



ORIGINAL

Interacción de FABP4 con proteínas de membrana de células endoteliales[☆]



Paula Saavedra, Josefa Girona, Gemma Aragonès, Anna Cabré, Sandra Guaita, Mercedes Heras y Lluís Masana*

Unitat de Recerca en Lípids i Arteriosclerosi, Universitat Rovira i Virgili, Departament de Medicina Interna, Hospital Universitari Sant Joan de Reus, IISPV, CIBERDEM, Reus, Tarragona, España

Recibido el 1 de abril de 2014; aceptado el 14 de mayo de 2014
Disponible en Internet el 16 de julio de 2014

PALABRAS CLAVE

FABP4;
Células endoteliales;
Membrana celular;
Receptor

Resumen

Introducción: *Fatty acid-binding protein 4* (FABP4) es una adipocina secretada por el tejido adiposo implicada en la regulación del metabolismo energético y la inflamación. FABP4 circulante se asocia con obesidad, dislipidemia aterogénica y síndrome metabólico. Estudios recientes muestran una asociación entre FABP4 circulante y disfunción endotelial, aunque se desconoce cómo se produce esta. El objetivo de este trabajo es estudiar la interacción entre FABP4 con las proteínas de la membrana citoplasmática en células endoteliales.

Metodología: Se incubaron células HUVEC con y sin FABP4 (100 ng/ml) durante 5 min. La inmunolocalización de FABP4 se estudió mediante microscopia confocal. Para estudiar las interacciones de FABP4 con las proteínas de membrana de las células HUVEC se diseñó una estrategia que combina incubaciones con o sin 6XHistidine-tag FABP4 (FABP4-His) (100 ng/ml), *cross-linking* con formaldehído, extracción de proteínas de membrana y western blot.

Resultados: Los resultados muestran que FABP4 colocaliza con CD31, una proteína utilizada como marcador de membrana citoplasmática. Además se observan diferentes patrones de western blot en función de la incubación con o sin FABP4-His. El inmunoblot revela la existencia de 3 complejos proteicos de aproximadamente 108, 77 y 33 kDa formados por FABP4 exógena y su posible receptor/es.

Discusión: Los resultados obtenidos apoyan la existencia de un complejo proteico capaz de unir FABP4 a las células endoteliales mediante una unión específica. Además, nos permiten avanzar en el conocimiento de los efectos moleculares de FABP4 y, en caso de confirmarse, podrían utilizarse como diana terapéutica para prevenir enfermedades cardiovasculares.

© 2014 Sociedad Española de Arteriosclerosis. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

[☆] Una comunicación referente a esta línea de trabajo, titulada «Interacción de FABP4 con proteínas de membrana en células endoteliales», fue presentada en el XXV Congreso Nacional de la SEA-Reus 2012 y galardonada con una mención especial.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: luís.masana@urv.cat (L. Masana).

KEYWORDS

FABP4;
Endothelial cells;
Plasma membrane;
Receptor

Interaction of FABP4 with plasma membrane proteins of endothelial cells**Abstract**

Introduction: Fatty acid binding protein (FABP4) is an adipose tissue-secreted adipokine implicated in the regulation of the energetic metabolism and inflammation. High levels of circulating FABP4 have been described in people with obesity, atherogenic dyslipidemia, diabetes and metabolic syndrome. Recent studies have demonstrated that FABP4 could have a direct effect on peripheral tissues and, specifically, on vascular function. It is still unknown how the interaction between FABP4 and the endothelial cells is produced to prompt these effects on vascular function. The objective of this work is studying the interaction between FABP4 and the plasma membrane proteins of endothelial cells.

Methodology: HUVEC cells were incubated with and without FABP4 (100 ng/ml) for 5 minutes. Immunolocalization of FABP4 was studied by confocal microscopy. The results showed that FABP4 colocalizes with CD31, a membrane protein marker.

A strategy which combines 6XHistidine-tag FABP4 (FABP4-His), incubations with or without FABP4-His (100 ng/ml), formaldehyde cross-linking, cellular membrane protein extraction and western blot, was designed to study the FABP4 interactions with membrane proteins of HUVECs.

Results: The results showed different western blot profiles depending of the incubation with or without FABP4-His. The immunoblot revealed three covalent protein complexes of about 108, 77 and 33 kDa containing FABP4 and its putative receptor.

Discussion: The existence of a specific binding protein complex able to bind FABP4 to endothelial cells is supported by these results. The obtained results will permit us advance in the molecular knowledge of FABP4 effects as well as use this protein and its receptor as therapeutic target to prevent cardiovascular.

© 2014 Sociedad Española de Arteriosclerosis. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

La *fatty acid-binding protein 4* (FABP4; adipocyte-FABP; aP2) es un miembro de la familia de proteínas intracelulares que se unen a ácidos grasos (FABP)¹. Las FABP pertenecen a una familia multigénica con al menos 9 tipos distintos de proteínas que codifican para proteínas de ~15 kDa formadas por 126-134 aminoácidos, y que tienen una expresión específica de tejido^{1,2}.

La estructura génica de la familia de las FABP está altamente conservada entre los miembros estudiados. Además, esta conservación también se mantiene con otros miembros de la familia multigénica de proteínas que se unen a lípidos. Las FABP se expresan abundantemente (1-5% proteínas citosólicas) en células involucradas activamente en el metabolismo lipídico. Los miembros de esta familia presentan un patrón de expresión tejido-específica y se nombran según el tejido en el que fueron identificados por primera vez³.

Las FABP son capaces de unir una gran variedad de ligandos hidrofóbicos, como por ejemplo ácidos grasos de cadena larga, eicosanoides, leucotrienos y prostaglandinas⁴⁻⁶. Sin embargo, la secuencia divergente entre los miembros de esta familia confiere a las proteínas pequeñas diferencias en cuanto a las propiedades de unión a ligandos y también define diferentes patrones de interacción proteína-proteína dependiendo del contexto celular. Se ha visto que las FABP adipocitaria, epitelial y cardíaca interactúan con la lipasa sensible a hormonas, mientras que la intestinal y la hepática no interactúan con ella^{3,7}. Se sabe también que la FABP4 interactúa con JAK2 de una manera ácido graso-dependiente, estableciendo un nuevo rol para FABP4

como sensor de ácidos grasos y afectando al metabolismo celular mediante interacciones proteína-proteína⁸.

La FABP4 se expresa predominantemente en el tejido adiposo y en macrófagos, y juega un papel importante en el metabolismo lipídico e inflamación de ambos tipos celulares⁸. En adipocitos, la FABP4 interactúa con PTEN, lo que sugiere un nuevo papel para esta fosfatasa en la regulación del metabolismo lipídico y en la diferenciación adipocitaria⁹. En macrófagos, participa en la regulación de la actividad inflamatoria y del tráfico de colesterol vía NF- κ B y *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR)- γ , interacción que podría ser responsable de efectos opuestos en la supervivencia y la proliferación en células endoteliales¹⁰.

Los niveles de FABP4 circulantes están aumentados en la obesidad, el síndrome metabólico (SM)¹¹, la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y la hiperlipidemia familiar combinada o síndromes lipodistróficos, y se correlacionan con lípidos y resistencia a la insulina¹²⁻¹⁸. Los niveles de FABP4 en suero predicen el riesgo de desarrollar SM, DM2 y enfermedad aterosclerótica^{17,19-21}. La FABP4 también tiene un efecto directo en la disminución de la contractilidad de las células musculares de miocardio, lo cual sugiere que la liberación de FABP4 al torrente circulatorio podría tener un efecto directo sobre algunas células y tejidos periféricos²². Las FABP4 en lesiones ateroscleróticas están asociadas con un fenotipo de placas inestables^{23,24}.

Un estudio reciente de nuestro grupo ha demostrado que los niveles de FABP4 circulante están inversamente asociados con la hiperemia reactiva periférica, un marcador de disfunción endotelial²⁵. En este sentido, resultados de

nuestro grupo muestran que la FABP4 exógena disminuye la expresión y la activación de eNOS²⁶. La FABP4 tiene un efecto directo sobre la migración y la proliferación de células humanas musculares de arteria coronaria lisa a través de la activación de MAPK y los factores de transcripción *c-jun* y *c-myc*²⁷.

Por todo ello, el objetivo de este trabajo es estudiar la interacción de FABP4 exógena con proteínas de membrana de células endoteliales.

Material y métodos

Reactivos

Las células utilizadas en este estudio fueron *Human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC) (GIBCO, Oregon, OR, EE.UU.) en pase 3 (C-015-5C). Las células se sembraron en medio M-200 (Cascade Biologics, New York, NY, EE. UU.) suplementado con 2% Low Serum Growth Supplement (LSGS) (Cascade Biologics) y con 1% Gentamicin/Amphotericin solution (Cascade Biologics) en placas de cultivo y/o portas con cámaras individuales (Nunc, Roskilde, Dinamarca). La FABP4 recombinante humana era de BioVendor (Heidelberg, Alemania) y 6XHistidine-tag FABP4 recombinante humana era de Enzo Life Sciences (San Diego, CA, EE. UU.). El anticuerpo anti-FABP4 era de R&D System (Minneapolis, MN, EE. UU.), el anticuerpo anti-6X His-tag era de Abcam (Cambridge, MA, EE. UU.), y los anticuerpos anti-CD31, anti-mouse, anti-rabbit y anti-goat eran de DAKO (Glostrup, Dinamarca). Los anticuerpos marcados con fluorescencia, Alexa Fluor*488 anti-goat y Alexa Fluor*532 anti-mouse, eran de Invitrogen (Carlsbad, CA, EE. UU.). Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) era de GIBCO® (14190-169). Paraformaldehído era de Sigma (St. Louis, MO, EE. UU.) (P6148-500G) y Mowiol era de Calbiochem (San Diego, CA, EE. UU.) (475904). Las pastillas anti-proteasas sin EDTA (Complete ULTRA Tablets, Mini EDTA-Free EASYPac) eran de Roche (Indianapolis, IN, EE. UU.). El kit FABP4 Inhibitor/Ligand Screening Assay Kit era de Cayman Chemical Company (Ann Harbor, MI, EE. UU.), y el kit HisPur™ Cobalt Purification Kit era de Pierce (Rockford, IL, EE. UU.).

Cultivos celulares y reactivos

Las células HUVEC crecieron con medio 2% LSGS durante 15 min y se incubaron con y sin FABP4 (100 ng/ml) a diferentes tiempos. Tras la incubación en placas de Petri de 10 cm se procedió a la extracción de proteínas de membrana. Se eliminó el medio de cultivo y las células se lavaron con DPBS, seguidamente se añadió el tampón de extracción (50 mM Tris-HCl pH = 7,4, 150 mM NaCl, 2 mM Ca²⁺, 1% TX100, 1% NP40, antiproteasas)²⁸. Se recogieron las células en un tubo, se rompieron pasándolas a través de una aguja (5/8 in) y se incubaron 10 min en hielo. Finalmente se centrifugan a 14.000 xg durante 10 min y se recupera el sobrenadante.

Inmunoblot

La concentración total de proteína se cuantificó con el método Bradford (Bio-Rad). La electroforesis y el

inmunoblot se realizaron utilizando el sistema de análisis NuPAGE (Invitrogen Life Technologies, Reino Unido). Las membranas fueron bloqueadas con reactivo ECL Advance Blocking Reagent al 2% (Amersham Biosciences, EE. UU.) e incubadas con anticuerpos anti-FABP4, anti-6X His-tag y anti-CD31. Los complejos antígeno-anticuerpo fueron detectados incubando la membrana con anticuerpos anti-IgG conjugados con HRP. Las bandas se visualizaron con los reactivos ECL (Amersham Pharmacia, EE. UU.) en el sistema de imagen ChemiDoc y se cuantificaron con el programa de análisis Image Lab (Bio Rad, EE. UU.). Los niveles relativos de FABP4 se cuantificaron y se normalizaron con los niveles de CD31; todos los valores se expresaron en unidades arbitrarias.

Inmunofluorescencia

Después de la incubación con y sin FABP4, las células fueron lavadas una vez con solución de lavado (PBS + 2% FBS + 0,1% BSA) durante 5 min, fijadas con paraformaldehído 4% durante 20 min a 4 °C y lavadas con solución de lavado 3 veces, 5 min. La incubación con los anticuerpos primarios anti-FABP4 y anti-CD31 (proteína utilizada como marcador de membrana citoplasmática) se llevó a cabo durante toda la noche a 4 °C. Tras los lavados, las células fueron incubadas

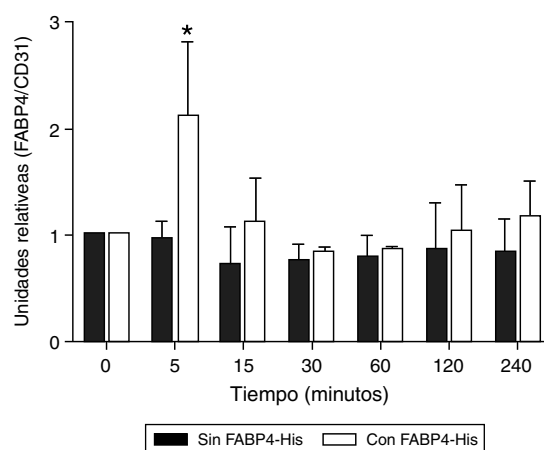


Figura 1 Variación de la cantidad de FABP4 en la membrana citoplasmática de HUVEC en función de la incubación con y sin FABP4 y del tiempo. A) Western blots de lisados de proteínas de membrana de células HUVEC después de la incubación con y sin FABP4 exógena a diferentes tiempos, usando anticuerpos anti-FABP4 y anti-CD31. CD31 se utiliza para corregir el error de carga. B) Gráfico de barras de la comparación cuantitativa entre los niveles de FABP4 en membrana citoplasmática. La intensidad de la señal de las bandas fue analizada por el programa ImageLab a partir de imágenes de 3 experimentos independientes. Los valores de FABP4 fueron normalizados utilizando los valores de CD31 y se expresan como niveles de proteína relativos en cada tiempo. Estos resultados son expresados como media $\pm$ error estándar. * $p < 0,05$ cantidad de FABP4 en la membrana de las células incubadas con FABP4 exógena durante 5 min versus cantidad de FABP4 en la membrana de las células incubadas sin FABP4 exógena durante 5 min y versus cantidad de FABP4 en la membrana de las células incubadas con FABP4 exógena a 30 min, 1 y 2 h.

con los anticuerpos secundarios Alexa Fluor*488 anti-goat y Alexa Fluor*532 anti-mouse y lavadas 3 veces con la solución de lavado. Los portas se montaron con mowiol con *antifading* y las imágenes de microscopia confocal de inmunofluorescencia fueron tomadas con Nikon Eclipse TE2000-E y procesadas con el programa EZ-C1 3.40.

Las imágenes de inmunofluorescencia también fueron captadas con un microscopio invertido Olympus IX71, procesadas con el programa CellF y cuantificadas con el programa ImageJ.

Cross-linking en HUVEC

Tras la incubación con y sin FABP4 exógena se realizó el *cross-linking* en las células HUVEC con formaldehído al 2% en DPBS a temperatura ambiente durante 30 min. La reacción se paró con 5 ml de glicina 0,125 M^{29,30}. Tras esto, las células se lavaron con DPBS y se extrajeron las proteínas de membrana citoplasmática.

Purificación proteica a partir de cola de histidina

La FABP4-His-tag del extracto de las proteínas de membranas de las células HUVEC fue purificada del resto de proteínas a partir de la cola de histidina. La purificación se hizo siguiendo las instrucciones de *HisPur™ Cobalt Purification Kit* (Pierce).

Ensayos de unión a ligando

Concentraciones crecientes de proteína (de 0 a 60.000 pg/ml) de membrana de células HUVEC incubadas 5 min con y sin FABP4 exógena fueron analizadas con el kit *FABP4 Inhibitor/Ligand Screening Assay Kit* (Cayman) siguiendo las instrucciones del mismo. Brevemente, este kit detecta ligandos de FABP4. Los extractos de proteínas de membrana se incubaron con una sonda que muestra fluorescencia creciente cuando se une a FABP4. La presencia en la muestra de proteínas que se unen a FABP4 desplaza la sonda fluorescente y la fluorescencia emitida decae. Se utiliza ácido araquidónico como control positivo y FABP4 recombinante a una concentración de 10 mM. La pérdida de fluorescencia se monitoriza excitando a 475 nm y leyendo la emisión a 370 nm en un fluorímetro Synergy HT (BioTek, Winooski, VT, EE.UU.). Los resultados obtenidos se presentan como porcentaje de fluorescencia de cada muestra respecto al máximo de fluorescencia (FABP4 + sonda fluorescente).

Análisis estadístico

Los resultados se presentan como media $\pm$ error estándar. Los resultados representan la media de 3 experimentos independientes cada uno realizado por duplicado. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa Graphpad

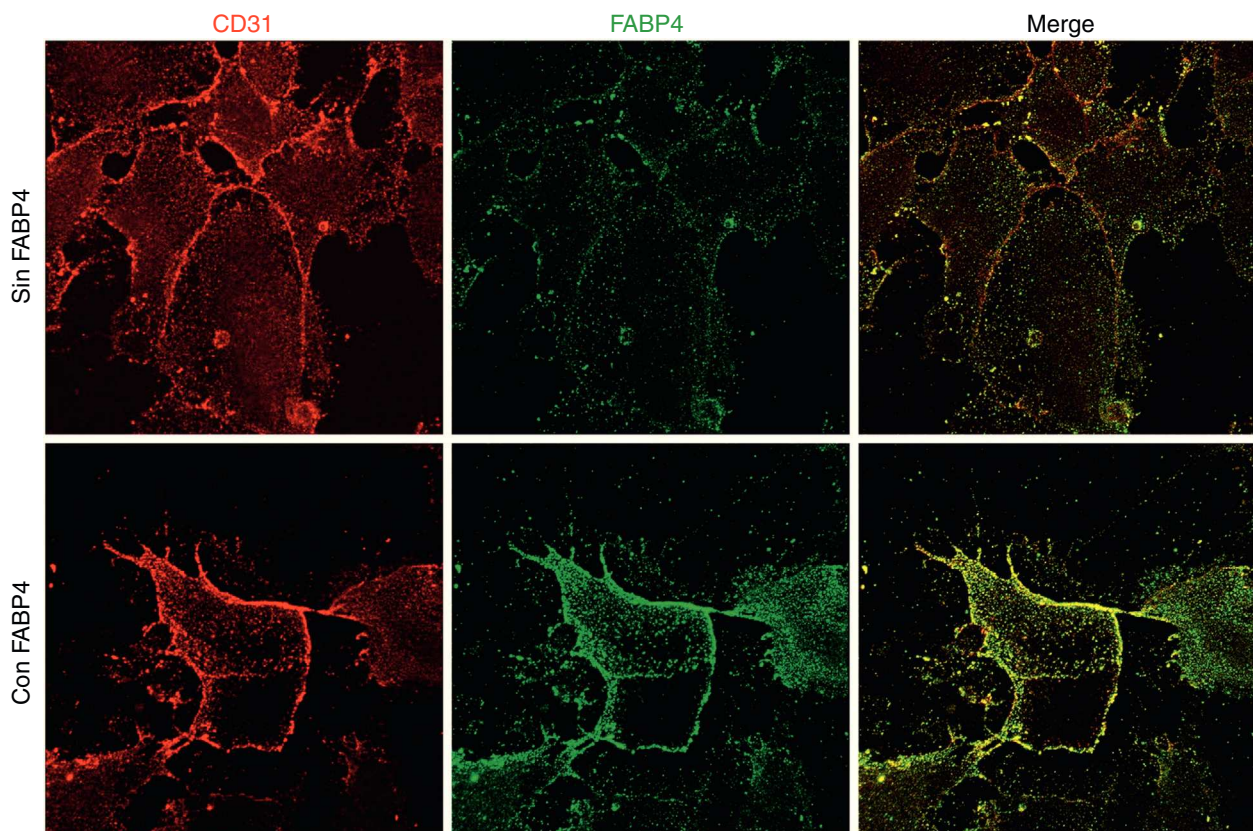


Figura 2 Colocalización de FABP4 exógena en la membrana de células endoteliales. Imágenes de microscopia confocal de una doble inmunofluorescencia para CD31 (rojo) y FABP4 (verde) realizada en 2 condiciones: incubación con FABP4 exógena e incubación sin FABP4 exógena.

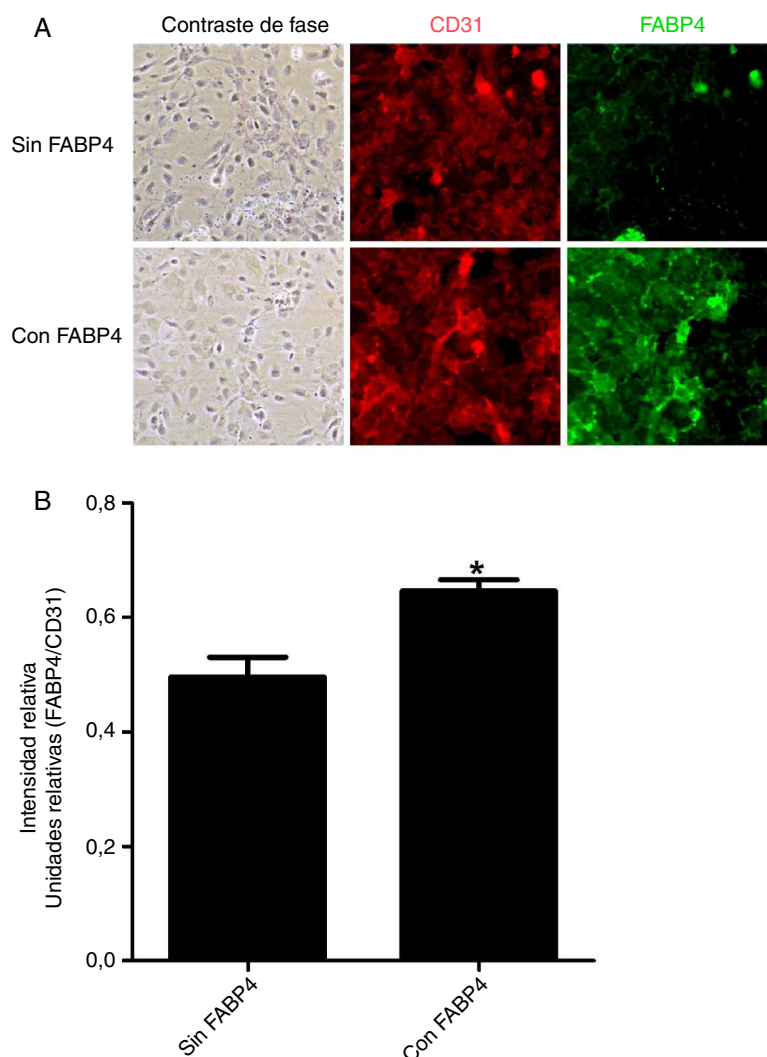


Figura 3 Imágenes y cuantificación de fluorescencia en HUVEC en función de la incubación con y sin FABP4. A) Doble inmunofluorescencia para CD31 (rojo) y FABP4 (verde) realizada en 2 condiciones: incubación con FABP4 exógena e incubación sin FABP4 exógena. Imágenes de fluorescencia obtenidas mediante un microscopio invertido. B) Gráfico de barras que muestra la cuantificación de la inmunofluorescencia de FABP4 tras la normalización con los valores de CD31. * $p < 0,05$ cantidad de FABP4 en la membrana de las células incubadas con FABP4 exógena versus cantidad de FABP4 en la membrana de las células incubadas sin FABP4 exógena.

Prism (versión 5, San Diego, CA, EE. UU.). Se utilizó el test t-Student para comparar medias. Las diferencias entre medias se consideraron estadísticamente significativas con un valor de $p < 0,05$.

Resultados

FABP4 colocaliza con CD31 en membrana de células HUVEC

Tras la incubación de las células HUVEC con FABP4-His a diferentes tiempos (5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h y 4 h) se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) en los niveles de FABP4 en los extractos de proteínas de membrana a los 5 min (2,22; $p < 0,05$), volviendo a los niveles basales tras ese tiempo. Cuando las células no estaban incubadas con FABP4 exógena, los niveles de FABP4 permanecían constantes durante las 4 h (fig. 1).

Los experimentos de inmunofluorescencia mostraron colocalización de FABP4 con CD31 (proteína utilizada como marcador de membrana citoplasmática) en la membrana de las células endoteliales (fig. 2) tras 5 min de incubación con FABP4 exógena. En la figura 3 observamos que la inmunocolocalización de FABP4 con CD31 se acompaña de un aumento significativo en los niveles de fluorescencia de FABP4 ($p < 0,05$).

FABP4 interacciona específicamente con proteínas de membrana plasmática en células HUVEC

Realizamos un ensayo de unión a ligando (FABP4 Inhibitor/Ligand Screening Assay Kit) utilizando proteínas de membrana de HUVEC incubadas con y sin FABP4 exógena durante 5 min. Observamos un aumento en la fluorescencia cuando las células eran incubadas con FABP4 exógena

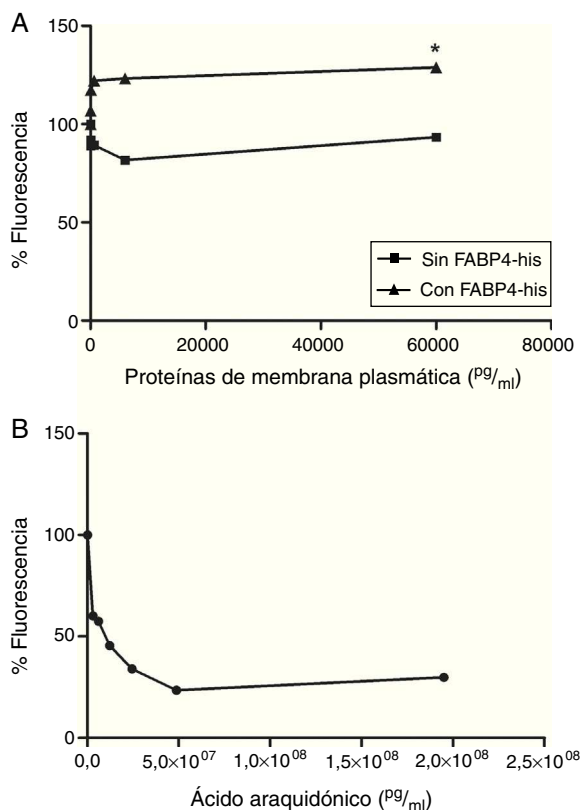


Figura 4 Curvas de desplazamiento del ensayo de unión a ligando. A) Comparación de las curvas de desplazamiento de las proteínas de membrana citoplasmática de células HUVEC incubadas con y sin FABP4 exógena. B) Curva de desplazamiento del ácido araquidónico, control positivo del kit.* $p < 0,05$ diferencia en el porcentaje de fluorescencia entre las proteínas de las células incubadas con FABP4 y las incubadas sin FABP4 exógena a partir de una concentración de 60 pg/ml.

(fig. 4A), sugiriendo la presencia de FABP4 exógena en la membrana. También observamos que cuando usábamos las proteínas de membrana de las células que habían sido incubadas sin FABP4 exógena, la señal de fluorescencia disminuía sugiriendo la presencia de proteínas de membrana capaces de unirse a FABP4 (fig. 4A). A partir de la concentración proteica de 60 pg/ml, las diferencias entre la fluorescencia de las proteínas de membrana de las células incubadas con y sin FABP4 exógena son significativas ($p < 0,05$). El ácido araquidónico fue utilizado como control positivo (fig. 4B).

La figura 5A muestra diferentes patrones de bandas de inmunoblot en función de la incubación con o sin FABP4-His. En el control negativo no se detectó ninguna banda, mientras que en las células incubadas con FABP4-His se detectaron 4 bandas diferentes: 15, 33, 77 y 108 kDa aproximadamente. En el control de especificidad (células HUVEC incubadas con FABP4 a 100 ng/ml y con FABP4-His a 10 ng/ml) se detectaban únicamente las bandas de 15 y 33 kDa indicando que los complejos de 77 y 108 kDa eran complejos específicos formados por FABP4 exógena y otras proteínas. Cuando revelamos estas muestras con anticuerpo anti-6X His-tag (fig. 5B), encontramos el mismo patrón de bandas que observábamos con anti-FABP4.

Discusión

El principal resultado de nuestro trabajo es la existencia de proteínas de membrana de células endoteliales capaces de formar complejos proteicos específicos con FABP4 exógena.

En estudios previos se ha postulado FABP4 como biomarcador plasmático del SM, DM2 y enfermedad aterosclerótica^{17,19-21}. Además, el aumento de las concentraciones de FABP4 plasmática se considera un riesgo para los tejidos periféricos, ya que modula la vía de la insulina en células vasculares y, consecuentemente, disminuye la activación de eNOS y la producción de NO, afectando a la vasodilatación arterial. Estos resultados apoyan el papel directo que juega FABP4 en la disfunción endotelial²⁶. Resultados previos de nuestro grupo muestran que FABP4 circulante también tiene un efecto directo en las complicaciones observadas en la lesión vascular en DT2²⁵.

En este trabajo se demuestra la interacción entre FABP4 circulante y la membrana citoplasmática de las células HUVEC (figs. 2 y 3), lo cual apoya la hipótesis de que la FABP4 circulante no es solamente un biomarcador sino que puede que tenga un efecto causal directo al interactuar con células periféricas. Además, observamos que esta interacción se produce a través de la formación complejos proteicos específicos (fig. 4). A partir de estos resultados, nuestro grupo está trabajando en la identificación de las proteínas que se unen a FABP4 para formar estos complejos, lo que sería necesario para conocer el papel de la FABP4 plasmática en estas enfermedades y entender mejor la función biológica de esta proteína. Se sabe que la FABP cardiaca (62% de homología con FABP4) tiene la capacidad de unirse a un receptor de membrana descrito en células cardiacas, observación que no ha sido confirmada ni demostrada en otras FABP³¹.

La FABP4 intracelular interacciona con el receptor de insulina, y los ácidos grasos modifican la estructura de la FABP4 activándola como sustrato del receptor de insulina³². No se sabe si esta interacción se produce forma directa o si es a través de otros componentes de la membrana plasmática. Además, la FABP4 endógena es una diana de la ruta VEGF/VEGFR2 y un regulador positivo de la proliferación de células endoteliales in vitro¹⁰.

No se sabe todavía si la FABP4 circulante puede internalizarse y activar mecanismos intracelulares. Se ha visto que la cantidad de FABP4 intracelular en células endoteliales aumenta cuando las células se incuban con FABP4 exógena en comparación con células no tratadas, lo que puede ser un indicio de la internalización de FABP4 circulante. Además, este aumento en la concentración intracelular de FABP4 va acompañado de una inhibición en la producción de eNOS y NO, debido a una alteración en la ruta de eNOS mediado por insulina a causa de la inhibición de la activación de IRS1 y Akt²⁶. Se sabe también que la FABP4 exógena regula la proliferación en células musculares a través de la activación de MAPK y los factores de transcripción c-jun y c-myc²⁷.

Todos estos datos sobre la interacción y la activación de rutas de la FABP4 exógena apoyan la hipótesis de su internalización. Además es probable que, una vez internalizada, la FABP4 pueda llegar hasta el núcleo, en donde active factores de transcripción o incluso actúe como factor de transcripción.

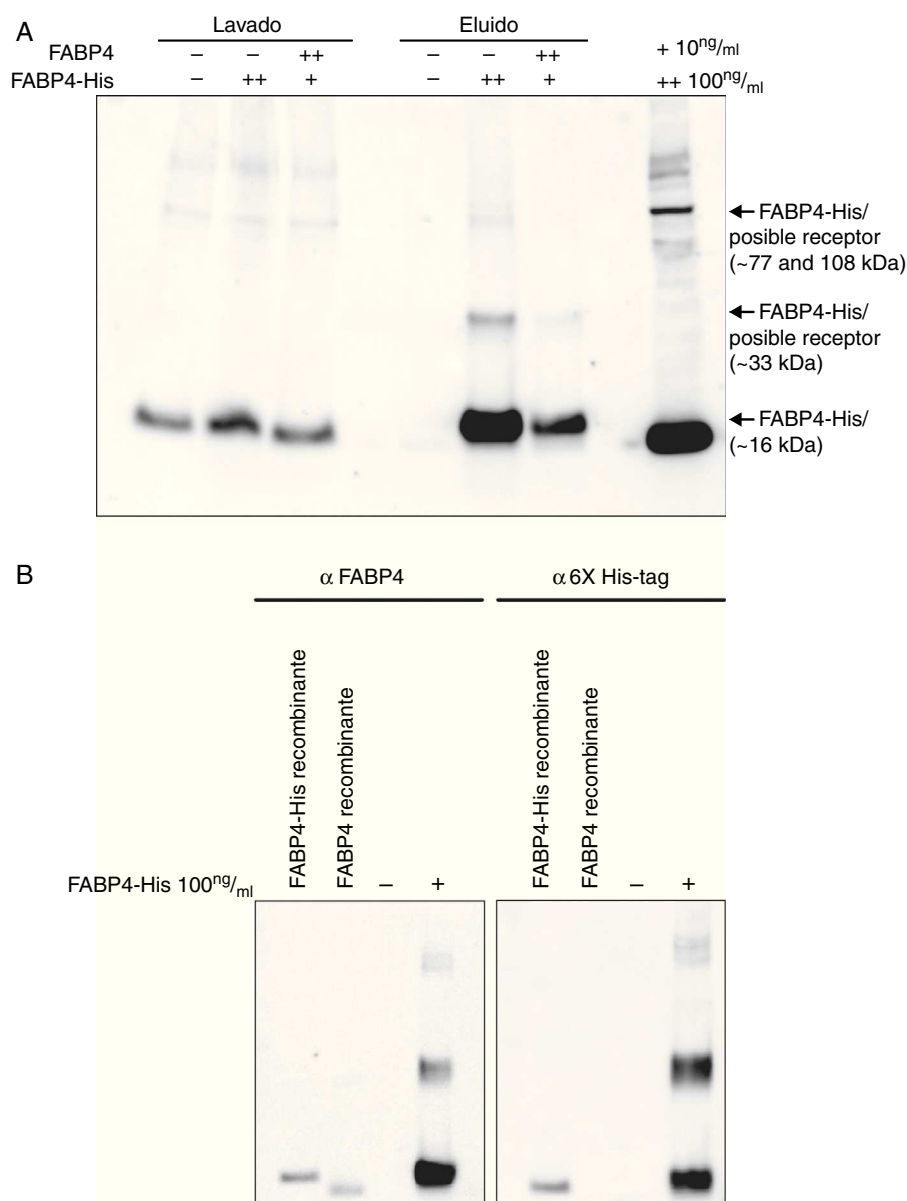


Figura 5 Formación de complejos en la membrana citoplasmática de HUVEC con FABP4-His. A) Western blot de extractos de proteínas de membrana citoplasmática de células HUVEC después de la incubación con y sin FABP4-His y después de la purificación a partir de la cola de histidina, utilizando anticuerpos anti-FABP4. B) Western blot de extractos de proteínas de membrana citoplasmática de células HUVEC después de la incubación con y sin FABP4-His y después de la purificación a partir de la cola de histidina, utilizando anticuerpos anti-FABP4 y anti-6X His-tag.

En conclusión, estos resultados muestran por primera vez la existencia de un complejo proteico específico que se forma a partir de la unión de FABP4 exógena con las células HUVEC. Los resultados obtenidos nos permiten avanzar en el conocimiento de los efectos moleculares de la FABP4, pudiéndose utilizar como diana terapéutica para prevenir enfermedades cardiovasculares asociadas con la obesidad y la diabetes.

Responsabilidades éticas:

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Financiación

Este trabajo ha sido subvencionado por las becas de ISCIII, Madrid, España (PI11/02216) y CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (ISCIII, Ministerio de Ciencia e Innovación).

Autoría

Todos los autores han contribuido en el diseño y análisis de los datos, así como en la redacción del artículo. La versión final de este manuscrito está aprobada por todos los autores.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Zimmerman AW, Veerkamp JH. New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59:1096–116.
- Hertzel AV, Bernlohr DA. The mammalian fatty acid-binding protein multigene family: Molecular and genetic insights into function. *Trends Endocrinol Metab.* 2000;11:175–80.
- Bernlohr DA, Simpson MA, Hertzel AV, Banaszak LJ. Intracellular lipid-binding proteins and their genes. *Annu Rev Nutr.* 1997;17:277–303.
- Haunerland NH, Spener F. Fatty acid-binding proteins — insights from genetic manipulations. *Prog Lipid Res.* 2004;43:328–49.
- Makowski L, Hotamisligil GS. The role of fatty acid binding proteins in metabolic syndrome and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2005;16:543–8.
- Wolfum C. Cytoplasmic fatty acid binding protein sensing fatty acids for peroxisome proliferator activated receptor activation. *Cell Mol Life Sci.* 2007;64:2465–76.
- Jenkins-Kruchten AE, Bennaars-Eiden A, Ross JR, Shen WJ, Kraemer FB, Bernlohr DA. Fatty acid-binding protein-hormone-sensitive lipase interaction. Fatty acid dependence on binding. *J Biol Chem.* 2003;278:47636–43.
- Thompson BR, Mazurkiewicz-Munoz AM, Suttles J, Carter-Su C, Bernlohr DA. Interaction of adipocyte fatty acid-binding protein (AFABP) and JAK2: AFABP/aP2 as a regulator of JAK2 signaling. *J Biol Chem.* 2009;284:13473–80.
- Gorbenko O, Panayotou G, Zhyvoloup A, Volkova D, Gout I, Filonenko V. Identification of novel PTEN-binding partners: PTEN interaction with fatty acid binding protein FABP4. *Mol Cell Biochem.* 2010;337:299–305.
- Elmasri H, Karaaslan C, Teper Y, Ghelfi E, Weng M, Ince TA, 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.
- Scheja L, Makowski L, Uysal KT, Wiesbrock SM, Shimshek DR, Meyers DS, et al. Altered insulin secretion associated with reduced lipolytic efficiency in aP2^{-/-} mice. *Diabetes.* 1999;48:1987–94.
- Cabre A, Lazaro I, Cofan M, Jarauta E, Plana N, Garcia-Otin AL, et al. FABP4 plasma levels are increased in familial combined hyperlipidemia. *J Lipid Res.* 2010;51:1173–8.
- Cabre A, Lazaro I, Girona J, Manzanares JM, Marimon F, Plana N, et al. Fatty acid binding protein 4 is increased in metabolic syndrome and with thiazolidinedione treatment in diabetic patients. *Atherosclerosis.* 2007;195:e150–8.
- Cabre A, Lazaro I, Girona J, Manzanares JM, Marimon F, Plana N, 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.
- Cabre A, Lazaro I, Girona J, Manzanares JM, Marimon F, Plana N, et al. Plasma fatty acid binding protein 4 is associated with atherogenic dyslipidemia in diabetes. *J Lipid Res.* 2008;49:1746–51.
- Coll B, Cabre A, Alonso-Villaverde C, Lazaro I, Aragonés G, Parra S, et al. The fatty acid binding protein-4 (FABP4) is a strong biomarker of metabolic syndrome and lipodystrophy in HIV-infected patients. *Atherosclerosis.* 2008;199:147–53.
- 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.
- Xu A, Wang Y, Xu JY, Stejskal D, Tam S, Zhang J, et al. Adipocyte fatty acid-binding protein is a plasma biomarker closely associated with obesity and metabolic syndrome. *Clin Chem.* 2006;52:405–13.
- Tso AW, Xu A, Sham PC, Wat NM, Wang Y, Fong CH, et al. Serum adipocyte fatty acid binding protein as a new biomarker predicting the development of type 2 diabetes: A 10-year prospective study in a Chinese cohort. *Diabetes Care.* 2007;30:2667–72.
- Xu A, Tso AW, Cheung BM, Wang Y, Wat NM, Fong CH, et al. Circulating adipocyte-fatty acid binding protein levels predict the development of the metabolic syndrome: A 5-year prospective study. *Circulation.* 2007;115:1537–43.
- Yeung DC, Xu A, Cheung CW, Wat NM, Yau MH, Fong CH, et al. Serum adipocyte fatty acid-binding protein levels were independently associated with carotid atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:1796–802.
- Lamounier-Zepter V, Look C, Alvarez J, Christ T, Ravens U, Schunck WH, et al. Adipocyte fatty acid-binding protein suppresses cardiomyocyte contraction: A new link between obesity and heart disease. *Circ Res.* 2009;105:326–34.
- Agardh HE, Folkersen L, Ekstrand J, Marcus D, Swedenborg J, Hedin U, et al. Expression of fatty acid-binding protein 4/aP2 is correlated with plaque instability in carotid atherosclerosis. *J Intern Med.* 2011;269:200–10.
- Peeters W, de Kleijn DP, Vink A, van de Weg S, Schoneveld AH, Sze SK, et al. Adipocyte fatty acid binding protein in atherosclerotic plaques is associated with local vulnerability and is predictive for the occurrence of adverse cardiovascular events. *Eur Heart J.* 2011;32:1758–68.
- Aragones G, Ferre R, Lazaro I, Cabre A, Plana N, Merino J, et al. Fatty acid-binding protein 4 is associated with endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis.* 2010;213:329–31.
- Aragones G, Saavedra P, Heras M, Cabre A, Girona J, Masana L. Fatty acid-binding protein 4 impairs the insulin-dependent nitric oxide pathway in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Diabetol.* 2012;11:72.
- Girona J, Rosales R, Plana N, Saavedra P, Masana L, Vallve JC. FABP4 induces vascular smooth muscle cell proliferation and migration through a MAPK-dependent pathway. *PLoS One.* 2013;8:e81914.
- Glass R, Loesch A, Bodin P, Burnstock G. P2X4 and P2X6 receptors associate with VE-cadherin in human endothelial cells. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59:870–81.
- Klockenbusch C, Kast J. Optimization of formaldehyde cross-linking for protein interaction analysis of non-tagged integrin beta1. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:927585.
- Vasilescu J, Guo X, Kast J. Identification of protein-protein interactions using in vivo cross-linking and mass spectrometry. *Proteomics.* 2004;4:3845–54.
- Burton PB, Hogben CE, Joannou CL, Clark AG, Hsuan JJ, Totty NF, et al. Heart fatty acid binding protein is a novel regulator of cardiac myocyte hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;205:1822–8.
- 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.