Tesi doctoral

Teixit adipós epicàrdic i senyalització a través dels Receptors Toll like (TLR): Paper en la patofisiologia de l'aterosclerosi

Memòria presentada per

Consol Benaiges Martinez

Tesi realitzada sota la direcció del doctor **Cándido Juárez Rubio**
per optar al títol de **Doctor en Immunologia**

Programa de Doctorat en Immunologia
Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d'Immunologia
Servei d'Immunologia. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau
Universitat Autònoma de Barcelona, 2014

Cándido Juárez Rubio **Consol Benaiges Martinez**

Als meus pares

AGRAÏMENTS

Aquesta tesis doctoral no hauria estat possible sense la col·laboració:

del meu director de tesis Cándido, per donar-me la oportunitat de introduir-me, guiar-me i ajudar-me en tot el procés.

de la Bet i de la Silvia, per la seva energia, ajuda i suport inestimable durant tot aquest temps.

de la Laura i el Oscar, per la seva constància i confiança, que en van iniciar en aquest camí i em van encaminar cap on sóc ara.

dels meus companys de laboratori Carlos, Eder, Juan, M. Àngels, Cristina, per les infinitat d'hores que hem passat junts treballant, divagant i rient.

del Xavier i del Christian, per la seva cooperació i el seu temps, sent el meu enllaç entre la part clínica i la experimental

de tot el servei de Immunologia de l'Hospital de Sant Pau, Nenuca, Manuela, Maite, Felipe, German, Elena, Mariví, Tere, Ester, Carmen, ... per compartir, espai, moments i coneixements.

de tots els màsters que han passat per Sant Pau, que els nombraria però ja en son molts.

dels meus compis, Marta, Ana, Joan i Xavi per compartir a més de pis tan bons moments junts.

dels meus amics, Nuria, Eli, Amparin, Juana, Kamon, Maria, Janio, Helena, Ivan, Valentí, Laura, i segur que men deixo algun, però ells ja hu saben. Per que ben bé no saben el que faig però m'han encoratjat en tot moment.

dels meus germans Samanta i Juan Manuel i de la meva cunyi Nuria, per soportar-me i animar-me durant tan temps.

dels meus pares, Consuelo i Juanito que sempre han cregut en mi.

i de tots aquells que m'han il·luminat quan tot era fosc. Gracies

ÍNDEX

ÍNDEX 1

ABREVIATURES 15

INTRODUCCIÓ 15

1. Teixit adipós 17

1.1. Teixit adipós marró 18

1.2. Teixit adipós blanc 18

1.3. Estructura general del teixit adipós 18

1.4. Morfologia dels adipòcits 19

1.5. El metabolisme dels adipòcits 20

1.5.1. Accions lipogèniques 21

1.5.1.1. La lipogènesi de novo: síntesi d'àcids grassos 21

1.5.1.2. La captació d'àcids grassos a partir de plasma 22

1.5.1.3. Síntesi de triacilglicèrids 22

1.5.2. Lipòlisis 24

1.6. Regulació hormonal del metabolisme 26

1.7. Remodelació del TA blanc i adipogènesi 26

1.8. Funció endocrina 29

1.9. Funcions de les adipocines 30

1.9.1. La leptina 31

1.9.2. L'adiponectina 32

1.9.3. La resistina 33

1.10. Els receptors *Toll Like* en teixit adipós 33

1.11. Inflamació i metabolisme 36

1.12. Via de senyalització JAK-STAT en teixit adipós 37

1.12.1. Senyalització de STAT1 en adipòcits 38

1.12.2. Senyalització de STAT3 en adipòcits 39
1.12.3. Senyalització de STAT5 en adipòcits 39
2. Tipus de teixit adipòs 39
2.1. Teixit adipós subcutani 41
2.2. El teixit adipós visceral 41
2.3. Heterogeneïtat morfològica i funcional entre el TAV i el TAS 41
2.3.1. Diferencies anatòmiques i estructurals 42
2.3.2. Diferències de sexe 42
2.3.3. Diferències morfològiques. 42
2.3.4. Diferències en el creixement i remodelació 43
2.3.5. Diferencies en l'angiogènesi 43
2.3.6. Diferencies en l'apoptosi 43
2.3.7. Diferències metabòliques 43
2.3.8. Diferencies en la secreció d'adipocines 44
3. Teixit adipós visceral i obesitat 45
3.1. Síndrome metabòlic i obesitat 45
3.2. Inflamació del teixit adipós visceral en obesitat 46
4. El teixit adipós epicàrdic 47
4.1. Localització anatòmica 48
4.2. Metabolisme del teixit adipós epicàrdic 49
4.3. Teixit adipós epicàrdic com greix marró 50
4.4. Vies d'interacció entre el teixit adipós epicardic i les arteries coronaries 50
4.4.1. Estructura de la paret arterial 50
4.4.2. Senyalització vasocrina 51
4.4.3. Senyalització paracrina 52
4.5. Teixit adipós epicàrdic com un òrgan secretor 52
4.6. Acció vascular 53
5. Teixit adipós epicàrdic i aterosclerosi 54

5.1. Aterosclerosi 54
5.1.1. Etiologia de l'aterosclerosi: factors de risc 54
5.1.2. Etapes en el desenvolupament de l'aterosclerosi 55
5.1.3. Disfunció endotelial 56
5.1.3.1. Teoria de dins a fora 57
5.1.3.2. Teoria de fora a dins 57
5.1.4. Activació endotelial i reclutament de cèl·lules immunes 57
5.1.5. Formació de cèl·lules escumoses 58
5.1.6. Formació de la placa fibrosa 59
5.1.7. Lesions avançades i trombosi 59
5.1.8. L'aterosclerosi i el sistema immune 60
5.1.8.1. Limfòcits T 61
5.1.8.2. Limfòcits B 62
5.2. Teoria de fora a dins: paper del teixit adipós epicàrdic en l'aterosclerosi 63
5.2.1. Quantitat de teixit adipós epicàrdic i aterosclerosi 63
5.2.2. Adipocines i aterosclerosi. 64
5.2.3. Secreció de factors que provoquen disfunció endotelial 64
5.2.4. Secreció de factors que afecten a la proliferació i migració de les cèl·lules musculars llises vasculars 65
5.2.5. Secreció de quimiocines. 65
5.2.6. Secreció de adipocines i citocines proinflamatoris 65
5.2.6.1. TNF-α 65
5.2.6.2. IL-6 65
5.2.6.3. Adiponectina 66
5.2.6.4. Resistina 66
5.2.6.5. Leptina 66
6. Observacions finals 67
OBJECTIUS 69
MATERIAL I MÈTODES 73
1. Selecció de pacients i obtenció de mostres 75
1.1. Identificació i registre de pacients 75

1.2. Caracterització dels pacients 75
1.3. Recollida de les mostres 75
2. Estimulació de les mostres 76
2.1. Estimulació dels explants 76
2.2. Estimulació de cèl·lules de sang total 77
3. Immunohistoquímica 77
3.1. Fixació i immersió 77
3.2. Tinció 78
3.3. Anàlisis microscòpic 79
4. Anàlisis d'expressió proteica per Western Blot 80
4.1. Extracte proteic de teixit adipós 80
4.2. Quantificació de l'extracte 81
4.3. Western Blot 81
4.3.1. Electroforesis 81
4.3.2. Transferència 82
4.3.3. Bloqueig 82
4.3.4. Incubació amb anticòs primari 82
4.3.5. Incubació amb anticòs secundari 83
4.3.6. Revelat 83
4.3.7. Stripping 83
4.3.8. Anàlisis dels resultats. 84
5. Detecció de proteïnes dels sobrenedants amb ELISA 84
6. Anàlisis d'expressió gènica del teixit adipós. 86
6.1. Obtenció de RNA a partir de teixit adipós 86
6.2. Determinació de la quantitat i qualitat del RNA. 87
6.3. Microarrays 88
6.3.1. Síntesi de la primera cadena de cDNA 89

6.3.2. Síntesi de la segona cadena de cDNA 89
6.3.3. Síntesi de cRNA per transcripció in vitro. 90
6.3.4. Purificació del cRNA 90
6.3.5. Avaluació i quantificació del cRNA 91
6.3.6. Síntesi del segon cicle de cDNA 91
6.3.7. Hidròlisis del cRNA amb la RNAsa H 91
6.3.8. Purificació del cDNA monocatenari 92
6.3.9. Avaluació i quantificació cDNA monocatenari. 92
6.3.10. Fragmentació del cDNA monocatenari 92
6.3.11. Marcatge del cDNA monocatenari fragmentat 92
6.3.12. Hibridació de les mostres 93
6.3.13. Rentat, tinció i escaneig del chip. 93

6.4. Anàlisi estadístic dels arrays 94

6.5. Classificació funcional i visualització dels gens. 94

7. Anàlisi estadístic 95

RESULTATS 97

1. Característiques clíniques dels pacients. 99

2. Caracterització del teixit adipós per immunohistoquímica 101

2.1. Expressió de CD68 en TA 102

2.2. Expressió de CD3 en TA 103

2.3. Expressió de CD20 en TA 104

2.4. Expressió de *Mast Cell Tryptasa* en TA 105

2.5. Expressió de CD31 en TA 106

2.6. Infiltrats limfocitaris en el TAE dels pacients amb CAD 107

2.7. Relació d'altres tipus cel·lulars amb els infiltrats del TAE dels pacients amb CAD 107

2.8. Determinació dels tipus de limfòcits T presents en els infiltrats limfocitaris del TAE dels pacients amb CAD. 108

3. Determinació de la secreció d'adipocines i citocines en teixit adipós i en sang total. 109

3.1. Secreció de factors pel teixit adipós 109

3.1.1. Secreció de citocines pel TA....109

3.1.2. Secreció d'adipocines pel TA....111

3.2. Secreció de factors per cèl·lules de sang perifèrica 113

3.2.1. Secreció de citocines per cèl·lules de sang perifèrica 113

3.2.2. Secreció de adipocines per cèl·lules de sang perifèrica 114

4. Expressió i activació dels STATs en el teixit adipós....116

4.1. Expressió i activació de STAT1 en teixit adipós....116

4.2. Expressió i activació de STAT3 en teixit adipós....117

4.3. Expressió i activació de STAT5 en teixit adipós....118

4.4. Expressió de STATs en el TAE per immunohistoquímica. 119

4.4.1.1. Expressió de STAT1 119

4.4.1.2. Expressió de STAT3 120

5. Expressió gènica en teixit adipós....121

5.1. Expressió gènica diferencial entre dipòsits de greix (TAE i TAS). 121

5.1.1. Classificació funcional dels gens diferencialment expressats entre el TAE i el TAS 122

5.1.1.1. Classificació funcional dels gens més expressats en el TAE. 122

5.1.1.2. Classificació funcional dels gens més expressats en el TAS. 124

5.2. Expressió gènica diferencial entre els pacients amb CAD i NCAD. 125

5.2.1. Expressió de la queratina 19 en el TAE....126

5.3. Efecte de l'estimulació amb lligands de TLR en l'expressió gènica del teixit adipós. 127

5.3.1. Efecte de l'estimulació del TA depenent del l'estímul (LPS-FSL-1)....127

5.3.2. Efecte de l'estimulació del TA depenent del teixit adipós (TAE-TAS)....128

5.3.3. Efecte de l'estimulació del TA depenent del pacient (CAD-NCAD)....129

5.3.4. Classificació funcional dels gens estimulats. 129
5.3.5. Efecte diferencial del tipus d'estímul en els gens induïts. 134
5.3.6. Efecte diferencial del tipus de teixit en els gens reprimits 135
5.3.7. Rutes i xarxes dels gens diferencialment expressats 136
5.3.8. Classificació funcional dels gens estimulats diferencialment expressats entre pacients amb CAD i NCAD. 138
5.3.8.1. Gens induïts en pacients amb CAD 138
5.3.8.2. Gens induïts en individus NCAD 139
5.3.8.3. Gens reprimits en pacients amb CAD 139
5.3.8.4. Gens reprimits en pacients amb NCAD 140
DISCUSSIÓ 141
1. Diferencies entre les poblacions cel·lulars presents en el TA 144
2. Secreció de mediadors inflamatoris pel TA 146
3. Secreció de mediadors inflamatoris per cèl·lules de sang total 147
4. Expressió dels STATs en TA 149
5. Expressió gènica diferencial en el TA entre els pacients amb CAD i NCAD 150
6. Estimulació del TA amb lligands TLR i efecte en la patologia del CAD 152
6.1. Efecte de l'estimulació en la secreció de mediadors inflamatoris pel TA. 152
6.2. Efecte de l'estimulació en la secreció de mediadors inflamatoris a nivell sistèmic 154
6.3. Efecte de l'estimulació en els STATs de TA 154
6.4. Efecte de l'estimulació en la expressió gènica del TA 155
CONCLUSIONS 159
BIBLIOGRAFIA 163
ANNEX 193

ABREVIATURES

ACACA: Acetil-CoA carboxilasa A

ACACB: Acetil-CoA carboxilasa B

Acetil-CoA: Acetilcoenzim A

AG: Àcids grassos

AGPAT: Acilglicerol-fosfat aciltransferasa

AMPc: AMP cíclic

AMPK: Proteïna quinasa A depenent de AMPc

Ang II: Angiotensina II

AQP: Aquaporines

ATGL: Lipasa adiposa de triglicèrids

C/EBP: Proteïna d'unió al potenciador-CCAAT

CAD: Malaltia arterial coronària

CL: Citrat liasa

CS: Citrat sintasa

DAG: Diacilglicerol

DGAT: Diacilglicerol aciltransferasa

DM: Diabetis mellitus tipus 2

eNOS: Sintasa d'òxid nítric endotelial

FABP: Proteïnes d'unió als àcids grassos

FAS: Sintasa d'àcids grassos

FATP: Proteïnes transportadores d'àcids grassos

FID: Federació Internacional de Diabetis

GAS: Seqüències gamma activades

GH: Hormona del creixement

GK: Glicerol quinasa

GLUT-1: Transportador de glucosa 1

GLUT-4: Transportador de glucosa 4

GPAT: Glicerol-3-fosfat aciltransferasa

GPD1: Glicerol-3fosfat-deshidrogenasa

H_2O_2: Peròxid d'hidrogen

H_2S: Sulfit d'hidrogen

HDL: Lipoproteïnes d'alta densitat

HSL: Lipasa sensible a hormones

IFN-α: interferó-α

IFN-β: interferó-β

IFN-γ: interferó-γ
IL-10: Interleucina-10
IL-6: Interleucina-6
IMC: Índex de massa corporal
IRF9: Factor regulador de l'interferó-9
IRSE: Elements de resposta estimulats per l'interferó
ISGF3: Factor genic-3 estimulat per l'interferó
JAK: Tirosina quinasa Janus
LDL: Lipoproteïnes de baixa densitat
LPL: Lipoproteïna lipasa
LPS: Lipopolisacàrids
MAG: Monoacilglicerol
MAPK: Proteïnes cinases activades per mitògens
MCP-1: Proteïna quimioatraient de monocits-1
MDH: Malat deshidrogenasa
ME1: Enzim màlic
MGL: Lipasa monoacilglicerol
NF-kB : Factor nuclear potenciador de les cadenes lleugeres kappa de les cèl·lules B activades
NO: Òxid nítric
NPY: Neuropèptid Y
PAI-1: Inhibidor de l'activador del plasminógen-1
PAMP: Patrons moleculars associats a patògens
PCK: Fosfoenolpiruvat carboxilasa
PDE-3: Fosfodiesterasa tipus 3
PDH: Piruvat deshidrogenasa
PLIN: Perilipina
PPAR: Receptor activat pel proliferador dels peroxisomes
PRL: Prolactina
PRR: Receptors de reconeixement de patrons
PRR: Reconeixement de patrons moleculars associats a patògens
RAS: Sistema renina angiotensina
ROS: Espècies reactives d'oxigen
SCD: Estearoil-CoA desaturasa-1
SM: Síndrome metabòlic
SOCS3: Supressor de senyal de citocines-3

SOD: Superòxid dismutasa

SORBS1: Domini que conte proteïnes Sorbin i SH3

SREBP1: Proteïna d'unió a elements regulador d'esterols

STAT: Transductors de senyal i activadors de la transcripció

SVF: Fracció de l'estroma vascular

TA: Teixit adipós

TAE: Teixit adipós epicàrdic

TAP: Teixit adipós pericàrdic

TAPV: Teixit adipós perivascular

TAS: Teixit adipós subcutani

TAV: Teixit adipós visceral

TG: Triglicèrids

TGF-β: Factor de creixement transformant

TLR: Receptors *toll like*

TNF-α: Factor de necrosis tumoral- α

VEGF: Factor de creixement de l'endoteli vascular

VLDL: Lipoproteïnes de molt baixa densitat

INTRODUCCIÓ

1. Teixit adipós

El teixit adipós va ser considerat originalment com un òrgan d'emmagatzematge d'energia, en les últimes dècades però, l'interès en la naturalesa del TA ha augmentat substancialment. El teixit adipós, actualment, ja no és considerat com un teixit inert sinó com un òrgan metabòlicament dinàmic, ja que a part de ser el lloc primari d'emmagatzematge de l'excés d'energia també funciona com un òrgan endocrí capaç de sintetitzar una sèrie de compostos biològicament actius que regulen l'homeòstasi metabòlica [1].

En els mamífers trobem dos tipus de teixit adipós amb funcions i estructures diferents. El teixit adipós blanc i el teixit adipós marro. El teixit adipós blanc emmagatzema l'excés d'energia en forma de triacilglicèrid (TG), mentre que el TA marró està involucrat activament en la regulació de la temperatura corporal [2, 3].

Els adipòcits són les úniques cèl·lules que estan especialitzades i perfectament adaptades per emmagatzemar lípids sense comprometre la seva integritat funcional, ja que tenen la maquinària enzimàtica necessària per sintetitzar àcids grassos (AG) i per emmagatzemar-los durant els períodes d'abundant energia i mobilitzar-la quan hi ha una dèficit energètic [4].

Es sol anomenar adipocina a qualsevol substància alliberada pel teixit adipós, ja siguin citocines, quimiocines, factors de creixement, factors del complement, hormones i enzims. Però tan sols la leptina, l'adiponectina i la resistina (,i possiblement, l'adipsina, i visfatina) es produeixen principalment pels adipòcits i per tant poden ser classificades correctament com adipocines, ja que a més, no són considerades com citocines [5]. Els processos biològics més importants afectats per les adipocines impliquen la regulació de l'homeòstasi energètica, l'angiogènesi, la resposta immune, la regulació de la pressió arterial i la coagulació de la sang ,entre altres [6].

El teixit adipós te una distribució generalitzada en tot el cos i depenent de la seva ubicació difereix morfològicament i funcionalment. Les variacions en la capacitat dels diferents dipòsits per emmagatzemar i alliberar àcids grassos i produir adipocines

són importants determinants de la distribució del greix i de les seves conseqüències fisiològiques [7, 8].

1.1. Teixit adipós marró

El teixit adipós marró està especialitzat en la producció de calor (termogènesi) i està pràcticament absent en els éssers humans adults, però es troba en els fetus i en els nadons. Els seus adipòcits tenen un diàmetre mitjà de 30 a 40 μ, sent més petits que els del teixit adipós blanc. Estan compostos per moltes gotes de lípids citoplasmàtiques de diferents mides (també anomenats adipòcits multiloculars), tenen un citoplasma relativament abundant, el nucli és esfèric i lleugerament excèntric i tenen moltes mitocòndries que alliberen calor a través de l'oxidació d'AG. L'alta concentració de citocrom oxidasa en aquestes mitocondris contribueix al seu color més fosc [3, 4].

1.2. Teixit adipós blanc

El teixit adipós blanc (TA) funciona principalment com un centre regulador clau del metabolisme de l'energia i un lloc per l'emmagatzematge de combustible. També influeix en altres processos biològics tals com l'angiogènesi, el control de la pressió arterial, la coagulació de la sang i la immunitat. El TA realitza les seves funcions a través de la regulació de la secreció d'hormones i citocines que poden actuar localment o a nivell sistèmic. D'altra banda, el TA proporciona aïllament tèrmic del cos i protegeix els òrgans interns contra danys mecànics [7].

1.3. Estructura general del teixit adipós

El TA es compon principalment d'adipòcits esfèrics grans, enganxats, recolzats per un teixit connectiu molt vascularitzat. La mida dels adipòcits varia en relació amb el contingut de lípids en les cèl·lules, oscil·la aproximadament de 30 a 130μ de diàmetre [9]. Un marc extern de teixit connectiu fort és un requisit per al manteniment dels adipòcits i l'estructura del teixit, l'exosquelet dels adipòcits es compon d'una malla de

col·lagen i fibres reticulars que funciona per protegir la cèl·lula del trencament mecànic [10].

Els altres components cel·lulars no adipòcits del TA formen part de l'anomenada fracció de l'estroma vascular (SVF), que és la fracció cel·lular aïllada després de la digestió amb la col·lagenasa del TA. El SVF comprèn cèl·lules mare multipotents, preadipòcits, fibroblasts, perícits, cèl·lules endotelials dels vasos sanguinis i limfàtics, macròfags i altres cèl·lules immunes [11]. El TA conté cèl·lules mare amb capacitat per diferenciar-se no tan sols en cèl·lules de llinatge mesodèrmic, com ara adipòcits, sinó també de cèl·lules no mesodèrmiques (neurones, hepatòcits i altres) [12]. En el TA també es poden infiltrar cèl·lules immunes, com ara macròfags, limfòcits, mastòcits i neutròfils [11, 13].

Una densa xarxa de capil·lars en el TA proporciona un lliurament adequat de substrats i oxigen, a més s'assegura rutes suficients per l'alliberament d'adipocines que poden actuar de manera endocrina [10]. El TA conté també els vasos limfàtics que proporcionen una important via de transport dels factors secretats [14]. El TA està innervat principalment pel sistema nerviós simpàtic amb les fibres nervioses que acompanyen les artèries i les arterioles [15].

1.4. Morfologia dels adipòcits

Els adipòcits en el TA contenen una única gota lipídica gran en el seu citoplasma i per tant es coneix com a adipòcits uniloculars. La gota de lípid en cada cèl·lula es col·loca al centre, el qual ocupa la major part del volum cel·lular (95%). Aquesta està envoltada per una monocapa de fosfolípids reforçada per una estructura en forma de gàbia formada per una xarxa de vimentina, perilipina (PLIN) i proteïnes activadores de la mort cel·lular semblants a DEFA (CIDE) [16]. Els lípids sintetitzats inicialment formen petites gotes a la capa perifèrica del citoplasma, després són transportats al llarg dels microtúbuls i, finalment, es fusionen amb la gota central [17].

El nucli en forma de copa és desplaçat a la perifèria de la cèl·lula, i la seva làmina nuclear està acoblada a la xarxa de vimentina [17]. El citoplasma conté l'aparell de

Golgi, el reticle endoplasmàtic llis i rugós, ribosomes lliures, i mitocondris grans i allargats amb crestes densament transversal [18]. La quantitat de mitocondris i el seu equip enzimàtic varia entre els diferents dipòsits de greix, el que contribueix a la diversitat fisiològica del TA [19].

La membrana plasmàtica conté molts tipus de receptors per a les hormones, neurotransmissors de noradrenalina, citocines i altres molècules de senyalització [11]. A més, els adipòcits expressen receptors *toll like* (TLRs), responsable del reconeixement de patrons moleculars associats a patògens (PRR) i altres molècules de senyalització de la immunitat innata i adaptativa [20].

1.5. El metabolisme dels adipòcits

EL TA és considerat un òrgan central en el control metabòlic. Les seves accions metabòliques principals es poden dividir en accions lipogèniques (biosíntesi, incorporació i emmagatzematge dels TG) i accions lipolítiques (alliberament d'AG lliures i glicerol) [21].

Durant els temps d'excessiva ingesta de nutrients o de disminució de la despesa d'energia, el TA guarda l'excedent de combustible en forma de TG. En resposta a l'estimulació de insulina, la glucosa que incorporen els adipòcits és utilitzada per produir els TG per al seu emmagatzematge. En cas d'escassetat de nutrients o l'augment dels requeriments d'energia, els TG es sotmeten a la lipòlisi, és a dir, s'hidrolitzen, i els AG resultants poden llavors ser transportats a través de la sang o pels vasos limfàtics a altres òrgans, on serveixen com a substrats energètics [21].

El TA també està involucrat en la regulació de l'estat nutricional, l'homeòstasi de la glucosa i la sensibilitat a la insulina a tot el cos mitjançant la producció de adipocines i pel flux d'AG [11, 22].

1.5.1. Accions lipogèniques

La majoria de les reserves d'energia en el cos humà s'emmagatzemen en els adipòcits en forma de TG, els quals són obtinguts per els adipòcits a partir de dues rutes principals: la lipogènesi de novo a partir de precursors no lipídics o mitjançant l'absorció dels AG del plasma [21].

1.5.1.1. La lipogènesi de novo: síntesi d'àcids grassos

La lipogènesi de novo és la síntesi de molècules d'AG a partir de substrats no lipídics, especialment de carbohidrats. Els llocs per la lipogènesi de novo en mamífers són el fetge, el TA i les glàndules mamàries [21]. Els enzims clau per a la síntesi d'AG, la sintasa d'àcids grassos (FAS) i l'acetil-CoA carboxilasa (amb les isoformes ACACA i ACACB) estan presents en el TA humà [23-27], però la contribució del TA a lipogènesi es considera que és baixa i menor que la del fetge [28, 29]. No es pot excloure però que la lipogènesi de novo podria operar en el TA en gran mesura quan hi ha excés de carbohidrats [21].

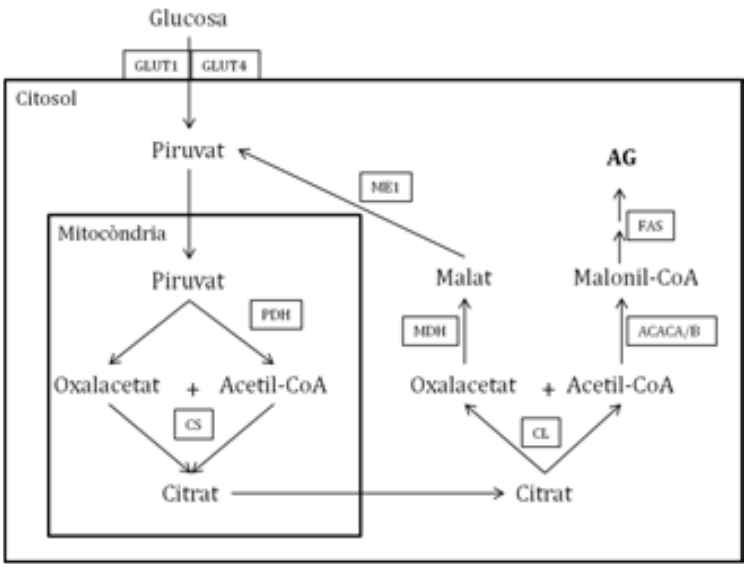

Figura 1. Lipogènesi de novo en els adipòcits.

Per la formació d'AG (Figura 1), una proporció dels metabòlits de la via glucolítica són desviats per formar piruvat, el qual, dins del mitocondri, es transforma en acetil-CoA (acetilcoenzim A) per la piruvat deshidrogenasa (PDH). L'acetil-CoA formada en la

mitocòndria per poder sortir al citoplasma es condensa amb l'oxalacetat per donar citrat, reacció que és catalitzada per la citrat sintasa (CS). El citrat surt de la mitocòndria al citosol on és escindit de nou a acetil-CoA i oxalacetat por la citrat liasa (CL). L'oxalacetat es reciclat per la malat deshidrogenasa (MDH) que el transforma en malat i aquest per l'enzim màlic (ME1) dona lloc al piruvat. Per altra banda, l'acetil-CoA sota l'acció de l'ACACA/B es transforma en malonil-CoA. Aquest últim entra en la síntesi d'AG, catalitzada per la maquinaria enzimàtica FAS, i culmina en la formació de l'àcid palmític (AG) [30, 31].

1.5.1.2. La captació d'àcids grassos a partir de plasma

La majoria dels AG utilitzats pels adipòcits per la síntesi de TG es proporcionen a partir del plasma, ja sigui com a AG no esterificat units a l'albúmina plasmàtica o com a TG incorporats en les lipoproteïnes (quilomicrons, lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL), lipoproteïnes de baixa densitat (LDL) i lipoproteïnes d'alta densitat (HDL)). Principalment els AG s'obtenen dels quilomicrons després de la ingesta i de les VLDL en etapes posteriors. Els TG d'aquestes lipoproteïnes són hidrolitzats fins a AG lliures i glicerol per la lipoproteïna lipasa (LPL) que es troba en el TA [32].

Els AG poden ser transportats o difondre passivament a través de les membrana plasmàtica dels adipòcits. Els adipòcits blancs humans expressen diversos transportadors d'AG que faciliten i regulen la transport d'aquests a través de la membrana plasmàtica: la proteïna CD36, les proteïnes transportadores d'AG (FATP) i les proteïnes d'unió als AG (FABP) [33-35].

1.5.1.3. Síntesi de triacilglicèrids

La síntesi de TG requereix glicerol i AG que seran transformats en glicerol-3-fosfat i en acetil-CoA respectivament i seran usats com a substrats (Figura 2). En els adipòcits humans, l'activitat glicerocinasa (GK) és insignificant, el glicerol-3-fosfat per tant, es produeix a partir de la glucosa a través de la primer pas de la glucòlisi o a partir de precursors no glucosídics a través de la gliceroneogènesis [36]. S'ha vist que la

gliceroneogènesis és la principal via ja que representa aproximadament el 90% de la síntesi de glicerol dels triglicèrids [37-39].

La gliceroneogènesis consisteix en la producció de glicerol-3-fosfat a partir de substrats no glucosídics com ara el piruvat, el lactat o aminoàcids. Aquesta via és una versió abreujada de la gluconeogènesis i està regulada principalment per la proteïna fosfoenolpiruvat carboxilasa (PCK1) [40-43]. Per la producció de glicerol-3-fosfat, el piruvat es transformat a oxalacetat, la PCK1 a partir de l'oxalacetat forma fosfoenolpiruvat. Aquest és el pas limitant de la velocitat de la via de gliceroneogènesis. El fosfoenolpiruvat es converteix en gliceraldehid-3-fosfat, que es redueix a dihidroxiacetona-fosfat i després a glicerol-3-fosfat per la glicerol-3-fosfat -deshidrogenasa (GPD1)[30].

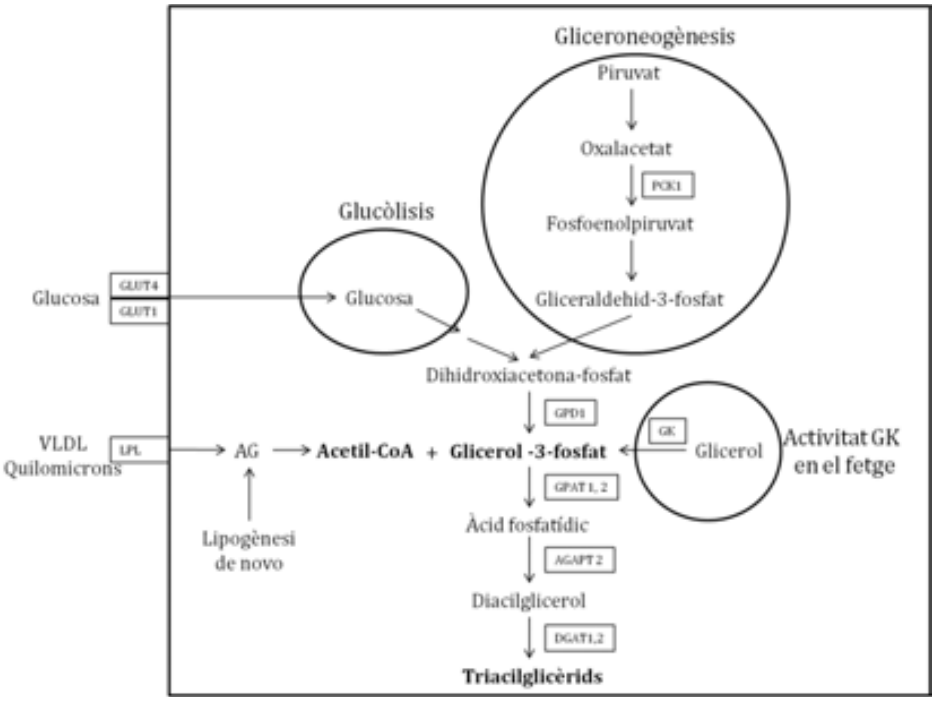

Figura 2. Síntesi de TG en els adipòcits.

La proporció de glicerol-3-fosfat produïda per la glicòlisi i per la gliceroneogènesis varia amb la l'estat nutricional. Per tant modificacions del flux de glucosa que entra en els adipòcits és probable que tinguin un impacte important amb el volum de TG [44]. La glucosa entra en els adipòcits a través de transportadors de glucosa (GLUT1 i

GLUT4) i la captació de la glucosa cel·lular és controlada per la insulina que promou la translocació del GLUT4 de l'espai intracel·lular a la membrana [21].

En els adipòcits, la biosíntesi de TG és la successiva esterificació dels àcids grassos en forma de Acetil-CoA al glicerol-3-fosfat per diferents enzims: per la glicerol-3-fosfat aciltransferasa (GPAT), l'acilglicerol-fosfat aciltransferasa (AGPAT) i la diacilglicerol aciltransferasa (DGAT)(Figura 2) [45, 46]. Tots els enzims involucrats en la síntesi dels TG poden presentar diferents isoformes i són codificats per diferents gens. En el TA són presents les isoformes GPAT1, GPAT2, AGAPT2, DGAT1 i DGAT2 però l'especificitat del substrat de les diferents isoformes encara no estan clares [47-49].

Els productes intermedis d'aquesta via, l'àcid fosfatídic i el diacilglicerol (DAG) estan involucrats en funcions cel·lulars important com la transducció de senyals. Per tant modificacions de l'activitat d'aquests enzims tindran un efecte no tan sols en l'emmagatzematge de TG sinó també en altres sistemes cel·lulars [50-53].

1.5.2. Lipòlisis

Durant la lipòlisi, els TG emmagatzemats en el TA són hidrolitzats fins AG lliures i glicerol, els quals són alliberats al torrent sanguini de manera que poden ser usats per altres teixits (Figura3). La hidròlisi completa dels TG depèn de l'activitat de tres enzims: la lipasa adiposa de TG (ATGL), que catalitza la primera etapa de la hidròlisi de TG amb la formació de DAG i AG; la lipasa sensible a hormones (HSL) que exhibeix un espectre de substrat molt més ampli, amb preferència per els DAG, però poden també hidrolitzar els monoacilglicèrids (MAG); i la lipasa monoacilglicerol (MGL), que hidrolitza els MAG a glicerol i AG lliures [54-57].

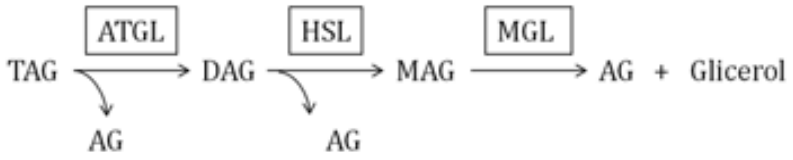

Figura 3. Lipòlisis dels TG en els adipòcits.

Els diferents passos del procés lipolític que condueix a l'activació de la HSL estan ben definits, l'estimulació de l'adenilat ciclasa condueix a un increment de les concentracions de AMP cíclic (AMPc) intracel·lular que al seu torn, promou l'activació de la proteïna quinasa A depenent de AMPc (AMPK) que activa per fosforilació a la HSL. Les catecolamines són els principals reguladors de la HSL, els receptors β-adrenèrgics (β1,2,3) en els adipòcits estan acoblats positivament a l'adenilat ciclasa i per tant estimulen la lipòlisi, en canvi el receptor α2-adrenèrgic està acoblat negativament i inhibeix la lipòlisis [58]. Els nivells de AMPc i, per tant, de lipòlisi també poden ser regulats per l'enzim fosfodiesterasa tipus 3 (PDE-3), el qual disminueix els nivells de AMPc [59].

En canvi la regulació de l'expressió i l'activació de l'ATGL és complexa i no ha estat del tot aclarida [60]. S'ha vist que l'expressió de ATGL s'eleva pel PPAR-γ, pels glucocorticoides i pel dejuni, mentre que la insulina i la ingesta d'aliments disminueix la seva expressió [61]. Comparant la regulació d'ambdós enzims, cal destacar que l'ATGL pot fosforilar-se, però la seva fosforilació no sembla ser intervinguda per la PKA com en cas de la HSL [54]. Cal destacar que els nivells d'expressió gènica no sempre es correlacionen amb l'activitat de l'ATGL i de la HSL. Aquesta discrepància s'explica per l'extensa regulació post-traduccional de les dues enzimes [61]. En canvi la MGL existeix en abundància i no està regulada hormonalment [62].

El producte final de la lipòlisi és el glicerol i els AG. El glicerol no és usat pel TA i és transportat per la circulació a altres teixits, principalment al fetge, amb la finalitat de ser metabolitzat. L'alliberament de glicerol per part dels adipòcits és depenent dels transportadors anomenats aquaporines (AQP3, AQP7 i AQP9), l'expressió d'aquaporines és reforçada pel dejuni i reprimida per la insulina [63, 64]. Per altra banda, els AG són transportats a través de la membrana dels adipòcits, la naturalesa d'aquest procés encara es debat, però es pensa, que surten mitjançant la difusió lateral o amb l'ús de proteïnes d'unió a AG, els adipòcits concretament expressen la proteïna FABP4 [65, 66]. Un cop fora, els AG al ser insolubles en aigua s'uneixen a proteïnes transportadores per tal de ser transportats a l'espai intersticial i a la circulació, hi ha diverses proteïnes transportadores d'AG però la més important és l'albúmina [67].

1.6. Regulació hormonal del metabolisme

Com la principal font de combustible, el TA té l'obligació de respondre de manera adequada als canvis en l'estat nutricional del cos i a les diferents necessitats d'energia. Les seves funcions estan regulades per senyals endocrines i pel sistema nerviós simpàtic [7].

El metabolisme de l'energia en els adipòcits és controlat per hormones produïdes per altres òrgans i per si mateix. L'emmagatzematge i la utilització de TG està regulat principalment per la insulina, les catecolamines i la leptina [68]. La insulina no tan sols promou la captació i l'ús de la glucosa en les cèl·lules de greix, sinó també activa els enzims lipogènics com ara els ACACA/B i el FAS i disminueix simultàniament la lipòlisi mitjançant la inhibició de l'activitat de la HSL [69]. La leptina contraresta els efectes de la insulina en els adipòcits, redueix la captació de glucosa i la lipogènesi, mentre que promou la lipòlisi i l'oxidació de la glucosa i dels AG [70].

Els glucocorticoides contraresten els efectes de la insulina sobre la utilització de glucosa en el fetge i en els teixits perifèrics. Els glucocorticoides estimulen la lipòlisi mitjançant l'augment de l'activitat de les lipases (HSL, ATGL i LPL), modulant d'aquesta manera tant l'alliberament com l'absorció dels AG [71].

Les catecolamines pertanyen als agents lipolítics claus. La unió de noradrenalina als receptors β1, β2 i β3-adrenèrgics en adipòcits activa la HSL, que es tradueix en un augment alliberament de combustible als teixits. En canvi, l'activació dels receptors α-adrenèrgics dels adipòcits inhibeix la lipòlisi [68].

1.7. Remodelació del TA blanc i adipogènesi

El TA es sotmet a la remodelació constant degut a l'adaptació a les quantitats canviants de combustible per emmagatzemar [72]. Els canvis inclouen la hipertròfia, que és l'increment de la mida, i la hiperplàsia, que és la proliferació dels adipòcits. En els adults, els adipòcits madurs constitueixen una població de cèl·lules terminalment diferenciades, però a causa de la presència de cèl·lules mare multipotents i preadipòcits, la taxa de rotació dels adipòcits humans és alta [73]. Els càlculs basats

en la incorporació de C atmosfèric en el DNA dels adipòcits van revelar que aproximadament el 10% del total dels adipòcits es renova cada any [74]. Els precursors dels adipòcits, els preadipòcits són una línia cel·lular derivada de cèl·lules mare multipotents embrionàries d'origen mesodèrmic i amb la capacitat de diferenciar-se en adipòcits, condròcits, osteoblasts o miòcits [75].

Adipogènesi és el procés durant el qual els preadipòcits es diferencien en adipòcits madurs i poden emmagatzemar greix (Figura 4). L'adipogènesi és un procés ben orquestrat de múltiples etapes que requereix l'activació seqüencial de nombrosos factors de transcripció, incloent el receptor-γ activat pel proliferador dels peroxisomes (PPAR-γ) i les proteïnes d'unió al potenciador-CCAAT (C/EBP) [75]. El factor de transcripció adipogènic director, el PPAR-γ indueix la proteïna d'unió a elements regulador d'esterols (SREBP1), un factor de transcripció lipogènic, iniciant d'aquesta manera tant la diferenciació d'adipòcits com la lipogènesi [76]. En el procés de l'adipogènesi estan implicats varis factors com el factor de creixement similar a la insulina tipus 1 (IGF-I), el factor d'estimulació de colònies de macròfags, els factors de transcripció STATS, els AG, les prostaglandines i els glucocorticoides [77].

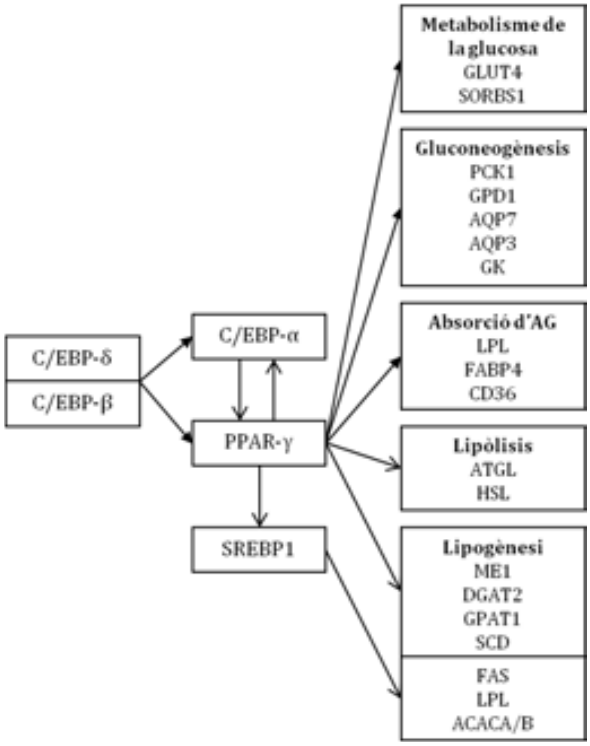

Figura 4 . Factors de transcripció implicats en l'adipogènesi i els processos metabòlics que afecten. SCD: Estearoil-CoA desaturasa-1; SORBS1: domini que conte proteïnes Sorbin i SH3

En el procés de diferenciació, els preadipòcits perden la seva morfologia fibroblàstica, acumulen TG al citoplasma, i adquireixen l'aspecte i les característiques metabòliques dels adipòcits [78]. L'acumulació de TG està estretament correlacionada amb l'augment de la freqüència de la lipogènesi de novo i l'augment de l'expressió dels enzims de la biosíntesi d'AG i TG [78, 79]. També s'expressen de forma coordinada nombroses proteïnes reguladores, característiques dels adipòcits madurs, com els receptors de insulina, el transportador de glucosa (GLUT4) i la leptina entre altres [78].

El **C**/EBP són factors de transcripció altament expressats en els adipòcits i s'indueixen durant l'adipogènesi. Existeixen tres isoformes (C/EBP-α, C/EBP-β i C/EBP-δ). El C/EBP-β i δ són induïts transitòriament durant les primeres etapes de l'adipogènesi, mentre que el C/EBP-α és induït durant les etapes terminals [80]. S'ha demostrat que cadascun d'ells té un paper important en l'adipogènesi, mentre que el C/EBP-β i δ promouen l'adipogènesi, almenys en part, per la inducció de l'expressió dels factors de transcripció principals (C/EBP-α i PPAR-γ). El C/EBP-α es requereix tant per a l'adipogènesi com per a la funció normal dels adipòcits, promovent l'adipogènesi mitjançant la inducció de l'expressió de PPAR-γ i actuant sinèrgicament amb aquest per promoure la diferenciació dels preadipòcits en adipòcits [81-83].

El PPAR-γ forma part d'una superfamília de receptors nuclears, està altament expressat en TA i estimula la transcripció de molts gens específics d'adipòcits, com els passos inicials crítics de l'adipogènesi [83]. Hi ha dues isoformes de PPAR-γ (PPAR-γ1 i PPAR-γ2). El PPAR-γ1 està expressat en el TA i en altres tipus cel·lulars en proporcions inferiors, en canvi PPARγ-2 és troba exclusivament expressat en el TA. El PPAR-γ s'activa per compostos conegut com les tiazolidinediones (TZD), que s'utilitzen com agents antidiabètics. L'activació de PPAR-γ en el TA implica l'activació de gens que codifiquen molècules que afecten al metabolisme dels lípids i de la glucosa. El PPAR-γ està implicat en l'estimulació dels passos crítics en el metabolisme com ara l'absorció d'AG (LPL, FABP4 i CD36) [84, 85], la lipogènesi (ME1, DGAT2, GPAT1 i SCD) [86-88], la gluconeogènesis (PCK1, GPD1, AQP7, AQP3 i GK) [89-92], la homeòstasis de la glucosa (GLUT4 i SORBS1) [93] i la lipòlisis (ATGL i HSL) [94].

L'activació d'aquesta via metabòlica causa en tot el cos repartició dels lípids augmentant el contingut de TG del TA i la reducció dels AG lliures i dels TG a la circulació, al fetge i al múscul [87, 95]. El PPAR-γ també afecta l'alliberament de molècules de senyalització del greix, els agonistes de PPAR-γ inhibeixen l'expressió de resistina i del TNF-α i estimulen la producció d'adiponectina [96-99].

La proteïna SREBP1 és un factor de transcripció induït pel PPAR-γ amb un paper important en l'adipogènesi, en la sensibilitat a la insulina i en la homeòstasis dels AG [100, 101]. SREBP1 estimula l'expressió de diversos gens lipogènics (FAS, LPL, ACACA i SCD) [102, 103].

1.8. Funció endocrina

El TA és capaç alliberar substancies que es disseminen en la circulació sanguínia i poden actuar a distancia, és a dir, de manera endocrina. Alguns investigadors han observat la presencia de capil·lars fenestrats, una característica de òrgans endocrins, en el TA. Aquests mediadors segregats pel TA també podrien actuar localment (de manera paracrina) [104].

Considerant que el TA no està compost únicament per adipòcits, és probable que els factors secretats podrien derivar-se de diferents tipus cel·lulars. De fet, es va demostrar que molts dels factors secretats provenen de cèl·lules diferents i no dels adipòcits madurs (Taula 1)[5, 105].

Taula 1. Les cèl·lules del TA que participen en la síntesi d'adipocines [105].

	Adipòcit	SVF
Adiponectina	+ + +	+ / -
Leptina	+ + +	-
Resistina	+ / -	+ + +
TNF-α	+ / -	+ + +
IL-6	+ / -	+ + +
IL-10	+/ -	+ + +
MCP-1	+ / -	+ + +
PAI-1	+ +	+ + +
Angiotensina II	+	+ + +
VEGF	+ / -	+ + +

Les cèl·lules del SVF alliberen principalment el factor de necrosis tumoral-α (TNF-α), interleucina-6, (IL-6), interleucina-10 (IL-10), la proteïna quimioatraient de monocits-1 (MCP-1), l'inhibidor de l'activador del plasminógen-1 (PAI-1), l'angiotensina II (Ang II) així com la resistina i el factor de creixement de l'endoteli vascular (VEGF), mentre que l'adiponectina i la leptina es produeixen casi exclusivament pels adipòcits humans (Taula 1) [105, 106].

1.9. Funcions de les adipocines

Els processos biològics més importants afectats per adipocines impliquen la regulació de l'homeòstasi energètica, la proliferació i la diferenciació dels adipòcits, l'angiogènesi , la resposta immune, la reproducció, la regulació de la pressió arterial i la coagulació de la sang entre altres. La taula 2 mostra les adipocines secretades i els processos fisiològics que afecten [11, 107, 108].

Taula 2. Classificació de les adipocines segons el procés fisiològic que duen a terme [108].

Processos fisiològics i metabòlics	**Adipocines**
Metabolisme energètic	Leptina
Control de la ingesta	Neuropèptid Y (NPY)
Metabolisme lipídic	Proteïna transportadora de retinol tipus 4 (RBP4) Lipoproteïna lipasa (LPL) Proteïna transportadora d'ésters de colesterol (CETP) Àcids grassos no esterificats (NEFA) Factor de creixement similar a la insulina tipus 1 (IGF-1) Apolipoproteïna E
Homeòstasis glucídic i sensibilitat a la insulina	Adiponectina Resistina Visfatina Vaspina Omentina Quemerina Nesfatina
Factors de creixement	Factor de creixement transformant (TGF-β) Factor de creixement neuronal (NGF) Factor de creixement dels hepatòcits (HGF) Factor de creixement epidèrmic amb capacitat d'unió a Heparina (HB-EGF)
Factors proinflamatoris	Interleucina-1 (IL-1) Interleucina-6 (IL-6) Interleucina -18 (IL-18) Interleucina-8 (IL-8) Proteïna quimioatraient de monocits-1 (MCP-1) Factor de necrosis tumoral-α (TNF-α) Lligand-10 de quimiocina (motiu C-X-C) (CXCL-10) Interleucina-1B (IL-1B),

Processos fisiològics i metabòlics	Adipocines
	Interleucina-13RA (IL-13RA) Interleucina (IL-16) Lligand-5 de quimiocina (motiu C-C) (CCL-5)
Factors antiinflamatoris	Interleucina -10 (IL-10) Interleucina -4 (IL-4) Interleucina -1RA (IL-1RA) Adrenomedulina
Angiogènesi	Factor de creixement de l'endoteli vascular (VEGF)
Homeòstasis vascular	Inhibidor de l'activador del plasminógen-1 (PAI-1)
Pressió sanguina	Angiotensina II (Ang II)
Proteïnes del complement o relacionades	Adipsina (factor del complement D) Factor del complement B Factor del complement C Factor del complement C3 Factor del complement C1q
Prostaglandines	Prostaglandina F2 (PGF2) Prostaglandina E2 (PGE2)
Factors oxidants	Òxid nítric (NO) Peròxid d'hidrogen (H_2O_2) Sulfit d'hidrogen (H_2S) Sintasa d'òxid nítric endotelial (eNOS) Superòxid dismutasa (SOD)

En els últims anys, el nombre d'adipocines s'ha expandit ràpidament, aquestes inclouen leptina, adiponectina i resistina, entre altres. A continuació es fa una breu descripció de les més estudiades.

1.9.1. La leptina

La leptina, un producte del gen *ob* , s'expressa i es produïda gairebé exclusivament pels adipòcits del TA [5]. S'ha vist que el greix subcutani és el principal productor de leptina i els seus nivells es correlacionen directament amb la quantitat de TA [109, 110]. La leptina actua sobre el sistema nerviós central per reduir la ingesta d'aliments i augmentar la utilització de l'energia [111-113]. Els receptors de la leptina es troben en diversos llocs de l'hipotàlem i en diferents òrgans, com el fetge, ronyó, pulmó, pàncrees i en el TA [114, 115].

La leptina actua sobre les cèl·lules diana a través de receptors de membrana amb l'activació de STAT3 i la seva acció es inhibida pel supressor de senyal de citocines-3 (SOCS3) [116, 117]. Es va veure en models animals que l'alteració del lloc d'unió de STAT3 als receptor de leptina provocava hiperfàgia, despesa d'energia reduïda i

obesitat, un fenotip semblant al dels ratolins deficients en receptors de leptina. Per tant, l'activació de STAT3 es pot utilitzar com un marcador de l'activació del receptor de leptina [118].

La presència de receptors de leptina en el TA reforcen el paper autocrí i paracrí de la leptina, els estudis experimentals van mostrar que la leptina és capaç d'afectar el metabolisme dels adipòcits per diferents mecanisme [119]: 1)Inhibició de la síntesi de lípids: amb la supressió d'enzims lipogènics (FAS i ACACA) [120, 121], incrementant els enzims d'oxidació d'AG [120], incrementant l'oxidació de la glucosa (CS) i incrementant de l'oxidació mitocondrial dels AG [122]. 2)Supressió de l'efecte de la insulina en TA, afectant la unió de la insulina als seus receptors i les accions metabòliques de la insulina sobre la captació de glucosa [123]. 3)Increment de la lipòlisis (ATGL) [124].

1.9.2. L'adiponectina

L'adiponectina és una proteïna altament expressada i exclusiva de TA [125]. S'ha observat que hi ha una forta correlació negativa entre la concentració d'adiponectina en els éssers humans i la quantitat de TA [126].

S'han identificat tres receptors d'adiponectina: AdipoR1, AdipoR2 i T-cadherina. El AdipoR1 s'expressa de forma ubiqua, amb major expressió en el múscul esquelètic, el AdipoR2 s'expressa més al fetge i el T-cadherina està àmpliament distribuït en tot l'arbre cardiovascular [127, 128]. A més, el TA també expressa els receptors de adiponectina AdipoR1i AdipoR2 [129]. La transducció del senyal pels receptor AdipoR1 i AdipoR2 implica l'activació de AMPK [130].

L'adiponectina està implicada en una àmplia varietat de processos fisiològics, incloent el metabolisme energètic, la inflamació i la fisiologia vascular, actuant directament en el fetge, el múscul esquelètic i a l'endoteli vascular [128].

L'adiponectina en el múscul activa el transport de glucosa amb l'augment dels transportadors de membrana GLUT4 [131] i augmenta l'oxidació d'AG amb l'activació de l'enzima ACACA/B [132]. En el fetge inhibeix la gluconeogènesi amb la inhibició de

molècules implicades com la PCK1 [133]. L'adiponectina també augmenta l'expressió de PPAR-γ i els seus gens diana, el que resulta en una reducció de contingut de TG en el fetge i en el múscul [130] .

L'adiponectina també pot efectuar un efecte autocrí en els adipòcits. S'ha vist que l'adiponectina pot modular la funció secretora del TA, ja que pot reduir l'expressió i secreció de citocines en els adipòcits humans, incloent les interleucines TNF, IL-6, la IL-8 i la MCP-1. A més, pot modular el creixement del TA amb la secreció de les metal·loproteïnes (TIMP-1/2), podent augmentar la hipertròfia i l'acumulació de greix en els adipòcits [134, 135].

1.9.3. La resistina

La resistina va ser anomenada per la seva capacitat per induir resistència a la insulina [97]. En els rosegadors, la resistina és secretada principalment a partir del TA, en canvi en humans la resistina es secretada principalment pels monòcits circulants de la sang, amb nivells baixos procedents del TA [5].

Es sap molt poc sobre les vies de senyalització intracel·lular pel qual la resistina indueix els seus efectes metabòlics malgrat que s'ha demostrat que és una proteïna important en la regulació de les vies metabòliques en diversos teixits i òrgans, inclosos el hipotàlem, els adipòcits i el fetge [136].

La resistina interfereix amb múltiples passos implicats en la cascada de senyalització d'insulina, incloent la fosforilació dels receptor de la insulina (IR i IRS-2), l'activació de la proteïna quinasa B (PKB o AKT) en el fetge, en el múscul, i en el TA [137]. A més, la resistina pot augmentar l'expressió d'enzims de la gluconeogènesis en el fetge i disminuir l'activitat de l'AMPK en el fetge i en el múscul [138-140]

1.10. Els receptors *Toll Like* en teixit adipós

Els receptors *toll like* (TLRs) són receptors de reconeixement de patrons (PRR) que detecten els components microbians i activen el sistema immunològic, proporcionant una primera línia de defensa de l'hoste enfront les infeccions [141, 142]. Els TLRs

reconeixen diversos patrons moleculars conservats anomenats patrons moleculars associats a patògens (PAMP) derivats de virus, bacteris, fongs i paràsits i també altres molècules del medi ambient no microbianes que poden iniciar les resposta immunitària de l'hoste. Diversos informes recents han demostrat que alguns TLRs, com el TLR2 i el TLR4, també responen a lligands endògens. Aquests lligands endògens inclouen proteïnes de xoc tèrmic, productes de degradació de la matriu extracel·lular, proteïnes B1 del grup d'alta mobilitat (HMGB1), β-defensines, AG i LDL modificades [141].

El millor TLR caracteritzat és el TLR4, que reconeix els lipopolisacàrids dels bacteris gramnegatius (LPS). Els altres TLRs antibacterians són el TLR2, que en combinació amb TLR1 reconeix lipopèptids triacilats (Pam3CSK4) o en combinació amb TLR6 (FSL-1) reconeix lipopèptids diacilats i el TLR5 que reconeix flagelina bacteriana. La resta de TLRs són antivirals, el TLR3 que reconeix el RNA de doble cadena, el TLR7 i el TLR8 que reconeixen el RNA d'una sola cadena i el TLR9 que reconeix motius CpG, en virus i bacteris [143, 144].

Els TLR s'expressen majoritàriament en cèl·lules hematopoètiques, però varis estudis han demostrat que tenen una expressió cel·lular àmplia, fins i tot en poblacions rellevants per a les funcions metabòliques, com ara els adipòcits i les neurones [145]. De fet, un informe recent ha demostrat majors nivells d'expressió de TLR4 en els adipòcits que en els macròfags presents en el TA. Atès al paper dels TLR en la resposta immune s'han proposat com un possible enllaç entre els sistemes immunològics, hormonals i metabòlics [106].

La senyalització dels TLRs es produeix a través de dues vies: una via dependent de MyD88 que condueix a la producció de citocines proinflamatòries, i una via MyD88 independent que desencadena la inducció de interferó-β (IFN-β) . La via dependent de MyD88 usada per la majoria dels TLRs és essencial per a la inducció de citocines proinflamatòries a traves de l'activació de NF-kB. La via MyD88 independent activada per TLR3 i TLR4 usa l'adaptador TRIF per la inducció d'interferons de tipus I (Figura 5) [141, 142, 146, 147].

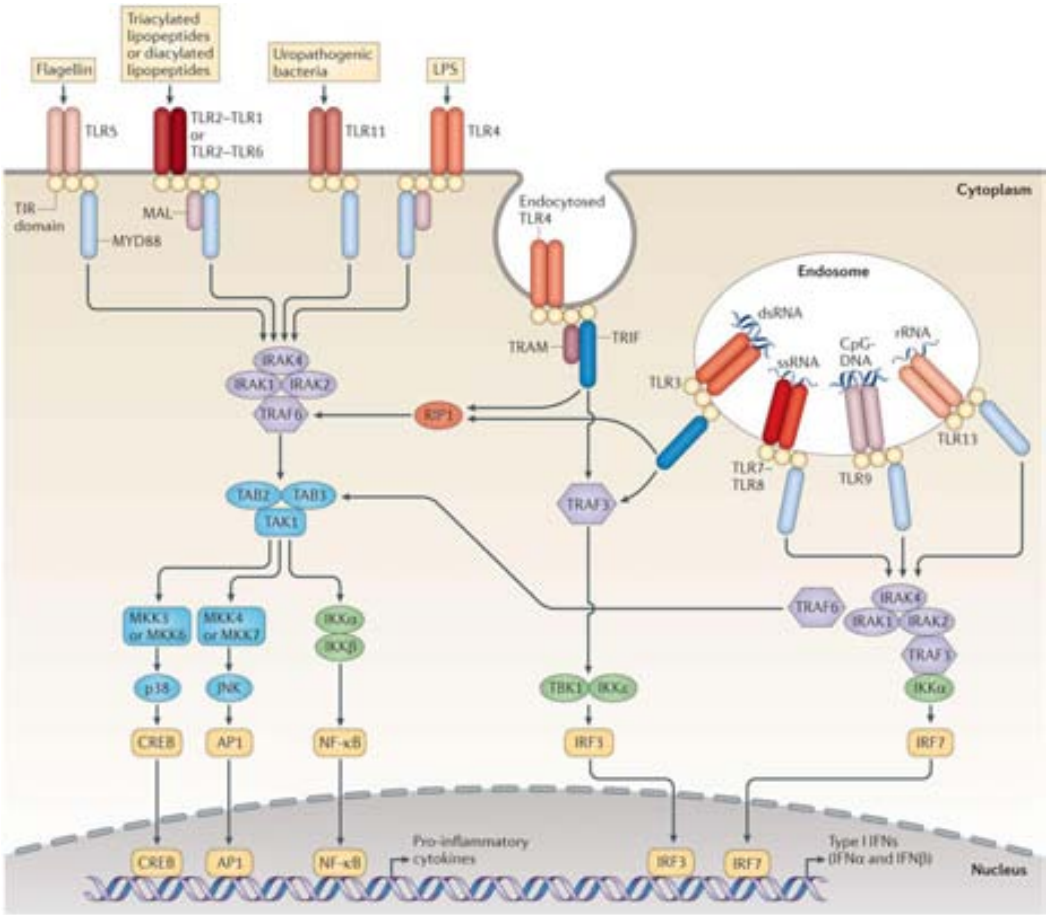

Figura 5. Via de senyalització dels receptors TLRs [148].

Tots els tipus de receptors TLR s'expressen en el TA humà, encara que, quan es va investigar en adipòcits humans aïllats i diferenciats, no es va veure expressió de TLR5 i TLR7 [149]. D'altra banda, el TA està compost per altres tipus cel·lulars presents en el SVF, aquest ha de ser considerat com un compartiment específic, ja que conté cèl·lules endotelials, cèl·lules vascular del múscul llis i cèl·lules immunes, entre altres, que mostren un perfil d'expressió de TLR que difereix dels adipòcits madurs o dels preadipòcits aïllats [149-151].

El LPS, a traves de TLR4, és sense dubte el més potent inductor de citocines proinflamatòries i quimiocines en els adipòcits. En els adipòcits humans, l'estimulació amb LPS indueix l'alliberament de TNF-α, IL-6, IL-1β, IL-8 i MCP-1 amb l'activació de la via de senyalització TLR/NF-kB [152] i regula a l'alça l'expressió del receptor TLR2 [151, 152].

1.11. Inflamació i metabolisme

El estat inflamatori del TA pot ser modulat pels lligands TLR, la majoria d'estudis s'han centrat en l'estimulació amb lipopolisacàrid (LPS) [153]. S'ha vist que la inflamació induïda per LPS provoca alteracions en el metabolisme amb un increment de la mobilització d'AG en el plasma [154, 155].

El TA després de l'estimulació amb LPS contribueix a la mobilització d'AG en plasma a diferents nivells: 1)Increment de la lipòlisis [155]; 2)Reducció de l'expressió de molts dels enzims i transportadors necessaris per a l'emmagatzematge dels AG en el TA (LPL, CD36, ACSL1, FABP4)[156-158]; 3)Disminució de l'expressió de enzims implicats en la lipogènesi (GPAT, AGPAT2, MGAT1, DGAT1, ME1) [159]; 4)Disminució d'enzims implicat en el metabolisme de la glucosa i en la gluconeogènesis (GLUT4 i PEPCK) [159].

A més la senyalització TLR2 i TLR4 s'ha vist que afecta a la diferenciació dels adipòcits amb la disminució de l'expressió de PPAR-γ. Aquesta observació pot estar apuntant a un possible paper de la inflamació en la regulació de l'adipogènesi [160, 161].

S'ha vist que a més que el LPS es capaç de modificar la secreció de adipocines. El LPS s'ha demostrat que incrementa els nivells de resistina en monòcits de sang perifèrica en humans [162], en canvi, l'estimulació del TA amb LPS sembla que no afectaria a la producció de resistina [163]. L'efecte del LPS en quant a la secreció de leptina ha estat motiu de controvèrsia, ja que els primers estudis es van realitzar amb rosegadors i van mostrar resultats contradictoris on mostraven tan que no havia cap efecte com que es produïa un augment de la producció de leptina [164-168]. Estudis en humans, però, han mostrat que el LPS pot provocar una reducció dels nivells de secreció de leptina per part adipòcits [169] [170]. En concordança, també s'ha vist que citocines inflamatòries com el TNF-α i la IL-1β poden disminuir la producció i alliberament de leptina en el TA [171]. En el cas de la adiponectina s'ha vist que el LPS i les citocines inflamatòries com el TNF-α poden disminuir la seva expressió en el teixit adipós [170, 172].

1.12. Via de senyalització JAK-STAT en teixit adipós

En la via de transducció JAK/STAT participen dues famílies de proteïnes: la família tirosina quinasa Janus (JAKs) i la família de transductors de senyal i activadors de la transcripció (STATs). La via JAK-STAT és una via de senyalització intracel·lular que s'activa en resposta a un gran nombre de citocines, factors de creixement i hormones, i està implicada en nombroses funcions dins del tot l'organisme com immunitat, inflamació, metabolisme de lípids, cancerogènesis, ontogènesis, entre moltes altres [173].

Fins ara s'han identificat 4 membres de la família JAK, incloent JAK1, JAK2, JAK3, i TYK2, en els adipòcits s'han detectat JAK1, JAK2 i TYK2, en canvi JAK3 s'ha detectat en TA, però no hi ha evidències que indiquin que s'expressi en els adipòcits [174, 175]. La família de proteïnes STAT conté 7 membres (1, 2, 3, 4, 5A, 5B, i 6) i s'ha detectat expressió de totes ells en els adipòcits [176-178].

L'activació de la via de JAK-STAT comença amb la unió d'una citocina o d'un factor de creixement amb el seu receptor de membrana provocant la dimerització del receptor i l'activació de les proteïnes JAK associades. Les JAK activades actuen fosforilant els STATs en un residu de tirosina, els STATs fosforilats es dimeritzen i transloquen cap el nucli per unir-se a seqüències específiques en el genoma on regulen la transcripció de gens diana específics [179].

Els STATs també poden ser fosforilats en serina per les proteïnes cinases activades por mitògens (MAPK) [173]. Tots els STATs, excepte el STAT2, es fosforilen com a mínim en un residu de serina. Aquesta fosforilació té lloc independentment de la fosforilació en tirosina i és necessària per assolir el grau màxim d'activació [180].

Els STATs després de ser activats es dimeritzen, STAT1, 3, 4, 5 i 6 solen formar homodímers o heterodímers, mentre que STAT2 funciona principalment formant un complex amb STAT1 i el factor regulador de l'interferó-9 (IRF9) [181]. STAT1 és un mediador central de la resposta a interferó de tipus II (interferó-γ (IFN-γ)) i de tipus I (interferó-α (IFN-α) i IFN-β) que estan implicats en la regulació del creixement cel·lular, en la resposta antivírica i en la defensa immune [182]. L' IFN-γ desencadena principalment l'activació de STAT1 que indueix l'expressió de gens mitjançant la unió

a seqüències gamma activades (GAS). En contrast, l'interferó de tipus I activa tant STAT1 com STAT2 i desencadena la formació del complex transcripcional ISGF3 (factor genic-3 estimulat per interferó) junt amb IRF9 implicat en la senyalització a través dels elements de resposta estimulats per l'interferó (IRSE) de tipus I [183].

STAT1, STAT2, STAT4 i STAT6 tenen una funció essencial en el desenvolupament de la resposta del sistema immune. En canvi, STAT3 i STAT5 estan implicats en una gran varietat de funcions biològiques, en diferents tipus cel·lulars i en resposta a diferents citocines i factors de creixement [184, 185]. Dins de les funcions en el sistema immune, STAT3 té un paper clau en la mediació de les senyals antiinflamatòries per la IL-10 [186]. D'altra banda, STAT5 és essencial en la mediació de les funcions de la prolactina (PRL) i de l'hormona del creixement (GH) [185].

La via de senyalització de JAK-STAT juga un paper important en el desenvolupament i l'homeòstasi de les cèl·lules. Una gran quantitat de citocines i hormones poden regular el funcionament i el metabolisme dels adipòcits a través de l'activació de la via de senyalització JAK-STAT amb la regulació transcripcional de gens implicats en l'acció de la insulina, l'adipogènesi i el metabolisme de lípids i la glucosa (taula 3) [173].

Taula 3. Gens diana dels STATs en els adipòcits [187]

STATs	Activador del STATs	Gen diana
STAT1	IFN-γ	PPAR-γ
	IFN-γ	LPL
STAT3	-	PPAR-γ
	-	C/EBP-β
STAT5	-	PPAR-γ
	GH	FABP4
	GH	AOX
	GH, PRL	FAS
	GH, PRL	PDK4

PDK4: Piruvat deshidrogenasa quinasa tipus 4; AOX: Acil-CoA oxidasa.

1.12.1. Senyalització de STAT1 en adipòcits

El principal activador de STAT1 en adipòcits és el IFN-γ, el qual indueix robustament la fosforilació de STAT1 [173]. Estudis previs en adipòcits han demostrat que les proteïnes STAT1 activades s'uneixen al promotor del PPAR-γ i de la LPL i reprimeixen

la seva expressió [188, 189]. D'acord amb això, es va veure que la senyalització a traves de STAT1 en els adipòcits te un paper central en la capacitat de el IFN-γ per disminuir l'emmagatzematge de lípids i l'adipogènesi [190, 191].

1.12.2. Senyalització de STAT3 en adipòcits

STAT3 s'expressa abundantment en els adipòcits [176, 192], intervé en l'acció de diverses molècules com la leptina, la IL-10, l'hormona de creixement i la IL-6 entre altres [193-195]. S'ha vist que STAT3 s'activa hora durant l'adipogènesi, el que suggereix que és un factor crític en la regulació de la diferenciació dels adipòcits [196]. S'ha vist que està implicat en la diferenciació dels adipòcits a través de la modulació de la transcripció de C/EBP-β i PPAR-γ [197, 198].

1.12.3. Senyalització de STAT5 en adipòcits

L'activació de STAT5 en TA es realitzada principalment per la hormona del creixement i per la prolactina [199]. STAT5 s'activa d'hora durant la diferenciació d'adipòcits i s'han demostrat que te un paper clau en el desenvolupament dels adipòcits [199]. S'ha vist que el STAT5 promou l'adipogènesi a traves de l'expressió de PPAR-γ [173, 200], a més, STAT5 pot induir l'expressió de AOX i PDK4 i reprimir l'expressió de FAS i FABP4, proteïnes que participen en metabolisme dels lípids i de la glucosa [201].

2. Tipus de teixit adipòs

El TA inclou nombrosos dipòsits anatòmicament distribuïts per tot el cos. La mida de les reserves de greix és molt variable, ja que pot variar des del 5% al 60% del total del pes corporal [202]. La distribució del TA es pot dividir en dos dipòsits principals: el teixit adipós visceral (TAV) i el teixit adipós subcutani (TAS). El TAV es troba a la cavitat abdominal envoltant els òrgans interns mentre que el TAS forma una capa de greix sota la pell, en la hipoderma (Figura 6). Al voltant del 80% de tot el greix corporal es troba a la zona subcutània. En canvi, el greix visceral ocupa del 10 al 20% del greix total en homes i del 5 al 8% en dones [203].

El TAV es pot dividir en tres dipòsits principals: el greix omental que envolta els intestins superficialment, el greix mesentèric que està més profundament enterrat al voltant dels intestins i el greix retroperitoneal prop dels ronyons, als costats dorsals de la cavitat abdominal. A més, quantitats més petites de TAV també es localitzen al voltant dels òrgans específics com ara els vasos sanguinis (perivascular), el cor (epicàrdic), l'estómac (epigàstric) i les gònades (gonadal) [204].

El greix subcutani representa el tampó fisiològic normal d'acumulació de greix quan el consum d'energia és excessiu i la despesa és limitada [205]. Quan es supera la capacitat d'emmagatzematge del TAS o si es deteriora la seva capacitat per generar nous adipòcits el greix comença a acumular-se en el TAV [206].

En estats patològics, els lípids també es poden acumular dins de teixits no adiposos formant dipòsits de greix ectòpics, especialment en el fetge, en el múscul esquelètic, en el cor, en el pàncrees i fins i tot dins la paret del vas sanguini. En aquest casos la funció de l'òrgan pot ser alterada pels dipòsits de greix que l'envolta ja sigui per la compressió mecànica o per la secreció d'adipocines [7].

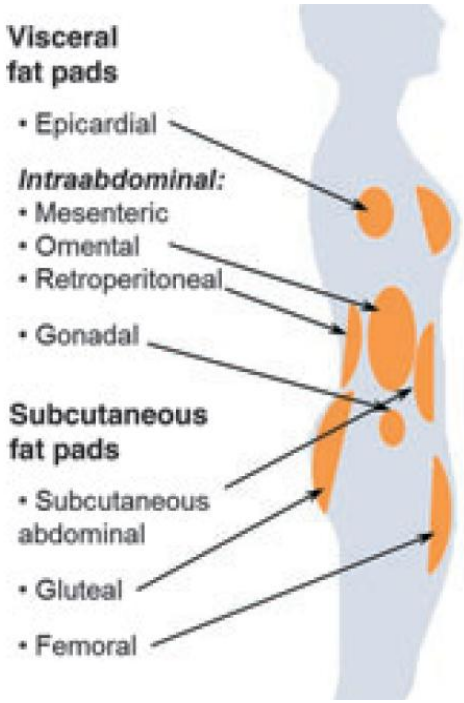

Figura 6. Representació anatòmica dels diferents dipòsits de greix [7].

2.1. Teixit adipós subcutani

El TAS es distribueix sobre la superfície del cos en la capa hipodèrmica de la pell. Els dipòsits subcutanis més definits i estudiats són el dipòsit abdominal, el gluteal i el femoral (figura 6) [204].

El TAS gràcies a la seva relativa inèrcia metabòlica, serveix principalment com un òrgan d'emmagatzematge de TG a llarg termini. S'ha suggerit que el paper de TAS és actuar com un tampó metabòlic contra l'excés de substrats d'energia durant el consum d'excedents de lípids provinents de la dieta així com contra l'escassetat de substrats d'energia durant els períodes d'exercici, de dejú, de fam i d'extenuació. Per tant, es pot concloure que el TAS indirectament protegeix el cos contra lipotoxicitat i deposició de greix ectòpic [207].

2.2. El teixit adipós visceral

Relativa a la ubicació del greix dins de la cavitat abdominal, es poden distingir diferents dipòsits de greix visceral (Figura 6): el mesentèric, l'omental, el retroperitoneal i el gonadal. Entre aquests, la circulació sanguínia del greix omental i mesentèric drena en la vena portal, mentre que el greix retroperitoneal i gonadal drenen a les venes sistèmiques. A causa de la seva localització anatòmica en els éssers humans, el greix mesentèric és el més difícil d'accedir, mentre que el greix omental és el de més fàcil accés durant una cirurgia abdominal [208].

2.3. Heterogeneïtat morfològica i funcional entre el TAV i el TAS

Hi ha diferències regionals en les característiques morfològiques i funcionals entre el greix visceral i subcutani. Els dos dipòsits difereixen en composició cel·lular, vasculatura, innervació, característiques metabòliques, composició de la matriu extracel·lular i productes de secreció [8].

Les diferències entre els TAV i el TAS sorgeixen dels diferents programes genètics de diferenciació dels preadipòcits i de la influència del microambient local [209, 210]. Es va observar que els preadipòcits humans subcutanis i viscerals aïllats i cultivats en

condicions idèntiques mantenien les característiques del dipòsit de greix específic, fins i tot després de moltes duplicacions de la població [211, 212].

2.3.1. Diferencies anatòmiques i estructurals

Les principals àrees de deposició de greix subcutani són les regions gluteo-femoral, la paret abdominal anterior i la paret abdominal posterior, en canvi en el teixit visceral és en la zona abdominal [213].

A causa de la seva posició anatòmica, la sang venosa de greix visceral (omental i mesentèric) es drena directament al fetge a través de la vena portal. Això contrasta amb el greix subcutani on el drenatge venós és a través de les venes sistèmiques. [214, 215].

2.3.2. Diferències de sexe

La distribució regional del greix en els éssers humans varia en funció del gènere, de l'estat hormonal i de la predisposició genètica. Generalment les dones tenen major quantitat de TA que els homes, a més, els homes acumulen més greix a la zona central (TAV i TAS abdominal), mentre que les dones acumulen més greix a la part inferior del cos (TAS gluteal i femoral) [216]. Per tant, l'obesitat superior del cos és més comuna en els homes, i l'obesitat de la part inferior del cos es produeix amb més freqüència en les dones. Els factors que regeixen aquest dimorfisme sexual no són clars, segurament les hormones sexuals (estrògens i andrògens) tindrien un paper important [216].

2.3.3. Diferències morfològiques.

Existeixen dos subtipus principals de preadipòcits amb diferents capacitats per a la replicació i la diferenciació. Encara que els dos subtipus es poden convertir l'un a l'altre, els seus ràtios varien entre els dipòsits de greix [212]. El TAS és ric en preadipòcits del subtipus ràpida replicació i diferenciació, mentre que el subtipus lenta replicació i diferenciació és abundant en el TAV [212]. A més, el nombre de

cèl·lules que componen el SVF per gram de TA és més gran en el TAV que en el TAS [217, 218].

2.3.4. Diferències en el creixement i remodelació

L'acumulació de TA depèn en part de la formació de nous adipòcits (adipogènesis) com per la hipertrofia dels ja existents. El TAV conté menor nombre de precursors adipogènics amb menor capacitat de proliferació i de diferenciació [219, 220]. Els preadipòcits dels dipòsits viscerals, en comparació amb els preadipòcits subcutanis, mostren menys capacitat de resposta a la inducció de la diferenciació a través del factor de transcripció PPAR-γ [221, 222]. Consistent amb això, els agonistes de PPAR-γ, també promouen més acumulació de greix en el TAS que en el TAV. La limitada capacitat per a la hiperplàsia en els dipòsits viscerals pot contribuir a la hipertròfia excessiva i per tant a la tensió en els adipòcits [223, 224].

2.3.5. Diferencies en l'angiogènesi

L'expansió del TA depèn també de l'angiogènesi, la formació de nous vasos sanguinis comença amb la proliferació endotelial, controlada per factors de creixement, incloent VEGF i regulada per diferents citocines [225]. El potencial angiogènic del greix visceral es va demostrar que era més baix que del greix subcutani [226].

2.3.6. Diferencies en l'apoptosi

S'ha observat que els preadipòcits viscerals són més susceptibles als estímuls apoptòtics que els subcutanis, el que suggereix que hi ha diferències intrínseques en els nivells d'apoptosi dels preadipòcits entre els dos dipòsits [220, 227].

2.3.7. Diferències metabòliques

Els adipòcits viscerals exhibeixen lipòlisis basal inferior, però una resposta superior a la lipòlisi induïda pels agonistes adrenèrgic [228, 229]. Els adipòcits viscerals mostren nivells menors d'expressió dels receptor α2-adrenèrgic antilipolítics i nivells

majors dels receptors β-adrenèrgics lipolítics (β1,2,3) en relació als adipòcits subcutanis, el que contribueix a la resposta més alta a la lipòlisis pels estímuls adrenèrgics en aquest dipòsit [230, 231]. També s'ha vist que els adipòcits viscerals tendeixen a ser menys sensibles als efectes antilipolítics de la insulina [69]. Per tant, en algunes situacions, és a dir, estrès o després de la ingesta, la contribució a l'alliberament pel dipòsit visceral d'AG pot a arribar a ser més significativa, fins a un 40% [232].

Les diferències regionals també s'han documentat en l'estimulació basal de la insulina a la captació de glucosa, amb nivells més alts d'expressió dels receptors GLUT4 en el TAV comparat amb el TAS [233, 234]. No obstant això, mentre que els adipòcits viscerals són resistents a l'efecte antilipolític d'insulina en comparació amb els adipòcits subcutanis [235, 236], no s'ha observat diferències en la sensibilitat de la captació de la glucosa estimulada per la insulina [237]. Varis estudis suggereixen que la lipòlisi i la captació de glucosa podrien ser regulades de manera diferent per la insulina en cada compartiment de greix [238, 239].

2.3.8. Diferencies en la secreció d'adipocines

A més d'adipòcits madurs, els dipòsits de greix visceral i subcutanis, contenen una població de cèl·lules altament heterogènia. Els diversos tipus cel·lulars presents juguen un paper important en l'activitat secretora del TA [5, 240]. Per tant els perfil de secreció dels dipòsits de greix dependrà en gran mesura pel tipus cel·lulars presents. S'ha vist que l'abundància de macròfags varia entre els dipòsits, sent més nombrosos en el TAV que en el TAS , el que probablement contribueix a la variació regional en la secreció de citocines [241-243].

3. Teixit adipós visceral i obesitat

3.1. Síndrome metabòlic i obesitat

L'obesitat o l'increment del TA, sobretot visceral, és un component crític, i el major factor del síndrome metabòlic (SM) [244, 245]. El SM és una constel·lació de símptomes, signes i condicions fisiopatològiques com obesitat visceral, hipertensió, dislipidèmia, resistència a la insulina, falta de tolerància a la glucosa i diabetis mellitus tipus 2 (DM), veure taula 4. Totes aquestes condicions augmenten de forma independent el risc de les malalties ateroscleròtiques, com la cardiopatia isquèmica i els accidents cerebrovasculars [246-248]. Molts d'aquests factors de risc de malaltia ateroscleròtica poden resultar directament o indirectament de l'obesitat, que a més està connectada a una malfunció del TA [208].

Taula 4: Definició de la síndrome metabòlica per la Federació Internacional de Diabetis (FID) [249].

Definició de la síndrome metabòlica per la FID	
L'obesitat central	Circumferència de la cintura* > 94 cm per als homes > 80 cm per a les dones IMC> 30 kg/m²
Glucosa en dejú	Elevada ≥ 100 mg/dl Diagnòstic previ de diabetis tipus 2
Pressió arterial elevada	Sistòlica ≥ 130 mmHg Diastòlica ≥ 85 mmHg
Perfil lipídic anormal	TG ≥ 150 mg/dl HDL <40 mg/dl en homes <50 mg/dl en dones

En la definició consens de la FID la síndrome metabòlica es defineix per l'obesitat central més dos dels components presentat [249]. L'obesitat central juga un paper central en la SM, mentre que les constel·lacions circumdants són principals manifestacions d'aquest síndrome. *Si l'índex de massa corporal (IMC) és superior a 30 kg/m ^{2} la circumferència de la cintura no necessita ser mesurada.

Entre les alteracions metabòliques induïdes per l'excés d'acumulació de greix, la resistència a la insulina sembla ser la conseqüència metabòlica més important, que condueix a la majoria dels casos a la diabetis mellitus de tipus 2 [250]. La resistència a la insulina es defineix com una resposta inadequada de la insulina, en els teixits diana tals com el múscul esquelètic, el fetge i el TA, als efectes fisiològics de la insulina circulant. La sensibilitat a la insulina deteriorada en aquests tres teixits provoca que

disminueixi la captació de glucosa estimulada per la insulina en el múscul esquelètic, el deteriorament de la inhibició per part de la insulina de la producció hepàtica de glucosa en el fetge i una disminució de la capacitat de la insulina per inhibir la lipòlisi en el TA [251]. La causa principal de la resistència a la insulina i DM és l'augment de la massa grassa i l'obesitat, particularment l'acumulació de greix intraabdominal [252].

3.2. Inflamació del teixit adipós visceral en obesitat

La inflamació del TA es considera com un esdeveniment crucial que condueix a les malalties cardiovasculars ateroscleròtiques, a la síndrome metabòlica i a la diabetis. No obstant això, els mecanismes precisos i la seqüència d'esdeveniments que condueixen a la inflamació del TA no s'entenen completament. La inflamació del TA, probablement és el resultat d'una relació complexa entre adipòcits, macròfags i altres tipus cel·lulars, amb contribucions tant de la immunitat innata com adaptativa [253].

L'estímul inicial de la inflamació en l'obesitat segueix sent en gran part desconegut, es postula però, que la hipòxia és el principal inductor. A part de la hipòxia, hi ha altres components que podrien estar implicats com la lipotoxicitat, l'estrès del reticle endoplasmàtic, la necrosi i la composició de microbiota [254, 255]

L'augment de l'acumulació de greix en els adipòcits diferenciats, resulta en la hipertròfia dels adipòcits, el factor més important per l'augment de greix en els dipòsits grassos en adults [74]. Un mecanisme determinant, el que podria lligar obesitat i inflamació és que la hipertròfia d'adipòcits podria conduir a la hipòxia del TA local durant les primeres etapes d'expansió [256].

La hipertrofia i la hipòxia es relaciona amb l'expressió i desregulació de la secreció d'adipocines i factors quimiotàctics, el TAV canviaria el seu equilibri immunològic cap a la producció de molècules proinflamatòries augmentant la infiltració de macròfags i altres cèl·lules inflamatòries [257, 258]. S'ha observat que el reclutament de limfòcits B i limfòcits T precedeix la infiltració de macròfags. No obstant això, la seqüència

precisa d'esdeveniments que regula la infiltració de macròfags queda per definir [259].

Es pensa que els adipòcits disfuncionals començarien a secretar nivells baixos de TNF-α, que provocaria la secreció per part dels preadipòcits i de les cèl·lules endotelials de MCP-1 [260]. Això atrauria els macròfags que una vegada presents i actius en el TA, juntament amb els adipòcits i altres tipus cel·lulars, perpetuarien el cercle viciós de reclutament de macròfags, producció de citocines inflamatòries (IL-6, IL-1β, i TNF-α) i deteriorament de la funció dels adipòcits [261].

A més d'augmentar el nombre de macròfags, l'obesitat també pot induir un canvi fenotípic en el TAV amb la polarització de macròfags. Els macròfags residents o M2 (activats alternativament) produirien citocines antiinflamatòries (com IL-10), mentre que els reclutats serien M1 macròfags (activats clàssics) els quals produirien nivells elevats de citocines proinflamatòries (com ara TNF-α i IL-6) [262].

L'obesitat provocaria canvis considerables en la composició i el fenotip de les cèl·lules immunes en el TA que participarien activament en l'alliberament de productes de secreció, juntament amb els adipòcits. Les citocines i quimiocines produïdes podrien influir en la inflamació localitzada i sistèmica, que és un enllaç patogènic entre l'obesitat i la resistència a la insulina [263]

4. El teixit adipós epicàrdic

El cor, les artèries coronàries, i virtualment totes les artèries estan envoltades d'una quantitat significativa de TA. El greix voltant dels vasos i del cor pot servir com a suport mecànic, atenuació de la tensió vascular i de torsió, pot participar en el remodelatge vascular i també pot ser una font vasocrina i paracrina d'adipocines [264].

El teixit adipós epicàrdic (TAE) és un dipòsit de greix visceral inusual amb continuïtat anatòmica i funcional de les artèries coronàries i del miocardi. El TAE pot actuar com a proveïdor d'energia local i com un amortidor enfront dels nivells tòxics dels AG

lliures en el miocardi i en la circulació arterial [264]. A més, a diferencia dels altres depòsits com el TAV i TAS, la funció del TAE ha estat menys estudiada [203].

4.1. Localització anatòmica

El terme teixit adipós perivascular (TAPV) s'utilitza per al TA al voltant de les artèries, independentment de la seva ubicació [265]. El TAPV es troba fora de la capa adventícia dels vasos sanguinis, sense estructures laminars o cap barrera organitzada que separi les dos estructures [266]. El TAPV envolta la majoria dels vasos sanguinis sistèmics, amb la notable excepció de la circulació cerebral [266]. El TAPV que està al voltant de les artèries coronàries és part del compartiment del TAE. El TAE és un greix amb proximitat al cor, i es troba localitzat a traves de les llargues arteries coronaries i en la superfície dels ventricles i en el àpex del cor [267-269]. No hi ha límits anatòmics evidents que diferencien el TAPV i el TAE, a més no hi ha indicis que aquests dos components podrien ser funcionalment diferents [270, 271].

A part del TAE, existeix un altre dipòsit de greix al cor, el teixit adipós pericàrdic (TAP). El depòsits de greix del cor consisteix, per tant, en el TAE situat entre el miocardi i el pericardi visceral, i el TAP situat fora del pericardi [272-274] .

El TAE i el TAP són embrionàriament diferent. El TAE s'origina a partir del mesoderma esplàncnic, mentre que el TAP s'origina del mesènquima primitiu toràcic (Figura 7A) [272, 275-277]. La vascularització és també diferent entre el TAE i el TAP ja que la vascularització del TAE és subministrada per branques de les artèries coronàries mentre que el TAP és vascularitzat a partir de fonts no coronaries [272, 275-277]

En condicions fisiològiques el TAE representa aproximadament el 20% de la massa del cor. En el cor humà adult, el TAE es troba comunament en els solcs auriculoventriculars i interventricular [273]. Curiosament no hi ha una fàscia muscular que separi TAE i el miocardi i per tant els dos teixits comparteixen la mateixa microcirculació (Figura 7B). A causa de la seva proximitat anatòmica en el cor i en els vasos sanguinis, i l'absència de límits físics, el TAE podria interactuar

localment amb el miocardi i les arteries coronaries a través de la secreció directa d'adipocines proinflamatòries [276].

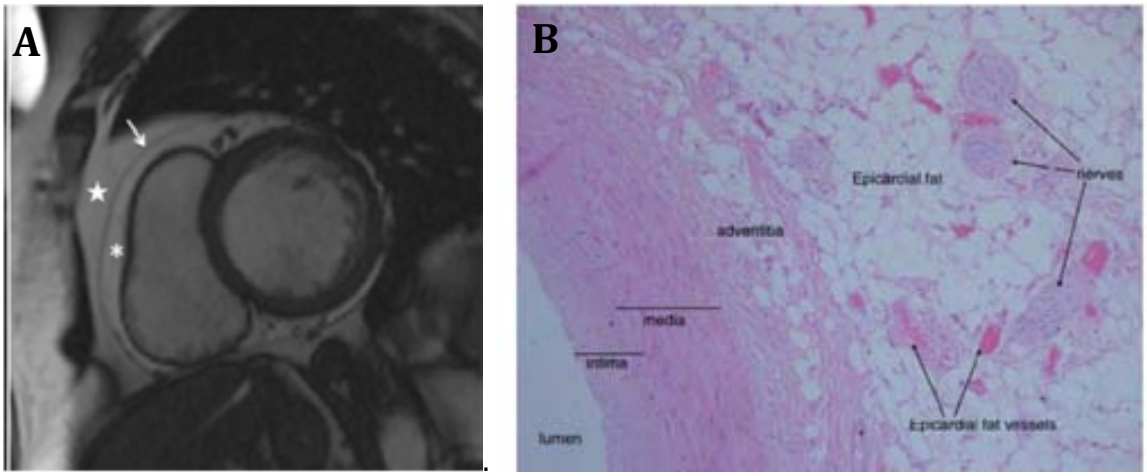

Figura 7. Figura 7A:Caracterització del greix al voltant del miocardi per ressonància magnètica on es mostra el pericardi visceral (fletxa), el TAE (asterisc) i el TAP (estrella) [274]. Figura 7B:Histologia d'una arteria coronària on es poden observar el TAE en relació l'arteria [276].

4.2. Metabolisme del teixit adipós epicàrdic

El TAE és més que una unitat d'emmagatzematge de lípids passiu, té propietats bioquímiques peculiars i participa activament en l'homeòstasi lipídica i energètica. En condicions normals fisiològiques, el TAE mostra una gran flexibilitat en l'emmagatzematge i alliberament d'AG comparat amb altres depòsits grassos, que podria ajudar a omplir les necessitats energètiques de les paret arterial i del muscle cardíac i ajudar a evitar la lipotoxicitat [272, 275-277].

La principal diferència entre el TAE i els altres dipòsits de greix visceral és la major capacitat de síntesi, d'alliberament i absorció d'AG i la menor taxa d'utilització de la glucosa [264]. En estudis amb animals s'ha vist que el TAE té taxes més altes de lipòlisi i de lipogènesi induïda per la insulina en comparació amb altres dipòsits de greix [264, 278, 279]. A més, en comparació amb TAS, el TAE sembla ser ric en AG saturats, incloent l'àcid mirístic, l'àcid palmític i l'àcid esteàric, mentre que els AG insaturats, l'àcid palmitoleic, l'àcid oleic, l'àcid linoleic i l'àcid linolènic són menys abundants [280].

El miocardi utilitza i metabolitza AG lliures a partir de la sang arterial coronària, l'oxidació d'AG és responsable d'aproximadament el 50-70% de la producció d'energia del cor. Per tant, s'ha proposat que el TAE pot funcionar com un amortidor per protegir el cor contra l'exposició a nivells excessivament alts d'AG lliures i proporcionar energia pel miocardi [272].

4.3. Teixit adipós epicàrdic com greix marró

S'ha vist expressió en el TAE de la proteïna desacoblant-1 (UCP-1), un marcador del teixit adipós marró. L'expressió de UCP-1 es va trobar més alta en TAE que en altres dipòsits de greix [281]. El TA genera calor en resposta a les baixes temperatures i activa el sistema nerviós autònom. No obstant això, la presència i el paper del greix marró en els humans no està clar, però s'ha postulat que el TAE podria tenir una funcionalitat similar al del greix marró per defensar el miocardi i l'artèria coronària de la hipotèrmia [282].

4.4. Vies d'interacció entre el teixit adipós epicardic i les arteries coronaries

Els compartiments del TAV i el TAS són més gran que el compartiment del TAE i per tan són capaços de secretar més quantitats d'adipocines i citocines en comparació el TAE. D'altra banda, el TAE per la seva situació anatòmica està estretament relacionat amb les artèries coronàries i petites quantitats d'adipocines poden tenir grans efectes fisiopatològics. L'explicació dels efectes comparables entre els diferents dipòsits pot ser a causa de la proximitat física entre el TAE i la paret de l'artèria permeten la senyalització directa dels mediadors [283]. Hi ha dos possibles mecanismes d'interacció descrits entre el TAE i les arteries coronaries: la senyalització vasocrina i paracrina [276].

4.4.1. Estructura de la paret arterial

Les artèries es componen de tres capes o túniques morfològicament diferents (Figura 8) [284].

-Túnica interna o intima, la capa més interna, està limitada per una monocapa de cèl·lules endotelials que descansen sobre una lamina basal, una capa conjuntiva subendotelial formada per teixit conjuntiu i cèl·lules musculars llises. A més d'una lamina elàstica interna composta per fibres elàstiques que separa l'intima de la túnica mitjana.

-Túnica mitjana, consisteix en cèl·lules musculars llises vasculars amb fibres elàstiques i fibres de col·lagen. A més d'una lamina elàstica externa que la separa de la túnica adventícia

-Túnica externa o adventícia, és la capa exterior, està formada de teixit connectiu amb fibroblasts, fibres de col·lagen i fibres elàstiques.

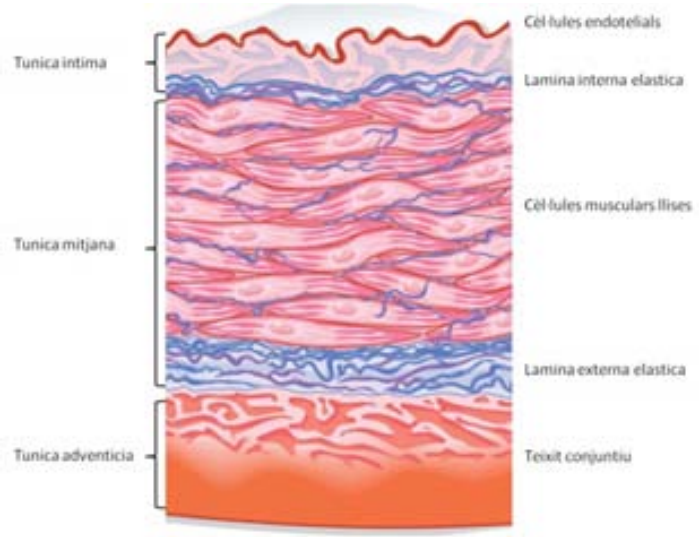

Figura 8. Estructura d'una arteria on es mostren les tres túniques i els seus components [284]

4.4.2. Senyalització vasocrina

En aquest sentit, els mediadors segregats pel TAE poden entrar directament en el *vasa vasorum* i ser transportats a la túnica mitjana i a l'intima [265]. El *vasa vasorum* es troba en l'adventícia, sorgeix de la bifurcació dels segments de les artèries coronàries dins l'adventícia i es divideix en branques formant circumferències paral·leles de segon ordre i de primer ordre que penetren a la paret coronària per subministrar oxigen i nutrients als seus dos terços exteriors, mentre que el terç interior es subministra per difusió de la llum [285]. En aquest model, a part dels

mediadors solubles, també poden migrar poblacions cel·lulars com ara macròfags. (Figura 9) [286].

4.4.3. Senyalització paracrina

Les molècules secretades pel TAE poden passar per difusió al fluid intersticial a través de la túnica adventícia a la túnica mitjana i a l'íntima. Podent interaccionar amb el *vasa vasorum*, amb l'endoteli i amb les cèl·lules musculars llises vasculars de les arteries coronaries (Figura 9) [276, 287].

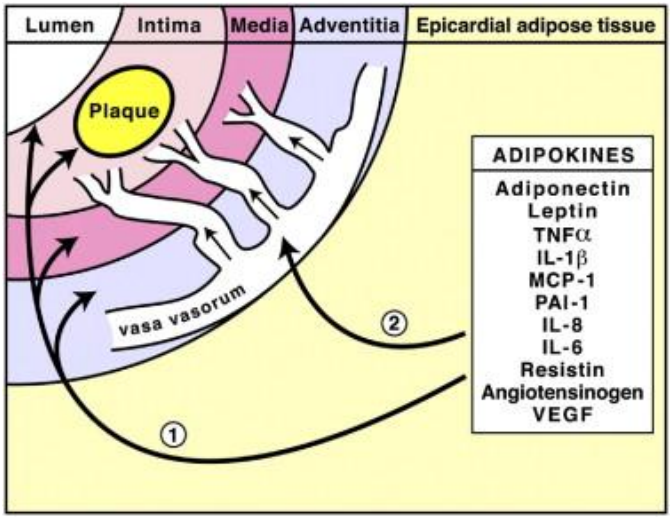

Figura 9. Mecanismes de senyalització entre el TAE i les arteries. Ruta 1: Senyalització paracrina. Ruta 2: Senyalització vasocrina [276]

4.5. Teixit adipós epicàrdic com un òrgan secretor

En els humans el TAE és un òrgan metabòlicament actiu i una font de diverses molècules bioactives que podrien influir substancialment en el miocardi i les artèries coronàries [272, 288-294] .Considerant que el TAE té el mateix origen embriològic que el TAV és capaç de produir un patró comparable d'adipocines (taula 2) [108, 288, 294, 295]. A més, s'ha vist major expressió i secreció de citocines inflamatòries en el TAE comparat al TAS. Les adipocines proinflamatòries secretades poden difondre a la paret del vas per mitja de la interacció paracrina i vasocrina [276].

Encara que els adipòcits constitueixen la majoria de les cèl·lules en el TAE, hi ha altres tipus cel·lulars presents. S'ha vist que el TAE també pot contenir diverses cèl·lules inflamatòries, principalment macròfags [288]. Les cèl·lules immunes podrien secreter les mencionades citocines quan són activades. La interacció entre adipòcits i les cèl·lules immune infiltrades en el TAE és una qüestió central en el funcionament d'aquest teixit, especialment en condicions de malaltia [296-299].

Les adipocines secretades pel TAE poden ser classificades com proinflamatòries (resistina, visfatina, etc) i antiinflamatòries (adiponectina, adrenomedulina, etc). En els últims anys s'han identificat noves adipocines (omentina, nesfatina, vaspina, quemerina, etc) [296, 300-303]. A més el TAE és capaç de alliberar quimiocines i citocines clàssiques, com ara TNF-α, IL6, IL-10, MCP-1, PAI-1, IL8, IL1-B, IL-13, IL-16 i CCL-5 [304-306]. El TAE també pot alliberar pèptids del sistema renina angiotensina (RAS) incloent Ang II i enzims convertidors [307, 308]. A més el TAE allibera espècies reactives d'oxigen (ROS) incloent el peròxid d'hidrogen (H_2O_2) i el sulfit d'hidrogen (H_2S). El TAE també allibera especies reactives del nitrogen com el òxid nítric (NO), la sintasa d'òxid nítric endotelial (eNOS) i totes les isoformes de la superòxid dismutasa (SOD) que són moduladores del to vascular [309-311].

4.6. Acció vascular

El TAE té efectes protectors sobre el to vascular disminuint les respostes contràctils als agents vasoconstrictors, exercint així una funció antihipertensiva través de la via de control dependent de l'endoteli (modulació del NO i ràtio de l'endotelina) i mecanismes independents (hiperpolarització cel·lular, i la producció de ROS) [312-314].

El TAE en condicions normals exerceix un efecte beneficiós anti-contràctil net en la funció vascular essencial pel manteniment de la homeòstasis vascular, alliberant substancies vasodilatadores com el NO que s'oposa als efectes vasoconstrictors de l'endotelina , l'angiotensina II (Ang II) i els ROS [312-314]

.

5. Teixit adipós epicàrdic i aterosclerosi

El TAE és un dipòsit de greix visceral inusual amb continuïtat anatòmica i funcional amb les artèries coronàries i amb el miocardi. En condicions fisiològiques, el TAE mostra propietats bioquímiques, mecàniques i termogèniques cardioprotectores. En condicions patològiques, el TAE pot afectar localment el cor i les artèries coronàries a través de la secreció vasocrina o paracrina de citocines proinflamatòries i pot estar implicada en la patogènesi de l'aterosclerosi, l'aterotrombosis i la ruptura de la placa [276, 315].

5.1. Aterosclerosi

La malaltia cardiovascular és la principal causa de mortalitat en molts països, el que representa 16,7 milions de morts cada any [316, 317]. La malaltia arterial coronària (CAD) i la malaltia cerebrovascular són les formes més comunes de la malaltia cardiovascular, i tenen greus conseqüències tant per a l'individu i com per la societat en general [318]. El seu procés patològic subjacent és l'aterosclerosi, una malaltia vascular crònica de les grans i mitjanes artèries que implica l'oclusió progressiva dels vasos sanguinis i que es manifesta clínicament quan causa trombosis [319].

Durant molts anys es va considerar que l'aterosclerosi no era més que l'acumulació passiva de colesterol a la paret del vasos sanguinis. Avui en dia l'aterosclerosi està considerada com una malaltia inflamatòria crònica [318]. La inflamació juga un paper clau en la iniciació i la progressió de l'aterosclerosi però encara no està clar precisament el que indueix la resposta inflamatòria [320].

5.1.1. Etiologia de l'aterosclerosi: factors de risc

Els factors de risc cardiovasculars estan constituïts per qualsevol hàbit o característica biològica que serveix per predir la probabilitat d'un individu a desenvolupar CAD. L'existència d'un factor de risc no implica obligatòriament una relació causa efecte amb la malaltia, però el coneixement i la detecció dels factors de risc desenvolupa un paper important per les estratègies de prevenció i tractament de

l'aterosclerosi. Els factors de risc es poden dividir en tradicionals i no tradicionals (Figura 10) [284, 321, 322].

Factors de risc per CAD	
Tradicionals	**No tradicionals**
Edat Sexe Diabetis Fumar Hipertensió Nivells elevats de LDL Nivells reduïts de HDL Dislipidèmia Obesitat Antecedents Familiars	Obesitat Inactivitat física Antecedents familiars Característiques ètniques Factors psicosocials Nivells elevats de TG Nivells elevats de homocisteïna Nivells elevats de lipoproteïna(a) Factors protrombòtics (fibrinogen) Marcadors de inflamació (PCR)

Factors de risc més importants per CAD
Edat (home ≥45; dona ≥55 anys) Historia familiar de CAD prematur (CAD en home <65 anys) Hipertensió (PA> 140/90 mmHg o fàrmacs antihipertensius) Fumar cigarretes Diabetis Nivells elevats de LDL Nivells baixos de HDL (<40 mg/dl) Hipertrigliceridèmia (>200 mg/dl) Obesitat

Figura 10. Factors de risc tradicionals i no tradicionals associats amb la patologia del CAD. Imatge modificada [284, 323]

5.1.2. Etapes en el desenvolupament de l'aterosclerosi

L'aterosclerosi (Figura 11) s'inicia amb la disfunció endotelial, és a dir, la descompensació de les funcions biològiques de l'endoteli. Els monòcits poden migrar través de la monocapa endotelial cap a la íntima, on proliferen, es diferencien en macròfags i fagociten les lipoproteïnes atrapades en l'intima, donant lloc a la formació de cèl·lules escumoses. Amb el temps, les cèl·lules escumoses moren, el que contribueix a que el seu contingut en lípids i restes cel·lulars formin l'ateroma. A més, amb la secreció d'elements fibrosos per les cèl·lules del múscul llis, es forma la placa fibrosa que es pot desenvolupar i augmentar de mida, poden així expandir-se cap a l'interior del vas i envair el lumen. El creixement de la placa pot causar estenosi o trencament de la placa (trombosis) i pot bloquejar el flux sanguini. La trombosis

provoca isquèmia, infart de miocardi i infart cerebral com a conseqüències potencialment mortals [318].

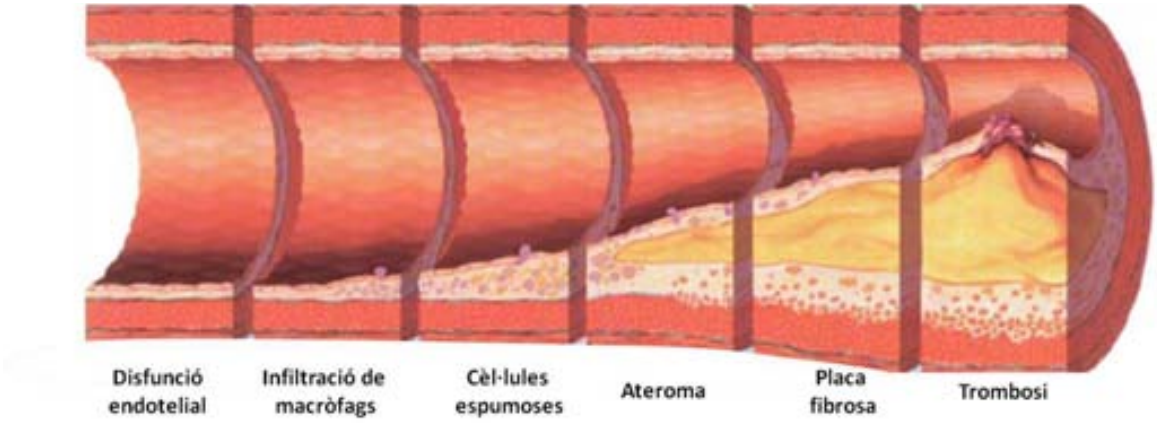

Figura 11. Etapes en el desenvolupament de l'aterosclerosi. Imatge adaptada [324].

5.1.3. Disfunció endotelial

Ara és àmpliament acceptat que el desenvolupament de l'aterosclerosi implica una resposta inflamatòria crònica, que inclou mecanismes d'immunitat tant innata com adaptativa. No obstant això, segueix havent preguntes respecte als factors que estimulen directament aquests mecanismes dins de l'íntima del vas sanguini i posen en marxa l'inici i la progressió de la malaltia [318, 320].

La disfunció endotelial, és a dir, la descompensació de les funcions biològiques de l'endoteli, és un dels principals fenòmens patològics que es produeixen en la fase inicial de l'aterosclerosi [325]. L'endoteli funciona com una barrera selectivament permeable entre la sang i els teixits, té funcions sensorials i pot generar molècules efectores que regulen la trombosi, la inflamació, el to vascular i la remodelació vascular [326].

L'homeòstasi vascular implica mantenir un equilibri ben controlat entre un estat de vasodilatació, que s'associa sovint amb un efecte antioxidant, antiinflamatori i antitrombòtic, d'una banda, i un estat vasoconstrictor en l'altra, que s'associa amb un efecte prooxidant, proinflamatoris i protrombòtics. La disfunció endotelial, es

caracteritza per un desequilibri entre la vasodilatació dependent de l'endoteli i la vasoconstricció [314].

La disfunció endotelial originalment es postulava que era causada per la senyalització que s'origina a partir de la llum del vas o en la interfase endoteli–íntima (teoria de dins a fora) Però hi ha cada vegada més proves que els canvis en l'adventícia o fins i tot en el TAE també podrien alterar la homeòstasi vascular (teoria de fora a dins) [327].

5.1.3.1. Teoria de dins a fora

La teoria de dins a fora postula que la inflamació començaria en l'intima i es propagaria cap a la túnica mitjana i a l'adventícia. La inflamació vascular seguiria un procés amb el que el dany de l'intima portaria a l'expressió de molècules d'adhesió vascular, alliberament de senyals inflamatòries i la subseqüent infiltració de monòcits al endoteli. Entre els mecanismes que podrien explicar el dany a l'intima inclouen la deposició i oxidació de lípids, l'acumulació de micropartícules derivades de cèl·lules i de factors no lipídics associats lipoproteïnes [328, 329].

5.1.3.2. Teoria de fora a dins

En canvi, la teoria de fora a dins postula que la inflamació començaria en el TAE i després es propagaria a l'interior del vas sanguini. Això és possible per la falta d'una separació física entre l'adventícia i el TAE que l'envolta, a més, de la presencia i extensió del *vasa vasorum* que permet un pas de molècules i cèl·lules directe. El mecanisme proposat seria que la inflamació en el TAE contribuiria a la disfunció de l'endoteli amb la secreció de citocines i altres factors proinflamatoris [330, 331].

5.1.4. Activació endotelial i reclutament de cèl·lules immunes

La disfunció endotelial contribueix a l''activació de les cèl·lules endotelials a expressar molècules d'adhesió, quimiocines i factors de creixement, provocant el reclutament de monòcits, cèl·lules dendrítiques i limfòcits T en l'intima [332].

Entre les molècules d'adhesió expressades en les cèl·lules endotelials importants en el reclutament dels monòcits inclouen la β_2-integrina, la VLA-4, i PCAM-1 i en el reclutament de limfòcits estan la ICAM-1, P-selectina, E-selectina, PCAM-1 i VCAM-1. A més, aquest reclutament de cèl·lules immunes es veu potenciat per les cèl·lules endotelials per la secreció de varies quimiocines (MCP-1, CCL2, CCL5, CXCL10 i CX3CL1) [284].

Les cèl·lules endotelials activades produeixen el factor estimulant de colònies de macròfags (M-CSF) que provoca l'activació i diferenciació dels monòcits cap a macròfags [333]. A més, els macròfags, un cop en l'intima poden secretar citocines que atraurien a altres leucòcits, produir proteïnases per digerir la matriu extracel·lular, poden pertorbar la funció de les cèl·lules del múscul llis, i poden influir en la vasodilatació dependent de l'endoteli [334].

5.1.5. Formació de cèl·lules escumoses

El colesterol és transportat en la sang per les LDL, aquestes partícules estan formades per un nucli hidrofòbic de colesterol esterificat i TG envoltats per una capa de fosfolípids, colesterol lliure i una apolipoproteïna B100 (ApoB100) [335]. La LDL es atrapada en l'intima, on pot ser sotmesa a modificacions, incloent oxidació, lipòlisi, proteòlisi i agregació [336]. Per altra banda, la HDL és altament protectora contra l'aterosclerosi, un important mecanisme que provoca aquest efecte protector és el paper de les HDL en l'eliminació de l'excés de colesterol dels teixits perifèrics, ja que el transporta fins al fetge [337, 338].

La diferenciació del monòcits a macròfags s'associa amb un increment dels receptors *scavenger* en la superfície cel·lular del macròfag. Els receptors *scavenger* són receptors de reconeixement de patrons (PRR), que inclouen el receptor scavenger de macrofag-1 (MSR1), el receptors de la LDL oxidada (LOX-1) i CD36 entre altres . Aquests intervenen en la internalització d'una àmplia gamma de molècules i partícules com endotoxines, cossos apoptòtics, components de paràsits i partícules de LDL [339, 340]. La LDL ha de ser àmpliament modificada (oxidada) abans que pugui ser captada pels macròfags per formar cèl·lules escumoses. Aquesta modificació

implica presumiblement les ROS produïdes per les cèl·lules endotelials i pels macròfags, però també es creu que hi participen diversos enzimes, incloent la mieloperoxidasa, l'esfingomielinasa i la fosfolipasa secretora (sPLA2) [341, 342]. Els macròfags també poden ingerir el colesterol per micropinocitosi de la LDL nativa i per la fagocitosi dels agregats de LDL [343, 344]. Amb el temps, l'entrada de colesterol pot desbordar la capacitat de la cèl·lula per a l'eliminació d'aquestes molècules i pot acumular-se en forma de gotes d'èster de colesterol en el citosol, adquirint el macròfag la característica aparença de cèl·lules escumoses [345].

5.1.6. Formació de la placa fibrosa

Nombroses cèl·lules escumoses i altres cèl·lules inflamatòries s'acumulen en l'intima. Les cèl·lules escumoses finalment moren, alliberant el seu contingut lipídic sobretot format per colesterol i esters de colesterol. Això provoca la formació de l'ateroma, una acumulació de lípids i restes cel·lulars, que es va engrandint fins formar nuclis necròtics rics en lípids que dominen la part central de l'íntima, en última instància, ocupant del 30% al 50% del volum de la paret arterial [346]. Amb la secreció d'elements fibrosos, sobretot col·lagen, per les cèl·lules del múscul llis, es formen les plaques fibroses que es desenvolupen i augmenten de mida. També pot haver calcificació de les lesions, que sembla ser un procés actiu i regulat que implica la secreció per els perícits d'una bastida per a la deposició de fosfat de calci. Inicialment, les lesions creixen cap a l'adventícia fins que s'arriba a un punt crític, després de la qual cosa comencen a expandir-se cap a l'exterior i envair el lumen [347].

5.1.7. Lesions avançades i trombosi

Les plaques d'ateroma poden ocupar la llum del vas causant estenosis (estrenyiment de la llum), dificultant l'arribada de sang als teixits i disminuint el transport d'oxigen. En les lesions avançades es pot produir trombosis, provocada pel trencament de la placa que condueix a l'exposició del material del seu interior al torrent circulatori [348]. Això provocaria una reacció trombogènica, amb l'agregació plaquetària, coagulació humoral i formació d'un trombe que consta de plaquetes adherents i

entrecreuaments de fibrina [284]. El trombe pot obliterar la llum del vas ja sigui immediatament o separar-se per esdevenir un èmbol que pot bloquejar el flux de sang distal respecte al seu punt d'origen. L'aterotrombosis provoca isquèmia, infart de miocardi i infart cerebral (ictus isquèmic), com a conseqüències potencialment mortals [318].

Estudis patològics suggereixen que el desenvolupament d'esdeveniments coronaris aguts depèn principalment de la composició i la vulnerabilitat de la placa d'ateroma en lloc de la severitat de l'estenosi. Les plaques vulnerables tenen, generalment, una capa fibrosa fina i un major nombre de cèl·lules inflamatòries. El manteniment de la capa fibrosa reflecteix la producció i degradació de la matriu, i els productes de les cèl·lules inflamatòries són susceptibles d'influir en els dos processos [284].

5.1.8. L'aterosclerosi i el sistema immune

Els mecanismes immunes que contribueixen al desenvolupament de l'aterosclerosi inclouen gairebé tots els aspectes del sistema immune (Taula 5). La depleció dels monòcits pot en gran mesura eliminar el desenvolupament de l'aterosclerosi en ratolins [349, 350]. Curiosament, aquest efecte és més prominent en les primeres etapes de la malaltia, mentre que la depleció dels monòcits/macròfags en les lesions avançades no altera la mida o la composició de la placa [351]. Les cèl·lules dendrítiques estan implicades en la formació primerenca de les plaques [352, 353]. La depleció de neutròfils redueix efectivament l'aterosclerosi si s'efectua durant el desenvolupament inicial de l'aterosclerosi [354, 355]. Es pensa que els neutròfils aplanarien el camí per a la infiltració de monòcits durant el desenvolupament de l'aterosclerosi en estadis inicials [356]. Les plaquetes també ajudarien al reclutament de cèl·lules immunes a la placa ateroscleròtica, facilitant les interaccions entre les cèl·lules endotelials i els monòcits, neutròfils, cèl·lules dendrítiques i limfòcits T [357]. El paper de les limfòcits T i B en l'aterosclerosi no ha estat del tot precisat, a continuació es descriuen en més detall [358, 359].

Taula 5. Paper de diferents cèl·lules immunes i dels anticossos en l'aterosclerosi.

Tipus cel·lular	Paper en ratolins	Paper en humans	Comentaris
Limfòcits T CD4 col·laboradors	En les lesions predominen els limfòcits Th1 productors d'IFN-γ, que promouen la progressió de les lesions.	En les lesions són freqüents els limfòcits productors d'IFN-γ i les limfòcits doble productors d'IFN-γ i de IL-17.	En humans és menys clar el subconjunts de limfòcits Th polaritzades. Tampoc està clar l'efecte dels limfòcits Th2 i Th17.
Limfòcits T CD8 citotòxics	No solen ser presents	Presents, però menys freqüents que els limfòcits $CD4^+$	Pot augmentar quan les vies inhibitòries dels limfòcits T estan deteriorades. Proaterogénic en general
Limfòcits T reguladors (Treg)	Els limfòcits $CD25^+$ $Foxp3^+$ Treg ateroprotectors estan presents però quan les lesions progressen són menys freqüents.	Els limfòcits $CD25^+$ $Foxp3^+$ Treg són presents però poc freqüents en les lesions avançades	Relació limfòcits CD25 amb Foxp3 menys constant en humans que en ratolins
Limfòcits B1	Productors d'anticossos naturals específics per Ox-LDL, que poden ser ateroprotectors		
Limfòcits B2	Es troben en l'adventícia de les artèries ateroscleròtiques		Poden ser proaterogénic independentment de la secreció d'anticossos
Monòcits	Monòcits $Ly6C^{hi}$ $Gr\text{-}1^+$ en el desenvolupament de les lesions i presumiblement diferenciats a macròfags	Monòcits $CD14^{hi}$ $CD16^-$ proinflamatoris, suposada font de macròfags diferenciats	Poblacions no comparables entre humans i ratolins, no està clar els precursors dels macròfags M1
Macròfags	Majoria de cèl·lules inflamatòries en les lesions, principalment macròfags M1	Majoria de cèl·lules inflamatòries en les lesions, principalment macròfags M1	Dicotomia M1-M2 no sempre diferent especialment en humans
Granulòcits	Poden participar molt d'hora en el desenvolupament de lesions	No hi ha evidencies clares de la presència o del paper en el desenvolupament de les lesions	Pot acumular-se en els trombes
Mastòcits	Contribuir al desenvolupament de la lesió	Participació menys clara que en ratolins	
Anticossos			
Anticossos anti-LDLox	Els nivells es correlacionen amb el grau d'hipercolesterolèmia i la càrrega de la lesió.	Els nivells es correlacionen amb el grau de la hipercolesterolèmia i la malaltia clínica	Alguns anticossos anti-LDLox poden ser ateroprotectors
Anticossos anti-oxHsp60	Els nivells es correlacionen amb el grau d'hipercolesterolèmia i la càrrega de la lesió.	Els nivells es correlacionen amb el grau de la hipercolesterolèmia i la malaltia clínica	

5.1.8.1. Limfòcits T

S'ha proposat que durant les primeres etapes de la malaltia, les respostes immunes són controlades per les limfòcits T reguladors amb l'alliberament de citocines antiinflamatòries com ara IL-10 i TGF-β que inhibeixen l'activitat dels limfòcits Th1 efectors. A mesura que la malaltia progressa aquest control es perdia gradualment i la resposta immune portaria a l'activació de limfòcits Th1 efectors i a l'alliberament de

citocines proinflamatòries, com ara IFN-γ, TNF-α i IL-1β [360]. Actualment hi ha proves convincents que els limfòcits Th1 promourien l'aterosclerosi ja que la supressió del factor de transcripció T-bet, necessari per la diferenciació al llinatge Th1, redueix l'aterosclerosi [361, 362].

Els limfòcits Th2 interactuen principalment amb les limfòcits B i són capaços de produir varies citocines entre elles la IL-4 considerada una citocina prototípica per a les limfòcits Th2. El paper dels limfòcits Th2 no està clar, ja que algunes citocines Th2 s'han assignat funcions de protecció, mentre que la supressió de la IL-4, en alguns estudis redueix el desenvolupament de l'aterosclerosi [363-365].

Els limfòcits T CD8 citotòxics no han estat tan àmpliament estudiats. Els limfòcits T CD8 són abundants en les plaques ateroscleròtiques, a més en les lesions humanes avançades, fins i tot, semblen ser el tipus predominant de limfòcits T [366]. S'ha demostrat que són activats en models animals d'aterosclerosi i que aquesta activació s'ha associat amb l'augment de la formació de placa [367, 368]. Un possible mecanisme patològic dels limfòcits T CD8 seria la destrucció citotòxica de les cèl·lules vasculars que al seu torn agreujaria la inflamació. En conseqüència, els limfòcits T CD8 podrien ser un importants mediadors de la destrucció de teixits i la inflamació crònica [369].

5.1.8.2. Limfòcits B

Els estudis inicials van suggerir que les limfòcits B tenien un paper protector en l'aterosclerosi en general, ja que els ratolins deficients en limfòcits B mostraven un augment de l'aterosclerosi en comparació amb els ratolins control i a més la transferència de les limfòcits B als ratolins esplenectomitzats ateroscleròtics reduïa l'aterosclerosi [370, 371]. No obstant això, recentment, el paper protector de les limfòcits B en l'aterosclerosi ha estat qüestionat ja que la depleció de les limfòcits B amb anticossos anti-CD20 es va veure que disminuïa l'aterosclerosi [372, 373]. Aquestes discrepàncies poden ser degudes en part als efectes diferencials de subconjunts de limfòcits B (B1 i B2). La depleció de limfòcits B2 (convencionals) milloraria l'aterosclerosi a través d'un mecanisme independent d'anticòs mitjançant

la interacció amb altres leucòcits i amb la secreció de citocines proinflamatòries [374].

Per altra banda les limfòcits B1 (naturals) serien protectores presumiblement a través de la secreció d'anticossos IgM naturals que s'uneixen al LDL oxidat i a les cèl·lules apoptòtiques [373-376]. Els anticossos IgM naturals poden limitar la inflamació, facilitant l'eliminació de les cèl·lules danyades i de les lipoproteïnes, ja que alts nivells d'aquests autoanticossos han estat associats amb menor risc cardiovascular en diversos estudis clínics [377]. El paper dels anticossos IgG en el desenvolupament de l'aterosclerosi segueix sent motiu de controvèrsia perquè els estudis epidemiològics han informat tan associació positiva com negativa amb la malaltia cardiovascular [378].

5.2. Teoria de fora a dins: paper del teixit adipós epicàrdic en l'aterosclerosi

5.2.1. Quantitat de teixit adipós epicàrdic i aterosclerosi

Un argument a favor d'una relació causal entre el TAE i l'aterosclerosi és l'absència d'aterosclerosi en els segments de l'artèria coronària on no hi ha teixit adipós, com és el cas dels ponts de miocardi (segments de l'artèria coronària que estan coberts amb miocardi i no per TAE). La manca de TA envoltant l'arteria i per tant l'absència d'estímuls proinflamatoris podria ser responsable de la propietat ateroprotectora dels ponts de miocardi [379-383].

Els estudis que examinen la relació entre la quantitat TAE i l'aterosclerosi de les artèries adjacents mostren que l'augment del volum del TAE s'associa amb l'estenosi de les artèries coronàries. Les associacions van ser independents de l'índex de massa corporal i altres factors de risc, el que suggereix que el TAE és un dels factors que contribueixen a la patologia del CAD [384, 385].

5.2.2. Adipocines i aterosclerosi.

En condicions normals el TAE exerceix un efecte beneficiós per la vasculatura però en condicions patològiques el TAE pot alterar el seu metabolisme amb la secreció de molècules proinflamatòries que contribueix al medi metabòlic i inflamatori que promou l'aterogènesi. [276, 315]

Les adipocines secretades pel TAE poden arribar a les parets dels vasos per secreció paracrina o vasocrina. La senyalització vasocrina pot ocórrer durant l'aterogènesi quan la proliferació cel·lular i la formació de plaques provoquen un augment del gruix de la paret arterial i es fa més difícil la difusió paracrina [288].

Les adipocines alliberades pel TAE poden participen en diverses etapes del procés ateroscleròtic incloent la disfunció endotelial, la proliferació i la migració de les cèl·lules musculars llises vasculars, la inflamació, la quimiotaxis, la formació de cèl·lules escumoses i la desestabilització de la placa [276, 315].

5.2.3. Secreció de factors que provoquen disfunció endotelial

El TAE pot augmentar la producció de molècules vasoconstrictores com l'Ang II i aldosterona i disminuir la secreció de factors anti-contràctil com el NO i induir disfunció endotelial [386].

El TAE amb l'estrés oxidatiu pot contribuir també a la disfunció endotelial amb l'alteració de l'activitat i la producció del NO. L'estrés oxidatiu és causat principalment per un desequilibri entre l'activitat dels enzims prooxidants endògens i enzims antioxidants, resultant en una alta producció de ROS que supera els sistemes de defensa antioxidants disponibles [387]. A més les ROS, per altra banda, contribueix a la disfunció endotelial per la regulació a l'alça de l'expressió de molècules d'adhesió i quimiotaxi en les cèl·lules endotelials, que promouen l'adhesió i la migració de monòcits a la paret del vas [388].

5.2.4. Secreció de factors que afecten a la proliferació i migració de les cèl·lules musculars llises vasculars

Els factors secretats a partir del TAE, com ara la resistina i la visfatina poden estimular la proliferació i la migració de les cèl·lules musculars llises vasculars [389, 390]. Per altra banda l'adiponectina té l'efecte contrari, al inhibir la proliferació de les cèl·lules musculars llises [391].

5.2.5. Secreció de quimiocines.

El TAE pot secretar un gran nombre de quimiocines, com ara el MCP-1, la IL-8, i la CCL5, que poden induir el reclutament i la infiltració de monòcits, limfòcits i neutròfils a la paret del vas sanguini i instigar la inflamació vascular local [392].

5.2.6. Secreció de adipocines i citocines proinflamatoris

El TAE pot alterar la seva funció endocrina normal, amb la disminució de la secreció molècules antiinflamatòries (adiponectina) i augmentar la secreció de molècules proinflamatòries (TNF-α, IL-6 i resistina), aquestes poden actuar en totes les etapes del procés ateroscleròtic [393].

5.2.6.1. TNF-α

Les accions del TNF-α poden promoure disfunció endotelial ja que pot induir la producció de ROS i modular el to dels vasos [251, 394]. El TNF-α també pot augmentar l'expressió de les molècules de adhesió ICAM-1, VCAM-1 i E-selectina en l'endoteli [395]. D'altra banda, el TNF-α pot activar i perpetuar les vies proinflamatòries en el TAE estimulant la secreció de proteïnes inflamatòries i suprimint la secreció d'adiponectina i leptina [171, 395, 396].

5.2.6.2. IL-6

La IL-6 pot estar implicada en l'alteració de la funció endotelial mitjançant l'augment de l'expressió d'angiotensina II, estimulant la producció de ROS i reduint l'expressió de NO en les cèl·lules endotelials [397, 398]. A més, la IL-6 pot estimular la

proliferació de les cèl·lules musculars llises vasculars [399]. Per últim, la IL-6 pot també estar implicada en l'alliberament d'altres citocines proinflamatòries [400].

5.2.6.3. Adiponectina

L'adiponectina pot exercir efectes ateroprotectors modulant múltiples vies en el desenvolupament de l'aterosclerosi. L'adiponectina evita la disfunció endotelial induint l'activació de eNOS i la producció de NO en les cèl·lules endotelials i també reduint la producció de ROS [399, 401]. L'adiponectina també pot suprimir la proliferació vascular de cèl·lules del múscul llis [402]. A més, l'adiponectina pot inhibir la transformació dels macròfags a cèl·lules d'escuma reduint l'acumulació de lípids i augmentant el flux de sortida de colesterol dels macròfags [403, 404]. L'adiponectina també pot inhibir l'expressió dels receptors de quimiocines en els macròfags i reduir el reclutament de limfòcits T [405]. Per últim, l'adiponectina pot inhibir les accions proaterogèniques del TNF-α i de la resistina [395, 396].

5.2.6.4. Resistina

La resistina pot causar disfunció endotelial a través de l'estrès oxidatiu per la disminució de l'eNOS, del NO i per l'augment dels nivells d'endotelina [406, 407]. La resistina també pot induir l'expressió en les cèl·lules endotelials de molècules d'adhesió vascular VCAM-1 i ICAM-1 i induir la secreció de MCP-1 [396, 406]. A més, la resistina pot augmentar la migració i proliferació de les cèl·lules musculars llises vasculars [408]. Per últim, la resistina s'ha demostrat que pot augmentar els esdeveniments transcripcionals en els monòcits que condueixen a l'augment de l'expressió de diverses citocines proinflamatòries, incloent la IL-1B, la IL-6 i el TNF-α [409, 410].

5.2.6.5. Leptina

Hi ha certa discrepància pel que fa al paper de la leptina en l'aterogènesi ja que varis estudis sobre el paper de la leptina en l'aterogènesi han llançat resultats contradictoris. En un principi es va veure que els animals sense el gen de leptina eren

resistents a l'aterosclerosi [411]. Però, més recentment, es va veure que el tractament amb leptina en un model animal d'aterosclerosi inhibia la progressió d'aquesta [412], a més, es va veure que animals deficients amb el receptor de la leptina resultava en el desenvolupament de lesions ateroscleròtiques més grans [413]. El que suggereix un paper protector per la leptina en l'aterosclerosi. Tot i que en un principi s'ha relacionat la leptina amb la progressió de l'aterosclerosi, el paper específic és difícil de determinar per la seva funció predominant en la regulació del metabolisme [414].

6. Observacions finals

Actualment el TA ha deixat de ser considerat sols com una estructura de suport mecànic o de dipòsits de greix. El TAE té la capacitat d'actuar d'una manera paracrina i vasocrina, cada cop noves molècules alliberades pel TAE s'afegeixen a la ja impressionant llista dels factors secretats [415, 416].

El TAE és un dipòsit adipós que s'ha demostrat que es pot correlacionar directament amb l'extensió i la gravetat de la malaltia de l'artèria coronària. Les investigacions actuals posen de manifest l'evidència experimental que munta com a suport de la hipòtesi que el TAE influeix en les vies clau de l'aterogènesi, com l'estrès oxidatiu, la inflamació, la disfunció endotelial i la remodelació vascular (Figura 12) [415, 416].

Si bé els mecanismes cel·lulars i moleculars exactes de com el TAE afecta a l'aterosclerosi encara no s'han delineat, molts estudis recents han començat a descobrir els canvis fenotípics clau en el TAE que es produeixen en la configuració del CAD. S'ha postulat que un desequilibri entre l'expressió de factors proaterogènics i antiaterogènics representaria un mecanisme fonamental que contribueix a la posada en marxa i a l'expansió de la malaltia coronària. Mentre que les investigacions actuals són prometedors, queden moltes preguntes respecte a les vies exactes i els mecanismes pels quals adipocines derivades del TAE influeixen en l'homeòstasi vascular en la salut i la malaltia [415, 416].

Els estudis que aborden la secreció i l'expressió del factors dels diferents dipòsits de TA són limitats, la caracterització del perfil de secreció del TAE podrien identificar els

factors que protegeixen o contribueixen al desenvolupament de malalties cardiovasculars. Així com, la importància de la composició cel·lular del TAE, ja que encara no està clara la infiltració de les cèl·lules immunes. Per tant cal destacar la importància dels estudis referents al TAE en relació a la patologia del CAD.

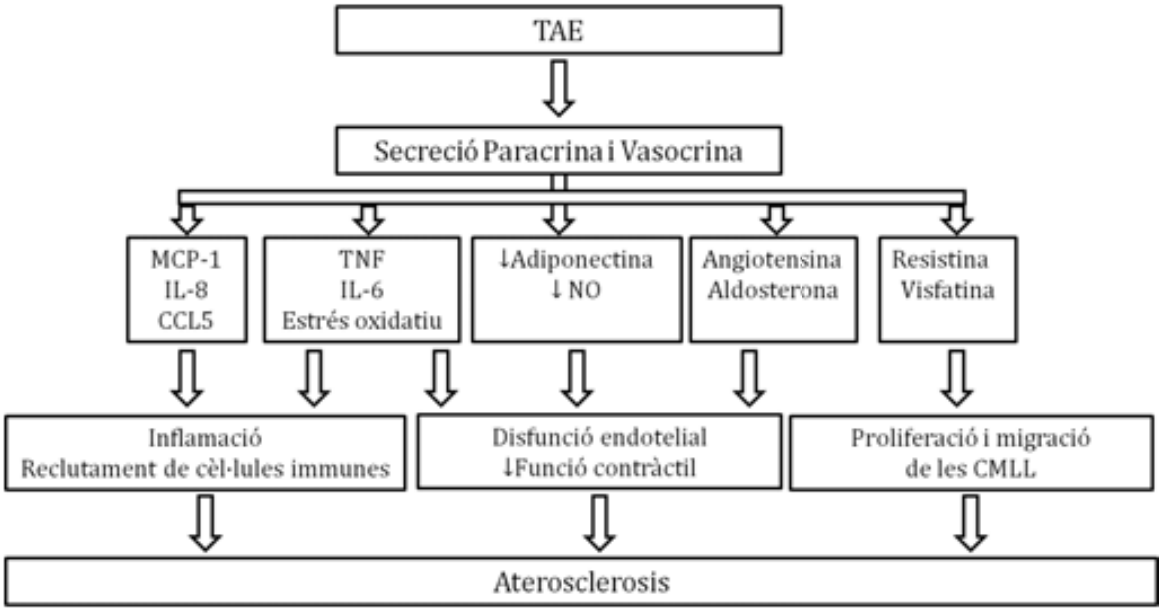

Figura 12. Contribució del TAE a l' aterosclerosi. El TAE a través de la secreció paracrina i/o vasocrina de substancies que podrien afectar a l'endoteli, a les cèl·lules de múscul llises vascular i a la inflamació i el reclutament de les cèl·lules immunes. Imatge modificada [415]

OBJECTIUS

L'objectiu general d'aquest estudi es determinar el paper del teixit adipós epicàrdic en la fisiopatologia de la aterosclerosis i l'efecte de la senyalització TLR.

Objectius específics:

Per tal de dilucidar el paper del TA en la patologia de l'aterosclerosi, s'analitzen en el TAE i el TAS de pacients amb aterosclerosi i individus control en estat basal i després de l'estimulació amb lligands TLR els següents factors:

- Tipus de poblacions presents.
- Secreció de citocines i d'adipocines.
- Expressió i activació dels STATs.
- Nivells d'expressió gènica.

Per tal de determinar l'efecte del TA a nivell sistèmic en la patologia de l'aterosclerosi s'analitza en mostres de sang perifèrica en pacients amb aterosclerosis i pacients control el següent factor:

- Secreció de citocines i adipocines en estat basal i desprès de l'estimulació amb lligands TLR.

MATERIAL I MÈTODES

1. Selecció de pacients i obtenció de mostres

1.1. Identificació i registre de pacients

Es van incloure en l'estudi un total de 86 pacients derivats de la consulta del Servei de Cardiologia i Cirurgia del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Les mostres de teixit adipós i sang perifèrica es van obtenir de pacients sotmesos a cirurgies cardíaques. En el cas dels pacients amb aterosclerosi o cardiopatia isquèmica van ser sotmesos a cirurgia de revascularització coronària i en el cas dels pacients amb valvulopatia sense aterosclerosi a cirurgia de recanvi valvular. Tots els pacients van donar el seu consentiment informat per escrit.

Es va realitzar la selecció de pacients amb malaltia cardíaca sense aterosclerosi coronària (grup NCAD) i pacients amb aterosclerosi (grup CAD) amb els següents criteris d'exclusió: antecedents d'angioplàstia coronària transluminal percutània o revascularització quirúrgica i nivells de creatinina superiors a 140 μmol/l. Seguint aquests criteris es van seleccionar per l'estudi 86 pacients, 36 pacients amb CAD i 50 pacients NCAD.

1.2. Caracterització dels pacients

Es va realitzar una caracterització clínica de diferents àmbits rellevants, es van recollir característiques clíniques basals (pes, índex de massa corporal, freqüència cardíaca, hipertensió arterial, dislipèmia, diabetis mellitus, tabaquisme, xifres de glucèmia, colesterol total, fraccions lipídiques, ...) i informació sobre els tractaments farmacològics de base (aspirina, inhibidor de l'enzima convertidora d'angiotensina (IECA), antagonista dels receptors d'angiotensina II (ARA2), estatines, blocadors β-adrenèrgics, antagonistes del calci, diürètics, insulina, ...).

1.3. Recollida de les mostres

Es van recollir mostres de TA de 86 pacients seleccionats segons els paràmetres anteriors. De cada pacient es van obtenir una mostra de TAE, una de TAS, i una

mostra de sang perifèrica. El TAE es va obtenir durant les cirurgies cardíaques de la base de l'arteria aorta i en la mateixa cirurgia també es va recollir, el TAS situat entre la pell i l'estern. Les mostres de TA obtingudes durant el procés quirúrgic, van ser recollides en un tub estèril (Deltalab) amb solució fisiològica (BBraun) i van ser transportades ràpidament cap al laboratori. Les mostres de sang perifèrica també es van obtenir durant la cirurgia i es van recollir en un tub d'heparina (Becton, Dickinson and Company).

2. Estimulació de les mostres

2.1. Estimulació dels explants

Després d'obtenir la mostra es va realitzar l'estimulació del TA. Es van usar explants, disseccions de teixit gras d'uns 0,5-1 cm^3 (de 20 a 80 mg). La concentració del lligand i el temps de cultiu òptim van quedar establerts amb la realització de diferents cinètiques temporals d'estimulació. El TA es va estimular durant 18 hores amb 1µg/ml de *Ultra pure E.coli* LPS (Invivogen) i 1µg/ml de FSL-1(Invivogen). El medi que es va usar va ser DMEM/F12 (Sigma), complementat amb 1% de penicil·lina/estreptomicina (BioWhittaker) i amb 1% de glutamina (Gibco). Es van rentar les mostra amb sèrum fisiològic durant 10 minuts i amb un bisturí es van realitzar tres parts equitatives de teixit. Es van col·locar els diferents explants de TA en diferents pous de una placa de cultiu de 48 pous (Corning) i es va procedir a l'estimulació amb els lligands TLR. Es va deixar 18 hores en l'incubador cel·lular a 37°C i al 5% de CO_2.

Un cop finalitzada l'estimulació es va recollir el sobrenedant i el greix i es van dipositar en tubs eppendorf estèrils correctament etiquetats. Els sobrenedants van ser congelats a -80C pel seu posterior anàlisis per ELISA. Una part de les mostres de TA van ser guardades a -80C amb *RNA later* (Ambion) per l'extracció de RNA; una altra part va ser congelades amb nitrogen líquid i guardades a -80ºC per l'extracció de proteïnes; i finalment una altra part van ser fixades i parafinades per el seu anàlisis immunohistoquímic.

2.2. Estimulació de cèl·lules de sang total

Es va procedir a l'estimulació de la sang perifèrica de pacients amb CAD i NCAD amb lligands TLR. Es va partir de 5ml de sang perifèrica en un tub d'heparina. La concentració del lligand i el temps de cultiu òptim van quedar establerts amb la realització de diferents cinètiques temporals d'estimulació. La sang total va ser estimulada durant 18 hores amb 1µg/ml de LPS, FSL-1 i PAM (Invivogen). El medi de cultiu usat va ser RMPI (Lonza) complementat amb 1% de penicil·lina/estreptomicina i amb 1% de glutamina. Es van usar 1ml de sang en tubs de cultiu (Becton, Dickinson and Company) i 400 µl de medi de cultiu. Un cop les mostres van ser estimulades es va recollir el sobrenedant i es va congelar a -80°C.

3. Immunohistoquímica

Per identificar i localitzar les diferents poblacions presents en el TA així com i l'expressió de queratina 19 i de STATs fosforilats es va realitzar la tècnica de immunohistoquímica. Es van usar mostres de 6 pacients amb CAD i 6 individus NCAD i es va realitzar amb un sistema automatitzat (Autostainer AS48 de DAKO). El protocol general utilitzat per aquesta tècnica va ser el següent.

3.1. Fixació i immersió

- Col·locar el teixit a fixar en un casset de plàstic (WVR).
- Preparar la formalina neutra tamponada al 10% (NBF *neutral buffer formalin*):
    - 100ml de formaldehid (Merk) al 37-40%
    - 4g de fosfat monosòdic (Panreac) (29mM).
    - 6,5g de fosfat disòdic (Panreac) (46mM).
    - Enrasar fins 1000ml d'aigua destil·lada.
- Col·locar el casset immers en formalina i deixar fixar *overnight.*
- Deshidratar la mostra:
    - Etanol (Merk) al 95% , 2 banys de 60 minuts.
    - Etanol absolut, 2 banys de 60 minuts.
    - Xilol (Merk), 2 banys de 60 minuts.

- Immersió del teixit en parafina (Panreac).
    - Tres banys de parafina a 60°C durant 30 minuts, 60 minuts i 90 minuts cada un.
- Tallar el teixit parafinat en el micròtom (Microm) i amb l'ajuda d'un bany a 40°C col·locar els talls en un portaobjectes (Merk).
- Assecar els portaobjectes en una estufa a 37°C.

3.2. Tinció

Es va usar el kit comercial *EnVision™ FLEX, High pH* (DAKO), es van seguir els següents passos:

- Desparafinar
    - Escalfar les preparacions en una estufa a 60°C durant 30 minuts.
    - Realitzar dos banys de xilol durant 3 minuts.
- Hidratar:
    - Etanol absolut, 2 banys de 3 minuts.
    - Etanol 95%, 2 banys de 3 minuts.
    - Esbandir suament amb aigua destil·lada.
- Recuperació antigènica amb calor amb el reactiu *EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x)*. És un tampó compost de Tris/EDTA. S'incuben les mostres durant 20 minuts a 97°C.
- A partir d'aquest punt, els passos es van realitzar de forma automatitzada i prèviament estandarditzada en l'Autostainer AS48 *de DAKO.*
- Inhibició de l'activitat de la peroxidasa endògena. Incubar les mostres durant 10 minuts amb el reactiu *EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent.* Reactiu compost per tampó fosfat amb peròxid d'hidrogen.
- Rentar amb *EnVision™ FLEX Wash Buffer (1x*). Solució tamponada amb Tris que conté Tween 20 (Merk).
- Incubar l'anticòs primari durant 20-30 minuts, diluït en *En Vision FLEX Antibody Diluent.* Tampó Tris, ph7,2 amb 15 mmol/L de NaN_3. En la taula 6 es troben els anticossos usats, els anticossos de la casa comercial DAKO ja venien pre-diluïts en el cas de la resta d'anticossos es van usar les concentracions indicades.

- Rentar amb *EnVision™ FLEX Wash Buffer (1x)*.
- Incubar durant 20-30 minuts amb l'anticòs secundari *EnVision™ FLEX /HRP*. Consisteix en un polímer unit a molècules de peroxidasa i molècules d'anticòs secundari de cabra contra immunoglobulines de conill i ratolí.
- Rentar amb *EnVision™ FLEX Wash Buffer (1x)*.
- Revelar la reacció, incubar durant 5 min amb *EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen EnVision™*. Solució de substrat composta per tetrahidroclorur 3,3'-diaminobencidina.
- Rentar amb aigua destil·lada.
- Tinció de contrast amb hematoxilina i eosina (Dako).
- Rentar amb aigua. A partir d'aquest pas es va treballar de forma manual fora del autostainer.
- Deshidratar:
    - Etanol al 95% , 2 banys de 60 minuts.
    - Etanol absolut, 2 banys de 60 minuts.
    - Xilol, 2 banys de 60 minuts.
- Muntatge final de les lamines, col·locar un cobreobjectes amb solució de muntatge (Dako) i deixar assecar.

Taula 6. Característiques dels anticossos usats en l'assaig de immunohistoquímica.

Anticòs	Casa comercial	Especificitat	Concentració
CD45	Dako	*Mouse monoclonal*	Pre-diluït
CD31	Dako	*Mouse monoclonal*	Pre-diluït
CD68	Dako	*Mouse monoclonal*	Pre-diluït
CD3	Dako	*Rabbit policlonal*	Pre-diluït
CD20cy	Dako	*Mouse monoclonal*	Pre-diluït
CD4	Dako	*Mouse monoclonal*	Pre-diluït
CD8	Dako	*Mouse monoclonal*	Pre-diluït
Mast Cell Tryptase	Dako	*Mouse monoclonal*	Pre-diluït
Stat1tyr	Abcam	*Rabbit policlonal*	1/100
Stat3tyr	CST	*Rabbit monoclonal*	1/100
Cytokeratin 19	CST	*Mouse monoclonal*	Pre-diluït

3.3. Anàlisis microscòpic

Les preparacions immunomarcades van ser examinades amb un microscopi Nikon Eclipse E400 acoblat a una càmera DXM1200. En cada preparació es van analitzar 4 camps (10X) per determinar el percentatge de cèl·lules immunomarcades presents en

el conjunt. Es va efectuar el recompte de cèl·lules marcades amb l'anticòs sobre el total de cèl·lules presents en cada camp. Els resultats es van expressar com percentatge de cèl·lules positives respecte el número de cèl·lules totals.

4. Anàlisis d'expressió proteica per Western Blot

Per mirar l'expressió de STATs totals i fosforilats en les mostres de TA es va utilitzar la tècnica de Western Blot en mostres aparellades de TAE i TAS procedents de 24 pacients, 12 pacients amb CAD i 12 individus NCAD. Els passos per la realització de la tècnica van ser els següents:

4.1. Extracte proteic de teixit adipós

El mètode d'extracció de proteïnes està basat en la homogeneïtzació en el tampó de lisis *RIPA Buffer* (Sigma) amb inhibidors de proteases i fosfatases. El protocol que es va seguir va ser el següent:

- Afegir al *RIPA Buffer* els inhibidors de fosfatases (*PhosStop* 1x (Roche)) i inhibidors de proteases (*Complet* 1x (Roche)).
- Afegir 100µl de *RIPA Buffer* a la mostra i deixar 20 minuts en gel.
- Disgregar amb el homogeneïtzador d'un sol ús *Biomasher® (Omni international)* i centrifugar 1 minut a 4.000g.
- Afegir 100µl de *RIPA Buffer* i centrifugar 1 minut a 4.000g.
- Incubar 20 minuts amb gel, vortejar cada 5 minuts.
- Congelar amb nitrogen líquid, deixar descongelar amb gel. Centrifugar 20 minuts a 8.000g a 4ºC.
- Alicuotar el sobrenedant en dos eppendorf i quantificar la concentració de proteïna.
- Guardar a -80ºC o procedir amb el Western Blot.

4.2. Quantificació de l'extracte

El contingut total de proteïnes dels homogeneïtzats cel·lulars es va quantificar amb un espectrofotòmetre segons el mètode dissenyat per *Lowry* [417] usant el kit comercial *DC Protein Assay* (Bio-rad). El protocol seguit va ser el següent:

- Preparar el *Reagent A**: per cada 1ml de *Reagent A* afegir 20µl de *Reagent S.*
- Preparar les dilucions del BSA de 2 a 0,25mg/ml amb el *RIPA Buffer* per realitzar la corba estàndard per duplicat.
- Afegir 5µl en una microplaca de 96 pous (Nunc):
    - Mostra de proteïnes a determinar.
    - Corba estàndard per duplicat.
- Afegir 25µl de *Reagent A** i 200µl de *Reagent B* a cada pou.
- Agitar durant 15 minuts a la foscor i llegir en l'espectrofotòmetre amb el filtre de mesura a 750nm i el filtre de referència a 405nm.
- Realitzar la corba estàndard i determinar la concentració de les mostres.
- Ajustar la concentració de les mostres a 1mg/ml.
- Preparar les mostres per carregar als pous del gel.
    - 6.5µl de mostra
    - 2.5µl de *LDS Sample Buffer* (4X) (Invitrogen)
    - 1µl *Sample Reducing Agent* (10x) (Invitrogen)
- Escalfar les mostres a 70°C durant 2minuts.

4.3. Western Blot

4.3.1. Electroforesis

- Col·locar el gel 4-12% Bis-Tris (Invitrogen) en la cubeta *X-Cell II Mini-Cell* (Novex). Omplir la cubeta amb 400ml de *Running Buffer* 1X (Invitrogen) i 500 µl d'antioxidant (Invitrogen)
- Cargar en el gel 30µl de mostra i 10µl de marcador (Invitrogen):
- Procedir a córrer el gel a una intensitat de 50 Ampers i un voltatge de 300 Volts.

4.3.2. Transferència

- Preparar 200ml de solució de transferència 1X (Invitrogen):
  - 10ml de *Transfer Buffer* (20X)
  - 20ml metanol pur (Merk) (10 %)
  - 200µl d'antioxidant
- Retallar 6 papers *whatman* (Whatman) (10x10) i una membrana de nitrocel·lulosa (Whatman) (9X9).
- Mullar els papers amb el buffer de transferència i col·locar-los en el aparell de transferència semisec (TE70X, Hoefer) per aquest ordre:
  - 3 papers *whatman*
  - Membrana de nitrocel·lulosa
  - Gel
  - 3 papers *whatman*
- Transferir una intensitat de 40 Ampers i a un voltatge de 200 Volts, durant 90 minuts.
- Rentar la membrana 5 minuts amb TBS (Tris-HCL 25mM, NaCl 15mM, pH=8) al 0,1% Tween 20 (Merk).

4.3.3. Bloqueig

- Preparar la solució de bloqueig: TBS al 5% de BSA (Sigma-aldrich)
- Incubar la membrana amb la solució de bloqueig durant 1 hora en agitació

4.3.4. Incubació amb anticòs primari

- Realitzar 4 rentats de 15 minuts amb TBS al 0,1% de Tween 20
- Diluir els anticossos amb la solució de bloqueig (Taula 7)
- Incubar la membrana amb els anticossos corresponents *overnight* en agitació a 4°C
- Realitzar 4 rentats de 15 minuts amb TBS al 0,1% Tween 20

4.3.5. Incubació amb anticòs secundari

- Diluir l'anticòs secundari conjugat amb peroxidasa (HRP) amb la solució de bloqueig (Taula 7).
- Incubar una hora amb agitació.
- Realitzar 4 rentats de 15 minuts amb TBS al 0,1% Tween 20

4.3.6. Revelat

Per revelar la membrana es va usar el reactiu *Super Signal West Dura* (Thermo scientific)

- Barrejar igual volum de les dos solucions del kit, prèviament temperades.
- Cobrir la membrana amb la solució de revelat i incubar 5 minuts
- Treure l'excés de líquid i procedir a la lectura de la quimioluminescència amb l'aparell G:BOX Chemi XX9 (Syngene)
- Guardar la membrana amb PBS a 4°C.

4.3.7. Stripping

Les membranes de nitrocel·lulosa revelades poden ser reutilitzades per detectar altres proteïnes. Amb el reactiu comercial *RestoreTM Western Blot Striping Buffer* (Thermo Scientific), s'incuben les membranes causant una dissociació entre l'anticòs i la proteïna a la que està unit sense afectar a les propietats de la membrana o de la proteïna. Es va determinar per stripping l'expressió de la β-actina i dels STAT totals.

- Incubar la membrana amb la solució de *stripping* durant 20 minuts a 45°C amb agitació.
- Rentar cinc cops amb TBS.
- Afegir TBS, i procedir a la incubació amb l'anticòs primari i els subsegüents passos ja descrits anteriorment.

Taula 7. Característiques dels anticossos usats en els assajos de Western Blot

Anticòs	Casa comercial	Especificitat	Dilució
Stat1tyr	Cell signaling	Policlonal conill	1/1000
Stat3tyr	Cell signaling	Monoclonal conill	1/1000
Stat5tyr	Cell signaling	Monoclonal conill	1/1000
Stat5ser	Abcam	Policlonal conill	1/1000
Stat 1 total	Cell signaling	Policlonal conill	1/1000
Stat 3 total	Cell signaling	Policlonal conill	1/1000
Stat5 total	Cell signaling	Policlonal conill	1/1000
BActina	Sigma aldrich	Monoclonal ratolí	1/5000
Anti-rabbit ,HRP-linked	Cell signaling	Cabra anti-conill IgG	1/2000
Anti-mouse,HRP-linked	Cell signaling	Cabra anti-ratolí IgG	1/2000

4.3.8. Anàlisis dels resultats.

Les proteïnes immunoreactives van ser visualitzades usant un sistema de detecció de quimioluminescència i van ser quantificades usant el programa *GeneTools Analysis Software*, sent expressats els nivells de proteïna diana relatius a la proteïna de referència (β-actina). D'aquesta manera es va determinar la quantitat relativa de la proteïna reconeguda per cada anticòs present en cada mostra en relació la carga proteica total de cada extracte.

5. Detecció de proteïnes dels sobrenedants amb ELISA

Es va realitzar l'anàlisi de citocines i adipocines en els sobrenedants obtinguts dels cultius de TA i de sang total procedents de 40 pacients, 20 amb CAD i 20 individus NCAD. Es van usar kits comercials de ELISA per IL-10, TNF-α, IL-6 (Biolegend) i de MCP-1, Adiponectina, Leptina i Resistina (R&D), seguint les indicacions del fabricants. Les mostres es van diluir segons la taula 8, per tal que la seva absorbància estigues dins de la corba patró usada per la quantificació de proteïna.

Taula 8. Dilucions de les mostres per la detecció de proteïnes secretades.

	Explant	Sang Total
Adiponectina	1/100	1/900
Leptina	1/10	1/30
Resistina	1/10	1/30
MCP-1	1/100	1/10
TNF-α	1/2.5	1/2.5
IL-10	1/2.5	1/2.5
IL-6	1/30-1/900	1/2.5-1/775

A continuació es fa una descripció del procediment que es va realitzar:

- Afegir 100µl de l'anticòs de captura a la concentració corresponent (taula 9) en un placa de 96 pous (Nunc).
  - Dilució de l'anticòs de captura amb PBS (tampó fosfat 10mM, NaCl 150 mM, Ph 7,2) i incubar 18 hores a temperatura ambient (adiponectina ,leptina, resistina i MCP-1).
  - Dilució de l'anticòs de captura amb tampó carbonat/bicarbonat (8,4g de bicarbonat sòdic, 3,56g de carbonat sòdic, ajustar fins 1000ml d'aigua) i incubar 18 hores a 4°C (IL-10, IL-6 i TNF-α).
- Descartar l'anticòs de captura.
- Rentar la placa 5 vegades amb PBS al 0,05%Tween-20.
- Afegir 300µl de la solució de bloqueig , PBS al 1% BSA (Sigma Aldrich), a cada pou i incubar durant 1 hora. Rentar la placa.
- Afegir 100µl de les mostres i de l'estàndard corresponents prèviament diluïts amb PBS al 1% BSA (taula 8 i 9). Incubar durant 2 hores. Rentar la placa.
- Afegir 100 µl de l'anticòs de detecció marcat amb biotina a la concentració corresponent (taula 9) diluït amb PBS al 1%BSA. Incubar durant 1 hora. Rentar la placa.
- Afegir 100 µl de l'avidina/estreptavidina conjugada amb HRP a la concentració indicada (taula 9) diluïda amb PBS al 1%BSA . Incubar durant 30 minuts. Rentar la placa.
- Afegir 100µl de la solució del substrat 3,3´,5,5´-tetrametilbenzidina (TMB) (R&D). Incubar durant 20 minuts.
- Aturar la reacció de la solució del substrat amb 50µl d'àcid sulfúric al 25%.
- Llegir la placa en un espectrofotòmetre amb el filtre de mesura a 420 nm i el filtre de referència a 620 nm.
- Realitzar la corba patró amb les mostres estàndards i calcular les concentracions de les mostres.

Taula 9. Característiques dels diferents anticossos usats per ELISA.

	Casa comercial	Anticòs de captura (dilució)	Standard (Cmax-Cmin) pg/ml	Anticòs de detecció (dilució)	Avidina/ estreptavidina-HRP (dilució)
Adiponectina	RD	1/180	4000- 62.5	1/180	1/200
Leptina	RD	1/180	2000- 31,3	1/180	1/200
Resistina	RD	1/180	2000-31,3	1/180	1/200
MCP-1	RD	1/180	1000 -15,6	1/180	1/200
TNF-α	BD	1/200	500-7,8	1/200	1/1000
IL-10	BD	1/200	250-3,9	1/200	1/1000
IL-6	BD	1/200	500-7,8	1/200	1/1000

6. Anàlisis d'expressió gènica del teixit adipós.

Per el anàlisi d'expressió gènica es van usar mostres de TAE i TAS estimulades amb lligands TLR (LPS i FSL-1) de pacients amb CAD i NCAD. Primer es va procedir a l'obtenció del RNA i es va avaluar la seva qualitat i quantitat per poder seleccionar les mostres per l'anàlisi de l'expressió gènica amb la tecnologia de microarrays de Affimetrix.

6.1. Obtenció de RNA a partir de teixit adipós

Per l'obtenció de RNA del TA es va usar el kit comercial *RNeasy Lipid Tissue Mini Kit* (Quiagen).

- Afegir 1ml de *QIAzol Lysis Reagent* a cada mostra.
- Disgregar mecànicament el TA amb el homogeneïtzador d'un sol ús *Biomasher®.* Centrifugar durant 5 minuts a 8.000g.
- Homogeneïtzar la mostra passant-la per una columna *QIAshredder* col·locada en un tub col·lector de 2ml. Centrifugar durant 2 minuts a màxima velocitat.
- Deixar reposar el tub que conté el homogeneïtzat durant 5 minuts.
- Afegir 200µl de cloroform i vortejar vigorosament durant 15segons.
- Deixar reposar el tub amb el homogeneïtzat durant 3 minuts i centrifugar durant 15 minuts a 5.000g i a 4°C . Després de centrifugar la mostra es troba separada en 3 fases: una superior sense coloració, que correspon a la fase aquosa que conté el

RNA; una capa intermèdia blanca; i una capa inferior, vermella, que correspon a la fase orgànica.

- Transferir la fase aquosa a un tub nou i afegir un volum equivalent (600µl) d'etanol (Merk) al 70%, barrejar amb vòrtex.
- Transferir la mostra, fins un màxim de 700µl, a una columna *RNeasy* spin col·locada en un tub col·lector de 2ml. Centrifugar durant 30 segons a 8.000g i descartar el líquid.
- Afegir el volum que queda de homogeneïtzat a la columna *RNeasy* i repetir el pas anterior.
- Afegir 350µl de Buffer RW1 a la columna *RNeasy*. Centrifugar 30 segons a 8.000g i descartar el líquid del tub col·lector.
- Preparar la *DNase*: Afegir 10µl de *DNase* a 70 µl de Buffer RDD. Barrejar per inversió.
- Afegir 80µl de la mix de *DNase* i RDD directament a la columna *RNeasy*. Incubar durant 15minuts.
- Afegir 350µl de Buffer RW1 a la columna *RNeasy*. Centrifugar 30 segons a 8.000g i descartar el líquid del tub col·lector.
- Afegir 500µl de Buffer RPE a la columna *RNeasy*. Centrifugar 30segons a 8.000g i descartar el líquid del tub col·lector.
- Afegir 500 µl de Buffer RPE a la columna *RNeasy*. Centrifugar 2 minuts a 8.000g
- Col·locar la columna *RNeasy* en un tub col·lector nou i centrifugar 1 minut a màxima velocitat.
- Col·locar la columna *RNeasy* en un tub col·lector de 1,5ml. Afegir 50 µl de *RNAse-free water* directament a la columna. Centrifugar 1 minut a 8.000g per eluir el RNA.
- Repetir el pas anterior, afegint 50µl més de *RNAse-free water*.
- Guardar el RNA a -80°C .

6.2. Determinació de la quantitat i qualitat del RNA.

Per determinar la quantitat del RNA extret es va procedir a quantificar-lo espectrofotomètricament amb el Nanodrop ND-1000 (Thermo scientific) usant com

blanc la solució d'elució. Es van ajustar totes les mostres a una concentració de 20ng/µl .

Per a la verificació de la qualitat del RNA es va usar el Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) amb el kit *Agilent RNA 6000 Nano* (Agilent Technologies) seguint les instruccions del fabricant. Aquest procés consisteix en una electroforesis de les mostres de RNA que dona les bandes corresponents a les subunitats ribosomals 28s i 18s. A més, calcula el número de la integritat del RNA (RIN) que correspon al ràtio 28s/18s . El RIN oscil·la entre el número 10 (RNA intacte) i el número 1 (RNA totalment degradat). Es van elegir les mostres per l'estudi d'expressió gènica amb un RIN>9

6.3. Microarrays

Es van realitzar anàlisis d'expressió gènica del TA mitjançant la tecnologia de microarrays de Affimetrix amb el protocol recomanat. Pels anàlisis mitjançant microarrays, es va partir de RNA prèviament extret del TA i guardat a -80°C.

Es va realitzar la hibridació d'un total de 36 microarrays, en cada array es van usar mostres de RNA de 3 pacients diferents, de forma que es van fer grups (pools). A més es van realitzar tres repliques per cada condició experimental. D'aquesta manera es van usar mostres de 18 pacients, dividits en 9 pacients amb CAD i 9 individus NCAD. De cada pacient es va estudiar dos tipus de TA (TAE i TAS), i en cada tipus teixit es va mirar l'efecte de l'estimulació amb LPS i FSL-1 respecte la mostra no estimulada (basal) (Figura 13).

Els chips usats en aquest estudi van ser els *Gene Chip®Human Gene 1.0 ST Array*, que permeten analitzar el nivell d'expressió de 28.869 gens amb 764.885 sondes diferents. Cada un d'aquestos gens està representat en el chip per 26 sondes de 25 nucleòtids repartides al llarg de tota la longitud del gen. Es va seguir el protocol segons la el kit comercial *Ambion® WT Expression* (Applied Biosystems)

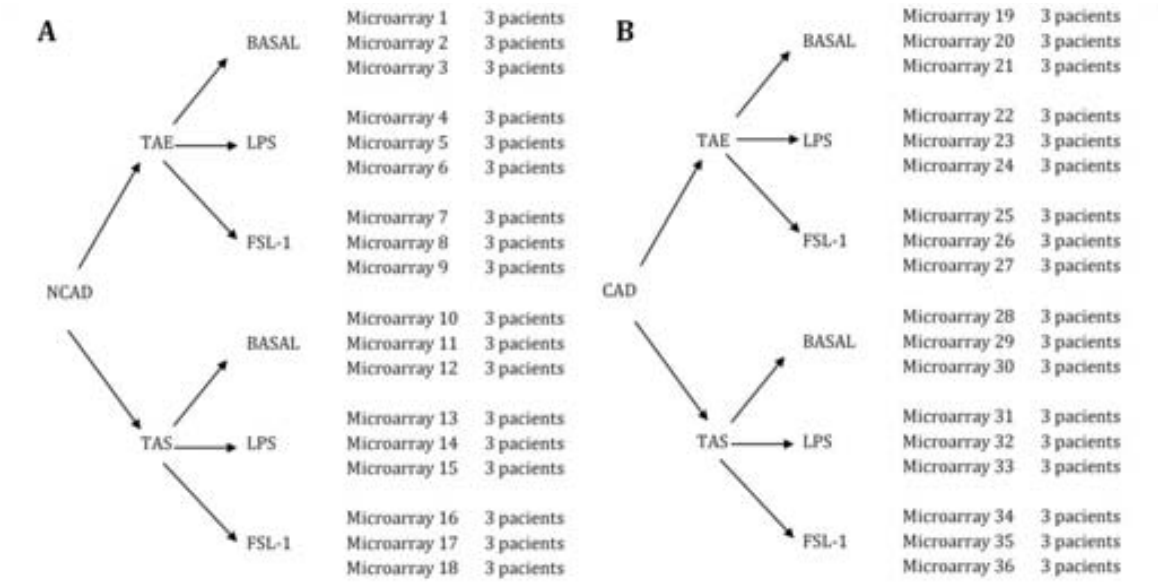

Figura 13. Esquema del nombre de mostres i condicions analitzades per microarrays. En la figura A es mostren els individus NCAD i en la figura B els pacients amb CAD. En cada pacient es van analitzar el TAE i el TAS en condició basal i després d'estimular-lo amb LPS i FSL-1. En cada microarray es van incloure mostres de tres pacients diferents i es van analitzar per triplicat.

6.3.1. Síntesi de la primera cadena de cDNA

- Preparar la màster mix de la primera cadena:
  - 4µl *First-Strand Buffer Mix*
  - 1µl *First-Strand Enzyme Mix*
  - 3µl RNA total (50 ng)
  - 2µl *Poly-A Spike Controls*
- Incubar en el termociclador 60 minuts a 25°C, 60 minuts a 42°C i 2 minuts a 4°C.

6.3.2. Síntesi de la segona cadena de cDNA

- Preparar la màster mix de la segona cadena:
  - 12,5 µl *Second-Strand Buffer mix*
  - 5µl *Second-Strand Enzyme mix*
  - 32,5µl *RNAse free water*
  - 10µl Síntesi de la primera cadena
- Incubar en el termociclador 60 minuts a 16°C, 10 minuts a 65°C, 2 minuts a 4°C.

6.3.3. Síntesi de cRNA per transcripció in vitro.

- Preparar la màster mix:
  - 24µl *IVT Buffer mix*
  - 6µl *IVT Enzyme mix*
  - 60µl Síntesi de la segona cadena
- Incubar en el termociclador 16 h a 40°C.

6.3.4. Purificació del cRNA

Després de la síntesi del cRNA, es va procedir a la seva purificació per eliminar enzims, sals i nucleòtids no incorporats.

- Preparar la mix d'unió de cRNA:
  - 10µl *Nucleic Acid Binding Beads*
  - 50µl *Nucleic Acid Binding Buffer Concentrate*
- Afegir 60µl de la mix d'unió de cRNA a la mix de la segona cadena. Barrejar pipetejant varies vegades.
- Transferir la mix de purificació a una placa amb pous en forma de U.
- Afegir 60µl d'isopropanol (Merk) al 100% a cada mostra i barrejar varies vegades.
- Col·locar la placa en un agitador i barrejar suaument durant 2 minuts, per tal que el cRNA s'uneixi a les *RNA Binding Beads.*
- Col·locar el plat en una base magnètica (Ambion) durant 5 minuts per capturar les boles magnètiques.
- Quan la solució adquireix un color clar i les boles magnètiques estan en el fons del pou, aspirar amb compte el sobrenedant i descartar-lo.
- Afegir 100µl de *Nucleic Acid Wash Solution* a cada mostra i agitar a velocitat moderada durant 1 minut.
- Col·locar novament el plat a la base magnètica i retirar el sobrenedant sense tocar les boles magnètiques.
- Repetir el rentat amb *Nucleic Acid Wash Solution* i retirar el sobrenedant.
- Agitar la placa vigorosament durant 1 minut per evaporar el isopropanol de les boles magnètiques.

- Per eluir el cRNA de les *RNA Binding Beads*, afegir a cada mostra 40µl de *Elution Solution* precalentada a 55°C. Incubar 2 minuts sense agitar.
- Agitar vigorosament la placa durant 3 minuts. Assegurar que les *RNA Binding Beads* estan completament disperses.
- Col·locar la placa a la base magnètica durant 5 minuts per capturar les *Nucleic Acid Binding Beads* al fons de la placa.
- Transferir el sobrenedant amb el cRNA a un microtub lliure de nucleases.

6.3.5. Avaluació i quantificació del cRNA

Es va mesurar la quantitat del cRNA obtingut amb el Nanodrop, es va ajustar la concentració de cRNA a 455ng/µl. També es va mirar la distribució del mida del cRNA obtingut usant el *Bioanalyzer*, esperant un perfil de distribució de la mida del cRNA entre 250-5500nt, amb una major quantitat distribuïda entre els 600-1200nt

6.3.6. Síntesi del segon cicle de cDNA

- Preparar:
  - 2µl de *Random Primers*
  - 22µl de cRNA (10µg)
- Incubar en el termociclador 5 minuts a 70°C, 5minuts a 25°C i 2minuts a 4°C.
- Preparar:
  - 8µl de *2nd-Cycle Buffer Mix*
  - 8µl de *2nd-Cycle Enzyme Mix*
  - 24µl de cRNA amb els *Random Primers*.
- Incubar en el termociclador 10 minuts a 25°C, 90 minuts a 42°C, 10 minuts a 70°C i 2 minuts a 4ºC.

6.3.7. Hidròlisis del cRNA amb la RNAsa H

- Preparar la reacció d'hidròlisis:
  - 2µl de *RNAsa*
  - 40µl de *2nd-cycle cDNA*

- Incubar en el termociclador 45 minuts a 37°C, 5 minuts a 95°C i 2minuts a 4°C.

6.3.8. Purificació del cDNA monocatenari

Es va procedir de la mateixa manera que en la purificació del cDNA (6.3.4) però amb la diferencia que es va usar 120µl d'etanol al 100% i no isopropanol i que el volum d'elució en aquest va ser de 30µl i no de 40µl.

6.3.9. Avaluació i quantificació cDNA monocatenari.

Es va mesurar la quantitat del cDNA optés amb el Nanodrop, s'ajusta la concentració de cDNA a 176,3 ng/µl. També es va mirar la distribució de la mida del cDNA obtingut usant el Bioanalyzer, esperant un perfil de distribució de la mida del cRNA de 400nt.

6.3.10. Fragmentació del cDNA monocatenari

A partir, d'aquest pas s'usa el kit *GeneChip®WT Terminal Labeling and Hybridization* (Affymetrix).

- Preparar la reacció de fragmentació:
  - 4,8µl de 10x *cDNA Fragmentation Buffer*
  - 1µl de UDG 10U/µl
  - 1µl de APE1 1000U/µl
  - 10µl de *RNAse free water*
  - 31,2µl de *Single-Stranded DNA*
- Incubar en el termociclador 60 minuts a 37°C, 2 minuts a 93°C i 3 minuts a 4°C.

Es va valorar la mida dels fragments amb el Bioanalyzer. El rang de mida màxima de les mostres fragmentades es de aproximadament de 40 a 70 nucleòtids.

6.3.11. Marcatge del cDNA monocatenari fragmentat

- Preparar la reacció de marcatge:
  - 12µl de 5x TdT *Buffer*

  - 2µl de TdT
  - 1µl de DNA *Labeling Reagent*, 5mM
  - 45µl de *Fragmented Single-Stranded* DNA
- Incubar 60minuts a 37°C 10 minuts a 70°C i 2minuts 4°C.

6.3.12. Hibridació de les mostres

- Preparar la reacció d'hibridació:
  - 1,7µl de *Control Oligonucleotide B2* (3nM)
  - 5µl de 20x *Eukaryotic Hybridization Controls* (bioB, bioC, bioD, cre)
  - 50µl de *Hybridization Mix* 2x
  - 7µl DMSO
  - 9,3µl *RNAse free water*
  - 27µl de *Fragmented and Labeled DNA target*
- Escalfar la mix d'hibridació: 5 minuts a 99°C i 5 minuts a 45°C.
- Centrifugar durant 1 minut a màxima velocitat.
- Temperar els xips (*GeneChip ST Array*).
- Introduir 200µl de mix d'hibridació en cada xip
- Hibridar els xips en una incubadora durant 17 hores a 45°C amb agitació a 60rpm.

6.3.13. Rentat, tinció i escaneig del chip.

Tan el procés de rentat com el de tinció dels arrays es van realitzar automàticament mitjançant la *GeneChip®Fluidics Station 400* (Affimetrix) amb el kit *GeneChip® Hybridization, Wash and Stain* (Affimetrix)*:*

- Rentar amb la Solució de Rentat A durant 10 cicles de 2 rentats cada un a 30°C.
- Rentar amb la Solució de Rentat B durant 6 cicles de 15 rentats cada un a 50°C.
- Incubar durant 5 minuts amb una solució de tinció estreptavidina/ficoeritrina (SAPE) a 35°C.
- Rentar amb la Solució de Rentat A durant 10 cicles, de 4 rentats cada un a 30°C.
- Incubar 5 minuts amb Solució d'anticossos a 35°C.
- Incubar 5 minuts amb Solució SAPE a 35°C.

- Rentat amb la Solució de Rentat A durant 15 cicles, de 4 rentats cada un a 35°C.
- Omplir el xip amb el A*rray Holding Buffer.*

Per últim es va realitzar l'escaneig amb el GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix) amb el protocol d'escaneig corresponent per l'array *Human Gene 1.ST*. Les imatges generades se guarden com arxius amb extensió .CEL.

6.4. Anàlisi estadístic dels arrays

Les imatges escanejades es van convertir automàticament en arxius CEL. utilitzant el programa *Affymetrix® GeneChip® Command Console® Software* (Affymetrix). Els valors d'intensitat de cada xip es van normalitzar utilitzant l'algoritme RMA (*Robust Multi-chip Average*). Es van determinar diferències estadísticament significatives entre les diferents grups utilitzant *Bioconductor* (http://www.bioconductor.org/) *Paquet limma* [418].

Els anàlisis es van dur a terme en tres nivells diferents, comparació entre teixits (TAE/TAS), comparació entre pacients (CAD/NCAD) i estimulació de les mostres (BASAL/LPS-FSL). Després de l'anàlisi es van mostrar les dades normalitzades amb valors de canvi entre dos condicions diferents, el canvi d'orde de magnitud o FC (*Fold Change*). El valor usat en les llistes serà el FC, a major valor absolut de FC la taxa de canvi serà major (amb signe positiu per les induïdes o més expressades i negatiu per les seqüències reprimides o menys expressades). Els gens que mostren un FC ≥ 1 o ≤1 i una diferència significativa (t -test , $p < 0,05$) van ser considerades diferencialment expressades.

6.5. Classificació funcional i visualització dels gens.

Una vegada realitzat el filtrat i anàlisi estadístic de les dades d'expressió s'obté un llista de gens que apareixen induïts o reprimits de manera estadísticament significativa entre varies condicions experimentals. Per processar aquesta gran

quantitat d' informació i traduir-la en informació biològica útil és necessari portar a terme un anàlisis funcional de les dades obtingudes.

Existeixen nombroses bases de dades públiques i fonts biobibliogràfiques disponibles per l'estudi de la funció gènica, existeixen una sèrie d'eines bioinformàtiques que permeten classificar als gens en funció dels processos biològics en els que intervenen, les funcions moleculars de les proteïnes que codifiquen i les rutes de senyalització en les quals participen.

En el nostre cas, la llista de gens seleccionats va estar compost per aquells gens diferencialment expressats amb valor de $p \geq 0{,}05$ i $FC \geq 1$ o ≤ 1 entre les diferents condicions comparades. L'anotació funcional es va realitzar amb la base de dades Database for Annotation, Visualization and Integrated (DAVID) [419]. A més es va usar el programa *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) (Ingenuity®Systems, www.ingenuity.com) per determinar les rutes de senyalització i regulació en que estaven implicades els gens prèviament seleccionats. Una vegada seleccionats les categories funcionals i els gens d'interès es van realitzar els mapes de calors o *heat map* amb els programes *Cluster 3.0* [420] *i Java Treeview* [421]

7. Anàlisi estadístic

Els anàlisis dels resultats, a excepció dels arrays, estan mostrats com la mitjana de les mostres amb el corresponent error estàndard de la mitjana (SEM). Les diferencies entre mostres van ser analitzades amb un test t de Student segons les variables fossin aparellades o independents. Per al càlcul del valors i la realització de gràfiques es va utilitzar la fulla de càlcul Excel (Microsoft) i el programa GraphPad Prism 5. El nivell de significança en tots els anàlisis ha estat el habitual del 5 % ($p<0{,}05$). El valor de probabilitat $p<0{,}05$ és indicatiu d'una relació estadísticament significativa, molt significativa $p<0{,}01$ i altament significativa $p <0{,}001$.

RESULTATS

1. Característiques clíniques dels pacients.

Es van obtenir mostres biològiques d'un total de 84 pacients dels quals un 40% van ser sotmesos a cirurgia de revascularització coronària (grup CAD) i un 60% a cirurgia de recanvi valvular sense aterosclerosi (grup NCAD). En la taula 10 es mostren les característiques clíniques dels pacients usats en l'estudi.

L'anàlisi de les característiques clíniques entre els pacients amb CAD i NCAD, va revelar algunes diferencies significatives. En els pacients amb CAD havia més presencia d'homes (73% vs 44%, p=0,007) i més prevalença de diabetis mellitus (53% vs 22%, p=0,024). Per altra banda els individus NCAD tenien nivells més elevats de HDL (1,0 vs 1,3 mmol/l, p=0,046).

També es van observar diferencies segons els tractaments farmacològics ja que la diferent patologia dels dos grups d'estudi. Els pacients amb CAD van rebre més tractaments amb estatines (73% vs 43%, p=0,007), amb aspirina (70% vs 16%, p<0,001) i amb insulina (9% vs 0%, p=0,033). Per altra banda els pacients amb NCAD van rebre més tractament amb diürètics (34% vs 59%, p=0,029).

No es van observar variacions clíniques entre els pacients amb CAD i NCAD en l'edat (67,0 vs 65,5 anys), l'índex de massa corporal (26,9 vs 27,3 kg/m^2), la hipertensió arterial (64,7 vs 62,5%), la dislipèmia (70,6 vs 46,9%), el consum de tabac (5,9 vs 3,1%) i l'ex-consum de tabac (47 vs 28 %), el colesterol total (4,2 vs 4,9 mmol/l), els nivells de LDL (2,6 vs 3,4 mmol/l) i els nivells de TG (1,7 vs 1,9 mmol/l), entre d'altres variables clíniques.

Per tal de que les dades fossin els més uniformes possibles, es van utilitzar pels diferents estudis mostres de pacients amb igual prevalença de dones i homes (en el cas dels arrays tan sols es van utilitzar homes), no es van usar mostres de pacients obesos i es van descartar els pacients tractats amb estatines i aspirina.

Taula 10. Característiques clíniques dels pacients.

	CAD (n=34)	NCAD (n=50)	Totals (n=84)	Valor de p
Homes, %	73,5	44,0	56,0	0,007
Edat, anys	67,0±1,9	65,5±1,8	66,1±1,3	0,553
Pes, kg	72,5± 1,8	72,9±2,2	72,7±1,5	0,915
Alçada, cm	164,3±1,5	163,3±1,5	163,7±1,1	0,671
IMC, kg/m2	26,9±0,5	27,3±0,7	27,1±0,5	0,680
Pressió arterial sistòlica, mmHg	126,7±6,3	124,4±5,1	125,4±3,9	0,780
Pressió arterial diastòlica, mmHg	69,6±3,7	67,5±3,2	68,4±2,4	0,664
Freqüència cardíaca, lpm	65,6±3,0	75,6±3,8	71,2±2,6	0,059
Hipertensió arterial ,%	64,7	62,5	63,3	0,882
Dislipèmia, %	70,6	46,9	55,1	0,117
Tabac, %	5,9	3,1	4,1	0,651
Ex-tabac, %	47,1	28,1	34,7	0,193
Diabetis mellitus, %	52,6	21,9	33,3	0,024
Colesterol total, mmol/l	4,2±0,4	4,9±1,4	4,6±0,3	0,183
HDL, mmol/l	1,0±0,1	1,3±0,1	1,1±0,1	0,046
LDL, mmol/l	2,6±0,4	3,4±0,6	2,9±0,3	0,210
TG, mmol/l	1,7±0,2	1,9±0,5	1,8±0,3	0,749
Glucosa, mmol/l	5,7±0,4	5,4±0,3	5,5±0,2	0,390
Creatinina, umol/l	95,7±9,4	84,6±5,1	88,7±4,7	0,264
Urea, mmol/l	8,0±0,7	8,9±0,6	8,6±0,5	0,384
Albúmina, mmol/l	42,8±1,3	44,1±1,1	43,5±0,8	0,465
Hemoglobina, g/dl	138,0±4,2	135,2±3,5	136,3±2,7	0,628
Volum corpuscular mitja, fl	88,6±1,2	89,1±0,9	88,9±0,7	0,758
Plaquetes, mm^3	202,8±15,8	207,2±13,1	205,5±10,0	0,835
Volum plaquetari mitja, um^3	8,5±0,2	8,9±0,3	8,7±0,2	0,365
FEVE, %	56,7±3,1	59,7±2,3	58,6±1,8	0,448
IECA, %	39,4	36,7	37,8	0,810
ARA2, %	18,2	18,4	18,3	0,983
Estatines, %	72,7	42,9	54,9	0,007
Aspirina, %	69,7	16,3	37,8	<0,001
Antagonistes del calci, %	25,0	22,4	23,5	0,794
Blocador β-adrenèrgic., %	43,8	38,8	40,7	0,661
Diürètics, %	34,4	59,2	49,4	0,029
AINEs, %	0,0	6,1	3,7	0,151
Corticoides, %	3,0	2,0	2,4	0,779
Antidiabètic oral, %	18,2	10,2	13,4	0,304
Insulina, %	8,8	0,0	3,6	0,033

Variables categòriques presentades en percentatges i variables continues presentades com a mitjana ± SEM. FEVE: Fracció d'ejecció del ventricle esquerre; IECA: Inhibidor de l'enzima conversor de l'angiotensina.; ARA2: Antagonista del receptor de l'angiotensina II; AINE: Antiinflamatori no esteroide.

2. Caracterització del teixit adipós per immunohistoquímica

El TA està compost per adipòcits i altres poblacions cel·lulars presents en el SVF, per tal de caracteritzar els tipus cel·lulars presents en el TA, es va realitzar un anàlisis immunohistoquímic amb diferents marcadors de poblacions cel·lulars. Considerant que el TA pot ser infiltrat per cèl·lules immunes, es va centrar l'estudi en la detecció de poblacions leucocitàries com macròfags (CD68), mastòcits (MCT) i limfòcits, tan limfòcits T (CD3) com limfòcits B (CD20). A més es va mirar la presencia de cèl·lules endotelials (CD31) per poder identificar els vasos sanguinis.

Es van analitzar per immunohistoquímica les diferents poblacions cel·lulars tan en el TAE com en el TAS dels pacients amb CAD i NCAD, per determinar si diferia la composició cel·lular del greix en estadi patològic. Es va realitzar un tinció de contrast amb hematoxilina i eosina per tal d'identificar la totalitat de les cèl·lules presents en el teixit. Els resultats s'expressen com el percentatge de cèl·lules positives respecte el número de cèl·lules totals.

L'anàlisi immunohistoquímic va mostrar un augment del número de macròfags (Figura 14), limfòcits T (Figura 15) i limfòcits B (Figura 16) en el TAE dels pacients amb CAD. Per contra no es van veure diferencies en quant el número de mastòcits (Figura 17) i cèl·lules endotelials(Figura 18) entre pacients amb CAD i NCAD.

2.1. Expressió de CD68 en TA

Es va mirar la presencia de macròfags en el TA amb l'anticòs CD68 (Figura14). Els pacients amb CAD presentaven en el TAE una major quantitat de macròfags que els individus NCAD (39% vs 28%, p=0,024). En canvi, en el TAS no es van observar diferencies en quant a la distribució de macròfags entre els pacients amb CAD i NCAD (25% vs 23%, p=0,386). En els pacients amb CAD, es van detectar més macròfags en el TAE respecte el TAS (39% vs 25%, p<0,001).

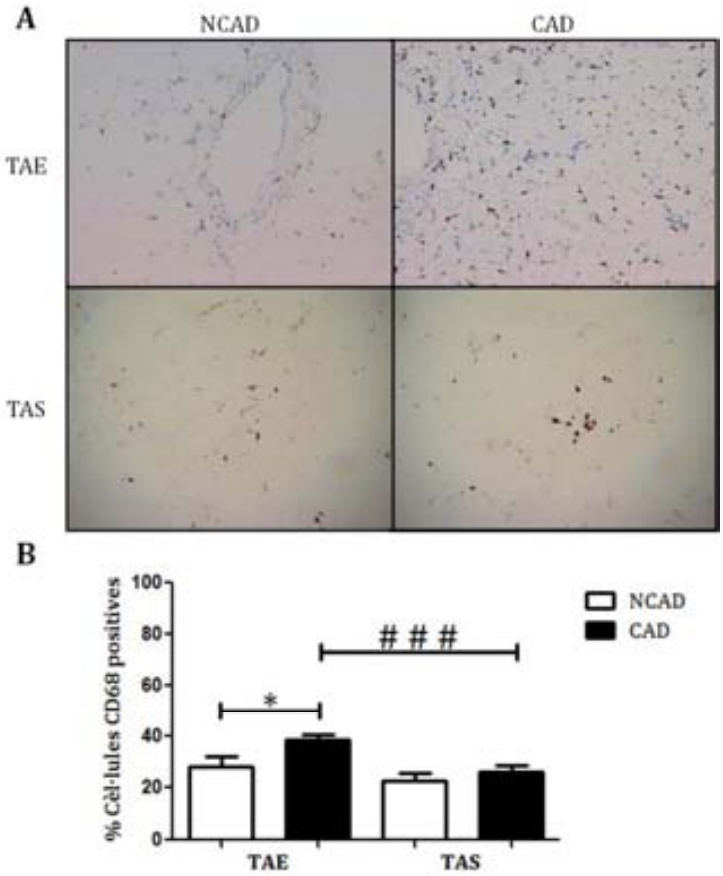

Figura 14. Expressió de CD68 en el TAE i el TAS de pacients amb CAD i NCAD. En la figura A es mostren les imatges representatives obtingudes per immunohistoquímica en els dos tipus de pacients i teixits (ampliació x10). En la figura B es mostren els anàlisis quantitatius, els resultats s'expressen com el percentatge de cèl·lula positives respecte el nombre de cèl·lules total. Les dades representen la mitjana ± SEM de 6 determinacions. (*) estadísticament significatiu CAD vs NCAD p <0,05; (###) estadísticament significatiu TAE vs TAS p <0,001.

2.2. Expressió de CD3 en TA

Es va mirar la presencia de limfòcits T en el TA amb l'anticòs CD3 (Figura15). Es van detectar major nombre de limfòcits T en el TAE dels pacients amb CAD en comparació els pacients NCAD (24% vs 6%, p<0,001). Es va detectar baixa presencia de limfòcits T en el TAS tan de pacients amb CAD com NCAD (4% i 3%, respectivament). En els pacients amb CAD, es van detectar més limfòcits T en el TAE respecte el TAS (26% vs 4%, p<0,001).

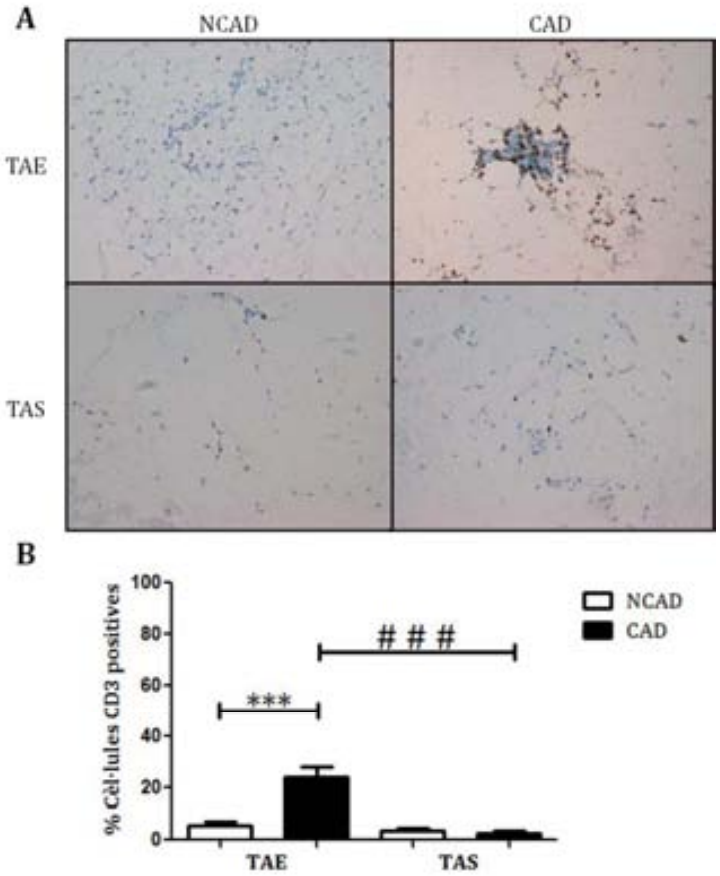

Figura 15. Expressió de CD3 en el TAE i el TAS de pacients amb CAD i NCAD. En la figura A es mostren les imatges representatives obtingudes per immunohistoquímica en els dos tipus de pacients i teixits (ampliació x10). En la figura B es mostren els anàlisis quantitatius, els resultats s'expressen com el percentatge de cèl·lula positives respecte el nombre de cèl·lules total. Les dades representen la mitjana ± SEM de 6 determinacions. (***) estadísticament significatiu CAD vs NCAD p<0,001; (###) estadísticament significatiu TAE vs TAS p <0,001.

2.3. Expressió de CD20 en TA

Es va detectar la presencia de limfòcits B en el TA amb l'anticòs específic contra CD20 present en la membrana d'aquestes cèl·lules (Figura16). Es van detectar limfòcits B exclusivament en el TAE dels pacients amb CAD (12%, p=0,004), no es van poder detectar limfòcits B ni en el TAE d'individus NCAD ni en el TAS en els dos tipus de pacient.

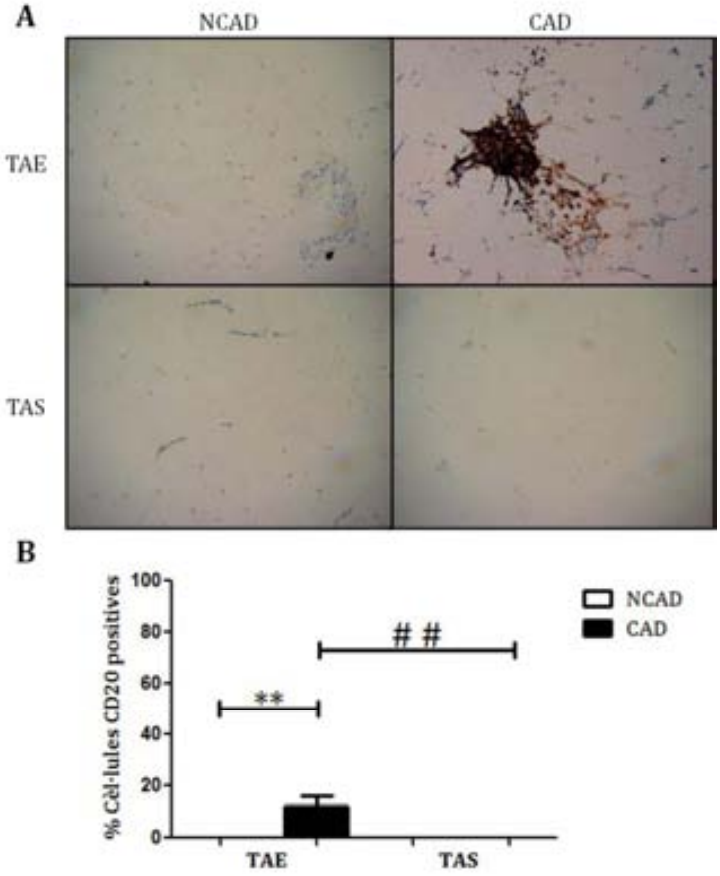

Figura 16. Expressió de CD20 en el TAE i el TAS de pacients amb CAD i NCAD. En la figura A es mostren les imatges representatives obtingudes per immunohistoquímica en els dos tipus de pacients i teixits (ampliació x10). En la figura B es mostren els anàlisis quantitatius, els resultats s'expressen com el percentatge de cèl·lula positives respecte el nombre de cèl·lules total. Les dades representen la mitjana ± SEM de 6 determinacions. (*) estadísticament significatiu CAD vs NCAD p <0,05; (##) estadísticament significatiu TAE vs TAS p <0,01.

2.4. Expressió de *Mast Cell Tryptasa* en TA

Es va analitzar la presencia de mastòcits en el TA mitjançant l'anticòs *Mast Cell Tryptasa* (MCT) que marca la triptasa mastocitaria (Figura17). Es van detectar mastòcits tan en el TAE com en el TAS de pacients amb CAD i NCAD, representant d'un 2% a un 6% de les cèl·lules presents. No es van observar diferencies estadístiques entre el número dels mastòcits entre els dos tipus de pacients i teixits.

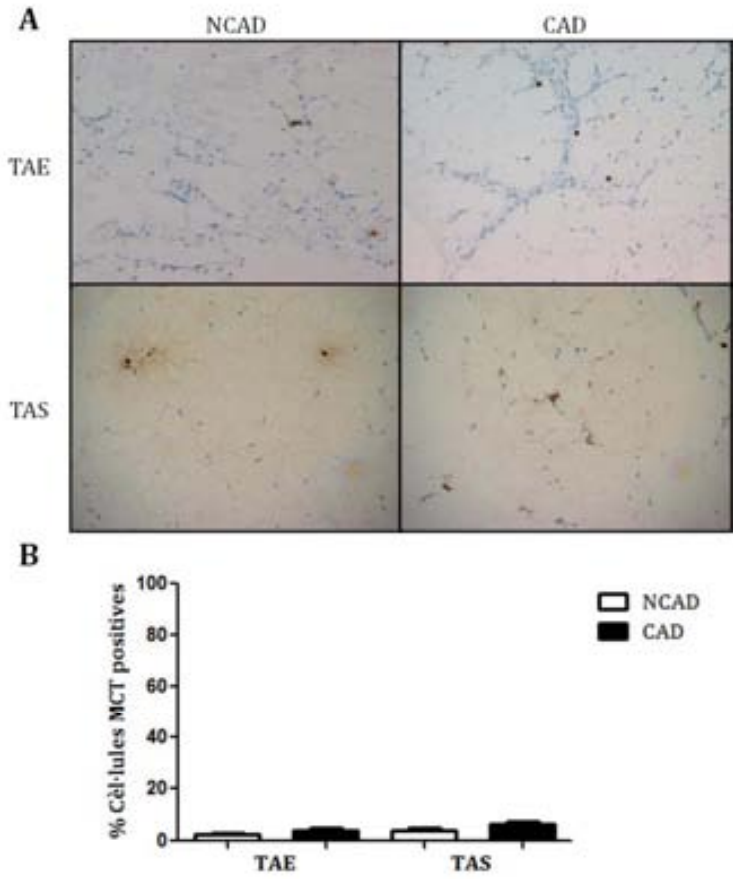

Figura 17. Expressió de MCT en el TAE i el TAS de pacients amb CAD i NCAD. En la figura A es mostren les imatges representatives obtingudes per immunohistoquímica en els dos tipus de pacients i teixits (ampliació x10). En la figura B es mostren els anàlisis quantitatius, els resultats s'expressen com el percentatge de cèl·lula positives respecte el nombre de cèl·lules total. Les dades representen la mitjana ± SEM de 6 determinacions.

2.5. Expressió de CD31 en TA

La tinció del TA amb CD31 indica la presencia de cèl·lules endotelials, que en el TA es troben en la majoria dels casos formant part dels vasos sanguinis o capil·lars que irriguen el teixit (Figura18). Es va detectar alta presencia de cèl·lules endotelials i per tant de vasos sanguinis en el dos tipus de teixits, tan en el TAE com en el TAS dels individus amb CAD i NCAD. No es van trobar diferencies significatives entre pacients ni teixits

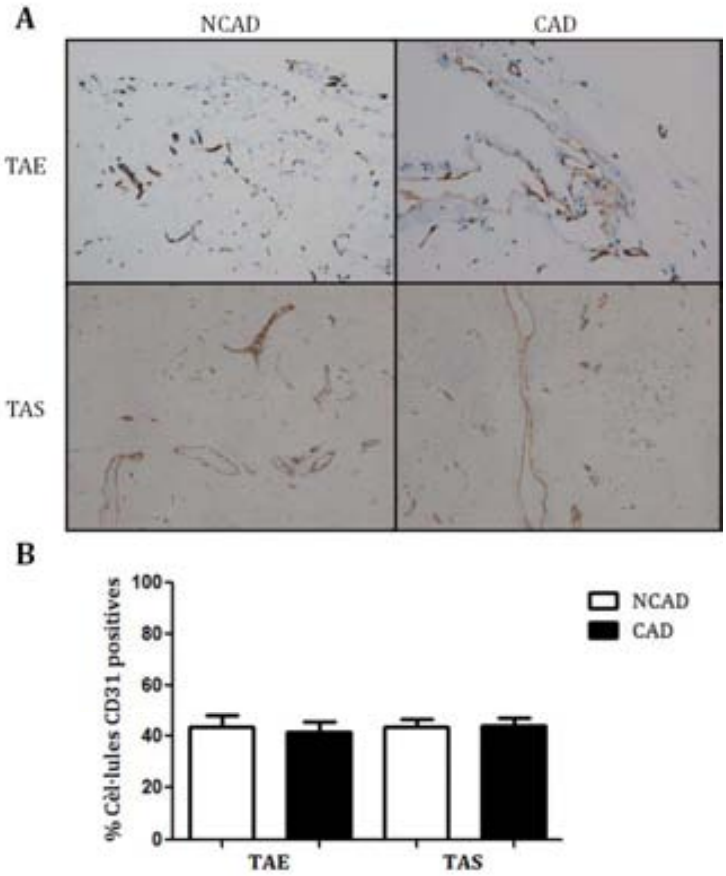

Figura 18. Expressió de CD31 en el TAE i el TAS de pacients amb CAD i NCAD. En la figura A es mostren les imatges representatives obtingudes per immunohistoquímica en els dos tipus de pacients i teixits (ampliació x10). En la figura B es mostren els anàlisis quantitatius, els resultats s'expressen com el percentatge de cèl·lula positives respecte el nombre de cèl·lules total. Les dades representen la mitjana ± SEM de 6 determinacions.

2.6. Infiltrats limfocitaris en el TAE dels pacients amb CAD

En el TAE dels pacients amb CAD es va observar nivells significativament més alts de limfòcits T i B comparat el TAE dels pacients NCAD. A partir de mostres obtingudes amb talls seqüencials, es van poder co-localitzar els dos tipus de poblacions i es va observar que la seva distribució en el TAE era de forma agrupada formant infiltrats. En la Figura 19 es mostren els limfòcits T i B de 6 pacients diferents amb CAD.

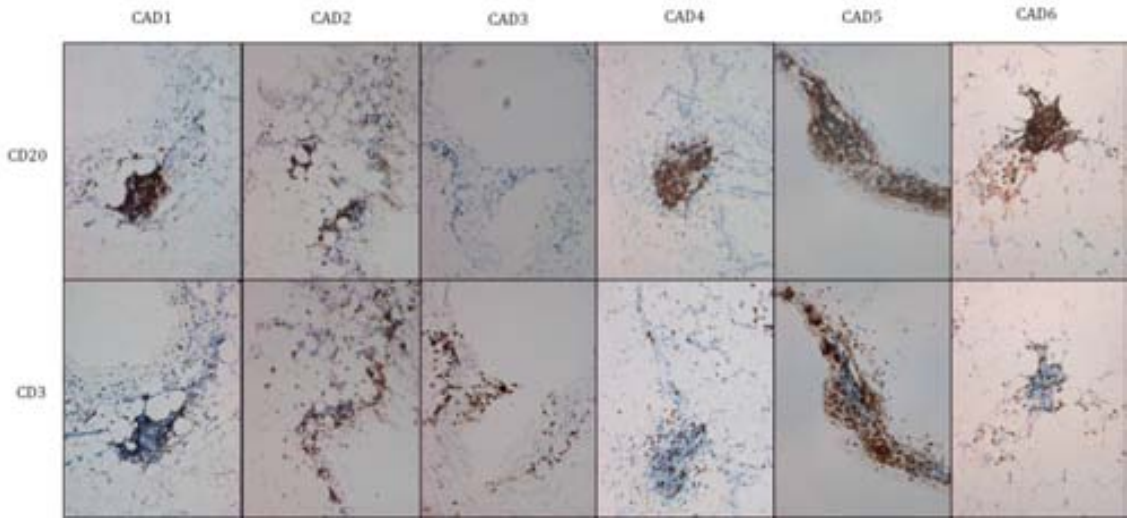

Figura 19. Expressió de CD20 i CD3 en el TAE de pacients amb CAD. Immunohistoquímiques representatives on es mostren limfòcits B i T en el TAE de 6 pacients amb CAD (ampliació x10).

2.7. Relació d'altres tipus cel·lulars amb els infiltrats del TAE dels pacients amb CAD

Es va analitzar la relació dels infiltrats limfocitaris formats per limfòcits T i B amb altres tipus cel·lulars presents en el TA. Per això, es van identificar els macròfags i els mastòcits en relació als infiltrats del TAE dels pacients amb CAD. En la figura 20, es mostra els macròfags que es troben formant part dels infiltrats leucocitaris i els mastòcits que es troben al voltants dels infiltrats.

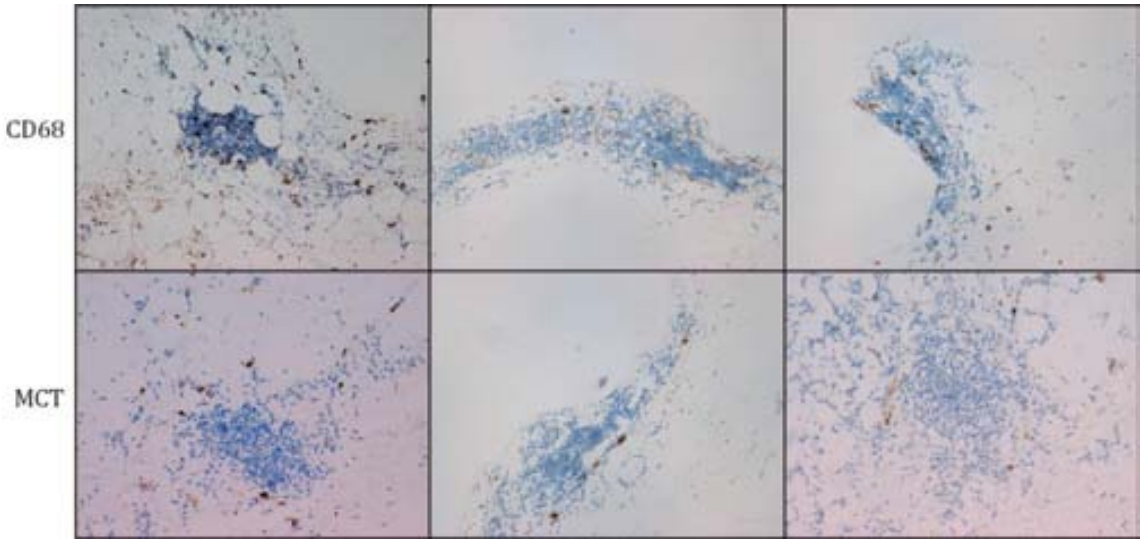

Figura 20. Expressió de CD68 i MCT en el TAE dels pacients amb CAD. Es mostren tres imatges representatives obtingudes per immunohistoquímica (ampliació x10).

2.8. Determinació dels tipus de limfòcits T presents en els infiltrats limfocitaris del TAE dels pacients amb CAD.

Es va realitzar la tinció immunohistoquímica amb anticossos CD4 i CD8 per determinar el subtipus de limfòcits T presents en el TAE dels pacients amb CAD. Es va observar que els infiltrats limfocitaris estan compostos per limfòcits T CD4+ i CD8+ (Figura 21).

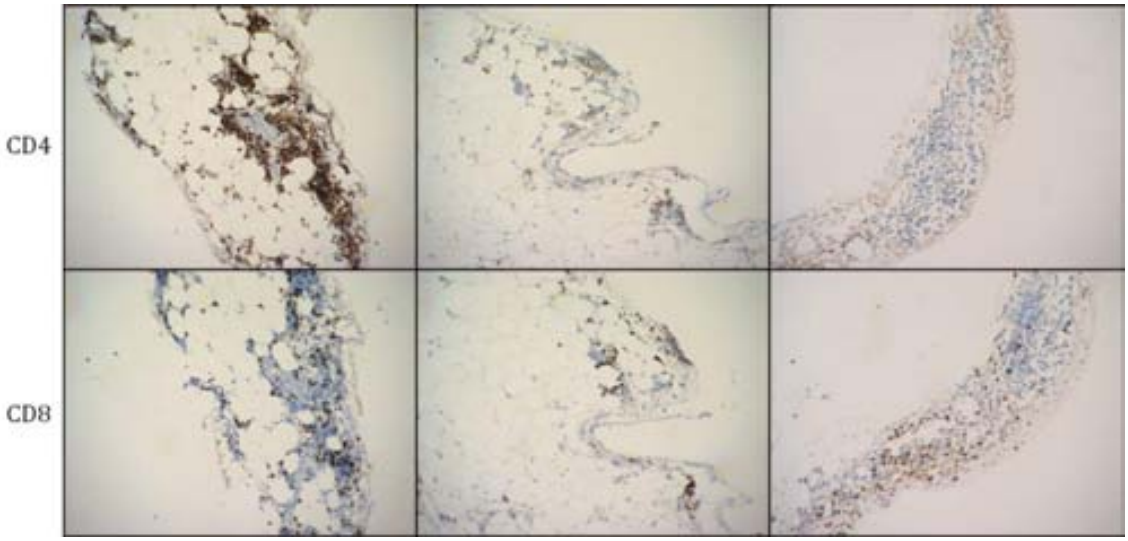

Figura 21. Expressió de CD4 i CD8 en el TAE dels pacients amb CAD. Es mostren tres imatges representatives obtingudes per immunohistoquímica (ampliació x10).

3. Determinació de la secreció d'adipocines i citocines en teixit adipós i en sang total. .

Es va mirar per ELISA la secreció de citocines (MCP-1, IL-10, TNF-α i IL-6) i de adipocines (adiponectina, leptina i resistina) en TA i en sang total. Es van analitzar els nivells secretats de les mostres en condicions basal i després d'estimular-les amb lligands TLR.

3.1. Secreció de factors pel teixit adipós

Es va mirar la secreció d'adipocines i citocines en mostres de TAE i TAS en estat basal i després de cultivar-les amb lligands TLR (LPS i FSL-1) en pacients amb CAD i NCAD.

3.1.1. Secreció de citocines pel TA

L'estimulació del TAE i del TAS amb LPS i FSL-1 va provocar un augment significatiu de la producció de IL-6, IL-10 i MCP-1 en els pacients amb CAD i NCAD. En canvi la producció de TNF-α tan sols es va veure afectada per LPS i no per FSL-1 en els dos tipus de teixit i de pacients (Taula 11).

Taula 11. Valors de les citocines secretades pel TAE i pel TAS després d'estimular-les amb lligands TLR tan en pacients amb CAD com NCAD.

		TAE			TAS		
		BASAL	LPS	FSL-1	BASAL	LPS	FSL-1
IL-6	NCAD	46±19	2281±362***	1088±249**	36±11	918±183***	241±61**
	CAD	136±25	2137±447***	915±233**	73±16	745±205**	245±67*
IL-10	NCAD	0,21±0,11	2,86±0,34***	2,12±0,62**	0,15±0,07	1,74±0,35***	0,81±0,24**
	CAD	0,20±0,06	4,81±0,81***	2,56±0,59**	0,16±0,07	2,48±0,43***	0,90±0,22**
TNF-α	NCAD	1,45±0,18	2,12±0,26**	1,35±0,15	1,01±0,14	1,41±0,18*	0,97±0,13
	CAD	2,13±0,28	3,16±0,40**	1,75±0,24	1,02±0,10	2,21±0,24***	1,09±0,10
MCP-1	NCAD	241±83	1731±261,2***	1383±320,9**	55±14	650±117***	304±59***
	CAD	521±91	1742±187***	1246±207**	101±28	669±144***	471±120**

Cada valor representa la mitjana±SEM pg/mg de 20 determinacions. Estadísticament significatiu: basal vs estimulat (*) p <0,05; (**) p <0,01; (***) p <0,001.

També es van analitzar les diferencies en quant la secreció de citocines entre pacients amb CAD i NCAD en condicions basals i després d'estimular el teixit. La secreció basal de TNF-α, MCP-1 i IL-6 del TAE es va trobar significativament incrementada en els

pacients amb CAD respecte els NCAD (TNF-α, p=0,047; MCP-1, p=0,031 i IL-6 , p=0,013). La secreció basal en el TAE de IL-10 i la secreció basal en el TAS de totes les citocines no va mostrar diferencies significatives entre pacients amb CAD i NCAD (Figura 22).

Després d'estimular el TAE amb LPS es va veure producció significativament més alta en els pacients amb CAD respecte els NCAD de TNF-α (p=0,033) i de IL-10 (p=0,033). La secreció de IL-6 i de MCP-1 no va mostrar diferencies significatives entre pacients després de l'estimulació del TAE i el TAS (Figura 22).

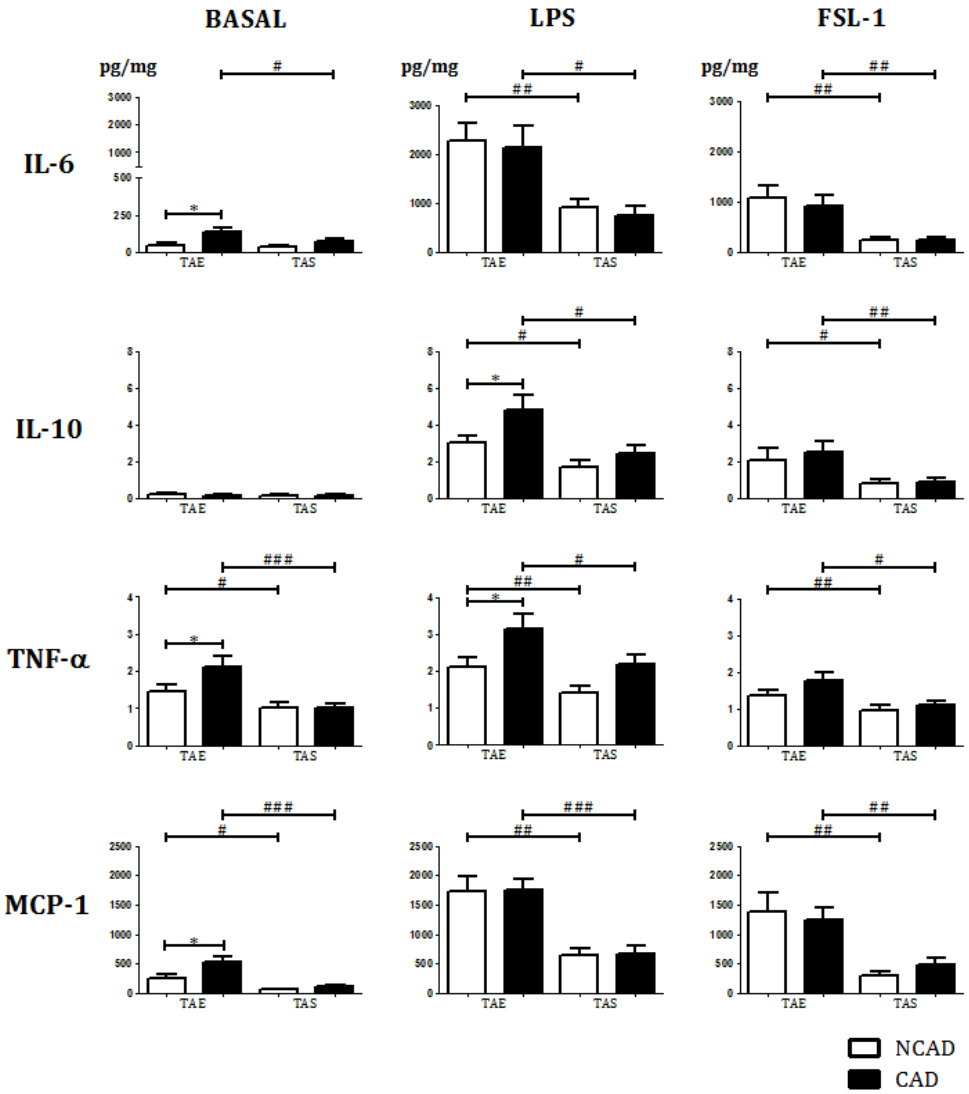

Figura 22. Secreció de citocines en el TAE i el TAS després de l'estimulació amb lligands TLR en pacients amb CAD i NCAD. Cada valor representa la mitjana ± SEM de 20 determinacions. Estadísticament significatiu: NCAD vs CAD (*) p<0,05. Estadísticament significatiu TAE vs TAS (#) p<0,05; (##) p<0,001; (###) p<0,001.

Es van analitzar les diferencies en quant la producció de citocines entre el TAE i el TAS tan a nivell basal com estimulat en els pacients amb CAD i NCAD. A nivell basal es va veure expressió significativament més alta de TNF-α i MCP-1 en el TAE respecte el TAS tan en pacients amb CAD (p= 0,001 i p=0,001 respectivament) i en individus no NCAD (p=0,019 i p=0,025 respectivament). En els pacients amb CAD es va veure producció significativament més alta de IL-6 en el TAE respecte el TAS (p=0,040), aquest efecte que no es va observar en els pacients NCAD (p=0,596) (Figura 22). No es van observar diferencies significatives en quant la producció a nivell basal de IL-10 en el TAE respecte el TAS. Després de l'estimulació amb lligands TLR es va veure producció significativament més alta de totes les citocines en el TAE respecte el TAS tan en els pacients amb CAD com NCAD (Figura 22).

3.1.2. Secreció d'adipocines pel TA

L'efecte de l'estimulació dels lligands TLR en la producció d'adipocines va mostra que l'estimulació del TAE amb LPS i FSL-1 en pacients amb CAD va provocar la disminució significativa de la producció de leptina i adiponectina respecte el seu basal (leptina: p=0,042 i p=0,004 i Adiponectina: p=0,008 i p=0,014 , LPS i FSL-1 respectivament) (Taula 12). Cal apuntar, que en els pacients NCAD també es va veure una disminució en la producció de adiponectina amb LPS i de leptina amb els dos lligands, però no arriba a la significança estadística. En canvi, la resistina no va respondre a cap tipus dels lligands tan en el TAE com en el TAS en els dos tipus de pacients.

Taula 12. Valors de les adipocines secretades pel TAE i el TAS després d'estimular-les amb lligands TLR tan en pacients amb CAD com NCAD.

		TAE			TAS		
		BASAL	LPS	FSL-1	BASAL	LPS	FSL-1
Adiponectina	NCAD	2.040±394	1.818±252	2181±271	1295±177	1234±159	1250±180
	CAD	1.175±116	945±107*	829±94*	848±120	703±105	793±119
Leptina	NCAD	69±13	43±4	49±7	33±4	28±2	30±4
	CAD	41±4	28±4*	31±3**	26±3	26±3	29±4
Resistina	NCAD	15±3	20±5	16±3	23±5	24±5	22±6
	CAD	9±2	10±3	9±2	17±4	16±4	16±3

Cada valor representa la mitjana±SEM pg/mg de 20 determinacions. Estadísticament significatiu: basal vs estimulat (*) p <0,05; (**) p <0,01.

Es van analitzar les diferencies entre la producció de adipocines entre els pacients amb CAD i NCAD (Figura 23). L'adiponectina es va trobar significativament disminuïda en els pacients amb CAD respecte els NCAD tan en el TAE com en el TAS en les tres condicions experimentals (Basal p=0,023 i p=0,038 ; LPS p=0,002 i p=0,007; FSL-1 p<0,001 i p=0,004; en TAE i TAS respectivament). La leptina es va trobar significativament més baixa en el TAE dels pacients amb CAD respecte els NCAD també en les tres condicions experimentals (Basal p=0,026; LPS p=0,017 i FSL-1 p=0,037). Per altra banda, la resistina no va mostrar diferencies significatives entre els pacients amb CAD i NCAD.

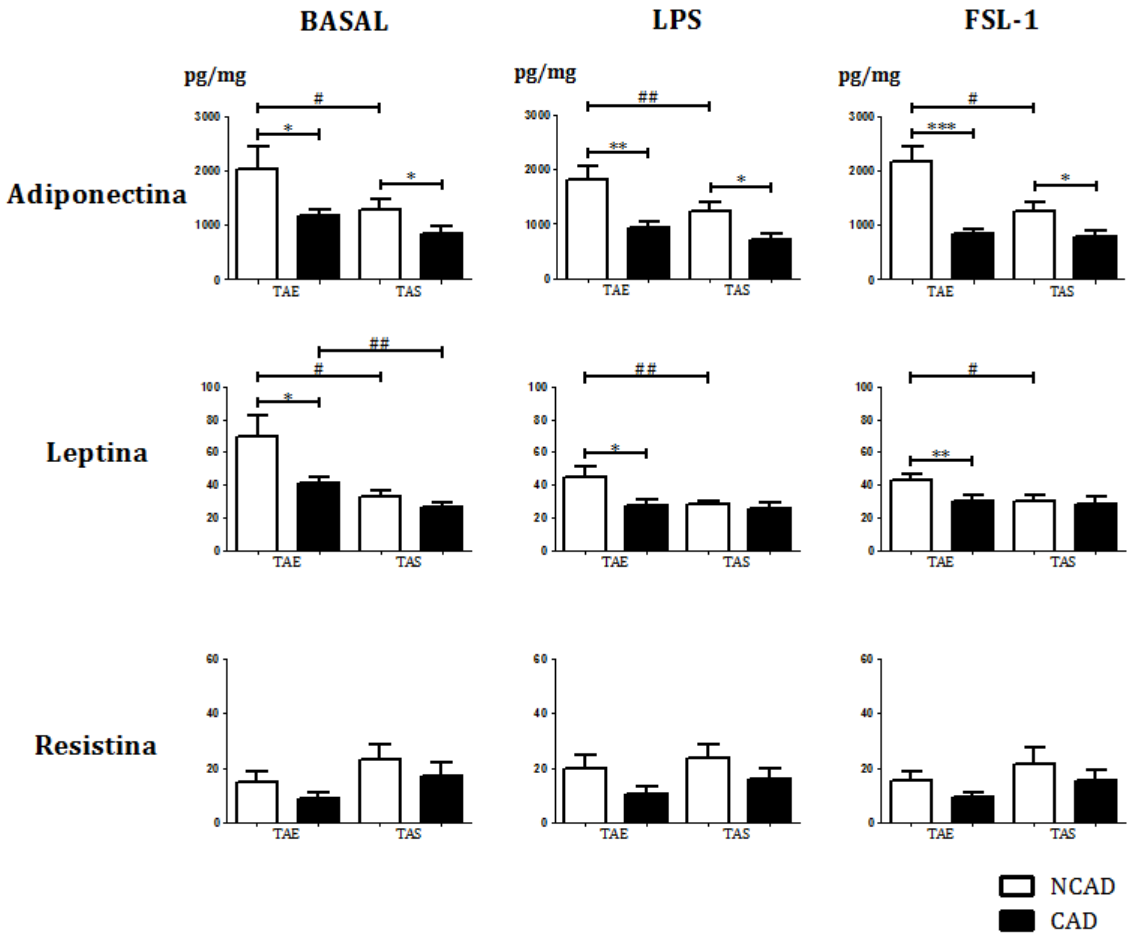

Figura 23. Secreció de adipocines en el TAE i el TAS després de l'estimulació amb lligands TLR en pacients amb CAD i NCAD. Cada valor representa la mitjana ±SEM de 20 determinacions. Estadísticament significatiu: NCAD vs CAD (*) p<0,05; (**) p<0,01; (***) p<0,001. Estadísticament significatiu: TAE vs TAS (#) p<0,05; (##) p<0,001. I

Es va mirar la secreció diferencial de adipocines entre els dos tipus de TA (Figura 23). Els individus amb NCAD van mostrar més secreció d'adiponectina i leptina en el TAE comparat amb el TAS en les tres condicions experimentals (Basal p=0,034 i p=0,025 ; LPS p=0,008 i p= 0,009 i FSL-1 p=0,012 i p=0,007 d'adiponectina i de leptina respectivament). En canvi els pacients amb CAD sols es va observar més expressió de leptina en el TAE respecte el TAS en la condició basal (p=0,003), ja que després de l'estimulació amb LPS i FSL-1, aquest efecte ja no es va observar (p= 0,433 i p=0,518 respectivament). Els pacients amb CAD no van mostrar diferencies estadístiques entre l'expressió d'adiponectina en el TAE respecte el TAS. La producció de resistina no va mostrar diferencies significatives entre la seva expressió en el TAE respecte el TAS en els dos tipus de pacients.

3.2. Secreció de factors per cèl·lules de sang perifèrica

Es va mirar la secreció d'adipocines i citocines en mostres de sang perifèrica després de cultivar-les amb lligands TLR (LPS, FSL-1 i PAM) en pacients amb CAD i NCAD. Ja que el volum de sang obtingut dels pacients en contrast amb la mostra més limitada de TA va permetre fer l'anàlisi amb un altre lligand addicional (PAM).

3.2.1. Secreció de citocines per cèl·lules de sang perifèrica

En les mostres de sang total es va veure nivells basals alts de MCP-1 però nivells basals baixos de IL-6, TNF-α i IL-10 tan en els pacients amb CAD com NCAD (Figura 24). Després de l'estimulació amb els tres lligands TLR es va veure un augment significatiu de la producció de totes les citocines tan en els pacients amb CAD com NCAD. L'estimulació amb LPS va afectar molt més a la producció de la IL-6 i TNF-α en comparació a l'efecte de la resta dels lligands sobre aquestes citocines (Taula 13).

No es van veure diferencies significatives entre la secreció de citocines en sang total entre pacients amb CAD i NCAD en condicions basal ni després de ser estimulades amb els tres lligands TLR (Figura 24).

Taula 13. Valors de les citocines secretades per cèl·lules de sang perifèrica després d'estimular-les amb lligands TLR tan en pacients amb CAD com NCAD.

		BASAL	LPS	FSL-1	PAM
IL-6	NCAD	212±12	18.543±2.450***	1.949±702*	4.027±1.565*
	CAD	287±39	24.437±2.437***	3.547±973**	7.046±2.226*
IL-10	NCAD	7±1	414±53***	34±10***	33±10*
	CAD	10±3	466±46***	20±5***	47±14***
TNF-α	NCAD	34±31	342±54***	224±45*	214±61*
	CAD	17±10	394±41***	303±37*	253±49*
MCP-1	NCAD	1.432±631	3.829±482*	4.796±653**	4.265±1.068*
	CAD	1.219±390	3.796±384***	5.400±296***	4.462±445***

Cada valor representa la mitjana ± SEM pg/mg de 20 determinacions. Estadísticament significatiu: basal vs estimulat (*) p <0,05; (**) p <0,01; (***) p <0,001.

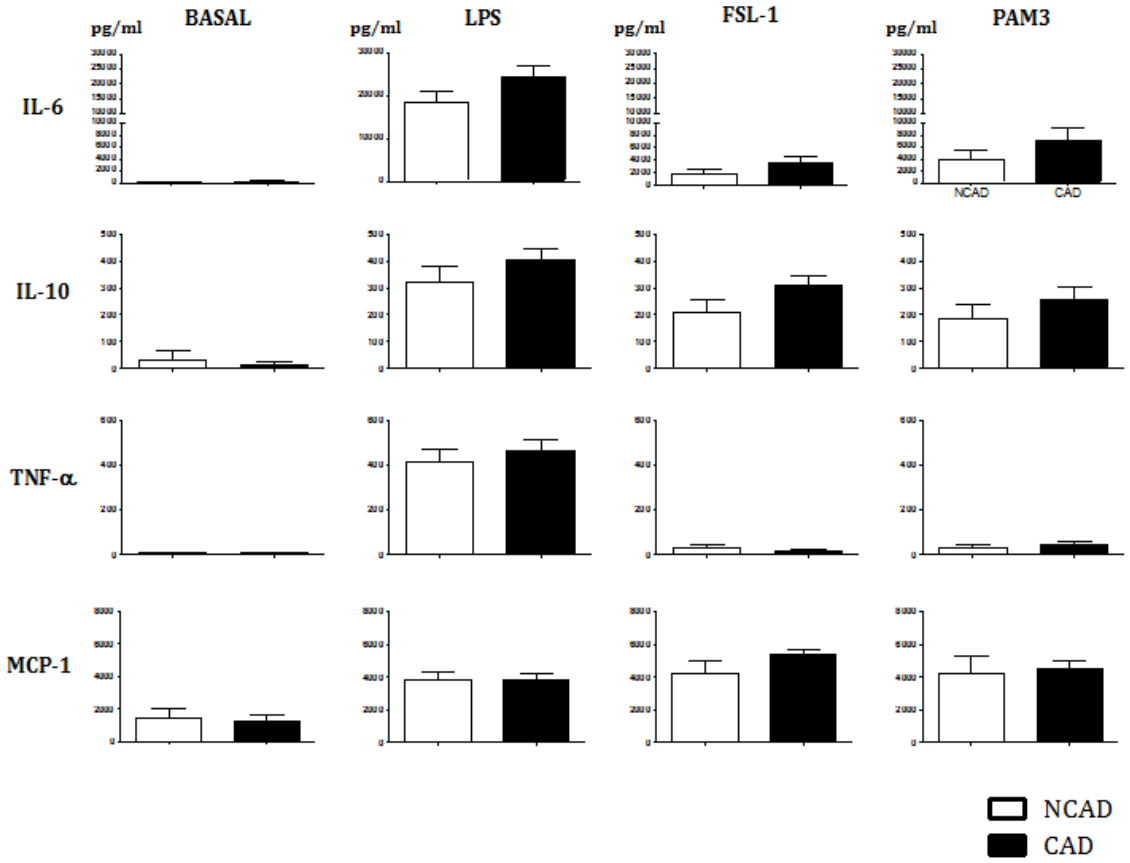

Figura 24. Secreció de citocines per cèl·lules de sang perifèrica després de l'estimulació amb lligands TLR en pacients amb CAD i NCAD. Cada valor representa la mitjana ±SEM de 20 determinacions.

3.2.2. Secreció de adipocines per cèl·lules de sang perifèrica

L'estimulació amb lligands TLR no va afectar a la producció d'adiponectina ni leptina, però en canvi si que va afectar a la producció de resistina. Concretament, es va veure

increment significatiu de l'expressió de resistina després de l'estimulació amb LPS en els individus NCAD (p=0,042) (Taula 14).

Taula 14. Valors de les adipocines secretades per cèl·lules de sang perifèrica després d'estimular-les amb lligands TLR tan en pacients amb CAD com NCAD.

		BASAL	LPS	FSL-1	PAM
Adiponectina	NCAD	2.648.265±227.623	2.498.989±264.666	2.504.835±254.082	2.432.061±240.226
	CAD	1.432.974±196.008	1.235.680±166.999	1.238.969±178.527	1.279.166±197.856
Leptina	NCAD	6.590±970	6.029±1.012	5.969±1.006	6.541±1.211
	CAD	4.733±853	4.401±784	4.302±784	3.903±721
Resistina	NCAD	8.519±2.015	13.444±3.836*	8.494±2.249	8.146±2.173
	CAD	19.028±4.104	16.650±3.161	16.772±3125	18.501±4.286

Cada valor representa la mitjana ±SEM pg/mg de 20 determinacions. Estadísticament significatiu: basal vs estimulat (*) p <0,05; (**) p <0,01; (***) p <0,001.

Els pacients amb CAD van secretar quantitats significativament menors d'adiponectina en comparació els individus NCAD en les quatre condicions experimentals (Basal p=0,001; LPS p=0,001; FSL-1 p=0,001 i PAM p=0,003). Els nivells de resistina van ser significativament més elevats en els pacients amb CAD comparat amb els individus NCAD en totes les condicions experimentals, menys per la estimulada amb LPS, on la diferencia no va a arribar a la significança estadística (Basal p=0,029; LPS p= 0,524; FSL-1 p=0,040; PAM3 p=0,039) (Figura 25).

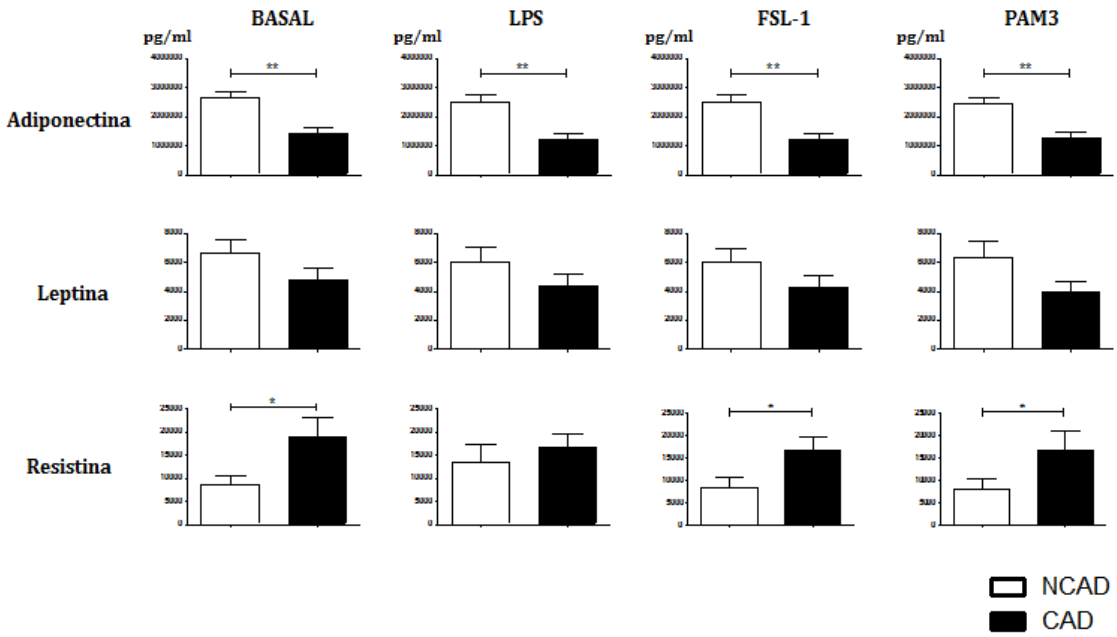

Figura 25. Secreció de adipocines per cèl·lules de sang perifèrica després de l'estimulació amb lligands TLR en pacients amb CAD i NCAD. Cada valor representa la mitjana ±SEM de 20 determinacions. Estadísticament significatiu: NCAD vs CAD (*) p<0,05; (**) p<0,01.

4. Expressió i activació dels STATs en el teixit adipós

Es va analitzar per Western Blot els nivells d'expressió (STATs totals) i d'activació (STATs fosforilats) de diferents STATs (STAT1, STAT3 i STAT5) en les mostres de TAE i de TAS de pacients amb CAD i NCAD en condicions basals i després de ser estimulades amb lligands TLRs (Figura 26, 27, 28).

4.1. Expressió i activació de STAT1 en teixit adipós

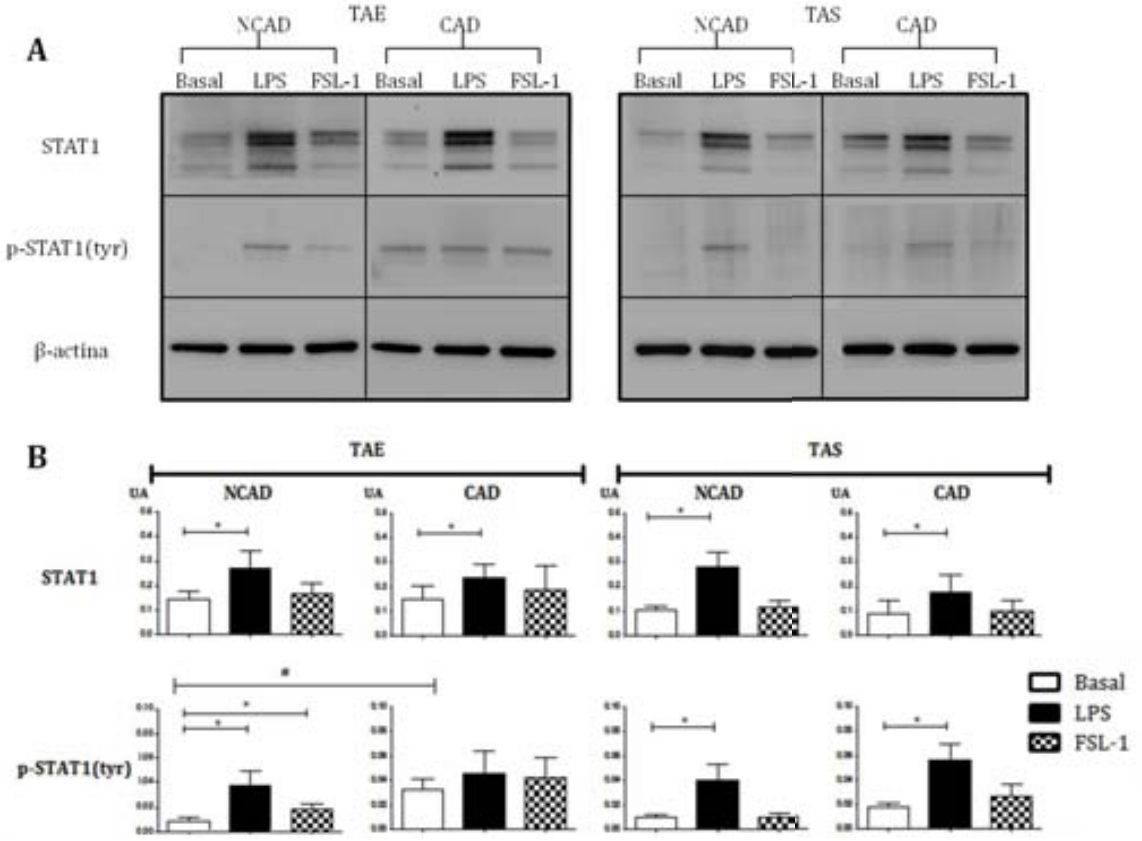

Figura 26. Expressió de STAT1 total i STAT1 fosforilats en el TAE i el TAS de pacients amb CAD i NCAD en estat basal i després de l'estimulació am LPS i FSL-1. La figura A mostra un Western Blot representatiu dels diferents experiments realitzats. En la figura B es mostren els anàlisis quantitatius de les senyals obtingudes per Western Blot. Les dades representen la mitjana ± SEM de 12 determinacions. (*) estadísticament significatiu basal vs estimulat $p<0,05$; (#)estadísticament significatiu CAD vs NCAD $p<0,05$.

L'estimulació del TA amb LPS va provocar un augment significatiu de l'expressió de STAT1 total en el TAE i el TAS de pacients amb CAD i NCAD (TAE: p=0,047 i p=0,037; TAS: p=0,032 i p=0,018; pacients amb CAD i NCAD respectivament). En canvi,

l'estimulació amb FSL-1 no va afectar als nivells de STAT1 total en els dos tipus de teixit i pacients. No es van observar diferencies en quant a l'expressió de STAT1 total entre els pacients amb CAD i NCAD (Figura 26).

En quant a l'activació de STAT1, és a dir la seva fosforilació, es va veure que els nivells de p-STAT1(tyr) basals van ser significativament més elevats en el TAE dels pacients amb CAD comparat amb els individus NCAD (p=0,037). Després de l'estimulació amb LPS i FSL-1 es va veure un augment de p-STAT1(tyr) en el TAE dels individus NCAD (p=0,037 i p=0,015, amb LPS i FSL-1 respectivament) i en els pacients amb CAD encara que no arribi a la significança estadística. En el cas del TAS, es va veure que el LPS va provocar un augment de p-STAT1(tyr), tan en els pacients amb CAD com NCAD (p=0,032 i p=0,020) (Figura 26).

4.2. Expressió i activació de STAT3 en teixit adipós

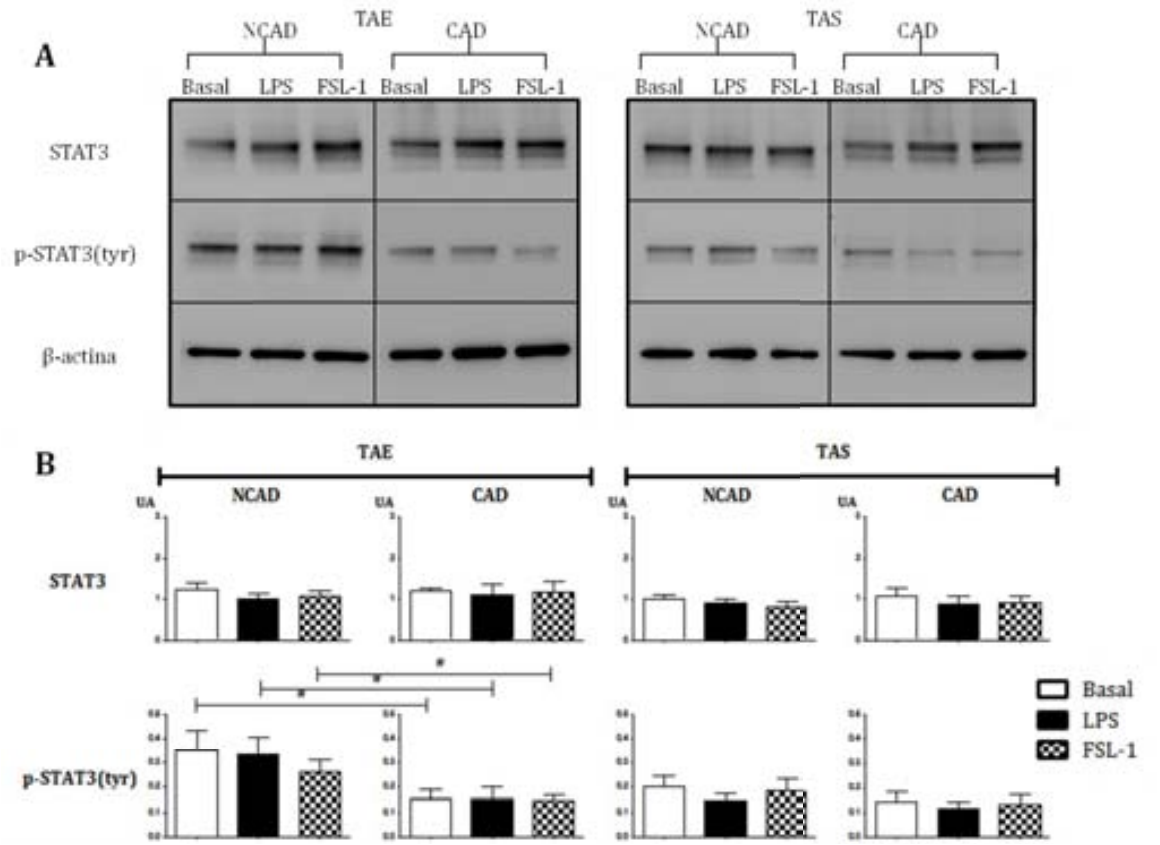

Figura 27. Expressió de STAT3 total i STAT3 fosforilats en el TAE i el TAS de pacients amb CAD i NCAD en estat basal i després de l'estimulació am LPS i FSL-1. La figura A mostra un Western Blot representatiu dels diferents experiments realitzats. En la figura B es mostren els anàlisis quantitatius de les senyals obtingudes per Western Blot. Les dades representen la mitjana ± SEM de 12 determinacions. (#)estadísticament significatiu CAD vs NCAD p<0,05.

L'estimulació amb els dos lligands TLR no va mostrar cap efecte en els nivells de STAT3 total i p-STAT3(tyr) tant en els dos tipus de teixit com de pacients. No es van observar diferencies significatives en quant els nivells de STAT3 total entre el TAE i el TAS ni entre els pacients amb CAD i NCAD. En canvi, els nivells de p-STAT3(tyr) en el TAE es van trobar més elevats en els pacients amb NCAD respecte els CAD en les tres condicions experimentals (Basal p=0,049; LPS p=0,038 i FSL-1 p=0,040) (Figura 27).

4.3. Expressió i activació de STAT5 en teixit adipós

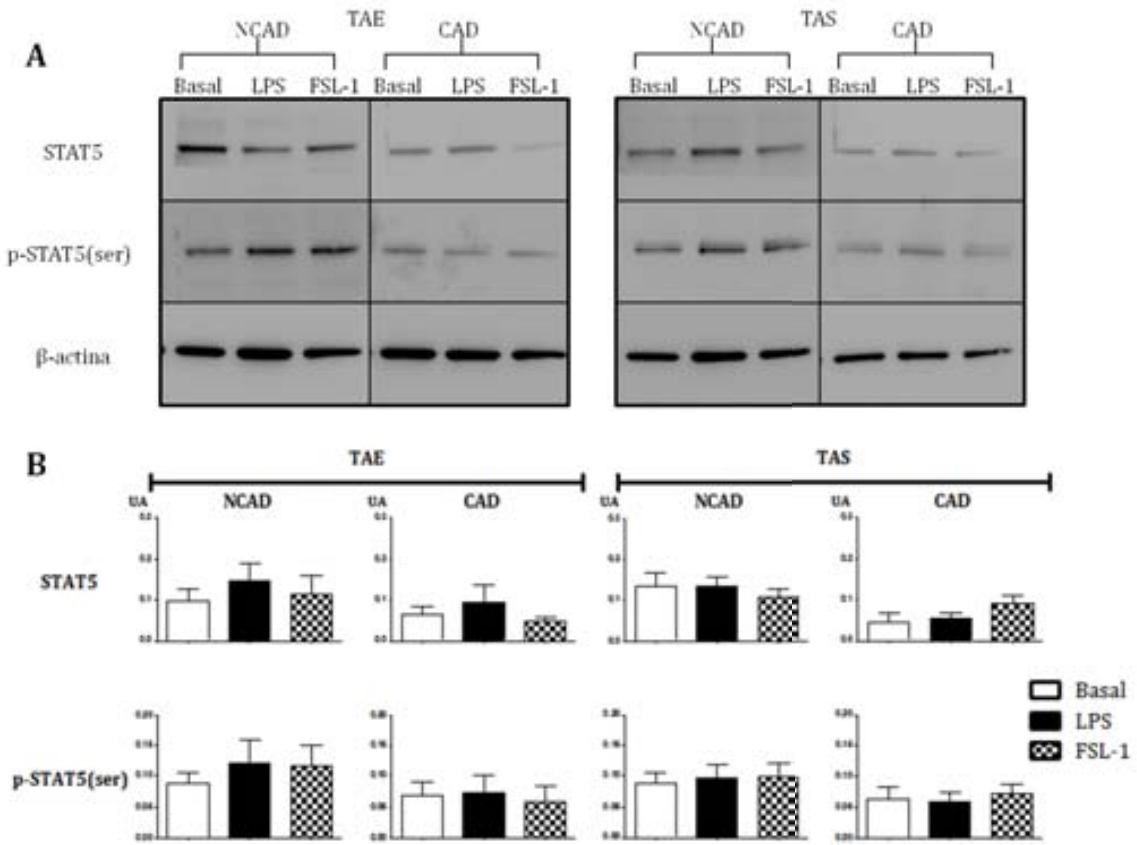

Figura 28. Expressió de STAT5 total i STAT5 fosforilats en el TAE i el TAS de pacients amb CAD i NCAD en estat basal i després de l'estimulació am LPS i FSL-1. La figura A mostra un Western Blot representatiu dels diferents experiments realitzats. En la figura B es mostren els anàlisis quantitatius de les senyals obtingudes per Western Blot. Les dades representen la mitjana ± SEM de 12 determinacions.

L'estimulació amb els dos lligands TLR no va mostrar cap efecte en els nivells de STAT5 total i p-STAT5(tyr) tant en els dos tipus de teixit com de pacients. Tot i que no arriba a la significança estadística, veiem una tendència a una menor expressió de

STAT5 total i p-STAT5(tyr) en els pacients amb CAD en contrast els NCAD tant en el TAE com en el TAS (Figura 28).

4.4. Expressió de STATs en el TAE per immunohistoquímica.

Es va mirar per immunohistoquímica la fosforilació de STAT1 i STAT3 en el TAE dels pacients amb CAD i NCAD, per tal de determinar si existeix algun tipus de relació entre els infiltrats presents en els pacients amb CAD i l'expressió diferencial en els nivells de fosforilació dels STATs detectats per Western Blot.

4.4.1.1. Expressió de STAT1

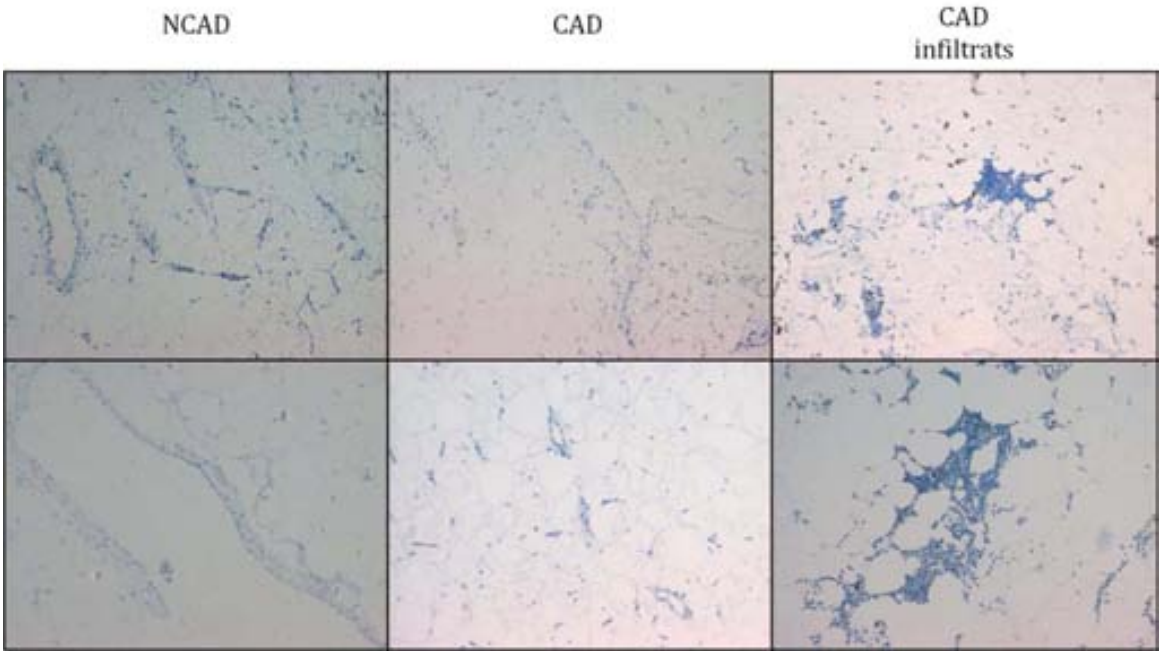

Figura 29. Expressió de p-STAT1(tyr) en el TAE dels pacients amb CAD i NCAD. Es mostren dos imatges representatives obtingudes per immunohistoquímica corresponents al TAE d'individus NCAD i al TAE de pacients amb CAD, en zones amb o sense infiltrats cel·lulars (ampliació x10).

En els anàlisis immunohistoquímics es va detectar expressió de p-STAT1(tyr) en cèl·lules dels infiltrats presents en el TAE dels pacients amb CAD, en canvi, no es va detectar expressió de p-STAT1(tyr) en el TAE dels individus NCAD ni en el TAE dels pacients amb CAD on no van ser presents els infiltrats. És a dir, en condicions basals

el TAE no expressa p-STAT1(tyr) a excepció de les cèl·lules que componen els infiltrats (Figura 29).

4.4.1.2. Expressió de STAT3

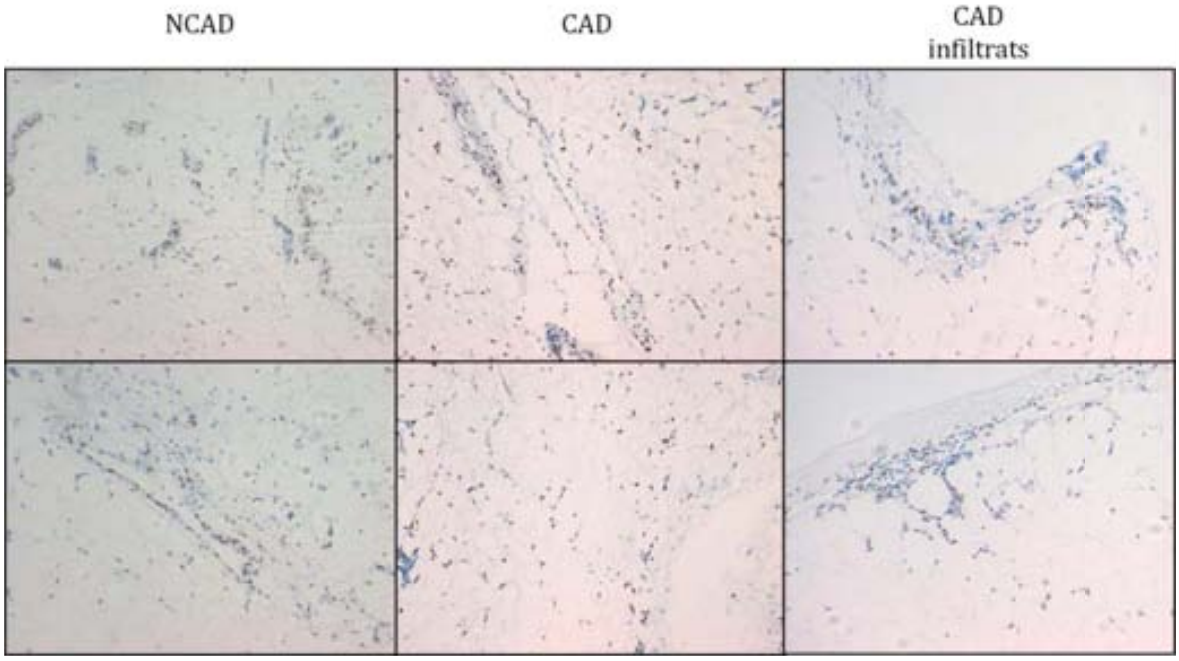

Figura 30. Expressió de p-STAT3(tyr) en el TAE dels pacients amb CAD i NCAD. Es mostren dos imatges representatives obtingudes per immunohistoquímica corresponents al TAE d'individus NCAD i al TAE de pacients amb CAD, en zones amb o sense infiltrats cel·lulars (ampliació x10).

Quan es va analitzar l'expressió de p-STAT3(tyr) en el TAE, es va observar que nombroses cèl·lules del teixit expressen p-STAT3(tyr), en els pacients amb CAD i NCAD. En canvi quan es va mirar els nivells d'expressió de p-STAT3(tyr) en els infiltrats es va veure que l'expressió de p-STAT3(tyr) era tan sols a algunes cèl·lules dels infiltrats, amb una expressió relativament més baixa en relació al número més alt de cel·les presents en els infiltrats (Figura 30).

5. Expressió gènica en teixit adipós

Es va analitzar l'expressió gènica del TAE i del TAS amb arrays de Affimetrix en els pacients amb CAD i NCAD en condicions basals i després de estimular-les amb els dos lligands TLR (LPS i FSL-1). Considerant l'alt número de condicions en l'estudi, es va realitzar l'anàlisi estadístic en tres passos, primer es va mirar les diferencies entre els depòsits de greix (TAE/TAS), seguidament es van analitzar les diferencies entre pacients (CAD/NCAD) i per l'últim l'efecte de l'estimulació (BASAL/LPS-FSL-1).

En el annex 1 es troben el llistat complet dels símbols dels gens utilitzats al llarg de l'anàlisi de tots els resultats junt al número de identificació d'*Affimetrix*, el nom complet del gen i la citobanda cromosòmica corresponent.

5.1. Expressió gènica diferencial entre dipòsits de greix (TAE i TAS).

Es va comparar l'expressió gènica del TAE respecte el TAS (TAE/TAS) en condicions basals, tan en els pacients amb CAD com en individus NCAD. El diagrama de Venn (Figura 31) mostra el número de gens diferencialment expressats entre el TAE i el TAS en pacients amb CAD i NCAD.

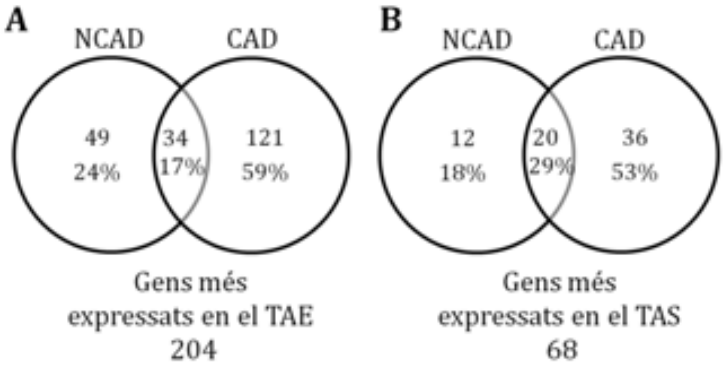

Figura 31: Diagrama de Venn on es mostren els gens diferencialment expressats entre el TAE i el TAS en els pacients amb CAD i NCAD. El diagrama de l'esquerra mostra els gens més expressats en el TAE en comparació el TAS i el diagrama de la dreta mostra els gens més expressats en el TAS comparat el TAE.

L'anàlisi comparatiu va mostrar un total de 272 gens diferentment expressats entre el TAE (204 gens més expressats en el TAE) i el TAS (68 gens més expressats en el TAS). Del total de gens més expressats en el TAE, un 17% dels gens van ser comuns entre

els pacients amb CAD i NCAD, un 24% específics dels individus NCAD i un 59% específics dels pacients amb CAD. Per altra banda, del total de gens amb major expressió en el TAS, un 29% dels gens van ser comuns entre els pacients amb CAD i NCAD, un 18% específics dels individus NCAD i un 53% específics dels pacients amb CAD. Es va observar que la proporció de gens específics diferentment expressats entre el TAE i el TAS és major en els pacients amb CAD.

5.1.1. Classificació funcional dels gens diferencialment expressats entre el TAE i el TAS

Es va realitzar la classificació funcional dels gens segons la seva expressió diferencial entre el TAE i el TAS i les diferencies d'expressió entre els pacients amb CAD i NCAD. Es van analitzar per separat els gens més expressats en el TAE respecte el TAS comuns entre els pacients amb CAD i NCAD, específics en els pacients amb CAD i específics en els individus NCAD. El mateix procediment es va seguir en els gens més expressats en el TAS respecte el TAE.

5.1.1.1. Classificació funcional dels gens més expressats en el TAE.

Es van analitzar funcionalment els 34 gens més expressats en TAE comuns entre pacients amb CAD i NCAD, el 21% dels gens estaven implicats en immunitat i defensa (CCL18, IL-18, CXADR, GPX8, CYSLTR2,...), el 12% en metabolisme dels carbohidrats (ADH4, CHI3L1, CHI3L2 i LOC339524) i el 6% en immunitat per complement (C7 i CFI), entre d'altres (Taula 15).

Taula 15. Classificació funcional dels gens més expressats en TAE comuns en els pacients amb CAD i NCAD

Categoria	Gens	%	Valor de P
Immunitat i defensa	7	20,6	0,023
Metabolisme de polisacàrids altres	3	8,8	0,023
Metabolisme de carbohidrats	4	11,8	0,079
Immunitat per complement	2	5,9	0,097

Dels 121 gens més expressats en el TAE respecte el TAS exclusivament en els pacients amb CAD, un 18% dels gens estaven implicats en immunitat i defensa (CD200, CD3D, CD48, FCER1G, ANXA8L1, F2RL1, C2, C3AR1, C4A, GZMK, HPR, HGF, LY96, MRC1, MARCH1, PXDNL, PTGS1,...), un 8% en adhesió cel·lular (CDH2, CDH6, DSC3, MSLN, PSG7, SPP1, SSX2IP, TSPAN5 i VCAM1) i un 4% en immunitat per citocines i quimiocines (CCL3L1, CCL4, CCL7, IL-13RA2 i TLR2), entre d'altres (Taula 16).

Taula 16. Classificació funcional dels gens més expressats en el TAE en els pacients amb CAD.

Categoria funcional	Gens	%	Valor de P
Immunitat i defensa	21	17,9	<0,001
Transducció de senyals	38	32,5	<0,001
Receptor de superfície cel·lular per transducció de senyals	22	18,8	0,001
Comunicació cel·lular	17	14,5	0,003
Senyalització per adhesió cel·lular	8	6,8	0,009
Senyalització per lligands	8	6,8	0,014
Adhesió cel·lular	9	7,7	0,034
Immunitat per citocines i quimiocines	4	3,4	0,040
Via de senyalització per citocines i quimiocines	5	4,3	0,068
Circulació sanguínia i intercanvi de gasos	2	1,7	0,095

Dels 49 gens més expressats en el TAE exclusivament en individus NCAD, un 14% dels gens estaven implicats en el metabolisme dels lípids, àcids grassos i esteroides, (CYP1B1, PTGDS, SREBF1, PLTP, ...), un 10% en desenvolupament del mesoderm (EDIL3, FGF1, LTBP1, MGP i SEMA3D) i un 8% en transport de lípids i àcids grassos (ABCA6, ABCA9, APOC1,...), entre d'altres (Taula 17).

Taula 17. Classificació funcional dels gens més expressats en TAE en els individus NCAD.

Categoria funcional	Gens	%	Valor de P
Comunicació cel·lular	10	20,4	0,008
Transport	10	20,4	0,013
Metabolisme dels lípids, àcids grassos i esteroides	7	14,3	0,025
Senyalització per lligands	6	12,2	0,008
Desenvolupament del mesoderm	5	10,2	0,088
Transport de lípids i àcids grassos	4	8,2	0,006
Angiogènesi	3	6,1	0,012

5.1.1.2. Classificació funcional dels gens més expressats en el TAS.

Es van analitzar funcionalment els 20 gens més expressats en el TAS en els pacients amb CAD i NCAD, el 21% dels gens estaven implicats en desenvolupament de l'ectoderm (HOXA5, HOXA6, HOXA7 i HOXA9), entre d'altres (Taula 18).

Taula 18. Classificació funcional dels gens més expressats en el TAS en els pacients amb CAD i NCAD

Categoria funcional	Gens	%	Valor de P
Especificació segmental	3	15,8	0,004
Neurogènesis	4	21,1	0,014
Desenvolupament de l'ectoderm	4	21,1	0,020
Regulació de la transcripció de mRNA	5	26,3	0,032
Transcripció de mRNA	5	26,3	0,072

Dels 36 gens més expressats en el TAS exclusivament en els pacients amb CAD, un 28% dels gens estaven implicats en processos de desenvolupament (AMOTL2, COL12A1, HOXC8, LMOD1,MAB21L1, PAX3, TNC, ...) i un 11% en senyalització per adhesió cel·lular (NOTCH3, CLSTN2, NCAM1 i SEMA3G), entre d'altres (Taula 19).

Taula 19. Classificació funcional dels gens més expressats en TAS en els pacients amb CAD.

Categoria funcional	Gens	%	Valor de P
Neurogènesis	6	16,7	0,002
Processos de desenvolupament	10	27,8	0,004
Desenvolupament de l'ectoderm	6	16,7	0,004
Senyalització per adhesió cel·lular	4	11,1	0,023
Comunicació cel·lular	6	16,7	0,040
Activitats neuronals	4	11,1	0,064

Dels 12 gens més expressats en el TAS exclusivament en els individus NCAD, un 33% estaven implicats en processos de desenvolupament (HOXC9, NRCAM i RBP7 i TCP11L2), entre d'altres (Taula 20).

Taula 20. Classificació funcional dels gens més expressats en el TAS en els individus NCAD

Categoria funcional	Gens	%	Valor de P
Desenvolupament de l'ectoderm	3	25	0,046
Processos de desenvolupament	4	33,3	0,083

5.2. Expressió gènica diferencial entre els pacients amb CAD i NCAD.

Es van analitzar els gens diferencialment expressats entre pacients amb CAD i NCAD, es va mirar aquest efecte diferencial per separat tan en el TAE com en el TAS, per la visualització dels gens obtinguts es van representar en un mapa de calor (Figura 32).

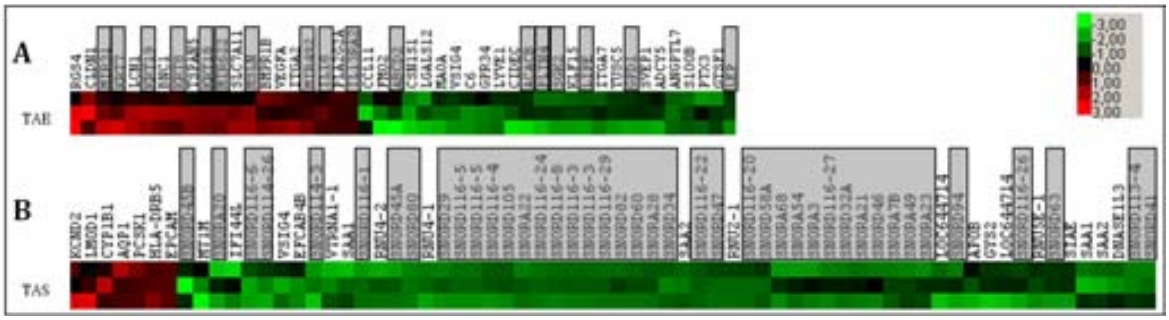

Figura 32. Mapa de calor dels gens diferencialment expressats entre els pacients amb CAD i NCAD. La figura A mostra els gens diferencialment expressats en el TAE i la figura B, en el TAS. Els gens més expressats en els pacients amb CAD en comparació amb els pacients NCAD es troben representats en vermell i els gens amb una menor expressió en els pacients amb CAD en comparació amb els pacients NCAD es troben en color ver. En color gris es troben els gens d'interès.

En el TAE dels pacients amb CAD es va observar major expressió de diversos queratines (KRT8, KRT7, KRT18 i KRT19), de microRNAs (MIR-31, MIR-492 i MIR-622), de citocines (IL-13RA i IL-18) i de la MSLN (mesotelina) entre d'altres gens (Figura 32A).

En el TAE dels individus NCAD es va observar major expressió de diversos gens relacionats amb el metabolisme (LEP (Leptina), ABCD2, ACACB, SGK2, LIPE (HSL), GPD1, PLIN4) (Figura 32A).

Per altra banda en el TAS dels pacients amb CAD es va observar menor expressió de RNAs nucleolars petits (snoRNAs) de les famílies compostes pels SNORD i pels SNORA. Cal destacar que del total de gens amb menor expressió en els pacients amb CAD el 68% dels gens (42 dels 62 gens) corresponen a la família snoRNAs (Figura 32B).

Dels gens amb major expressió en el TAE dels pacients amb CAD que s'han destacat anteriorment (queratines, microRNAs, citocines i mesotelina), es va comprovar el seu ràtio d'expressió entre el TAE i el TAS en els pacients amb CAD i NCAD (Figura 33). Es

va veure que tots aquests gens a més d'estar més expressats en els pacients amb CAD també estaven més expressats en el TAE que en el TAS.

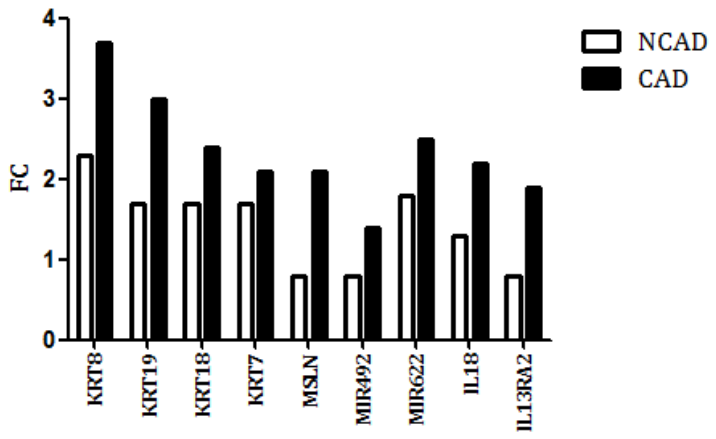

Figura 33. Ràtio d'expressió entre el TAE i el TAS de varis gens diferencialment expressats entre pacients amb CAD i NCAD. Els resultats s'expressen com les vegades que canvia el nivell d'expressió (*fold change* (FC)) del TAE respecte el TAS.

5.2.1. Expressió de la queratina 19 en el TAE

L'alta presencia de queratines, a més, de l'expressió de mesotelina ens va suggerir la presencia de cèl·lules mesotelials. Per verificar la presencia d'aquests tipus cel·lular en el TAE es va realitzar un anàlisis immunohistoquímic utilitzant un anticòs específic per aquest tipus cel·lular (queratina 19 (KRT19)). Es va detectar que la KRT19 tenyeix específicament una monocapa de cèl·lules al voltant de lòbuls de greix en el TAE i no es va detectar KRT19 en el TAS (Figura 34).

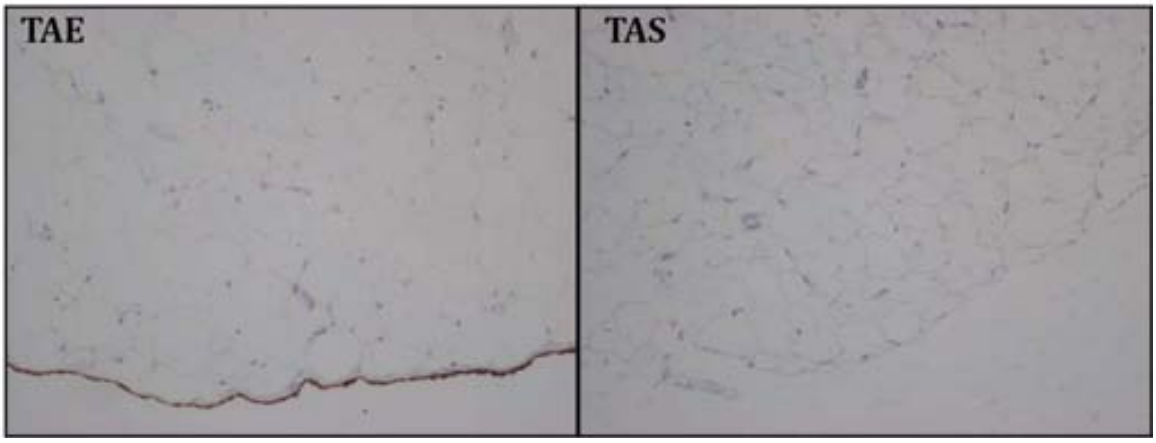

Figura 34. Immunohistoquímica del TAE i TAS amb KRT19. Imatge representativa on mostra l'expressió de KRT19 en les cèl·lules mesotelials (ampliació x10).

5.3. Efecte de l'estimulació amb lligands de TLR en l'expressió gènica del teixit adipós.

Per identificar la resposta del TA a l'estimulació amb lligands TLR es van estudiar els canvis en l'expressió gènica del TAE i TAS de pacients amb CAD i NCAD tractats amb LPS i FSL-1. Es van analitzar els gens expressats diferencialment per a cadascun dels lligands de TLR en comparació amb el seu control o basal. La Taula 21 mostra el nombre de gens que estaven diferencialment regulats en cada comparació, es van incloure pacients amb CAD i NCAD, els dos tipus de teixits (TAE i TAS) i els dos lligands TLR (LPS i FSL-1) .

Taula 21. Número de gens diferencialment expressats en el TAE i el TAS en pacients amb CAD i NCAD després de l'estimulació amb lligands TLR (LPS i FSL-1)

	LPS				FSL-1			
	TAE		TAS		TAE		TAS	
	NCAD	CAD	NCAD	CAD	NCAD	CAD	NCAD	CAD
Gens induïts	218 (58%)	222 (59%)	217 (57%)	188 (50%)	79 (21%)	49 (13%)	45 (12%)	71 (19%)
Gens reprimits	143 (60%)	124 (52%)	59 (25%)	49 (20%)	94 (39%)	59 (25%)	7 (3%)	12 (5%)

Per detectar les possibles diferencies que hi ha entre els dos tipus d'estímul, els dos tipus de teixit i els dos tipus de pacient després de l'estimulació del TA, es van realitzar els diagrames de Venn que mostren els gens expressats diferencialment entre els estímuls (Figura 35), entre els teixits (Figura 36) i entre els pacients (Figura 37).

5.3.1. Efecte de l'estimulació del TA depenent del l'estímul (LPS-FSL-1)

La figura 35 mostra l'efecte de l'estimulació del TA depenen de l'estímul (LPS i FSL-1). Es va veure que del total dels gens induïts un 30% van ser modificats pels dos estímuls, en canvi un 60% dels gens van ser exclusivament afectats per LPS, en front del 11% dels gens exclusivament modificats per FSL-1. Per altra banda els gens reprimits, un 38% dels gens van ser modificats pels dos lligands, un 49% van ser modificats únicament per LPS i un 13% únicament per FSL-1. Es pot observar que el

LPS modifica més gens que el FSL-1 tan induint-los com reprimint-los. A més els gens induïts tenen més gens específics modificats per LPS que en els gens reprimits.

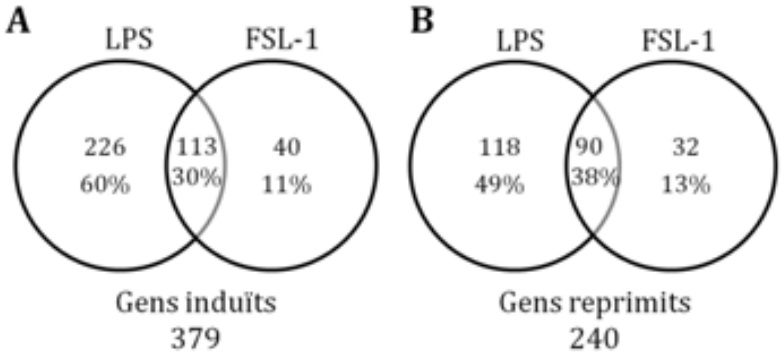

Figura 35. Diagrama de Venn on es mostren els gens estimulats específicament per LPS i FSL-1. La figura A) mostra els gens induïts i la figura B) els gens reprimits

5.3.2. Efecte de l'estimulació del TA depenent del teixit adipós (TAE-TAS)

La figura 36 mostra l'efecte de l'estimulació depenent del tipus de TA (TAE-TAS). Es va veure que un 55% dels gens induïts van ser comuns entre els dos teixits, un 26% dels gens van ser exclusivament induïts en el TAE i un 19% dels gens exclusivament en el TAS. En els gens reprimits es va veure que el 23% dels gens van ser comuns entre els dos teixits, un 62% dels gens van ser exclusivament reprimits en TAE i un 15% dels gens van ser reprimits exclusivament en el TAS. Aquestes dades mostren diferencies entre els gens induïts i reprimits, ja que hi ha molts més gens específics reprimits en el TAE en comparació en els gens específics induïts en aquest mateix teixit

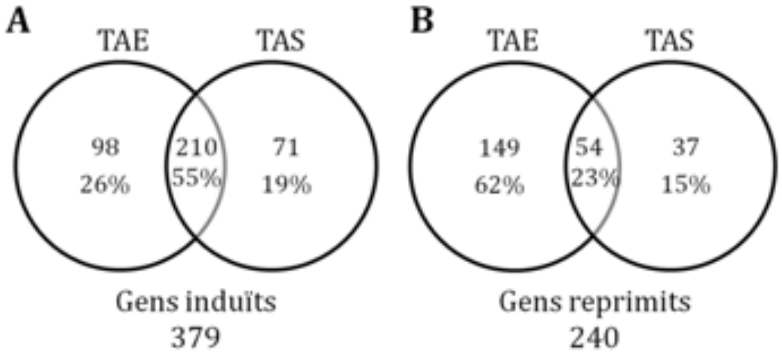

Figura 36. Diagrama de Venn on es mostren els gens estimulats específicament pel TAE i pel TAS. La figura A) mostra els gens induïts i la figura B) els gens reprimits.

5.3.3. Efecte de l'estimulació del TA depenent del pacient (CAD-NCAD)

La figura 37 mostra l'efecte de l'estimulació depenent del tipus de pacients (CAD i NCAD). Es va veure que del total de gens estimulats comuns entre pacients amb CAD i NCAD un 59% estaven induïts i un 42% reprimits. Dels total de gens induïts un 18% van ser específics en pacients amb CAD i un 23% específics dels NCAD. Del total de gens reprimits un 23% van ser exclusius de pacients CAD i un 37% específics dels NCAD. Es va observar que els individus NCAD tenien més gens reprimits específics comparats amb els CAD

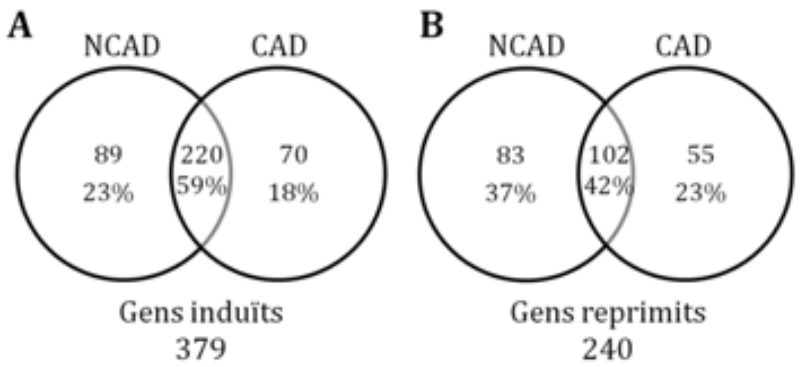

Figura 37. Diagrama de Venn on es mostren els gens estimulats específicament en els pacients amb CAD i els NCAD. La figura A) mostra els gens induïts i la figura B) els gens reprimits.

5.3.4. Classificació funcional dels gens estimulats.

Es va realitzar la classificació funcional i la interpretació biològica dels gens expressats després de l'estimulació amb LPS i FSL-1 en el TAE i TAS de pacients amb CAD i NCAD. Es va realitzar la classificació funcional de tots els gens estimulats en totes les condicions experimentals. És a dir a nivell dels dos tipus teixits (TAE i TAS) dels dos estímuls (LPS i FSL-1) i dels dos tipus de pacients (CAD i NCAD). Es van mirar tan els gens induïts (taula 22 i figura 38) com els gens reprimits (taula 23 i figura 39) i es van representar gràficament totes les categories funcionals amb el nombre de gens corresponents a cada condició.

En els gens induïts es va veure que casi la meitat de les categories funcionals estaven involucrades en relació a la resposta immunitària: immunitat i defensa, via de senyalització per citocines i quimiocines, immunitat per interferó, immunitat per

macròfags, immunitat per citocines i quimiocines, cascada NF-kB i cascada JAK-STAT. La resta dels grups funcionals on estaven implicats van ser transducció de senyals, proteòlisi , apoptosi i comunicació cel·lular entre altres (taula 22 i figura 38) .

Els gens induïts mostraven diferències entre l'estimulació amb LPS i FSL-1, es va observar que, en gairebé totes les categories funcionals es van reduir el nombre de gens estimulats amb FSL-1 en comparació amb LPS independentment del tipus de pacient i teixit. Per exemple en la categoria funcional immunitat i defensa van trobar que el LPS va modificar més del doble de gens en comparació amb el FSL-1 (TAE: NCAD 78 vs 30 gens; CAD 82 vs 26 gens. TAS: NCAD 73 vs 19 gens; CAD 66 vs 34 gens. D'altra banda, en la categoria de la immunitat per interferó, el nombre de gens estimulats per FSL-1 va ser molt baix o indetectable (TAE: NCAD 21 vs 3 gens; CAD 24 vs 0 gens. TAS: NCAD 24 vs 0 gens; CAD 21 vs 0 gens).

Taula 22. Classificació funcional dels gens induïts després de l'estimulació amb LPS i FSL-1 en el TAE i TAS de pacients amb CAD i NCAD. En la taula es mostren les categories funcionals i els nombre de gens que pertanyen a cada una condició.

	LPS				FSL-1			
	TAE		TAS		TAE		TAS	
	NCAD	CAD	NCAD	CAD	NCAD	CAD	NCAD	CAD
Immunitat i defensa	78	82	73	66	30	26	19	34
Transducció de senyals	64	65	53	57	26	27	22	39
Transducció de senyals per receptor de superfície	44	41	36	36	18	20	18	30
Comunicació cel·lular	38	39	34	39	24	19	18	27
Via de senyalització per citocines i quimiocines	29	31	26	27	13	13	13	22
Senyalització per lligands	29	29	25	28	18	15	16	22
Proteòlisis	26	25	22	18	12	0	0	0
Immunitat per interferó	21	24	24	21	3	0	0	0
Immunitat per macròfags	19	18	17	16	9	6	7	9
Cascada intracel·lular de senyalització	19	19	18	18	9	7	8	12
Immunitat per citocines i quimiocines	15	15	13	13	6	6	7	8
Apoptosi	14	16	15	15	0	0	6	10
Motilitat cel·lular	10	11	0	9	7	7	4	7
Cascada NF-kB	8	8	5	7	5	3	5	5
Cascada JAK-STAT	8	9	10	8	3	3	3	5

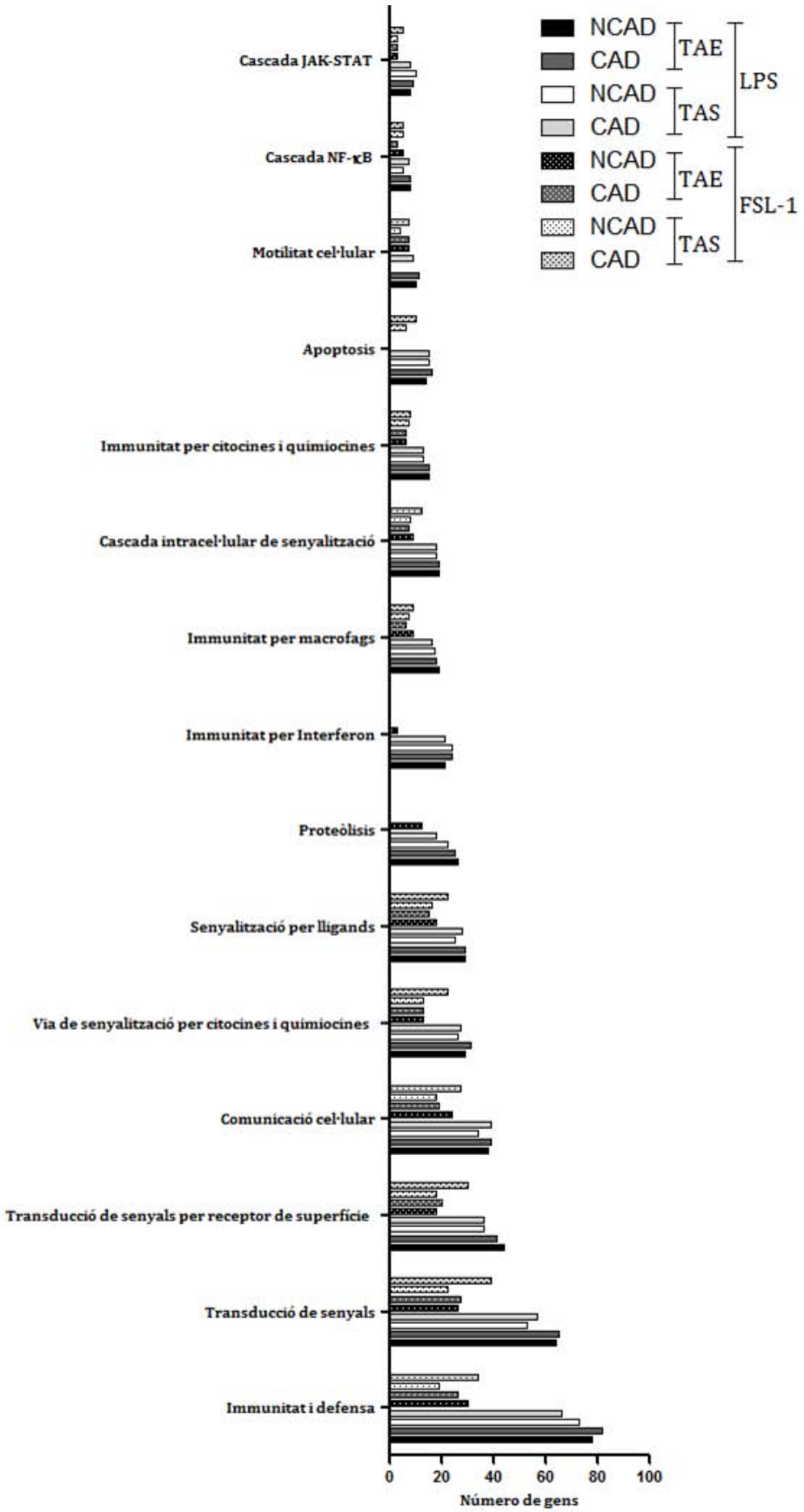

Figura 38. Classificació funcional dels gens induïts amb els dos lligands TLR en el TAE i el TAS en pacients amb CAD i NCAD. L'eix X mostra el número de gens i inclosos en cada categoria.

En la taula 23 i la figura 39 es mostren la classificació funcional dels gens reprimits que inclou diversos grups funcionals: transducció de senyals, immunitat i defensa, immunitat per macròfags, adhesió cel·lular i processos de desenvolupament, immunitat per complement metabolisme dels hidrats de carbohidrats, metabolisme dels lípids, àcids grassos i esteroides entre d'altres.

Els gens reprimits van mostrar diferències entre l'estimulació del TAE i el TAS, es va observar que en gairebé totes les categories funcionals es van reduir el nombre de gens reprimits en el TAS en comparació amb el TAE independentment del tipus de pacient i estímul (Taula 23). Per exemple en la categoria funcional immunitat i defensa tenim que en el TAE es van reprimir més del doble de gens en comparació amb el TAS (LPS: NCAD 28 vs 11 gens; CAD: 21 vs 7 gens. FSL-1 NCAD:25 vs 2; CAD:12 vs 0 gens). D'altra banda, en la categories immunitat per complement, metabolisme dels hidrats de carbohidrats i metabolisme dels lípids, àcids grassos i esteroides no es va observar cap gen estimulat en el TAS.

Taula 23 Categoria funcional dels gens reprimits després de l'estimulació amb LPS i FSL-1 en el TAE i TAS de pacients amb CAD i NCAD. En la taula es mostren les categories funcionals i els nombre de gens que pertanyen a cada una condició..

	LPS				FSL-1			
	TAE		TAS		TAE		TAS	
	NCAD	CAD	NCAD	CAD	NCAD	CAD	NCAD	CAD
Transducció de senyals	41	36	16	16	24	14	3	3
Immunitat i defensa	28	21	11	7	25	12	2	0
Processos de desenvolupament	23	18	2	10	9	4	0	1
Comunicació cel·lular	17	15	8	8	10	0	0	2
Metabolisme dels lípids, dels àcids grassos i dels esteroides	12	11	0	0	11	7	0	0
Desenvolupament del mesoderm	10	8	1	6	7	1	0	0
Adhesió cel·lular	10	12	5	5	5	4	0	2
Immunitat per macròfags	8	8	3	3	6	6	0	0
Metabolisme dels carbohidrats	8	10	0	0	5	4	0	0
Desenvolupament del esquelet	6	4	1	3	4	0	0	0
Immunitat per complement	5	2	0	0	5	2	0	0

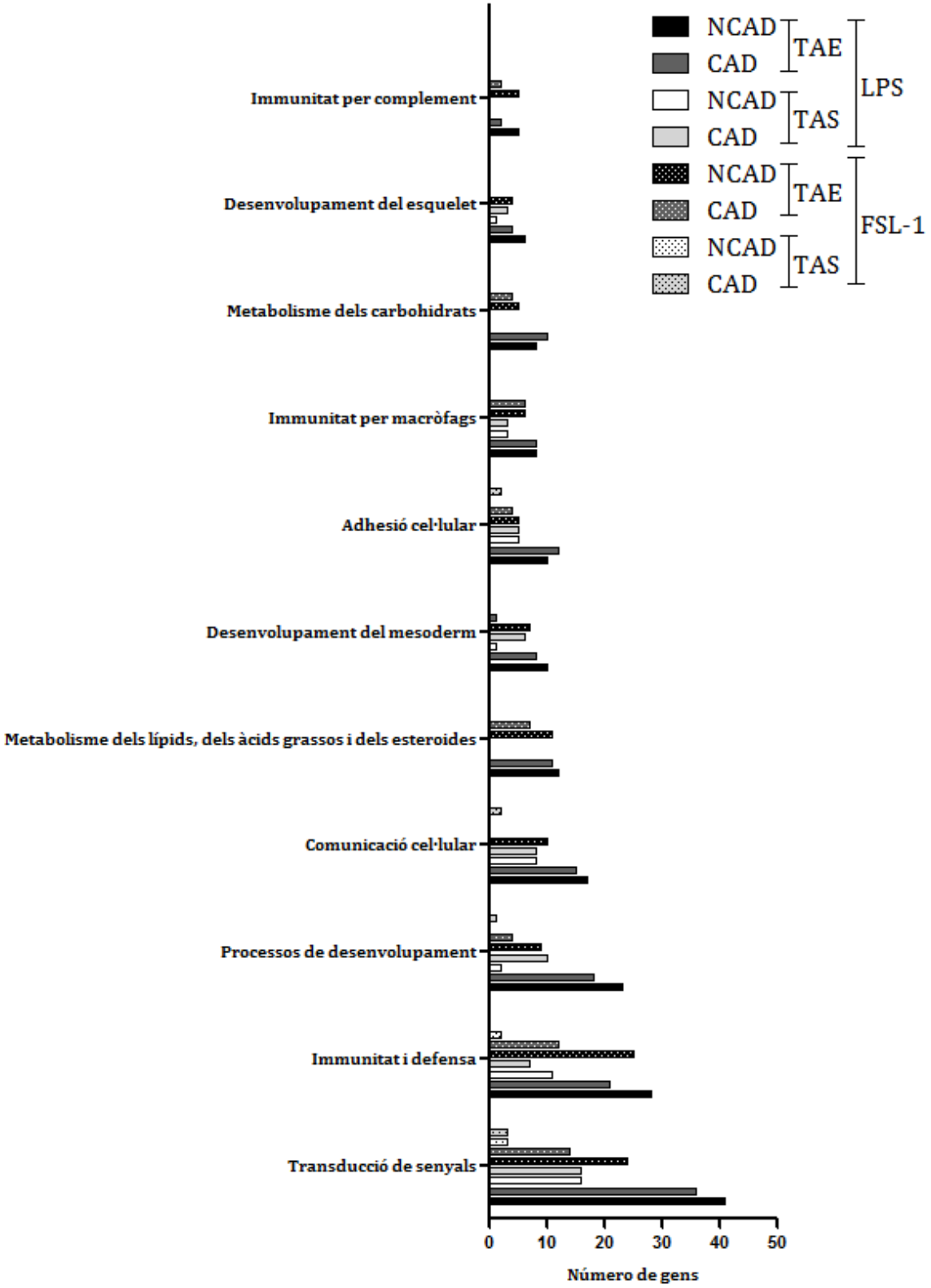

Figura 39. Classificació funcional dels gens reprimits amb els dos lligands TLR en el TAE i el TAS en pacients amb CAD i NCAD. L'eix X mostra el número de gens i inclosos en cada categoria.

5.3.5. Efecte diferencial del tipus d'estímul en els gens induïts.

Considerant que els gens induïts contenien una gran quantitat de categories funcionals relacionades amb la resposta immune, es va realitzar un mapa de calor que mostra els components immunològics afectats per l'estimulació TLR del TAE i el TAS dels pacients amb CAD i NCAD. Es van incloure: interleucines, quimiocines, gens relacionats amb el factor de necrosi tumoral i amb el interferó i la via TLR/ JAK/STAT (figura 40).

El mapa de calor va revelar que el LPS i el FSL-1 regulen els gens de les quimiocines, citocines i gens relacionats amb el TNF, però en canvi el LPS provoca una resposta transcripcional més pronunciada que el FSL -1 en tots els gens del grup de la via TLR/JAK/STAT i dels gens relacionats amb l'interferó.

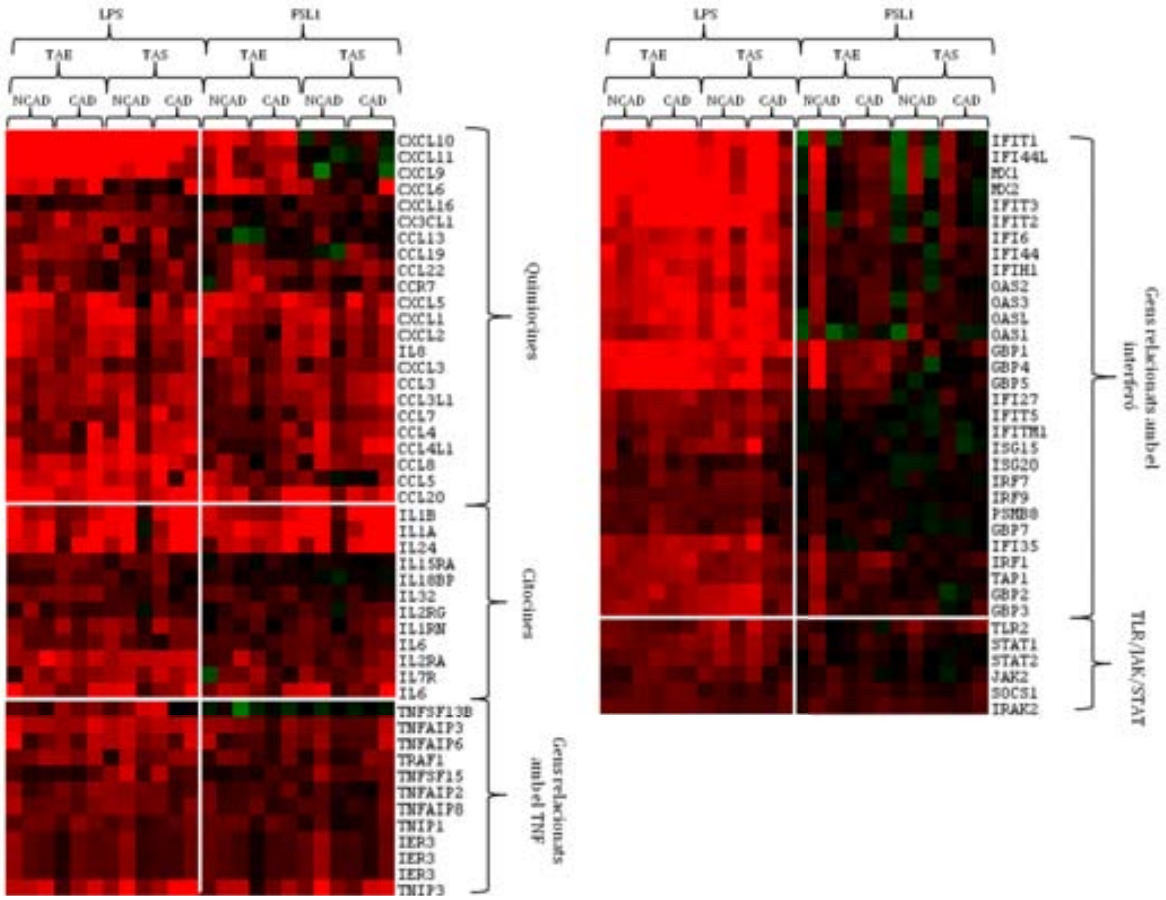

Figura 40. Mapa de calor dels gens induïts pels lligants TLR implicats en la resposta immune. Inclou pacients amb CAD i NCAD i els dos dipòsits de greix (TAE i TAS). Es mostren interleucines, quimiocines, i gens relacionats amb el TNF-α, amb el interferó i amb la via de senyalització TLR/JAK/STAT.

5.3.6. Efecte diferencial del tipus de teixit en els gens reprimits

Com que també es van detectar diferencies en els gens expressats reprimits entre el TAE i el TAS, es va realitzar un mapa de calor amb els gens que en l'agrupació funcional estaven reprimits principalment en el TAE. Els gens inclosos corresponen a les funcions moleculars: metabolisme dels hidrats de carboni i metabolisme dels lípids, àcids grassos i dels esteroides (Figura 41).

El mapa de calor confirma que tots els gens relacionats amb el metabolisme es trobaven reprimits principalment en el TAE. amb els dos lligands TLR (LPS i FSL-1).

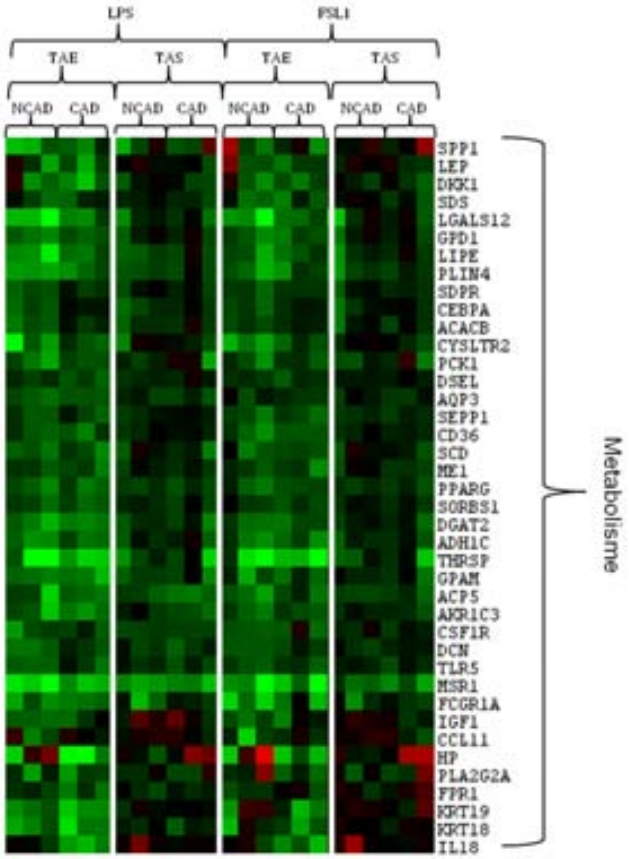

Figura 41. Mapa de calor on estan representats els gens reprimits després de l'estimulació amb lligands TLR implicats en el metabolisme dels carbohidrats i lípids. Inclou pacients amb CAD i NCAD i els dos tipus de depòsits grassos (TAE i TAS)

5.3.7. Rutes i xarxes dels gens diferencialment expressats

L'agrupació funcional dels gens estimulats i la seva visualització amb els mapes de calor va mostrar diferencies tan a nivell d'estímul en el cas dels gens induïts com a nivell de teixit en els gens reprimits. La totalitat d'aquests gens van ser analitzats per separat (gens induïts i reprimits) pel programa bioinformàtic IPA per determinar les vies en que interactuaven o si formaven part d'una xarxa integrada.

Es va observar que els gens induïts específicament per LPS i no per FSL-1, estaven implicats en la via canònica de l'interferó (Figura 42). Aquesta via es va veure enriquida significativament, dels 36 gens totals que formen la via, en el TAE es van trobar induïts 13(CAD) i 9 (NCAD) gens i en el cas del TAS es van trobar induïts 9 (CAD) i 11 (CAD) gens.

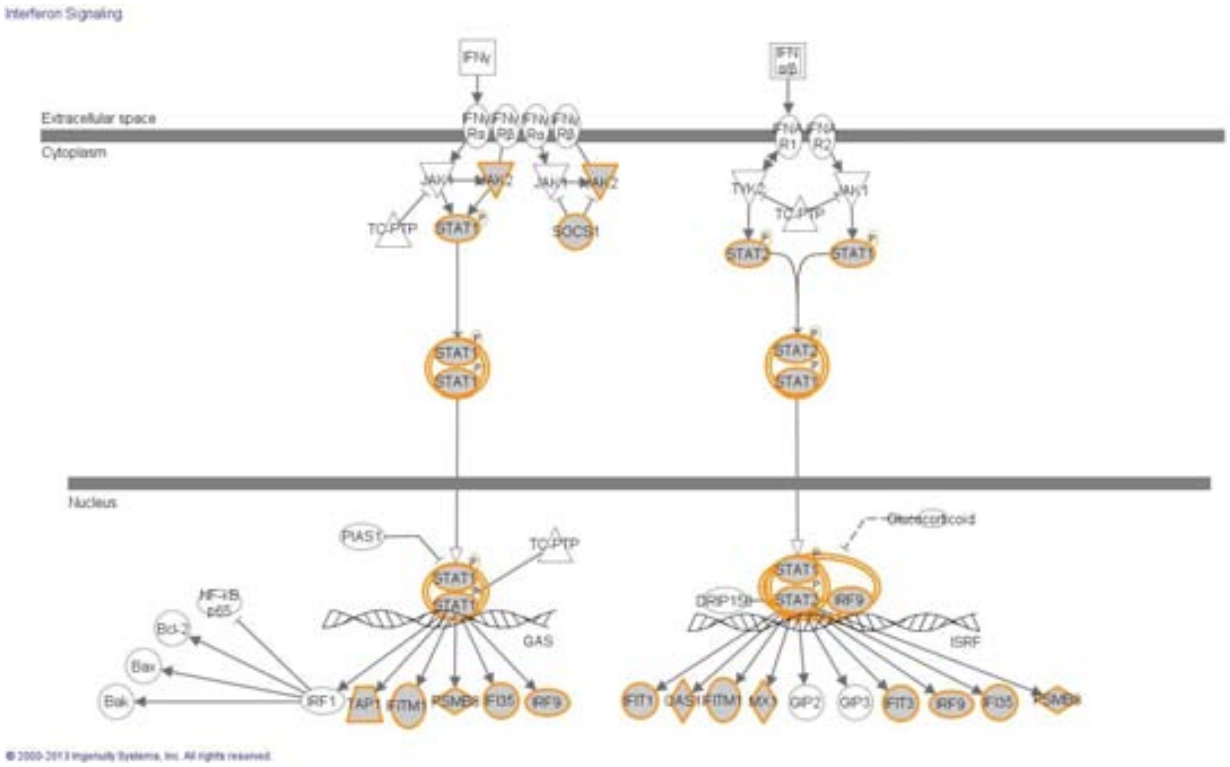

Figura 42. Via canònica de l'interferó. La via canònica de l'interferó va ser activada per LPS però no per FSL-1 després de l'estimulació del TAE i del TAS de pacients amb CAD i NCAD. Totes les molècules encerclades en taronja i ombrejades pertanyen als gens induïts amb LPS.

Els gens exclusivament reprimits en el TAE i no en el TAS inclou 40 gens relacionats amb el metabolisme. El anàlisi amb el programa informàtic IPA, va demostrar que tots aquest gens estaven relacionats per una xarxa on el PPAR-γ és el factor de transcripció central (Figura 43). Dels 40 gens totals que formen part de la xarxa del PPAR-γ, l'estimulació amb LPS va reprimir 27(CAD) i 25(NCAD) gens i en el cas del FSL-1 va reprimir 9 (CAD) i 21 (CAD) gens.

El anàlisi funcional de la xarxa de PPAR-γ va permetre aprofundir en les funcions metabòliques dels diferents gens inclosos en aquesta. Es va veure que els gens estaven relacions amb funcions del metabolisme de lípids i de carbohidrats: la lipòlisi (LIPE), la síntesi de lípids (DGAT2, SORBS1, ACACB), la gluconeogènesi (SDS, PCK1,) i la síntesi d'hidrats de carboni (SCD)

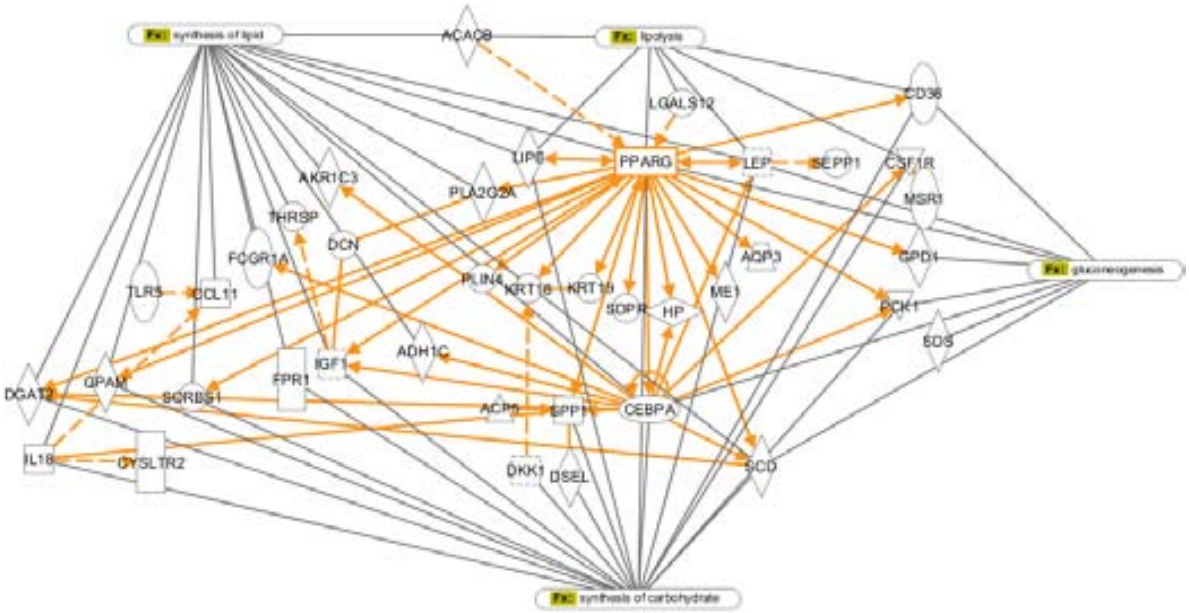

Figura 43. Xarxa del PPAR-γ. La xarxa del PPAR-γ es va trobar reprimida en el TAE després d'estimular-la tan amb LPS com amb FSL-1. Tot els gens inclosos en la xarxa es va trobar reprimits. Les connexions taronges continues (interacció directa) i discontinua (interacció indirecta) mostren les interaccions dels gens i les connexions grises mostren la categoria funcional a la qual pertanyen.

5.3.8. Classificació funcional dels gens estimulats diferencialment expressats entre pacients amb CAD i NCAD.

Es va realitzar l'anàlisi funcional dels gens específicament estimulats en pacients amb CAD i en NCAD. Es va realitzar l'anàlisi funcional dels 70 gens induïts exclusivament en els pacients amb CAD i dels 89 gens específics dels NCAD. També es van mirar els gens específics reprimits, 55 gens en els pacients amb CAD i 83 gens en els individus NCAD.

5.3.8.1. Gens induïts en pacients amb CAD

Dels 70 gens induïts en pacients amb CAD un 28% pertanyien al grup funcional immunitat i defensa (CD80, FCAR, FCRL3, S100A9, TAPB, EMR3, GBP7, HCK,,LCN2, HLA-F, MS4A1,...), un 7% a senyalització per citocines i quimiocines (CCL13, CCL7, CSF2RB, IL-2RG, IL-20, PPBP i SOCS1), un 6% a apoptosi (BCL2A1, LGALS9, LGALS9C, SGPP2, MYB,...) i un 6% a adhesió cel·lular (CLC, KLRC4-KLRK1, SELP i VCAM1,...) , entre d'altres (Taula 24).

Taula 24. Classificació funcional dels gens induïts en els pacients amb CAD.

Categoria funcional	Gens	%	Valor de P
Transducció de senyals	25	36,8	<0,001
Immunitat i defensa	19	27,9	<0,001
Transducció de senyals per receptors de superfície cel·lular	14	20,6	0,004
Comunicació cel·lular	11	16,2	0,008
Senyalització per citocines i quimiocines	7	10,3	<0,001
Senyalització per lligand	6	8,8	0,015
Apoptosi	6	8,8	0,038
Adhesió cel·lular	6	8,8	0,062
Immunitat i defensa, altres	4	5,9	0,018
Immunitat per cèl·lules *Natural killer*	3	4,4	0,028
Immunitat per macròfag	3	4,4	0,090
Immunitat per MHCI	2	2,9	0,062

5.3.8.2. Gens induïts en individus NCAD

Dels 89 gens induïts en individus NCAD un 14% pertanyien al grup funcional immunitat i defensa (NMI, CXCL16, CXCL6, DPP4, IER3, NR4A2, ORM1, ORM2, PTX3,...), un 10% a metabolisme dels lípids, àcids grassos i esteroides (ST3GAL1, UGCG, ELOVL2, LBP , PLA2G4A,...), un 8% al desenvolupament del mesoderm (BTN3A1, BTN3A2, BTN3A3, FGF2, VDR,...), un 5% metabolisme del colesterol (APOL4, AH25H, CYP7B1 i INSIG2), un 5% a metabolisme d'altres polisacàrids (ST3GAL1, CHI3L1, CHI3L2,...) i un 3% en catabolisme del RNA (ISG20, PNPT1 i TMEM62), entre d'altres (taula 25).

Taula 25. Classificació funcional dels gens induïts en els pacients amb NCAD.

Categoria funcional	Gens	%	Valor de P
Immunitat i defensa	12	13,5	0,053
Proteòlisis	10	11,2	0,037
Metabolisme dels lípids, àcids grassos i esteroides	9	10,1	0,032
Desenvolupament del mesoderm	7	7,9	0,058
Senyalització per lligand	6	6,7	0,052
Resposta a l'estrès	5	5,6	0,016
Metabolisme del colesterol	4	4,5	0,005
Metabolisme d'altres polisacàrids	4	4,5	0,028
Metabolisme dels esteroides	4	4,5	0,055
Lactació, desenvolupament mamari	3	3,4	0,002
Catabolisme del RNA	3	3,4	0,033

5.3.8.3. Gens reprimits en pacients amb CAD

Dels 55 gens reprimits en pacients amb CAD un 13% pertanyien al grup funcional metabolisme dels carbohidrats (GALNTL2, DSEL, ME1, PTGR1, SDS, SORBS1 i VAT1L), entre d'altres (Taula 26).

Taula 26. Classificació funcional dels gens reprimits en els pacients amb CAD.

Categoria funcional	Gens	%	Valor de P
Transducció de senyals	16	29,6	0,058
Metabolisme dels carbohidrats	7	13,0	0,006
Estructura cel·lular	6	11,1	0,044
Metabolisme dels carbohidrats, altres	4	7,4	0,001
Metabolisme dels carbons, altres	3	5,6	0,023

5.3.8.4. Gens reprimits en pacients amb NCAD

Dels 83 gens reprimits en pacients amb NCAD un 15% pertanyien al grup funcional immunitat i defensa (CLC, MOSC1, ADORA3, CCL11, CSF1R, CYSLTR2, PRG4 , SEPP1,...), un 9% a metabolisme dels lípids, àcids grassos i esteroides (ABCD2, APOC1, DHRS9, RBP7,...), un 4% formen part de síntesi de àcids grassos (ACACB, HPGDS i PTGIS), un 4% a immunitat per complement (CR1, C1QA i C6) i un 3% a gluconeogènesis (ACACB i PCK1), entre d'altres (Taula 27).

Taula 27. Classificació funcional dels gens reprimits en els pacients amb NCAD

Categoria funcional	Gens	%	Valor de P
Transducció de senyals	23	29,5	0,002
Comunicació cel·lular	12	15,4	0,003
Immunitat i defensa	12	15,4	0,005
Transducció de senyals per receptors de superfície cel·lular	12	15,4	0,028
Metabolisme dels lípids, àcids grassos i esteroides	7	9,0	0,049
Senyalització per lligand	6	7,7	0,015
Síntesi de àcids grassos	3	3,8	0,001
Immunitat per complement	3	3,8	0,018
Transport de lípids i àcids grassos	3	3,8	0,073
Gluconeogènesis	2	2,6	0,062

DISCUSSIÓ

El TAE és un dipòsit de greix visceral inusual amb continuïtat anatòmica i funcional amb les artèries coronàries i amb el miocardi. S'ha vist que en condicions fisiològiques el TAE mostra propietats cardioprotectores tan bioquímiques com mecàniques i termogèniques. Per altra banda, en condicions patològiques el TAE pot afectar localment el cor i les artèries coronàries a través de la secreció de substancies proinflamatòries i pot estar implicat en la patogènesi de l'aterosclerosi, l'aterotrombosis i la ruptura de la placa [276, 315].

Tot i els avenços en l'estudi de la patologia del CAD, encara no estan clars els mecanismes que posen en marxa l'inici i la progressió de la malaltia [320]. Inicialment es va postular que la senyalització que s'originava en la llum del vas era el factor desencadenant però en els últims anys hi ha cada vegada més proves que els canvis en el TAE podrien afectar a la patologia del CAD, amb la teoria de fora a dins que indica que la inflamació començaria en el TAE i després es propagaria a l'interior del vas sanguini contribuint a la lesió de l'endoteli i a tots els estadis patològics [330, 331].

Els estudis inicials de TA en relació amb la patologia de l'aterosclerosi es van basar en anàlisis comparatius entre el TAE i el TAS [288, 422]. En els últims anys però el interès pel TAE ha provocat un augment dels estudis comparatius entre pacients amb CAD i NCAD [423-426], però a causa de la dificultat d'obtenció de mostres, a la limitada mida d'aquestes i a l'obtenció d'individus controls sense aterosclerosi, els estudis es veuen limitats a l'hora de l'anàlisi d'un número reduït de variables. Per això el nostre anàlisi comparatiu en relació als tipus de poblacions presents, a la secreció de citocines i adipocines, a l'activació dels STATs, als nivells d'expressió gènica en condicions basals i en resposta a lligands TLR amb els dos tipus de pacients i amb mostres aparellades de TAE i TAS permet aportar noves dades sobre el paper del TAE en la patologia del CAD.

1. Diferencies entre les poblacions cel·lulars presents en el TA

El TA a part d'adipòcits està compost per altres tipus cel·lulars que poden influir en la seva funció tan a nivell fisiològic com patològic. S'ha descrit que en el TAE hi pot haver acumulació de cèl·lules inflamatòries, com ara limfòcits T, macròfags i mastòcits [288]. A més, estudis previs han demostrat major infiltració de macròfags i limfòcits T en el TAE dels pacients amb CAD comparat els individus NCAD [298, 427].

Partint d'aquests treballs, vam decidir estudiar els diferents tipus de poblacions presents en el TAE i en el TAS per tal de determinar si els nivells de distribució de poblacions cel·lulars es podrien correlacionar amb la patologia del CAD. Els anàlisis immunohistoquímics de poblacions en el TAE van mostrar que els pacients amb CAD presentaven importants infiltrats compostos per limfòcits T i B i un major número de macròfags que els individus NCAD. No es van detectar limfòcits B en el TAE dels pacients NCAD ni en el TAS en els dos tipus de pacients, en canvi si que es van detectar un baix número de limfòcits T dispersos en aquests teixits, però en cap cas formant infiltrats. L'anàlisi del subtipus de poblacions T presents en els infiltrats va mostrar tan limfòcits T CD4+ com CD8+. Tot i que la quantitat de cèl·lules endotelials i mastòcits no difereix entre els dos tipus de pacients, la distribució dels mastòcits era diferent en el TAE dels pacients amb CAD ja que es van trobar localitzats al voltant dels infiltrats. El nostre estudi a més de confirmar els resultats anteriors que mostraven major infiltració de limfòcits T i de macròfags en el TAE dels pacients amb CAD, també demostrem major infiltració de limfòcits B. A més d'indicar que els dos subtipus de limfòcits T, tan CD4+ com CD8+ estan presents en el TAE dels pacients amb CAD, en contrast els resultats d'un estudi previ que sols va poder detectar limfòcits T CD8[427].

La presencia en el TAE d'importants infiltrats compostos per limfòcits T i B i macròfags indicaria que un procés inflamatori local important està succeint i que podria estar afectant a la patologia CAD ja que aquests tipus cel·lulars poden expressar alts nivells de productes inflamatoris. La rellevància de les nostres dades és la detecció d'importants infiltrats de limfòcits B presents en el TAE dels pacients amb CAD, el paper d'aquestes cèl·lules en el teixit adipós i en relació a la patologia del CAD

encara estan per determinar. Però varis estudis previs en relació a les lesions de les arteries afectades per aterosclerosi han mostrat que en contrast amb la presència pronunciada de limfòcits T i macròfags dins de les lesions ateroscleròtiques, s'han detectat pocs limfòcits B [428]. En canvi s'ha vist que els limfòcits B participen en els infiltrats de limfòcits que es troben en la túnica adventícia que envolta les artèries afectades [429-433] i que, a més, poden estar organitzats com òrgans limfoides terciaris, amb un paper potencial en la regulació de la resposta inflamatòria de les lesions [434]. A més, és important reconèixer que el TAE envolta la adventícia sense cap barrera física ni cap frontera funcional que separi els dos medis i sense limitacions sobre el trànsit cel·lular entre els dos teixits [435]. Per tant, l'augment de la càrrega de cèl·lules inflamatòries en el TAE pot fàcilment transitar cap la adventícia i tenir un paper en el desenvolupament de la resposta inflamatòria. A més, a traves de la secreció paracrina o vasocrina, tan els factors secretats com les cèl·lules inflamatòries podrien arribar a l'intima des del costat del TAE i de l'adventícia, podent contribuir localment a l'aterosclerosi coronaria [330].

A part de limfòcits B, també s'ha descrit limfòcits T i macròfags en la túnica adventícia de les lesions ateroscleròtiques [436-438] i a més s'ha vist que els nivells d'infiltració de cèl·lules inflamatoris en l'adventícia es poden correlacionar amb els nivells d'infiltració d'aquestos en la intima tan en estadis primerencs com més avançats de la lesió ateroscleròtica [439]. A diferencia dels estudis en la adventícia on sols es detecten infiltrats inflamatoris en els lloc de les lesions ateroscleròtiques, tenint en conte que les nostres mostres de greix van ser obtingudes a l'atzar, la detecció dels infiltrats en el TAE dels pacients amb CAD és independent de la presencia de lesions ateroscleròtiques, indicant així el paper potencial del TAE en l' iniciació i progressió de la lesió. Considerant totes aquestes dades, podem suggerir que la inflamació es podria iniciar en el TAE i es podria propagar cap la adventícia i la intima, tan amb la migració de tipus cel·lulars com amb la secreció de factors patogènics.

Altres dades que avalen el potencial del infiltrats en la patologia del CAD és que en els estudis de teixit visceral i obesitat, camp molt més estudiat, s'ha determinat que la infiltració dels macròfags en el TAV, és un esdeveniment clau en l'establiment de la inflamació del TA en obesitat [260, 299]. Curiosament en estudis amb models murins

s'ha observat que els limfòcits B, seguit de prop per les limfòcits T, són les primeres cèl·lules del sistema immune en infiltrar el TAV [259]. Per tant, sembla que els mecanismes d'inflamació en el TAE durant l'aterosclerosi, amb la infiltració de limfòcits T i B i macròfags, serien similar als processos d'inflamació del TAV en l'obesitat, això concordaria amb la pròpia naturalesa del TAE, atès que aquest teixit es considerat com a teixit adipós visceral [204].

Tots aquests indicis mostren que la presencia de infiltrats compostos per limfòcits B, T i macròfags en el TAE dels pacients amb CAD seria un reflex de la inflamació en el TAE que podria estar afectant a la patologia de l'aterosclerosi tan en la seva iniciació com en la seva progressió.

2. Secreció de mediadors inflamatoris pel TA

Per veure si els infiltrats cel·lulars presents en el TAE podrien afectar a la secreció de mediadors inflamatoris, es va analitzar la secreció de citocines i adipocines en els dos dipòsits de greix en pacients amb CAD i NCAD. Vam observar que en el TAE dels pacients amb CAD hi havia més producció de citocines inflamatòries (TNF-α, MCP-1 i IL-6) i que aquest efecte no s'observava en el TAS, aquests resultats estan d'acord amb varis estudis que demostren que el TAE dels pacients amb CAD té un perfil més proinflamatori que el dels individus NCAD [293, 305, 423, 440-445]. Aquestes dades apunten que la presencia dels infiltrats en el TAE dels pacients amb CAD podrien estar implicats en la patologia cardiovascular amb l'augment de secreció de citocines inflamatòries.

Per altra banda, el anàlisis de les adipocines secretades pel TAE van mostrar que els pacients amb CAD presentaven menor producció de adiponectina i de leptina comparat els individus NCAD. La secreció local d'adiponectina és important per a la funció normal vascular ja que té propietats tant antiinflamatòries com antiaterogèniques [289, 446], per tant, la menor secreció d'adiponectina detectada en el TAE dels pacients amb CAD pot representar un factor important en el desenvolupament de l'aterosclerosi, aquests resultats, a més, no s'oposen a observacions prèvies [267, 293, 426, 440, 441, 443, 444].

Actualment, s'està qüestionant el paper de la leptina en la patologia del CAD, ja que si be inicialment va ser considerada com una molècula proinflamatoria [411], estudis recents han demostrat el seu possible paper protector en l'aterosclerosi [412, 447]. A més no s'ha arribat al consens de si la producció de leptina en el TAE varia entre els pacients amb CAD i NCAD ja que els estudis existents fins al moment han mostrat resultats contradictoris [304, 305, 425, 441, 443, 448]. Tenint en compte que la leptina participa en molts processos metabòlics [414], és possible que la seva disminució en els pacients amb CAD estigui més relacionada en les funcions metabòliques d'aquesta molècula en el teixit en contra dels efectes inflamatoris anteriorment atribuïts.

S'ha vist que les citocines inflamatòries poden afectar a la producció de adipoquines en els adipòcits humans, concretament el TNF-α pot inhibir la producció i alliberament de la leptina i de la adiponectina [171, 172, 449]. Considerant que en el nostre estudi junt amb la disminució de la producció de leptina i adiponectina també observem augment de citocines inflamatòries, possiblement aquestes estarien implicades en la menor producció de les adipocines per part dels adipòcits en el TAE dels pacients amb CAD.

Per tant, les nostres dades recolzen la idea de que la presencia dels infiltrats compostos per limfòcits T, B i macròfags en el TAE podria afectar a la patologia de la aterosclerosis amb la secreció de citocines inflamatòries i amb canvis en la producció de leptina i adiponectina.

3. Secreció de mediadors inflamatoris per cèl·lules de sang total

Les adipocines i citocines secretades pel teixit adipós poden exercir un efecte local, així com un efecte sistèmic, a través de mecanismes autocrins, paracrins, vasocrins i endocrins, i exercir un paper rellevant en el desenvolupament de malalties cardiovasculars [287]. Per tal de determinar el seu possible efecte a nivell sistèmic es va comparar la producció de citocines i adipocines en mostres de sang perifèrica entre pacients amb CAD i NCAD.

Les nostres dades van mostrar, que en contrast amb la detecció en el TAE de major producció de citocines inflamatòries en els pacients amb CAD, aquest efecte no s'observava en sang perifèrica. Aquests resultats suggereixen que les citocines inflamatòries produïdes en el TAE dels pacients amb CAD actuarien com factors aterogènics localment per mitja de la secreció paracrina o vasocrina i no com a factors circulants. Les nostres dades estan d'acord amb estudis anteriors que indiquen que la càrrega inflamatòria local no es correlaciona amb les concentracions plasmàtiques de les citocines circulants [288, 441].

En canvi, si que es van detectar diferencies entre la secreció d'adiponectina i resistina en sang total entre els pacients amb CAD i NCAD, efecte que no s'observava en quant a la producció de leptina ja que en els dos tipus de pacient els nivells eren similar. Estudis anteriors han mostrat que els nivells circulants d'adiponectina [441, 450, 451] i resistina estan relacionats amb la malaltia cardiovascular [452-455], en canvi no s'ha pogut evidenciar per la leptina [289, 424, 425, 441]. Està descrit que la resistina en humans és produïda principalment pels monòcits de sang perifèrica, encara que també pot ser secretada pels macròfags presents en el TA [5], considerant que els nivells de resistina sistèmics eren més alts en els pacients amb CAD i que aquest efecte no es va observar ni el TAE ni el TAS, indicaria que els nivells diferencials de resistina reflectirien canvis sistèmics en els pacient amb CAD probablement, com indiquen varis autors [452, 453, 456], estarien relacionats amb la inflamació sistèmica dels pacients amb CAD i podrien reflectir la gravetat de l'aterosclerosi coronaria

Per altra banda, les nostres dades van mostren nivells sistèmics d'adiponectina més baixos en els pacients amb CAD en comparació els NCAD. Considerant que l'adiponectina és produïda principalment pels adipòcits [125] i que aquesta es trobava disminuïda tan en el TAE com en el TAS en els pacients amb CAD l'efecte a nivell sistèmic podria estar influenciat pel dos teixits. Hi ha certa discrepància pel fet si el TAE podria afectar als nivells circulants de l'adiponectina, hi ha estudis que mostren que el TAE podria exercir com un òrgan endocrí i contribuir junt al TAS a la secreció d'adiponectina [450] però tenint en compte que el TAS és un compartiment

de greix molt més gran que el TAE, segurament l'efecte a nivell sistèmic que observem estigui més influenciat pel TAS com indiquen altres autors [448, 457].

4. Expressió dels STATs en TA

Els anàlisis de la senyalització JAK-STAT dins del teixit adipós suposa una poc estudiada i interessant eina que pot aportar noves dades sobre els mecanismes pels qual les cèl·lules immunes del TA es comuniquen amb els adipòcits i altres cèl·lules per modular l'efecte en la patologia de l'aterosclerosi. Per això es va analitzar el grau d'activació dels factors de transcripció implicats en la transmissió de senyals per les citocines i adipocines.

L'anàlisi comparatiu entre l'expressió de STATs va mostrar que en el TAE dels pacients amb CAD els nivells d'activació basals de STAT1(tyr) eren més elevats, els nivells de activació de STAT3(tyr) eren més baixos i no hi havia cap variació entre els nivells de STAT5. Atès que no es van observar diferencies en quant el grau d'activació entre els pacients amb CAD i NCAD en el TAS destaca el paper del STATs en el TAE en la patologia de la aterosclerosi.

El paper de l'activació de STAT3 i STAT1 en els adipòcits segueix funcions diferents, mentre que el STAT3 s'expressa abundantment en els adipòcits i és un factor crític en la regulació de la adipogènesis i el metabolisme a traves de la modulació de C/EBP-β i PPAR-γ [197, 198], per altra banda el STAT1 te un paper central en la capacitat del IFN-γ per disminuir l'emmagatzematge de lípids i l'adipogènesi en els adipòcits [173, 190, 191]. D'acord amb això i junt al fet que l'activació de STAT1 es donava concretament en les cèl·lules que componen els infiltrats, els nivells d'activació basals més alts de STAT1 estarien relacionats amb la resposta inflamatòria de les cèl·lules immunes infiltrades. Per altra banda, es va observar activació basal de STAT3 en el TAE en els dos tipus de pacients, però el grau d'activació era més baix en els pacients amb CAD. Aquestes dades concorden amb el fet de que el STAT3 és un factor de transcripció clau en el metabolisme dels adipòcits, a més considerant que STAT3 pot ser activat per la leptina [287], la menor activació de STAT3 podria ser causada per la

menor activació d'aquest per part de la leptina, ja que també es va observar menor producció de la leptina en el TAE dels pacients amb CAD.

Aquestes dades ens indiquen que la presència de cèl·lules immunes en el TAE dels pacients amb CAD podria alterar el metabolisme normal, ja que la major producció de citocines inflamatòries i la menor producció de adipocines podrien ser les responsables de la major activació de STAT1 i la menor activació de STAT3. Aquestes dades semblen indicar que en el TAE dels pacients amb CAD l'augment de l'estat inflamatori coincidiria amb una disminució de l'activitat metabòlica normal.

5. Expressió gènica diferencial en el TA entre els pacients amb CAD i NCAD

L'ús de microarrays en TA representa una poderosa eina per tal de detectar diferències en el perfil d'expressió gènica dels pacients amb aterosclerosi. Aquestes diferències podrien posar de manifest les possibles vies que intervenen en l'origen i desenvolupament d'aquesta patologia, podent ser utilitzades per desenvolupar noves estratègies terapèutiques. A més, junt al fet que fins al moment tan sols existeixi un estudi d'expressió gènica que compari el TAE i el TAS en pacients amb CAD i NCAD [458], permet que el nostre estudi pugui aportar noves dades sobre el TA en la patologia de la aterosclerosi.

Per tal de determinar diferencies en quant el TA en relació a la patologia de la aterosclerosi, es va comparar el perfil genòmic de biòpsies aparellades de TAS i TAE obtingudes de pacients amb CAD i NCAD. El anàlisi de la classificació funcional dels gens específics més expressat en el TAE entre pacients amb CAD i NCAD, va mostrar que els pacients amb CAD expressen més gens implicats en la immunitat i molècules del complement en contrast els NCAD que expressen més gens relacionats amb el metabolisme i el transport dels lípids. Aquests resultats reforcen la idea del pas del TAE dels pacients amb CAD de un perfil metabòlic a un inflamatori.

Per altra banda els experiments d'expressió gènica van mostrar que en el TAE dels pacients amb CAD un augment de l'expressió de varies queratines KRT7 , KRT8 , KRT18 i KTR19, de mesotelina, de citocines (IL-18 i IL13-RA2) i de microRNAs (MIR-

492 i MIR-622). Considerant que les queratines i la mesotelina són marcadors de cèl·lules mesotelials i que aquestes ja han estat descrites en el TAV però no en el TAE [459, 460] es va realitzar l'anàlisi immunohistoquímic amb l'anti–queratina que va revelar la presencia de cèl·lules mesotelials en el TAE però no el TAS. La tinció amb anti–queratina va identificar una monocapa de cèl·lules al voltant dels adipòcits del TAE, el que confirma la presència de cèl·lules mesotelials en aquest teixit. Estudis anteriors van demostrar que les cèl·lules mesotelials en el TAV són les principals productores de les citocines proinflamatòries IL-18 i IL13-RA2 [459, 461], citocines que també en el nostre cas es van trobar més expressades en el TAE dels pacients amb CAD. Per altra banda, es va detectar que els microRNAs MIR-492 i MIR-622 també estaven més expressat en el TAE dels pacients amb CAD respecte als pacients NCAD. Curiosament, en les seqüències dels gens MIR-492 i MIR-622 es localitzen els pseudògens de la queratina 19 (KRT19P2) i de la queratina 18 (KRT18P27) respectivament [462, 463], a més, s'ha informat que el miR-492 es pot originar a partir de la seqüència codificant del gen KRT19 [462]. S'ha vist que l'expressió de microRNAs ubicats dins dels gens que codifiquen seria una forma de coregulació dels gens corresponents [464, 465]. En concordança, els nostres resultats també mostren un augment de l'expressió tan de les queratines KRT19 i KRT18 com dels MIR-492 i MIR-622 en el TAE dels pacients amb CAD. En conseqüència, la major expressió de queratines, mesotelina, juntament amb les citocines IL18 i IL13RA2 i els microRNAs, en el TAE dels pacients amb CAD reforcen la implicació de les cèl·lules mesotelials en la regulació del TAE i la seva implicació en la patologia del CAD.

Per altra banda, es va observar en el TAS dels pacients amb CAD una menor expressió de varis membres de la família de RNAs petits nucleolar (snoRNAs) SNORD i SNORA. Entre ells, diversos gens de SNORD que pertanyen al grup 116 (1, 3, 4, 5, 6, 8, 20, 22, 24, 26, 27, i 29), curiosament una delecció que afecta al clúster 116 SNORD, està implicada en el síndrome de *Prader-Willi,* la forma més comuna d'obesitat monogenètica, causada per hiperfàgia d'origen desconegut [466, 467]. Aquestes dades indiquen el paper potencial dels snoRNAs en la funcionalitat del TA, no obstant això, la rellevància de la menor expressió de snoRNAs en el TAS dels pacients amb CAD no està clar. Fins al moment hi ha pocs estudis sobre el paper funcional del

snoRNAs, s'ha vist que en el múscul esquelètic de pacients sotmesos a extirpació del TAV que cobreix els intestins i el abdomen (omentectomia) mostraven reducció de l'expressió de gens inflamatoris en comparació amb els pacients sense omentectomia que van mostrar diversos SNORD entre els pocs gens que es trobaven induïts [468]. A més, un estudi en càncer mostrava que els gens de SNORD es trobaven globalment reprimits en les cèl·lules tumorals en comparació les cèl·lules homòlogues normals [469]. En conjunt, aquestes dades suggereixen fortament que els snoRNAs podrien donar informació de canvis a nivells sistèmic que tenen lloc en la patologia del CAD i que l'anàlisi d'expressió de snoRNAs podria ser útil tant en el diagnòstic i el pronòstic dels pacients.

6. Estimulació del TA amb lligands TLR i efecte en la patologia del CAD

Diversos estudis han demostrat que el TAE i el TAS difereixen en termes de funció metabòlica, capacitat secretora i resposta inflamatòria [288, 470-472]. No obstant això, no s'han demostrat aquestes diferències després de l'estimulació amb lligands TLR en l'efecte patogènic en aterosclerosi, ja que, fins ara els efectes de l'estimulació amb lligands TLR sobre el teixit adipós en humans s'ha analitzat principalment en el TAS [473], en canvi els estudis dels possibles efectes diferencials de l'estimulació amb lligands TLR entre el TAS i TAV son reduïts [474] i en cap cas s'han realitzat en el TAE en relació a la patologia del CAD. En conseqüència i per una millor comprensió del TAE en el paper en la malaltia cardiovascular, l'objectiu va ser estudiar la possible associació entre la inflamació induïda per lligands TLR en el TAE i el TAS amb pacients amb malaltia cardiovascular i pacients controls. L'anàlisi es va realitzar tan a nivell proteic com a nivell d'expressió gènica per microarrrays.

6.1. Efecte de l'estimulació en la secreció de mediadors inflamatoris pel TA.

La resposta comparativa dels dos dipòsits de greix a l'estimulació amb els dos lligands TLR va mostrar un important augment de la secreció de totes les citocines inflamatòries (IL-6, IL-10, MCP-1 i TNF-α) amb una resposta inflamatòria més alta en el TAE comparat el TAS en els dos tipus de pacients. Però amb la diferencia que en els

pacients amb CAD es va detectar major producció de IL-10 i TNF-α després de l'estimulació amb LPS en comparació els individus NCAD. Aquestes dades son consistents amb la secreció basal de citocines, on el TAE secreta major quantitat de citocines proinflamatoris que el TAS, perfil que s'observa més marcat en els pacients amb CAD ja que els nivells basals de les citocines detectats eren més alts en relació els NCAD. Aquestes dades demostren el paper més proinflamatori del TAE, especialment, en els pacients amb CAD, tan a nivell basal com en la resposta inflamatòria amb LPS.

S'ha de tenir en compte que hem realitzat l'estimulació amb lligands TLR en la totalitat del TA, considerant que hem detectat diferents tipus de poblacions, l'aportació de cada un a la inflamació pot ser diferent. S'ha vist que tan els adipòcits com les cèl·lules presents en el SVF poden respondre als estímuls inflamatoris, però la contribució de cada qual encara no ha estat del tot establerta [475, 476]. Existeixen varis estudis que han indicat que els adipòcits després de l'estimulació amb LPS són capaços de secretar IL-6 i MCP-1 entre altres citocines però van ser incapaços de secretar TNF-α i IL-10 [477-479]. Aquestes dades indiquen que la secreció de TNF-α i IL-10 després de l'estimulació podria ser produïda per les cèl·lules no adiposes presents en el TA, per tant podem proposar que l'augment de la secreció de TNF-α i de IL-10 que observem en el TAE dels pacients amb CAD podria ser a causa de la resposta inflamatòria dels infiltrats cel·lulars. Aquests resultats donen suport al paper del TAE en la patologia de la aterosclerosi amb el perfil inflamatori més alt en els pacients amb CAD tan en condicions basals com després de l'estimulació amb lligands TLR.

En el cas de les adipocines es va veure que tan la adiponectina com la leptina es trobaven reprimides en el TAE després de l'estimulació amb lligands TLR amb significança estadística únicament en els pacients amb CAD, les nostres dades estan d'acord amb un estudi anterior que mostra que el LPS provoca disminució de les dues adipocines en TA visceral [170]. Tenint en compte que en condicions basals aquestes dues adipocines es trobaven disminuïdes en el TAE dels pacients amb CAD en relació els pacients NCAD seria indicatiu de que el TAE dels pacients amb CAD estaria patint un procés inflamatori.

Totes aquestes dades estarien indicant que tan el TAE com el TAS son capaços de respondre a estímuls inflamatoris, però en el cas del TAE aquesta resposta és més alta. A més en el TAE dels pacients amb CAD l'estimulació encara diferencia la producció d'algunes citocines i d'adipocines, indicant el perfil més proinflamatori dels pacients amb CAD tan en estat basal com després de l'estimulació amb lligands TLR.

6.2. Efecte de l'estimulació en la secreció de mediadors inflamatoris a nivell sistèmic

Es va analitzar la secreció de citocines i adipocines a nivell sistèmic en mostres de sang total després de l'estimulació amb lligands TLR en els dos tipus pacient. El anàlisi a nivell sistèmic, va mostrar que l'estimulació amb sang total provoca la producció de totes les citocines sense diferencies entre els pacients amb CAD i NCAD.

A més, es va observar que l'estimulació amb LPS augmenta la producció de resistina en els individus NCAD. Cal apuntar que els pacients amb CAD tenien nivells basal més alts de la resistina i que després de l'estimulació amb LPS, els nivells en els pacients amb CAD, encara que no augmentin la seva producció, segueixen sent més elevats en contraposició els NCAD. S'ha vist que en humans la resistina pot ser produïda pels monòcits de sang perifèrica i que el LPS és capaç d'induir la seva expressió [456, 480]. Considerant que els pacients amb CAD tenien nivells més alts de resistina i que la seva producció no es veu afectada per l'estimulació amb LPS podria ser a causa de que la producció de resistina ja es trobava induïda en els pacients amb CAD i que las sobre-estimulació no afectaria a la seva producció, sembla ser que els monòcits de sang perifèrica dels pacients amb CAD haguessin patit un procés de tolerància[481]. Aquestes dades reforcen el paper de la resistina en la patologia del CAD, ja que els nivells de resistina poden reflectir la inflamació sistèmica en els pacients i la gravetat de l'aterosclerosi a nivell sistèmic.

6.3. Efecte de l'estimulació en els STATs de TA

Es va mirar el grau d'activació dels factors de transcripció implicats en la transmissió de senyals per les citocines i adipocines després de l'estimulació amb lligands TLR. Es

va veure que l'estimulació afecta de forma diferent a les proteïnes STATs, ja que l'estimulació amb LPS però no amb FSL-1 va augmentar l'expressió de STAT1 en TA tan a nivell de proteïna total com de fosforilada, en canvi no es van observar variacions en els nivells de proteïna total o activada de STAT3 i STAT5. Cal destacar que aquest efecte es va observar tan en el TAE com en el TAS i tan en pacients amb CAD i NCAD, però com que en el TAE dels pacients amb CAD ja observàvem basalment augment de la fosforilació de STAT1 tot i que si que es veu un augment de la seva activació no arriba a la significança estadística.

Considerant que les nostres dades mostren que el TA es capaç de respondre a estímuls inflamatoris amb la secreció de citocines, junt amb al fet que també el factor de transcripció STAT1 pot respondre a l'estimulació amb LPS en el TA indicaria que possiblement estigui mediant la transducció de la senyalització durant la resposta immune. A més com que STAT1 i no STAT3 es activat després de l'estimulació recolza el paper antagonista que realitzen en el TA, ja que STAT1 participaria en la mediació de la resposta inflamatòria en canvi STAT3 estaria implicat en el control dels processos metabòlics.

6.4. Efecte de l'estimulació en la expressió gènica del TA

L'ús de microarrays per a l'estudi del TA estimulat amb LPS és una eina important per tal de poder determinar diferències en el perfil d'expressió entre teixits, estímuls i pacients amb aterosclerosi. Considerant que fins al moment hi ha pocs estudis comparatius entre teixits després de l'estimulació amb lligands TLR [474, 482] i en cap cas s'ha realitzat un anàlisis d'expressió gènica comparatiu entre el TAE i el TAS després de l'estimulació amb lligands TLR i el seu efecte en la patologia del CAD. Per tal de intentar dilucidar el possible paper diferencial dels dos tipus de teixit i la seva aportació en la patologia del CAD es van determinar el perfils d'expressió gènica després de l'estimulació amb lligands TLR de mostres aparellades de TAE i TAS de pacients amb CAD i NCAD.

La classificació funcional dels gens induïts en TA comuns entre pacients i teixits va revelar que casi la meitat de les categories funcionals estaven involucrades en la

resposta immunitzaria (immunitat i defensa, immunitat per macròfags, immunitat per citocines i quimiocines i cascada NF-kB, entre altres). Les nostres dades van mostrar que la magnitud de la resposta transcripcional en termes del nombre de gens regulats diferencialment amb l'estimulació amb LPS va ser més gran que la resposta transcripcional amb FSL-1 ja que vam detectar que en gairebé totes les categories funcionals es van reduir el nombre de gens estimulats amb FSL-1 en comparació amb el LPS.

Es va veure que tant el TAE com en el TAS comparteixen mecanismes de resposta comuns activats durant la inflamació, però es van observar diferencies en quant a la senyalització amb LPS i FSL-1. Concretament es va detectar que la via canònica de l'interferó es trobava afectada per LPS i no per FSL-1. A més, l'estimulació amb LPS, però no amb FSL-1, conduïa a l'expressió de IRF9 (ISGF3B), STAT1 i STAT2, molècules que estan involucrades en la via de senyalització per l'interferó de tipus I. Aquestes tres molècules formarien el complex ISGF3 implicat en la senyalització de la via del interferó a través dels elements de resposta d'interferó (IRSE). En el nostre estudi a més de veure l'expressió de les tres molècules que formen el complex ISGF3, també es va detectar augment de l'expressió de varis gens induïts per l'interferó que recolzen l'activació d'aquesta via per el LPS i no per el FSL-1. Prenent en conjunt els resultats, proposem que en el TA la presencia de LPS condueix a l'expressió primerenca i per tant en el nostre estudi no detectable de IFN-β a través de la via de senyalització MyD88 independent del TLR4 (gens del interferó tipus I), posteriorment el IFN-β podria activar la via de senyalització de JAK/STAT i formar el complex ISGF-3 i induir la transcripció de gens relacionats amb el interferó. Mentre que, per altra banda, els gens induïts tan per LPS com per FSL-1 van ser induïts presumiblement a traves de la senyalització del TLR4 i del TLR2/6 respectivament a traves de la via de senyalització MyD88 depenent (NF-kB). Aquestes dades indiquen que el TA és capaç de respondre de manera convencional els estímuls inflamatoris com els altres tipus cel·lulars, responent amb els factors i amb les vies ja descrites per la resposta immune[141, 142, 146, 147]. Tot i que el TAV i per extensió el TAE s'ha considerat un teixit més actiu en la inflamació, estudis anteriors han demostrat que la resposta inflamatòria induïda en el TAS l'aproxima a un fenotip similar al TAV [483, 484]. Les nostres dades indiquen que tan el TAS com el TAE a nivell d'expressió gènica són

capaços de respondre als estímuls inflamatoris però a nivell proteic veiem que quantitativament el TAE és més actiu que el TAS en la secreció de mediadors inflamatoris.

Per altra banda el anàlisis funcional dels gens reprimits va revelar diferencies entre els gens reprimits en el TAE i el TAS, ja que els grups funcionals relacionats amb el metabolisme (metabolisme dels carbohidrats i metabolisme dels lípids, dels àcids grassos i dels esteroides) es van trobar més reprimits en el TAE amb ambdós lligands TLR. A més, es va observar que tots aquest gens funcionalment relacionats amb el metabolisme estaven inclosos en la xarxa integrada del PPAR-γ. El PPAR-γ és un factor transcripcional inductor essencial per l'adipogènesi i controla nombrosos gens importants en el metabolisme dels lípids i de la glucosa) [83-85]. El TAV i per extensió el TAE, s'ha considerat que té menor capacitat de adipogènesi i menor expressió de gens lipogènics que el TAS ja que aquest últim és considerat el lloc acumulació de greix normal en condicions fisiològiques i que quan aquest es sobrepassat es comença a acumular en el TAV [205, 206]. La disminució dels gens lipogènics i adipogènics en el TAE després de l'estimulació amb lligands TLR seria un mecanisme de defensa contra l'expansió d'aquest teixit. Per altra banda, la disminució dels gens lipogènics, més aguda en el TAE, a més, també podria estar associada a un augment de la inflamació. Això està d'acord amb estudis anteriors que indiquen que un augment de la inflamació s'acompanya d'una disminució de la lipogènesi [485]. Una interpretació fisiològica podria ser que més cèl·lules es canvien d'un fenotip d'emmagatzematge a un de tipus inflamatori amb el manteniment de la inflamació crònica que portaria al desequilibri funcional i al desenvolupament de patologies com la aterosclerosi.

El pas de un fenotip de metabòlic a inflamatori es pot també observar en la diferent resposta transcripcional entre els individus amb CAD i NCAD, ja que l'anàlisi funcional dels gens induïts tan a nivell basal com després de l'estimulació amb lligands TLR va mostrar que els pacients amb CAD s'induïen més gens relacionats funcionalment amb la immunitat i per altra banda els individus NCAD inclouen més gens induïts relacionats en el metabolisme.

En concordança amb això, veiem que tan el TAE com el TAS són capaços de respondre de manera adequada a l'estimulació dels lligands TLR, encara que el TAE mostra un perfil més inflamatori i disminució de l'expressió de gens relacionats amb el metabolisme. Per altra banda hem vist que la presència de cèl·lules immunes en el TAE dels pacients amb CAD pot alterar el metabolisme normal amb major producció de citocines inflamatòries, menor producció de adipocines i diferent activació dels STATs. Aquestes dades semblen indicar que en el TAE dels pacients amb CAD l'augment de l'estat inflamatori provocaria una disminució de l'activitat metabòlica normal. En conclusió, sembla que l'estimulació del TAE aproparia els mecanismes fisiològics que ocorrien en la patologia de l'aterosclerosi. Aquestes dades recolzen la idea que el TAE dels pacients amb CAD estaria amb un estat de inflamació que es caracteritzaria per l'augment de les respostes immunes i una disminució de l'activitat metabòlica normal.

CONCLUSIONS

1. El TAE dels pacients amb CAD presenta importants infiltrats compostos per limfòcits B i limfòcits T (CD4+ i CD8+) i un major número de macròfags comparat els individus NCAD.

2. El TAE dels pacients amb CAD presenta més producció de citocines inflamatòries (TNF-α, MCP-1 i IL-6) i menys producció de adiponectina i leptina comparat els individus NCAD.

3. Els pacients amb CAD presenten nivells sistèmics d'adiponectina més baixos i nivells de resistina més alts comparat els individus NCAD. En canvi no es detecten diferencies entre la producció de citocines entre els dos pacients.

4. En el TAE dels pacients amb CAD els nivells d'activació basals de STAT1 es troben més elevats i els nivells d'activació basals de STAT3 es troben més baixos comparat els individus NCAD. A més, l'activació de STAT1 concretament es dona en les cèl·lules que componen els infiltrats.

5. Es detecten per immunohistoquímica presencia de cèl·lules mesotelials en el TAE. S'observa major expressió gènica de IL18, IL13-RA2, de queratines (KRT7, KRT8, KRT18, KRT19) i de microRNAs (MIR-492 i MIR-622) en el TAE dels pacients amb CAD que reforcen la implicació de les cèl·lules mesotelials en la regulació del TAE i la seva implicació en la patologia CAD.

6. En el TAS dels pacients amb CAD s'observa menor expressió de varis membres de la família de RNAs petits nucleolar (snoRNAs):SNORD i SNORA.

7. S'observa un perfil més proinflamatori del TAE en comparació el TAS, més marcat en els pacients amb CAD, tan a nivell basal com desprès de la resposta inflamatòria induïda pel lligands TLR:

    a. El TA respon a l'estimulació amb lligands TLR amb un augment de la producció de citocines inflamatòries (IL-6, IL-10, MCP-1 i TNF-α).

b. La secreció de citocines inflamatòries desprès de l'estimulació amb lligands TLR és més alta en el TAE que en el TAS.

c. Els pacients amb CAD desprès de l'estimulació amb LPS presenten major producció de IL10 i TNF-α comparat els individus NCAD.

d. La producció de leptina i adiponectina es troba reprimida en el TAE del pacients amb CAD desprès de l'estimulació amb LPS.

8. L'estimulació de sang total amb lligands TLR indueix la producció de citocines inflamatòries (IL-6, IL-10, MCP-1 i TNF-α) en els dos tipus de pacients i en els individus NCAD veiem que indueix la secreció de resistina

9. L'estimulació del TA augmenta la producció de STAT1 tan a nivell de proteïna total com de fosforilada, en canvi no s'observen variacions en els nivells de STAT3.

10. L'efecte de l'estimulació del TA a nivell d'expressió gènica mostra:

a. La via canònica de l'interferó es trobava induïda exclusivament per LPS i no per FSL-1.

b. La xarxa integrada del PPAR-γ es troba reprimida exclusivament en el TAE i no en el TAS.

c. Els pacients amb CAD mostren que els gens induïts tan a nivell basal com desprès de l'estimulació amb lligands TLR estan relacionats funcionalment amb la immunitat i per altra banda els individus NCAD inclouen gens induïts relacionats en el metabolisme.

BIBLIOGRAFIA

1. Ottaviani, E., D. Malagoli, and C. Franceschi, *The evolution of the adipose tissue: a neglected enigma.* Gen Comp Endocrinol, 2011. **174**(1): p. 1-4.

2. Mariman, E.C. and P. Wang, *Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and role in obesity.* Cell Mol Life Sci, 2010. **67**(8): p. 1277-92.

3. Cannon, B. and J. Nedergaard, *Brown adipose tissue: function and physiological significance.* Physiol Rev, 2004. **84**(1): p. 277-359.

4. Fonseca-Alaniz, M.H., et al., *Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice.* J Pediatr (Rio J), 2007. **83**(5 Suppl): p. S192-203.

5. Fain, J.N., et al., *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**(5): p. 2273-82.

6. Fruhbeck, G., et al., *The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2001. **280**(6): p. E827-47.

7. Wronska, A. and Z. Kmiec, *Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots.* Acta Physiol (Oxf), 2012. **205**(2): p. 194-208.

8. Lee, M.J., Y. Wu, and S.K. Fried, *Adipose tissue heterogeneity: implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications.* Mol Aspects Med, 2013. **34**(1): p. 1-11.

9. Skurk, T., et al., *Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion.* J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(3): p. 1023-33.

10. Sbarbati, A., et al., *Subcutaneous adipose tissue classification.* Eur J Histochem. **54**(4): p. e48.

11. Ouchi, N., et al., *Adipokines in inflammation and metabolic disease.* Nat Rev Immunol, 2010. **11**(2): p. 85-97.

12. Yarak, S. and O.K. Okamoto, *Human adipose-derived stem cells: current challenges and clinical perspectives.* An Bras Dermatol. **85**(5): p. 647-56.

13. Anderson, E.K., D.A. Gutierrez, and A.H. Hasty, *Adipose tissue recruitment of leukocytes.* Curr Opin Lipidol. **21**(3): p. 172-7.

14. Miller, N.E., et al., *Secretion of adipokines by human adipose tissue in vivo: partitioning between capillary and lymphatic transport.* Am J Physiol Endocrinol Metab. **301**(4): p. E659-67.

15. Bartness, T.J. and C.K. Song, *Brain-adipose tissue neural crosstalk.* Physiol Behav, 2007. **91**(4): p. 343-51.

16. Ohsaki, Y., et al., *Biogenesis of cytoplasmic lipid droplets: from the lipid ester globule in the membrane to the visible structure.* Biochim Biophys Acta, 2009. **1791**(6): p. 399-407.

17. Verstraeten, V.L., et al., *Reorganization of the nuclear lamina and cytoskeleton in adipogenesis.* Histochem Cell Biol. **135**(3): p. 251-61.

18. Sato, K., H. Umeno, and T. Nakashima, *Histological investigation of liposuctioned fat for injection laryngoplasty.* Am J Otolaryngol, 2005. **26**(4): p. 219-25.

19. Deveaud, C., et al., *Regional differences in oxidative capacity of rat white adipose tissue are linked to the mitochondrial content of mature adipocytes.* Mol Cell Biochem, 2004. **267**(1-2): p. 157-66.

20. Suganami, T. and Y. Ogawa, *Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling.* J Leukoc Biol. **88**(1): p. 33-9.

21. Lafontan, M., *Advances in adipose tissue metabolism.* Int J Obes (Lond), 2008. **32 Suppl 7**: p. S39-51.

22. Miyazaki, Y., et al., *Abdominal fat distribution and peripheral and hepatic insulin resistance in type 2 diabetes mellitus.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002. **283**(6): p. E1135-43.

23. Letexier, D., et al., *Comparison of the expression and activity of the lipogenic pathway in human and rat adipose tissue.* J Lipid Res, 2003. **44**(11): p. 2127-34.

24. Shrago, E., T. Spennetta, and E. Gordon, *Fatty acid synthesis in human adipose tissue.* J Biol Chem, 1969. **244**(10): p. 2761-6.

25. Shrago, E., J.A. Glennon, and E.S. Gordon, *Comparative aspects of lipogenesis in mammalian tissues.* Metabolism, 1971. **20**(1): p. 54-62.

26. Angel, A. and G.A. Bray, *Synthesis of fatty acids and cholesterol by liver, adipose tissue and intestinal mucosa from obese and control patients.* Eur J Clin Invest, 1979. **9**(5): p. 355-62.

27. Castle, J.C., et al., *ACC2 is expressed at high levels in human white adipose and has an isoform with a novel N-terminus [corrected].* PLoS One, 2009. **4**(2): p. e4369.

28. Sjostrom, L., *Fatty acid synthesis de novo in adipose tissue from obese subjects on a hypercaloric high-carbohydrate diet.* Scand J Clin Lab Invest, 1973. **32**(4): p. 339-49.

29. Bjorntorp, P. and L. Sjostrom, *Carbohydrate storage in man: speculations and some quantitative considerations.* Metabolism, 1978. **27**(12 Suppl 2): p. 1853-65.

30. Proenca, A.R., et al., *New concepts in white adipose tissue physiology.* Braz J Med Biol Res, 2014. **47**(3): p. 192-205.

31. Jensen, M.V., et al., *Metabolic cycling in control of glucose-stimulated insulin secretion.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008. **295**(6): p. E1287-97.

32. Mead, J.R., S.A. Irvine, and D.P. Ramji, *Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease.* J Mol Med (Berl), 2002. **80**(12): p. 753-69.

33. Abumrad, N.A., et al., *Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36.* J Biol Chem, 1993. **268**(24): p. 17665-8.

34. Schaffer, J.E. and H.F. Lodish, *Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein.* Cell, 1994. **79**(3): p. 427-36.

35. Isola, L.M., et al., *3T3 fibroblasts transfected with a cDNA for mitochondrial aspartate aminotransferase express plasma membrane fatty acid-binding protein and saturable fatty acid uptake.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(21): p. 9866-70.

36. Reshef, L., et al., *Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle.* J Biol Chem, 2003. **278**(33): p. 30413-6.

37. Hanson, R.W. and L. Reshef, *Glyceroneogenesis revisited.* Biochimie, 2003. **85**(12): p. 1199-205.

38. Yang, J., S.C. Kalhan, and R.W. Hanson, *What is the metabolic role of phosphoenolpyruvate carboxykinase?* J Biol Chem, 2009. **284**(40): p. 27025-9.

39. Nye, C.K., R.W. Hanson, and S.C. Kalhan, *Glyceroneogenesis is the dominant pathway for triglyceride glycerol synthesis in vivo in the rat.* J Biol Chem, 2008. **283**(41): p. 27565-74.

40. Gorin, E., Z. Tal-Or, and E. Shafrir, *Glyceroneogenesis in adipose tissue of fasted, diabetic and triamcinolone treated rats.* Eur J Biochem, 1969. **8**(3): p. 370-5.

41. Reshef, L., R.W. Hanson, and F.J. Ballard, *Glyceride-glycerol synthesis from pyruvate. Adaptive changes in phosphoenolpyruvate carboxykinase and pyruvate carboxylase in adipose tissue and liver.* J Biol Chem, 1969. **244**(8): p. 1994-2001.

42. Ballard, F.J., R.W. Hanson, and G.A. Leveille, *Phosphoenolpyruvate carboxykinase and the synthesis of glyceride-glycerol from pyruvate in adipose tissue.* J Biol Chem, 1967. **242**(11): p. 2746-50.

43. Reshef, L., R.W. Hanson, and F.J. Ballard, *A possible physiological role for glyceroneogenesis in rat adipose tissue.* J Biol Chem, 1970. **245**(22): p. 5979-84.

44. Frayn, K.N., *Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux.* Diabetologia, 2002. **45**(9): p. 1201-10.

45. Cases, S., et al., *Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(22): p. 13018-23.

46. Cases, S., et al., *Cloning of DGAT2, a second mammalian diacylglycerol acyltransferase, and related family members.* J Biol Chem, 2001. **276**(42): p. 38870-6.

47. Agarwal, A.K. and A. Garg, *Congenital generalized lipodystrophy: significance of triglyceride biosynthetic pathways.* Trends Endocrinol Metab, 2003. **14**(5): p. 214-21.

48. Leung, D.W., *The structure and functions of human lysophosphatidic acid acyltransferases.* Front Biosci, 2001. **6**: p. D944-53.

49. Bell, R.M. and R.A. Coleman, *Enzymes of glycerolipid synthesis in eukaryotes.* Annu Rev Biochem, 1980. **49**: p. 459-87.

50. Pages, C., et al., *Lysophosphatidic acid synthesis and release.* Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2001. **64**(1-4): p. 1-10.

51. Hla, T., et al., *Lysophospholipids--receptor revelations.* Science, 2001. **294**(5548): p. 1875-8.

52. Fang, Y., et al., *Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling.* Science, 2001. **294**(5548): p. 1942-5.

53. Sprong, H., P. van der Sluijs, and G. van Meer, *How proteins move lipids and lipids move proteins.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(7): p. 504-13.

54. Zimmermann, R., et al., *Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase.* Science, 2004. **306**(5700): p. 1383-6.

55. Haemmerle, G., et al., *Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis.* J Biol Chem, 2002. **277**(7): p. 4806-15.

56. Osuga, J., et al., *Targeted disruption of hormone-sensitive lipase results in male sterility and adipocyte hypertrophy, but not in obesity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(2): p. 787-92.

57. Karlsson, M., et al., *cDNA cloning, tissue distribution, and identification of the catalytic triad of monoglyceride lipase. Evolutionary relationship to esterases, lysophospholipases, and haloperoxidases.* J Biol Chem, 1997. **272**(43): p. 27218-23.

58. Lafontan, M. and M. Berlan, *Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function.* J Lipid Res, 1993. **34**(7): p. 1057-91.

59. Degerman, E., P. Belfrage, and V.C. Manganiello, *Structure, localization, and regulation of cGMP-inhibited phosphodiesterase (PDE3).* J Biol Chem, 1997. **272**(11): p. 6823-6.

60. Lass, A., et al., *Lipolysis - a highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores.* Prog Lipid Res, 2011. **50**(1): p. 14-27.

61. Zechner, R., et al., *FAT SIGNALS--lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling.* Cell Metab, 2012. **15**(3): p. 279-91.

62. Karlsson, M., H. Tornqvist, and C. Holm, *Expression, purification, and characterization of histidine-tagged mouse monoglyceride lipase from baculovirus-infected insect cells.* Protein Expr Purif, 2000. **18**(3): p. 286-92.

63. Kishida, K., et al., *Genomic structure and insulin-mediated repression of the aquaporin adipose (AQPap), adipose-specific glycerol channel.* J Biol Chem, 2001. **276**(39): p. 36251-60.

64. Rodriguez, A., et al., *Aquaglyceroporins serve as metabolic gateways in adiposity and insulin resistance control.* Cell Cycle, 2011. **10**(10): p. 1548-56.

65. Abumrad, N., C. Harmon, and A. Ibrahimi, *Membrane transport of long-chain fatty acids: evidence for a facilitated process.* J Lipid Res, 1998. **39**(12): p. 2309-18.

66. Fisher, R.M., et al., *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**(1-2): p. 95-100.

67. Potter, B.J., D. Sorrentino, and P.D. Berk, *Mechanisms of cellular uptake of free fatty acids.* Annu Rev Nutr, 1989. **9**: p. 253-70.

68. Lafontan, M. and D. Langin, *Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue.* Prog Lipid Res, 2009. **48**(5): p. 275-97.

69. Ahmadian, M., Y. Wang, and H.S. Sul, *Lipolysis in adipocytes.* Int J Biochem Cell Biol, 2010. **42**(5): p. 555-9.

70. Ceddia, R.B., *Direct metabolic regulation in skeletal muscle and fat tissue by leptin: implications for glucose and fatty acids homeostasis.* Int J Obes (Lond), 2005. **29**(10): p. 1175-83.

71. Macfarlane, D.P., S. Forbes, and B.R. Walker, *Glucocorticoids and fatty acid metabolism in humans: fuelling fat redistribution in the metabolic syndrome.* J Endocrinol, 2008. **197**(2): p. 189-204.

72. Lee, M.J., Y. Wu, and S.K. Fried, *Adipose tissue remodeling in pathophysiology of obesity.* Curr Opin Clin Nutr Metab Care. **13**(4): p. 371-6.

73. Arner, P., et al., *Dynamics of human adipose lipid turnover in health and metabolic disease.* Nature. **478**(7367): p. 110-3.

74. Spalding, K.L., et al., *Dynamics of fat cell turnover in humans.* Nature, 2008. **453**(7196): p. 783-7.

75. Gregoire, F.M., C.M. Smas, and H.S. Sul, *Understanding adipocyte differentiation.* Physiol Rev, 1998. **78**(3): p. 783-809.

76. Desai, M., M. Beall, and M.G. Ross, *Developmental origins of obesity: programmed adipogenesis.* Curr Diab Rep, 2013. **13**(1): p. 27-33.

77. Ali, A.T., et al., *Adipocyte and adipogenesis.* Eur J Cell Biol, 2013. **92**(6-7): p. 229-36.

78. Tang, Q.Q. and M.D. Lane, *Adipogenesis: from stem cell to adipocyte.* Annu Rev Biochem, 2012. **81**: p. 715-36.

79. Student, A.K., R.Y. Hsu, and M.D. Lane, *Induction of fatty acid synthetase synthesis in differentiating 3T3-L1 preadipocytes.* J Biol Chem, 1980. **255**(10): p. 4745-50.

80. Tanaka, T., et al., *Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene.* EMBO J, 1997. **16**(24): p. 7432-43.

81. Clarke, S.L., C.E. Robinson, and J.M. Gimble, *CAAT/enhancer binding proteins directly modulate transcription from the peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 promoter.* Biochem Biophys Res Commun, 1997. **240**(1): p. 99-103.

82. Tontonoz, P., E. Hu, and B.M. Spiegelman, *Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor.* Cell, 1994. **79**(7): p. 1147-56.

83. Tontonoz, P., E. Hu, and B.M. Spiegelman, *Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator activated receptor gamma.* Curr Opin Genet Dev, 1995. **5**(5): p. 571-6.

84. Schoonjans, K., et al., *PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene.* EMBO J, 1996. **15**(19): p. 5336-48.

85. Sato, O., et al., *Dual promoter structure of mouse and human fatty acid translocase/CD36 genes and unique transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma ligands.* J Biol Chem, 2002. **277**(18): p. 15703-11.

86. Matsusue, K., et al., *Liver-specific disruption of PPARgamma in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes.* J Clin Invest, 2003. **111**(5): p. 737-47.

87. Yamauchi, T., et al., *The mechanisms by which both heterozygous peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) deficiency and PPARgamma agonist improve insulin resistance.* J Biol Chem, 2001. **276**(44): p. 41245-54.

88. Festuccia, W.T., et al., *The PPARgamma agonist rosiglitazone enhances rat brown adipose tissue lipogenesis from glucose without altering glucose uptake.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2009. **296**(5): p. R1327-35.

89. Tontonoz, P., et al., *PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene.* Mol Cell Biol, 1995. **15**(1): p. 351-7.

90. Patsouris, D., et al., *PPARalpha governs glycerol metabolism.* J Clin Invest, 2004. **114**(1): p. 94-103.

91. Kishida, K., et al., *Enhancement of the aquaporin adipose gene expression by a peroxisome proliferator-activated receptor gamma.* J Biol Chem, 2001. **276**(51): p. 48572-9.

92. Guan, H.P., et al., *Corepressors selectively control the transcriptional activity of PPARgamma in adipocytes.* Genes Dev, 2005. **19**(4): p. 453-61.

93. Ribon, V., et al., *Thiazolidinediones and insulin resistance: peroxisome proliferatoractivated receptor gamma activation stimulates expression of the CAP gene.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(25): p. 14751-6.

94. Festuccia, W.T., et al., *PPARgamma agonism increases rat adipose tissue lipolysis, expression of glyceride lipases, and the response of lipolysis to hormonal control.* Diabetologia, 2006. **49**(10): p. 2427-36.

95. Guan, H.P., et al., *A futile metabolic cycle activated in adipocytes by antidiabetic agents.* Nat Med, 2002. **8**(10): p. 1122-8.

96. Hollenberg, A.N., et al., *Functional antagonism between CCAAT/Enhancer binding protein-alpha and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma on the leptin promoter.* J Biol Chem, 1997. **272**(8): p. 5283-90.

97. Steppan, C.M., et al., *The hormone resistin links obesity to diabetes.* Nature, 2001. **409**(6818): p. 307-12.

98. Peraldi, P., M. Xu, and B.M. Spiegelman, *Thiazolidinediones block tumor necrosis factor-alpha-induced inhibition of insulin signaling.* J Clin Invest, 1997. **100**(7): p. 1863-9.

99. Iwaki, M., et al., *Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors.* Diabetes, 2003. **52**(7): p. 1655-63.

100. Osborne, T.F., *Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): key regulators of nutritional homeostasis and insulin action.* J Biol Chem, 2000. **275**(42): p. 32379-82.

101. Tontonoz, P., et al., *ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation.* Mol Cell Biol, 1993. **13**(8): p. 4753-9.

102. Kim, J.B. and B.M. Spiegelman, *ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism.* Genes Dev, 1996. **10**(9): p. 1096-107.

103. Tabor, D.E., et al., *Identification of conserved cis-elements and transcription factors required for sterol-regulated transcription of stearoyl-CoA desaturase 1 and 2.* J Biol Chem, 1999. **274**(29): p. 20603-10.

104. Cao, R., et al., *Leptin induces vascular permeability and synergistically stimulates angiogenesis with FGF-2 and VEGF.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(11): p. 6390-5.

105. Adamczak, M. and A. Wiecek, *The adipose tissue as an endocrine organ.* Semin Nephrol, 2013. **33**(1): p. 2-13.

106. Fain, J.N., *Release of inflammatory mediators by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily by the nonfat cells: a review.* Mediators Inflamm, 2010. **2010**: p. 513948.

107. Xu, P., et al., *Leptin and zeranol up-regulate cyclin D1 expression in primary cultured normal human breast pre-adipocytes.* Mol Med Rep, 2010. **3**(6): p. 983-90.

108. Kershaw, E.E. and J.S. Flier, *Adipose tissue as an endocrine organ.* J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(6): p. 2548-56.

109. Vidal, H., et al., *The expression of ob gene is not acutely regulated by insulin and fasting in human abdominal subcutaneous adipose tissue.* J Clin Invest, 1996. **98**(2): p. 251-5.

110. Zha, J.M., et al., *Comparison of gene transcription between subcutaneous and visceral adipose tissue in Chinese adults.* Endocr J, 2009. **56**(8): p. 935-44.

111. Campfield, L.A., et al., *Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks.* Science, 1995. **269**(5223): p. 546-9.

112. Vong, L., et al., *Leptin action on GABAergic neurons prevents obesity and reduces inhibitory tone to POMC neurons.* Neuron, 2011. **71**(1): p. 142-54.

113. Berglund, E.D., et al., *Direct leptin action on POMC neurons regulates glucose homeostasis and hepatic insulin sensitivity in mice.* J Clin Invest, 2012. **122**(3): p. 1000-9.

114. Bornstein, S.R., et al., *Immunohistochemical and ultrastructural localization of leptin and leptin receptor in human white adipose tissue and differentiating human adipose cells in primary culture.* Diabetes, 2000. **49**(4): p. 532-8.

115. Hoggard, N., et al., *Localization of leptin receptor mRNA splice variants in murine peripheral tissues by RT-PCR and in situ hybridization.* Biochem Biophys Res Commun, 1997. **232**(2): p. 383-7.

116. Buettner, C., et al., *Critical role of STAT3 in leptin's metabolic actions.* Cell Metab, 2006. **4**(1): p. 49-60.

117. Fruhbeck, G., *Intracellular signalling pathways activated by leptin.* Biochem J, 2006. **393**(Pt 1): p. 7-20.

118. Bates, S.H., et al., *STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction.* Nature, 2003. **421**(6925): p. 856-9.

119. Harris, R.B., *Direct and indirect effects of leptin on adipocyte metabolism.* Biochim Biophys Acta, 2014. **1842**(3): p. 414-23.

120. Wang, M.Y., Y. Lee, and R.H. Unger, *Novel form of lipolysis induced by leptin.* J Biol Chem, 1999. **274**(25): p. 17541-4.

121. Bai, Y., et al., *Obese gene expression alters the ability of 30A5 preadipocytes to respond to lipogenic hormones.* J Biol Chem, 1996. **271**(24): p. 13939-42.

122. Ceddia, R.B., et al., *Leptin stimulates uncoupling protein-2 mRNA expression and Krebs cycle activity and inhibits lipid synthesis in isolated rat white adipocytes.* Eur J Biochem, 2000. **267**(19): p. 5952-8.

123. Muller, G., et al., *Leptin impairs metabolic actions of insulin in isolated rat adipocytes.* J Biol Chem, 1997. **272**(16): p. 10585-93.

124. Fruhbeck, G., M. Aguado, and J.A. Martinez, *In vitro lipolytic effect of leptin on mouse adipocytes: evidence for a possible autocrine/paracrine role of leptin.* Biochem Biophys Res Commun, 1997. **240**(3): p. 590-4.

125. Scherer, P.E., et al., *A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes.* J Biol Chem, 1995. **270**(45): p. 26746-9.

126. Hu, E., P. Liang, and B.M. Spiegelman, *AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity.* J Biol Chem, 1996. **271**(18): p. 10697-703.

127. Mattu, H.S. and H.S. Randeva, *Role of adipokines in cardiovascular disease.* J Endocrinol, 2013. **216**(1): p. T17-36.

128. Kadowaki, T. and T. Yamauchi, *Adiponectin and adiponectin receptors.* Endocr Rev, 2005. **26**(3): p. 439-51.

129. Li, W., et al., *Insulin-sensitizing effects of thiazolidinediones are not linked to adiponectin receptor expression in human fat or muscle.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. **292**(5): p. E1301-7.

130. Yamauchi, T., et al., *The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity.* Nat Med, 2001. **7**(8): p. 941-6.

131. Ceddia, R.B., et al., *Globular adiponectin increases GLUT4 translocation and glucose uptake but reduces glycogen synthesis in rat skeletal muscle cells.* Diabetologia, 2005. **48**(1): p. 132-9.

132. Winder, W.W. and D.G. Hardie, *AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes.* Am J Physiol, 1999. **277**(1 Pt 1): p. E1-10.

133. Lochhead, P.A., et al., *5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside mimics the effects of insulin on the expression of the 2 key gluconeogenic genes PEPCK and glucose-6-phosphatase.* Diabetes, 2000. **49**(6): p. 896-903.

134. Hector, J., et al., *TNF-alpha alters visfatin and adiponectin levels in human fat.* Horm Metab Res, 2007. **39**(4): p. 250-5.

135. Dietze-Schroeder, D., et al., *Autocrine action of adiponectin on human fat cells prevents the release of insulin resistance-inducing factors.* Diabetes, 2005. **54**(7): p. 2003-11.

136. Galic, S., J.S. Oakhill, and G.R. Steinberg, *Adipose tissue as an endocrine organ.* Mol Cell Endocrinol, 2010. **316**(2): p. 129-39.

137. Steppan, C.M., et al., *Activation of SOCS-3 by resistin.* Mol Cell Biol, 2005. **25**(4): p. 1569-75.

138. Banerjee, R.R., et al., *Regulation of fasted blood glucose by resistin.* Science, 2004. **303**(5661): p. 1195-8.

139. Sheng, C.H., et al., *Resistin is expressed in human hepatocytes and induces insulin resistance.* Endocrine, 2008. **33**(2): p. 135-43.

140. Qi, Y., et al., *Loss of resistin improves glucose homeostasis in leptin deficiency.* Diabetes, 2006. **55**(11): p. 3083-90.

141. Kawai, T. and S. Akira, *The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors.* Nat Immunol, 2010. **11**(5): p. 373-84.

142. Medzhitov, R., *Toll-like receptors and innate immunity.* Nat Rev Immunol, 2001. **1**(2): p. 135-45.

143. Doyle, S.L. and L.A. O'Neill, *Toll-like receptors: from the discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity.* Biochem Pharmacol, 2006. **72**(9): p. 1102-13.

144. Shamsul, H.M., et al., *The Toll-like receptor 2 (TLR2) ligand FSL-1 is internalized via the clathrin-dependent endocytic pathway triggered by CD14 and CD36 but not by TLR2.* Immunology, 2010. **130**(2): p. 262-72.

145. Kanczkowski, W., et al., *Toll-like receptors in endocrine disease and diabetes.* Neuroimmunomodulation, 2008. **15**(1): p. 54-60.

146. Parker, L.C., L.R. Prince, and I. Sabroe, *Translational mini-review series on Toll-like receptors: networks regulated by Toll-like receptors mediate innate and adaptive immunity.* Clin Exp Immunol, 2007. **147**(2): p. 199-207.

147. Fresno, M., R. Alvarez, and N. Cuesta, *Toll-like receptors, inflammation, metabolism and obesity.* Arch Physiol Biochem, 2011. **117**(3): p. 151-64.

148. Takeda, K. and S. Akira, *Toll-like receptors in innate immunity.* Int Immunol, 2005. **17**(1): p. 1-14.

149. Kopp, A., et al., *Innate immunity and adipocyte function: ligand-specific activation of multiple Toll-like receptors modulates cytokine, adipokine, and chemokine secretion in adipocytes.* Obesity (Silver Spring), 2009. **17**(4): p. 648-56.

150. Vitseva, O.I., et al., *Inducible Toll-like receptor and NF-kappaB regulatory pathway expression in human adipose tissue.* Obesity (Silver Spring), 2008. **16**(5): p. 932-7.

151. Creely, S.J., et al., *Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. **292**(3): p. E740-7.

152. Kopp, A., et al., *Toll-like receptor ligands cause proinflammatory and prodiabetic activation of adipocytes via phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase and c-Jun N-terminal kinase but not interferon regulatory factor-3.* Endocrinology, 2010. **151**(3): p. 1097-108.

153. Andreasen, A.S., et al., *Human endotoxemia as a model of systemic inflammation.* Curr Med Chem, 2008. **15**(17): p. 1697-705.

154. Hardardottir, I., C. Grunfeld, and K.R. Feingold, *Effects of endotoxin on lipid metabolism.* Biochem Soc Trans, 1995. **23**(4): p. 1013-8.

155. Khovidhunkit, W., et al., *Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host.* J Lipid Res, 2004. **45**(7): p. 1169-96.

156. Memon, R.A., et al., *Regulation of fatty acid transport protein and fatty acid translocase mRNA levels by endotoxin and cytokines.* Am J Physiol, 1998. **274**(2 Pt 1): p. E210-7.

157. Memon, R.A., et al., *In vivo regulation of acyl-CoA synthetase mRNA and activity by endotoxin and cytokines.* Am J Physiol, 1998. **275**(1 Pt 1): p. E64-72.

158. Feingold, K.R., et al., *Endotoxin rapidly induces changes in lipid metabolism that produce hypertriglyceridemia: low doses stimulate hepatic triglyceride production while high doses inhibit clearance.* J Lipid Res, 1992. **33**(12): p. 1765-76.

159. Lu, B., et al., *Type II nuclear hormone receptors, coactivator, and target gene repression in adipose tissue in the acute-phase response.* J Lipid Res, 2006. **47**(10): p. 2179-90.

160. Poulain-Godefroy, O. and P. Froguel, *Preadipocyte response and impairment of differentiation in an inflammatory environment.* Biochem Biophys Res Commun, 2007. **356**(3): p. 662-7.

161. Poulain-Godefroy, O., et al., *Inflammatory role of Toll-like receptors in human and murine adipose tissue.* Mediators Inflamm, 2010. **2010**: p. 823486.

162. Lu, S.C., et al., *Lipopolysaccharide increases resistin gene expression in vivo and in vitro.* FEBS Lett, 2002. **530**(1-3): p. 158-62.

163. Szalowska, E., et al., *Resistin is more abundant in liver than adipose tissue and is not up-regulated by lipopolysaccharide.* J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(8): p. 3051-7.

164. Francis, J., et al., *Systemic administration of lipopolysaccharide increases plasma leptin levels: blockade by soluble interleukin-1 receptor.* Endocrine, 1999. **10**(3): p. 291-5.

165. Mastronardi, C.A., et al., *Lipopolysaccharide-induced leptin release is neurally controlled.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(25): p. 14720-5.

166. Lappas, M., et al., *Release and regulation of leptin, resistin and adiponectin from human placenta, fetal membranes, and maternal adipose tissue and skeletal muscle from normal and gestational diabetes mellitus-complicated pregnancies.* J Endocrinol, 2005. **186**(3): p. 457-65.

167. Daniel, J.A., et al., *Leptin, tumor necrosis factor-alpha (TNF), and CD14 in ovine adipose tissue and changes in circulating TNF in lean and fat sheep.* J Anim Sci, 2003. **81**(10): p. 2590-9.

168. Soliman, M., et al., *Plasma leptin responses to lipopolysaccharide and tumor necrosis factor alpha in cows.* Jpn J Vet Res, 2002. **50**(2-3): p. 107-14.

169. Hoareau, L., et al., *Effect of PEA on LPS inflammatory action in human adipocytes.* Cytokine, 2006. **34**(5-6): p. 291-6.

170. Dermitzaki, E., et al., *Corticotrophin-Releasing Factor (CRF) and the urocortins are potent regulators of the inflammatory phenotype of human and mouse white adipocytes and the differentiation of mouse 3T3L1 pre-adipocytes.* PLoS One, 2014. **9**(5): p. e97060.

171. Bruun, J.M., et al., *Effects of pro-inflammatory cytokines and chemokines on leptin production in human adipose tissue in vitro.* Mol Cell Endocrinol, 2002. **190**(1-2): p. 91-9.

172. Simons, P.J., et al., *Pro-inflammatory delipidizing cytokines reduce adiponectin secretion from human adipocytes without affecting adiponectin oligomerization.* J Endocrinol, 2007. **192**(2): p. 289-99.

173. Xu, D., et al., *JAK-STAT in lipid metabolism of adipocytes.* JAKSTAT, 2013. **2**(4): p. e27203.

174. Hellgren, G., et al., *Growth hormone receptor interaction with Jak proteins differs between tissues.* J Interferon Cytokine Res, 2001. **21**(2): p. 75-83.

175. Kim, H.S., et al., *Oleanolic acid suppresses resistin induction in adipocytes by modulating Tyk-STAT signaling.* Nutr Res, 2013. **33**(2): p. 144-53.

176. Stephens, J.M., R.F. Morrison, and P.F. Pilch, *The expression and regulation of STATs during 3T3-L1 adipocyte differentiation.* J Biol Chem, 1996. **271**(18): p. 10441-4.

177. Chakrabarti, S.K., et al., *Evidence for activation of inflammatory lipoxygenase pathways in visceral adipose tissue of obese Zucker rats.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2011. **300**(1): p. E175-87.

178. Shang, C.A., et al., *Genes induced by growth hormone in a model of adipogenic differentiation.* Mol Cell Endocrinol, 2002. **189**(1-2): p. 213-9.

179. Murray, P.J., *The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration.* J Immunol, 2007. **178**(5): p. 2623-9.

180. Wen, Z., Z. Zhong, and J.E. Darnell, Jr., *Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation.* Cell, 1995. **82**(2): p. 241-50.

181. Li, X., et al., *Formation of STAT1-STAT2 heterodimers and their role in the activation of IRF-1 gene transcription by interferon-alpha.* J Biol Chem, 1996. **271**(10): p. 5790-4.

182. Schindler, C. and S. Brutsaert, *Interferons as a paradigm for cytokine signal transduction.* Cell Mol Life Sci, 1999. **55**(12): p. 1509-22.

183. Kessler, D.S., et al., *Interferon-alpha regulates nuclear translocation and DNA-binding affinity of ISGF3, a multimeric transcriptional activator.* Genes Dev, 1990. **4**(10): p. 1753-65.

184. Akira, S., *Roles of STAT3 defined by tissue-specific gene targeting.* Oncogene, 2000. **19**(21): p. 2607-11.

185. Teglund, S., et al., *Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses.* Cell, 1998. **93**(5): p. 841-50.

186. Benkhart, E.M., et al., *Role of Stat3 in lipopolysaccharide-induced IL-10 gene expression.* J Immunol, 2000. **165**(3): p. 1612-7.

187. Richard, A.J. and J.M. Stephens, *The role of JAK-STAT signaling in adipose tissue function.* Biochim Biophys Acta, 2014. **1842**(3): p. 431-9.

188. Waite, K.J., et al., *Interferon-gamma-induced regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and STATs in adipocytes.* J Biol Chem, 2001. **276**(10): p. 7062-8.

189. Hogan, J.C. and J.M. Stephens, *STAT 1 binds to the LPL promoter in vitro.* Biochem Biophys Res Commun, 2003. **307**(2): p. 350-4.

190. McGillicuddy, F.C., et al., *Interferon gamma attenuates insulin signaling, lipid storage, and differentiation in human adipocytes via activation of the JAK/STAT pathway.* J Biol Chem, 2009. **284**(46): p. 31936-44.

191. Liu, J.J., et al., *Acetyl-keto-beta-boswellic acid induces lipolysis in mature adipocytes.* Biochem Biophys Res Commun, 2013. **431**(2): p. 192-6.

192. Harp, J.B., et al., *Differential expression of signal transducers and activators of transcription during human adipogenesis.* Biochem Biophys Res Commun, 2001. **281**(4): p. 907-12.

193. Zhao, P. and J.M. Stephens, *Identification of STAT target genes in adipocytes.* JAKSTAT, 2013. **2**(2): p. e23092.

194. Kim, Y.B., et al., *In vivo administration of leptin activates signal transduction directly in insulin-sensitive tissues: overlapping but distinct pathways from insulin.* Endocrinology, 2000. **141**(7): p. 2328-39.

195. Lumeng, C.N., J.L. Bodzin, and A.R. Saltiel, *Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization.* J Clin Invest, 2007. **117**(1): p. 175-84.

196. Seo, C.R., et al., *Cucurbitacin B and cucurbitacin I suppress adipocyte differentiation through inhibition of STAT3 signaling.* Food Chem Toxicol, 2014. **64**: p. 217-24.

197. Zhang, K., et al., *JAK2/STAT3 pathway is involved in the early stage of adipogenesis through regulating C/EBPbeta transcription.* J Cell Biochem, 2011. **112**(2): p. 488-97.

198. Wang, D., et al., *Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) regulates adipocyte differentiation via peroxisome-proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma).* Biol Cell, 2010. **102**(1): p. 1-12.

199. Kawai, M., et al., *Growth hormone stimulates adipogenesis of 3T3-L1 cells through activation of the Stat5A/5B-PPARgamma pathway.* J Mol Endocrinol, 2007. **38**(1-2): p. 19-34.

200. Meirhaeghe, A., et al., *A functional polymorphism in a STAT5B site of the human PPAR gamma 3 gene promoter affects height and lipid metabolism in a French population.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(2): p. 289-94.

201. Richard, A.J. and J.M. Stephens, *Emerging roles of JAK-STAT signaling pathways in adipocytes.* Trends Endocrinol Metab, 2011. **22**(8): p. 325-32.

202. Shen, W., et al., *Adipose tissue quantification by imaging methods: a proposed classification.* Obes Res, 2003. **11**(1): p. 5-16.

203. Wajchenberg, B.L., *Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome.* Endocr Rev, 2000. **21**(6): p. 697-738.

204. Iozzo, P., *Myocardial, perivascular, and epicardial fat.* Diabetes Care, 2011. **34 Suppl 2**: p. S371-9.

205. Freedland, E.S., *Role of a critical visceral adipose tissue threshold (CVATT) in metabolic syndrome: implications for controlling dietary carbohydrates: a review.* Nutr Metab (Lond), 2004. **1**(1): p. 12.

206. Bjorntorp, P., *Do stress reactions cause abdominal obesity and comorbidities?* Obes Rev, 2001. **2**(2): p. 73-86.

207. McQuaid, S.E., et al., *Femoral adipose tissue may accumulate the fat that has been recycled as VLDL and nonesterified fatty acids.* Diabetes, 2010. **59**(10): p. 2465-73.

208. Bjorndal, B., et al., *Different adipose depots: their role in the development of metabolic syndrome and mitochondrial response to hypolipidemic agents.* J Obes, 2011. **2011**: p. 490650.

209. Tchkonia, T., et al., *Identification of depot-specific human fat cell progenitors through distinct expression profiles and developmental gene patterns.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. **292**(1): p. E298-307.

210. Yamamoto, Y., et al., *Adipose depots possess unique developmental gene signatures.* Obesity (Silver Spring). **18**(5): p. 872-8.

211. Tchkonia, T., et al., *Fat depot origin affects adipogenesis in primary cultured and cloned human preadipocytes.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2002. **282**(5): p. R1286-96.

212. Tchkonia, T., et al., *Abundance of two human preadipocyte subtypes with distinct capacities for replication, adipogenesis, and apoptosis varies among fat depots.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005. **288**(1): p. E267-77.

213. Ibrahim, M.M., *Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences.* Obes Rev, 2010. **11**(1): p. 11-8.

214. Heinrich, P.C., J.V. Castell, and T. Andus, *Interleukin-6 and the acute phase response.* Biochem J, 1990. **265**(3): p. 621-36.

215. Marin, P., et al., *The morphology and metabolism of intraabdominal adipose tissue in men.* Metabolism, 1992. **41**(11): p. 1242-8.

216. Geer, E.B. and W. Shen, *Gender differences in insulin resistance, body composition, and energy balance.* Gend Med, 2009. **6 Suppl 1**: p. 60-75.

217. Shahparaki, A., L. Grunder, and A. Sorisky, *Comparison of human abdominal subcutaneous versus omental preadipocyte differentiation in primary culture.* Metabolism, 2002. **51**(9): p. 1211-5.

218. Van Harmelen, V., K. Rohrig, and H. Hauner, *Comparison of proliferation and differentiation capacity of human adipocyte precursor cells from the omental and subcutaneous adipose tissue depot of obese subjects.* Metabolism, 2004. **53**(5): p. 632-7.

219. Hauner, H., M. Wabitsch, and E.F. Pfeiffer, *Differentiation of adipocyte precursor cells from obese and nonobese adult women and from different adipose tissue sites.* Horm Metab Res Suppl, 1988. **19**: p. 35-9.

220. Tchkonia, T., et al., *Fat depot-specific characteristics are retained in strains derived from single human preadipocytes.* Diabetes, 2006. **55**(9): p. 2571-8.

221. Adams, M., et al., *Activators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma have depot-specific effects on human preadipocyte differentiation.* J Clin Invest, 1997. **100**(12): p. 3149-53.

222. Digby, J.E., et al., *Depot-related and thiazolidinedione-responsive expression of uncoupling protein 2 (UCP2) in human adipocytes.* Int J Obes Relat Metab Disord, 2000. **24**(5): p. 585-92.

223. Kelly, I.E., et al., *Effects of a thiazolidinedione compound on body fat and fat distribution of patients with type 2 diabetes.* Diabetes Care, 1999. **22**(2): p. 288-93.

224. Mori, Y., et al., *Effect of troglitazone on body fat distribution in type 2 diabetic patients.* Diabetes Care, 1999. **22**(6): p. 908-12.

225. Ye, J., *Adipose tissue vascularization: its role in chronic inflammation.* Curr Diab Rep, 2011. **11**(3): p. 203-10.

226. Gealekman, O., et al., *Depot-specific differences and insufficient subcutaneous adipose tissue angiogenesis in human obesity.* Circulation, 2011. **123**(2): p. 186-94.

227. Niesler, C.U., K. Siddle, and J.B. Prins, *Human preadipocytes display a depot-specific susceptibility to apoptosis.* Diabetes, 1998. **47**(8): p. 1365-8.

228. Tchernof, A., et al., *Regional differences in adipose tissue metabolism in women: minor effect of obesity and body fat distribution.* Diabetes, 2006. **55**(5): p. 1353-60.

229. Boivin, A., et al., *Regional differences in adipose tissue metabolism in obese men.* Metabolism, 2007. **56**(4): p. 533-40.

230. Lonnqvist, F., et al., *Sex differences in visceral fat lipolysis and metabolic complications of obesity.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. **17**(7): p. 1472-80.

231. Leibel, R.L., N.K. Edens, and S.K. Fried, *Physiologic basis for the control of body fat distribution in humans.* Annu Rev Nutr, 1989. **9**: p. 417-43.

232. Meek, S.E., K.S. Nair, and M.D. Jensen, *Insulin regulation of regional free fatty acid metabolism.* Diabetes, 1999. **48**(1): p. 10-4.

233. Lundgren, M., et al., *Glucocorticoids down-regulate glucose uptake capacity and insulin-signaling proteins in omental but not subcutaneous human adipocytes.* J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(6): p. 2989-97.

234. Stolic, M., et al., *Glucose uptake and insulin action in human adipose tissue--influence of BMI, anatomical depot and body fat distribution.* Int J Obes Relat Metab Disord, 2002. **26**(1): p. 17-23.

235. Mauriege, P., et al., *Regional variation in adipose tissue metabolism of severely obese premenopausal women.* J Lipid Res, 1995. **36**(4): p. 672-84.

236. Zierath, J.R., et al., *Regional difference in insulin inhibition of non-esterified fatty acid release from human adipocytes: relation to insulin receptor phosphorylation and intracellular signalling through the insulin receptor substrate-1 pathway.* Diabetologia, 1998. **41**(11): p. 1343-54.

237. Marette, A., et al., *Regional variation in adipose tissue insulin action and GLUT4 glucose transporter expression in severely obese premenopausal women.* Diabetologia, 1997. **40**(5): p. 590-8.

238. Veilleux, A., et al., *Glucose transporter 4 and insulin receptor substrate-1 messenger RNA expression in omental and subcutaneous adipose tissue in women.* Metabolism, 2009. **58**(5): p. 624-31.

239. Bashan, N., et al., *Mitogen-activated protein kinases, inhibitory-kappaB kinase, and insulin signaling in human omental versus subcutaneous adipose tissue in obesity.* Endocrinology, 2007. **148**(6): p. 2955-62.

240. Sengenes, C., et al., *Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display distinct features from the adult mesenchymal and hematopoietic stem cells.* J Cell Physiol, 2005. **205**(1): p. 114-22.

241. Curat, C.A., et al., *Macrophages in human visceral adipose tissue: increased accumulation in obesity and a source of resistin and visfatin.* Diabetologia, 2006. **49**(4): p. 744-7.

242. Zhang, H.M., et al., *Macrophage infiltrates with high levels of Toll-like receptor 4 expression in white adipose tissues of male Chinese.* Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2009. **19**(10): p. 736-43.

243. Cancello, R., et al., *Increased infiltration of macrophages in omental adipose tissue is associated with marked hepatic lesions in morbid human obesity.* Diabetes, 2006. **55**(6): p. 1554-61.

244. Kusunoki, J., A. Kanatani, and D.E. Moller, *Modulation of fatty acid metabolism as a potential approach to the treatment of obesity and the metabolic syndrome.* Endocrine, 2006. **29**(1): p. 91-100.

245. Cornier, M.A., et al., *The metabolic syndrome.* Endocr Rev, 2008. **29**(7): p. 777-822.

246. Grundy, S.M., et al., *Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition.* Circulation, 2004. **109**(3): p. 433-8.

247. Morton, N.M., *Obesity and corticosteroids: 11beta-hydroxysteroid type 1 as a cause and therapeutic target in metabolic disease.* Mol Cell Endocrinol, 2010. **316**(2): p. 154-64.

248. Kim, S.H. and G.M. Reaven, *The metabolic syndrome: one step forward, two steps back.* Diab Vasc Dis Res, 2004. **1**(2): p. 68-75.

249. Alberti, K.G., P. Zimmet, and J. Shaw, *The metabolic syndrome--a new worldwide definition.* Lancet, 2005. **366**(9491): p. 1059-62.

250. DeFronzo, R.A., E. Ferrannini, and V. Koivisto, *New concepts in the pathogenesis and treatment of noninsulin-dependent diabetes mellitus.* Am J Med, 1983. **74**(1A): p. 52-81.

251. Schenk, S., M. Saberi, and J.M. Olefsky, *Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation.* J Clin Invest, 2008. **118**(9): p. 2992-3002.

252. Fujioka, S., et al., *Contribution of intra-abdominal fat accumulation to the impairment of glucose and lipid metabolism in human obesity.* Metabolism, 1987. **36**(1): p. 54-9.

253. Sun, K., C.M. Kusminski, and P.E. Scherer, *Adipose tissue remodeling and obesity.* J Clin Invest, 2011. **121**(6): p. 2094-101.

254. Donath, M.Y. and S.E. Shoelson, *Type 2 diabetes as an inflammatory disease.* Nat Rev Immunol, 2011. **11**(2): p. 98-107.

255. Henao-Mejia, J., et al., *Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity.* Nature, 2012. **482**(7384): p. 179-85.

256. Trayhurn, P. and I.S. Wood, *Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue.* Br J Nutr, 2004. **92**(3): p. 347-55.

257. Hosogai, N., et al., *Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation.* Diabetes, 2007. **56**(4): p. 901-11.

258. Ye, J., *Emerging role of adipose tissue hypoxia in obesity and insulin resistance.* Int J Obes (Lond), 2009. **33**(1): p. 54-66.

259. Duffaut, C., et al., *Unexpected trafficking of immune cells within the adipose tissue during the onset of obesity.* Biochem Biophys Res Commun, 2009. **384**(4): p. 482-5.

260. Xu, H., et al., *Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance.* J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1821-30.

261. Kintscher, U., et al., *T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(7): p. 1304-10.

262. Gordon, S., *Macrophage heterogeneity and tissue lipids.* J Clin Invest, 2007. **117**(1): p. 89-93.

263. Cildir, G., S.C. Akincilar, and V. Tergaonkar, *Chronic adipose tissue inflammation: all immune cells on the stage.* Trends Mol Med, 2013. **19**(8): p. 487-500.

264. Marchington, J.M., C.A. Mattacks, and C.M. Pond, *Adipose tissue in the mammalian heart and pericardium: structure, foetal development and biochemical properties.* Comp Biochem Physiol B, 1989. **94**(2): p. 225-32.

265. Yudkin, J.S., E. Eringa, and C.D. Stehouwer, *"Vasocrine" signalling from perivascular fat: a mechanism linking insulin resistance to vascular disease.* Lancet, 2005. **365**(9473): p. 1817-20.

266. Gao, Y.J., *Dual modulation of vascular function by perivascular adipose tissue and its potential correlation with adiposity/lipoatrophy-related vascular dysfunction.* Curr Pharm Des, 2007. **13**(21): p. 2185-92.

267. Iacobellis, G., et al., *Adiponectin expression in human epicardial adipose tissue in vivo is lower in patients with coronary artery disease.* Cytokine, 2005. **29**(6): p. 251-5.

268. Iacobellis, G., et al., *Epicardial fat from echocardiography: a new method for visceral adipose tissue prediction.* Obes Res, 2003. **11**(2): p. 304-10.

269. Ouwens, D.M., et al., *The role of epicardial and perivascular adipose tissue in the pathophysiology of cardiovascular disease.* J Cell Mol Med, 2010. **14**(9): p. 2223-34.

270. Verhagen, S.N. and F.L. Visseren, *Perivascular adipose tissue as a cause of atherosclerosis.* Atherosclerosis, 2011. **214**(1): p. 3-10.

271. Company, J.M., et al., *Epicardial fat gene expression after aerobic exercise training in pigs with coronary atherosclerosis: relationship to visceral and subcutaneous fat.* J Appl Physiol, 2010. **109**(6): p. 1904-12.

272. Iacobellis, G., D. Corradi, and A.M. Sharma, *Epicardial adipose tissue: anatomic, biomolecular and clinical relationships with the heart.* Nat Clin Pract Cardiovasc Med, 2005. **2**(10): p. 536-43.

273. Corradi, D., et al., *The ventricular epicardial fat is related to the myocardial mass in normal, ischemic and hypertrophic hearts.* Cardiovasc Pathol, 2004. **13**(6): p. 313-6.

274. Bertaso, A.G., et al., *Epicardial fat: definition, measurements and systematic review of main outcomes.* Arq Bras Cardiol, 2013. **101**(1): p. e18-28.

275. Iacobellis, G., *Epicardial and pericardial fat: close, but very different.* Obesity (Silver Spring), 2009. **17**(4): p. 625; author reply 626-7.

276. Sacks, H.S. and J.N. Fain, *Human epicardial adipose tissue: a review.* Am Heart J, 2007. **153**(6): p. 907-17.

277. Rabkin, S.W., *Epicardial fat: properties, function and relationship to obesity.* Obes Rev, 2007. **8**(3): p. 253-61.

278. Marchington, J.M. and C.M. Pond, *Site-specific properties of pericardial and epicardial adipose tissue: the effects of insulin and high-fat feeding on lipogenesis and the incorporation of fatty acids in vitro.* Int J Obes, 1990. **14**(12): p. 1013-22.

279. Barber, M.C., et al., *Ovine adipose tissue monounsaturated fat content is correlated to depot-specific expression of the stearoyl-CoA desaturase gene.* J Anim Sci, 2000. **78**(1): p. 62-8.

280. Pezeshkian, M., et al., *Fatty acid composition of epicardial and subcutaneous human adipose tissue.* Metab Syndr Relat Disord, 2009. **7**(2): p. 125-31.

281. Sacks, H.S., et al., *Uncoupling protein-1 and related messenger ribonucleic acids in human epicardial and other adipose tissues: epicardial fat functioning as brown fat.* J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(9): p. 3611-5.

282. Richard, D. and F. Picard, *Brown fat biology and thermogenesis.* Front Biosci (Landmark Ed), 2011. **16**: p. 1233-60.

283. Thalmann, S. and C.A. Meier, *Local adipose tissue depots as cardiovascular risk factors.* Cardiovasc Res, 2007. **75**(4): p. 690-701.

284. Lusis, A.J., *Atherosclerosis.* Nature, 2000. **407**(6801): p. 233-41.

285. Moreno, P.R., et al., *Neovascularization in human atherosclerosis.* Circulation, 2006. **113**(18): p. 2245-52.

286. Virmani, R., et al., *Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(10): p. 2054-61.

287. Iacobellis, G. and A.C. Bianco, *Epicardial adipose tissue: emerging physiological, pathophysiological and clinical features.* Trends Endocrinol Metab, 2011. **22**(11): p. 450-7.

288. Mazurek, T., et al., *Human epicardial adipose tissue is a source of inflammatory mediators.* Circulation, 2003. **108**(20): p. 2460-6.

289. Baker, A.R., et al., *Human epicardial adipose tissue expresses a pathogenic profile of adipocytokines in patients with cardiovascular disease.* Cardiovasc Diabetol, 2006. **5**: p. 1.

290. Chaldakov, G.N., et al., *Neurotrophin presence in human coronary atherosclerosis and metabolic syndrome: a role for NGF and BDNF in cardiovascular disease?* Prog Brain Res, 2004. **146**: p. 279-89.

291. Fain, J.N., et al., *Identification of omentin mRNA in human epicardial adipose tissue: comparison to omentin in subcutaneous, internal mammary artery periadventitial and visceral abdominal depots.* Int J Obes (Lond), 2008. **32**(5): p. 810-5.

292. Kremen, J., et al., *Increased subcutaneous and epicardial adipose tissue production of proinflammatory cytokines in cardiac surgery patients: possible role in postoperative insulin resistance.* J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(11): p. 4620-7.

293. Cheng, K.H., et al., *Adipocytokines and proinflammatory mediators from abdominal and epicardial adipose tissue in patients with coronary artery disease.* Int J Obes (Lond), 2008. **32**(2): p. 268-74.

294. Fain, J.N., et al., *Human epicardial adipokine messenger RNAs: comparisons of their expression in substernal, subcutaneous, and omental fat.* Metabolism, 2010. **59**(9): p. 1379-86.

295. Ho, E. and Y. Shimada, *Formation of the epicardium studied with the scanning electron microscope.* Dev Biol, 1978. **66**(2): p. 579-85.

296. Tilg, H. and A.R. Moschen, *Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity.* Nat Rev Immunol, 2006. **6**(10): p. 772-83.

297. Guzik, T.J., et al., *Perivascular adipose tissue as a messenger of the brain-vessel axis: role in vascular inflammation and dysfunction.* J Physiol Pharmacol, 2007. **58**(4): p. 591-610.

298. Henrichot, E., et al., *Production of chemokines by perivascular adipose tissue: a role in the pathogenesis of atherosclerosis?* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(12): p. 2594-9.

299. Weisberg, S.P., et al., *Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue.* J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1796-808.

300. Ohashi, K., N. Ouchi, and Y. Matsuzawa, *Adiponectin and hypertension.* Am J Hypertens, 2011. **24**(3): p. 263-9.

301. Bhalla, V., et al., *Serum resistin: physiology, pathophysiology and implications for heart failure.* Biomark Med, 2010. **4**(3): p. 445-52.

302. Rajsheker, S., et al., *Crosstalk between perivascular adipose tissue and blood vessels.* Curr Opin Pharmacol, 2010. **10**(2): p. 191-6.

303. Yamawaki, H., *Vascular effects of novel adipocytokines: focus on vascular contractility and inflammatory responses.* Biol Pharm Bull, 2011. **34**(3): p. 307-10.

304. Karastergiou, K., et al., *Epicardial adipokines in obesity and coronary artery disease induce atherogenic changes in monocytes and endothelial cells.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(7): p. 1340-6.

305. Shibasaki, I., et al., *Greater expression of inflammatory cytokines, adrenomedullin, and natriuretic peptide receptor-C in epicardial adipose tissue in coronary artery disease.* Regul Pept, 2010. **165**(2-3): p. 210-7.

306. Payne, G.A., M.C. Kohr, and J.D. Tune, *Epicardial perivascular adipose tissue as a therapeutic target in obesity-related coronary artery disease.* Br J Pharmacol, 2010. **165**(3): p. 659-69.

307. Galvez-Prieto, B., et al., *Comparative expression analysis of the renin-angiotensin system components between white and brown perivascular adipose tissue.* J Endocrinol, 2008. **197**(1): p. 55-64.

308. Lu, C., et al., *Mechanisms for perivascular adipose tissue-mediated potentiation of vascular contraction to perivascular neuronal stimulation: the role of adipocyte-derived angiotensin II.* Eur J Pharmacol, 2010. **634**(1-3): p. 107-12.

309. Fang, L., et al., *Hydrogen sulfide derived from periadventitial adipose tissue is a vasodilator.* J Hypertens, 2009. **27**(11): p. 2174-85.

310. Gao, Y.J., et al., *Modulation of vascular function by perivascular adipose tissue: the role of endothelium and hydrogen peroxide.* Br J Pharmacol, 2007. **151**(3): p. 323-31.

311. Ketonen, J., et al., *Periadventitial adipose tissue promotes endothelial dysfunction via oxidative stress in diet-induced obese C57Bl/6 mice.* Circ J, 2010. **74**(7): p. 1479-87.

312. Greenstein, A.S., et al., *Local inflammation and hypoxia abolish the protective anticontractile properties of perivascular fat in obese patients.* Circulation, 2009. **119**(12): p. 1661-70.

313. Zhang, H. and C. Zhang, *Regulation of Microvascular Function by Adipose Tissue in Obesity and Type 2 Diabetes: Evidence of an Adipose-Vascular Loop.* Am J Biomed Sci, 2009. **1**(2): p. 133.

314. Mudau, M., et al., *Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis.* Cardiovasc J Afr, 2012. **23**(4): p. 222-31.

315. Stern, N. and Y. Marcus, *Perivascular fat: innocent bystander or active player in vascular disease?* J Cardiometab Syndr, 2006. **1**(2): p. 115-20.

316. Dahlof, B., *Cardiovascular disease risk factors: epidemiology and risk assessment.* Am J Cardiol, 2010. **105**(1 Suppl): p. 3A-9A.

317. Lloyd-Jones, D.M., *Cardiovascular risk prediction: basic concepts, current status, and future directions.* Circulation, 2010. **121**(15): p. 1768-77.

318. Hansson, G.K. and A. Hermansson, *The immune system in atherosclerosis.* Nat Immunol, 2011. **12**(3): p. 204-12.

319. Hansson, G.K., *Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease.* N Engl J Med, 2005. **352**(16): p. 1685-95.

320. Wong, B.W., et al., *The biological role of inflammation in atherosclerosis.* Can J Cardiol, 2012. **28**(6): p. 631-41.

321. Grundy, S.M., et al., *Assessment of cardiovascular risk by use of multiple-risk-factor assessment equations: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology.* Circulation, 1999. **100**(13): p. 1481-92.

322. Mehrabian, M., et al., *Genetic loci controlling body fat, lipoprotein metabolism, and insulin levels in a multifactorial mouse model.* J Clin Invest, 1998. **101**(11): p. 2485-96.

323. Pranavchand, R. and B.M. Reddy, *Current status of understanding of the genetic etiology of coronary heart disease.* J Postgrad Med, 2013. **59**(1): p. 30-41.

324. Pepine, C.J., *Systemic hypertension and coronary artery disease.* Am J Cardiol, 1998. **82**(3A): p. 21H-24H.

325. Tousoulis, D., et al., *Endothelial dysfunction: potential clinical implications.* Minerva Med, 2010. **101**(4): p. 271-84.

326. Gimbrone, M.A., Jr., *Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis.* Am J Pathol, 1999. **155**(1): p. 1-5.

327. Zhang, L., et al., *Diabetes-induced oxidative stress and low-grade inflammation in porcine coronary arteries.* Circulation, 2003. **108**(4): p. 472-8.

328. Libby, P., *Inflammation in atherosclerosis.* Nature, 2002. **420**(6917): p. 868-74.

329. Moreno, P.R., et al., *Intimomedial interface damage and adventitial inflammation is increased beneath disrupted atherosclerosis in the aorta: implications for plaque vulnerability.* Circulation, 2002. **105**(21): p. 2504-11.

330. Maiellaro, K. and W.R. Taylor, *The role of the adventitia in vascular inflammation.* Cardiovasc Res, 2007. **75**(4): p. 640-8.

331. Chaldakov, G.N., et al., *Periadventitial adipose tissue (tunica adiposa): enemy or friend around?* Arch Pathol Lab Med, 2007. **131**(12): p. 1766; author reply 1766-7.

332. Zernecke, A., E. Shagdarsuren, and C. Weber, *Chemokines in atherosclerosis: an update.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(11): p. 1897-908.

333. Smith, J.D., et al., *Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(18): p. 8264-8.

334. Hansson, G.K. and P. Libby, *The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword.* Nat Rev Immunol, 2006. **6**(7): p. 508-19.

335. Boren, J., et al., *Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL. A single-point mutation in apo-B100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding.* J Clin Invest, 1998. **101**(12): p. 2658-64.

336. Goldstein, J.L., et al., *Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(1): p. 333-7.

337. Hegele, R.A., *Paraoxonase genes and disease.* Ann Med, 1999. **31**(3): p. 217-24.

338. Shih, D.M., et al., *Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis.* J Biol Chem, 2000. **275**(23): p. 17527-35.

339. Suzuki, H., et al., *A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection.* Nature, 1997. **386**(6622): p. 292-6.

340. Febbraio, M., et al., *Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice.* J Clin Invest, 2000. **105**(8): p. 1049-56.

341. Marathe, S., et al., *Sphingomyelinase, an enzyme implicated in atherogenesis, is present in atherosclerotic lesions and binds to specific components of the subendothelial extracellular matrix.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(11): p. 2648-58.

342. Ivandic, B., et al., *Role of group II secretory phospholipase A2 in atherosclerosis: 1. Increased atherogenesis and altered lipoproteins in transgenic mice expressing group IIa phospholipase A2.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(5): p. 1284-90.

343. Kruth, H.S., *The fate of lipoprotein cholesterol entering the arterial wall.* Curr Opin Lipidol, 1997. **8**(5): p. 246-52.

344. Kruth, H.S., *Sequestration of aggregated low-density lipoproteins by macrophages.* Curr Opin Lipidol, 2002. **13**(5): p. 483-8.

345. Moore, K.J. and I. Tabas, *Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis.* Cell, 2011. **145**(3): p. 341-55.

346. Eggen, D.A. and L.A. Solberg, *Variation of atherosclerosis with age.* Lab Invest, 1968. **18**(5): p. 571-9.

347. Insull, W., Jr., *The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment.* Am J Med, 2009. **122**(1 Suppl): p. S3-S14.

348. Stary, H.C., et al., *A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995. **15**(9): p. 1512-31.

349. Combadiere, C., et al., *Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytosis and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice.* Circulation, 2008. **117**(13): p. 1649-57.

350. Saederup, N., et al., *Fractalkine deficiency markedly reduces macrophage accumulation and atherosclerotic lesion formation in CCR2-/- mice: evidence for independent chemokine functions in atherogenesis.* Circulation, 2008. **117**(13): p. 1642-8.

351. Stoneman, V., et al., *Monocyte/macrophage suppression in CD11b diphtheria toxin receptor transgenic mice differentially affects atherogenesis and established plaques.* Circ Res, 2007. **100**(6): p. 884-93.

352. Jongstra-Bilen, J., et al., *Low-grade chronic inflammation in regions of the normal mouse arterial intima predisposed to atherosclerosis.* J Exp Med, 2006. **203**(9): p. 2073-83.

353. Zhu, S.N., et al., *GM-CSF regulates intimal cell proliferation in nascent atherosclerotic lesions.* J Exp Med, 2009. **206**(10): p. 2141-9.

354. Drechsler, M., et al., *Hyperlipidemia-triggered neutrophilia promotes early atherosclerosis.* Circulation, 2010. **122**(18): p. 1837-45.

355. Zernecke, A., et al., *Protective role of CXC receptor 4/CXC ligand 12 unveils the importance of neutrophils in atherosclerosis.* Circ Res, 2008. **102**(2): p. 209-17.

356. Soehnlein, O., et al., *Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes.* Blood, 2008. **112**(4): p. 1461-71.

357. Lievens, D. and P. von Hundelshausen, *Platelets in atherosclerosis.* Thromb Haemost, 2011. **106**(5): p. 827-38.

358. Hsue, P.Y., S.G. Deeks, and P.W. Hunt, *Immunologic basis of cardiovascular disease in HIV-infected adults.* J Infect Dis, 2012. **205 Suppl 3**: p. S375-82.

359. Binder, C.J., et al., *Innate and acquired immunity in atherogenesis.* Nat Med, 2002. **8**(11): p. 1218-26.

360. Bjorkbacka, H., G.N. Fredrikson, and J. Nilsson, *Emerging biomarkers and intervention targets for immune-modulation of atherosclerosis - a review of the experimental evidence.* Atherosclerosis, 2013. **227**(1): p. 9-17.

361. Buono, C., et al., *T-bet deficiency reduces atherosclerosis and alters plaque antigen-specific immune responses.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(5): p. 1596-601.

362. Lahoute, C., et al., *Adaptive immunity in atherosclerosis: mechanisms and future therapeutic targets.* Nat Rev Cardiol, 2011. **8**(6): p. 348-58.

363. King, V.L., S.J. Szilvassy, and A. Daugherty, *Interleukin-4 deficiency decreases atherosclerotic lesion formation in a site-specific manner in female LDL receptor-/- mice.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(3): p. 456-61.

364. Mallat, Z., et al., *Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis.* Circ Res, 1999. **85**(8): p. e17-24.

365. Binder, C.J., et al., *IL-5 links adaptive and natural immunity specific for epitopes of oxidized LDL and protects from atherosclerosis.* J Clin Invest, 2004. **114**(3): p. 427-37.

366. Gewaltig, J., et al., *Requirements for CD8 T-cell migration into the human arterial wall.* Hum Pathol, 2008. **39**(12): p. 1756-62.

367. Kolbus, D., et al., *CD8+ T cell activation predominate early immune responses to hypercholesterolemia in Apoe(-)(/)(-) mice.* BMC Immunol, 2010. **11**: p. 58.

368. Olofsson, P.S., et al., *CD137 is expressed in human atherosclerosis and promotes development of plaque inflammation in hypercholesterolemic mice.* Circulation, 2008. **117**(10): p. 1292-301.

369. Wigren, M., J. Nilsson, and D. Kolbus, *Lymphocytes in atherosclerosis.* Clin Chim Acta, 2012. **413**(19-20): p. 1562-8.

370. Caligiuri, G., et al., *Protective immunity against atherosclerosis carried by B cells of hypercholesterolemic mice.* J Clin Invest, 2002. **109**(6): p. 745-53.

371. Major, A.S., S. Fazio, and M.F. Linton, *B-lymphocyte deficiency increases atherosclerosis in LDL receptor-null mice.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(11): p. 1892-8.

372. Ait-Oufella, H., et al., *B cell depletion reduces the development of atherosclerosis in mice.* J Exp Med, 2010. **207**(8): p. 1579-87.

373. Kyaw, T., et al., *Conventional B2 B cell depletion ameliorates whereas its adoptive transfer aggravates atherosclerosis.* J Immunol, 2010. **185**(7): p. 4410-9.

374. Kyaw, T., et al., *Depletion of B2 but not B1a B cells in BAFF receptor-deficient ApoE mice attenuates atherosclerosis by potently ameliorating arterial inflammation.* PLoS One, 2012. **7**(1): p. e29371.

375. Kyaw, T., et al., *B1a B lymphocytes are atheroprotective by secreting natural IgM that increases IgM deposits and reduces necrotic cores in atherosclerotic lesions.* Circ Res, 2011. **109**(8): p. 830-40.

376. Sage, A.P., et al., *BAFF receptor deficiency reduces the development of atherosclerosis in mice--brief report.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(7): p. 1573-6.

377. Frostegard, J., *Low level natural antibodies against phosphorylcholine: a novel risk marker and potential mechanism in atherosclerosis and cardiovascular disease.* Clin Immunol, 2010. **134**(1): p. 47-54.

378. Nilsson, J. and P.T. Kovanen, *Will autoantibodies help to determine severity and progression of atherosclerosis?* Curr Opin Lipidol, 2004. **15**(5): p. 499-503.

379. Ishikawa, Y., et al., *Significance of anatomical properties of myocardial bridge on atherosclerosis evolution in the left anterior descending coronary artery.* Atherosclerosis, 2006. **186**(2): p. 380-9.

380. Ishikawa, Y., et al., *Anatomic properties of myocardial bridge predisposing to myocardial infarction.* Circulation, 2009. **120**(5): p. 376-83.

381. Ishii, T., et al., *The effects of a myocardial bridge on coronary atherosclerosis and ischaemia.* J Pathol, 1998. **185**(1): p. 4-9.

382. Kawawa, Y., et al., *Detection of myocardial bridge and evaluation of its anatomical properties by coronary multislice spiral computed tomography.* Eur J Radiol, 2007. **61**(1): p. 130-8.

383. Zeina, A.R., et al., *Myocardial bridge: evaluation on MDCT.* AJR Am J Roentgenol, 2007. **188**(4): p. 1069-73.

384. Cheng, V.Y., et al., *Pericardial fat burden on ECG-gated noncontrast CT in asymptomatic patients who subsequently experience adverse cardiovascular events.* JACC Cardiovasc Imaging, 2010. **3**(4): p. 352-60.

385. Ding, J., et al., *The association of pericardial fat with incident coronary heart disease: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA).* Am J Clin Nutr, 2009. **90**(3): p. 499-504.

386. Fernandez-Alfonso, M.S., et al., *Mechanisms of Perivascular Adipose Tissue Dysfunction in Obesity.* Int J Endocrinol, 2013. **2013**: p. 402053.

387. Salgado-Somoza, A., et al., *Proteomic analysis of epicardial and subcutaneous adipose tissue reveals differences in proteins involved in oxidative stress.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **299**(1): p. H202-9.

388. Cooper, D., et al., *Oxidative stress promotes blood cell-endothelial cell interactions in the microcirculation.* Cardiovasc Toxicol, 2002. **2**(3): p. 165-80.

389. Wang, P., et al., *Perivascular adipose tissue-derived visfatin is a vascular smooth muscle cell growth factor: role of nicotinamide mononucleotide.* Cardiovasc Res, 2009. **81**(2): p. 370-80.

390. Shyu, K.G., et al., *Resistin contributes to neointimal formation via oxidative stress after vascular injury.* Clin Sci (Lond), 2011. **120**(3): p. 121-9.

391. Wang, Y., et al., *Adiponectin inhibits cell proliferation by interacting with several growth factors in an oligomerization-dependent manner.* J Biol Chem, 2005. **280**(18): p. 18341-7.

392. Libby, P., et al., *Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice.* Circ J, 2010. **74**(2): p. 213-20.

393. Chatterjee, T.K., et al., *Proinflammatory phenotype of perivascular adipocytes: influence of high-fat feeding.* Circ Res, 2009. **104**(4): p. 541-9.

394. Maenhaut, N. and J. Van de Voorde, *Regulation of vascular tone by adipocytes.* BMC Med, 2011. **9**: p. 25.

395. Ouchi, N., et al., *Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin.* Circulation, 1999. **100**(25): p. 2473-6.

396. Kawanami, D., et al., *Direct reciprocal effects of resistin and adiponectin on vascular endothelial cells: a new insight into adipocytokine-endothelial cell interactions.* Biochem Biophys Res Commun, 2004. **314**(2): p. 415-9.

397. Schrader, L.I., et al., *IL-6 deficiency protects against angiotensin II induced endothelial dysfunction and hypertrophy.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(12): p. 2576-81.

398. Langenberg, C., et al., *Cardiovascular death and the metabolic syndrome: role of adiposity-signaling hormones and inflammatory markers.* Diabetes Care, 2006. **29**(6): p. 1363-9.

399. Klouche, M., et al., *Novel path to activation of vascular smooth muscle cells: up-regulation of gp130 creates an autocrine activation loop by IL-6 and its soluble receptor.* J Immunol, 1999. **163**(8): p. 4583-9.

400. Chudek, J. and A. Wiecek, *Adipose tissue, inflammation and endothelial dysfunction.* Pharmacol Rep, 2006. **58 Suppl**: p. 81-8.

401. Chen, X., et al., *The reciprocal relationship between adiponectin and LOX-1 in the regulation of endothelial dysfunction in ApoE knockout mice.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **299**(3): p. H605-12.

402. Arita, Y., et al., *Adipocyte-derived plasma protein adiponectin acts as a platelet-derived growth factor-BB-binding protein and regulates growth factor-induced common postreceptor signal in vascular smooth muscle cell.* Circulation, 2002. **105**(24): p. 2893-8.

403. Tian, L., et al., *Adiponectin reduces lipid accumulation in macrophage foam cells.* Atherosclerosis, 2009. **202**(1): p. 152-61.

404. Tsubakio-Yamamoto, K., et al., *Adiponectin prevents atherosclerosis by increasing cholesterol efflux from macrophages.* Biochem Biophys Res Commun, 2008. **375**(3): p. 390-4.

405. Okamoto, Y., et al., *Adiponectin inhibits the production of CXC receptor 3 chemokine ligands in macrophages and reduces T-lymphocyte recruitment in atherogenesis.* Circ Res, 2008. **102**(2): p. 218-25.

406. Verma, S., et al., *Resistin promotes endothelial cell activation: further evidence of adipokine-endothelial interaction.* Circulation, 2003. **108**(6): p. 736-40.

407. Chen, C., et al., *Resistin decreases expression of endothelial nitric oxide synthase through oxidative stress in human coronary artery endothelial cells.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **299**(1): p. H193-201.

408. Mu, H., et al., *Adipokine resistin promotes in vitro angiogenesis of human endothelial cells.* Cardiovasc Res, 2006. **70**(1): p. 146-57.

409. Silswal, N., et al., *Human resistin stimulates the pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-12 in macrophages by NF-kappaB-dependent pathway.* Biochem Biophys Res Commun, 2005. **334**(4): p. 1092-101.

410. Milan, G., et al., *Resistin and adiponectin expression in visceral fat of obese rats: effect of weight loss.* Obes Res, 2002. **10**(11): p. 1095-103.

411. Beltowski, J., *Leptin and atherosclerosis.* Atherosclerosis, 2006. **189**(1): p. 47-60.

412. Jun, J.Y., et al., *Leptin treatment inhibits the progression of atherosclerosis by attenuating hypercholesterolemia in type 1 diabetic Ins2(+/Akita):apoE(-/-) mice.* Atherosclerosis, 2012. **225**(2): p. 341-7.

413. Hasty, A.H., et al., *Severe hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, and atherosclerosis in mice lacking both leptin and the low density lipoprotein receptor.* J Biol Chem, 2001. **276**(40): p. 37402-8.

414. Aghamohammadzadeh, R., et al., *Perivascular adipose tissue from human systemic and coronary vessels: the emergence of a new pharmacotherapeutic target.* Br J Pharmacol, 2012. **165**(3): p. 670-82.

415. Gomez-Hernandez, A., et al., *[Role of brown and perivascular adipose tissue in vascular complications due to obesity].* Clin Investig Arterioscler, 2013. **25**(1): p. 36-44.

416. Lima-Martinez, M.M., C. Blandenier, and G. Iacobellis, *[Epicardial adipose tissue: more than a simple fat deposit?].* Endocrinol Nutr, 2013. **60**(6): p. 320-8.

417. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent.* J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.

418. Smyth, G.K., *limma: Linear Models for Microarray Data*, in *Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor*. 2005, Springer New York. p. 397-420.

419. Huang da, W., B.T. Sherman, and R.A. Lempicki, *Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources.* Nat Protoc, 2009. **4**(1): p. 44-57.

420. de Hoon, M.J., et al., *Open source clustering software.* Bioinformatics, 2004. **20**(9): p. 1453-4.

421. Saldanha, A.J., *Java Treeview--extensible visualization of microarray data.* Bioinformatics, 2004. **20**(17): p. 3246-8.

422. Iglesias, M.J., et al., *[Gender differences in adiponectin and leptin expression in epicardial and subcutaneous adipose tissue. Findings in patients undergoing cardiac surgery].* Rev Esp Cardiol, 2006. **59**(12): p. 1252-60.

423. Hirata, Y., et al., *Coronary atherosclerosis is associated with macrophage polarization in epicardial adipose tissue.* J Am Coll Cardiol, 2011. **58**(3): p. 248-55.

424. Sacks, H.S., et al., *Depot-specific overexpression of proinflammatory, redox, endothelial cell, and angiogenic genes in epicardial fat adjacent to severe stable coronary atherosclerosis.* Metab Syndr Relat Disord, 2011. **9**(6): p. 433-9.

425. Jaffer, I., et al., *Expression of fat mobilizing genes in human epicardial adipose tissue.* Atherosclerosis, 2012. **220**(1): p. 122-7.

426. Shimabukuro, M., et al., *Epicardial adipose tissue volume and adipocytokine imbalance are strongly linked to human coronary atherosclerosis.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013. **33**(5): p. 1077-84.

427. Hirata, Y., et al., *Enhanced inflammation in epicardial fat in patients with coronary artery disease.* Int Heart J, 2011. **52**(3): p. 139-42.

428. Zhou, X. and G.K. Hansson, *Detection of B cells and proinflammatory cytokines in atherosclerotic plaques of hypercholesterolaemic apolipoprotein E knockout mice.* Scand J Immunol, 1999. **50**(1): p. 25-30.

429. Wilcox, J.N. and N.A. Scott, *Potential role of the adventitia in arteritis and atherosclerosis.* Int J Cardiol, 1996. **54 Suppl**: p. S21-35.

430. Parums, D. and M.J. Mitchinson, *Demonstration of immunoglobulin in the neighbourhood of advanced atherosclerotic plaques.* Atherosclerosis, 1981. **38**(1-2): p. 211-6.

431. Houtkamp, M.A., et al., *Adventitial infiltrates associated with advanced atherosclerotic plaques: structural organization suggests generation of local humoral immune responses.* J Pathol, 2001. **193**(2): p. 263-9.

432. Higuchi, M.L., et al., *Comparison between adventitial and intimal inflammation of ruptured and nonruptured atherosclerotic plaques in human coronary arteries.* Arq Bras Cardiol, 2002. **79**(1): p. 20-4.

433. Aubry, M.C., et al., *B-Lymphocytes in plaque and adventitia of coronary arteries in two patients with rheumatoid arthritis and coronary atherosclerosis: preliminary observations.* Cardiovasc Pathol, 2004. **13**(4): p. 233-6.

434. Galkina, E., et al., *Lymphocyte recruitment into the aortic wall before and during development of atherosclerosis is partially L-selectin dependent.* J Exp Med, 2006. **203**(5): p. 1273-82.

435. Mahabadi, A.A., et al., *Association of pericoronary fat volume with atherosclerotic plaque burden in the underlying coronary artery: a segment analysis.* Atherosclerosis, 2010. **211**(1): p. 195-9.

436. Tavora, F., et al., *Adventitial lymphocytic inflammation in human coronary arteries with intimal atherosclerosis.* Cardiovasc Pathol, 2010. **19**(3): p. e61-8.

437. Campbell, K.A., et al., *Lymphocytes and the adventitial immune response in atherosclerosis.* Circ Res, 2012. **110**(6): p. 889-900.

438. Aubry, M.C., et al., *Differences in atherosclerotic coronary heart disease between subjects with and without rheumatoid arthritis.* J Rheumatol, 2007. **34**(5): p. 937-42.

439. Kortelainen, M.L. and K. Porvari, *Adventitial macrophage and lymphocyte accumulation accompanying early stages of human coronary atherogenesis.* Cardiovasc Pathol, 2014. **23**(4): p. 193-7.

440. Eiras, S., et al., *Extension of coronary artery disease is associated with increased IL-6 and decreased adiponectin gene expression in epicardial adipose tissue.* Cytokine, 2008. **43**(2): p. 174-80.

441. Langheim, S., et al., *Increased expression and secretion of resistin in epicardial adipose tissue of patients with acute coronary syndrome.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **298**(3): p. H746-53.

442. Zhou, Y., et al., *Decreased adiponectin and increased inflammation expression in epicardial adipose tissue in coronary artery disease.* Cardiovasc Diabetol, 2011. **10**(1): p. 2.

443. Gormez, S., et al., *Adipose tissue gene expression of adiponectin, tumor necrosis factor-alpha and leptin in metabolic syndrome patients with coronary artery disease.* Intern Med, 2011. **50**(8): p. 805-10.

444. Gao, X., et al., *Association of chemerin mRNA expression in human epicardial adipose tissue with coronary atherosclerosis.* Cardiovasc Diabetol, 2011. **10**: p. 87.

445. Tian, Z., et al., *Perivascular adipose tissue-secreted angiopoietin-like protein 2 (Angptl2) accelerates neointimal hyperplasia after endovascular injury.* J Mol Cell Cardiol, 2013. **57**: p. 1-12.

446. Kumada, M., et al., *Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(1): p. 85-9.

447. Luo, W., et al., *Leptin receptor-induced STAT3-independent signaling pathways are protective against atherosclerosis in a murine model of obesity and hyperlipidemia.* Atherosclerosis, 2011. **214**(1): p. 81-5.

448. Teijeira-Fernandez, E., et al., *Baseline epicardial adipose tissue adiponectin levels predict cardiovascular outcomes: a long-term follow-up study.* Cytokine, 2012. **60**(3): p. 674-80.

449. Wang, B. and P. Trayhurn, *Acute and prolonged effects of TNF-alpha on the expression and secretion of inflammation-related adipokines by human adipocytes differentiated in culture.* Pflugers Arch, 2006. **452**(4): p. 418-27.

450. Yun, K.H., et al., *Relationship between the Echocardiographic Epicardial Adipose Tissue Thickness and Serum Adiponectin in Patients with Angina.* J Cardiovasc Ultrasound, 2009. **17**(4): p. 121-6.

451. Luo, S., H. Lei, and Q. Liu, *Correlation between serum adiponectin and risk factors in patients with coronary artery disease.* Clin Lab, 2013. **59**(1-2): p. 121-6.

452. Momiyama, Y., et al., *Serum resistin levels and cardiovascular events in patients undergoing percutaneous coronary intervention.* J Atheroscler Thromb, 2011. **18**(2): p. 108-14.

453. Ohmori, R., et al., *Associations between serum resistin levels and insulin resistance, inflammation, and coronary artery disease.* J Am Coll Cardiol, 2005. **46**(2): p. 379-80.

454. Sinan, U.Y., et al., *Relationship between increased serum resistin level and severity of coronary artery disease.* Angiology, 2014. **65**(3): p. 239-42.

455. Li, L., et al., *Association between serum resistin level and cardiovascular events in postmenopausal women with acute coronary syndrome undergoing percutaneous coronary intervention.* Chin Med J (Engl), 2013. **126**(6): p. 1058-62.

456. Lehrke, M., et al., *An inflammatory cascade leading to hyperresistinemia in humans.* PLoS Med, 2004. **1**(2): p. e45.

457. Bambace, C., et al., *Inflammatory profile in subcutaneous and epicardial adipose tissue in men with and without diabetes.* Heart Vessels, 2014. **29**(1): p. 42-8.

458. Dutour, A., et al., *Secretory type II phospholipase A2 is produced and secreted by epicardial adipose tissue and overexpressed in patients with coronary artery disease.* J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(2): p. 963-7.

459. Darimont, C., et al., *Contribution of mesothelial cells in the expression of inflammatory-related factors in omental adipose tissue of obese subjects.* Int J Obes (Lond), 2008. **32**(1): p. 112-20.

460. Wilkosz, S., et al., *A comparative study of the structure of human and murine greater omentum.* Anat Embryol (Berl), 2005. **209**(3): p. 251-61.

461. Mandl-Weber, S., et al., *Vascular endothelial growth factor production and regulation in human peritoneal mesothelial cells.* Kidney Int, 2002. **61**(2): p. 570-8.

462. von Frowein, J., et al., *MicroRNA-492 is processed from the keratin 19 gene and up-regulated in metastatic hepatoblastoma.* Hepatology, 2011. **53**(3): p. 833-42.

463. Chan, W.L., et al., *pseudoMap: an innovative and comprehensive resource for identification of siRNA-mediated mechanisms in human transcribed pseudogenes.* Database (Oxford), 2013. **2013**: p. bat001.

464. Wei, J.S., et al., *microRNA profiling identifies cancer-specific and prognostic signatures in pediatric malignancies.* Clin Cancer Res, 2009. **15**(17): p. 5560-8.

465. Das, S., *Evolutionary origin and genomic organization of micro-RNA genes in immunoglobulin lambda variable region gene family.* Mol Biol Evol, 2009. **26**(5): p. 1179-89.

466. Peters, J., *Prader-Willi and snoRNAs.* Nat Genet, 2008. **40**(6): p. 688-9.

467. Duker, A.L., et al., *Paternally inherited microdeletion at 15q11.2 confirms a significant role for the SNORD116 C/D box snoRNA cluster in Prader-Willi syndrome.* Eur J Hum Genet, 2010. **18**(11): p. 1196-201.

468. Tamboli, R.A., et al., *Reduction in inflammatory gene expression in skeletal muscle from Roux-en-Y gastric bypass patients randomized to omentectomy.* PLoS One, 2011. **6**(12): p. e28577.

469. Valleron, W., et al., *Small nucleolar RNA expression profiling identifies potential prognostic markers in peripheral T-cell lymphoma.* Blood, 2012. **120**(19): p. 3997-4005.

470. Bambace, C., et al., *Adiponectin gene expression and adipocyte diameter: a comparison between epicardial and subcutaneous adipose tissue in men.* Cardiovasc Pathol, 2011. **20**(5): p. e153-6.

471. Blachnio-Zabielska, A.U., et al., *Increased bioactive lipids content in human subcutaneous and epicardial fat tissue correlates with insulin resistance.* Lipids, 2012. **47**(12): p. 1131-41.

472. Salgado-Somoza, A., et al., *Changes in lipid transport-involved proteins of epicardial adipose tissue associated with coronary artery disease.* Atherosclerosis, 2012. **224**(2): p. 492-9.

473. Mehta, N.N., et al., *Experimental endotoxemia induces adipose inflammation and insulin resistance in humans.* Diabetes, 2010. **59**(1): p. 172-81.

474. Vatier, C., et al., *Visceral and subcutaneous adipose tissue from lean women respond differently to lipopolysaccharide-induced alteration of inflammation and glyceroneogenesis.* Nutr Diabetes, 2012. **2**: p. e51.

475. Song, M.J., et al., *Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes.* Biochem Biophys Res Commun, 2006. **346**(3): p. 739-45.

476. Lin, Y., et al., *The lipopolysaccharide-activated toll-like receptor (TLR)-4 induces synthesis of the closely related receptor TLR-2 in adipocytes.* J Biol Chem, 2000. **275**(32): p. 24255-63.

477. Bassols, J., et al., *Study of the proinflammatory role of human differentiated omental adipocytes.* J Cell Biochem, 2009. **107**(6): p. 1107-17.

478. Fain, J.N., S.W. Bahouth, and A.K. Madan, *TNFalpha release by the nonfat cells of human adipose tissue.* Int J Obes Relat Metab Disord, 2004. **28**(4): p. 616-22.

479. Brenner, C., et al., *TLR signalling and adapter utilization in primary human in vitro differentiated adipocytes.* Scand J Immunol, 2012. **76**(4): p. 359-70.

480. Kaser, S., et al., *Resistin messenger-RNA expression is increased by proinflammatory cytokines in vitro.* Biochem Biophys Res Commun, 2003. **309**(2): p. 286-90.

481. Biswas, S.K. and E. Lopez-Collazo, *Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance.* Trends Immunol, 2009. **30**(10): p. 475-87.

482. Juge-Aubry, C.E., et al., *Adipose tissue is a regulated source of interleukin-10.* Cytokine, 2005. **29**(6): p. 270-4.

483. Alvarez-Llamas, G., et al., *Characterization of the human visceral adipose tissue secretome.* Mol Cell Proteomics, 2007. **6**(4): p. 589-600.

484. Shah, R., et al., *Gene profiling of human adipose tissue during evoked inflammation in vivo.* Diabetes, 2009. **58**(10): p. 2211-9.

485. Poulain-Godefroy, O., et al., *Inflammation is associated with a decrease of lipogenic factors in omental fat in women.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2008. **295**(1): p. R1-7.

ANNEX

Annex. Llistat complet ordenat alfabèticament dels símbols dels gens utilitzats junt al numero de identificació de Affimetrix, el nom complet del gen i la citobanda cromosòmica corresponent.

Símbol	Identificació	Nom	Citobanda
ABCA6	8017964	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 6	17q24.3
ABCA9	8017927	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 9	17q24.2
ABCD2	7962312	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 2	12q11-q12
ACACB	7958466	acetyl-CoA carboxylase beta	12q24.11
ACP5	8034304	acid phosphatase 5, tartrate resistant	12q24.11
ADCY5	8090070	adenylate cyclase 5	3q13.2-q21
ADH1C	8101893	alcohol dehydrogenase 1C (class I), gamma polypeptide	19p13.3-p13.2
ADH4	8101852	alcohol dehydrogenase 4 (class II), pi polypeptide	4q23
ADIPOQ	8084710	adiponectin, C1Q and collagen domain containing	c("4q21-q24", "4q22")
ADORA3	7918533	adenosine A3 receptor	3q27
AH25H,			1p13.2
AKR1C3	7925929	aldo-keto reductase family 1, member C3 (3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type II)	
AMOTL2	8090852	angiomotin like 2	10p15-p14
ANGPTL7	7897675	angiopoietin-like 7	1p36
ANXA8L1	7933312	annexin A8-like 1	3q21-q22
APOB	8050619	apolipoprotein B (including Ag(x) antigen)	2p24-p23
APOC1	8029536	apolipoprotein C-I	10q11.22
APOL4	8075709	apolipoprotein L, 4	19q13.2
AQP1	8132118	aquaporin 1 (Colton blood group)	7p14
AQP3	8160670	aquaporin 3 (Gill blood group)	22q11.2-q13.2
BCL2A1	7990818	BCL2-related protein A1	9p13
BMPR1B	8096511	bone morphogenetic protein receptor, type IB	4q22-q24
BNC1	7991080	basonuclin 1	15q25.2
BTN3A1	8117458	butyrophilin, subfamily 3, member A1	15q24.3
BTN3A2	8117435	butyrophilin, subfamily 3, member A2	6p22.1
BTN3A3	8117476	butyrophilin, subfamily 3, member A3	6p22.1
C1QA	7898793	complement component 1, q subcomponent, A chain	6p21.3
C1QB	7898805	complement component 1, q subcomponent, B chain	1p36.12
C1QC	7898799	complement component 1, q subcomponent, C chain	1p36.12
C2	8118324	complement component 2	1p36.12
C3AR1	7960874	complement component 3a receptor 1	1p36.11
C4A	8118409	complement component 4A (Rodgers blood group)	6p21.3
C6	8111864	complement component 6	6p21.3
C7	8105084	complement component 7	6p21.3
CCL11	8006445	chemokine (C-C motif) ligand 11	12p13.31
CCL13	8006459	chemokine (C-C motif) ligand 13	6p21.3
CCL18	8006594	chemokine (C-C motif) ligand 18 (pulmonary and activation-regulated)	6p21.3
CCL19	8160879	chemokine (C-C motif) ligand 19	6p21.3
CCL2	8006433	chemokine (C-C motif) ligand 2	17q11.2-q12
CCL20	8048864	chemokine (C-C motif) ligand 20	5p13
CCL22	7996022	chemokine (C-C motif) ligand 22	5p13
CCL3	8014369	chemokine (C-C motif) ligand 3	5p13
CCL3L1	8014391	chemokine (C-C motif) ligand 3-like 1	17q21.1-q21.2
CCL4	8006602	chemokine (C-C motif) ligand 4	17q21.1-q21.2
CCL4L1	8006621	chemokine (C-C motif) ligand 4-like 1	17q11.2

Símbol	Identificació	Nom	Citobanda
CCL5	8014316	chemokine (C-C motif) ligand 5	17q11.2
CCL7	8006440	chemokine (C-C motif) ligand 7	17q11.2
CCL8	8006453	chemokine (C-C motif) ligand 8	9p13
CCR7	8015031	chemokine (C-C motif) receptor 7	2q33-q37
CD200	8081657	CD200 molecule	16q13
CD36	8133876	CD36 molecule (thrombospondin receptor)	17q12
CD3D	7952056	CD3d molecule, delta (CD3-TCR complex)	17q21.1
CD48	7921667	CD48 molecule	17q21.1
CD80	8089771	CD80 molecule	17q21.1
CDH2	8022674	cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal)	17q21.1
CDH6	8104663	cadherin 6, type 2, K-cadherin (fetal kidney)	17q12
CEBPA	8036004	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha	17q12
CFI	8102328	complement factor I	17q12
CHI3L1	7923547	chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)	17q11.2-q12
CHI3L2	7903920	chitinase 3-like 2	17q11.2-q12
CIDEC	8085244	cell death-inducing DFFA-like effector c	3p25.3
CLC	8036755	Charcot-Leyden crystal protein	17q11.2-q12
CLDN1	8092726	claudin 1	3q28-q29
CLSTN2	8083034	calsyntenin 2	17q11.2
COL12A1	8127563	collagen, type XII, alpha 1	17q12-q21.2
CR1	7909371	complement component (3b/4b) receptor 1 (Knops blood group)	3q12-q13
CSF1R	8115076	colony stimulating factor 1 receptor	7q11.2
CSF2RB	8072757	colony stimulating factor 2 receptor, beta, low-affinity (granulocyte-macrophage)	11q23
CSN1S1	8095412	casein alpha s1	4q21.1
CX3CL1	7996027	chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	1q21.3-q22
CXADR	8067955	coxsackie virus and adenovirus receptor	3q13.3-q21
CXCL1	8095697	chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)	18q11.2
CXCL10	8101126	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	5p13.3
CXCL11	8101131	chemokine (C-X-C motif) ligand 11	19q13.1
CXCL16	8011713	chemokine (C-X-C motif) ligand 16	4q25
CXCL2	8100994	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	4q25
CXCL3	8100984	chemokine (C-X-C motif) ligand 3	1q32.1
CXCL5	8100977	chemokine (C-X-C motif) ligand 5	1p13.3
CXCL6	8095688	chemokine (C-X-C motif) ligand 6 (granulocyte chemotactic protein 2)	19q13.1
CXCL9	8101118	chemokine (C-X-C motif) ligand 9	3q23
CYP1B1	8051583	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	6q12-q13
CYP7B1	8151056	cytochrome P450, family 7, subfamily B, polypeptide 1	1q32
CYSLTR2	7969050	cysteinyl leukotriene receptor 2	1q32
DCN	7965410	decorin	5q32
DGAT2	7942613	diacylglycerol O-acyltransferase 2	5q32
DHRS9	8046124	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9	22q13.1
DKK1	7927631	dickkopf homolog 1 (Xenopus laevis)	16q13
DNASE1L1	8176076	deoxyribonuclease I-like 1	Xq28
DPP4	8056222	dipeptidyl-peptidase 4	21q21.1
DSC3	8022692	desmocollin 3	4q21
DSEL	8023727	dermatan sulfate epimerase-like	4q21
EDIL3	8112980	EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3	4q21.2
EFCAB4B	7960370	EF-hand calcium binding domain 4B	12p13.32

Símbol	Identificació	Nom	Citobanda
ELOVL2	8123920	ELOVL fatty acid elongase 2	17p13
EMR3	8034851	egf-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like 3	17p13
EPCAM	8098439	epithelial cell adhesion molecule	2p21
F2RL1	8106403	coagulation factor II (thrombin) receptor-like 1	4q21
FCAR	8031374	Fc fragment of IgA, receptor for	4q21
FCER1G	7906720	Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; gamma polypeptide	4q13.3
FCGR1A	7905047	Fc fragment of IgG, high affinity Ia, receptor (CD64)	4q13.3
FCRL3	7921275	Fc receptor-like 3	4q13.3
FGF1	8114805	fibroblast growth factor 1 (acidic)	4q21
FGF2	8097256	fibroblast growth factor 2 (basic)	2p22.2
FMO2	7907271	flavin containing monooxygenase 2 (non-functional)	1q24.3
FPR1	8038899	formyl peptide receptor 1	8q21.3
GALNTL2	8078155	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 2	13q14.2
GBP1	7917516	guanylate binding protein 1, interferon-inducible	13q14.2
GBP2	7917532	guanylate binding protein 2, interferon-inducible	12q21.33
GBP3	7917503	guanylate binding protein 3	11q13.5
GBP4	7917561	guanylate binding protein 4	2q31.1
GBP5	7917576	guanylate binding protein 5	10q11.2
GBP7	7917548	guanylate binding protein 7	2q24.3
GPAM	8113356	glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial	18q12.1
GPD1	7955348	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)	18q22.1
GPR34	8166906	G protein-coupled receptor 34	Xp11.4
GPX8	8105348	glutathione peroxidase 8 (putative)	18q22.1
GTSF1	7963817	gametocyte specific factor 1	12q13.13
GYS2	7961673	glycogen synthase 2 (liver)	12p12.2
GZMK	8105331	granzyme K (granzyme 3; tryptase II)	5q14
HCK	8061668	hemopoietic cell kinase	6p24.2
HGF	8140556	hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)	19p13.1
HLA-DRB5	8125436	major histocompatibility complex, class II, DR beta 5	6p21.3
HLA-F	8117760	major histocompatibility complex, class I, F	5q13
HOXA5	8138735	homeobox A5	19q13.42
HOXA6	8138741	homeobox A6	1q23
HOXA7	8138745	homeobox A7	1q21.2-q21.3
HOXA9	8138749	homeobox A9	1q21-q22
HOXC8	7955869	homeobox C8	5q31
HOXC9	7955865	homeobox C9	4q26
HP	7997188	haptoglobin	19q13.4
HPGDS	8101780	hematopoietic prostaglandin D synthase	3p25.1
HPR	7997192	haptoglobin-related protein	1p22.2
IER3	8124848	immediate early response 3	1p22.2
IFI27	7976443	interferon, alpha-inducible protein 27	1p22.2
IFI35	8007446	interferon-induced protein 35	1p22.2
IFI44	7902553	interferon-induced protein 44	1p22.2
IFI44L	7902541	interferon-induced protein 44-like	1p22.2
IFI6	7914127	interferon, alpha-inducible protein 6	1p22.2
IFIH1	8056285	interferon induced with helicase C domain 1	10q25.2
IFIT1	7929065	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	12q12-q13
IFIT2	7929047	interferon-induced protein with tetratricopeptide	5q11.2

Símbol	Identificació	Nom	Citobanda
		repeats 2	
IFIT3	7929052	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	5q11.2
IFIT5	7929072	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 5	20q11-q12
IFITM1	7937335	interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	7q21.1
IGF1	7965873	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	6p21.3
IL10	7923907	interleukin 10	6p21.3
IL13RA1	8169580	interleukin 13 receptor, alpha 1	6p21.3
IL13RA2	8174598	interleukin 13 receptor, alpha 2	7p15.2
IL15RA	7931899	interleukin 15 receptor, alpha	7p15.2
IL18	7951686	interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor)	7p15.2
IL18BP	7942300	interleukin 18 binding protein	7p15.2
IL1A	8054712	interleukin 1, alpha	12q13.3
IL1B	8054722	interleukin 1, beta	12q13.3
IL1RN	8044574	interleukin 1 receptor antagonist	16q22.2
IL20	7909261	interleukin 20	4q22.3
IL24	7909271	interleukin 24	16q22.1
IL2RA	7931914	interleukin 2 receptor, alpha	6p21.3
IL2RG	8173444	interleukin 2 receptor, gamma	6p21.3
IL32	7992828	interleukin 32	6p21.3
IL6	8131803	interleukin 6 (interferon, beta 2)	6p21.3
IL7R	8104901	interleukin 7 receptor	6p21.3
INSIG2	8044766	insulin induced gene 2	6p21.3
IRAK2	8077786	interleukin-1 receptor-associated kinase 2	14q32
IRF1	8114010	interferon regulatory factor 1	17q21
IRF7	7945462	interferon regulatory factor 7	1p31.1
IRF9	7973618	interferon regulatory factor 9	1p31.1
ISG15	7896817	ISG15 ubiquitin-like modifier	1p35
ISG20	7985777	interferon stimulated exonuclease gene 20kDa	2q24
ITGA2	8105267	integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)	5q11.2
ITGA7	7963880	integrin, alpha 7	12q13
JAK2	8154178	Janus kinase 2	10q23.31
KCND2	8135705	potassium voltage-gated channel, Shal-related subfamily, member 2	7q31
KLF15	8090343	Kruppel-like factor 15	3q21.3
KLRC4-KLRK1	7961173	KLRC4-KLRK1 readthrough	10q23.31
KRT18	7955637	keratin 18	10q24
KRT19	8015349	keratin 19	10q23.31
KRT7	7955613	keratin 7	11p15.5
KRT8	7963567	keratin 8	12q23.2
KRT9	8015357	keratin 9	17q21.1-q21.2
LBP	8062461	lipopolysaccharide binding protein	1q31-q32
LCN1	8158995	lipocalin 1 (tear prealbumin)	9q34
LCN2	8158167	lipocalin 2	Xq24
LEP	8135909	leptin	Xq13.1-q28
LGALS12	7940762	lectin, galactoside-binding, soluble, 12	10p15.1
LGALS9	8005809	lectin, galactoside-binding, soluble, 9	11q22.2-q22.3
LGALS9C	8005458	lectin, galactoside-binding, soluble, 9C	11q22.2-q22.3
LIPE	8037186	lipase, hormone-sensitive	11q22.2-q22.3

Símbol	Identificació	Nom	Citobanda
LMOD1	7923386	leiomodin 1 (smooth muscle)	11q13
LOC339524	7902808	hypothetical LOC339524	2q14
LOC644714	8161943	hypothetical LOC644714	3p21.31
LTBP1	8041383	latent transforming growth factor beta binding protein 1	2q14.2
LY96	8146934	lymphocyte antigen 96	1q32
LYVE1	7946579	lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1	11p15
MAB21L1	7970949	mab-21-like 1 (C. elegans)	1q32
MAOA	8166925	monoamine oxidase A	Xp11.3
MARCH1	8103508	membrane-associated ring finger (C3HC4) 1	10p15-p14
MCP-1			Xq13.1
ME1	8127854	malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic	Xq13.1
MGP	7961514	matrix Gla protein	16p13.3
MIR31	8160439	microRNA 31	7p21
MIR492	7957608	microRNA 492	7p21
MIR622	7969574	microRNA 622	5p13
MOSC1	7909877	MOCO sulphurase C-terminal domain containing 1	2q14.2
MRC1	7926410	mannose receptor, C type 1	3p25.3
MS4A1	7940287	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1	5q31.1
MSLN	7992071	mesothelin	11p15.5
MSR1	8149448	macrophage scavenger receptor 1	14q11.2
MT1M	7995787	metallothionein 1M	16q13
MX1	8068713	myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse)	1p36.33
MX2	8068697	myxovirus (influenza virus) resistance 2 (mouse)	15q26
MYB	8122202	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)	15q26
NCAM1	7943892	neural cell adhesion molecule 1	9p24
NMI	8055702	N-myc (and STAT) interactor	12p
NOTCH3	8034940	notch 3	12q13
NR4A2	8055952	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	12q13
NRCAM	8142270	neuronal cell adhesion molecule	17q21.2
OAS1	7958884	2'-5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	17q21.2
OAS2	7958913	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	12q13.13
OAS3	7958895	2'-5'-oligoadenylate synthetase 3, 100kDa	12q13
OASL	7967117	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	20q11.23
ORM1	8157446	orosomucoid 1	9q34
ORM2	8157450	orosomucoid 2	7q31.3
PAX3	8059301	paired box 3	11q13
PCK1	8063590	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (soluble)	17q11.2
PCSK1	8113234	proprotein convertase subtilisin/kexin type 1	5q15-q21
PLA2G2A	7913216	phospholipase A2, group IIA (platelets, synovial fluid)	17p11.2
PLA2G4A	7908351	phospholipase A2, group IVA (cytosolic, calcium-dependent)	19q13.2
PLIN4	8032829	perilipin 4	1q32
PLTP	8066619	phospholipid transfer protein	
PNPT1	8052331	polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1	1p22.3
PPARG	8077899	peroxisome proliferator-activated receptor gamma	2p22-p21
PPBP	8100971	pro-platelet basic protein (chemokine (C-X-C motif) ligand 7)	8q21.11
PRG4	7908312	proteoglycan 4	13q13
PSG7	8037251	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 7 (gene/pseudogene)	4q32.2
PSMB8	8125500	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 8	

Símbol	Identificació	Nom	Citobanda
		(large multifunctional peptidase 7)	
PTGDS	8159521	prostaglandin D2 synthase 21kDa (brain)	6q12
PTGIS	8066925	prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase	6q12
PTGR1	8163328	prostaglandin reductase 1	12p12.3
PTGS1	8157650	prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	9p21.3
PTX3	8083594	pentraxin 3, long	12q22
PXDNL	8150704	peroxidasin homolog (Drosophila)-like	13q31.3
RBP7	7897522	retinol binding protein 7, cellular	1q41
RETN	8025278	resistin	10p12.33
RGS4	7906919	regulator of G-protein signaling 4	1q23.3
RNU2-1	8019707	RNA, U2 small nuclear 1	17q12-q21
RNU4-1	7967030	RNA, U4 small nuclear 1	12q24.31
RNU4-2	7967028	RNA, U4 small nuclear 2	12q24.31
RNU5E-1	7897801	RNA, U5E small nuclear 1	1p36.22
S100A9	7905571	S100 calcium binding protein A9	11q12
S100B	8071036	S100 calcium binding protein B	21q22.3
SAA1	7946986	serum amyloid A1	11p15.1
SAA2	8180303	serum amyloid A2	11p15.1-p14
SCD	7935776	stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)	16p13.3
SDPR	8057797	serum deprivation response	8p22
SDS	7966621	serine dehydratase	21q22.3
SELP	7922200	selectin P (granule membrane protein 140kDa, antigen CD62)	21q22.3
SEMA3D	8140686	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3D	6q22-q23
SEMA3G	8087907	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3G	11q23.1
SEPP1	8111915	selenoprotein P, plasma, 1	2q23
SGK2	8062728	serum/glucocorticoid regulated kinase 2	20q13.2
SGPP2	8048717	sphingosine-1-phosphate phosphatase 2	19p13.2-p13.1
SIAE	7944867	sialic acid acetylesterase	11q24
SLC7A11	8102800	solute carrier family 7 (anionic amino acid transporter light chain, xc- system), member 11	4q28-q32
SNORA20	8130578	small nucleolar RNA, H/ACA box 20	6q25.3
SNORA21	8014755	small nucleolar RNA, H/ACA box 21	17q12
SNORA22	8133106	small nucleolar RNA, H/ACA box 22	2q22-q23
SNORA23	7938329	small nucleolar RNA, H/ACA box 23	11p15.4
SNORA3	7938291	small nucleolar RNA, H/ACA box 3	11p15
SNORA49	7960052	small nucleolar RNA, H/ACA box 49	12q24.33
SNORA54	7945801	small nucleolar RNA, H/ACA box 54	11p15.4
SNORA68	8026875	small nucleolar RNA, H/ACA box 68	7q31
SNORA7B	8090565	small nucleolar RNA, H/ACA box 7B	3q21.3
SNORD105	8025584	small nucleolar RNA, C/D box 105	19p13.2
SNORD113-4	7976812	small nucleolar RNA, C/D box 113-4	12q24.2
SNORD114-26	7976826	small nucleolar RNA, C/D box 114-26	12q24.2
SNORD114-3	7976816	small nucleolar RNA, C/D box 114-3	12q24.2
SNORD116-1	7981949	small nucleolar RNA, C/D box 116-1	15q11.2
SNORD116-20	7981988	small nucleolar RNA, C/D box 116-20	15q11.2

Símbol	Identificació	Nom	Citobanda
SNORD116-22	7981992	small nucleolar RNA, C/D box 116-22	15q11.2
SNORD116-24	7981996	small nucleolar RNA, C/D box 116-24	15q11.2
SNORD116-26	7982000	small nucleolar RNA, C/D box 116-26	15q11.2
SNORD116-27	7982002	small nucleolar RNA, C/D box 116-27	15q11.2
SNORD116-29	7982006	small nucleolar RNA, C/D box 116-29	15q11.2
SNORD116-3	7981953	small nucleolar RNA, C/D box 116-3	15q11.2
SNORD116-4	7981955	small nucleolar RNA, C/D box 116-4	15q11.2
SNORD116-5	7981958	small nucleolar RNA, C/D box 116-5	15q11.2
SNORD116-6	7981960	small nucleolar RNA, C/D box 116-6	15q11.2
SNORD116-8	7981964	small nucleolar RNA, C/D box 116-8	15q11.2
SNORD29	7948902	small nucleolar RNA, C/D box 29	11q13
SNORD32A	8030360	small nucleolar RNA, C/D box 32A	19q13.3
SNORD34	8030364	small nucleolar RNA, C/D box 34	12q24.2
SNORD36B	8159006	small nucleolar RNA, C/D box 36B	9q31-q32
SNORD41	8034512	small nucleolar RNA, C/D box 41	19p13.2
SNORD44	7922410	small nucleolar RNA, C/D box 44	9q32
SNORD45A	7902398	small nucleolar RNA, C/D box 45A	c("2q35", "2q35-q37")
SNORD45B	7902400	small nucleolar RNA, C/D box 45B	20q13.31
SNORD46	7901048	small nucleolar RNA, C/D box 46	1p34.1
SNORD47	7922402	small nucleolar RNA, C/D box 47	20q13.31
SNORD58A	8023259	small nucleolar RNA, C/D box 58A	18q21
SNORD60	7998722	small nucleolar RNA, C/D box 60	16p13.3
SNORD63	8114468	small nucleolar RNA, C/D box 63	5q31.2
SNORD78	7922408	small nucleolar RNA, C/D box 78	1p35
SNORD80	7922404	small nucleolar RNA, C/D box 80	1q25.1
SNORD82	8059712	small nucleolar RNA, C/D box 82	2q37.1
SNORD94	8043276	small nucleolar RNA, C/D box 94	2p11.2
SOCS1	7999423	suppressor of cytokine signaling 1	1q25
SORBS1	7935188	sorbin and SH3 domain containing 1	19p13.3
SPP1	8096301	secreted phosphoprotein 1	20q13.12
SREBF1	8013135	sterol regulatory element binding transcription factor 1	2p15
SSX2IP	7917255	synovial sarcoma, X breakpoint 2 interacting protein	3p25
ST3GAL1	8153021	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 1	4q12-q13
STAT1	8057744	signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	1q25-q31
STAT2	7964119	signal transducer and activator of transcription 2, 113kDa	19q13.2
STAT5A	8007212	signal transducer and activator of transcription 5A	6p21.3
STAT5B	8015590	signal transducer and activator of transcription 5B	9q34.2-q34.3
SVEP1	8163202	sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain containing 1	9q32
TAP1	8125512	transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	20q13.13
TAPBP	8178977	TAP binding protein (tapasin)	9q31.3
TBX3	7966690	T-box 3	9q32-q33.3
TCP11L2	7958262	t-complex 11 (mouse)-like 2	3q25
THRSP	7942793	thyroid hormone responsive	8q11.22-q11.23

Símbol	Identificació	Nom	Citobanda
TLR2	8097903	toll-like receptor 2	1p36.22
TLR5	7924499	toll-like receptor 5	19p13.2
TMEM62	7983157	transmembrane protein 62	1q21
TNC	8163637	tenascin C	10q24.31
TNF	8118142	tumor necrosis factor	2q32-q33
TNFAIP2	7977046	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2	12q24.13
TNFAIP3	8122265	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	12q24.13
TNFAIP6	8045688	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6	1q22-q25
TNFAIP8	8107520	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8	7q21.11
TNFSF13B	7969986	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b	3p21.1
TNFSF15	8163618	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 15	5q31
TNIP1	8115210	TNFAIP3 interacting protein 1	5q31
TNIP3	8102594	TNFAIP3 interacting protein 3	2q36.1
TRAF1	8163825	TNF receptor-associated factor 1	7q11.21
TSPAN5	8101828	tetraspanin 5	19p13
TUSC5	8003635	tumor suppressor candidate 5	17p13.3
UGCG	8157216	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase	14q32.31
VAT1L	7997336	vesicle amine transport protein 1 homolog (T. californica)-like	14q32
VCAM1	7903358	vascular cell adhesion molecule 1	14q32
VDR	7962689	vitamin D (1,25- dihydroxyvitamin D3) receptor	19q13.3
VEGFA	8119898	vascular endothelial growth factor A	6p12
VSIG4	8173287	V-set and immunoglobulin domain containing 4	Xq12-q13.3
VTRNA1-1	8108627	vault RNA 1-1	5q31.3