Takahara N, et al. Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo : a specific vascular action of insulin. *Circulation* 2000;101:676-81.
- [165] Yoshizumi M, Perrella MA, Burnett JC, Jr., Lee ME. Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. *Circ Res* 1993;73:205-9.
- [166] Madonna R, Massaro M, De Caterina R. Insulin potentiates cytokine-induced VCAM-1 expression in human endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 2008;1782:511-6.
- [167] Mahmud FH, Earing MG, Lee RA, Lteif AN, Driscoll DJ, Lerman A. Altered endothelial function in asymptomatic male adolescents with type 1 diabetes. *Congenit Heart Dis* 2006;1:98-103.
- [168] Coffman JD. Effects of endothelium-derived nitric oxide on skin and digital blood flow in humans. *Am J Physiol* 1994;267:H2087-90.
- [169] Noon JP, Haynes WG, Webb DJ, Shore AC. Local inhibition of nitric oxide generation in man reduces blood flow in finger pulp but not in hand dorsum skin. *J Physiol* 1996;490 (Pt 2):501-8.
- [170] Baumbach GL, Siems JE, Heistad DD. Effects of local reduction in pressure on distensibility and composition of cerebral arterioles. *Circ Res* 1991;68:338-51.
- [171] Christensen KL. Reducing pulse pressure in hypertension may normalize small artery structure. *Hypertension* 1991;18:722-7.

Referències

- [172] James MA, Watt PA, Potter JF, Thurston H, Swales JD. Pulse pressure and resistance artery structure in the elderly. *Hypertension* 1995;26:301-6.
- [173] Caballero AE, Arora S, Saouaf R, et al. Microvascular and macrovascular reactivity is reduced in subjects at risk for type 2 diabetes. *Diabetes* 1999;48:1856-62.
- [174] de Jongh RT, Serne EH, RG IJ, de Vries G, Stehouwer CD. Impaired microvascular function in obesity: implications for obesity-associated microangiopathy, hypertension, and insulin resistance. *Circulation* 2004;109:2529-35.
- [175] Serne EH, Stehouwer CD, ter Maaten JC, et al. Microvascular function relates to insulin sensitivity and blood pressure in normal subjects. *Circulation* 1999;99:896-902.
- [176] Shimabukuro M, Higa N, Asahi T, et al. Hypoadiponectinemia is closely linked to endothelial dysfunction in man. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:3236-40.
- [177] Hayoz D, Weber R, Rutschmann B, et al. Postischemic blood flow response in hypercholesterolemic patients. *Hypertension* 1995;26:497-502.
- [178] Binggeli C, Spieker LE, Corti R, et al. Statins enhance postischemic hyperemia in the skin circulation of hypercholesterolemic patients: a monitoring test of endothelial dysfunction for clinical practice? *J Am Coll Cardiol* 2003;42:71-7.
- [179] Mitchell GF. Pulse pressure, arterial compliance and cardiovascular morbidity and mortality. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1999;8:335-42.
- [180] Mitchell GF, Parise H, Vita JA, et al. Local shear stress and brachial artery flow-mediated dilation: the Framingham Heart Study. *Hypertension* 2004;44:134-9.
- [181] Gimbrone MA, Jr., Bevilacqua MP, Cybulsky MI. Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte adhesion in inflammation and atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 1990;598:77-85.
- [182] Wagner OF, Jilma B. Putative role of adhesion molecules in metabolic disorders. *Horm Metab Res* 1997;29:627-30.
- [183] Vita JA, Keaney JF, Jr. Endothelial function: a barometer for cardiovascular risk? *Circulation* 2002;106:640-2.
- [184] Vita JA, Keaney JF, Jr., Larson MG, et al. Brachial artery vasodilator function and systemic inflammation in the Framingham Offspring Study. *Circulation* 2004;110:3604-9.
- [185] Eschen O, Christensen JH, Dethlefsen C, Schmidt EB. Cellular Adhesion Molecules in Healthy Subjects: Short Term Variations and Relations to Flow Mediated Dilation. *Biomark Insights* 2008;3:57-62.

- [186] Nawawi H, Osman NS, Annuar R, Khalid BA, Yusoff K. Soluble intercellular adhesion molecule-1 and interleukin-6 levels reflect endothelial dysfunction in patients with primary hypercholesterolaemia treated with atorvastatin. *Atherosclerosis* 2003;169:283-91.
- [187] Witte DR, Broekmans WM, Kardinaal AF, et al. Soluble intercellular adhesion molecule 1 and flow-mediated dilatation are related to the estimated risk of coronary heart disease independently from each other. *Atherosclerosis* 2003;170:147-53.
- [188] Holmlund A, Hulthe J, Millgard J, Sarabi M, Kahan T, Lind L. Soluble intercellular adhesion molecule-1 is related to endothelial vasodilatory function in healthy individuals. *Atherosclerosis* 2002;165:271-6.
- [189] Sibal L, Aldibbiat A, Agarwal SC, et al. Circulating endothelial progenitor cells, endothelial function, carotid intima-media thickness and circulating markers of endothelial dysfunction in people with type 1 diabetes without macrovascular disease or microalbuminuria. *Diabetologia* 2009;52:1464-73.
- [190] Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 2004;364:937-52.
- [191] Boizard M, Le Liepvre X, Lemarchand P, Foufelle F, Ferre P, Dugail I. Obesity-related overexpression of fatty-acid synthase gene in adipose tissue involves sterol regulatory element-binding protein transcription factors. *J Biol Chem* 1998;273:29164-71.
- [192] 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.
- [193] Nielsen SU, Spener F. Fatty acid-binding protein from rat heart is phosphorylated on Tyr19 in response to insulin stimulation. *J Lipid Res* 1993;34:1355-66.
- [194] Kukreja RC, Xi L. eNOS phosphorylation: a pivotal molecular switch in vasodilation and cardioprotection? *J Mol Cell Cardiol* 2007;42:280-2.
- [195] 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.
- [196] Burton PB, Hogben CE, Joannou CL, et al. Heart fatty acid binding protein is a novel regulator of cardiac myocyte hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;205:1822-8.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FABP4 I BIOMARCADORS DE LA DISFUNCIÓ ENDOTELIAL. ESTUDI CLÍNIC I IN VITRO

Gemma Aragonès Bargalló

ISBN:978-84-693-8853-2/DL:T.1951-2010

9. Annex I

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FABP4 I BIOMARCADORS DE LA DISFUNCIÓ ENDOTELIAL. ESTUDI CLÍNIC I IN VITRO

Gemma Aragonès Bargalló

ISBN:978-84-693-8853-2/DL:T.1951-2010

FULL D'INFORMACIÓ AL PARTICIPANT.

Model:

Naturalesa del projecte

El projecte d'investigació pel qual li demanem la seva participació té per títol "**APLICACIÓ CLÍNICA DEL MESURAMENT DE LA FUNCIÓ ENDOTELIAL MITJANÇANT LA TONOMETRIA ARTERIAL PERIFÈRICA.**"

L'objectiu de l'estudi és determinar la utilitat clínica d'un nou mètode de **Tonometria Arterial Perifèrica (PAT)**. Aquest mètode permet el mesurament de la funció endotelial per determinar el risc cardiovascular de pacients catalogats com de risc intermedi/alt segons els mètodes clàssics. La tonometria arterial perifèrica és un mètode no invasiu que permet detectar l'arterioesclerosi en la seva fase més inicial. Es preveu que l'estudi durarà dos anys.

Els investigadors responsables d'aquest estudi pertanyen al Servei de Medicina Interna de l'Hospital Universitari Sant Joan de Reus.

Procediments

La participació en l'estudi consisteix en:

- Permetre que els investigadors puguin conèixer i treballar amb dades com el diagnòstic, l'edat, l'evolució de la malaltia, etc.
- Mesurament de la Funció Endotelial.
- Realització d'una ecografia d'artèries caròtides.
- Mesurament de l'índex turmell-braç.
- Permetre que li practiquin una extracció de sang en dejú, per l'anàlisi de diferents components de lípids i per la creació d'una col·lecció de mostres biològiques (plasma, sèrum i ADN).

Totes les dades recollides per la investigació es guarden informatitzades en uns fitxers especialment dissenyats per la investigació i en ells no apareix ni el seu nom ni cap altre dada que pugui identificar-lo.

Les mostres de sang són processades per separar el plasma de les cèl·lules. El plasma se guarda congelat per les anàlisis bioquímiques. De les cèl·lules sanguínies s'extrau el material genètic (l'ADN) amb el que es faran les anàlisis genètiques.

Part del plasma i de l'ADN de la seva mostra es dipositarà congelat en el banc de mostres del nostre centre per anàlisis futurs amb el mateix objectiu. Aquest material podrà ser compartit amb altres grups d'investigació, tant de centres públics com d'empreses privades, procediment que sempre se farà sota les normes de seguretat i confidencialitat necessàries.

Beneficis i riscos

El benefici de l'estudi és profunditzar en el coneixement de la malaltia amb la finalitat de millorar la detecció, el diagnòstic, el tractament i les seves conseqüències. A curt termini no es preveu que els resultats obtinguts en l'estudi puguin beneficiar directament al participant, sinó que seran uns resultats que beneficiaran a la població en general.

Vostè com a participant no rebrà cap compensació econòmica.

L'estudi no suposa cap risc que no sigui el derivat de l'extracció de sang.

Garantia de participació voluntària

Els investigadors li garantim que sigui quina sigui la seva decisió respecte a la participació en el projecte, la seva atenció sanitària per part del personal de l'hospital no es veurà afectada. A més a més en el cas de que vostè accepti participar, ha de saber que es pot retirar en qualsevol moment sense haver de donar explicacions i, en aquest cas, la seva mostra seria retirada del banc de mostres i les seves dades dels fitxers informàtics.

Confidencialitat

L'hospital i els investigadors es responsabilitzen de què en tot moment es mantingui la confidencialitat respecte a la identificació i les dades del participant. El nom i les dades que permetran identificar el pacient només consten en la història clínica. Els investigadors utilitzen codis d'identificació sense conèixer el nom de la persona a la qual pertany la mostra. Aquests procediments estan subjectes al què disposa la Llei Orgànica 15/1999 del 13 de desembre de protecció de dades de caràcter personal.

Preguntes

Arribat aquest moment li donem l'oportunitat de què, sinó ho ha fet abans, faci preguntes. Li respondrem el millor que podem.

CONSENTIMENT INFORMAT.

Model:

El/La...Dr/Dra.....

informa al pacient o representant legal (familiar de referència o tutor) Sr./Sra.
..... de l'existència d'un projecte
d'investigació i es demana la seva participació.

“APLICACIÓ CLÍNICA DEL MESURAMENT DE LA FUNCIÓ ENDOTELIAL MITJANÇANT TONOMETRIA ARTERIAL PERIFÈRICA ”

L'estudi de la paret arterial mitjançant mètodes no invasius, s'està consolidant en l'abordatge de malalties relacionades amb l'arteriosclerosi. La funció endotelial és la primera alteració de la paret arterial que s'observa en el desenvolupament de la arteriosclerosi. En aquest projecte es vol estudiar si aquest mètode pot ser utilitzat en la pràctica clínica habitual. Determinar la seva correlació amb altres tècniques habituals, en el diagnòstic subclínic de l'arteriosclerosi com és la mesura del gruix *intima-mitja* (IMT) en artèries caròtides, determinació de l'índex turmell-braç en pacients amb risc cardiovascular intermedi o alt i en població sana sense cap factor de risc cardiovascular.

Un dels objectius d'aquest projecte és conèixer la correlació entre els marcadors bioquímics presents en la sang amb la funció endotelial determinada mitjançant aquesta nova tècnica.

Per això convidarem a participar a pacients amb risc cardiovascular global intermedi que segueixen controls clínics en el nostre centre i a població sana sense cap factor de risc cardiovascular. És un estudi observacional, en el qual el pacient acut un dia a l'Hospital per: realització d'ecografia d'artèries caròtides, càlcul de l'índex turmell-braç i determinació de funció endotelial mitjançant la tonometria arterial perifèrica. Es realitzarà una extracció de sang venosa per la posterior mesura de lipoproteïnes, marcadors bioquímics de funció endotelial. Tanmateix considerem d'interès disposar de col·lecció de mostres biològiques d'aquests pacients i d'individus sans, per tant es procedirà, en la mateixa extracció, a l'obtenció de mostres per al BIOBANC.

La participació és voluntària. Els mètodes utilitzats (adquisició de bases de dades, imatges, etc.), estan unificats en el nostre centre hospitalari, així com el software d'anàlisi d'imatge. Aquest estudi proporcionarà noves dades que creiem seran d'utilitat clínica en el maneig del pacient amb risc cardiovascular.

L'equip investigador garanteix la confidencialitat respecte a la identitat del participant i per altra banda, garanteix que la mostra i els resultats derivats de la investigació seran utilitzats per a finalitats descrites i no altres.

He estat informat de la naturalesa de l'estudi que se resumeix en aquest full, he pogut fer preguntes per aclarir els meus dubtes i finalment he pres la decisió de participar, sabent que la decisió no afecta la meva atenció terapèutica en el centre i que em puc retirar en qualsevol moment.

| | Nom i cognoms | Data | Firma |
|------------------|---------------|------|-------|
| Pacient | | | |
| Familiar o tutor | | | |
| Informant | | | |

10. Annex II



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FABP4 I BIOMARCADORS DE LA DISFUNCIÓ ENDOTELIAL. ESTUDI CLÍNIC I IN VITRO

Gemma Aragonès Bargalló

ISBN:978-84-693-8853-2/DL:T.1951-2010

10.1. PNT de la detecció de les LDL oxidades per ELISA

| | | | |
|---|---|---|------------------|
|  UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI | |  | |
| Procediment Normalitzat de Treball Metodològic | | | |
| ELISA oxLDL | | | |
| PNT-PO0703-URLA-06 | | Revisió: 00 | Data: 24-07-2008 |
| 1. Fonament i objectiu | | | |
| <p>Fonament: Es basa en la determinació de LDL oxidada mitjançant un ELISA tipus “sandwich”, on les LDL oxidades de la mostra s'uneixen a l'anticòs mAb-4E6 que hi ha unit als pouets de la placa d'ELISA. Mitjançant un altre anticòs marcat amb un enzim i el substrat d'aquest enzim, es detecta la unió LDL-anticòs i afegint un àcid permet la seva lectura espectrofotomètrica.</p> <p>Objectiu: Determinar de forma quantitativa les LDL oxidades en mostres de plasma-EDTA, plasma-heparina o sèrum.</p> <p>La LDL (lipoproteïna de baixa densitat) nativa es torna aterogènica quan s'oxida. La LDL oxidada està involucrada en la iniciació i progressió de la lesió arterioscleròtica, ja que és fagocitada per macròfags induint així l'acumulació de colesterol en els macròfags i transformant-los en cèl·lules escumoses. Els nivells de LDL oxidada en plasma són significativament elevats en pacients amb malaltia coronària. Així, sembla que els nivells circulants de LDL oxidada són marcadors d'arteriosclerosi coronària.</p> | | | |
| 2. Espècimen | | | |
| Plasma-EDTA (recomanat), plasma-heparina o sèrum. | | | |
| 3. Documentació relacionada | | | |
| Manual del kit Oxidized LDL ELISA. | | | |
| 4. Definicions | | | |
| | | | |
| 5. Historial de revisions | | | |
| | | | |
| Modificacions efectuades | No de Revisió | Data | |
| | | | |
| | | | |
| 6. Solucions, reactius i materials | | | |
| Kit comercial Oxidized LDL ELISA de Mercodia, Ref: 10-1143-01 | | | |
| Aigua MilliQ | | | |
| <i>Estabilitat dels reactius reconstituïts i oberts</i> | | | |
| Calibradors | 1 setmana a 2-8 °C | | |
| Controls (L), (H) | 1 setmana a 2-8 °C | | |
| Wash Buffer | 1 mes a 2-8 °C | | |
| Sample Buffer | 1 mes a 2-8 °C | | |
| Placa recoberta, tires no utilitzades | 2 mesos a 2-8 °C (tornar a segellar la bossa) | | |
| Enzyme Conjugate | 1 mes a 2-8 °C | | |
| Material | Capacitat | Tractament Previ | Observacions |
| Pipetes multicanal | 100µl | | |
| Pipetes dispensadores | 10 a 1000 µL | | |

Annex II

| Tubs d'assaig amb tap | 3,5 mL | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|--------------------|----------------|----------------|--------------|---|--------------------|-------|--|--|---------------|---------|--------------|---|--------------------|-------|--|--|---------------|---------|----------------|
| 7. Instrumentació i equips: | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Equip | Ubicació | Núm. Inventari | Núm. PNT-EE | Observacions | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Rentador de plaques d'ELISA | Laboratori 2. URL | 085881 | 54 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Lector de plaques d'ELISA (450 nm) | Laboratori 2. URL | 012592 | 57 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Agitador orbital | Laboratori 1. URL | 003559 | 74 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Vórtex | Laboratori 2. URL | 012483 | 32 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8. Precaucions | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>El valor de concentració obtingut dels controls en cada prova es registrarà i es tindrà en compte.</p> <p>La concentració del calibrador pot variar en cada Lot.</p> <p>La solució de STOP conté àcid. Manipular-la amb precaució.</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9. Procediment | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p><u>9.1. Preparació del Enzyme Conjugate:</u> Diluir el Enzyme Conjugate 11x (1,2 mL) afegint el Enzyme Conjugate Buffer (12 mL).</p> <p>NOTA: el Enzyme Conjugate és sensible a la llum, tapar amb paper de plata.</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p><u>9.2. Preparació del Sample Buffer:</u> Diluir el Sample Buffer 4x (50 mL) afegint aigua MiliQ (150 mL).</p> <p>NOTA: pot produir-se un precipitat quan es conserva a 2-8 °C. Deixar atemperar i agitar o passar pel vórtex per a que es dissolgui el precipitat.</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p><u>9.3. Preparació del Wash Buffer:</u> Diluir el Wash Buffer 21x (40 mL) afegint aigua MiliQ (800 mL).</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p><u>9.4. Dilució de les mostres:</u> Cada mostra s'ha de diluir en dos passos fins a diluir-la 6561 vegades:</p> <table border="1"> <tr> <td>1</td> <td>Mostra del pacient</td> <td>25 µL</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>Sample Buffer</td> <td>2000 µL</td> <td>Dilució 1/81</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>Mostra del pacient</td> <td>25 µL</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>Sample Buffer</td> <td>2000 µL</td> <td>Dilució 1/6561</td> </tr> </table> | | | | | 1 | Mostra del pacient | 25 µL | | | Sample Buffer | 2000 µL | Dilució 1/81 | 2 | Mostra del pacient | 25 µL | | | Sample Buffer | 2000 µL | Dilució 1/6561 |
| 1 | Mostra del pacient | 25 µL | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Sample Buffer | 2000 µL | Dilució 1/81 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | Mostra del pacient | 25 µL | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Sample Buffer | 2000 µL | Dilució 1/6561 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>A cada pas tapar els tubs, invertir-los tres vegades i mesclar al vórtex. NOTA: La dilució 1/6561 és estable durant 1 dia, tot i que la dilució 1/81 és estable fins a 4 dies però conservada a 2-8 °C.</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p><u>9.5. Procediment:</u> Tots els reactius i les mostres han d'estar a temperatura ambient abans d'utilitzar-los.</p> <p>9.5.1 Dispensar 25 µL de mostra, calibradors i controls.</p> <p>9.5.2 Afegir 100 µL del Assay Buffer a cada pouet.</p> <p>9.5.3 Incubar en un agitador de plaques durant <u>dues hores</u> a temperatura ambient (18-25 °C).</p> <p>9.5.4 Rentar 6 vegades amb un rentador automàtic o aspirar el volum de reacció, afegir 350 µL de Wash Buffer a cada pouet, aspirar completament i repetir això 5 vegades. Després de l'últim rentat, invertir i picar la placa en paper de filtre.</p> <p>9.5.5 Afegir 100 µL del Enzyme Conjugate a cada pou.</p> <p>Incubar en un agitador de plaques durant <u>una hora</u> a temperatura ambient (18-25 °C).</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

- 9.5.6 Repetir el pas 9.5.4.
9.5.7 Afegir **200 µL** del substrat TMB.
NOTA: el TMB és incolor i sensible a la llum, tapar amb paper de plata.
9.5.8 Incubar durant 15 min a temperatura ambient sense agitar.
9.5.9 Afegir **50 µL** de STOP Solution a cada pou.
9.5.10 Agitar la placa durant aproximadament 15 segons en un agitador de plaques per assegurar que es barreja bé.
9.5.11 Llegir la densitat òptica a 450 nm i calcular els resultats.
NOTA: llegir en màxim 30 min.

10. Verificació de la tècnica i interpretació de resultats

Representar gràficament els valors d'absorbància obtinguts dels calibradors vs. la concentració de LDL oxidada (corba de calibració).

Mitjançant l'equació de la recta de calibració, calcular la concentració de les mostres a partir del valor d'absorbància.

NOTA: recordar que el valor de la concentració s'ha de multiplicar pel factor de dilució.

Les mostres lipèmiques, icteriques o hemolitzades no interfereixen en l'assaig.

11. Guia de problemes

| Problema | Possible causa | Solució |
|----------|----------------|---------|
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |



12. Referències

Descrites en el Manual del kit Oxidized LDL ELISA.

13. Control de la documentació

14. Annexos

10.2. PNT de la detecció dels anticossos de les LDL oxidades per ELISA

| | | | |
|---|--|---|--------------|
|  UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI | |  | |
| Procediment Normalitzat de Treball Metodològic | | | |
| ELISA oxLDL-Ab | | | |
| PNT-PO0703-URLA-07 Revisió: 00 | | Data: 24-07-2008 | |
| 1. Fonament i objectiu | | | |
| <p>Fonament: Es basa en la determinació d'anticossos anti LDL oxidades mitjançant un ELISA tipus "sandwich", on les LDL oxidades de la mostra s'uneixen a les LDL oxidades immobilitzades als micropouets de la placa d'ELISA com amb les LDL natives immobilitzades a les "agulles" de la placa FTS. Mitjançant un altre anticòs marcat amb un enzim (peroxidasa) i el seu respectiu substrat, es detecta la concentració d'anticossos i afegint un àcid permet la seva lectura espectrofotomètrica.</p> <p>Objectiu: Determinar de forma quantitativa els anticossos anti LDL oxidades en mostres de sèrum.</p> <p>Els nivells d'anticossos anti LDL oxidada en sèrum són significativament elevats en pacients amb malaltia coronària i arteriosclerosi. Així, sembla que els nivells circulants d'anticòs anti LDL oxidada són marcadors d'arteriosclerosi coronària.</p> | | | |
| 2. Espècimen | | | |
| Sèrum | | | |
| 3. Documentació relacionada | | | |
| Manual del kit comercial IMTEC-oxLDL-Antibodies Ig(GM) | | | |
| 4. Definicions | | | |
| 5. Historial de revisions | | | |
| Modificacions efectuades | | No de Revisió | Data |
| | | | |
| 6. Solucions, reactius i materials | | | |
| Kit comercial IMTEC-oxLDL-Antibodies Ig(GM), Ref. ITC59500 | | | |
| Aigua MilliQ | | | |
| <i>Estabilitat dels reactius oberts</i> | | | |
| Calibradors | 2-8 °C fins la data de caducitat (ja preparat) | | |
| Controls (L), (H) | 2-8 °C fins la data de caducitat (ja preparat) | | |
| Wash Buffer | 6 setmanes a 2-8 °C | | |
| Dilution Buffer | 2-8 °C fins la data de caducitat (ja preparat) | | |
| Placa recoberta, tires no utilitzades | 2 mesos a 2-8 °C (tornar a segellar la bossa) | | |
| Placa de FTS (LDL natiu) | 2 mesos a 2-8 °C (tornar a segellar la bossa) | | |
| Enzyme Conjugate | 2-8 °C fins la data de caducitat (ja preparat) | | |
| Material | | | |
| Pipetes multicanal | Capacitat | Tractament Previ | Observacions |
| Pipetes dispensadores | 100µl | | |
| | 10 a 1000 µL | | |

| | | | | | | | | | | |
|---|--------------------|----------------|-------------|--------------|---|--------------------|-------|--|-----------------|---------|
| Eppendorfs | 1,5 mL | | | | | | | | | |
| 7. Instrumentació i equips: | | | | | | | | | | |
| Equip | Ubicació | Núm. Inventari | Núm. PNT-EE | Observacions | | | | | | |
| Rentador de plaques d'ELISA | Laboratori 2. URL | 085881 | 54 | | | | | | | |
| Lector de plaques d'ELISA (450 nm) | Laboratori 2. URL | 012592 | 57 | | | | | | | |
| 8. Precaucions | | | | | | | | | | |
| <p>Treballar amb tots els components a temperatura ambient</p> <p>El valor de concentració obtingut dels controls en cada prova es registrarà i es tindrà en compte.</p> <p>La concentració del calibrador pot variar en cada Lot.</p> <p>La solució de STOP conté àcid. Manipular-la amb precaució.</p> | | | | | | | | | | |
| 9. Procediment | | | | | | | | | | |
| <p><u>9.1. Preparació del Wash Buffer:</u> Diluir el Wash Buffer 10x (50mL) afegint aigua MiliQ (450 mL) fins a un volum final de 500ml.</p> <p><u>9.2. Dilució de les mostres:</u> Cada mostra s'ha de diluir 1:101 amb el Buffer de dilució:</p> <table border="1"> <tr> <td>1</td> <td>Mostra del pacient</td> <td>10 µL</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Dilution Buffer</td> <td>1000 µL</td> </tr> </table> <p>A cada pas tapar els eppendorfs i barrejar bé.</p> <p><u>9.3. Procediment:</u> Tots els reactius i les mostres han d'estar a temperatura ambient abans d'utilitzar-los.</p> <p>9.3.1 Dispensar 100 µL de mostra, calibradors i controls.</p> <p>9.3.2 Cobrir la placa amb FTS (placa amb LDLnatiu)</p> <p>9.3.3 Incubar <u>una hora</u> a temperatura ambient (18-25 °C).</p> <p>9.3.4 Rentar 3 vegades amb un rentador automàtic o aspirar el volum de reacció, afegir 350 µL de Wash Buffer a cada pouet, aspirar completament i repetir això 3 vegades. Després de l'últim rentat, invertir i picar la placa en paper de filtre.</p> <p>9.3.5 Afegir 100 µL del Enzyme Conjugate a cada pou.</p> <p>9.3.6 Incubar durant <u>30 min</u> a temperatura ambient (18-25 °C).</p> <p>9.3.7 Repetir el pas 9.3.4</p> <p>9.3.8 Afegir 100 µL del substrat TMB. NOTA: el TMB és incolor i sensible a la llum, tapar amb paper de plata.</p> <p>9.3.9 Incubar durant 10 min a temperatura ambient.</p> <p>9.3.10 Afegir 100 µL de STOP Solution a cada pou.</p> <p>9.3.11 Llegir la densitat òptica a 450 nm i calcular els resultats. NOTA: llegir en màxim 30 min.</p> | | | | | 1 | Mostra del pacient | 10 µL | | Dilution Buffer | 1000 µL |
| 1 | Mostra del pacient | 10 µL | | | | | | | | |
| | Dilution Buffer | 1000 µL | | | | | | | | |
| 10. Verificació de la tècnica i interpretació de resultats | | | | | | | | | | |
| <p>Representar gràficament els valors d'absorbància obtinguts dels calibradors vs. la concentració de LDL oxidada (corba de calibració).</p> <p>Mitjançant l'equació de la recta de calibració, calcular la concentració de les mostres (U/ml) a partir del</p> | | | | | | | | | | |

Annex II

valor d'absorbància.

Els resultats superiors a 30 U/ml (valor del punt de tall) es consideren positius.

Verificació de la tècnica:

www.human.de/data/gb/vr/el-59500.pdf

www.human-de.com/data/gb/vr/el-59500.pdf

11. Guia de problemes

| Problema | Possible causa | Solució |
|----------|----------------|---------|
| | | |
| | | |
| | | |



12. Referències

1. Conrad K. et al., Autoantibodies in Systemic Autoimmune Diseases- A Diagnostic reference; Pabst Science Publishers, Lengerich, Berlin, Riga, Rom, Viernheim, Wien, Zagreb (2002).
2. Becarevic M. et al., Clin. Lab. 51, 279-283 (2005).

13. Control de la documentació

14. Annexos

10.3. PNT de la detecció de FABP4 per ELISA

| | | | |
|---|---------------|------------------|----------------------------|
|  | | | |
|  UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI | | | |
| Procediment Normalitzat de Treball Metodològic Human Adipocyte FABP ELISA - FABP4 | | | |
| PNT-PO0703-URLA-11 | Revisió: 00 | | |
| Data: 24-07-2008 | | | |
| 1. Fonament i objectiu | | | |
| <p>L'ELISA de l'<i>adipocyte fatty acid binding protein</i> humana (AFABP – Cat. No. RD191036200R) de BioVendor és un <i>biotin labelled antibody based sandwich enzyme immunoassay</i> per la determinació quantitativa d'AFABP humana en sèrum, plasma i extractes de teixits i medi de cultiu.</p> <p>A l'ELISA, els calibradors i les mostres són incubades amb un anticòs <i>goat polyclonal</i> anti-AFABP humana retintut en pous de placa de 96 pous. Després d'una hora d'incubació i una sèrie de rentats, s'afegeix un anticòs policlonal anti-AFABP marcat amb biotina i s'incuba amb l'AFABP capturada durant una hora. Després d'una segona sèrie de rentats, s'afegeix un conjugat <i>streptavidin-horseradish</i> peroxidase. Després de 30 min d'incubació i l'última sèrie de rentats, el conjugat remanent permet reaccionar amb el substrat H_2O_2-<i>tetramethylbenzidine</i>. La reacció s'atura per l'addició d'una solució àcida i l'absorbància del producte groc resultant es mesura a 450nm. L'absorbància és proporcional a la concentració d'AFABP. La corba estàndard es construeix representant els valors d'absorbància vers les concentracions d'AFABP, i les concentracions de les mostres desconegudes es determinen utilitzant la corba estàndard.</p> | | | |
| 2. Espècimen | | | |
| Sèrum o plasma humà, extractes de teixits o medi de cultiu. | | | |
| 3. Documentació relacionada | | | |
| | | | |
| 4. Definicions | | | |
| | | | |
| 5. Historial de revisions | | | |
| | | | |
| Modificacions efectuades | No de Revisió | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| 6. Solucions, reactius i materials | | | |
| <p><u>Nota:</u> com es tracta d'un kit ELISA comercial, totes les solucions i reactius que són necessaris, venen inclosos en el propi kit. Només cal seguir les indicacions del protocol proporcionat per la casa comercial.</p> <p>Tots els reactius proporcionats estan preparats per fer-los servir, excepte el <i>AFABP Master Calibrator</i>, els <i>Quality Controls</i> i el <i>Wash Solution Concentrate (10x)</i>. A l'apartat número 9, s'indica la seva preparació.</p> | | | |
| | | | |
| Material | Capacitat | Tractament Previ | Observacions |
| tubs eppendorf | 1,5ml | ---- | No és necessari autoclavat |
| probeta | 1l | ---- | ---- |
| puntes micropipeta | 2-200µl | ---- | No és necessari autoclavat |
| puntes micropipeta | 100-1000µl | ---- | No és necessari autoclavat |
| puntes micropipeta multicanal | 50-350µl | ---- | No és necessari autoclavat |

Annex II

| 7. Instrumentació i equips: | | | | |
|---|---|----------------|-------------|---|
| Equip | Ubicació | Núm. Inventari | Núm. PNT-EE | Observacions |
| Lector ELISA BioWhittaker KINETIC-QCL | Laboratori 2. Bioquímica | 012592 | | |
| Roller | Laboratori 2. Bioquímica | 012416 | | |
| Agitador orbital | (propietat de Psiquiatria) | | | Ens el deixen fer servir cada vegada que el necessitem. |
| Micropipeta multicanal | Laboratoris 1/2. Genètica i Biologia Molecular/Bioquímica | | | |
| Micropipeta 2-200µl | Laboratoris 1/2. Genètica i Biologia Molecular/Bioquímica | | | |
| Micropipeta 100-1000µl | Laboratoris 1/2. Genètica i Biologia Molecular/Bioquímica | | | |
| 8. Precaucions | | | | |
| <p>És imprescindible llegir-se el protocol de la casa comercial que ve amb el kit abans d'iniciar el procediment. Cada lot sol tenir una actualització del protocol i en cada compra ens arriba un lot diferent.</p> | | | | |
| 9. Procediment | | | | |
| <p>Nota #1. Aquest kit ELISA comercial inclou un protocol proporcionat per la casa comercial; s'indica seguir les instruccions de procediment proporcionades per la casa comercial. Nota #2. Tots els reactius s'han d'atemperar previ a fer-los servir; també, s'han de portar a temperatura ambient, les mostres de plasma i sèrum previ a ser pipetejades. Nota #3. Per realitzar aquest kit es necessita 1 litre d'aigua MilliQ per placa, que sigui recent. És a dir, del mateix dia o del dia anterior. Nota #4. Si no és necessària tota la placa, es poden retirar les tires que no siguin necessàries i guardar-les en un altre marc de placa de 96 pous dins la bossa d'alumini proporcionada amb la bosseta dessecant i segellar-la. Cal guardar-la a 2-8°C, preservant-la de la humitat.</p> | | | | |
| 9.1. <u>Preparació dels reactius</u> | | | | |
| <p>9.1.1. <i>Wash solution</i> Diluir els 100ml de <i>Wash Solution Concentrate</i> amb 900ml d'aigua MilliQ en una probeta de 1l. Estabilitat i emmagatzematge: la <i>Wash solution</i> diluïda és estable durant un mes a 2-8°C.</p> <p>9.1.2. <i>Human AFABP Calibrators</i> IMPORTANT: per la reconstitució del <i>Master Calibrator</i> liofilitzat amb el <i>Dilution Buffer</i>, cal consultar en cada cas el <i>Certificate of Analysis</i> que va inclòs en cada kit (fulla groga). Reconstituir el <i>Master Calibrator</i> liofilitzat amb el <i>Dilution Buffer</i> previ a l'inici de l'assaig. Afegir el volum indicat de <i>Dilution Buffer</i> i deixar dissoldre com a mínim 15 min, en el <i>roller</i>. La concentració resultant de la solució estoc d'AFABP humana és de 25ng/ml. Estabilitat i emmagatzematge: els calibradors són estables fins a la data de caducitat indicada si es conserven a -20°C.</p> <p>9.1.3. <i>Quality Controls</i> IMPORTANT: per la reconstitució dels <i>Quality Controls</i> liofilitzats amb aigua MilliQ, cal</p> | | | | |

consultar en cada cas el *Certificate of Analysis* que va inclòs en cada kit.

Reconstituïr els *Quality Controls (HIGH i LOW)* liofilitzats amb el aigua MilliQ previ a l'inici de l'assaig.

Cal tractar els controls com a mostres; per tant, cal diluir-los 1:10 amb *Dilution Buffer* abans de ser utilitzats.

Per exemple: 30µl *Quality Control* + 270µl *Dilution Buffer*

Estabilitat i emmagatzematge: els controls de qualitat reconstituïts però no diluïts, són estables fins a la data de caducitat indicada si es conserven a -20°C.

9.2. Preparació de la corba estàndard

El *Master Calibrator* reconstituït constitueix la solució estoc d'AFABP de 25ng/ml. La corba estàndard es prepara a partir de l'estoc per dilucions seriades amb *dilution buffer* segons la següent taula:

| | Volum estàndard | Volum <i>Dilution Buffer</i> | Concentració |
|-------------|--|------------------------------|--------------|
| Estàndard 6 | solució estoc <i>Master Calibrator</i> | --- | 25 ng/ml |
| Estàndard 5 | 500µl estàndard 6 | 750µl | 10 ng/ml |
| Estàndard 4 | 500µl estàndard 5 | 500µl | 5 ng/ml |
| Estàndard 3 | 500µl estàndard 4 | 500µl | 2.5 ng/ml |
| Estàndard 2 | 500µl estàndard 3 | 750µl | 1 ng/ml |
| Estàndard 1 | 500µl estàndard 2 | 500µl | 0.5 ng/ml |

9.3. Preparació de les mostres

La dilució recomanada per les mostres de sèrum o plasma és de 1:10 amb *Dilution Buffer*. Depenent del tipus de població d'estudi es podria requerir una altra dilució.

Es recomana: 30µl mostra + 270µl *dilution buffer*.

Estabilitat i emmagatzematge: no guardar les mostres diluïdes.

9.4. Procediment experimental

9.4.1. Preparar una plantilla amb el disseny de la placa ELISA, en què a cada pou de la placa s'indiqui què hi correspon (blancs, estàndards, controls i mostres).

9.4.2. Pipetejar 100µl dels estàndards, els controls de qualitat, el blanc (*dilution buffer*) i les mostres; preferiblement per duplicat d'acord amb la plantilla prèviament dissenyada. Quan s'hagin dispensat totes les mostres, cal eliminar les bombolles generades en dispensar amb una agulla de xeringa. Seguidament, cal segellar la placa amb un film adhesiu transparent.

9.4.3. Incubar la placa a temperatura ambient durant 1 hora, en un agitador orbital a 100rpm.

9.4.4. Primera sèrie de rentats.

Eliminar el volum dels pous i picar la placa sobre un bloc de papers de filtre, perquè quedi ben seca.

Rentar amb la micropipeta multicanal amb wash solution 1x: 300µl/pou.

Omplir la placa, buidar-la i picar-la sobre papers de filtre.

Realitzar aquesta operació 5 vegades.

Després del darrer rentat, cal eliminar les bombolles amb una agulla de xeringa.

9.4.5. Pipetejar 100µl de *Biotin Labelled Anti-AFABP Antibody Solution* a cada pou.

9.4.6. Incubar la placa a temperatura ambient durant 1 hora, en un agitador orbital a

Annex II

| |
|--|
| 100rpm. |
| 9.4.7. Segona sèrie de rentats. Eliminar el volum dels pous i picar la placa sobre un bloc de papers de filtre, perquè quedi ben seca. Rentar amb la micropipeta multicanal amb wash solution 1x: 300µl/pou. Omplir la placa, buidar-la i picar-la sobre papers de filtre. Realitzar aquesta operació 5 vegades. |
| 9.4.8. Després del darrer rentat, cal eliminar les bombolles amb una agulla de xeringa. |
| 9.4.9. Pipetejar 100µl de <i>Streptavidin-HRP Conjugate</i> a cada pou. |
| 9.4.10. Incubar la placa a temperatura ambient durant 30 min, en un agitador orbital a 100rpm. |
| 9.4.11. Tercera sèrie de rentats. Eliminar el volum dels pous i picar la placa sobre un bloc de papers de filtre, perquè quedi ben seca. Rentar amb la micropipeta multicanal amb wash solution 1x: 300µl/pou. Omplir la placa, buidar-la i picar-la sobre papers de filtre. Realitzar aquesta operació 5 vegades. |
| 9.4.12. Pipetejar 100µl de <i>Substrate Solution</i> a cada pou. Cal realitzar aquesta operació preservant el reactiu de l'exposició a la llum. Un cop dispensat el volum de reactiu als pous de la placa, cal cobrir-la amb un paper d'alumini durant el temps d'incubació. |
| 9.4.13. Incubar la placa a temperatura ambient durant 10 min; important, SENSE AGITACIÓ. Durant aquest temps, els pous adquireixen una coloració blava, en diferent grau segons la concentració d'AFABP. |
| 9.4.14. Aturar la reacció afegint 100µl de <i>Stop Solution</i> per pou. En aquest punt, la coloració blava es torna groga en afegir la solució de stop. |
| 9.4.15. Esperar 5 min després d'haver afegit la solució de stop i, seguidament, determinar l'absorbància llegint a 450nm en un lector ELISA. Si algun valor excedeix el límit que pot llegir el lector ELISA, la lectura que s'obtindrà serà OVERFLOW. En aquest cas, es pot fer una segona lectura a 405nm. |
| 9.4.16. |
| 10. Verificació de la tècnica i interpretació de resultats |
| 10.1. Càlculs A partir dels valors d'absorbància obtinguts pels estàndards i pel blanc, es confeccionarà una corba estàndard. Es recomana utilitzar el programari <i>GraphPad Prism 5</i> . El model matemàtic que cal aplicar és una funció paramètrica de quart ordre. Si aquest model no s'ajustés adequadament, és possible aplicar una funció paramètrica de tercer ordre. Els estàndards no estan diluïts, mentre que les mostres i els controls de qualitat sí ho estan; la dilució aplicada que es recomana d'inici és 1:10. Cal tenir en compte el factor de dilució a l'hora de fer els càlculs. |
| 10.2. Límits de l'assaig Els resultats que excedeixin el valor d'absorbància de l'estàndard corresponent a la concentració de 25ng/ml malgrat la dilució 1:10 aplicada haurien de ser repetits aplicant una dilució més gran. També s'haurien de repetir aquelles mostres que el seu valor d'absorbància estigui per sota del valor més baix de la corba aplicant una dilució més petita o si es donés el cas, sense diluir la mostra. El factor de dilució a aplicar ha de decidir-se en funció a l'absorbància obtinguda i les absorbàncies observades per la corba estàndard. |
| 10.3. Controls de qualitat Cal validar els valors de concentració obtinguts pels controls de qualitat HIGH i LOW. Per fer-ho, cal recórrer al <i>Certificate of Analysis</i> que va inclòs en cada kit (fulla groga). En aquest document, es presenten uns rangs de valors de concentració en els que s'haurien de trobar les concentracions obtingudes pels controls en el nostre assaig. |
| 11. Guia de problemes |

| Problema | Possible causa |
|--|---|
| 1. Senyal FEBLE a tots els pous | Omissió d'algun reactiu en algun dels passos del kit. |
| | Preparació no adequada d'algun reactiu o mala conservació. |
| | Realització del procediment abans que els reactius es trobessin a temperatura ambient. |
| 2. Senyal MOLT ALTA o ELEVAT soroll de fons | Procediment de rentats no realitzat de manera adequada. |
| | Sobree xposició; temps d'incubació amb el substrat excessiu abans d'afegir la solució de stop. |
| 3. Elevat coeficient de variació (CV) | Procediment de rentats no realitzat de manera adequada. |
| 4. Efecte del procés de congelació/descongelació en la concentració d'AFABP en les mostres | No s'observa cap deriva significativa en la determinació de la concentració d'AFABP en mostres de sèrum i plasma després de tres cicles de congelació/descongelació. |
| 5. Estabilitat de les mostres a 4°C | Les mostres haurien de ser conservades a -20°C. Però, no s'observa una deriva significativa en la concentració d'AFABP en mostres de sèrum i plasma quan aquestes s'emmagatzemen a 4°C durant 2 setmanes. |
| 6. Efecte de la matriu de la mostra (sèrum/plasma) | No s'observen diferències significatives en les concentracions d'AFABP en mostres de sèrum, plasma citrat, plasma EDTA i plasma Heparina. |

12. Referències

Referències a l'*adipocyte fatty acid binding protein (AFABP)*:

- Makowski L, Brittingham KC, Reynolds JM, Suttles J and Hotamisligil GS: The Fatty Acid Binding Protein, aP2, Coordinates Macrophage Cholesterol Trafficking and Inflammatory Activity. *J Biol Chem.* Apr 1; **280**(13): 12888-95 (2005).
- Maeda K, Cao H, Kono K, Gorgun CZ, Furuhashi M, Uysal KT, Cao Q, Atsumi G, Malone H, Krishnan B, Minokoshi Y, Kahn BB, Parker RA and Hotamisligil GS: Adipocyte/macrophage fatty acid binding proteins control integrated metabolic responses in obesity and diabetes. *Cell Metabolism.* February; **1**(2): 107-19 (2005).
- Boord JB, Maeda K, Makowski L, Babaev VR, Fazio S, Linton MF, Hotamisligil GS: Combined adipocyte-macrophage fatty acid-binding protein deficiency improves metabolism, atherosclerosis, and survival in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation.* Sep 14; **110**(11): 1492-8 (2004).
- Lehmann F, Haile S, Axen E, Medina C, Uppenberg J, Svensson S, Lundback T, Rondahl L, Barf T: Discovery of inhibitors of human adipocyte fatty acid-binding protein, a potential type 2 diabetes target. *Bioorg Med Chem Lett.* Sep 6; **14**(17): 4445-8 (2004).
- Damcott CM, Moffett SP, Feingold E, Barmada MM, Marshall JA, Hamman RF, Ferrell RE: Genetic variation in fatty acid-binding protein-4 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma interactively influence insulin sensitivity and body composition in males. *Metabolism.* Mar; **53**(3): 303-9 (2004).
- Jenkins-Kruchten AE, Bennaars-Eiden A, Ross JR, Shen WJ, Kraemer FB, Bernlohr DA: Fatty acid-binding protein-hormone-sensitive lipase interaction. Fatty acid dependence on binding. *J Biol Chem.* Nov 28; **278**(48): 47636-43 (2003).
- Hertzell AV, Bennaars-Eiden A, Bernlohr DA: Increased lipolysis in transgenic animals overexpressing the epithelial fatty acid binding protein in adipose cells. *J Lipid Res.* Dec; **43**(12): 2105-11 (2002).
- Fu Y, Luo N, Lopes-Virella MF, Garvey WT: The adipocyte lipid binding protein (ALBP/aP2) gene facilitates foam cell formation in human THP-1 macrophages. *Atherosclerosis.* Dec; **165**(2): 259-69 (2002).
- Storch J, Veerkamp JH, Hsu KT: Similar mechanisms of fatty acid transfer from human and rodent fatty acid-binding proteins to membranes: liver, intestine, heart muscle, and adipose tissue FABPs. *Mol Cell Biochem.* Oct; **239**(1-2): 25-33 (2002).

- Fisher RM, Hoffstedt J, Hotamisligil GS, Thorne A, Ryden M: Effects of obesity and weight loss on the expression of proteins involved in fatty acid metabolism in human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord*. Oct; **26**(10): 1379-85 (2002).
- Boord JB, Maeda K, Makowski L, Babaev VR, Fazio S, Linton MF, Hotamisligil GS: Adipocyte fatty acid-binding protein, aP2, alters late atherosclerotic lesion formation in severe hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Oct 1; **22**(10): 1686-91(2002).
- Fisher RM, Eriksson P, Hoffstedt J, Hotamisligil GS, Thorne A, Ryden M, Hamsten A, Arner P: Fatty acid binding protein expression in different adipose tissue depots from lean and obese individuals. *Diabetologia*. Oct; **44**(10): 1268-73 (2001).
- Scheja L, Makowski L, Uysal KT, Wiesbrock SM, Shimshek DR, Meyers DS, Morgan M, Parker RA, Hotamisligil GS: Altered insulin secretion associated with reduced lipolytic efficiency in aP2^{-/-} mice. *Diabetes*. Oct; **48**(10): 1987-94 (1999).
- Coe NR, Simpson MA, Bernlohr DA: Targeted disruption of the adipocyte lipid-binding protein (aP2 protein) gene impairs fat cell lipolysis and increases cellular fatty acid levels. *J Lipid Res*. May; **40**(5): 967-72 (1999).
- Baxa CA, Sha RS, Buelt MK, Smith AJ, Matarese V, Chinander LL, Boundy KL and Bernlohr DA: Human adipocyte lipid-binding protein: purification of the protein and cloning of its complementary DNA. *Biochemistry*. **28**(22): 8683-90 (1989).



Referències a aquest producte:

- Xu A, Tso AW, Cheung BM, Wang Y, Wat NM, Fong CH, Yeung DC, Janus ED, Sham PC, Lam KS: Circulating adipocyte-fatty acid binding protein levels predict the development of the metabolic syndrome: a 5-year prospective study. *Circulation*. Mar 27; **115**(12): 1537-43 (2007).
- Bronsky J, Karpisek M, Bronska E, Pechova M, Jancikova B, Kotolova H, Stejskal D, Prusa R, Nevoral J: Adiponectin, adipocyte fatty acid binding protein, and epidermal fatty acid binding protein: Proteins newly identified in human breast milk. *Clin Chem*. Sep; **52**(9): 1763-70 (2006).
- von Eynatten M, Schneider JG, Allolio B: Adipocyte fatty acid binding protein (A-FABP) ist ein neuer Serum-Marker für Adipositas, Insulinresistenz und Metabolisches Syndrom. *Diabetologie*. **1**: S23-S172 (2006).
- Xu A, Wang Y, Xu JY, Stejskal D, Tam S, Zhang J, Wat NM, Wong WK, Lam KS: Adipocyte fatty acid-binding protein is a plasma biomarker closely associated with obesity and metabolic syndrome. *Clin Chem*. Mar; **52**(3): 405-13 (2006).
- Stejskal D and Karpisek M: Adipocyte fatty acid binding protein (A-FABP) in Caucasian population: a new marker of metabolic syndrome? *Eur J Clin Invest*. Sep; **36**(9): 621-5 (2006).
- Cabré A, Lázaro I, Girona J, Manzanares JM, Marimón F, Plana N, Heras M, Masana L: Fatty acid binding protein 4 is increased in metabolic syndrome and with thiazolidinedione treatment in diabetic patients. *Atherosclerosis*. 2007; 195:e150-8. PMID: 17553506
- Coll B, Cabré A, Alonso-Villaverde C, Lázaro I, Aragonés G, Parra S, Girona J, Masana L: The fatty acid binding protein-4 (FABP4) is a strong biomarker of metabolic syndrome and lipodystrophy in HIV-infected patients. *Atherosclerosis*. 2008;199(1):147-53. PMID: 17983623
- Cabré A, Lázaro I, Girona J, Manzanares JM, Marimón F, Plana N, Heras M, Masana L: Plasma fatty acid-binding protein 4 increases with renal dysfunction in type 2 diabetic patients without microalbuminuria. *Clin Chem*. 2008;54:181-7. PMID: 18024526
- Cabré A, Lázaro I, Girona J, Manzanares JM, Marimón F, Plana N, Heras M, Masana L: Plasma fatty acid binding protein 4 is associated with atherogenic dyslipidemia in diabetes. *J Lipid Res*. 2008;49: 1746-51. PMID: 18421072

13. Control de la documentació

14. Annexos

10.4. PNT del mètode Bradford



| | |
|--|----------------------------------|
|  | |
|  | |
| Procediment Normalitzat de Treball Metodològic Determinació de proteïnes per Bradford | |
| PNT-PO0703-URLA-08 | Revisió: 00 |
| Data: 24-07-2008 | |
| 1. Fonament i objectiu | |
| <p>Fonament: La tècnica està basada en l'absorbància màxima d'una solució àcida de Coomassie Brilliant Blue G-250 que canvia de 465nm a 595nm quan es produeix la unió de proteïnes. Un increment en la concentració de proteïnes es correspon amb un increment en la densitat òptica de la absorbància de llum.</p> <p>Objectiu: Determinació de proteïnes totals pel mètode de Bradford.</p> <p>Utilitat: Quantificar el contingut de proteïna present en la mostra. (Extractes cel·lulars, lipoproteïnes, etc)</p> | |
| 2. Espècimen | |
| Lipoproteïnes: VLDL, IDL, LDL, HDL. Extractes cel·lulars, etc. | |
| 3. Documentació relacionada | |
| | |
| 4. Definicions | |
| | |
| 5. Historial de revisions | |
| | |
| Modificacions efectuades | No de Revisió |
| | |
| | |
| 6. Solucions, reactius i materials | |
| | |
| Nom de la solució: | Reactiu Bradford (Protein assay) |
| Volum final: | 500ml |
| pH | Manipulació prèvia: atemperar |
| Conservació: | 4°C |
| Reactiu | Referència / marca |
| Concentració final | Quantitat (unitats) |
| Bradford | Bio-rad ref. 500-006 |
| | 200µl x mostra |
| | |
| Nom de la solució: | PBS |
| Volum final: | 500ml |
| pH | Manipulació prèvia: atemperar |
| Conservació: | 4°C |
| Reactiu | Referència / marca |
| Concentració final | Quantitat (unitats) |
| Phosphate-Buffer-Saline (PBS) | Invitrogen Ref. 149190 |
| | 799µl x mostra |
| | |
| Nom de la solució: | Aigua bidestilada |
| Volum final: | 500ml |
| pH | Manipulació prèvia: |
| Conservació: | |
| Solució Mare | Referència / marca |
| Concentració final | Quantitat (unitats) |
| H ₂ O mili-Q | |
| | 799µl x mostra |
| | |
| Nom de la solució mare: | Protein Standard BSA |
| Volum final: | 1ml |
| pH | Manipulació prèvia: Atemporar |
| Conservació: | -20°C |
| Solució Mare | Referència / marca |
| Concentració final | Quantitat (unitats) |

Annex II

| BSA | Sigma Ref.P-5616 | | | |
|---|---------------------------------|------------------|--------------|--------------|
| Material | Capacitat | Tractament Previ | Observacions | |
| Cubetes de espectrofotometre | 1ml | | | |
| Eppendorfs | 1,5ml | | | |
| Puntes grogues | Fins 200µl | | | |
| Puntes Blaves | Fins a 1000µl | | | |
| 7. Instrumentació i equips: | | | | |
| | | | | |
| Equip | Ubicació | Núm. Inventari | Núm. PNT-EE | Observacions |
| GENEQUANT | Laboratori 1 | 003525 | | |
| Pipetes | Laboratorio 1, 2, cultius i RNA | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| 8. Precaucions | | | | |
| | | | | |
| 9. Procediment | | | | |
| <u>Preparació de les mostres:</u> | | | | |
| <p>Generalment no es necessària cap preparació. La dilució es prepara per poder llegir dins dels marges de la corba de calibratge.</p> <p>Per lipoproteïnes: Blancs: Pipetejar 800µl de PBS en un eppendorf de 1.5ml i afegir 200µl del Reactiu de Bradford. Mostres: -Quil= 10µl -VLDL= 10µl -IDL= 5µl -LDL= entre 5 i 2µl -HDL= entre 5 i 2µl</p> <p>9.1. Pipetejar el volum corresponent de cada fracció en un eppendorf de 1.5ml 9.2. Afegir el PBS necessari per arribar a 800µl 9.3. Afegir 200µl de reactiu Bradford 9.4. Barrejar per inversió 9.5. Després de un període de 5 min llegir a 595nm en la cubeta de poliestiré (pot llegir-se fins una hora després)</p> <p>Per EXTRACTES CEL·LULARS: Els extractes de proteïnes nuclears es conserven a 4°C durant l'assaig. La reacció es fa a temperatura ambient. Blancs: : Pipetejar 800µl d'aigua bidestilada en un eppendorf de 1.5ml i afegir 200µl del Reactiu de Bradford. Mostres: 9.6. Posar 798µl de H₂O bidestilada en un tub eppendorf 9.7. Afegir 2µl de extracte cel·lular 9.8. Afegir 200µl del reactiu de Bradford 9.9. Barrejar per inversió 9.10. Deixar reposar 5 min a temperatura ambient 9.11. Llegir l'absorbància a 595nm al GeneQuant</p> | | | | |
| 10. Verificació de la tècnica i interpretació de resultats | | | | |
| <p>Els resultats es donen en µg/µl i queden impresos en un paper. S'ha de tenir en compte els µl que s'han afegit de cada mostra i multiplicar pel respectiu factor de dilució. Per verificar el resultats hem realitzat anteriorment una corba estàndard la qual ha estat analitzada juntament amb les mostres.</p> <p>Corba estàndard per lipoproteïnes:</p> | | | | |

| | | | | | | |
|--|------------|----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Liofilitzat de Gamma Globulina Sèrica Bovina 6,95µg/10µl (Solució stock) Pipetejar els següents volums en eppendorf de 1.5ml | | | | | | |
| Conc | ST1(0.0µg) | ST2(1.74µg) | ST3(3.48µg) | ST4(4.87µg) | ST5(6.95µg) | ST6(8.35µg) |
| Sol. Stock | 0µl | 2,5µl | 5µl | 7µl | 10µl | 12µl |
| PBS | 800µl | 797,5µl | 795µl | 793µl | 790µl | 788µl |
| Bradford | 200µl | 200µl | 200µl | 200µl | 200µl | 200µl |
| Corba estàndard per EXTRACTES CEL·LULARS : | | | | | | |
| Liofilitzat de Albúmina sèrica bovina (BSA) 500µg/ml (Solució stock) Pipetejar els següents volums en eppendorf de 1.5ml. | | | | | | |
| Conc | ST1(0.0µg) | ST2(0.5µg) | ST3(1µg) | ST4(2µg) | ST5(4µg) | ST6(6µg) |
| Sol. Stock | 0µl | 1µl | 2µl | 4µl | 8µl | 12µl |
| PBS | 800µl | 799µl | 798µl | 796µl | 792µl | 788µl |
| Bradford | 200µl | 200µl | 200µl | 200µl | 200µl | 200µl |
| 11. Guia de problemes | | | | | | |
| | | | | | | |
| Problema | | Possible causa | | Solució | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| 12. Referències | | | | | | |
| | | | | | | |
| 13. Control de la documentació | | | | | | |
| | | | | | | |
| 14. Annexos | | | | | | |
| | | | | | | |

10.5. PNT de l'Electroforesi SDS-PAGE

|  | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|------------------------------------|--------------------------|------------------------------------|--------------|-------|----|---------------------|--------------|-----|---------|--------------------|--------------------|---------------------|--|---------------------|----|-------|--------------------------|--|--|-------|
|  UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Procediment Normalitzat de Treball Metodològic SDS-PAGE amb gels comercials (Invitrogen) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PNT-PO0703-URLA-03 | Revisió: 00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Data: 24-07-2008 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1. Fonament i objectiu | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>Fonament: Separació de proteïnes en un gel de poliacrilamida comercial. Les proteïnes són tractades amb un detergent aniònic (dodecil sulfat sòdic o SDS) que desnaturalitza l'estructura secundària de les proteïnes però no les estructures terciàries connectades amb ponts disulfur i els dona càrrega negativa en proporció a la seva massa (la quantitat de càrregues és constant per unitat de pes molecular de la proteïna). En el gel les proteïnes corren de manera inversament proporcional al seu pes (com més petites més corren).</p> <p>Objectiu: L'objectiu d'aquesta prova és la separació d'una barreja de proteïnes en funció del seu pes molecular, amb la possibilitat d'esbrinar-ne el valor en cas que sigui desconegut.</p> <p>Utilitat: Sovint una electroforesi és un pas previ a una altra tècnica, com per exemple el western blot.</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2. Espècimen | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>Sol ser una solució aquosa de proteïnes aïllades o amb altres substàncies. Per exemple: extractes de proteïnes cel·lulars o de teixit, medi de cultiu, plasma, sèrum, orina. Cal tenir present que el procés de tractament de les mostres desnaturalitza les proteïnes i per tant aquestes perden les propietats dependents de la seva estructura.</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3. Documentació relacionada | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4. Definicions | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| SDS: dodecil sulfat sòdic PAGE: electroforesi en gels de poliacrilamida | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5. Historial de revisions | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <table border="1" style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th style="width: 50%;">Modificacions efectuades</th> <th style="width: 25%;">No de Revisió</th> <th style="width: 25%;">Data</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> </tbody> </table> | | Modificacions efectuades | No de Revisió | Data | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Modificacions efectuades | No de Revisió | Data | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6. Solucions, reactius i materials | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td>Nom de la solució:</td> <td>Tampó d'electroforesi Tris-Acetate</td> <td>Volum final:</td> <td>800ml</td> </tr> <tr> <td>pH</td> <td>Manipulació prèvia:</td> <td>Conservació:</td> <td>4°C</td> </tr> <tr> <td>Reactiu</td> <td>Referència / marca</td> <td>Concentració final</td> <td>Quantitat (unitats)</td> </tr> <tr> <td>Nu®PAGE Tris -Acetate SDS Running Buffer 20X</td> <td>LA0041 / Invitrogen</td> <td>1X</td> <td>40 ml</td> </tr> <tr> <td>H₂O Milli-Q</td> <td></td> <td></td> <td>760ml</td> </tr> </table> | | Nom de la solució: | Tampó d'electroforesi Tris-Acetate | Volum final: | 800ml | pH | Manipulació prèvia: | Conservació: | 4°C | Reactiu | Referència / marca | Concentració final | Quantitat (unitats) | Nu®PAGE Tris -Acetate SDS Running Buffer 20X | LA0041 / Invitrogen | 1X | 40 ml | H ₂ O Milli-Q | | | 760ml |
| Nom de la solució: | Tampó d'electroforesi Tris-Acetate | Volum final: | 800ml | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| pH | Manipulació prèvia: | Conservació: | 4°C | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Reactiu | Referència / marca | Concentració final | Quantitat (unitats) | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Nu®PAGE Tris -Acetate SDS Running Buffer 20X | LA0041 / Invitrogen | 1X | 40 ml | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| H ₂ O Milli-Q | | | 760ml | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

| | | | | | | | |
|---|-----|------------------------------------|--|-----------------------|--|---------------------|--|
| Nom de la solució: | | Tampó d'electroforesi MOPS | | Volum final: | | 800ml | |
| pH | | Manipulació prèvia: | | Conservació: | | 4°C | |
| Reactiu | | Referència / marca | | Concentració final | | Quantitat (unitats) | |
| Nu®PAGE MOPS SDS Running Buffer 20X | | NP0001 / Invitrogen | | 1X | | 40 ml | |
| H ₂ O Milli-Q | | | | | | 760ml | |
| Nom de la solució: | | Tampó d'electroforesi MES | | Volum final: | | 800ml | |
| pH | | Manipulació prèvia: | | Conservació: | | 4°C | |
| Reactiu | | Referència / marca | | Concentració final | | Quantitat (unitats) | |
| Nu®PAGE MES SDS Running Buffer 20X | | NP0002 / Invitrogen | | 1X | | 40 ml | |
| H ₂ O Milli-Q | | | | | | 760ml | |
| Nom de la solució: | | Tampó d'electroforesi Tris-Glycine | | Volum final: | | 800ml | |
| pH | | Manipulació prèvia: | | Conservació: | | 4°C | |
| Reactiu | | Referència / marca | | Concentració final | | Quantitat (unitats) | |
| Nu®PAGE Tris-Glycine SDS Running Buffer 20X | | LC 2675 / Invitrogen | | 1X | | 40 ml | |
| H ₂ O Milli-Q | | | | | | 760ml | |
| Nom de la solució: | | 1.5M Tris-HCl | | Volum final: | | 100ml | |
| pH | 8.8 | Manipulació prèvia: | | ajustar pH amb HCl 6N | | Conservació: 4°C | |
| Reactiu | | Referència / marca | | Concentració final | | Quantitat (unitats) | |
| Trizma Base | | T1503-100G/SIGMA | | 1.5M | | 18.165g | |
| H ₂ O Milli-Q | | | | | | Fins a Vf=100ml | |
| Nom de la solució: | | SDS al 10% | | Volum final: | | 100ml | |
| pH | | Manipulació prèvia: | | Conservació: | | T ambient | |
| Reactiu | | Referència / marca | | Concentració final | | Quantitat (unitats) | |
| SDS | | L3771-25G/SIGMA | | 10% | | 10g | |
| H ₂ O Milli-Q | | | | | | Fins a Vf=100ml | |
| Reactiu | | Referència/Marca | | Conservació | | | |
| NuPAGE® LDS Sample Buffer 4x | | NP0007/ Invitrogen | | 4°C | | | |
| NuPAGE® Sample Reducing Agent 10X | | NP0004/ Invitrogen | | 4°C | | | |
| NuPAGE® Antioxidant | | NP0005 /Invitrogen | | 4°C | | | |
| Gels NuPAGE® Novex (1mm, 10 wells) | | 3.8% Tris-Acetate | | EA0375BOX/Invitrogen | | 4°C | |
| Gels NuPAGE® Novex (1mm, 10 wells) | | 10% Bis-Tris | | NP0302BOX/Invitrogen | | 4°C | |
| Gels NuPAGE® Novex (1mm, 12 wells) | | 4.12% Tris-Glycine | | EC60352BOX/Invitrogen | | 4°C | |
| NOVEX® Tris-Glycine SDS Sample Buffer (2x) | | LC2676 / Invitrogen | | 4°C | | | |
| HiMark™ Pre-Stained High Molecular (HMW) | | LC5699/Invitrogen | | -20°C | | | |
| BenchMARK™ Pre-Stained Protein Ladder | | 10748-010/Invitrogen | | -20°C | | | |
| MagicMark | | LC5602/Invitrogen | | -20°C | | | |
| Precision Plus Protein WesternC standards | | 161-0376/ Invitrogen | | -20°C | | | |
| Trizma Base | | T1503 / Sigma | | T ambient | | | |

Annex II

| | | | | |
|--|---------------------------------------|-----------------------|--------------------|---------------------|
| Acril/Bisacrilamida 40% | 161-0146 / Bio-Rad | 4°C | | |
| SDS | L3771 / Sigma | T ambient | | |
| TEMED | T8133 / Sigma | T ambient | | |
| Persulfat amònic | 161-0700 / Bio-Rad | T ambient | | |
| 7. Instrumentació i equips: | | | | |
| | | | | |
| Equip | Ubicació | Núm. Inventari | Núm. PNT-EE | Observacions |
| Font d' electroforesi | Laboratori 1 | | | |
| Cubeta mini-protean II | Laboratori 1 | | | |
| Termociclador | Laboratori 2 | | | |
| Centrífuga | Laboratori 2 | 003532 | | |
| Agitador | Laboratori 2 | 012410 | | |
| 8. Precaucions | | | | |
| | | | | |
| 9. Procediment | | | | |
| <u>9.1 Preparació tampó d'electroforesi NuPAGE® SDS Running Buffer 1X</u> | | | | |
| <u>Proteïnes entre 60-250KDa: NuPAGE® Tris-Acetate SDS Running Buffer 1X</u> | | | | |
| Preparar 800 ml a partir de NuPAGE® Tris-Acetate SDS Running Buffer 20X: | | | | |
| | NuPAGE Tris-Acetate SDS Buffer (20X) | | 40ml | |
| | H ₂ O MilliQ | | 760ml | |
| <u>Proteïnes entre 20-80 KDa: NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer 1X</u> | | | | |
| Preparar 800 ml a partir de NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer 20X: | | | | |
| | NuPAGE® MOPS SDS Buffer (20X) | | 40ml | |
| | H ₂ O MilliQ | | 760ml | |
| <u>Proteïnes entre 20-80 KDa: NuPAGE® MES SDS Running Buffer 1X</u> | | | | |
| Preparar 800 ml a partir de NuPAGE® MES SDS Running Buffer 20X: | | | | |
| | NuPAGE® MOPS SDS Buffer (20X) | | 40ml | |
| | H ₂ O MilliQ | | 760ml | |
| <u>Proteïnes entre 31-200 KDa: NuPAGE® Tris-Glycine Running Buffer 1X</u> | | | | |
| Preparar 800 ml a partir de NuPAGE® Tris-Glycine SDS Running Buffer 20X: | | | | |
| | NuPAGE® Tris-Glycine SDS Buffer (20X) | | 40ml | |
| | H ₂ O MilliQ | | 760ml | |
| <u>9.2 Preparació i desnaturalització de la mostra (sempre mostres en gel !!!!)</u> | | | | |
| En eppendorfs estèrils d' 1ml, preparar les mostres en un volum total de 10 µl com es descriu a la següent taula tenint en compte la quantitat de proteïna necessària. | | | | |
| | Protein Sample * | | X µl | |
| | NuPAGE® LDS Sample Buffer 4X | | 2.5 µl | |
| | NuPAGE® Sample Reducing Agent 10X | | 1 µl | |
| | Deionized Water | | to 10 µl | |
| * Si el volum de preparació de mostres varia, recalcular els volums a partir de la taula d'excel (volum total well: 10-25 µl) | | | | |

| Volum total (µl)= | 20 | | |
|-------------------|---------------------------------|--------------------------------------|--------------------|
| Protein Sample µl | NuPAGE® LDS Sample Buffer 4X µl | NuPAGE® Sample Reducing Agent 10X µl | Deionized Water µl |
| 11,6 | 5 | 2 | 1,4 |
| 1,62 | 5 | 2 | 11,38 |
| 4,98 | 5 | 2 | 8,02 |

Pels gels TRIS-GLYCINE, la preparació de les mostres difereix en algun dels tampons i en els volums utilitzats (per un volum final de 10 µl)

| | |
|--|----------|
| Protein Sample * | x µl |
| NOVEX® TRIS-Glycine SDS Sample Buffer (2x) | 5 µl |
| NuPAGE® Sample Reducing Agent 10X | 1 µl |
| Deionized Water | to 10 µl |

9.3 Fer un pols amb la centrífuga a 4°C, perquè baixi la mostra.

9.4 Escalfar les mostres en el bloc de temperatura (termomixer, Eppendorf) a 70°C durant 10 min; en el cas dels gels Tris-Glycine, es desnaturalitzarà durant 2min a 85°C.

9.5 Fer un pols amb la centrífuga a 4°C i clavar-les en gel fins el moment de carregar-les al gel.

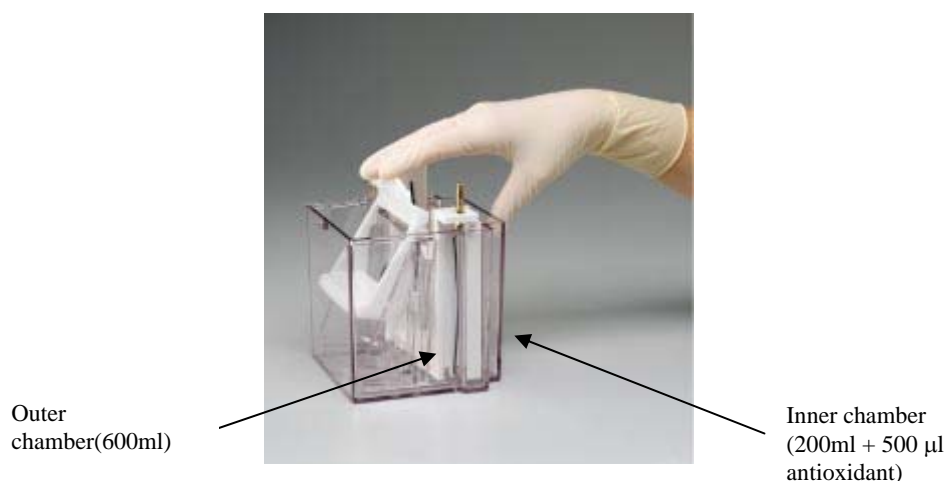
SDS-PAGE

9.6 Muntar el gel comercial NuPAGE® Novex en la cubeta d'electroforesi *XCell SureLock Mini-Cell* o muntar el gel en la cubeta Mini-PROTEAN® 3 Cell de Bio-Rad (PNT-PO0705-URLA-65), si el gel es confecciona manualment.

*** Si només es fa córrer un gel utilitzar el “Buffer Dam” on aniria el 2on gel.**

9.7 Afegir 600 ml de tampó d'electroforesi NuPAGE® SDS Running Buffer 1X al compartiment “outer” i 200 ml de tampó d'electroforesi NuPAGE® SDS Running Buffer 1X amb 500 µl antioxidant al compartiment “inner” (preparar immediatament abans de fer la electroforesi).

*** En el cas d'utilitzar gels Tris-Glycine, no és necessari separar 200ml de tampó 1x per afegir els 500 µl d'antioxidant. Aquests gels no necessiten antioxidant.**



9.8 Carregar els µl de mostra al gel i carregar 10 µl del marcador de pes molecular pretenyit.

9.9 Connectar els elèctrodes a la font d'alimentació.

Gels Tris-Acetat - Proteïnes entre 60-250KDa:

Fixar el **voltatge** a **150V**.

Potència aproximada **10-11 W**.

Intensitat de la corrent esperada: **40-55mA/gel** a l'inici i de **25-40mA/gel** al final.

Temps electroforesis a temperatura ambient: ~1hora

Gels Bis-Tris amb tampó MOPS - Proteïnes entre 20-80KDa:

Fixar el **voltatge** a **200V**.

Potència aproximada **10-11 W**.

Intensitat de la corrent esperada: **100-115mA/gel** a l'inici i de **60-70mA/gel** al final.

Temps electroforesi a temperatura ambient: 50min

Gels Bis-Tris amb tampó MES Proteïnes entre 20-80KDa:

Fixar el **voltatge** a **200V**.

Potència aproximada **10-11 W**.

Intensitat de la corrent esperada: **100-115mA/gel** a l'inici i de **60-70mA/gel** al final.

Temps electroforesi a temperatura ambient: 35min

Gels Tris-Glycine (comercials o manuals*) - Proteïnes entre 31-200KDa:

Fixar el **voltatge** a **125V**.

Potència aproximada **10-11 W**.

Intensitat de la corrent esperada: **30-40mA/gel** a l'inici i de **8-12mA/gel** al final.

Temps electroforesi a temperatura ambient: 90min

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

10. Verificació de la tècnica i interpretació de resultats

11. Guia de problemes



| Problema | Possible causa | Solució |
|----------|----------------|---------|
| | | |
| | | |
| | | |

12. Referències

13. Control de la documentació

14. Annexos

10.6. PNT del Western Blot

| | | | |
|---|------------------------|---|----------------------|
|  UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI | |  | |
| Procediment Normalitzat de Treball Metodològic | | | |
| Identificació de proteïnes per Western Blot | | | |
| PNT-PO0703-URLA-23 | | Revisió: 00 | Data: 24-07-2008 |
| 1. Fonament i objectiu | | | |
| <p>Fonament: Aquesta tècnica és una aplicació de l'electroforesi SDS-PAGE. Les proteïnes separades mitjançant electroforesi SDS-PAGE són transferides des del gel a una membrana de nitrocel·lulosa, per capilaritat o mitjançant l'aplicació de corrent elèctric, on poden ser detectades i identificades per hibridació amb anticossos específics, ja que la membrana és una rèplica del patró de les proteïnes separades en el gel.</p> <p>Aquesta és una tècnica qualitativa perquè l'anàlisi dels resultats es basa en l'aparició i visualització de bandes que corresponen a la proteïna estudiada. També pot ser una tècnica semiquantitativa si les bandes visualitzades es processen en un programa d'anàlisi d'imatge en el que es pugui fer una comparativa de la intensitat relativa d'aquestes.</p> <p>Objectiu: Identificar proteïnes específiques procedents d'un homogenat de teixit o un extracte cel·lular.</p> | | | |
| 2. Espècimen | | | |
| Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) on prèviament hem separat proteïnes d'extractes cel·lulars, homogenats de teixit, orina, plasma, etc, pel seu pes molecular. | | | |
| 3. Documentació relacionada | | | |
| PNT AP69. iBlot™. Sistema de transferència en sec. (Laboratoris Clínics – CRB. Hospital Universitari Sant Joan de Reus) | | | |
| 4. Definicions | | | |
| | | | |
| 5. Historial de revisions | | | |
| | | | |
| Modificacions efectuades | | No de Revisió | Data |
| | | | |
| | | | |
| 6. Solucions, reactius i materials | | | |
| | | | |
| Nom de la solució: | Tampó de transferència | | Volum final: 1000 mL |
| pH | Manipulació prèvia: | Conservació: | 4°C |
| Reactiu | Referència marca | / Concentració final | Quantitat (unitats) |
| NuPAGE Transfer Buffer (20X) | | 1X (v/v) | 50 mL |
| NuPAGE Antioxidant | | | 1 mL |
| MeOH ⁽¹⁾ | | 10 % (v/v) | 100 mL |
| H ₂ O MilliQ | | | 849 mL |
| <p>⁽¹⁾ Preparam NuPAGE Transfer Buffer 1X amb un 20% de MeOH si es transfereixen 2 gels per una transferència òptima.</p> | | | |
| Nom de la | TBS 10X ⁽¹⁾ | | Volum final: 1 L |

Annex II

| | | | | |
|--|-----|---------------------|--------------------|---------------------|
| solució: | | | | |
| pH | 7.4 | Manipulació prèvia: | | Conservació: |
| Reactiu | | Referència / marca | Concentració final | Quantitat (unitats) |
| KCl | | | 250 mM (p/v) | 30 g |
| NaCl | | | 1.50 M (p/v) | 80 g |
| Tris | | | 27 mM (p/v) | 2 g |
| H ₂ O MilliQ ⁽²⁾ | | | | 800 mL |

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

⁽²⁾ Pesem tots els reactius i els dissolem en 800 mL d'aigua MilliQ, llavors ajustem el pH de la dissolució amb HCl fins a 7.4 i finalment afegim aigua MilliQ fins a 1L.

| | | | | |
|-------------------------|--|---------------------|--------------------------------|----------------------|
| Nom de la solució: | | Solució de bloqueig | Volum final: | 50 mL ⁽¹⁾ |
| pH | | Manipulació prèvia: | | Conservació: |
| Reactiu | | Referència / marca | Concentració final | Quantitat (unitats) |
| Reactiu de bloqueig ECL | | | 2 % o 4 % ⁽²⁾ (p/v) | 1 g o 2 g |
| Tween 20 | | | 0.1 % (v/v) | 0.05 mL |
| TBS 1X | | | | 50 mL |

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

⁽²⁾ La quantitat de reactiu de bloqueig depèn de l'estratègia de bloqueig de la membrana que volem utilitzar:

- posem 2 % d'ECL si el bloqueig és overnight a 4°C o 1h a temperatura ambient
- posem 4% d'ECL si bloquegem la membrana durant 20 min a temperatura ambient

| | | | | |
|--------------------|--|---------------------|--------------------|-----------------------|
| Nom de la solució: | | Tampó de rentats | Volum final: | 500 mL ⁽¹⁾ |
| pH | | Manipulació prèvia: | | Conservació: |
| Reactiu | | Referència / marca | Concentració final | Quantitat (unitats) |
| 10 % SDS | | | 1 % (v/v) | 5 mL |
| Nonidet p40 | | | 0.5 % | 2.5 mL |
| TBS 1X | | | | 450 mL TBS 1X |

| Material | Capacitat | Tractament Previ | Observacions |
|---------------------------|-----------|------------------|--------------|
| Pipetes pasteur | 3.5 ml | | |
| Pinces per la membrana | | | |
| Estisores per la membrana | | | |
| Roller | | | |
| Cubetes de plàstic | | | |
| Bosses de plàstic | | | |

7. Instrumentació i equips:

| Equip | Ubicació | Núm. Inventari | Núm. PNT-EE | Observacions |
|-------------------|-----------------------------------|----------------|-------------|--------------|
| Balança analítica | 4rt taulell del laboratori URLA 2 | 012415 | | |

| | | | | |
|---|---|------------------------------|--|--|
| pH-metre | 4 ^a poiata laboratori URLA 2 | 012409 | | |
| vórtex | Per les diverses poiates laboratori URLA 1 i 2 | 012420, 012483, 055054 | | |
| Agitador magnètic i calefactor | 4 ^a poiata laboratori URLA 2 | 003672 | | |
| Sistema transferència semihumit XCell II™ Blot Module (invitrogen) | 5 ^a poiata laboratori URLA 1 | | | |
| Agitador | Cambra freda Laboratori d'extraccions. | 012472 | | |
| VERSADOC | 1 ^a poiata laboratori URLA 1 | 083271 | | |
| Agitador orbital | Cambra freda Laboratori d'extraccions. | 003559 | | |

8. Precaucions

9. Procediment

9.1. Preparar 1000 ml de tampó de transferència .

9.2. Transferència blotting (sistema SEMI-WET)

9.2.1 Sumergir els "Sponge Pads" en tampó de transferència

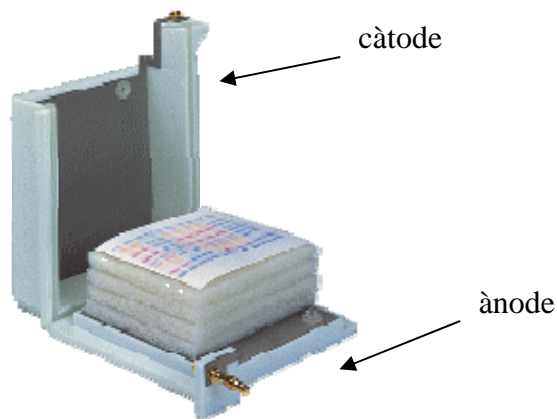
9.2.2 Mullar els papers de transferència i la membrana en el tampó de transferència (**Utilitzar les pinces per manipular els papers i la membrana**)

9.2.3 Muntar el sandvitx al XCell Blot Module

- Col·locar 2 "sponge pads" mullats damunt de l'ànode. Passar el roller mullat amb tampó de transferència per damunt per treure possibles bombolles.
- Col·locar un paper de transferència mullat damunt de les esponges.
- Posar la membrana damunt del paper (s'ha de mantenir el sandvitx tota l'estona humit)
- Posar el gel damunt de la membrana i passar el roller mullat per eliminar bombolles
- Col·locar l'altre paper de transferència**
- Col·locar 2 o 3 "sponge pads" mullats i remullar totes les esponges amb tampó
- Col·locar el càtode damunt del sandvitx i introduir-lo a la cubeta XCell Sure Lock Mini Cell
- Afegir 200ml de tampó de transferència al interior del Blot i 600ml d'aigua destil·lada a la cubeta per evitar el sobre-escalfament mentre dura el procés.

**Si volem transferir dos gels en aquest punt posem una esponja llavors un paper de transferència, una membrana, el 2n gel i un altre paper de transferència, fent així dos sandvitxos i continuem.

Annex II



9.2.4 Connectar la font d'Alimentació

Proteïnes entre 20-80 KDa: (Utilitzem la font de Bio-Rad per que les altres no arriben als mA necessaris)

Fixar el voltatge a 30 V

Potència aproximada 10-11 W

Intensitat de la corrent esperada: 170mA/gel al inici i de 110mA/gel al final.

Temps de transferència a temperatura ambient: aprox 1 hora.

Proteïnes entre 60-250 KDa:

Fixar el voltatge a 30 V

Potència aproximada 10-11 W

Intensitat de la corrent esperada: 220mA/gel al inici i de 180mA/gel al final.

Temps de transferència a temperatura ambient: aprox 1 hora.

9.2.5 Desconnectar la font d'alimentació.

9.3. Hibridació de la membrana

9.3.1 Preparar 15 min abans de que finalitzi la transferència la solució de bloqueig

9.3.2 Recuperar la membrana de nitrocel·lulosa.

9.3.3 Bloquejar la membrana amb la solució de bloqueig. Hi ha diferents estratègies possibles:

- *Overnight* a 4°C (a la cambra freda) amb agitació constant.
- 1 h a temperatura ambient amb agitació constant.
- 20 min a temperatura ambient amb agitació constant.

9.4. Incubació

9.4.1 Netegem la membrana amb TBS1X per treure l'excés de solució de bloqueig.

9.4.2 Incubació amb anticòs primari:

- Preparem una bossa de plàstic de mida ajustada a la membrana o bé un recipient i afegim l'anticòs primari diluït en solució de bloqueig; volum de la solució de l'anticòs en funció de la mida de la membrana i dilució depenent de cada anticòs (1:500, 1:1000, 1:3000, etc.). Segellada amb plàstic amb 1 ml de la solució de bloqueig es suficient, així es gasta menys anticòs.
- Incubar 1h a temperatura ambient (amb agitació suau si es fa amb recipient). Es pot incubar O/N a 4°C amb agitació suau en cas de necessitar augmentar el senyal.

9.4.3 Rentar l'excés d'anticòs amb solució de rentats.

- Fer 6 rentats de 5 min a temperatura ambient i amb agitació

9.4.5 Incubació amb anticòs secundari:

- Preparem una bossa de plàstic de mida ajustada a la membrana o bé un recipient i afegim l'anticòs secundari diluït en solució de bloqueig; volum de la solució de l'anticòs en funció de la mida de la membrana i dilució depenent de cada anticòs (1:5000, 1:10000, 1:20000, etc.).
- Incubar 30 min a temperatura ambient amb agitació suau

9.4.6 Rentar l'excés d'anticòs amb solució de rentats.

- Fer 6 rentats de 5 min a temperatura ambient i amb agitació
- Fer 2 rentats amb TBS 1X de 10 min a temperatura ambient en agitació suau

9.5 Revelat de la membrana (treballar en una habitació fosca)

9.5.1 Temperar els reactius d'ECL a temperatura ambient. Un cop temperats barregem a parts iguals (volum segons tamany de la membrana) les solucions A i B del kit en un tub que prèviament hem folrat amb paper d'alumini per protegir de la llum.

9.5.2 Treure la membrana del TBS, escórrer l'excés sense que s'assequi i posar-la en una safata on es procedirà a impregnar-la amb el reactiu ECL. Dispensem el reactiu ECL per damunt de la membrana amb l'ajuda d'una pipeta pasteur i anem remullant la superfície amb el reactiu durant 5 min, procurant fer-ho homogèniament i sense fer escuma. Escórrer la membrana damunt d'un tros de paper Whatman net

9.5.3 Posem la membrana en la safata del VERSADOC i captem imatges de la quimioluminiscència emesa.

10. Verificació de la tècnica i interpretació de resultats

S'obtenen bandes de diferents pesos moleculars i amb diferents intensitats. Hem d'interpretar les bandes segons el tractament que s'ha fet a les mostres.
 Bandes de pesos majors poden significar proteïna fosforilada, acetilada, etc. O bé la formació de dímers, trimers, etc.
 Podem fer la quantificació de les bandes amb el software Quantity One del VERSADOC (BioRad).

11. Guia de problemes

| Problema | Possible causa | Solució |
|--|--|---|
| Si apareix brutícia de fons a la membrana al revelar | No s'ha bloquejat la membrana de manera adequada | Diluir l'anticòs secundari |
| | | Augmentar el temps de rentat i l'astringència de la solució (posar més detergent, augmentar la força iònica, etc.) |
| | | Augmentar el bloqueig de la membrana |
| Apareixen bandes inespecífiques | Anticòs primari inespecífic | Disminuir la quantitat de proteïna que s'ha carregat |
| | Membrana poc bloquejada | Augmentar el bloqueig de la membrana |
| Hi ha poca intensitat de les bandes | Poca quantitat de proteïna | Augmentar la quantitat de proteïna que s'ha carregat |
| | Temps de incubació del secundari molt curt | Incubar amb secundari O/N |

Annex II

| | | |
|---|---|---|
| Si la transferència no és homogènia | Les esponges poden estar gastades i no fan prou pressió entre la membrana i el gel. | Afegir més esponges o bé canviar les que hi ha per esponges noves |
| Bandes molt grans, com taques en poc temps d'exposició. | Massa proteïna | Carregar menys proteïna |
| | | Diluir més l'anticòs primari |
| | | Diluir més l'anticòs secundari |

12. Referències

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

13. Control de la documentació

14. Annexos



14.1 Transferència en sistema SEC – iBlot (Invitrogen)

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

14.2 Quadre resum de les especificacions per cada proteïna

| | Anticòs PRIMARI | | Anticòs SECUNDARI | | |
|----------------------|-----------------|-----------|-------------------|---------|-----------|
| | DILUCIÓ | INCUBACIÓ | TIPUS | DILUCIÓ | INCUBACIÓ |
| ACTINA | 1:20000 | 1h, TA | anti-GOAT | 1:10000 | 30min, TA |
| Akt | 1:5000 | o/n, 4°C | anti-RABBIT | 1:10000 | 30min, TA |
| pAkt (Ser473) | 1:2000 | o/n, 4°C | anti-RABBIT | 1:10000 | 30min, TA |
| FABP4 | 1:500 | o/n, 4°C | anti-GOAT | 1:10000 | 30min, TA |
| eNOS | 1:1000 | o/n, 4°C | anti-RABBIT | 1:10000 | 30min, TA |
| peNOS | 1:1000 | o/n, 4°C | anti-RABBIT | 1:10000 | 30min, TA |
| p-p44/p42MAPK | 1:10000 | o/n, 4°C | anti-RABBIT | 1:10000 | 30min, TA |
| p44/p42MAPK | 1:20000 | o/n, 4°C | anti-RABBIT | 1:10000 | 30min, TA |

10.7. PNT de l'Extracció de RNA dels extractes cel·lulars

|  | |
|--|---|
|  UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI | |
| Procediment Normalitzat de Treball Metodològic Extracció RNA 6100 | |
| PNT-PO0703-URLA-29 | Revisió: 00 |
| Data: 05-08-2008 | |
| 1. Fonament i objectiu | |
| <p>Extracció de RNA de diferents tipus de teixit, de diferents tipus cel·lulars, etc. Es basa en passar la mostra a través d'una columna amb un filtre, aquest el que fa és retenir l'RNA fins a tirar-li la solució d'elució que farà que es desenganxi.</p> | |
| 2. Espècimen | |
| Hi ha diferents tipus de mostres: Cèl·lules, teixit (fetge, cervell) | |
| 3. Documentació relacionada | |
| | |
| 4. Definicions | |
| | |
| 5. Historial de revisions | |
| | |
| Modificacions efectuades | No de Revisió |
| | |
| | |
| 6. Solucions, reactius i materials | |
| | |
| Nom de la solució: | Buffer de lisi <i>nucleic acid purification</i> |
| pH | Volum final: |
| Manipulació prèvia: | Conservació: |
| Reactiu | Referència / marca |
| Solució de lisi 2x | 4305895/Applied Biosystems |
| PBS sense Ca i Mg | Invitrogen |
| | |
| Nom de la solució: | Solució de rentat I ref. 4305891 |
| pH | Volum final: |
| Manipulació prèvia: | Conservació: |
| Reactiu | Referència / marca |
| | |
| | |
| Nom de la solució: | Solució de rentat II ref. 4305890 |
| pH | Volum final: |
| Manipulació prèvia: | Conservació: |
| Reactiu | Referència / marca |
| | |
| | |
| Nom de la solució: | Solució d'elució ref. 4305893 |
| pH | Volum final: |
| Manipulació prèvia: | Conservació: |
| Reactiu | Referència / marca |
| | |
| | |

Annex II

| Material | Capacitat | Tractament Previ | Observacions |
|--------------------------------|-----------|------------------------|------------------------------------|
| Tubs | 200 uL | Lliures Rnases | |
| Tubs | 1,5-2 ml | Lliures Rnases | |
| Puntes | | Lliures Rnases | Amb filtre |
| Estisores | | Esterilitzar 180°C- 5h | |
| Pinces | | Esterilitzar 180°C- 5h | |
| Paper alumini | | Esterilitzar 180°C- 5h | |
| Splash guard | | | Applied Biosystems ref: 4311758 |
| Total RNA purification tray | | | Applied Biosystems ref: 4305673 |
| 96-well optical reaction plate | | | Applied Biosystems ref: 4306737 |

7. Instrumentació i equips:

| Equip | Ubicació | Núm. Inventari | Núm. PNT-EE | Observacions |
|-----------------|---------------------|----------------|-------------|--------------|
| 6100 | Laboratori 1 | | | |
| Pipetes | Laboratori 1 | | | |
| Balança | Laboratori 2 | | | |
| Homogeneïtzador | Laboratori Nutrició | | | |
| Centrífuga | Laboratori 1 | | | |

8. Precaucions

9. Procediment

Extracció de RNA de teixit:

1. Agafar els tubs necessaris de 2 ml lliures de RNases i afegir-hi 650 µL de 1 X solució de lisi i posar-los en una gradeta en gel.
2. Treure les mostres de teixit del congelador i posar-les en una gradeta en gel.
3. Pesar la quantitat de teixit necessària i posar la mostra ràpidament dins la 1 X solució de lisis en gel.
4. Homogeneïtzar la mostra durant 35 seg. a màxima velocitat i tornar-la a posar en gel.
5. Centrifugar les mostres a 1000 rpm durant 3 min.
6. Mentre es centrifuga, obrir l'aparell, posar les plaques al seu lloc (veure PNT funcionament 6100 Nucleic Acid PrepStation), i afegir a les columnes que s'hagin d'utilitzar 40 µL de solució de rentat I.
7. Posar a les columnes 200 µL de mostra i apretar start.
8. Afegir 500 µL de solució de rentat I i apretar el botó start.
9. Afegir 400 µL de solució de rentat II i apretar el botó start.
10. Posar-hi 300 µL més de solució de rentat II i apretar el botó start.
11. Posar-hi 300 µL més de solució de rentat II i apretar el botó start.
12. Apretar el botó start.
13. Fer un touchoff.
14. Posar la 96-well optical reaction plate en la posició collection.
15. Moure el rack a la posició collection.
16. Afegir-hi 150 µL de la solució d'elució i apretar el botó start.
17. Fer un touchoff.
18. Transferir les mostres de RNA a un tub lliure de RNases.
19. Mirar la concentració de RNA. (Veure PNT determinació de la concentració de RNA)
20. Congelar-lo a -80°C.

Extracció de RNA de cèl·lules :

Lisar cèl·lules en suspensió:



1. Centrifugar les cèl·lules dins el cultiu a <1000 rpm durant 5-10 min. i sense el fre de la centrífuga posat. Si el medi en que estan les cèl·lules, no conté ni calci ni magnesi, llavors es pot afegir directament el mateix volum de 2 X solució de lisis
2. Si el medi conté calci i magnesi llavors el que es fa és separar el medi de les cèl·lules centrifugant, com hem explicat en el punt anterior, es treu el medi vigilant no desfer el pellet i

| <p>s'hi afegeix 250 µL de 1 X solució de lisis.</p> <p>3. Barrejar bé pipetejant amunt i avall.</p> <p>Lisar cèl·lules adherides</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Aspirar el medi de cultiu de tots els pous vigilant no tocar les cèl·lules. Si el medi de cultiu és lliure de Ca²⁺ i Mg²⁺ tu pots afegir directament el mateix volum de 2 X solució de lisis que de cultiu 2. Si no ho és afegir 250 µL 1 X solució de lisis 3. Barrejar les cèl·lules pipetejant amunt i avall. <p>Extracció de RNA</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Seleccionar en l'aparell el programa d'extracció de RNA de cèl·lules. 2. Posar la total RNA purification tray a la posició de waste. 3. Posar en els pous que s'hagin d'utilitzar 40 µL de la solució de rentat I. 4. Afegir de 10-650 µL de la mostra i pulsar el botó start. 5. Afegir 500 µL de la solució de rentat I i apretar start. 6. Posar 400 µL de la solució de rentat II i pulsar start. 7. Posar 400 µL més de la solució de rentat II i tornar a apretar start. 8. Afegir 300 µL de la solució de rentat II i apretar start. 9. Apretar start per assecar el pou. 10. Fer un touch off 11. Canviar de posició la total RNA purification tray i posar-la a la collection. 12. Afegir 150 µL de la solució d'elució i apretar start. 13. Fer un touch off. 14. La mostra queda en la placa de 96, llavors es passa a un tub de 200 µL lliure de RNases. 15. Es congela a -80°C. 16. Mirar la concentració de l'RNA obtingut. | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|-------------------------------------|---------------------------------------|----------|----------------|---------|--------------------------|---------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|--|--|--|--|--|--|
| 10. Verificació de la tècnica i interpretació de resultats | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 11. Guia de problemes | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <table border="1"> <thead> <tr> <th>Problema</th> <th>Possible causa</th> <th>Solució</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="2">Obstrucció d'una columna</td> <td>Massa quantitat RNA</td> <td>Posar menys quantitat d'homogeneïtzat</td> </tr> <tr> <td>Homogeneïtzat amb restes cel·lulars</td> <td>Centrifugar a 1000 rpm durant 3'</td> </tr> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> </tbody> </table> | | | Problema | Possible causa | Solució | Obstrucció d'una columna | Massa quantitat RNA | Posar menys quantitat d'homogeneïtzat | Homogeneïtzat amb restes cel·lulars | Centrifugar a 1000 rpm durant 3' | | | | | | |
| Problema | Possible causa | Solució | | | | | | | | | | | | | | |
| Obstrucció d'una columna | Massa quantitat RNA | Posar menys quantitat d'homogeneïtzat | | | | | | | | | | | | | | |
| | Homogeneïtzat amb restes cel·lulars | Centrifugar a 1000 rpm durant 3' | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 12. Referències | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 13. Control de la documentació | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 14. Annexos | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>1- <u>Esterilitzar pinces i estisores:</u></p> <p>Les pinces, estisores i els trossets de paper d'alumini s'han de posar embolicats amb paper d'alumini a una estufa a 150°C durant 4h, ja que d'aquesta manera eliminem les RNases que pugui tenir.</p> <p>2- <u>Homogeneïtzació:</u></p> <p>Les mostres per homogeneïtzar han d'estar dins el tub amb la solució de lisis.</p> | | | | | | | | | | | | | | | | |

Annex II

El braç de l'homogeneïtzador ha d'estar netejat amb zap per eliminar les Rnases.
Posar el braç de l'homogeneïtzador fins al final del tub i engegar-lo (veure instruccions en el manual de l'aparell) s'ha de posar a màxima velocitat durant 35 segons.
Rentar el braç amb lleixiu, aigua destil·lada, etanol i aigua destil·lada cada vegada que s'hagi de canviar de mostra.

10.8. PNT de la quantificació del RNA per Qubit

| | | | | |
|--|---------------|---|--------------------------------|--------------|
|  UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI | |  | | |
| Procediment Normalitzat de Treball Metodològic | | | | |
| Concentració RNA Qubit | | | | |
| PNT-PO0703-URLA-31 Revisió: 00 | | Data: 29-07-2008 | | |
| 1. Fonament i objectiu | | | | |
| Mirar la concentració de RNA mitjançant fluorescència. | | | | |
| 2. Espècimen | | | | |
| Mostres de RNA | | | | |
| 3. Documentació relacionada | | | | |
| El document PDF del protocol anomenat Quant-iT RNA Assay kits | | | | |
| 4. Definicions | | | | |
| | | | | |
| 5. Historial de revisions | | | | |
| | | | | |
| Modificacions efectuades | No de Revisió | Data | | |
| | | | | |
| | | | | |
| 6. Solucions, reactius i materials | | | | |
| Material | Capacitat | Tractament Previ | Observacions | |
| Tubs | 0,5 ml | | Han de ser especials del Qubit | |
| Puntes | 1000 uL | Lliures de RNases | | |
| | | | | |
| 7. Instrumentació i equips: | | | | |
| | | | | |
| Equip | Ubicació | Núm. Inventari | Núm. PNT-EE | Observacions |
| Vórtex | Laboratori 1 | 055054 | | |
| Qubit | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| 8. Precaucions | | | | |
| | | | | |
| 9. Procediment | | | | |
| <ul style="list-style-type: none"> - Atemptar els reactius - Preparar els tubs necessaris depenent del número de mostres que tinguem per mirar la concentració, més dos tubs pels dos estàndards(Són per calibrar l'aparell) - En un tub fer la solució de treball: que són 199 µl de Quant-iT™ RNA buffer X número de tubs que necessitem + 1 µl de Quant-iT™ RNA reagent (fluorófor) també X número de tubs. (Atenció no fer mai la solució de treball en un tub de vidre) - El volum final de cada tub ha de ser de 200 µl. <p>En el cas dels estàndards s'ha de posar 190 µl de la solució de treball i 10 µl de l'estàndart apropiat. En el cas de les mostres el volum de la solució de treball pot anar desde 180 µl fins a 199 µl i la resta,</p> | | | | |

Annex II

fins a 200 µl, de la mostra corresponent.

- Fem un vòrtex de 2-3 segons.
- Incubem a temperatura ambient durant 2 min.
- Obrim l'aparell.
- S'apreta el botó HOME i amb els botons ▲ i ▼ arribar fins al programa Quant-iT™ RNA , apretar GO.
- Llavors l'aparell ja anirà demanant el que vol: primer els estandarts i després les mostres. Cada vegada que es posi un tub dins seguidament apretar GO perquè llegeixi.
- Quan s'ha acabat de llegir, s'ha de calcular la concentració:

$$\text{Concentration of your sample} = \text{QF value} \times \frac{(200)}{X}$$

On:

QF= Al valor que et dona l'aparell

X = Al microlitres que s'han afegit de mostra

10. Verificació de la tècnica i interpretació de resultats

11. Guia de problemes

| Problema | Possible causa | Solució |
|----------|----------------|---------|
| | | |
| | | |
| | | |

12. Referències

13. Control de la documentació

14. Annexos

Annex II

8. Precaucions

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

9. Procediment

9.1 Preparació de la placa

9.1.1. Fer una plantilla de com quedarà la placa, ja que és més fàcil muntar la placa. Recordar que sempre s'hi ha de posar com a mínim un control endogen. Exemple: en aquest cas el control endogen és el GAPDH

| | | | | | | | | | | | | |
|---|-----|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | NTC | 01 GAPDH | 01 GAPDH | 01 GAPDH | 02 GAPDH | 02 GAPDH | 02 GAPDH | 03 GAPDH | 03 GAPDH | 03 GAPDH | | |
| B | NTC | 04 GAPDH | 04 GAPDH | 04 GAPDH | 05 GAPDH | 05 GAPDH | 05 GAPDH | 06 GAPDH | 06 GAPDH | 06 GAPDH | | |
| C | NTC | 01 eNOS | 01 eNOS | 01 eNOS | 02 eNOS | 02 eNOS | 02 eNOS | 03 eNOS | 03 eNOS | 03 eNOS | | |
| D | NTC | 04 eNOS | 04 eNOS | 04 eNOS | 05 eNOS | 05 eNOS | 05 eNOS | 06 eNOS | 06 eNOS | 06 eNOS | | |
| E | NTC | 01 VCAM1 | 01 VCAM1 | 01 VCAM1 | 02 VCAM1 | 02 VCAM1 | 02 VCAM1 | 03 VCAM1 | 03 VCAM1 | 03 VCAM1 | | |
| F | NTC | 04 VCAM1 | 04 VCAM1 | 04 VCAM1 | 05 VCAM1 | 05 VCAM1 | 05 VCAM1 | 06 VCAM1 | 06 VCAM1 | 06 VCAM1 | | |
| G | NTC | 01 E-sel | 01 E-sel | 01 E-sel | 02 E-sel | 02 E-sel | 02 E-sel | 03 E-sel | 03 E-sel | 03 E-sel | | |
| H | NTC | 04 E-sel | 04 E-sel | 04 E-sel | 05 E-sel | 05 E-sel | 05 E-sel | 06 E-sel | 06 E-sel | 06 E-sel | | |

9.2. Fer un mix per cada gen que s'hagi de mirar l'expressió tenint en compte que per cada mostra s'han de fer triplicats i a més s'ha de posar un control negatiu per comprovar que no hi ha cap reactiu caducat. Exemple: si tenim 12 mostres, el càlcul que hem de fer es mostra en la següent taula:

PCR tr fet amb el kit d'applied Biosystems

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

Programa de la PCRtr:

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

9.3. Quan s'hagi fet el mix barrejar bé i fer un pols, aliquotar el mix de cada gen posant 9 µl en cada pou. Quan estigui tot dispensat (cada mix al seu pou corresponent) afegir les mostres de cDNA 1 µl en cada pou. En els controls pensar a posar la mateixa quantitat que de mostra, però amb aigua lliure de RNases.

9.4. Quan estigui acabat tapar amb un adhesive cover sobretot amb la espàtula de plàstic. Ja que l'aparell llegeix la fluorescència per la part de sobre de la placa, per tant mai tocar-la amb els dits!!!

9.5. Centrifugar les plaques amb la centrífuga de plaques.

| 9.6. Ja està preparat per posar a l'aparell. | | | | | | | | | | | | | | |
|---|----------------|---------|----------|----------------|---------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| 9.7 Utilitzar el programa: | | | | | | | | | | | | | | |
| 9.7.1. Obrir el SDS 2.3, quan estigui obert seleccionar: File new: dins d'aquí seleccionar 96 wells i $\Delta\Delta Ct(RQ)$ i apretar a OK. | | | | | | | | | | | | | | |
| 9.7.2. Add markers, que és dir-li al programa quins gens estem utilitzant si ja estan entrats escollir els markers i apretar "copy to the plate document" si no, apretar new i omplir les caselles amb el nom del teu marcador. | | | | | | | | | | | | | | |
| 9.7.3. Una vegada escollits els marcadors, dissenyar la placa. | | | | | | | | | | | | | | |
| 9.7.4. Una vegada dissenyada, dir-li quin dels gens és el control endogen. | | | | | | | | | | | | | | |
| 9.7.5. Quan estigui fet, anar-se'n a "Instrument", sortiran 3 pestanyetes: a la "Thermal Cycler" canviar els microlitres de la reacció (posar 10) i mirar que estigui marcat fast . Guardar el fitxer dins la carpeta. | | | | | | | | | | | | | | |
| 9.7.6. Llavors anar a la pestanyeta "Real Time" clicar "connect to the instrument" i quan estigui conectat apretar "open/close" s'obrirà l'aparell i posarem la placa (el codi de barres cap al davant) tornar a clicar "open/close" i es tancarà l'aparell. Apretar Start. | | | | | | | | | | | | | | |
| 9.7.7. L'aparell està corrent uns 30'. | | | | | | | | | | | | | | |
| 9.7.8. Quan hagi acabat posarà un missatge dient que el run és OK. | | | | | | | | | | | | | | |
| 9.7.9. Ara es pot analitzar el resultat apretant la fletxa verda. En aquest primer anàlisi es poden veure si els triplicats són bons o no. | | | | | | | | | | | | | | |
| 9.7.10. Tornar a la pestanya de Real Time i tornar a open/close per treure la placa de dins l'aparell i tornar a tancar. | | | | | | | | | | | | | | |
| 9.7.11. A partir d'aquí es poden fer altres plaques o tancar el programa i gravar-nos el resultat per analitzar-lo | | | | | | | | | | | | | | |
| 9.8 Analitzar els resultats: | | | | | | | | | | | | | | |
| 9.8.1. Obrir el programa RQ manager. | | | | | | | | | | | | | | |
| 9.8.2. Afegir totes les plaques que vulguem analitzar juntes. Quan les tinguem totes juntes, analitzar (es pot fer tant manualment con dir-li que ho faci el software). Quan ho hagi analitzat s'han d'exportar els resultats. | | | | | | | | | | | | | | |
| 9.8.3. Exportant els resultats es genera un document amb format text. Que es pot obrir amb un excel, allí ordenem els resultats i els passem al document d'anàlisis. | | | | | | | | | | | | | | |
| 10. Verificació de la tècnica i interpretació de resultats | | | | | | | | | | | | | | |
| 11. Guia de problemes | | | | | | | | | | | | | | |
| <table border="1"><thead><tr><th>Problema</th><th>Possible causa</th><th>Solució</th></tr></thead><tbody><tr><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td></td><td></td><td></td></tr></tbody></table> | | | Problema | Possible causa | Solució | | | | | | | | | |
| Problema | Possible causa | Solució | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| 12. Referències | | | | | | | | | | | | | | |
| 13. Control de la documentació | | | | | | | | | | | | | | |
| 14. Annexos | | | | | | | | | | | | | | |
| En el nostre cas, Utilitzar el GAPDH com a control endogen. | | | | | | | | | | | | | | |

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FABP4 I BIOMARCADORS DE LA DISFUNCIÓ ENDOTELIAL. ESTUDI CLÍNIC I IN VITRO

Gemma Aragonès Bargalló

ISBN:978-84-693-8853-2/DL:T.1951-2010

11. Annex III

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FABP4 I BIOMARCADORS DE LA DISFUNCIÓ ENDOTELIAL. ESTUDI CLÍNIC I IN VITRO

Gemma Aragonès Bargalló

ISBN:978-84-693-8853-2/DL:T.1951-2010



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Atherosclerosis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/atherosclerosis



Fatty acid-binding protein 4 is associated with endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes

Gemma Aragonès, Raimon Ferré, Iolanda Lázaro, Anna Cabré, Núria Plana, Jordi Merino, Mercedes Heras, Josefa Girona, Lluís Masana*

Research Unit on Lipids and Atherosclerosis, Universitat Rovira i Virgili, Internal Medicine Department, Sant Joan University Hospital, IISPV. CIBER of Diabetes and Associated Metabolic Diseases (CIBERDEM), Reus, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 April 2010
Received in revised form 20 July 2010
Accepted 20 July 2010
Available online xxx

Keywords:

FABP4
Endothelial function
Type 2 diabetes
Reactive hyperemia
Inflammatory markers
Oxidative markers
Cardiovascular risk

ABSTRACT

Objective: Adipocyte fatty acid-binding protein (FABP4) plasma levels are higher in type 2 diabetes (T2D). Endothelial dysfunction is also common in T2D. We have investigated the relationship between circulating FABP4 levels and endothelial function in diabetic patients.

Methods: In 257 patients (105 diabetic and 152 non-diabetic) at increased risk of cardiovascular disease, we measured circulating FABP4, reactive hyperemia index (RHI) by peripheral artery tonometry, intima-media thickness, and biomarkers of inflammation, oxidation and endothelial function.

Results: In T2D subjects, FABP4 was negatively associated with endothelial function, as measured by RHI ($r = -0.226$, $P = 0.05$). In a stepwise multivariate linear regression model, FABP4 was a predictor of RHI in T2D patients ($P = 0.04$).

Conclusion: Circulating levels of FABP4 are inversely associated with endothelial function in T2D patients, as measured by RHI. We suggest a direct effect of plasma FABP4 on the vascular endothelium in those with T2D.

© 2010 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The adipose fatty acid-binding protein (FABP), also known as FABP4 and aP2, is one of the best characterised intracellular lipid transport proteins. It is expressed in adipocytes and macrophages [1]. A recent study has shown that FABP4 is expressed in microvascular endothelial cells [2]. It appears to function primarily as a cytoplasmic chaperone of long chain fatty acids; it transports them to other sub-cellular compartments for metabolism, secretion [3] or translocation to the nucleus to regulate the function of transcription factors, such as PPAR γ [4]. FABP4 knock-out mice are protected against hyper-insulinemia and insulin resistance induced by obesity [1]. FABP4 $-/-$ mice in an apo E $-/-$ background show delayed development of arteriosclerotic plaques [1]. FABP4 is also found circulating in plasma; however, neither its secretion pathways nor its functions are known. Our group and others have shown that FABP4 plasma concentrations are increased in patients with obesity, metabolic syndrome (MS), type 2 diabetes (T2D), familial combined hyperlipidemia or lipodystrophy syndromes [5–9]. FABP4 levels have also been associated with the presence of cardio-

vascular disease. However, FABP4's causal role in these processes has not been established. There is indirect evidence that circulating FABP4 could promote inflammation and mediate insulin resistance and atherogenic dyslipidemia; circulating FABP4 has also been associated with carotid intima-media thickness and coronary atheroma [10]. It has recently been demonstrated that FABP4 has a direct impact on myocardial muscle cells by decreasing their contractility [11]. This finding suggests that circulating FABP4 could also have a direct effect on peripheral cells and tissues. One hypothesis is that the elevated FABP4 plasma concentrations observed in patients with obesity, MS and T2D could account for the accelerated arterial damage seen in these conditions. Endothelial dysfunction is a common finding in the above mentioned metabolic diseases. Several factors, such as insulin resistance, dyslipidemia, hypertension, hyperglycaemia, abdominal obesity and low-grade inflammation, have been associated with endothelial dysfunction in subjects with T2D [12], but the exact cause of this alteration is not clear. Despite the strong evidence relating endothelial dysfunction and cardiovascular risk, an assessment of endothelial function is not usually performed at the clinical level [13], primarily because of technical difficulties. Reactive hyperemia index (RHI), which is measured by peripheral artery tonometry (PAT), is a non-invasive, reproducible and reliable method used to assess endothelial function in clinical settings. In this work, we have explored the relationship between FABP4 plasma levels and endothelial function assessed by RHI in diabetics and non-diabetics at elevated cardiovascular risk.

* Corresponding author at: Vascular Medicine and Metabolism Unit, Research Unit on Lipids and Atherosclerosis, Sant Joan University Hospital, Universitat Rovira i Virgili. C. Sant Joan S/N, 43201 Reus, Spain. Tel.: +34 977759366; fax: +34 977759322.
E-mail address: luis.masana@urv.cat (L. Masana).

Table 1

Clinical, metabolic, biochemical and vascular function parameters according to diabetes status.

| Characteristic | All CVR patients (n = 257) | Non-T2D (n = 152) | T2D (n = 105) | P |
|------------------------------------|----------------------------|-------------------------|------------------------|---------|
| Women, % | 29.6 | 28.9 | 30.5 | 0.792 |
| Age, years | 57.29 ± 10.66 | 55.38 ± 11.06 | 60.07 ± 9.44 | <0.0001 |
| Systolic blood pressure, mm Hg | 137.99 ± 16.88 | 136.22 ± 14.66 | 140.55 ± 19.44 | 0.043 |
| Diastolic blood pressure, mm Hg | 83.51 ± 10.72 | 83.42 ± 11.06 | 83.63 ± 10.27 | 0.879 |
| Body mass index, kg/m ² | 31.11 ± 4.41 | 30.22 ± 4.06 | 32.43 ± 4.60 | <0.0001 |
| Waist circumference, cm | 103.83 ± 10.62 | 101.91 ± 9.72 | 106.70 ± 11.29 | <0.0001 |
| Total cholesterol, mmol/l | 5.10 ± 1.13 | 5.33 ± 1.08 | 4.77 ± 1.12 | <0.0001 |
| Triglycerides, mmol/l | 1.89 (1.20–2.97) | 1.88 (1.22–2.77) | 1.94 (1.11–3.23) | 0.596 |
| LDL, mmol/l | 3.19 ± 0.94 | 3.44 ± 0.93 | 2.84 ± 0.85 | <0.0001 |
| HDL, mmol/l | 1.40 ± 0.30 | 1.43 ± 0.30 | 1.36 ± 0.28 | 0.061 |
| Glucose, mmol/l | 6.80 ± 2.10 | 5.80 ± 1.18 | 8.24 ± 2.29 | <0.0001 |
| HbA1c, % | 6.37 ± 1.16 | 5.35 ± 0.59 | 6.74 ± 1.09 | <0.0001 |
| Creatinine, μmol/l | 84.00 (71.00–93.00) | 85.00 (75.00–93.00) | 82.50 (70.25–91.75) | 0.412 |
| FABP4, ng/ml | 26.02 (19.39–7.99) | 25.30 (17.77–35.81) | 29.22 (21.52–39.64) | 0.069 |
| ICAM-1, ng/ml | 71.11 (28.50–181.04) | 70.20 (28.95–182.85) | 78.33 (27.94–175.32) | 0.908 |
| VCAM-1, ng/ml | 833.34 (394.61–1328.40) | 791.24 (339.30–1265.50) | 984.86 (459.73–1430.0) | 0.082 |
| E-selectin, ng/ml | 23.88 (10.77–43.03) | 21.01 (9.79–37.96) | 27.53 (13.73–48.63) | 0.036 |
| IL-6, pg/ml | 47.66 (24.00–149.67) | 44.91 (24.00–143.89) | 53.33 (24.00–155.54) | 0.754 |
| TNFα, pg/ml | 143.77 (24.00–502.08) | 129.31 (24.00–476.25) | 158.13 (36.17–549.91) | 0.395 |
| HsCRP, mg/l | 1.44 (0.76–3.87) | 1.33 (0.66–3.42) | 1.69 (0.84–4.50) | 0.259 |
| Ab ox-LDL, U/ml | 16.27 (14.33–19.47) | 16.22 (14.51–19.56) | 16.31 (14.13–19.14) | 0.497 |
| ox-LDL/LDL, U/mmol | 56.05 (45.62–68.60) | 54.87 (44.29–67.94) | 58.02 (47.47–69.75) | 0.175 |
| RHI | 1.58 (1.45–1.88) | 1.58 (1.46–1.89) | 1.58 (1.45–1.86) | 0.884 |
| CCA mean, mm | 0.75 (0.66–0.87) | 0.75 (0.66–0.88) | 0.75 (0.64–0.86) | 0.836 |
| IMT mean, mm | 0.79 (0.70–0.88) | 0.80 (0.70–0.88) | 0.79 (0.70–0.90) | 0.847 |
| IMT max, mm | 1.10 (0.99–1.25) | 1.10 (0.99–1.25) | 1.10 (0.96–1.26) | 0.920 |
| ABI | 1.02 (0.93–1.10) | 1.03 (0.94–1.11) | 1.01 (0.92–1.08) | 0.607 |

Normally distributed data are presented as mean ± SD or percentage of patients. Non-normally distributed data are presented as the median (25th percentile–75th percentile). P-value: the difference among non-T2D and T2D using one-way ANOVA or Mann–Whitney U-test. Abbreviations: CVR, cardiovascular risk; T2D, type 2 diabetes; LDL, low-density lipoprotein; HDL, high-density lipoprotein; FABP4, fatty acid-binding protein 4; sICAM-1, soluble intercellular adhesion molecule 1; sVCAM-1, soluble vascular cell adhesion molecule-1; sE-selectin, soluble E-selectin; IL-6, interleukin 6; TNFα, tumor necrosis factor α; HsCRP, Hs C-reactive protein; ox-LDL/LDL, oxidized low-density lipoprotein/LDL; Ab ox-LDL, oxidized low-density lipoprotein antibodies; RHI, reactive hyperemia index; CCA, carotid common artery; IMT, intima-media thickness; ABI, ankle brachial index.

2. Subjects and methods

2.1. Subjects

Two hundred and fifty-seven men and women, aged 22–80 years, with no evidence of cardiovascular disease but with T2D or intermediate global cardiovascular risk (CVR) were included in the study. Complete physical examination, anthropometry, CVR assessment, vascular function and imaging studies were performed. The study was approved by the Ethical and Clinical Investigation Committee of the hospital, and all participants signed the written consent form.

2.2. Biochemical and biomarker determinations

Plasma levels of FABP4 were assessed using commercial kits (Bio Vendor Laboratory Medicine Inc., Brno, Czech Republic). Results were expressed as ng/ml. The performance characteristics of this assay were <5% CV intra-assay and <8% inter-assay.

Differential expression of inflammatory cytokines (sVCAM-1, sICAM-1, sE-Selectin, TNFα and IL-6) was determined using the Human Cytokine Antibody Array (RayBiotech, Norcross, GA, USA).

Oxidized low-density lipoproteins (ox-LDL) in plasma were measured by the Mercodia Oxidized LDL ELISA, a solid-phase two-site enzyme immunoassay (Mercodia AB, Uppsala, Sweden). The ox-LDL-antibodies (Ab ox-LDL) were determined using the enzyme immunoassay (IMTEC Immunodiagnostika GmbH, Berlin, Germany).

2.3. Vascular function and imaging studies

The endothelial function was assessed using the EndoPAT-2000 (Itamar Medical Ltd., Israel). This method compares the pulse wave amplitude in two fingertips, one on each hand, before and after

five minutes of brachial ischemia in one of the arms (test arm). The obtained value is referred to RHI.

The carotid intima-media thickness (IMT) was evaluated by B-mode ultrasonography using an Acuson Sequoia 512 sonograph (Siemens Medical Solutions, Erlangen, Germany).

The lowest value of the ankle/arm SBP ratio measured with an 8 MHz continuous wave Doppler probe (Hadeco Mini Doppler Es 100X) was recorded as the ABI index.

2.4. Statistical analysis

All data were tested for normality using the Kolmogorov–Smirnov test. Continuous variables are presented as the mean ± SD for normally distributed data, as the median (25th percentile–75th percentile) for non-normally distributed data and as frequencies (n) or percentages (%) for categorical variables. Comparisons between groups were analyzed by one-way ANOVA or the Mann–Whitney U-test. Differences in FABP4 tertile groups according to diabetes status were tested using the chi-square test. Univariate association of FABP4 with anthropometric, biochemical and vascular variables was tested by Spearman or Pearson correlation analysis. To account for inflation of the experiment-wise type 1 error resulting from multiple testing, we implemented the Bonferroni test. After this adjustment, a $P \leq 0.05$ was considered statistically significant. The predictors for stepwise regression analysis were based on correlation analysis and selected from the variables known to be associated with the dependent variable. Analyses were performed using SPSS (version 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL). A $P \leq 0.05$ was considered as statistically significant.

3. Results

The clinical and biochemical characteristics of the 257 patients distributed according to T2D status is summarised in Table 1.

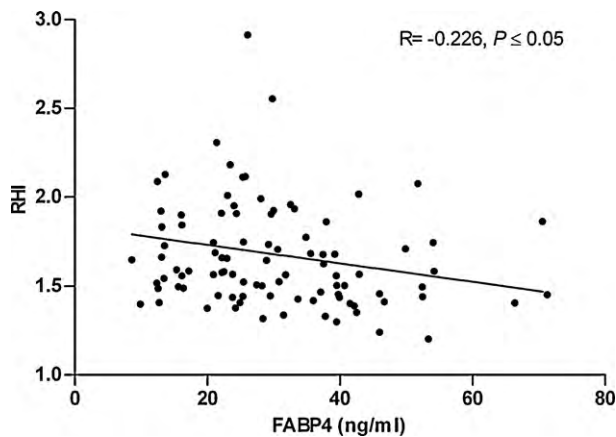


Fig. 1. Relationship between fatty acid-binding protein 4 (FABP4) and RHI in subjects with T2D. Univariate association was tested by Pearson correlation analysis. Results remained statistically significant at $P \leq 0.05$ after we adjusted for α inflation caused by multiple testing.

FABP4 plasma concentrations tended to be higher in T2D patients ($P=0.069$). When the study population was divided into tertiles by FABP4 levels, the upper tertiles contained a significantly higher percentage of subjects with T2D than without it (24.8%, 36.2%, 39.0% vs. 38.8%, 31.6%, 29.6% respectively; $P=0.05$).

FABP4 correlations with age, body mass index (BMI), waist circumference, ICAM-1, VCAM-1, E-selectin, IL-6, TNF α , HsCRP, Ab ox-LDL, ox-LDL/LDL, RHI, CCA mean, IMT mean, IMT max and ABI were assessed in patients with and without T2D. In T2D patients, we observed a significant positive association with Ab ox-LDL ($r=0.251$, $P=0.02$) and a significant negative association with RHI ($r=-0.226$, $P=0.05$) (Fig. 1). This correlation remained significant after adjusting for age, gender and BMI ($P=0.05$).

A linear regression model, which included age, gender, BMI, total cholesterol, triglycerides, glucose, sE-selectin, Ab ox-LDL and Hs C-reactive protein as independent variables, revealed that FABP4 was the only variable associated with RHI levels (inverse) in T2D patients ($R^2=0.034$, $P=0.04$).

4. Discussion

The main finding of our study was that circulating FABP4 levels are inversely associated with peripheral reactive hyperemia, a subrogated marker of endothelial dysfunction, in T2D patients. Multivariate analysis revealed that plasma FABP4 was the only determinant of endothelial dysfunction in T2D. This finding could reflect a direct impact of FABP4 on vascular function in this group of patients.

We also observed a significant correlation between FABP4 and Ab ox-LDL in T2D patients. These results suggest that FABP4 may be related to lipid oxidation, which is one of the main pathophysiological mechanisms leading to endothelial dysfunction.

The role of circulating FABP4 remains unknown. Because some metabolic alterations can be associated with an increase in the plasma concentration of FABP4, it could be considered as a hazard to peripheral tissues. It has recently been shown that FABP4 levels cause direct harm to myocardiocytes, which could contribute to myocardial dysfunction in situations where FABP4 is increased [11]. Our results support the hypothesis that circulating FABP4 is not only a biochemical marker but also an effector of vascular damage in T2D. Other groups have shown that FABP4 is associated with the presence of clinical and subclinical arteriosclerosis [10,14,15]. By connecting FABP4 with endothelial dysfunction, our results provide more information about the relationship between FABP4 and

arterial lesions. Although our data cannot establish a causal effect, we speculate that FABP4 may injure the endothelium.

FABP4 was associated with Ab ox-LDL in diabetic patients. Lipid oxidation appears to promote endothelial dysfunction; thus, we cannot exclude an interaction FABP4, oxidation and RHI alteration. On the other hand, it has been argued that FABP4 has a possible antioxidant effect at cellular level. However, Ab ox-LDL was not correlated to RHI in either binary or logistic correlation studies, and the association between FABP4 and RHI remained after adjusting for Ab ox-LDL.

This study has several limitations. Because it was cross-sectional, it allowed us to detect correlations but not to formulate predictions. To assess the clinical relevance of plasma FABP4 levels, prospective studies are needed.

In summary, we have demonstrated for the first time that circulating FABP4 levels are associated with endothelial dysfunction, as assessed by RHI, in T2D. If a causal relationship can be established, FABP4 plasma concentrations could be a therapeutic target for the prevention of vascular damage in T2D patients.

Conflict of interest

None.

Acknowledgments

This work was supported by grants from ISCIII, Madrid, Spain (PI 051954, PI 081409, FEDER). CIBERDEM are initiatives of ISCIII, Spain.

References

- [1] Makowski L, Boord JB, Maeda K, et al. Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis. *Nat Med* 2001;7:699–705.
- [2] Elmasri H, Karaaslan C, Teper Y, et al. Fatty acid binding protein 4 is a target of VEGF and a regulator of cell proliferation in endothelial cells. *FASEB J* 2009;23:3865–73.
- [3] Fu Y, Luo L, Luo N, Garvey WT. Lipid metabolism mediated by adipocyte lipid binding protein (ALBP/aP2) gene expression in human THP-1 macrophages. *Atherosclerosis* 2006;188:102–11.
- [4] 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.
- [5] Cabre A, Lazaro I, Cofan M, et al. FABP4 plasma levels are increased in familial combined hyperlipidemia. *J Lipid Res* 2009.
- [6] Cabre A, Lazaro I, Girona J, et al. Fatty acid binding protein 4 is increased in metabolic syndrome and with thiazolidinedione treatment in diabetic patients. *Atherosclerosis* 2007;195:e150–8.
- [7] Cabre A, Lazaro I, Girona J, et al. Plasma fatty acid-binding protein 4 increases with renal dysfunction in type 2 diabetic patients without microalbuminuria. *Clin Chem* 2008;54:181–7.
- [8] Cabre A, Lazaro I, Girona J, et al. Plasma fatty acid binding protein 4 is associated with atherogenic dyslipidemia in diabetes. *J Lipid Res* 2008;49:1746–51.
- [9] Coll B, Cabre A, Alonso-Villaverde C, et al. The fatty acid binding protein-4 (FABP4) is a strong biomarker of metabolic syndrome and lipodystrophy in HIV-infected patients. *Atherosclerosis* 2008;199:147–53.
- [10] Yeung DC, Xu A, Cheung CW, et al. Serum adipocyte fatty acid-binding protein levels were independently associated with carotid atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:1796–802.
- [11] Lamounier-Zepter V, Look K, Alvarez J, et al. Adipocyte fatty acid-binding protein suppresses cardiomyocyte contraction: a new link between obesity and heart disease. *Circ Res* 2009;105:326–34.
- [12] Jansson PA. Endothelial dysfunction in insulin resistance and type 2 diabetes. *J Intern Med* 2007;262:173–83.
- [13] Ter Avest E, Stalenhoef AF, de Graaf J. What is the role of non-invasive measurements of atherosclerosis in individual cardiovascular risk prediction? *Clin Sci (Lond)* 2007;112:507–16.
- [14] Miyoshi T, Onoue G, Hirohata A, et al. Serum adipocyte fatty acid-binding protein is independently associated with coronary atherosclerotic burden measured by intravascular ultrasound. *Atherosclerosis* 2010;211:164–9.
- [15] Rhee EJ, Lee WY, Park CY, et al. The association of serum adipocyte fatty acid-binding protein with coronary artery disease in Korean adults. *Eur J Endocrinol* 2009;160:165–72.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FABP4 I BIOMARCADORS DE LA DISFUNCIÓ ENDOTELIAL. ESTUDI CLÍNIC I IN VITRO

Gemma Aragonès Bargalló

ISBN:978-84-693-8853-2/DL:T.1951-2010

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

FABP4 I BIOMARCADORS DE LA DISFUNCIÓ ENDOTELIAL. ESTUDI CLÍNIC I IN VITRO

Gemma Aragonès Bargalló

ISBN:978-84-693-8853-2/DL:T.1951-2010